

**Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова –
обособленное структурное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской академии наук»**

На правах рукописи

ПАВЛОВ РАИС ВАЛЕРЬЕВИЧ

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

1.4.4. ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
Кандидат химических наук
Гайнанова Гульнара Ахатовна

Казань – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. НАПРАВЛЕННЫЙ ДИЗАЙН МИЦЕЛЛЯРНЫХ И ЛИПИДНЫХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ. ОПТИМИЗАЦИЯ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ЗАДАЧ | 11 |
| 1.1. Высокоорганизованные среды на основе катионных ПАВ | 12 |
| 1.1.1. Процессы агрегации и солюбилизации в водных растворах катионных ПАВ. | 12 |
| 1.1.2. Термодинамика самоорганизации ПАВ на поверхности раздела вода – воздух и в объеме раствора..... | 17 |
| 1.1.3. Биомедицинский потенциал дикатионных ПАВ | 21 |
| 1.1.4. Биоразлагаемые ПАВ – новое направление в синтезе и исследовании амфифильных соединений | 26 |
| 1.2. Липосомы как универсальные наноконтейнеры | 28 |
| 1.2.1. Основные физико-химические и <i>in vitro</i> параметры липосомальных композиций в водных дисперсиях..... | 28 |
| 1.2.2. Дизайн липосомальных носителей методом ковалентной и нековалентной модификации липидного бислоя | 33 |
| 1.2.3. Керасомы и порфисомы в качестве везикулярных наноносителей следующего поколения..... | 43 |
| 1.2.4. Обзор механизмов преодоления биологических барьеров липосомальными системами..... | 48 |
| ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 53 |
| 2.1. Исходные вещества и реагенты | 53 |
| 2.2. Приготовление растворов и образцов | 62 |
| 2.3. Методы измерения | 63 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. НАПРАВЛЕННАЯ НАСТРОЙКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ..... | 71 |
| 3.1. Самоорганизация и антимикробная активность дикатионных геминальных ПАВ, содержащих карбаматные фрагменты..... | 73 |
| 3.1.1. Влияние длины алкильных фрагментов на пороги агрегации и термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования карбаматсодержащих геминальных ПАВ..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.2. Влияние структурных параметров на солубилизацию и полярность микроокружения в мицеллах карбаматсодержащих геминальных ПАВ | 78 |
| 3.1.3. Антимикробная активность карбаматсодержащих геминальных ПАВ | 83 |
| 3.2. Разработка катионных липосом с включением липида ДОТАП, нековалентно модифицированных амфифильными пептидами C ₁₂ -GGRGD-NH ₂ и C ₁₂ -GGGHK-NH ₂ | 87 |
| 3.3. Модуляция дзета-потенциала липосом путём встраивания катионных ПАВ в липидный бислой..... | 92 |
| 3.4. Нековалентная модификация липосом дикатионными карбаматсодержащими ПАВ и амфифильным пептидом C ₁₆ -SSRGD-NH ₂ | 95 |
| 3.4.1. Подбор длины гидрофобной части геминального ПАВ для достижения оптимальных значений дзета-потенциала и цитотоксичности | 95 |
| 3.4.2. Изменение морфологических характеристик липосом при модификации карбаматсодержащим геминальным ПАВ и катионным липидом ДОТАП | 100 |
| 3.4.3. Влияние катионных компонентов и амфифильного пептида C ₁₆ -SSRGD-NH ₂ на эффективность взаимодействия липосом с мембранами клеток рака простаты PC-3 | 103 |
| 3.5. Катионные липосомы, модифицированные гидроксиэтилированными геминальными ПАВ, для доставки 2-ПАМ в мозг..... | 110 |
| 3.5.1. Подбор спейсерного фрагмента геминального ПАВ для достижения оптимальных значений дзета-потенциала и стабильности липосом | 110 |
| 3.5.2. Инкапсуляция гидрофильных субстратов родамина Б и 2-ПАМ в липосомы и оценка эффективности загрузки | 112 |
| 3.5.3. Биосовместимость и проникновение через ГЭБ катионных липосом, модифицированных гидроксиэтилированными геминальными ПАВ..... | 115 |
| 3.5.4. Реактивация ацетилхолинэстеразы головного мозга и фармакокинетика 2-ПАМ, инкапсулированного в катионные липосомы | 118 |
| 3.6. Разработка порфисом методом нековалентной модификации с использованием очищенных нефтяных порфиринов | 120 |
| 3.6.1. Оценка способности липосом инкапсулировать нефтяные порфирины..... | 121 |
| 3.6.2. Применение порфисом на основе нефтяных порфиринов для клеточной доставки доксорубина в клетки M-HeLa | 124 |
| 3.7. Разработка гибридных органо-кремниевых наноконтейнеров для доставки лекарств в клетки глиобластомы T98G | 127 |
| 3.7.1. Создание и физико-химический анализ керасом, полученных методом инъекции, варьирование условий приготовления | 127 |
| 3.7.2. Создание и физико-химический анализ керасом, полученных методом гидратации тонкой плёнки, варьирование состава и анализ морфологической стабильности..... | 130 |

| | |
|---|-----|
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 142 |
| СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ..... | 144 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 146 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ..... | 179 |

ВВЕДЕНИЕ

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 фокусируется 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 солубилизационная 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 дикатионным гидроксиэтилированным 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 дикатионных карбаматсодержащих геминальных ПАВ при варьировании длины гидрофобной части.
2. Оценка влияния доли карбаматсодержащих и гидроксиэтилированных геминальных ПАВ в составе липосом на дзета-потенциал и стабильность модифицированных липосом.
3. Оптимизация методики получения гибридных липидных наноконтейнеров с силоксановой 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 гидроксиэтилированными 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 и списка литературы (322 литературные ссылки на публикации отечественных и зарубежных авторов). Общий объем диссертации составляет 180 страниц, включая 20 таблиц, 59 рисунков. Объем приложения 2 страницы. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, заключения, списка условных обозначений и сокращений, списка использованной литературы и приложения.

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».

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. НАПРАВЛЕННЫЙ ДИЗАЙН МИЦЕЛЛЯРНЫХ И ЛИПИДНЫХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ. ОПТИМИЗАЦИЯ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ЗАДАЧ

В повестке фармацевтических компаний и стартапов в XXI веке важнейшее значение имеет нанотехнология. Благодаря нанотехнологии удаётся экспоненциально расширить спектр новых идей и решений для фармакологии и фармации. К старым, давно устоявшимся терапевтическим приёмам присоединяется множество новых подходов с применением наночастиц, позволяющих улучшать биодоступность плохо растворимых лекарств, преодолевать резистентность, прицельно транспортировать молекулы в определенные ткани и органы, доставлять лекарства за пределы биологических барьеров, совмещать разные терапевтические подходы в составе одной формуляции, визуализировать локации, куда доставляются лекарства [1,2]. С другой стороны, с появлением на рынке первой одобренной к применению липосомальной формуляции доксорубина в 1995 году многие первоначальные ожидания и надежды не были оправданы сполна. Множество последовавших лекарств с использованием наночастиц, предложенных к клиническим испытаниям в 2010-х годах, были недостаточно эффективны [3]. Одними из основных типов наночастиц, используемых в доставке лекарств, являются липосомы и их модификации, полимерные наночастицы и супрамолекулярные ансамбли из амфифильных и макроциклических молекул самой разной природы, а также их комбинаций [2]. Супрамолекулярные структуры и процесс самосборки играют главные роли в формировании подавляющего большинства наночастиц для доставки лекарств, многие из которых состоят из амфифильных молекул – ПАВ или липидов. основополагающим фактором, определяющим свойства супрамолекулярных систем, является природа их составных частей, каждая из которых представляет интерес для физико-химических исследований, в особенности ПАВ, и без того вовлеченные во всевозможные виды деятельности человека [4]. Именно на основе амфифильных молекул – амфифильных лигандов, полимеров и ПАВ – разрабатывается большинство модификаций липосомальных и полимерных систем [5].

1.1. Высокоорганизованные среды на основе катионных ПАВ

Повсеместное практическое применение ПАВ в синтезе наночастиц, мицеллярном катализе, эмульсионной полимеризации, солюбилизации биологически активных и лекарственных веществ, производстве моющих средств и нефтедобычи основано на их способности снижать поверхностное натяжение, образовывать наноразмерные агрегаты и влиять на смачиваемость [6–13]. Особое место занимают катионные ПАВ [7,14,15], и интерес к ним быстро растет в связи с применением в косметике и фармацевтике [16], ингибировании коррозии [17] и синтезе наноматериалов [18]. Синтез новых амфифильных соединений с введением в головную группу функциональных фрагментов или замещением атома, несущего заряд, является мировой практикой поиска новых наноконтейнеров, нанореакторов, антимикробных композиций на основе ПАВ. Наиболее объемная доля экспериментального материала в этом направлении получена на примере солей аммония. ПАВ нового поколения должны при сохранении всех полезных свойств обладать меньшей токсичностью для живых организмов. Одним из направлений снижения токсичности является переход к геминальным ПАВ, так как они характеризуются очень низкими значениями критической концентрации мицеллообразования (ККМ), что позволяет работать с ними в микромолярном диапазоне концентраций [19,20]. Они привлекают все большее внимание исследователей во многих областях науки. Еще одним направлением является применение биоразлагаемых ПАВ. Исследователи внедряют биоразлагаемые компоненты, такие как аминокислотные, карбаматные, амидные или сложноэфирные группы, для снижения экологических последствий [21,22].

1.1.1. Процессы агрегации и солюбилизации в водных растворах катионных ПАВ

Основной движущей силой самоорганизации амфифилов в воде признают гидрофобный эффект – явление совместной агрегации гидрофобных молекул или их частей в водном растворе, в результате которой площадь контакта гидрофобных групп с молекулами воды стремится к минимуму для обеспечения степеней свободы незадействованных в сольватации молекул воды, что выражается в энтропийном выигрыше системы [23]. В случае взаимодействия типичных гидрофобных молекул – углеводов – с водой, которые выступают в роли гидрофобных радикалов в

подавляющем большинстве амфифилов, для минимизации площади контакта между водой и гидрофобным веществом происходит разделение фаз. В случае амфифилов, состоящих, как правило, из углеводородного гидрофобного домена и гидрофильной головной группы ионной или неионной природы, взаимодействие с водой значительно усложняется, поскольку такая смесь термодинамически тяготеет к сольватации головных групп с выигрышем в энтальпии, но противится сольватации гидрофобных радикалов ПАВ. Естественным решением такого противостояния является адсорбция и ориентация молекул на границе раздела фаз и самоорганизация амфифилов в воде.

В процессе самоорганизации молекулы ПАВ формируют плотно упакованные структуры, каждая из которых устроена таким образом, что гидрофильные части амфифилов ориентируется в сторону водной фазы, а гидрофобные радикалы максимально от неё удаляются. Агрегатам, образуемым ПАВ, присуще большое множество структур, среди которых прямые и обратные мицеллы, цилиндрические мицеллы, бислои в форме сплошных мембран или везикул, биконтинуальные структуры (рис. 1.1).

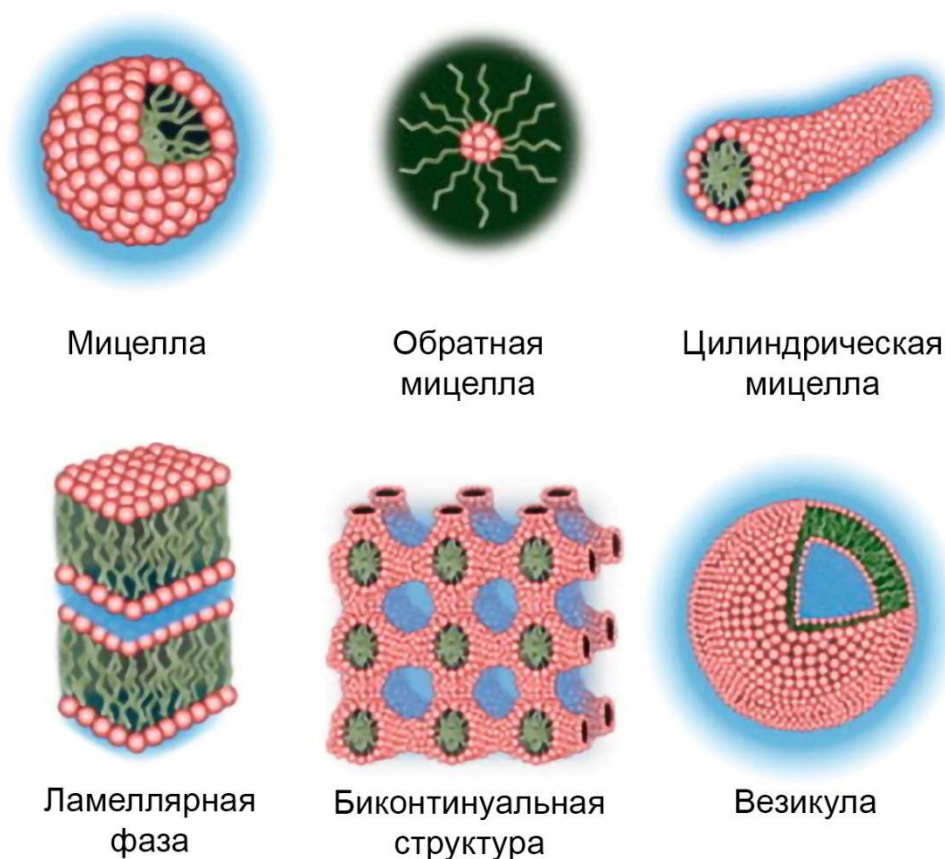


Рисунок 1.1. Изображения некоторых агрегатов, формируемых ПАВ [24].

Структуру получаемых агрегатов обычно предсказывают с помощью параметра упаковки $P = V/(a \cdot l)$, где V — объем гидрофобного фрагмента, a — площадь, занимаемая головной группой ПАВ, l — длина гидрофобного фрагмента [25]. Значение этого параметра характеризует конусность и обращённость формы молекулы ПАВ; так, при $P < 1/3$ молекулы ПАВ имеют форму конуса и стремятся к образованию прямых сферических мицелл; при $1/3 < P < 1/2$ (усеченный конус) образуются цилиндрические мицеллы; при $1/2 < P < 1$ молекула имеет цилиндрическую форму, что обуславливает образование бислоев, а при $P > 1$ молекулы ПАВ соответствуют усеченному инвертированному конусу и склонны к образованию обращенных агрегатов.

С одной стороны, решающую роль в определении параметра упаковки играет структура ПАВ, с другой стороны, фактический объём, который приходится на одну молекулу ПАВ в процессе самоорганизации, и его конечная форма зависит от внешних условий: сольватации, степени экранированности заряда головной группы (для ионных ПАВ), конформации самой молекулы ПАВ, особенно в случаях геминальных ПАВ или ПАВ с конформационно-подвижными двойными связями в структуре. Известно, что добавление солей в раствор ПАВ может приводить к переходу из сферических мицелл в цилиндрические за счет экранирования зарядов головных групп, которое уменьшает их взаимное отталкивание и приводит к уменьшению эффективного объема головной группы ПАВ, а как следствие – к увеличению значения параметра упаковки [26]. Также известно, что одно и то же ПАВ может образовывать разные типы агрегатов при разных концентрациях, так после ККМ для цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) наблюдается образование сферических мицелл, но с повышением концентрации постепенно образуется всё большее число цилиндрических мицелл [27].

Геминальные ПАВ отличаются от традиционных мономерных ПАВ наличием двух заряженных головных групп и гидрофобных заместителей, ковалентно соединённых между собой группой, называемой спейсерным фрагментом (рис. 1.2). Геминальные ПАВ отличаются порогами агрегации, меньшими на порядки в сравнении с аналогичными мономерными ПАВ, что является одной из причин их широкого практического использования в индустриальной [28–32] и биомедицинских [33–35] сферах. У геминальных ПАВ типа n - s - n в зависимости от природы головной группы, длины гидрофобных цепей (n) и гидрофобного спейсерного фрагмента (s) меняются пороги агрегации и структуры, образуемые при самоорганизации.

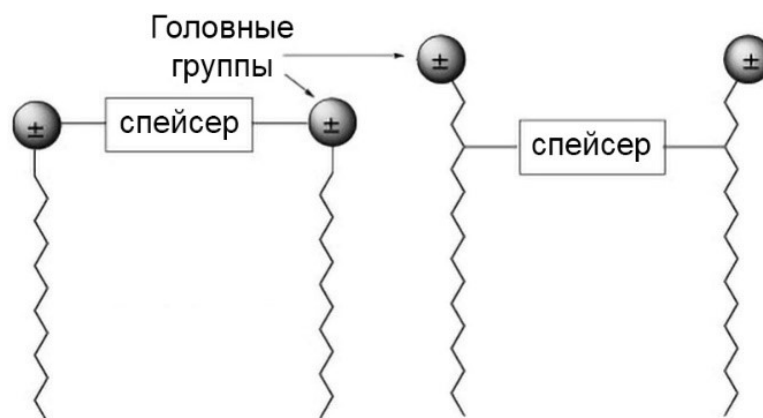


Рисунок 1.2. Структура геминальных (димерных) ПАВ [36].

Как и у других ПАВ, с ростом длины гидрофобных цепей (n) у геминальных ПАВ снижается ККМ, но прежде всего интересно влияние уникального компонента структуры геминальных ПАВ – спейсерного фрагмента. Так, с увеличением длины спейсерного фрагмента на примере серии 12-s-12 показано, что ККМ сначала растёт до достижения максимума при длине спейсерного фрагмента 5-6 атомов углерода, затем падает с дальнейшим увеличением s [37]. При включении гидрофильных групп в состав спейсерного фрагмента значения ККМ падают из-за повышения растворимости мономеров ПАВ [38]. В серии 12-s-12 с увеличением s наблюдается нетипичная последовательность структур: продолговатые мицеллы – сферические мицеллы – везикулы. В то же время в серии ПАВ 16-s-16 с увеличением s наблюдается иная картина: везикулы + продолговатые мицеллы – продолговатые мицеллы – сферические мицеллы [39].

Помимо варьирования структурных характеристик, переходы формируемых агрегатов из мицеллярных в везикулярные и наоборот можно осуществлять под воздействием внешних условий [40]. Так, традиционные аммонийные геминальные ПАВ 12-2-12 могут формировать и мицеллярные, и везикулярные агрегаты в зависимости концентрации ПАВ [41]. Показаны подобные переходы при изменении pH, обусловленные протонированием и отталкиванием атомов азота в кислой среде, что приводит к увеличению площади сечения головной группы, к уменьшению значения параметра упаковки и к переходу от везикулярных и цилиндрических агрегатов к мицеллярным [42]. Также известны переходы при изменении температуры [43], и в присутствии солей, например, показано, что бензоат-анион может приводить к переходу

мицелла-везикула за счет компенсации положительного заряда аммония в составе головных групп геминальных ПАВ [44].

Одно из важнейших свойств ПАВ – это солюбилизующая способность, которая заключается в том, что гидрофобные субстраты могут переходить в жидкую мицеллярную фазу, растворяясь в ядрах формируемых амфифилами агрегатов (рис.1.3).

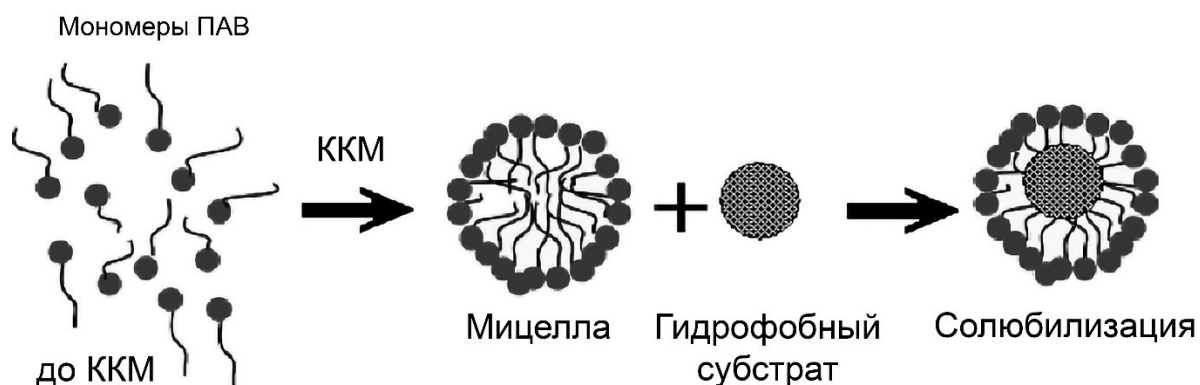


Рисунок 1.3. Процесс солюбилизации молекул масла с помощью ПАВ в водном растворе [45].

Количество солюбилизированного вещества в агрегатах геминальных ПАВ заметно выше, чем в обычных, что в первую очередь обусловлено наличием сразу двух гидрофобных заместителей на одну молекулу ПАВ, позволяющих формировать объемные мицеллы с меньшим числом мономеров [46–48]. Увеличение длины спейсерного фрагмента так же увеличивает солюбилизационную емкость, как показано на примере геминальных ПАВ со сложноэфирными фрагментами в гидрофобных цепях [49]. В той же работе показано, что наличие сложноэфирных связей в составе гидрофобного домена ПАВ понижает солюбилизационную емкость по отношению к красителям хинизарину и Судану I.

Геминальные ПАВ представляют интерес для многих исследователей, потому что они обладают заметно более высокой солюбилизующей способностью при более низких значениях ККМ, чем мономерные ПАВ, поэтому для достижения требуемых параметров самоорганизации геминальных ПАВ можно варьировать их структуру. Так, низким значениям ККМ способствуют длинные гидрофобные заместители n , короткие (<4) или длинные (>7), гибкие спейсерные фрагменты гидрофобной природы. В то же время увеличение длины спейсерного фрагмента и гидрофобных заместителей приводит к увеличению солюбилизационной емкости. При этом слишком длинные гидрофобные

заместители (>16) ухудшают растворимость геминальных ПАВ в воде, образуют ПАВ с температурой Крафта выше комнатной и неоптимальны для практического применения.

1.1.2. Термодинамика самоорганизации ПАВ на поверхности раздела вода – воздух и в объеме раствора

Процесс формирования агрегатов можно описать термодинамически, для чего необходимо знать степень связывания противоионов (β), ККМ и температуру. Исходя из данных параметров, можно определить энергию Гиббса мицеллообразования ΔG_{mic} .

На практике определение β производят, прибегая к методу кондуктометрии [50]. Поскольку удельная проводимость в области до ККМ осуществляется за счет растворения мономеров ПАВ в объеме воды, а после ККМ – за счет медленных, менее проводящих мицелл и несвязанных ионов, то через соотношение можно определить долю связанных и свободных противоионов ПАВ. Степень связывания определяют по выражению $\beta = 1 - S_2/S_1$, где S_1 – тангенс угла наклона кондуктометрической зависимости до ККМ, а S_2 – после ККМ (рис.1.4).

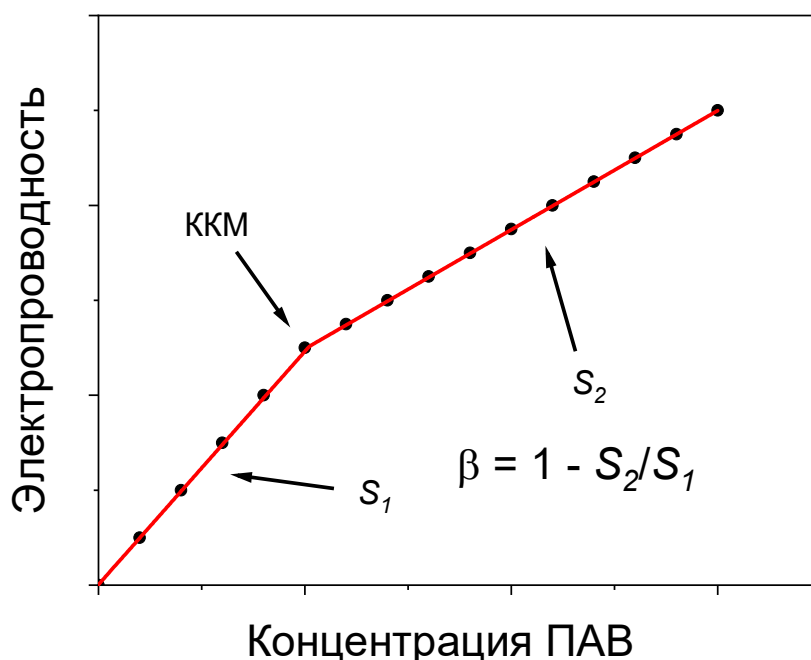


Рисунок 1.4. Расчет степени связывания противоионов из кондуктометрической зависимости по тангенсам углов наклона участков графика до и после ККМ.

Значения ΔG_{mic} учитывают число гидрофобных заместителей и противоионов (в случае ионных ПАВ), таким образом, возможно проводить сравнения свободной энергии мицеллообразования между различными представителями: ионными и неионными, мономерными, болаформными, геминальными ПАВ. Структура геминальных ПАВ включает дикатионный поверхностно-активный ион и два противоиона, вследствие чего множитель в выражении для ΔG_{mic} геминальных ПАВ приобретает вид $0.5 + \beta$. Учет степени диссоциации ПАВ играет важную роль при расчете ΔG_{mic} и сравнении значений между различными классами амфифилов [51].

Другими важными параметрами, характеризующими самоорганизацию ПАВ на поверхности раздела, являются значения предельной адсорбции, Γ_{max} , и минимальной равновесной площади, занимаемой мономером ПАВ в насыщенном поверхностном слое, A_{min} . Эти значения показывают, насколько плотно молекулы ПАВ располагаются в поверхностном слое воды при его полном насыщении. Предельную адсорбцию находят из изотерм поверхностного натяжения, полученных методом тензиометрии (рис. 1.5).

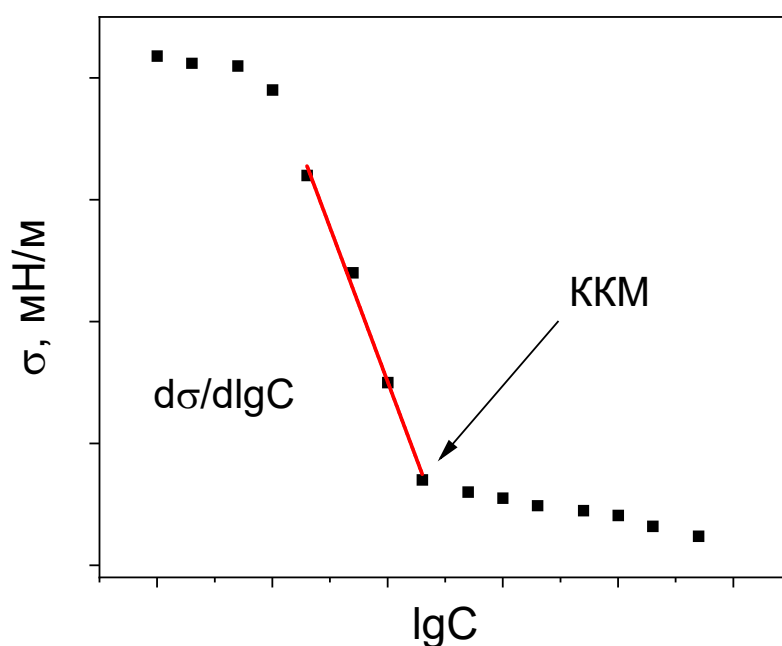


Рисунок 1.5. Расчет предельной адсорбции ПАВ на поверхности раздела водный раствор – воздух из наклона предмицеллярного региона изотермы поверхностного натяжения.

В литературе, как правило, прибегают к линейной аппроксимации предмицеллярного участка изотерм поверхностного натяжения [52], однако существуют

свидетельства об успешном применении квадратичной аппроксимации. Было показано, что при сравнении данных о средней равновесной площади, приходящейся на одну молекулу ПАВ в поверхностном слое A_{min} , полученных методами нейтронного отражения и тензиометрии, сходимость между методами наблюдали в эксперименте по тензиометрии с применением именно квадратичной аппроксимации, а не линейной [53]. В целом, в последние 10 лет анализ изотерм поверхностного натяжения с применением уравнения адсорбции Гиббса сталкивался с неопределенностями в случае необычных ПАВ с разняющимися валентностями поверхностно-активных ионов и противоионов, в участках низкой насыщенности поверхностного слоя [54,55].

Число частиц, образующихся при диссоциации, затруднительно определить для геминальных ПАВ, не проводя дополнительные эксперименты по оценке активности ионов при диссоциации. Если принять n как 3 (геминальное дикатионное ПАВ распадается на поверхностно-активный дикатион и 2 противоиона), то полученные значения Γ_{max} и A_{min} могут отличаться от истинных, однако при их сравнении в гомологическом ряду неточность выбора n не играет роли, поскольку все значения зависят от n одинаково.

В настоящее время известно большое множество аммонийных геминальных ПАВ, для которых были проведены расчеты вышеописанных термодинамических параметров. Традиционные метиламмониевые геминальные ПАВ демонстрируют стандартное понижение свободной энергии мицеллообразования с ростом длины гидрофобных заместителей. В то же время для спейсерных фрагментов из 6 метиленовых групп наблюдается, как правило, самое высокое значение ΔG_{mic} , соответствующее максимуму ККМ в данном ряду [56]. Для серии ПАВ 12-s-12 с диэтильными заместителями на атомах азота и длиной спейсерного фрагмента от 2 до 20 метиленовых групп было показано, что ΔG_{mic} растёт от -33 кДж/моль до -25 кДж/моль с ростом длины спейсерного фрагмента от 2 до 12 метиленовых групп, одновременно наблюдается уменьшение степени связывания противоионов [57]. Это можно объяснить с точки зрения плотности заряда: по обе стороны коротких спейсерных фрагментов аммонийные группы расположены близко, плотность заряда высокая и более требовательная к компенсации противоионом, вследствие чего связь с противоионом сильнее, чем в случае длинных спейсерных фрагментов с удаленными аммонийными группами и низкой плотностью заряда. В альтернативном ряду геминальных ПАВ структуры 12-4-12 с неразветвленными метильными, этильными,

пропильными и бутильными заместителями в головной группе наблюдали небольшое уменьшение β от 0.750 до 0.708 с увеличением заместителя от метильного до бутильного. Значения ΔG_{mic} в том же ряду приобретали более отрицательные значения от -39.9 кДж/моль до -42.3 кДж/моль. Из этих данных следует, что увеличение объема заместителей у заряженных атомов азота ослабляет их связь с противоионами [58]. С ростом температуры β ожидаемо снижается из-за повышения энергии, необходимой на связывание противоионов аммонийными группами [58]. На степень связывания противоионов влияет их природа, так, показано, что наибольшую склонность к диссоциации демонстрируют космотропные анионы (дигидрофосфат, фторид $\beta = 0.42, 0.45$ соответственно), а наименьшую – хаотропные анионы (бромид, нитрат $\beta = 0.73, 0.75$ соответственно).

Для геминальных ПАВ с ростом длины спейсерного фрагмента наблюдают понижение значения предельной адсорбции Γ_{max} , сопровождаемое повышением равновесной площади мономера A_{min} [57,59]. Так, для этилированных аммонийных геминальных ПАВ с додецильными гидрофобными радикалами и спейсерным фрагментом из 4 метиленовых групп получили значение площади мономера 1.33 nm^2 , а в случае спейсерного фрагмента из 12 метиленовых групп почти вдвое более высокое значение 2.52 nm^2 [57]. В присутствии соли произошло изменение тренда в значениях A_{min} : наблюдали появление максимума, составившего 1.06 nm^2 в случае октандиильного спейсерного фрагмента, в то время как для коротких и длинных фрагментов получили более низкие значения (0.72 nm^2 для 4 метиленовых групп и 0.77 nm^2 для 12 метиленовых групп). Возможно, появление максимума можно объяснить устранением отталкивания головных групп геминальных ПАВ в присутствии солей. Поэтому в случае длинных спейсерных фрагментов происходит компактизация, которая в отсутствие соли ограничена кулоновским отталкиванием аммонийных групп [57]. Структура головной группы также оказывает значительное влияние на параметры адсорбции геминальных ПАВ на границе раздела водный раствор – воздух. Для геминальных ПАВ 12-4-12 с одним гидроксиэтильным фрагментом в составе головных групп скачкообразно возрастает значение A_{min} до 1.55 nm^2 (по сравнению с 0.84 nm^2 для диметилированного аналога). В случае добавления еще одного гидроксиэтильного заместителя на каждый атом азота в составе этого ПАВ A_{min} умеренно возрастает до 1.63 nm^2 [60].

Таким образом, главная особенность геминальных ПАВ заключается в наличии спейсерного фрагмента. При условии постоянства спейсерного фрагмента варьирование других структурных аспектов геминальных ПАВ оказывает влияние на термодинамические параметры аналогично мономерным ПАВ: с ростом длины гидрофобной цепи понижаются значения ККМ, A_{min} и растут значения ΔG_{mic} , Γ_{max} . При варьировании длины спейсерного фрагмента наблюдаются максимумы ККМ и ΔG_{mic} для средних спейсерных фрагментов из 5-6 метиленовых групп. Увеличение числа метиленовых групп в спейсере s влечет за собой равномерный рост равновесной площади мономера ПАВ в деионизированной воде, но в присутствии солей проходит через максимум, обусловленный компактизацией геминальных ПАВ с длинными гибкими спейсерными фрагментами. Именно эта структурная особенность – спейсерный фрагмент – обуславливает уникальные характеристики геминальных ПАВ при взаимодействии с биомолекулами.

1.1.3. Биомедицинский потенциал дикатионных ПАВ

Геминальные ПАВ широко применяются в разных сферах (рис. 1.6), и особенно в биомедицинских исследованиях, благодаря уникальным особенностям взаимодействия с биомолекулами, обусловленным наличием спейсерного фрагмента. В данной главе более подробно разбирается их применение для доставки генетического материала, антимикробная активность и особенности взаимодействия с липидными мембранами.

Основополагающее свойство дикатионных геминальных ПАВ, обуславливающее их широкую применимость для компактизации нуклеиновых кислот и трансфекции – это их положительный заряд, который необходим для эффективного связывания анионных молекул дезоксирибо- и рибонуклеиновых кислот (ДНК и РНК) [6]. Геминальные ПАВ обладают способностью уменьшать размер молекул ДНК за счет межмолекулярных взаимодействий (компактизация), а образуемые агрегаты нуклеиновых кислот с ПАВ называют липоплексами. На примере ряда гидроксиэтилированных геминальных ПАВ с гексадецильными гидрофобными радикалами и длиной спейсерного фрагмента в 4, 6, 12 метиленовых групп показали, что эффективность трансфекции ДНК наиболее высока в случае спейсерного фрагмента из 12 атомов углерода, а минимальную эффективность наблюдали для ПАВ со спейсерным фрагментом из 6 метиленовых групп [61].

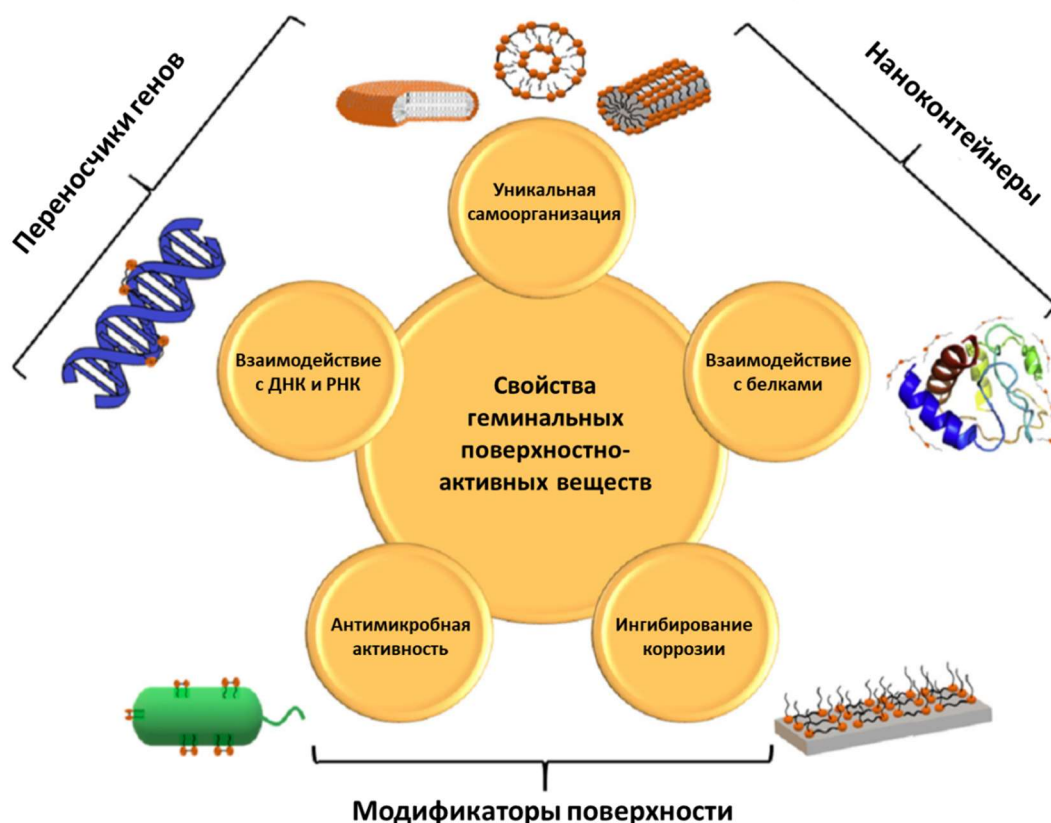


Рисунок 1.6. Свойства геминальных ПАВ, обуславливающие их практическое применение в разных сферах [62].

Ассиметричное введение фитана в состав дикаатионных геминальных ПАВ структуры 16-3-16 улучшило упаковку ДНК в составе липоплексов и повысило способность к доставке нуклеиновых кислот по сравнению с немодифицированным ПАВ [63]. В другой работе представили пиридинсодержащие геминальные ПАВ, с помощью которых продемонстрировали высокую эффективность трансфекции для амфифилов, содержащих пентадецильные и гексадецильные гидрофобные радикалы [64]. Эта сфера в области доставки нуклеиновых кислот – трансфекции – является новой и на данный момент в литературе не существует подробной теоретической базы по зависимости эффективности трансфекции от структуры геминальных ПАВ, однако движение в сторону обобщения результатов осуществляется в обзорных статьях. Так, касательно длины спейсерного фрагмента считается, что наиболее эффективны, как правило, ПАВ с коротким (<3 атомов углерода) или длинным (>12) спейсерным фрагментом [65], при этом желательно наличие длинных гидрофобных заместителей у ПАВ (>12) [66].

Молекулы ПАВ имеют два основных пути проникновения в липидный бислой: электростатическая адсорбция и гидрофобное встраивание [67]. Для мономерных ПАВ

характерно значение критического параметра упаковки, способствующего положительной кривизне образуемых агрегатов. Для липидов, наоборот, характерны значения, благоприятные для нулевой кривизны агрегатов, что считается ключевым структурным фактором, обуславливающим склонность липидов к образованию мембран и везикул. Смешение ПАВ и липидов может приводить к разным изменениям свойств образуемого бислоя, которые сильно зависят от формы молекулы ПАВ. Так, мономерные ПАВ, в особенности неионные ПАВ серий Твин и Спан, обладающие объемными головными группами из полиоксиэтиленовых цепей, считаются краевыми активаторами, способствующими высокой деформируемости образуемых агрегатов [68].

Геминальные ПАВ, содержащие в структуре две заряженные головные группы и два гидрофобных радикала, обладают богатым структурным многообразием и являются любопытным объектом для изучения их взаимодействия с липидными мембранами. Исследования температуры фазового перехода мембран, образованных дипальмитоилхфосфатидилхолином (ДПФХ), показали, что геминальные ПАВ в зависимости от соотношения длин гидрофобных заместителей и спейсерного фрагмента могут оказывать различное влияние на фазовое состояние липидной мембраны. Для геминальных ПАВ типа 12-2-12 наблюдается разрыхление мембраны, что связано с разностью длин гидрофобных частей с основным липидным компонентом ДПФХ с цепями в 16 атомов углерода. Эта разность приводит к образованию регионов с пониженной плотностью упаковки молекул в бислое, и как следствие, к понижению температуры фазового перехода мембраны с 42 °С до 39.7 °С. Геминальные ПАВ с длинными цепями, наоборот, повышают температуру фазового перехода (например, 18-2-18 повышает температуру до 45.5 °С) [69].

Взаимодействие геминальных ПАВ с липидными мембранами представляет интерес с точки зрения антибактериальной активности, поскольку считается, что основной механизм токсического действия ПАВ по отношению к бактериям – это солюбилизация клеточной мембраны [16,70,71]. В целом, солюбилизация липидных мембран молекулами ПАВ детально исследована и состоит из трех основных этапов: включение мономеров ПАВ в липидный бислой, нарушение упаковки молекул в мембране, приводящее к возникновению неровностей и пор, формирование смешанных мицелл из липидов и ПАВ (рис. 1.7).

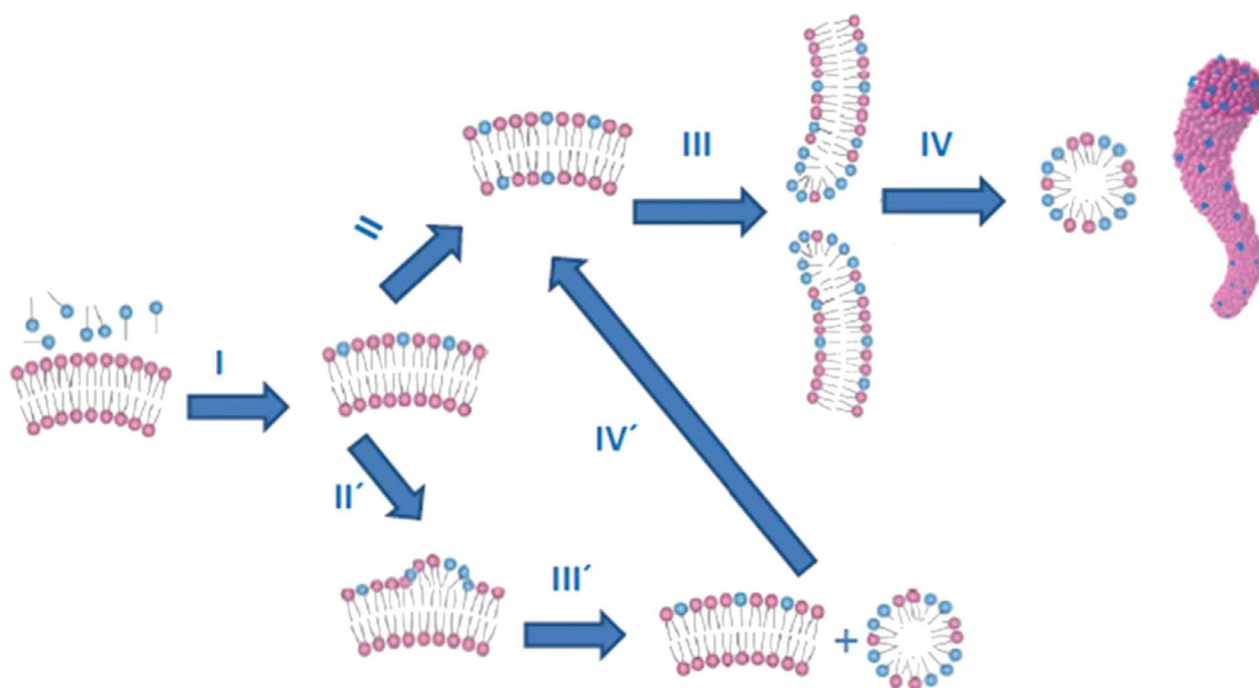


Рисунок 1.7. Предполагаемый механизм солюбилизации липидной мембраны. (I) Включение мономеров ПАВ в состав мембраны. (II) Установление равновесия локализации ПАВ на внешней и внутренней стороне липидного бислоя. (III) формирование пор. (IV) Формирование смешанных мицелл из липида и ПАВ. Когда распределение молекул ПАВ между слоями мембраны затруднено, процесс описывают иным образом. (II') Встраивание ПАВ приводит к формированию участков с повышенной кривизной. (III') Эти участки отделяются от мембраны и формируют смешанные мицеллы. (IV') Отсоединение фрагментов липидной мембраны способствует распределению молекул ПАВ между сторонами бислоя [72].

Большое значение придают способности ПАВ повышать кривизну мембраны, из-за которой происходит нарушение равномерности и целостности супрамолекулярной структуры липидных бислоев. Ключевую роль отдают способности молекул ПАВ претерпевать трансмембранный переход, а также скорости этого процесса [72]. Немаловажно и взаимодействие заряженных групп, присутствующих в составе мембраны, и мономеров ПАВ: выделяют различия в механизмах процесса солюбилизации мембран противоположно и одноименно заряженными амфифилами [73]. Таким параметрам ПАВ, как значение ККМ, объем гидрофильной группы, длина гидрофобного заместителя ПАВ, не приписывают большого значения в механизме солюбилизации [73].

Для геминальных ПАВ процесс солюбилизации мембраны может приобретать разный характер в зависимости от мельчайших изменений в структуре ПАВ, таких как длина спейсерного фрагмента или гидрофобных частей. Взаимодействия молекул ПАВ с молекулами липида могут реализовываться во многих направлениях, включающих Ван-дер-Ваальсовы и электростатические взаимодействия (рис. 1.8) [74].

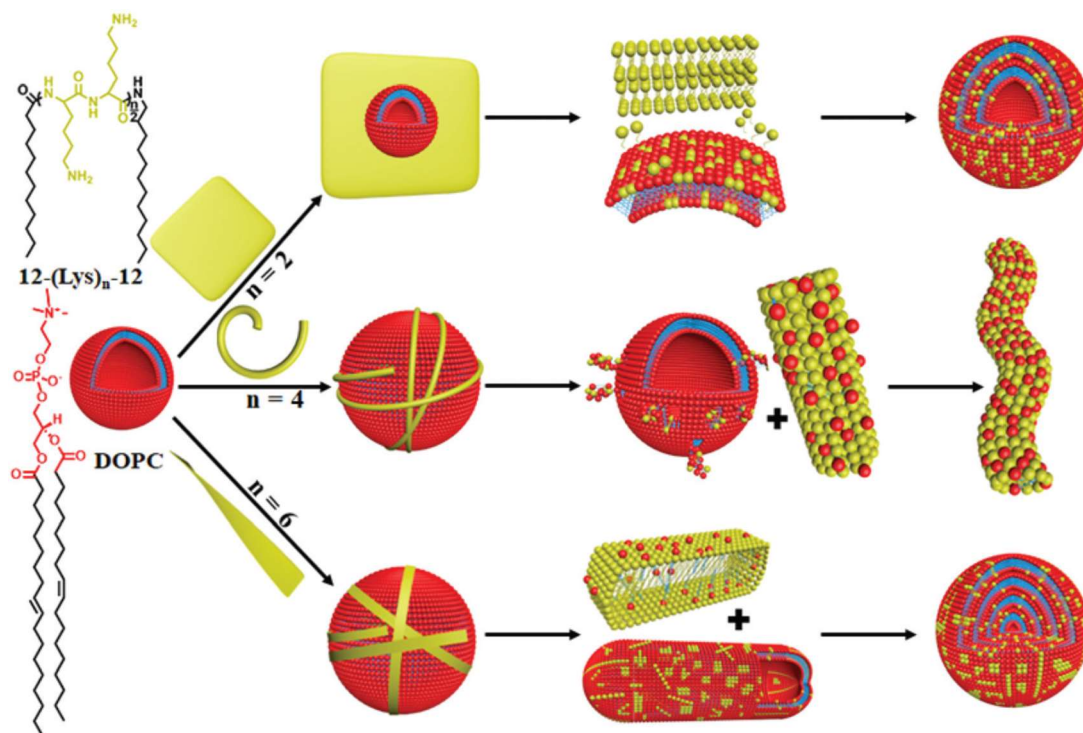


Рисунок 1.8. Схема солюбилизации везикул из липида диолеилфосфатидилхолина геминальными ПАВ с полилизиновым спейсерным фрагментом различной длины [74].

На первой стадии происходит адсорбция молекул ПАВ на поверхности везикул. Затем, по мнению авторов, для коротких спейсерных фрагментов (2 остатка лизина) молекулы амфифилов покидают состав своих агрегатов и диффундируют в состав везикул, создавая новые двойные слои вокруг исходных частиц. В случае средних спейсерных фрагментов (4 остатка лизина), фибриллы, образованные этим ПАВ, приводят к постепенному растворению липидной мембраны и перемещению молекул липида в состав червеобразных мицелл смешанного состава. Наконец, в случае длинных спейсерных фрагментов (6 остатков лизина) предполагается, что молекулы ПАВ, высвобождающиеся из агрегатов, встраиваются в липидные мембраны везикул, деформируя их, что в конечном итоге приводит к формированию мультислойных везикул [74].

Множество уникальных свойств геминальных ПАВ обуславливают всесторонний интерес и их вовлечение в исследования: эффективное комплексообразование с нуклеиновыми кислотами [36], взаимодействие с бислоем (влияние на температуру фазового перехода липидного бислоя) [75], энантиомер-зависимая агрегация [76], рН или переключаемая электромагнитным излучением агрегация [77]. В настоящее время разработка новых биосовместимых геминальных ПАВ продолжается в множестве научных групп, а также публикуются подробные обзоры их биомедицинских и антикоррозионных свойств [62,78], что указывает на скрытый потенциал геминальных ПАВ, который еще предстоит открыть.

1.1.4. Биоразлагаемые ПАВ – новое направление в синтезе и исследовании амфифильных соединений

В ходе развития исследований амфифилов направление по разработке новых катионных ПАВ своего рода получило «второе дыхание» с ростом внимания к биоразлагаемым и природным фрагментам. Так, за последние 15 лет значительно возросло число публикаций, описывающих новые ПАВ, содержащие амидные, иминные, дисульфидные, эфирные, карбаматные связи, а также природные фрагменты, такие как остатки сахаров, аминокислоты, жёлчные кислоты [4].

Первоначально интерес возник к включению в состав ПАВ фрагментов, которые можно расщепить при помощи внешнего воздействия (кислотный или щелочной гидролиз, электромагнитное излучение, температура). Для таких ПАВ характерна стабильность в одних условиях и дестабилизация в условиях, присущих конкретной задаче, для которой используются эти амфифилы. Слабый, разрываемый фрагмент, как правило, располагается между гидрофобной частью и головной группой ПАВ, таким образом, его расщепление приводит к снижению или уничтожению поверхностной активности вещества. Самый яркий пример таких ПАВ – это так называемые Ester quats, амфифилы с аммонийной головной группой и гидрофобной частью, присоединенной к ней посредством сложноэфирной связи [79], которые применяются в текстильной промышленности. В настоящее время широко известны также разлагаемые ПАВ на основе амидной, карбонатной, иминной, силоксановой связей, а также ПАВ, содержащие бетаиновый фрагмент [21].

Широко применяется и термин «биоразлагаемый», под которым, как правило, подразумевается анализ разложения веществ микроорганизмами в закрытых сосудах в течение 28 дней, описанный протоколами Организации экономического сотрудничества и развития (ОЕСД) в 1982 году и правилами Европейского экономического сообщества (ЕЕС) в 1984 году. Этот тест заключается в помещении раствора исследуемого компонента небольшой концентрации (2-5 мг/л) с добавлением малых количеств разнообразных микроорганизмов в закрытые герметичные бутылки, где после 28 дней анализируется потребление кислорода. Так, ряд мономерных и геминальных ПАВ со сложноэфирным фрагментом между головной группой и гидрофобным углеводородным радикалом был протестирован на биоразлагаемость. В работе обнаружили, что мономерные ПАВ подвергаются полному биоразложению в течение 28 дней, а их геминальные аналоги разлагались лишь на 60% в течение 30-40 дней. В то же время авторы пробовали найти зависимость степени биоразложения от скорости химического гидролиза сложноэфирных связей в составе исследованных ПАВ и обнаружили, что между ними нет значимой корреляции [80]. Большое множество геминальных ПАВ с аминокислотами в составе головной группы отличаются высокой биоразлагаемостью с разложением, как правило, более 50% в течение 28 дней [81]. Ряд геминальных ПАВ с различной длиной гидрофобных цепей со сложноэфирными связями в составе спейсерного фрагмента продемонстрировал биodeградацию в 72-77% по истечении 28 дней в аналогичном тесте в бутылке, и было показано, что степень биodeградации уменьшается с ростом длины углеводородного радикала [82]. В то же время геминальные аммонийные ПАВ, содержащие в своем составе спейсерный фрагмент различной природы: метиленовый, ненасыщенный, содержащий эфирную связь, бензольное кольцо – не продемонстрировали способности к биodeградации [83].

Особое внимание привлекают ПАВ, содержащие карбаматный фрагмент, поскольку он является фармакофором, входящим в ряд лекарственных веществ [84,85], а также биоразлагаемым фрагментом, который может быть переработан ферментативными механизмами микроорганизмов.

Как показывает обзор современной литературы, появление геминальных ПАВ в поле зрения исследователей вывело разработку амфифильных соединений на новый уровень, затронув целое множество отраслей жизни. Геминальные ионные ПАВ превосходят традиционные мономерные ионные ПАВ в склонности к агрегации, в функциональных и

стимул-отзывчивых свойствах, в практически важных процессах солюбилизации и мицеллярного катализа, биосовместимости. Благодаря высокой склонности встраиваться в липидный бислой, обусловленной большой конформационной лабильностью и обилием групп для обеспечения межмолекулярных взаимодействий с липидами, геминальные ПАВ представляют особый интерес в качестве модификаторов для липосомальных систем доставки лекарств. Систематическое исследование гомологических серий геминальных ПАВ позволяет выявлять оптимальные соединения по критериям порогов самоорганизации, солюбилизации, токсичности и антимикробной активности, что развивает текущее состояние исследований по этой теме и повышает планку функциональных свойств разрабатываемых ПАВ.

1.2. Липосомы как универсальные наноконтейнеры

В течение нескольких десятилетий липосомы используют в качестве систем доставки лекарств, а модификация их состава приводит к появлению уникальных свойств [86–93,4,5,94,95]. Их особенность – это уникальная биосовместимость и биоразлагаемость, обусловленная природным происхождением составляющих липосом липидов – представляет особую ценность в фармацевтике, косметической и пищевой промышленности. В настоящей главе рассматриваются физико-химические параметры липосом как носителей лекарственных молекул, методы их модификации и задачи, решаемые с помощью данных модификаций, а также особенности взаимодействия липосом с биообъектами.

1.2.1. Основные физико-химические и *in vitro* параметры липосомальных композиций в водных дисперсиях

Отличительной особенностью везикулярной структуры, присущей липосомам, является наличие и липидной мембраны, и водного ядра, благодаря чему в липосомах могут быть инкапсулированы как гидрофобные, так и гидрофильные молекулы, что делает их универсальными наноконтейнерами [5] (рис.1.9). Существует ряд свойств липосом, которые характеризуют их с точки зрения дисперсного состояния (размер, дзета-потенциал) и доставки лекарств (эффективность инкапсуляции, степень загрузки, профиль высвобождения субстрата).

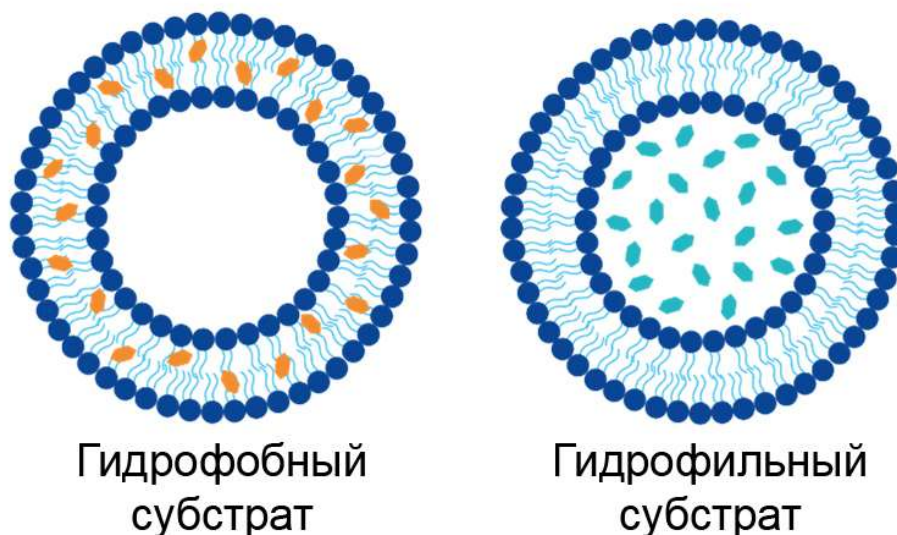


Рисунок 1.9. Распределение гидрофильных и гидрофобных веществ внутри липосомы.

Подобно ПАВ, липиды, составляющие их мембрану, могут быть катионными, анионным и неионными. Хорошо известно, что оптимальным размером для наночастиц считается 100 нм, который достаточно мал, чтобы избежать раннего удаления липосом из кровотока, но достаточно велик, чтобы сохранять низкую кривизну мембраны для долгосрочной стабильности [96]. Для оценки размера и формы липосомальных систем наиболее широко применяются динамическое светорассеяние, электронная микроскопия, также возможно применение статического светорассеяния, гель-проникающей хроматографии и методов рентгеновского и нейтронного рассеяния [97].

Относительно дзета-потенциала липосом литература не имеет таких четких предписаний. Большое значение дзета-потенциала выгодно для поддержания коллоидной стабильности частиц, но также приводит к распознаванию иммунной системой и выводу частиц из кровотока [98,99]. С другой стороны, эндотелиальные клетки и многие виды раковых клеток обладают значительным отрицательным потенциалом на поверхности мембран, что делает применение катионных липосом выгодным [100–106]. Защита от опсонизации и иммунной реакции организма тоже не является однозначным плюсом, поскольку известно, что маскировка при помощи полиэтиленгликоля (ПЭГ) или поддержание низкого заряда частиц, также ухудшают сродство липосом к клеткам и понижают эффективность доставки. Образцы липосом с идентичным количеством катионных групп на поверхности мембраны могут обладать сильно отличающимися значениями дзета-потенциала в зависимости от природы заряженного компонента [107].

Кроме того, дзета-потенциал зависит от внешних факторов, в первую очередь от рН: концентрация протонов в водной среде отражается на степени ионизации основных и кислотных функций на головной группе липидов, с ростом рН дзета-потенциал приобретает отрицательные значения, поскольку возрастает ионизация кислотных отрицательно заряженных групп. Он также зависит от ионной силы раствора таким образом, что при повышении концентрации солей в растворе липосом абсолютное значение дзета-потенциала стремится к нулю, что обусловлено экранированием зарядов на поверхности мембраны благодаря наличию в среде множества свободных ионов различного заряда [108]. Дзета-потенциал измеряют с помощью электрофоретического светорассеяния [109], что является одним из самых воспроизводимых и экспрессных методов, однако также можно применять капиллярный электрофорез [110], электроакустический анализ [111].

Эффективность инкапсуляции (ЕЕ) отражает долю субстрата, который локализован в липосомах за счет адсорбции на мембране, посредством включения в липидную мембрану или заключения во внутреннюю полость липосомы. Эффективность инкапсуляции характеризует качество загрузки субстратом: оптимально значение ЕЕ, стремящееся к 100%, и чем оно ниже, тем большее количество субстрата находится в неизменном свободном виде, не обладающем преимуществами наноносителя, что может быть связано с плохой аффинностью субстрата к липосомам [112] или с неэффективным методом приготовления образцов [113,114]. Степень загрузки (LC) – это доля загруженного субстрата по отношению к общей массе наноносителя и субстрата. Ключевое отличие LC от ЕЕ заключается в том, что LC зависит от типа и вместимости наночастиц и от количества загруженного субстрата, теоретически LC может превышать 100%, это бы значило, что масса субстрата, заключенного в липосомы больше массы самой липосомы.

Для определения параметров инкапсуляции (ЕЕ и LC) необходимо выполнение двух задач: отделение незакапсулированного субстрата от загруженных липосом и его количественная оценка. Отделение можно производить с помощью хроматографии, фильтрации, центрифугирования, диализа, а количественную оценку – с помощью спектроскопических методов и хроматографии [115]. Наиболее распространёнными методами отделения являются диализ и фильтрование с помощью центрифужных концентраторов. Методом диализа удобно отделять незакапсулированный субстрат в

объёмных образцах, но его длительность может превышать несколько суток, он не может обеспечить полноценное отделение субстрата и требует поддержания градиента концентрации [116]. Метод центрифужного фильтрования позволяет отделять субстрат экспрессно, но объём центрифужных фильтров, как правило составляет всего доли или несколько единиц миллилитра, что ограничивает его применимость, кроме того, мембраны таких концентраторов могут быть приведены в негодность липосомами при высоких концентрациях, что приводит к завышению получаемых значений ЕЕ [117]. Хроматографические методы отделения незакапсулированного субстрата являются наиболее эффективными с точки зрения глубины разделения и подходят для малых и больших объёмов образцов, однако в ходе хроматографии происходит изменение концентрации липосом, что делает невозможным их дальнейшее применение без какой-либо количественной оценки [115,117].

Процесс определения ЕЕ и ЛС зависит от природы субстрата. Для гидрофобных субстратов применяют фильтрование и центрифугирование, чтобы отделить от липосом незакапсулированное вещество в виде осадка. Для количественной характеристики ЕЕ и ЛС быстрее и проще всего прибегать к спектрофотометрии и флуориметрии, но не всегда субстрат является оптически детектируемым, поэтому в качестве модельных субстратов, как правило применяют флуоресцентные красители с полосами поглощения в видимой области, например, родамин Б или кальцеин [118,119]. Среди фармакологических субстратов удобными являются антибиотики антрациклинового ряда, например, доксорубицин или даунорубицин, обладающие ярко выраженным красным цветом, но многие другие субстраты невозможно легко детектировать с помощью фотометрии, например, противораковый агент паклитаксел. В таких случаях прибегают к хроматографическим и масс-спектрометрическим методам количественной оценки [120].

Другим важным свойством липосом как системы доставки лекарств является профиль высвобождения субстрата. Необходимо обеспечение контролируемого высвобождения лекарства, поскольку для осуществления терапевтического эффекта его должны поглотить определенные клетки организма [121]. В противном случае снижается эффективность использования лекарственного препарата, а в ряде случаев это приводит к токсическому воздействию на организм [122].

Оценка процесса высвобождения проводится методом диализа (рис.1.10). Диализные мешки образованы из полупроницаемых мембран, размеры пор которых

таковы, что через них проникает субстрат, но не липосомы. В результате этого за пределы диализного мешка высвобождается только незакапсулированный лекарственный препарат, который можно количественно охарактеризовать доступными методами.

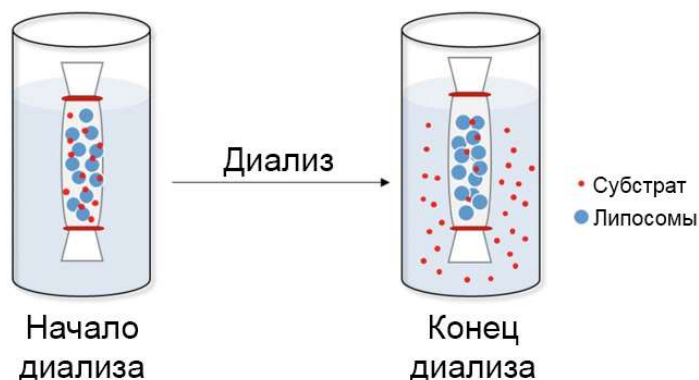


Рисунок 1.10. Разделение высвободившегося субстрата и липосом методом диализа [123].

На скорость высвобождения влияют природа субстрата, строение липидного бислоя. Так, было выяснено, что будесонид быстрее высвобождается из липосом по сравнению с гидрокортизоном. Это связано с тем, что первый субстрат липофильный и располагается преимущественно в липидном бислое, тогда как второй, более гидрофильный, частично располагается в ядре липосомы. Размер пор диализной мембраны также оказывает влияние на скорость высвобождения субстрата из липосомы [116] (рис.1.11).

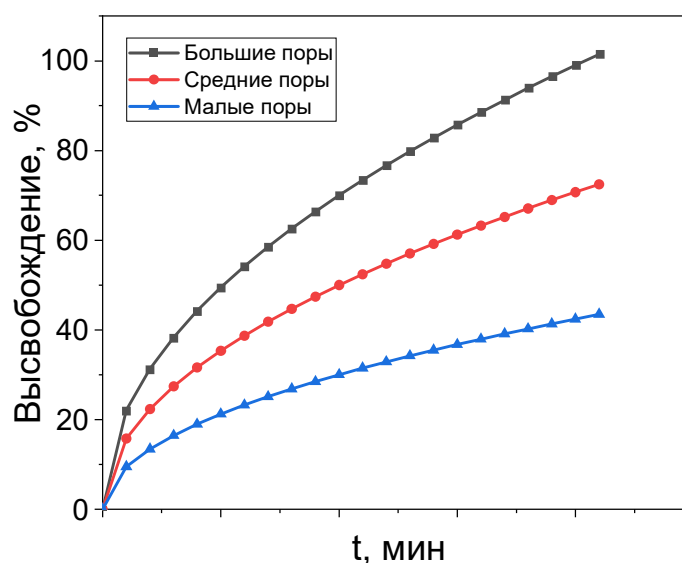


Рисунок 1.11. Зависимость доли высвобожденного субстрата от времени диализа при различных размерах пор диализной мембраны.

Холестерин является ключевой молекулой, добавление которой способно замедлять высвобождение содержимого липосомы [124]. Эффект замедления высвобождения начинает проявляться при мольной доле холестерина в 5 мол.%, показано, что 10, 20, 30 мол.% замедляют высвобождение гидрофильного красителя сульфородамина Б на 21%, 34%, 74% соответственно [125]. Кроме того, авторы [126] продемонстрировали, что липосомы с диаметром 159 нм удерживают более 90% карбоксифлуоресцеина в течение 8 ч, в то время как наночастицы с диаметрами 98 и 68 нм высвобождают 25% и 75% субстрата соответственно.

Несмотря на большой потенциал применения в медицине, существует ряд трудностей, которые возникают при использовании липосом. Чаще всего необходимо обеспечить точную адресную доставку лекарственного препарата для повышения терапевтических и снижения побочных эффектов. Кроме того, везикулы должны оставаться в исходной форме до достижения цели, после чего эффективно высвобождать субстрат [122]. Поэтому липосомы в настоящее время используются не в чистом виде, а в составе тех или иных смешанных систем с добавлением различных модификаторов, как правило, амфифильной природы [4,5]. В целом, липидные наночастицы занимают особое место в качестве систем доставки лекарственных препаратов. Однако перед медицинским применением липосомальных систем необходимо изучить их стабильность, механизм образования, оценить эффективность их применения, цитотоксичность и другие основные характеристики. Большинство этих свойств зависят напрямую от композиции липосом и различных модификаций, исследование и разработка которых представляют большой интерес и практическую пользу.

1.2.2. Дизайн липосомальных носителей методом ковалентной и нековалентной модификации липидного бислоя

Введение в состав липосом холестерина, ПАВ, нацеливающих фрагментов или маскирующих полимеров является многообещающим способом получения эффективных липидных наноносителей с точки зрения низкой токсичности, более длительного времени циркуляции в кровотоке, контролируемого высвобождения и нацеливания на биологические мишени [127,128]. Но основополагающим аспектом в формировании

липосомальной системы для доставки лекарств является подбор липидной основы липосом.

Основные строительные блоки липосом – фосфолипиды – состоят из спиртового остова (глицерин в глицерофосфолипидах и сфингозин в сфингомиелинах), присоединенного к гидрофильной головной группе и гидрофобным ацильным цепям. Наиболее часто используемые природные фосфолипиды для приготовления липосом в изобилии присутствуют в яичном желтке или соевых бобах, которые являются их основным промышленным источником [129]. Основные синтетические фосфолипиды образуются путём замещения головных групп и/или алифатических цепей природных фосфолипидов и включают липиды с насыщенными гидрофобными цепями, с катионными, анионными или полиоксиэтиленовыми головными группами [130].

В дополнение к полярным головным группам на стабильность и эффективность липосомальных составов влияют длина и уровень насыщения гидрофобных радикалов. Показано, что фосфолипиды с длинными (>16 атомов углерода) насыщенными углеводородными заместителями приводят к образованию липосом с высокой стабильностью, тогда как липиды с короткими или полиненасыщенными гидрофобными доменами образуют более деформируемые везикулы с менее упорядоченными бислоями [131].

Холестерин, важная составляющая клеточных мембран, обычно присутствует в составе липосом. Он улучшает упаковку фосфолипидов, оказывая влияние на их жесткость, текучесть, стабильность и на эффективность инкапсуляции субстрата. Как правило, холестерин включают в состав липосом в соотношении от 20 мол.% до 70 мол.% [124,125]. Холестерин оказывает влияние на фазовое состояние бислоя, понижает температуру фазового перехода, его проницаемость и повышает плотность мембраны. Кроме того, холестерин участвует в образовании липидных фрагментов, называемых рафтами или доменами, которые отличаются повышенной плотностью и являются важными элементами, необходимыми для функционирования некоторых трансмембранных белков и связанных с ними клеточных сигнальных путей [132].

Различают ковалентные и нековалентные методы модификации липосом (рис.1.12). Среди них наиболее распространенным способом является нековалентная модификация путем добавления заранее функционализированного лигандом ПЭГилованного липида к исходной липидной смеси для формирования тонкой пленки. Этот метод известен с

основополагающей работы A.D. Bangham о самоорганизации фосфолипидов в бислои и везикулы [133]. Для образования бислоя, как известно, молекула липида должна обладать гидрофильной головной группой и двумя гидрофобными углеводородными заместителями. При условии, что встраиваемая молекула также является амфифилом, её встраивание самопроизвольно осуществляется в процессе гидратации, поскольку её гидрофобная часть иммобилизуется в липидном бислое из-за гидрофобного эффекта. Это явление наблюдается для производных липидов, в том числе холестерина, для гидрофобных молекул, которые встраиваются в гидрофобное ядро бислоя, для ПАВ, которые хорошо встраиваются в мембраны при достаточно низких концентрациях, не приводящих к солубилизации липидов [134].

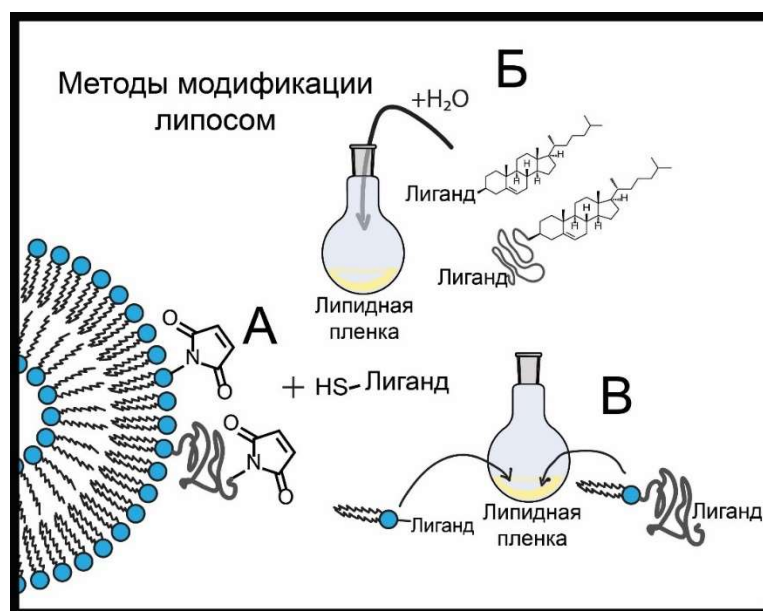


Рисунок 1.12. Различные примеры модификации липосом лигандами: (А) химическая конъюгация с приготовленными липосомами (как правило, клик-реакция, например, тиол-малеимидное сочетание); (Б) гидратация липидной плёнки водным раствором функционализированных липидов (к примеру, холестерин в качестве якорной гидрофобной части) или пост-встраивание; (В) добавление функционализованного липида в изначальную липидную плёнку.

Кроме того, было показано, что липосомы могут быть функционализированы методом пост-встраивания, также известным как встраивание *in situ*, поскольку гидрофобный якорь, присутствующий в липидах, термодинамически склонен к самопроизвольному встраиванию в мембрану липосомы [135]. С тех пор этому методу

было посвящено не так много фундаментальных исследований, в рамках которых варьировали различные гидрофобные фрагменты, такие как адамантан, углеводородные цепи, холестерин или липидный фрагмент, чтобы сравнить эффективность их введения и оценить способность облегчения межмембранного слияния [134,136]. Работы показали, что гидрофобность якоря может иметь решающее значение в некоторых случаях, таких как слияние мембран, когда алкильных заместителей недостаточно и требуется более объемный фрагмент холестерина. Кроме того, важна химическая природа гидрофобного заместителя, поскольку разные гидрофобные домены могут индуцировать различные конформации пептида и, таким образом, могут влиять на сродство пептида к целевому белку [134].

Как правило, для модификации липосом необходимые лиганды конъюгируют с алкильными цепями, гидрофобными аминокислотными последовательностями, липидами и ПЭГилированными липидами [5,137]. Наиболее распространенным ковалентным методом модификации в последние годы является химическая конъюгация аминогруппы пептида с карбоксигруппой или тиолированного пептида с малеимидной группой на конце цепи ПЭГ (как правило, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламин используется в качестве якоря) [138]. Этот подход основан на необходимости обеспечения длительной циркуляции липосом в кровотоке, что достигается при помощи ПЭГ, и способности избирательно связываться с целевыми биообъектами, такими как опухолевые клетки, путем обеспечения специфической модификации пептидами.

Наиболее удобны для ковалентной модификации клик-реакции, в том числе азид-алкиновое, тиол-малеимидное сочетание, связывания с образованием пептидной связи, реакция изотиоцианатов с аминогруппой. Сочетания с образованием амидной связи производят с помощью предварительной активации карбоксильной группы связывающими агентами (п-нитрофенол, гидроксibenзотриазол и его производные).

Формирование тиоэфирной связи также может быть использовано для связывания лигандов с молекулами липидов. Обычно линкер с малеимидной группой специфически реагирует с тиолами в диапазоне $pH = 6.5-7.5$ по реакции присоединения Михаэля. Лиганд должен содержать тиоловую группу, полученную из цистеина или путем тиолирования с использованием реактива Траута (2-иминотиолан).

Также применяют безмедное циклоалкин-азидное сочетание для присоединения лигандов, которое проходит очень быстро, однако требует наличия соответствующих групп со стороны лиганда и со стороны липида. В случае других методов, как правило, используются карбоксильные, amino- и тиоловые группы, широкодоступные на многих соединениях-лигандах, огромная доля которых представлена пептидами, почти всегда содержащими вышеперечисленные группы [139].

Вовлечение в процесс приготовления наночастиц сторонних связывающих реагентов, а также образование побочных продуктов нежелательно, поскольку после таких модификаций необходима дополнительная очистка липосом методом диализа [140,141]. Кроме того, в случае инкапсулирования гидрофильных молекул диализ неприемлем, поскольку вместе с побочными продуктами инкапсулированный субстрат удаляется частично или полностью. Именно поэтому возникает востребованность в применении нековалентных методов модификации, производимых на основе супрамолекулярных взаимодействий липидных мембран и модифицирующих молекул. Как упомянуто выше, необходимым свойством таких молекул является наличие гидрофобного домена, так что амфифильные соединения, и в особенности, ПАВ, являются уникальным инструментом для модификации липосомальных систем доставки лекарств.

Одна из основополагающих причин, по которым прибегают к модификации липосом молекулами катионных ПАВ – это обеспечение положительного заряда на поверхности [142–148]. В основном, такие наночастицы применяют для эффективной доставки отрицательно заряженных биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты [149,150], белки [151] и пептиды [152]. Положительный заряд также наделяет липосомы способностью преодолевать биологические барьеры [5]. Известно, что катионные ПАВ зачастую токсичны, особенно традиционные ПАВ на основе триметиламмония, такие как ЦТАБ. Токсичность катионных липосом может быть их слабым местом, однако она сильно зависит от концентрации и природы наночастиц, а также от доли встроенного катионного компонента [153,154]. Существуют способы снижения токсичности за счет использования новых ПАВ или их модификации, как это было сделано в работе [155] путем добавления карбаматного фрагмента к некоторым распространенным ПАВ на основе аммония. Некоторые из катионных ПАВ, например с головной группой на основе имидазола, изначально менее токсичны и являются перспективными кандидатами для

модификации липосом, обладающими антимикробной активностью в отношении определенных микроорганизмов, влияющими на скорость высвобождения и средство к определенным биологически важным молекулам, таким как ДНК [156].

Нековалентную модификацию липосом при помощи ПАВ производят не только с целью получить положительно заряженные наночастицы. На примере алкилтрифенилфосфониевых ПАВ эксплуатируют способность катиона трифенилфосфония нацеливать частицы на митохондрии внутри клеток [147]. Добавление катионных ПАВ, содержащих стерически затрудненный фрагмент в головной группе, повышает долгосрочную стабильность липосом до 1 года, а также способствует замедлению высвобождения родамина Б [157]. Катионные ПАВ с фрагментом борнеола использовали для модификации липосомальной системы для трансдермальной доставки лекарств, показано, что включение ПАВ повышает стабильность наночастиц и ускоряет диффузию инкапсулированного субстрата через модельные мембраны, имитирующие кожу человека в условиях *in vitro* [158]. В работе [159] для трансдермальной доставки противовоспалительных препаратов использовали липосомы, модифицированные ПАВ с триметиламмониевой, имидазолсодержащей и пирролидинсодержащей головными группами и показали, что модификация всеми исследованными катионными ПАВ улучшает диффузию лекарственных средств через мембрану, а среди амфифилов лидирующую позицию занял гидроксиэтилированный представитель имидазолсодержащего катионного ПАВ.

Среди неионных ПАВ Твин 80 применяют для нацеливания липосом на эндотелиальные клетки мозга [160], а исследование ПАВ серии Спан показало, что Спан 40 – представитель с пальмитоиловым гидрофобным заместителем – более чем вдвое усиливает поглощение клетками COS-7 и HeLa [161]. Твин 80 – одно из первых неионных ПАВ, примененных для модификации липосом с целью получения ультрадеформируемых липосом для трансдермальной доставки лекарств, которое породило класс модифицированных липосом, названных в последствии трансферсомами [162].

В целом, методы, вовлекающие химические реакции непосредственно с участием молекул в составе целостных агрегатов – липосом – неоптимальны в силу образования побочных продуктов. С другой стороны, методы, в основе которых лежит включение молекул в состав липидных мембран на основе супрамолекулярных взаимодействий, то

есть модификация состава липидной плёнки или пост-встраивание, лишены этого недостатка. Тем не менее, любые подходы к модификации липосом в большинстве случаев опираются на применение лигандов, обладающих специфичностью к целевым биообъектам (рис. 1.13).

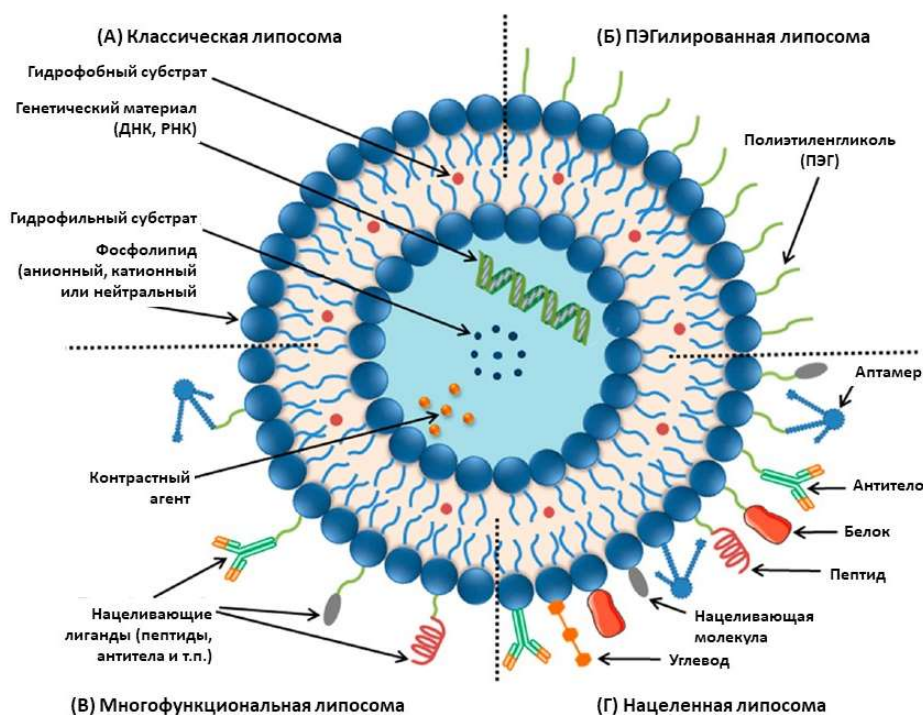


Рисунок 1.13. Липосомы: классические липосомы из фосфолипидов (А), ПЭГирированные липосомы (Б), многофункциональные липосомы (В), нацеленные липосомы (Г) [163].

Так, к примеру, фолиевая кислота является витамином, жизненно необходимым для роста и поддержания жизни клеток млекопитающих. Для поглощения фолиевой кислоты на клетках существуют фолатные рецепторы. Эти рецепторы зачастую более ярко выражены на раковых клетках из-за их агрессивной природы, соревнующейся за питательные вещества со здоровыми клетками [164]. Именно поэтому фолат-анион является очень распространенным лигандом для активного нацеливания на раковые опухоли. Одной из первых липосомальных формуляций, нацеленной на раковые клетки с помощью фолата были липосомы с ПЭГирированным липидом с длиной цепи 3350 Да, на конец которой конъюгировался фолат [165]. В дальнейшем было показано, что целесообразно использование более длинных цепей ПЭГ для нацеливающих лигандов по

сравнению с цепями ПЭГ, которые обеспечивают стелс-свойства и не содержат лиганда на конце. Например, основная полимерная оболочка представляется липидами с ПЭГ-2000, а фолат конъюгируется с более длинной цепью в 3400 или 5000 Да [166,167].

Как и фолиевая кислота, углеводы являются необходимым веществом для поддержания жизнеспособности бесконтрольно растущих раковых клеток и могут быть использованы как нацеливающие лиганды для многих видов рака. Такие лиганды обеспечивают интернализацию липосом клетками посредством связывания с глюкозными транспортёрами (GLUT) или асиалогликопротеиновыми рецепторами (ASPGR) [168,169]. Использование углеводов и полисахаридов особенно привлекательно для терапии рака мозга или для нацеливания липосом на преодоление гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), поскольку эндотелиальные клетки капилляров в мозге обогащены глюкозными транспортёрами [170]. Как и в случае с фолатом, длина цепи ПЭГ, на которую прикреплен нацеливающий лиганд играет огромную роль. Так, в одной из работ было показано, что ПЭГ-1000 является оптимальной длиной, при которой лиганды достаточно отдалены от липосом для взаимодействия с рецепторами, но длина цепи ПЭГ не так велика, чтобы цепи запутывались и стерически усложняли доступ лиганда к рецепторам [171]. Среди полисахаридов широко распространенным лигандом является гиалуроновая кислота, способная связываться с гликопротеинами CD44, обильно экспрессируемыми клетками рака мозга, яичников, печени, кишечника, молочной железы и лёгких [172]. Более того, гиалуроновая кислота является гидрофильным полимером, который способен выполнять функцию маскировки липосом от захвата иммунной системой организма в кровотоке [173].

Другим классом нацеливающих лигандов, применяемых для модификации липосом являются аптамеры – короткие цепи ДНК или РНК, способные связываться с целевыми биообъектами с высокой эффективностью и специфичностью. Благодаря разнообразию конформаций, обусловленных составом и структурой аптамеров, они могут выступать в роли специфического нацеливающего лиганда для широкого круга биомолекул. С помощью аптамеров можно повышать аффинность липосом к множеству экспрессируемых в раковых клетках белков, в том числе CD44, рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), его типы 2 (HER2) и 3 (HER3), нуклеотины, рецепторы трансферрина и т.д. [174]. Дизайн аптамеров производится с помощью идентификации потенциальных последовательностей из библиотеки случайных

последовательностей нуклеиновых кислот. Они обладают низкой иммуногенностью и высокой стабильностью, помимо вышеупомянутых эффективности и селективности связывания [175]. Однако для их получения необходимо наличие сложного оборудования, поскольку последовательный синтез аптамеров из десятков и сотен нуклеиновых кислот не может обладать оптимальной эффективностью [176].

Антитела тоже являются высокоспецифичными биомолекулами, которые можно использовать для нацеливания на самые разные мишени в составе раковых тканей. Имея в структуре вариативный домен, антитела используются иммунной системой для подстройки под антигены – молекулы, наличие которых сигнализирует о развитии заболеваний. Аналогично, антитела могут быть разработаны для распознавания практически любых молекул-мишеней [177]. Их преимуществом являются высокие биосовместимость и селективность, однако их производство является трудоёмким и кропотливым процессом, вовлекающим введение антигена в специальные типы животных для эксплуатации их иммунной системы с последующей многостадийной экстракцией антител в микроколичествах, что обуславливает их высокую стоимость и малую коммерческую доступность.

В отдельный класс лигандов для нацеливания на опухолевые клетки также можно выделить белки, не являющиеся антителами. Значительно повышенная экспрессия рецепторов трансферрина и лактоферрина на раковых клетках позволяет создавать нацеленные липосомальные наноносители путём конъюгации трансферрина и лактоферрина на их поверхности [178,179].

Среди других модификаций липосом очень многообещающим и, пожалуй, самым распространённым способом повышения специфичности к опухолям и терапевтической эффективности является декорирование липосом пептидами. Механизм их нацеливающего действия заключается в распознавании белков, специфичных для клеток-мишеней, и иммобилизация наноносителя на их поверхности и последующего поглощения. Так, трипептид Arg-Gly-Asp (RGD) – один из самых распространенных представителей для нацеливания на опухоли из-за его короткой длины и сродства к интегринам, которые сверхэкспрессируются на поверхности многих типов раковых клеток [169,180]. Хорошо известны также пептиды, усиливающие проникновение в клетки, которые содержат большое число положительно заряженных аминокислот (аргинин, лизин). Они не отличаются высокой специфичностью, и, как правило, их

используют в сочетании с активными нацеливающими пептидами [181]. Другие распространенные последовательности аминокислот нацелены на рецептор эндотелиального фактора роста сосудов-2 (VEGFR-2), рецептор эпидермального фактора роста человека-2 (HER2), которые также ярко выражены в различных типах раковых клеток и в сосудистой сети опухолей [182–184]. Для нацеливания на головной мозг наиболее распространенными мишенями являются никотиновый ацетилхолиновый рецептор $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$), нейропиплин-1 и субъединица альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13R $\alpha 2$), для которых исследователи разрабатывают свои последовательности аминокислот [181,185–188].

Кроме того, разрабатывают альтернативные пептиды, превосходящие RGD, для нацеливания на интегрин $\alpha_v\beta_3$, например, последовательность mmRwr (строчные буквы обозначают декстро-аминокислоты). Такая последовательность обладает лучшей иммуносовместимостью по сравнению с наиболее эффективной циклической формой RGD с(RGDyK) и более эффективно связывается с интегрином $\alpha_v\beta_3$. В частности, пептид mmRwr способен нацеливаться на глиому, детектировать маркеры ангиогенеза, васкулогенеза и усиливать терапевтический эффект доставляемого доксорубина [189]. Поиск новых пептидных последовательностей для проникновения в клетки продолжается, и научные группы представляют множество новых последовательностей ежегодно [138].

Таким образом, в литературе в изобилии описаны разные методы ковалентной и нековалентной модификации липосом для получения целевых и стимул-отзывчивых свойств, для усиления поглощения клетками. В качестве модификаторов применяют фрагменты или производные природных биологически значимых молекул (витаминов, гормонов, питательных веществ, белков, ферментов), а также тонко настраиваемые под конкретную задачу структуры на основе пептидов и аптамеров. Такой подход к модификации липосомальной платформы можно охарактеризовать как узкий, специализированный, селективный, и он важен и востребован для развития наномедицины. Однако актуальны и более общая разработка и модификация липосомальной платформы, а также анализ влияния общих физико-химических свойств наночастиц для решения фармацевтических задач.

1.2.3. Керасомы и порфисомы в качестве везикулярных наноносителей следующего поколения

Известен ряд принципиальных модификаций липосомальной платформы, которые отличаются от традиционных фосфолипидных липосом: ниосомы, трансферсомы, хитосомы, порфисомы, керасомы, бицеллы [190–195]. Такие наночастицы в литературе часто называют липосомами «следующего поколения», потому что их свойства сильно отличаются от свойств фосфолипидных липосом, и добавляются новые особенности: исключительная прочность, гибкость, отзывчивость на внешние стимулы. Одной из первых принципиальных модификаций в истории липосомальных систем доставки лекарств было применение ПЭГилированных липидов, которые маскируют наночастицы от иммунной системы в кровотоке. В современной литературе такие наноносители, называемые стелс-липосомами, уже подробно исследованы, и интерес привлекают новые везикулярные наноносители.

Среди таких наночастиц липосомы с высоким содержанием порфирина – порфисомы – уже зарекомендовали себя в качестве многофункциональной системы доставки лекарств, которая обладает полезными свойствами для диагностики заболеваний за счет визуализации, а также терапевтическим потенциалом при применении фотодинамической терапии (ФДТ), в сочетании с присущей любым липосомальным системам способности инкапсулировать лекарственные вещества [196–201]. Наиболее эффективные производные порфиринов, такие как вертепорфин, включали в состав липосом для увеличения биодоступности и сохранения фотосенсибилизатора в мономерной форме [202]. Известна лекарственная липосомальная форма порфирина Visudyne, которая была успешно применена и одобрена после клинических испытаний [203]. Водорастворимые производные порфирина могут быть загружены в водную полость липосом, тогда как гидрофобные порфирины встраивают в липидные бислои за счет гидрофобного эффекта. Наиболее прогрессивным является применение порфисом, полученных на основе липидов, непосредственно модифицированных порфиринами [204]. Как правило, лизофосфолипиды (липиды, одна из гидрофобных цепей которых была отсоединена) конъюгируют с порфирином, например с пиррофеофорбидом или его производными [205] (рис.1.14).

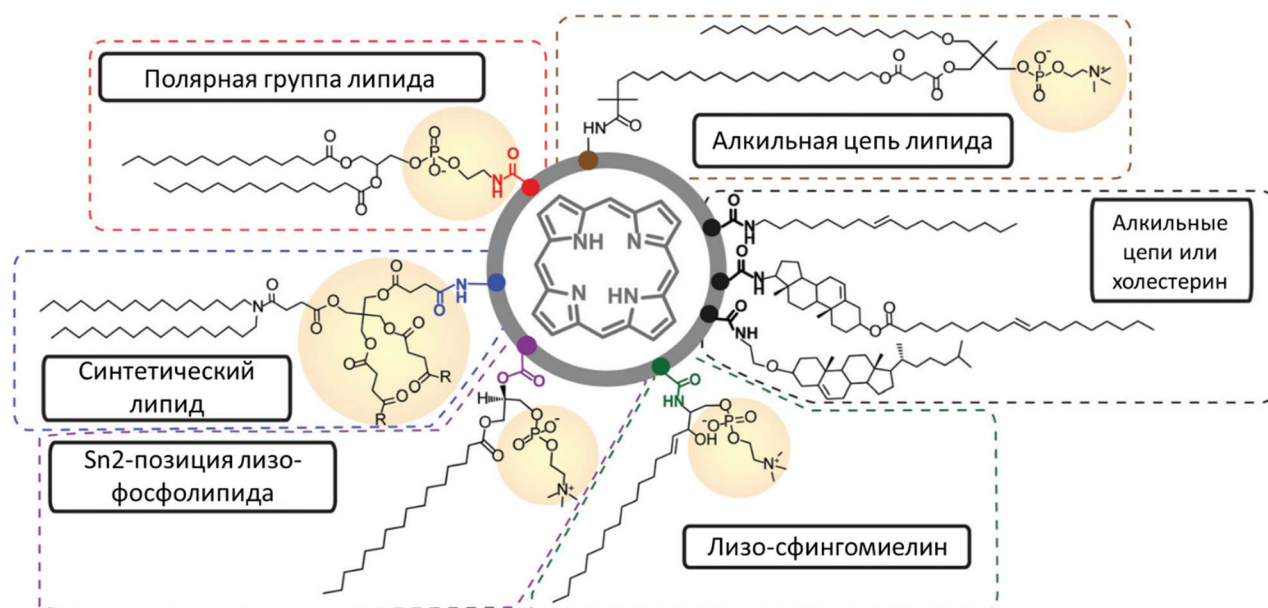


Рисунок 1.14. Методы включения порфиринов в липидную мембрану с помощью конъюгатов на основе порфиринсодержащих производных фосфолипидов [204].

Однако такие соединения требуют разработки синтетических методик, и массовое производство порфисом на основе прямой модификации липидов рискует быть экономически нецелесообразным. На данный момент известны примеры масштабирования производства чистых порфириновых фосфолипидов в граммовых масштабах [205]. Наконец, ведется разработка новых производных порфиринов, а также конъюгатов порфиринов с полимерами, которые представляют интерес для ФДТ в качестве систем доставки лекарств или каталитических систем [206,207].

Другая усовершенствованная форма липосом, представляющая интерес для данной работы, – керасомы – была разработана и изучена за последние два десятилетия [194,208–210]. Строительные блоки керасом представляют собой искусственные липиды с триэтоксисилановыми остатками в головной группе (рис. 1.13, структура 1), которые способны к самосборке в везикулярные структуры и к последующей полимеризации за счет гидролиза этоксисилильных групп и образования силоксановых связей между соседствующими молекулами липида [193].

Такая особенность усложняет процесс получения керасом, поскольку триэтоксисилановая группа нерастворима в воде и оказывает плохое влияние на водную растворимость липида. Так, первый представленный в литературе керасообразующий липид N^1, N^1 -дигексадецил- N^4 -(3-(триэтоксисилил)пропил)сукцинамид нерастворим в воде. Для инициирования его самоорганизации в липосомальные структуры необходимо

обеспечить условия мягкого гидролиза в кислой среде при $\text{pH} = 3$, как было показано в одной из основополагающих работ [193]. Существует и другой вид керасомообразующего липида, содержащий аммонийную группу, которая обеспечивает растворимость даже для негидролизованной формы липида (рис. 1.15, структура 2). В связи с необходимостью гидролиза для керасом используются различные методы приготовления. Один из них – это традиционный для липосом метод гидратации тонкой плёнки с условием, что гидратирующий раствор должен обладать $\text{pH} = 3$, при этом растворение липидной фазы, лимитированное процессом гидролиза, занимает несколько часов. Получаемые агрегаты, как правило, обладают диаметром 200–400 нм и индексом полидисперсности 0.25–0.4 по данным метода динамического светорассеяния. Такие частицы плохо поддаются обработке с помощью экструзии, поэтому применяют ультразвуковую обработку [193]. Применяют также метод инъекции, когда липид предварительно гидролизуют в 1 мМ растворе соляной кислоты в этаноле, а затем плавно вносят этаноловый раствор в воду при перемешивании [211]. Такой метод позволяет получать наиболее монодисперсные керасомы, однако их загрузка гидрофобными или гидрофильными субстратами оказывается проблематичной.

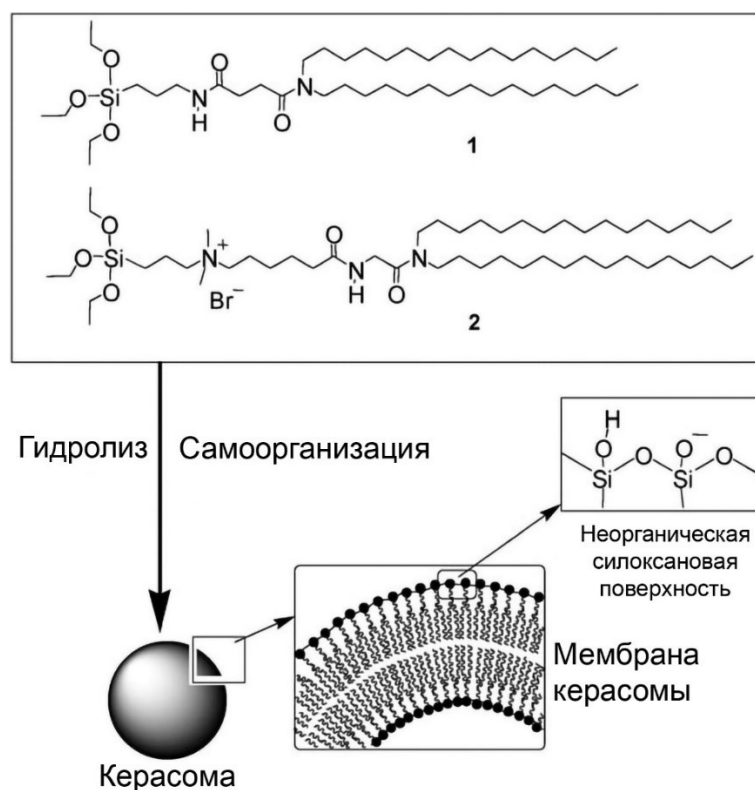


Рисунок 1.15. Структурные формулы оригинальных керасомообразующих липидов и схема образования силиконовых связей на поверхности керасом [193].

Липиды, формирующие керасомы, сами по себе замедляют высвобождение загруженных молекул за счет развитых ковалентных связей на поверхности мембраны [212,213], а также предоставляют морфологическую прочность, таким образом, керасомы являются наиболее стойкими из известных везикулярных наноносителей [214]. Они не только стабильны при хранении, но и устойчивы к солюбилизации мембран молекулами ПАВ [193], что делает их очень привлекательной альтернативой липосомам с практической точки зрения. Такой нанотехнологический строительный блок для разработки носителей лекарств привлек большое внимание, и за последнее десятилетие были сделаны различные концептуальные вклады. Структура липида состоит из трёх компонентов: гидрофобные домены, спейсер, и головной фрагмент, содержащий триэтоксисилановую группу. Подбор этих компонентов при синтезе позволяет проводить множество модификаций структуры для получения функционализированной молекулы [193,208]. К настоящему времени различные авторы предложили и исследовали некоторые модификации исходной структуры, такие как липид с холестерином в качестве гидрофобного домена [215], разветвленные липиды с различным количеством концевых и головных групп [216], липиды на основе аминокислот [213], дисульфидсодержащие липиды [217], азидсодержащие липиды [209], липиды, конъюгированные с порфирином [218]. В одной из работ было показано, как изменение количества гидрофобных цепей и триэтоксисилильных групп в молекуле оказывает влияние на скорость высвобождения лекарства как гидрофильной, так и гидрофобной природы [216]. Также был разработан чувствительный к окислительно-восстановительному потенциалу керасомообразующий липид, содержащий связь S-S, которая в присутствии биологических окислителей позволяет отделять силоксановую оболочку для ускоренного высвобождения лекарственного средства [219]. В работе [219] заменили этоксисилильную головную группу трифенилфосфонием и использовали смесь исходного керасомообразующего липида и модифицированного трифенилфосфонием липида для адресной доставки в митохондрии. В другой работе конъюгировали фрагмент порфирина с керасомами в качестве фотосенсибилизатора для терапии рака [218] и разработали наноноситель с порфирином, нагруженный цетуксимабом, для терапии колоректального рака [220]. Кроме того, на основе аспарагиновой кислоты был синтезирован альтернативный вариант керасомообразующего липида, который способен самоорганизовываться в керасомы так же эффективно, как и оригинальный липид [213,221]. По аналогии с модификацией

липосомальной платформы, вышеперечисленные вариации керасомообразующего липида можно отнести к ковалентным модификациям.

Как и липосомы, керасомы также могут быть нековалентно модифицированы с помощью целевых лигандов и стелс-полимеров для нацеленного воздействия и пролонгирования времени циркуляции, чтобы подстраивать наноноситель для конкретных задач [222–225]. Например, изучено использование ПЭГилированных катионных керасом в качестве носителя РНК и продемонстрирован их потенциал для лечения заболеваний печени [222]. Различные смеси керасомообразующих липидов с обычными фосфатидилхолинами также были успешно приготовлены и исследованы с точки зрения стабильности и скорости высвобождения лекарственного средства, в работе также продемонстрированы их термочувствительные свойства [220,226]. Кроме того, гибридные липосомальные керасомы использовали в качестве средства доставки противоопухолевых препаратов, которые могут быть активированы при помощи сфокусированного высокоинтенсивного ультразвука [223]. В той же группе исследователей применяли керасомы для одновременной визуализации и высвобождения доксорубина [225], разработали наноноситель для доставки химиотерапевтических препаратов и газообразного кислорода для преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевой ткани [210].

Как новый тип наноконтейнера, керасомы были сразу же исследованы токсикологическими и фармакокинетическими методами, и было показано, что их острая токсичность наблюдается при относительно высокой концентрации липида в 50 мг/кг [227]. Время циркуляции керасом выше, чем у обычных липосом, но ниже, чем у стелс-липосом, модифицированных ПЭГ. Предполагается, что морфологическая стабильность керасом является движущим фактором пролонгирования времени циркуляции *in vivo* [227].

Таким образом, липосомы как платформа для доставки лекарственных средств за последние десятилетия стали более разнообразны и приобрели новые уникальные и стимул-отзывчивые свойства. Так, получают порфисомы – стимул-отзывчивые везикулы, позволяющие одновременно осуществлять доставку лекарств, визуализацию тканей и генерацию активных форм кислорода, преимущественно производятся из ковалентно модифицированных липидов. Путём включения в структуру липидов этоксисилильных групп получают керасомы – везикулярные наночастицы, сшиваемые на поверхности

силоксановыми связями, наноконтейнеры с непревзойденной морфологической устойчивостью по сравнению с другими видами везикулярных частиц. Будучи относительно новыми концепциями, порфисомы и керасомы обладают своими преимуществами, но не так подробно изучены, как фосфолипидные липосомы. Поэтому новые исследования, вовлекающие эти наночастицы, и новые способы их получения актуальны и востребованы.

1.2.4. Обзор механизмов преодоления биологических барьеров липосомальными системами

При разработке липосом в качестве систем доставки лекарств необходимо понимать природу их взаимодействия с биологическими барьерами на пути к органу-мишени, которая регулируется физико-химическими, биохимическими и биологическими факторами. Во многих взаимодействиях именно физико-химические характеристики липосом определяют судьбу инкапсулированных соединений. В свою очередь, инкапсулированные соединения играют главную роль в проявлении терапевтического эффекта. Лекарственные препараты и другие терапевтические средства на основе наночастиц обладают более высокой эффективностью и меньшими побочными эффектами [91,228–230]. Поведение наночастиц в таких условиях и правильные взаимодействия с биологическими барьерами являются ключом к подбору решения для терапевтических и фармакологических задач [98,231,232].

Среди биологических барьеров значение ГЭБ, безусловно, является наиболее высоким. При осуществлении доставки лекарственного вещества в мозг, этот барьер можно обойти только при интраназальном введении через обонятельный регион, а пероральный или трансдермальный пути в итоге доставляют наночастицы в кровоток, где им предстоит преодолевать ГЭБ. Суммируя известные в настоящее время успешные подходы к доставке в мозг, можно выделить неспецифические катионные (агглютинин, хитозан, катионизированный альбумин, катионные ПАВ, пептид ТАТ, полиаргинин и др.) [233–237] и модификации специфичными лигандами (глюкоза, глутатион, трансферрин, инсулин, лактоферрин и др.) [179,238–240]. В этом контексте комбинация как катионных, так и специфических модификаторов может быть многообещающим способом доставки лекарства в мозг (рис.1.16).

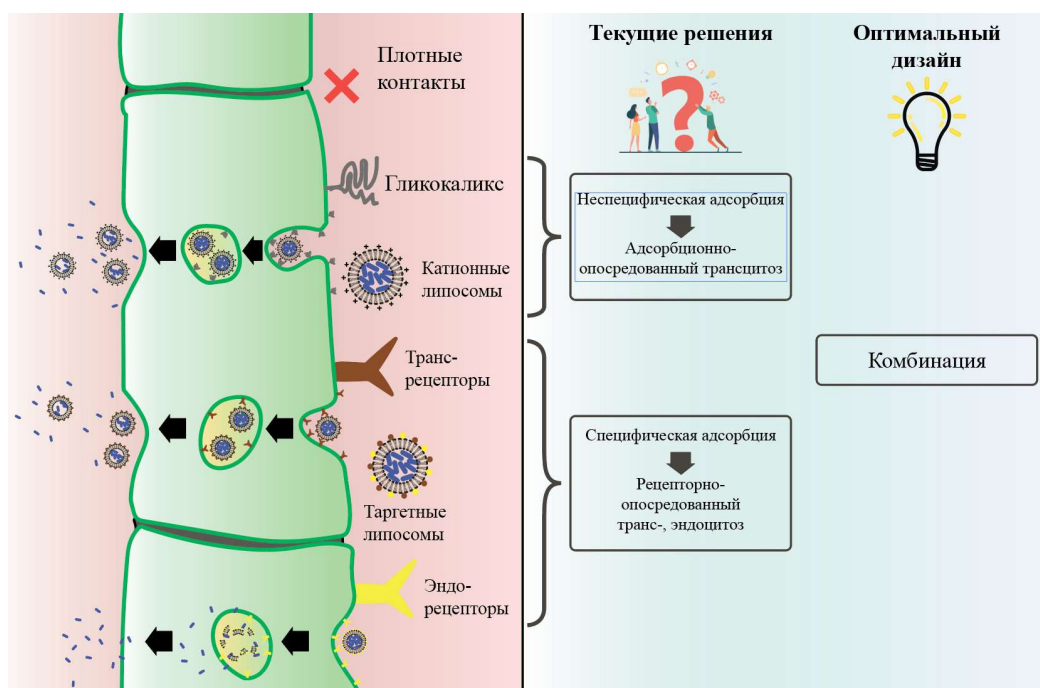


Рисунок 1.16. Схематическое изображение современных подходов к преодолению ГЭБ.

Одним из фундаментальных параметров, определяющих взаимодействие наночастиц с клетками, является их заряд. Несмотря на большое количество работ, обсуждающих влияние заряда частиц, известных на сегодняшний день, общее понимание того, каким должен быть заряд частиц для доставки лекарств против рака, еще не достигнуто [241]. Многие результаты противоречивы и несопоставимы друг с другом из-за различий в объектах исследования, типах частиц и экспериментальных подходах. Поглощение катионных или анионных частиц может проходить по разным механизмам и с разной интенсивностью в зависимости от типа клеток, что позволяет нацеливать липосомы на определенные клетки с помощью их заряда [104,242]. Кроме того, для доставки генетического материала катионные частицы обычно считаются оптимальными прежде всего из-за их способности хранить и защищать отрицательно заряженные нуклеиновые кислоты [243]. Однако обобщение роли заряда частиц осложняется разнообразием клеточных культур и типов наночастиц, которые могут иметь различную морфологию, размеры и специфические взаимодействия с клеточными рецепторами. Исследования механизмов поглощения липосом клетками продолжаются [244], и в одном из недавних исследований делается вывод, что первичным механизмом поглощения как катионных, так и анионных частиц является макропиноцитоз [245]. С другой стороны, имеются данные о том, что на интенсивность и механизм поглощения может сильно

влиять даже такая маленькая деталь как стереохимия геминальных дикаатионных ПАВ, используемых для модификации липосом [246,247]. Другие исследования предполагают, что основным механизмом поглощения катионных наночастиц является адсорбция, опосредованная электростатическими взаимодействиями частиц с мембраной, и последующий эндоцитоз (адсорбционный эндоцитоз) [248]. В литературе по доставке лекарств в головной мозг механизм проникновения катионных частиц принято называть опосредованным адсорбцией трансцитозом [92,249–251]. При этом в кровотоке частицы с сильным зарядом, положительным или отрицательным, скоротечно приобретают белковую корону и легче поглощаются макрофагами, что препятствует выполнению задачи по доставке лекарств [99,252,253]. С физико-химической точки зрения движущей силой ассоциации катионных частиц с отрицательными клеточными мембранами является кулоновское притяжение.

Преимущество положительно заряженных наночастиц в контексте доставки в мозг заключается в их способности электростатически притягиваться к мембране эндотелиальных клеток ГЭБ из-за присущего им отрицательного заряда и, таким образом, способствовать поглощению тканями [100,103–106]. Различные типы наночастиц продемонстрировали улучшенное поглощение при добавлении положительного поверхностного заряда [103,106,254]. Известно, что катионные липосомы нацелены на сосудистую сеть опухоли [154], в то время как эндотелиальные клетки имеют множество анионных участков на своей поверхности [255]. Клетки ГЭБ обладают особенно большим количеством анионных участков из-за присутствия гликокаликса, представленного биополимерами с множеством карбоксильных групп [256]. Именно поэтому опосредованный адсорбцией трансцитоз считается важным путем проникновения в ткань мозга для системно вводимых формуляций [92,250].

Таким образом, управление поведением частиц в биологических средах на их пути к целевым биообъектам можно осуществлять и путём подстройки физико-химических свойств, как заряд частиц, их дзета-потенциал. Поэтому проведение исследований, обобщающих влияние физико-химических свойств на параметры эффективности наночастиц в выполнении биологических и фармакологических задач, является необходимым вкладом, который продвинет текущие научные разработки на новый уровень.

В целом, исследования в области разработки липосомальных и иных везикулярных наночастиц для доставки лекарств востребованы, актуальны, вовлекают огромное число междисциплинарных научных групп и развиваются в очень быстром темпе. Анализ современной литературы в области наномедицины показывает, что с точки зрения клинической практики липосомы по-прежнему удерживают лидирующие позиции вследствие своей биосовместимости, универсальности, отсутствия токсичности и высокого сродства к клеточным мембранам. Несмотря на то, что достигнуты значительные успехи в продвижении лекарственных препаратов от лабораторного стола к пациенту (from bench to bedside), известен ряд задач, решение которых может способствовать прогрессу в этой области. Прежде всего, недостаточно изучена нековалентная модификация носителей, за исключением формирования ПЭГилированных липосом. Между тем этот способ имеет очевидные преимущества в связи с его простотой, универсальностью и широким спектром возможностей введения в липидный бислой различных функциональных групп, конъюгированных с гидрофобным фрагментом. Еще одним недостаточно разработанным аспектом является использование комбинированной модификации частиц для обеспечения как неспецифического (например, электростатического) сродства к поверхности клеток, так и таргетности, основанной на принципах молекулярного распознавания.

Следует отметить, что особенностью современных работ, выходящих по тематике липосомальной доставки лекарств, является специализированный и узконаправленный подход, фокусирующийся на частных деталях, то есть на подборе нацеливающих лигандов, стимул-отзывчивых функциональных групп. При этом в подавляющем большинстве работ за основу берут известную формулу липосом из фосфолипидов и холестерина с добавлением ПЭГилированных липидов с массой полимера 2000 Да, несмотря на появление большого числа работ, опровергающих успешность такого подхода как с точки зрения эксплуатации эффекта повышенной проницаемости, так и с точки зрения оптимальности подбора длины цепей ПЭГ. В литературе недостаточно работ, фокусирующихся на физико-химических свойствах липосом, в особенности, на дзета-потенциале, в текущих научных публикациях обуславливает необходимость систематического взгляда на липосомальные системы доставки лекарств с позиции физической химии. Эти мало изученные аспекты в области создания липосомальных

наноконтейнеров положены в основу исследований, запланированных в рамках диссертационной работы.

Представленный литературный обзор обнаруживает большой потенциал, актуальность и значимость исследований геминальных ПАВ. Особое внимание исследователей в настоящее время уделено разработке новых геминальных амфифилов, в состав которых включаются природные и биоразлагаемые фрагменты, которые положительно сказываются и на функциональной активности, и на биосовместимости таких ПАВ. В то же время липиды и образуемые ими липосомы представляют собой гибкую платформу, на основе которой можно строить исследования о влиянии дзета-потенциала и о методах модификации липосом с применением катионных ПАВ. Так, выбор дикатионных гидроксиэтилированных геминальных ПАВ в настоящей работе обусловлен наличием в их головных группах дополнительных центров для межмолекулярных взаимодействий в составе смешанных супрамолекулярных структур с молекулами липидов. Уделяется внимание и модификации гидроксиэтилированных ПАВ карбаматным фрагментом, который является биоразлагаемым, а также обеспечивает еще большее число полярных фрагментов головной группы для обеспечения множественных межмолекулярных взаимодействий. Для получения более широкой информации о свойствах, активности и модифицирующего потенциала данных ПАВ предусматриваются работы и с новыми мономерными катионными ПАВ изотиурониевого ряда, а также с катионным липидом ДОТАП.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Исходные вещества и реагенты

Поверхностно-активные вещества

В диссертационной работе в качестве объектов исследования выступали дикаationные геминальные ПАВ с карбаматными и гидроксипропиловыми фрагментами с различной длиной гидрофобных радикалов и спейсерных фрагментов, синтезированные в лаборатории Высокоорганизованных сред к.х.н. Лукашенко С.С. и к.х.н. Кузнецовым Д.М. Изотиуриониевые катионные ПАВ, синтезированные в Химическом Институте им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) Федерального Университета под руководством д.х.н. Галкиной И.В., обсуждаются в диссертации для сопоставления антимикробной активности моно- и дикаationных амфифилов (рис. 2.1).

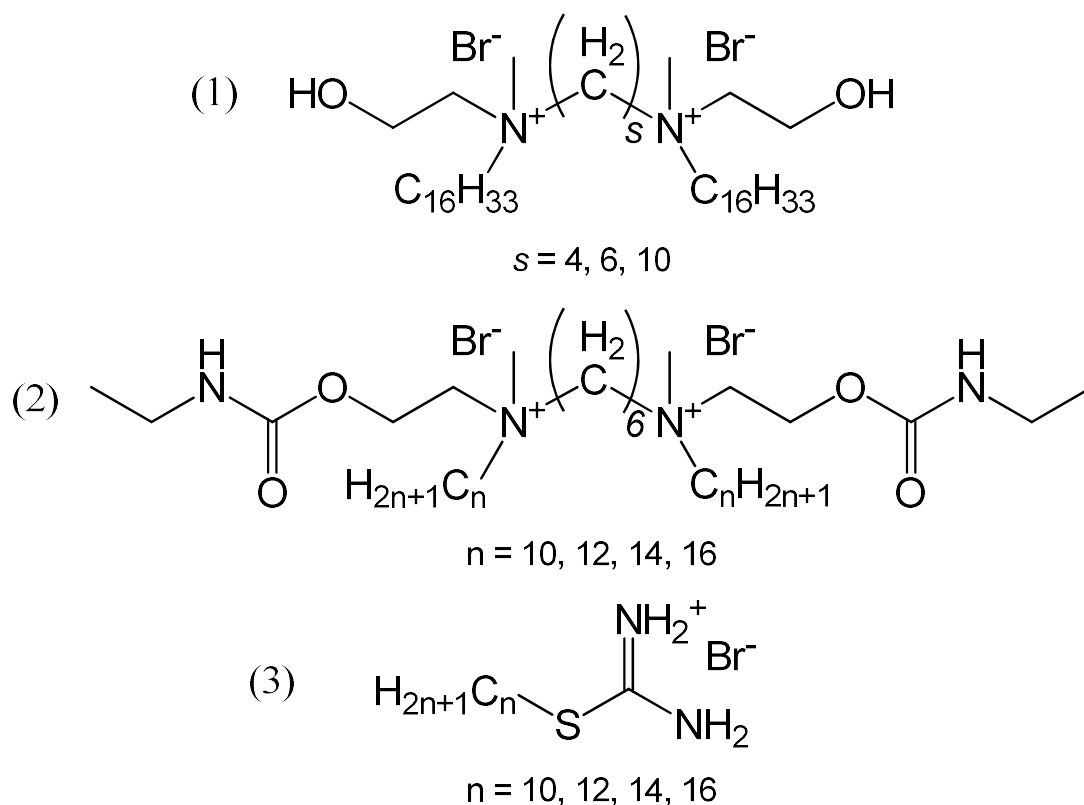


Рисунок 2.1. ПАВ, исследованные в работе: (1) N,N'-дигексадецил-N,N'-диметил-N,N'-бис(2-(гидрокси)этил)алкан- α,ω -диаммоний дибромид; (2) N,N'-диалкил-N,N'-диметил-N,N'-бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)гексан- α,ω -диаммоний дибромид; (3) 2-алкилизотиурионий бромид.

Гидроксиэтилированные ПАВ N,N' -диалкил- N,N' -диметил- N,N' -бис(2-(гидрокси)этил)алкан- α,ω -диаммоний дибромиды были синтезированы по ранее описанным методикам [257,258]. Эти соединения были использованы в качестве прекурсоров для взаимодействия с этилизоцианатом в присутствии 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана (ДАБКО), выступающего в роли катализатора, для получения карбаматсодержащих аналогов, N,N' -диалкил- N,N' -диметил- N,N' -бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)гексан- α,ω -диаммоний дибромидов (рис. 2.2) [259].

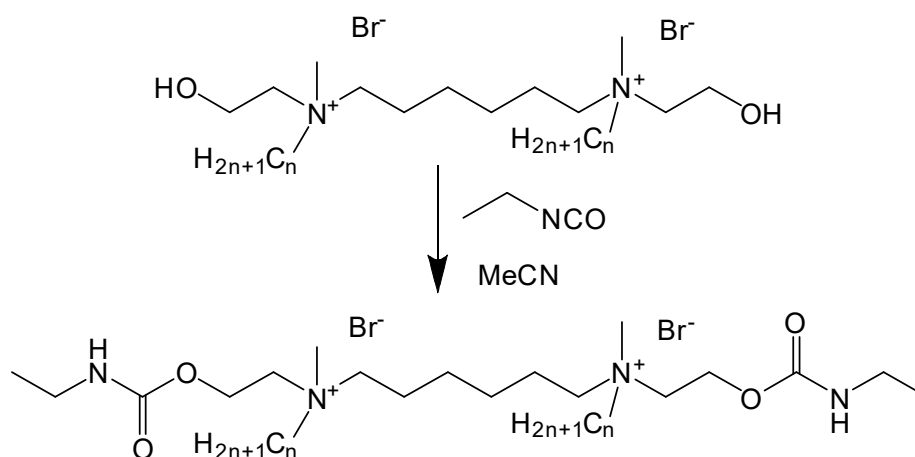


Рисунок 2.2. Схема синтеза карбаматсодержащих геминальных ПАВ с алкильными заместителями из 10, 12, 14 и 16 атомов углерода.

Структура всех полученных соединений подтверждена с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением (ИЭР) Bruker Amazon X и ЯМР-спектрометра Bruker Avance 400.

Карбаматсодержащее геминальное ПАВ с децильными гидрофобными заместителями **10-6-10(Et)** N,N' -дидецил- N,N' -диметил- N,N' -бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)гексан-1,6-диаммоний дибромид.

Смесь 1.00 г (1.48 ммоль) N,N' -дидецил- N,N' -диметил- N,N' -бис(2-гидроксиэтил)гексан-1,6-диаммония дибромид, 0.05 г ДАБКО и 0.48 мл (6.07 ммоль) этилизоцианата перемешивали в 20 мл безводного ацетонитрила при 60 °С в течение 16 ч. В реакционной смеси образовался белый осадок, который отфильтровали и перекристаллизовали из этилацетата. Осадок отделяли и сушили на водяной бане (45 °С) в вакууме (15 мм рт. ст.). Выход 0.60 г (50%). Белый порошок. Т. пл. 115-118 °С. Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м. д., J, Гц): 5.67 м (NH, 2H); 4.53 м ($\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-}$, 4H);

3.82 м ($N^+-\underline{CH}_2-CH_2-O-CO-$, 4H); 3.65 м ($N^+-\underline{CH}_2-(CH_2)_4-\underline{CH}_2-N^+$, 4H); 3.46 – 3.44 м ($N^+-\underline{CH}_2-CH_2-Алк$, 4H); 3.35 ш с ($N^+-\underline{CH}_3$, 6H); 3.20 к ($CO-NH-\underline{CH}_2-CH_3$, 4H, $^3J_{NH}$ 6.9); 1.98 м ($N^+-CH_2-CH_2-(\underline{CH}_2)_2-CH_2-CH_2-N^+$, 4H); 1.71 м ($N^+-CH_2-\underline{CH}_2-(CH_2)_2-\underline{CH}_2-CH_2-N^+$, 4H); 1.61 м ($N^+-CH_2-\underline{CH}_2-Алк$, 4H); 1.35 и 1.26 два м ($-(\underline{CH}_2)_7-CH_3$, 28H); 1.16 т ($-NH-CH_2-\underline{CH}_3$, 6H, $^3J_{NH}$ 7.2); 0.87 т ($N^+-(CH_2)_n-\underline{CH}_3$, 6H, $^3J_{NH}$ 6.8); ИК-спектр (KBr): ν : 3460, 3239, 2925, 2855, 1719, 1527, 1466, 1378, 1357, 1299, 1250, 1138, 1085, 1030, 935, 901, 776, 723, 685, 651 cm^{-1} . Масс-спектр ИЭР: $m/z = [(M-2Br)/2]^+ = 328.29$ (рассч. 328.54).

Карбаматсодержащее геминальное ПАВ с додецильными гидрофобными заместителями **12-6-12(Et)** N,N'-дидодецил-N,N'-диметил-N,N'-бис(2-этилкарбамоилокси)этил)гексан-1,6-диаммоний дибромид.

Смесь 1.00 г (1.37 ммоль) N,N'-дидодецил-N,N'-диметил-N,N'-бис(2-гидроксиэтил)гексан-1,6-диаммония дибромида, 0.05 г ДАБКО и 0.44 мл (5.62 ммоль) этилизоцианата перемешивали в 20 мл безводного ацетонитрила при 60 °С в течение 16 ч. В реакционной смеси образовался белый осадок, который отфильтровали и перекристаллизовали из смеси этилацетата и метанола 50:1. Осадок отделяли и сушили на водяной бане (45 °С) в вакууме (15 мм рт. ст.). Выход 0.62 г (52%). Белый порошок. Т. пл. 116-119 °С. Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м. д., J, Гц): 5.71 м (\underline{NH} , 2H); 4.54 м ($N^+-CH_2-\underline{CH}_2-O-CO-$, 4H); 3.81 м ($N^+-\underline{CH}_2-CH_2-O-CO-$, 4H); 3.66 м ($N^+-\underline{CH}_2-(CH_2)_4-\underline{CH}_2-N^+$, 4H); 3.45 м ($N^+-\underline{CH}_2-CH_2-Алк$, 4H); 3.34 ш с ($N^+-\underline{CH}_3$, 6H); 3.21 м ($CO-NH-\underline{CH}_2-CH_3$, 4H, $^3J_{NH}$ 6.9); 1.99 м ($N^+-CH_2-CH_2-(\underline{CH}_2)_2-CH_2-CH_2-N^+$, 4H); 1.72 м ($N^+-CH_2-\underline{CH}_2-(CH_2)_2-\underline{CH}_2-CH_2-N^+$, 4H); 1.63 м ($N^+-CH_2-\underline{CH}_2-Алк$, 4H); 1.36 и 1.26 два м ($-(\underline{CH}_2)_7-CH_3$, 36H); 1.16 т ($-NH-CH_2-\underline{CH}_3$, 6H, $^3J_{NH}$ 7.2); 0.88 т ($N^+-(CH_2)_n-\underline{CH}_3$, 6H, $^3J_{NH}$ 6.8); ИК-спектр (KBr): ν : 3435, 3241, 2924, 2853, 2363, 2344, 1711, 1637, 1533, 1467, 1378, 1356, 1251, 1139, 1085, 1031, 990, 934, 902, 774, 722, 650 cm^{-1} . Масс-спектр ИЭР: $m/z = [(M-2Br)/2]^+ = 356.33$ (рассч. 356.59).

Карбаматсодержащее геминальное ПАВ с тетрадецильными гидрофобными заместителями **14-6-14(Et)** N,N'-диметил-N,N'-дитетрадецил-N,N'-бис(2-этилкарбамоилокси)этил)гексан-1,6-диаммоний дибромид.

Смесь 1.00 г (1.27 ммоль) N,N'-диметил-N,N'-дитетрадецил-N,N'-бис(2-гидроксиэтил)гексан-1,6-диаммония дибромида, 0.05 г ДАБКО и 0.41 мл (5.22 ммоль) этилизоцианата перемешивали в 20 мл безводного ацетонитрила при 60 °С в течение 16 ч. В реакционной смеси образовался белый осадок, который отфильтровали и

перекристаллизовали из этилацетата. Осадок отделяли и сушили на водяной бане (60 °С) в вакууме (15 мм рт. ст.). Выход 0.70 г (59%). Белый порошок. Т. пл. 119-122 °С. Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м. д., J, Гц): 5.58 м ($\underline{\text{NH}}$, 2H); 4.54 м ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-\text{CO}-$, 4H); 3.82 м ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$, 4H); 3.65 – 3.64 м ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_2}-(\text{CH}_2)_4-\underline{\text{CH}_2}-\text{N}^+$, 4H); 3.45 – 3.43 м ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{Алк}$, 4H); 3.34 ш с ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_3}$, 6H); 3.21 к ($\text{CO}-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_3$, 4H, $^3J_{\text{NH}}$ 6.9); 1.98 м ($\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\underline{\text{CH}_2})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+$, 4H); 1.71 м ($\text{N}^+-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-(\text{CH}_2)_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{N}^+$, 4H); 1.62 м ($\text{N}^+-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{Алк}$, 4H); 1.35 и 1.25 два м ($-(\underline{\text{CH}_2})_7-\text{CH}_3$, 44H); 1.16 т ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_3}$, 6H, $^3J_{\text{NH}}$ 7.2); 0.87 т ($\text{N}^+-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_3}$, 6H, $^3J_{\text{NH}}$ 6.8); ИК-спектр (KBr): ν : 3467, 3239, 2923, 2853, 1718, 1528, 1467, 1378, 1357, 1299, 1251, 1138, 1085, 1030, 988, 936, 901, 775, 722, 650 cm^{-1} . Масс-спектр ИЭР: $m/z = [(\text{M}-2\text{Br})/2]^+ = 384.36$ (рассч. 384.64).

Карбаматсодержащее геминальное ПАВ с гексадецильными гидрофобными заместителями **16-6-16(Et)** $\text{N,N}'$ -дигексадецил- $\text{N,N}'$ -диметил- $\text{N,N}'$ -бис(2-этилкарбамоилокси)этилгексан-1,6-диаммоний дибромид.

Смесь 1.00 г (1.19 ммоль) $\text{N,N}'$ -дигексадецил- $\text{N,N}'$ -диметил- $\text{N,N}'$ -бис(2-гидроксиэтил)гексан-1,6-диаммония дибромид, 0.05 г ДАБКО и 0.38 мл (4.87 ммоль) этилизоцианата перемешивали в 20 мл безводного ацетонитрила при 60 °С в течение 16 ч. В реакционной смеси образовался белый осадок, который отфильтровали и перекристаллизовали из этилацетата. Осадок отделяли и сушили на водяной бане (60 °С) в вакууме (15 мм рт. ст.). Выход 0.78 г (67%). Белый порошок. Т. пл. 120-123 °С. Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м. д., J, Гц): 5.26 м ($\underline{\text{NH}}$, 2H); 4.54 м ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-\text{CO}-$, 4H); 3.79 м ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$, 4H); 3.63 – 3.61 м ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_2}-(\text{CH}_2)_4-\underline{\text{CH}_2}-\text{N}^+$, 4H); 3.43 – 3.41 м ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{Алк}$, 4H); 3.31 ш с ($\text{N}^+-\underline{\text{CH}_3}$, 6H); 3.21 к ($\text{CO}-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_3$, 4H, $^3J_{\text{NH}}$ 6.9); 1.98 м ($\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\underline{\text{CH}_2})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+$, 4H); 1.72 м ($\text{N}^+-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-(\text{CH}_2)_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{N}^+$, 4H); 1.63 м ($\text{N}^+-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{Алк}$, 4H); 1.35 и 1.26 два м ($-(\underline{\text{CH}_2})_7-\text{CH}_3$, 52H); 1.16 т ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_3}$, 6H, $^3J_{\text{NH}}$ 7.2); 0.88 т ($\text{N}^+-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_3}$, 6H, $^3J_{\text{NH}}$ 6.8); ИК-спектр (KBr): ν : 3435, 3239, 2922, 2852, 1719, 1618, 1528, 1468, 1378, 1358, 1299, 1251, 1139, 1085, 1031, 989, 936, 901, 776, 722, 691, 655 cm^{-1} . Масс-спектр ИЭР: $m/z = [(\text{M}-2\text{Br})/2]^+ = 412.42$ (рассч. 412.69).

В роли классического амфифила в работе для сравнения было использовано катионное ПАВ цетилтриметиламмоний бромид (Sigma-Aldrich, >99%). Неионное ПАВ Твин 80 (Ferak Berlin, >95%) применяли для нековалентной модификации керасом (рис. 2.3).

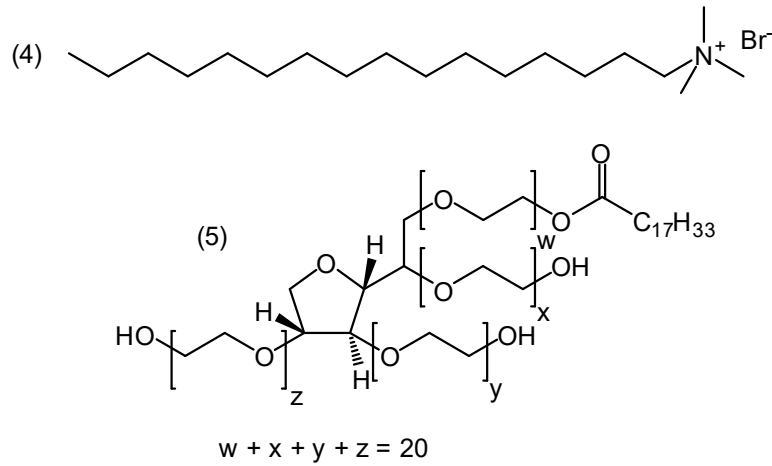


Рисунок 2.3. Классические ПАВ: (4) цетилтриметиламмоний бромид; (5) Твин 80 (полисорбат 80).

Липиды

В качестве основных компонентов для формирования липосом, модифицированных гидроксиэтилированными геминальными ПАВ, использовали фосфатидилхолин из соевых бобов (Lipoid, >98%). Для формирования других липосом применяли соевый фосфатидилхолин (Avanti, 95%), холестерин (Sigma-Aldrich, >99%), диолеил-3-триметиламмоний пропан (ДОТАП, Lipoid, 95%) (рис. 2.4).

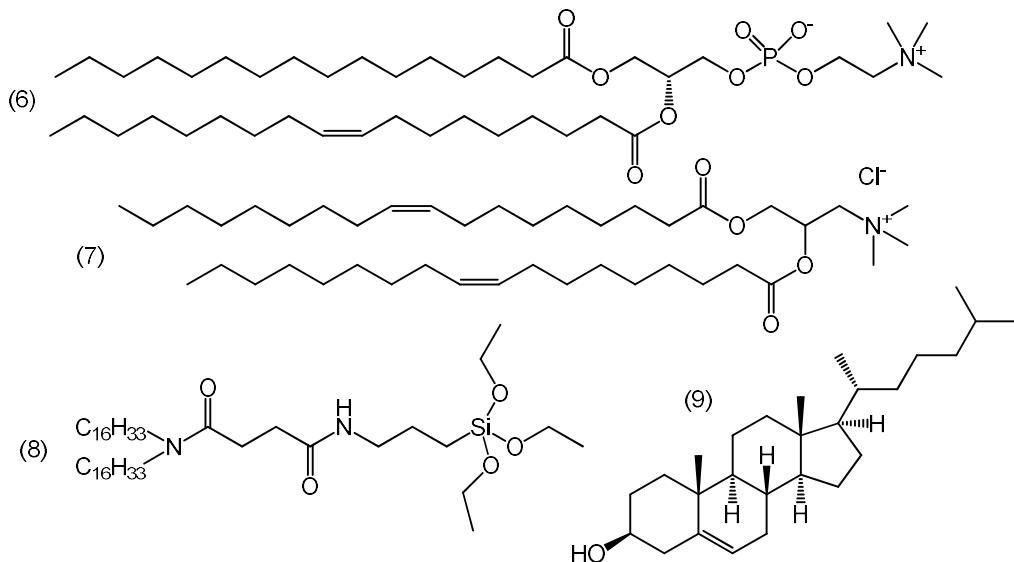


Рисунок 2.4. Липиды, использованные в работе для формирования наночастиц: (6) фосфатидилхолин (ФХ); (7) диолеил-3-триметиламмоний пропан (ДОТАП); (8) N-[N-(3-триэтоксисилил)пропилсукцинаммоил]дигексадециламин (CFL16); (9) холестерин (Хол).

Керасомообразующий липид N-[N-(3-триэтоксисилил)пропилсукцинаммоил]дигексадециламин (CFL16) синтезирован двухстадийной конденсацией дигексадециламина с янтарным ангидридом (Sigma-Aldrich, >99%) в присутствии триэтиламина (Sigma-Aldrich, >99%) и (3-аминопропил)триэтоксисилана (Sigma-Aldrich, >98%) с 1-гидроксibenзотриазолом (HOBT, Sigma-Aldrich, >97%) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC, Sigma-Aldrich, >98%) в дихлорметане в присутствии диизопропилэтиламина (DIPEA, Sigma-Aldrich, 99.8%) по методике, описанной в литературе (рис. 2.5) [217].

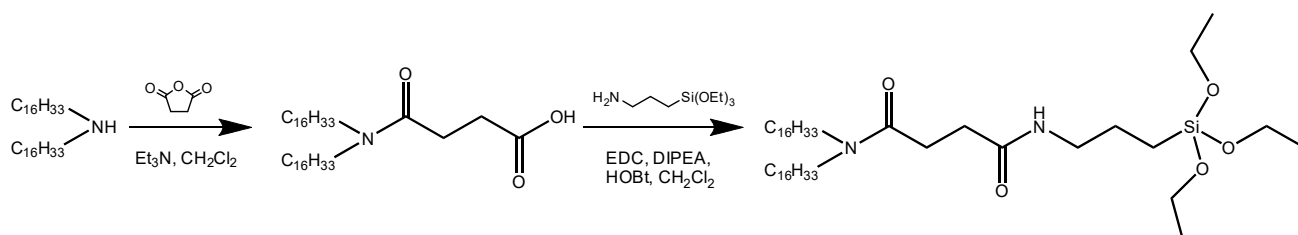


Рисунок 2.5. Схема синтеза керасомообразующего липида CFL16.

N,N-Дигексадециламин

Гексадециламин (10.0 г, 41.4 ммоль) и 1-бромгексадекан (11.39 мл, 37.3 ммоль) растворяли при нагревании в 80 мл безводного этанола в присутствии K_2CO_3 (11.4 г, 82.8 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 120 ч, после чего растворитель отогнали на роторном испарителе при нагревании на водяной бане (60 °C) в вакууме (15 мм рт. ст.). Полученную твердую массу суспензировали в хлороформе (100 мл), профильтровали от осадка, промыли в делительной воронке сначала 1 М раствором H_2SO_4 (50 мл), затем дважды дистиллированной водой (100 мл), после чего отделили органический слой и оставили его над безводным Na_2SO_4 на сутки. Раствор профильтровали, хлороформ отогнали на роторном испарителе на водяной бане (40 °C) в вакууме (15 мм рт. ст.), полученное бледно-желтое твердое вещество перекристаллизовали из гексана трехкратно до получения бесцветного порошка. Выход 7.5 г (39%). Т. пл. 65–68 °C. Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м. д., J, Гц): 2.73 м (N-CH₂-CH₂, 4H); 1.68 м (N-CH₂-CH₂, 4H); 1.30–1.26 м ((CH₂)₁₃, 52H); 0.88 т (CH₃, 6H, $^3J_{HH}$ 6.9). Масс-спектр ИЭР $m/z = [M+H]^+ = 466.66$ (рассч. 466.90).

4-(N,N-дигексадециламино)-4-оксобутановая кислота

Дигексадециламин (1.0 г, 2.30 ммоль), янтарный ангидрид (0.575 г, 5.74 ммоль) и триэтиламин (0.64 мл, 4.59 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (42 мл) и перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали в делительной воронке сначала 10% раствором лимонной кислоты (50 мл), затем насыщенным раствором Na_2CO_3 (20 мл) и дважды дистиллированной водой (50 мл). Затем органический слой отделили и оставили над безводным Na_2SO_4 на сутки. Осадок отфильтровали, отогнали дихлорметан на роторном испарителе на водяной бане (30 °C) в вакууме (15 мм рт. ст.). Полученное темно-коричневое твердое вещество перекристаллизовали из безводного ацетонитрила дважды для получения белого порошка. Выход 1.01 г (77%). Т. пл. 65-68 °C. Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м. д., J, Гц): 3.32 м (N-C(O)-CH₂-CH₂-, 2H); 3.24 м (N-C(O)-CH₂-CH₂-, 2H); 2.69 м (N-CH₂-CH₂, 4H); 1.54 м (N-CH₂-CH₂, 4H); 1.26 м ((CH₂)₁₃, 52H); 0.88 т (CH₃, 6H, $^3J_{\text{HH}}$ 6.7). Масс-спектр ИЭР $m/z = [\text{M}+\text{H}]^+ = 566.7$ (рассч. 566.98); $m/z = [\text{M}-\text{H}]^- = 564.7$ (рассч. 564.96).

Керасомообразующий липид CFL16 N-[N-(3-триэтоксисилил)пропилсукцинаммоил]дигексадециламин.

4-(дигексадециламино)-4-оксобутановую кислоту (0.75 г, 1.32 ммоль), 1-гидроксibenзотриазол (0.233 г, 1.72 ммоль), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (0.267 г, 1.72 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (10 мл) и перемешивали в течение 30 мин, затем в реакционную смесь добавили диизопропилэтиламин (0.300 мл, 1.72 ммоль) и 3-аминопропилтриэтоксисилан (0.403 мл, 1.72 ммоль) и перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Затем дихлорметан отогнали на роторном испарителе при нагревании на водяной бане с вакуумом (40 °C, 15 мм рт. ст.) и оставшуюся непрозрачную густую жидкую массу разделяли при помощи жидкостной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью дихлорметан – метанол (30:1), получив бесцветное масло. Выход 0.43 г (42%). $R_f = 0.33$ (дихлорметан – метанол 30:1). Т. пл. 6-10 °C. Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м. д., J, Гц): 6.31 ш с (C(O)-NH-CH₂-, 1H); 3.81 к (-Si-O-CH₂-CH₃, 6H, $^3J_{\text{HH}}$ 7.0); 3.28 м (-NH-CH₂-CH₂-CH₂-Si-, 2H); 3.22 м (N-CH₂-CH₂, 4H); 2.64 м (-N-C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, 2H); 2.53 м (-N-C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, 2H); 1.61 м (-NH-CH₂-CH₂-CH₂-Si-, 2H); 1.55–1.49 два м (N-CH₂-CH₂, 4H); 1.30–1.26 м ((CH₂)₁₃, 52H); 1.22 т (-Si-O-CH₂-CH₃, 9H, $^3J_{\text{HH}}$ 7.0); 0.88 т (CH₃, 6H, $^3J_{\text{HH}}$ 6.9); 0.62 м (-NH-CH₂-CH₂-CH₂-Si-, 2H). Масс-спектр ИЭР: $m/z = [\text{M}+\text{H}]^+ = 769.74$ (рассч. 769.68).

Спектральные зонды и лекарственные субстраты

Для анализа солубилизационной активности ПАВ использовали гидрофобный краситель Оранж ОТ (ChemCruz, >95%). Для исследования самоорганизации ПАВ методом флуориметрии в качестве зонда применяли пирен (Sigma-Aldrich, >99%) (рис. 2.6).

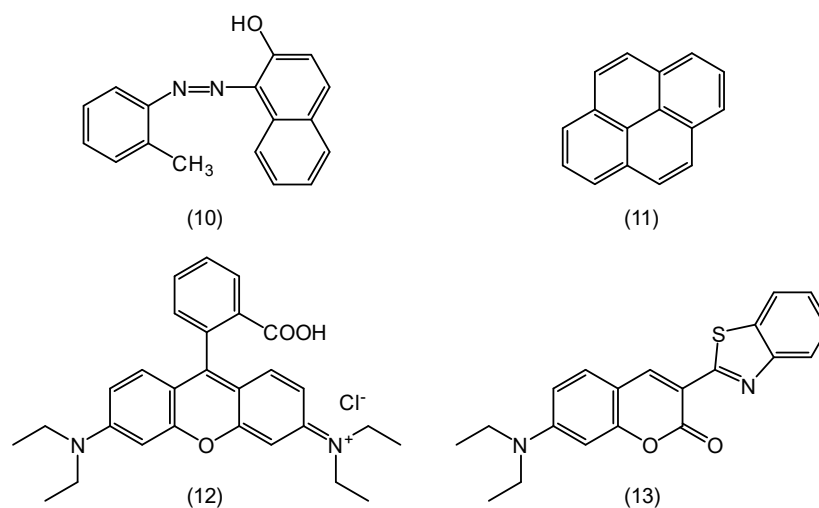


Рисунок 2.6. Спектральные зонды: (10) Оранж ОТ (ООТ); (11) пирен; (12) родамин Б; (13) кумарин 6.

Для визуализации наночастиц с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии, а также для анализа с помощью проточной цитометрии использовали кумарин 6 (Sigma-Aldrich, >98%), родамин Б (Acros Organics, >98%) (рис. 2.6). Среди терапевтических субстратов, загружаемых в липосомы, использовали прапидоксим хлорид (2-ПАМ, Sigma-Aldrich, 99%), доксорубин гидрохлорид (DOX) (Alfa Aesar, >99%), паклитаксел (PTX) (Sigma-Aldrich, >95%) (рис. 2.7).

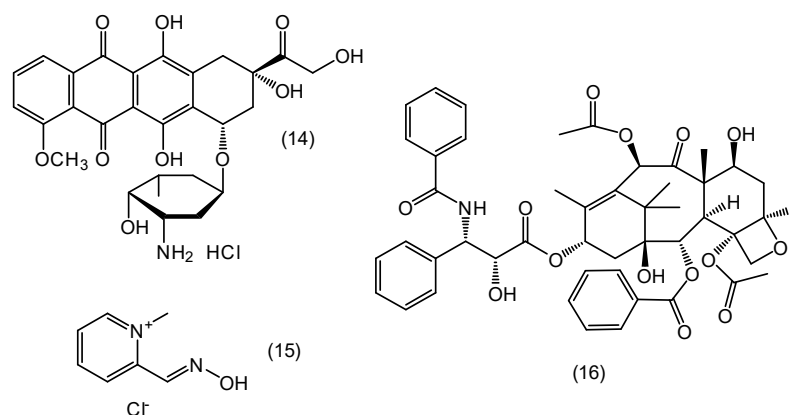


Рисунок 2.7. Лекарственные субстраты: (14) доксорубин гидрохлорид (DOX); (15) прапидоксим хлорид (2-ПАМ); (16) паклитаксел (PTX).

Пептиды

Модификацию липосом производили с помощью амфифильных форм пептидов (рис. 2.8). Лауроил-производные пептидов GGRGD и GGGHK были синтезированы в Научно-образовательном центре фармации Казанского (Приволжского) Федерального Университета под руководством к.б.н. Абдуллина Т.И. Пальмитоил-производное SSRGD (>95%) предоставлено фирмой Altabion (Воронеж, Российская Федерация).

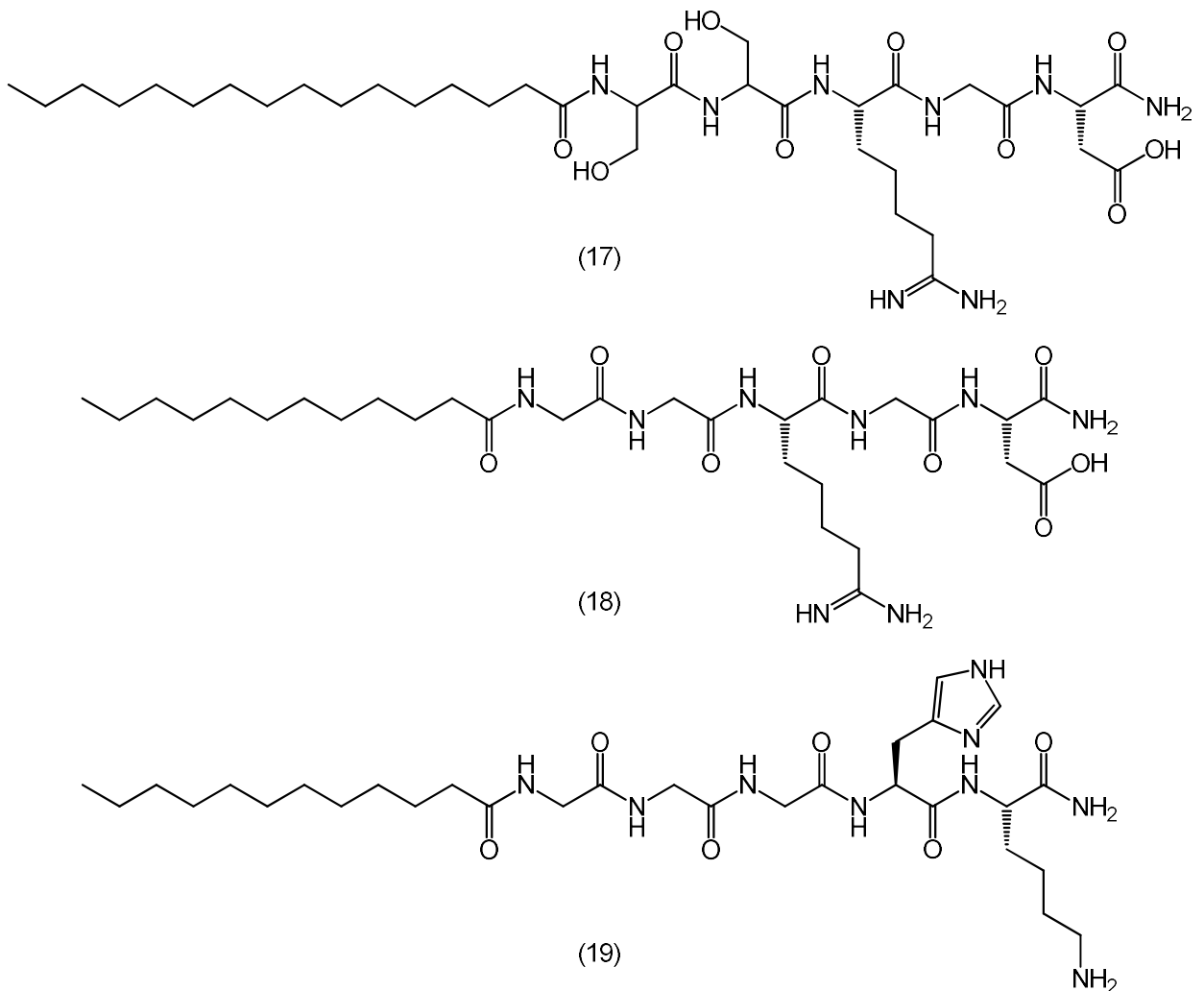


Рисунок 2.8. Амфифильные формы пептидов, использованные для модификации липосом: (17) C_{16} -SSRGD-NH₂; (18) C_{12} -GGRGD-NH₂; (19) C_{12} -GGGHK-NH₂.

Буферы

Для приготовления буферных растворов использовали стандарт-титр для pH-6.86 (тип 4) (УралХимИнвест), а также 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES, Sigma-Aldrich, >99.5%)

Порфирины

Для создания порфисом использовали нефтяные порфирины, представленные различными гомологами со средней молекулярной массой 500.6 г/моль. Состав смеси нефтяных порфиринов, предоставленной д.х.н. Якубовым М.Р. и к.х.н. Мироновым Н.А., охарактеризован в нашей совместной работе [260] и в Приложении (рис. П1, П2, табл. П1).

2.2. Приготовление растворов и образцов

В качестве растворителя для приготовления образцов применяли деионизированную воду Milli-Q с сопротивлением 18.2 МΩ/см, очищенную на приборе Direct-Q5 (Millipore, США) или буферные растворы, которые доводили до pH = 7.4. Таким образом, все образцы хранили при физиологическом pH с концентрацией буферного компонента 50 mM, если не указано иное.

Приготовление липосом

Для приготовления липосом или керасом использовали метод гидратации тонкой плёнки. Для этого выбирали липидные компоненты и субстраты, загружаемые в наночастицы, и все гидрофобные составляющие растворяли по отдельности в хлороформе для дальнейшего дозирования в сосуды для испарения и формирования тонкой плёнки посредством вакуумирования при нагревании не выше 50 °C. Гидратация плёнки в зависимости от состава образца была проведена деионизированной водой Milli-Q, буферным раствором или растворами загружаемых гидрофильных субстратов. Полученную суспензию липидов в воде перемешивали при 55 °C в течение 1 ч, а затем подвергали обработке с помощью экструзии или ультразвука. В первом случае образцы в сосудах замораживали в жидком азоте и размораживали на водяной бане пятикратно, после чего производили экструзию через поликарбонатные мембраны Millipore с диаметром пор 100 нм с помощью экструдеров LiposoFast Basic и LiposoFast LF-50 (Avestin, Канада). Во втором случае образцы подвергали ультразвуковой обработке с помощью излучателя Sonopuls HD 4100 (Bandelin, Германия).

Модификацию липосом осуществляли путем добавления составляющих в состав липидной плёнки перед этапом гидратации (метод 1) или путем дозирования аликвоты с модифицирующим соединением в суспензию приготовленных липосом в воде (метод пост-встраивания, метод 2).

Для приготовления везикул из керасомообразующего липида CFL16 помимо метода гидратации тонкой плёнки использовался метод инъекции. Навеску липида растворяли в этаноле, содержащем 1 мМ HCl, и инкубировали при 25 °С в течение 24 ч. Затем при интенсивном перемешивании производили плавную инъекцию этанолового раствора CFL16 в деионизированную воду при помощи автоматического дозатора. Полученные растворы анализировали через 24 ч.

2.3. Методы измерения

Тензиометрия

Измерения поверхностного натяжения водных растворов ПАВ проводили при помощи силового тензиометра Kruss K6 (Kruss, Германия) методом отрыва платинового кольца. Между измерениями кольцо очищали в этаноле и полностью высушивали. Погрешность измерения поверхностного натяжения не превышала 2%. Исходя из полученных изотерм поверхностного натяжения, определяли ККМ (погрешность оценки значения ККМ не более 4%), рассчитывали предельную адсорбцию ПАВ на поверхности раздела вода – воздух по уравнению адсорбции Гиббса:

$$\Gamma_{max} = -\frac{1}{2.303 * nRT} * \lim_{C \rightarrow C_{cmc}} \frac{d\sigma}{d \log C} \quad (1),$$

где Γ_{max} – предельная адсорбция, n – число ионов, образуемых при диссоциации ПАВ, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, σ – поверхностное натяжение, C – концентрация ПАВ.

Значения предельной адсорбции использовали для вычисления равновесной площади, приходящейся на молекулу ПАВ в поверхностном слое A_{min} :

$$A_{min} = \frac{10^{18}}{N_a * \Gamma_{max}} \quad (2),$$

где N_a – число Авогадро.

Толщину адсорбционного слоя молекул ПАВ рассчитывали с использованием значения Γ_{max} :

$$\delta = \frac{\Gamma_{max} * M}{d} \quad (3),$$

где δ – толщина адсорбционного слоя, M – молярная масса ПАВ, d – плотность ПАВ.

Кондуктометрия

Кондуктометрические измерения водных растворов ПАВ проводили с помощью прибора InoLab Cond 7110 (WTW, США) с ошибкой не более 0.5%. Значения ККМ и наклона зависимости удельной электропроводности от концентрации до (S_1) и после (S_2) ККМ использовали для вычисления степени связывания противоионов ПАВ β :

$$\beta = 1 - \frac{S_2}{S_1} \quad (4).$$

Свободную энергию мицеллообразования находили из следующего соотношения:

$$\Delta G_{mic} = RT(0.5 + \beta) \ln X_{\text{ККМ}} - 0.5RT \ln 2 \quad (5),$$

где ΔG_{mic} – свободная энергия мицеллообразования, $X_{\text{ККМ}}$ – мольная доля ККМ, равная $[\text{ККМ}]/55.4$.

Спектрофотометрия

В растворы ПАВ объемом 3 мл различных концентраций до и после ККМ помещали избыток гидрофобного красителя ООТ и интенсивно взбалтывали, после чего инкубировали растворы в темноте при комнатной температуре в течение 48 ч. Затем растворы отделяли от нерастворенного субстрата и анализировали оптическое поглощение Оранжевого Т при длине волны 492 нм на спектрофотометре Specord 250 Plus (Analytik Jena, Германия) для определения солубилизационной ёмкости и ККМ ПАВ.

На полученных зависимостях оптической плотности от концентрации ПАВ после достижения ККМ наблюдался скачкообразный рост абсорбции с постоянным наклоном. Погрешность полученных значений ККМ не превышала 4%. Точки после ККМ аппроксимировали линейным уравнением, угловой коэффициент b которого брали для расчета солубилизационной ёмкости S :

$$S = \frac{b}{l\varepsilon} \quad (6),$$

где l – длина оптического пути, ε – мольный коэффициент экстинкции, равный 17600 л моль⁻¹ см⁻¹ для ООТ.

Числа агрегации вычисляли по методу Шотта [261], для этого для каждой точки на зависимости оптической плотности ООТ выше ККМ находили число агрегации N :

$$N = \frac{\varepsilon l (C_{\text{ПАВ}} - \text{ККМ})}{D} \quad (7),$$

где $C_{\text{ПАВ}}$ – концентрация ПАВ, D – оптическая плотность. В качестве значения числа агрегации брали среднее арифметическое из 3–5 точек на графике солубилизации.

Флуориметрия

В растворы ПАВ объемом 3 мл различных концентраций до и после ККМ дозировали по 5 мкл раствора пирена в этаноле для получения финальной концентрации зонда 2 мкМ. Растворы инкубировали в течение 60 мин для обеспечения полной диффузии флуоресцентной метки в агрегаты, сформированные ПАВ, после чего растворы анализировали в кварцевых кюветах Hellma (Германия) на приборе Hitachi F-7100 (Hitachi, Япония). Полученные спектры анализировали по соотношению I и III колебательных пиков флуоресценции пирена (I_{373}/I_{383} , параметр полярности микроокружения пирена), ККМ определяли как середину перегиба зависимости I_{373}/I_{383} от концентрации ПАВ, аппроксимируя данные сигмной кривой Больцмана, погрешность полученных значений ККМ не более 2%.

Динамическое и электрофоретическое рассеяние света

Анализ дисперсных характеристик наночастиц проводили при помощи динамического и электрофоретического светорассеяния (ДРС и ЭРС) на приборе Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern, США) в дзета-кюветах DTS1070 (Malvern, США). Исходные корреляционные данные были преобразованы встроенным программным обеспечением ZetaSizer Software 7.11 (Malvern, США) в коэффициент диффузии, из которого были вычислены значения гидродинамического диаметра (D_h) по уравнению Стокса-Эйнштейна (8), а для определения дзета-потенциала (ζ) полученную в ходе опыта электрофоретическую подвижность частиц конвертировали по уравнению Генри (9):

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (8),$$

$$\zeta = \frac{3U_E\eta}{2\varepsilon_w f(Ka)} \quad (9),$$

где k_B – постоянная Больцмана; η – вязкость растворителя; D – коэффициент диффузии; U_E – электрофоретическая подвижность; ε_w – диэлектрическая проницаемость воды; $f(Ka)$ – функция Генри.

Эксперимент проводили при помощи излучения He-Ne лазера с длиной волны 633 нм, рассеянный сигнал был детектирован под углом 173° . В случае керасом анализ частиц при помощи ДРС и ЭРС также проводили на приборе Litesizer 500 (Anton Paar, Австрия)

под углом рассеяния 175° . Преобразование корреляционных данных проводили аналогично в программном обеспечении Anton Paar Calliope.

Значения гидродинамического диаметра и дзета-потенциала, полученные методом динамического и электрофоретического рассеяния света, имели стандартное отклонение не более 5% ($n = 3-5$).

Просвечивающая электронная микроскопия

Наночастицы также были проанализированы при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на приборе Hitachi HT 7700 Exalens (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ на подложках из медной сетки и углеродной пластины с полимерным покрытием формвар (Ted Pella, США). Образцы необходимой концентрации (0.005–0.5 мМ) объемом 1–2 мкл равномерно наносили на подложки и высушивали на воздухе в течение 30–60 мин. Приготовленные образцы снимали методом ПЭМ в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» К(П)ФУ под руководством к.б.н. Евтюгина В.Г.

Определение параметров инкапсуляции субстратов в липосомах

Разделение инкапсулированных и неинкапсулированных лекарственных веществ в липосомах проводили с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra 0.5 mL (Merck Millipore, США) с размером пор 100 кДа. Для этого 0.4 мл липосом отделяли 10 мин при 10 000 об/мин на центрифуге Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Германия). Концентрацию лекарственного вещества, не инкапсулированного в липосомы, определяли спектрофотометрически. Эффективность инкапсуляции (ЕЕ) и степень загрузки (LC) рассчитывали с использованием следующих уравнений:

$$EE = \frac{m_{total} - m_{in}}{m_{total}} * 100\% \quad (10),$$

$$LC = \frac{m_{total} - m_{in}}{m_{lipids}} * 100\% \quad (11),$$

где m_{total} – это общая масса загруженного субстрата, m_{in} – масса субстрата, ассоциированного с наночастицами, m_{lipids} – масса липидов, из которых состоят наночастицы. Полученные значения ЕЕ и LC имели относительное стандартное отклонение не более 5% ($n = 3$).

Биологические эксперименты

Биологические эксперименты проводили сотрудники Лаборатории микробиологии 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» под руководством к.б.н. Волошиной А.Д., сотрудники Международного научно-инновационного Центра нейробиологии и фармакологии под руководством к.б.н. Петрова К.А., сотрудники Научно-образовательного центра фармацевтики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» под руководством к.б.н. Абдуллина Т.И.

Антимикробная и противогрибковая активность

Антимикробную активность соединений тестировали на грамположительных *S. aureus* ATCC 209p (Sa), *B. cereus* ATCC 8035 (Bc), *E. Faecalis* ATCC 29212 (Ef) и грамотрицательных бактериях *E. Coli* ATCC 10231 (Ec), *P. Aeruginosa* ATCC 9027 (Pa), в том числе на метициллин-резистентных штаммах *S. aureus* MRSA-1 (резистентный к фторхинолонам и бета-лактамам) и MRSA-2 (резистентный к бета-лактамам). Противогрибковая активность была изучена на *Candida albicans* ATCC 10231 (Ca) и *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* (Tm). Бактериостатическую и фунгистатическую активности изучали в сравнении с ципрофлоксацином, кетоконазолом, хлорамфениколом. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как минимальную концентрацию соединения, подавляющую рост соответствующего тестируемого микроорганизма. Минимальные бактерицидные концентрации (МБК) и минимальные фунгицидные концентрации (МФК) определяли как концентрации добавляемых соединений, при которых попытка рекультивации клеток не увенчалась успехом [107,262,263].

Гемагглютинация

Гемагглютинационную активность исследуемых соединений анализировали в 96-луночном U-планшете для микротитрования. Готовили двукратные серийные разбавления исследуемых композиций. 100 мкл из каждого разбавления смешивали со 100 мкл 2% раствора эритроцитарной массы (1:1) и вносили в лунку на 96-луночном U-планшете для микротитрования. Каждое разбавление анализировали в 2-х параллельных

лунках. Образцы выдерживали в течение 1 ч при 37 °С, а затем наблюдали гемагглютинацию невооруженным глазом [264]. Фотографии образцов были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ci-S (Nikon, Япония) [237,265].

МТТ-тест на цитотоксичность

Цитотоксическое действие образцов на клетки определяли с помощью МТТ-теста. Долю нежизнеспособных клеток оценивали по фиолетовой окраске восстановленной формы красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид (МТТ). Оптическую плотность суспензий с клетками регистрировали при длине волны 540 нм на планшет-ридере Invitrologic (Россия). Опыты для всех соединений повторяли трижды. Расчет концентрации тестируемого соединения, вызывающей подавление роста клеток на 50%, IC_{50} , производили с помощью программы: MLA - "Quest Graph™ IC_{50} Calculator" (AAT Bioquest, Inc.) [107,120].

Поглощение клетками

Для проточной цитометрии клетки высевали в 24-луночные планшеты в конечном объеме 500 мкл. В лунки помещали тестируемые образцы и инкубировали в течение заданного времени, после чего клеточное поглощение образцов исследовали методом проточной цитометрии (Guava easy Cyte 8HT, США). Результаты цитометрии анализировали с помощью многофункциональной системы Cytell Cell Imaging с использованием приложений Cell Viability BioApp и Apoptosis BioApp [107,237,265].

Флуоресцентная микроскопия

Для анализа методом флуоресцентной микроскопии клетки высевали в 6-луночные планшеты с покровными стеклами на дне каждой лунки. Через 24 ч инкубации в лунки добавляли тестируемые системы и культивировали в CO_2 -инкубаторе. После проведения инкубации на необходимое время клетки фиксировали и окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАПИ, синий). Исследование проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse Ci-S (Nikon, Япония) при 400-кратном увеличении [107,237,265].

Анализ индукции апоптоза

Клетки T98G инкубировали с тестируемыми образцами, добавляли в среды маркеры апоптоза и некроза аннексин V-Alexa Fluor 647 (Sigma-Aldrich, США) и йодид пропидия (Sigma-Aldrich, США). Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и по соотношению флуоресценции маркеров оценивали количество клеток, подверженных апоптозу [265].

Животные

Все экспериментальные процедуры с участием животных проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в Директиве Совета Европейского сообщества от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЕС). Протоколы *in vivo* экспериментов были одобрены Комиссией по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН. Эксперименты проведены на крысах линии Вистар обоего пола, приобретенных в филиале Института биоорганической химии им. Шенякина-Овчинникова РАН, Пущино, Московская область, Россия. Животных содержали в пластиковых клетках, устланных опилками, в хорошо проветриваемом помещении при температуре 20-22 °С, 12-часовом цикле свет/темнота, относительной влажности 60-70% и с неограниченным доступом к пище и воде.

Проникновение через гематоэнцефалический барьер

Для анализа проникновения частиц в мозг крысам линии Вистар внутривенно вводили образцы, помеченные флуоресцентным зондом родамином Б. Необработанных животных использовали в качестве контроля фоновой флуоресценции. Через 2 ч после инъекции животных глубоко анестезировали изофлураном, извлекали головной мозг и хранили его при -80 °С. Затем от замороженной ткани отсекали срезы толщиной 10 мкм и анализировали их методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [237,265].

Фармакокинетика

Для количественного анализа 2-ПАМ в плазме и мозге животных использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-ИЭР-МС). Заранее извлеченные и замороженные ткани подвергали процедуре экстракции для изоляции 2-ПАМ из биологической смеси и последующего количественного анализа [237].

Статистическая обработка

Статистическую обработку биологических данных проводили с применением критерия Манна-Уитни.

Представления результатов измерений

Общее число измерений n составило от 3 до 5 в зависимости от используемого метода. Полученные данные представлены как среднее арифметическое \bar{x} каждого значения x_i выборки, а через знак « \pm » представлено среднеквадратическое отклонение σ для данной выборки:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (12).$$

Измерения, относительные стандартные отклонения которых были меньше 1%, приведены без $\pm\sigma$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. НАПРАВЛЕННАЯ НАСТРОЙКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ

В диссертационной работе набором физико-химических методов проведено исследование самоорганизации новых геминальных дикаатионных ПАВ с карбаматными фрагментами в водном растворе с целью разработки подхода к поэтапной модификации липосомальных наноконтейнеров для доставки лекарств. Выбор объектов исследования обусловлен многочисленными литературными свидетельствами об интенсивном взаимодействии геминальных ПАВ с биомолекулами (нуклеиновые кислоты, белки) и липидными мембранами. Два карбаматных фрагмента были включены в состав головной группы нового гомологического ряда геминальных ПАВ в качестве биоразлагаемой части, которая также содержит центры для образования межмолекулярных связей. Самоорганизация амфифильных соединений лежит в основе жизненно важных бытовых, медицинских, сельскохозяйственных и промышленных процессов. Для развития и роста таких сфер необходимы постоянная оптимизация и улучшение свойств применяемых ПАВ, поэтому разработка и подробная характеристика новых амфифилов являются актуальными задачами.

Основополагающая цель работы заключается в поиске и обобщении взаимосвязей физико-химических свойств липосомальных систем с химическим составом мембраны, а также в поиске закономерностей между структурными и коллоидными параметрами наночастиц и характером их взаимодействия с биообъектами. Многообещающей стратегией для решения подобной проблемы является применение ПАВ для модификации липосомальных мембран, поскольку это позволяет осуществлять направленное регулирование дзета-потенциала липосом. Между тем, липосомальные системы хорошо известны высокой биосовместимостью, поэтому биоразлагаемость и низкая токсичность являются крайне желательными свойствами для модифицирующих ПАВ. Наличие двух положительно заряженных центров позволяет ограничивать применяемые количества ПАВ для минимизации побочных токсических эффектов. Существенный аспект современного дизайна супрамолекулярных систем, затронутый в настоящей работе, – это нековалентная модификация липосомальных композиций.

Липосомальная платформа имеет и слабые места, такие как неоптимальная эффективность нацеливания, морфологическая нестабильность, обусловленная нековалентной природой связей внутри самой наночастицы. Поэтому в работе рассмотрены альтернативные вариации липосомальной платформы – порфисомы и керасомы, подход к осуществлению которых, как и в случае индукции положительного заряда при помощи ПАВ, базируется в том числе и на основе супрамолекулярных взаимодействий.

Характеристику новой серии геминальных ПАВ составляли по различным видам функциональной активности: 1) оценка концентрационных порогов агрегации и термодинамических параметров адсорбции и мицеллообразования карбаматсодержащих геминальных ПАВ; 2) исследование их способности увеличивать растворимость гидрофобных спектральных зондов; 3) анализ зависимости антимикробной активности от структурных параметров соединений. В качестве вклада в разработку везикулярных наночастиц для доставки лекарств охарактеризовали: 1) зависимость дзета-потенциала липосом от их состава; 2) влияние дзета-потенциала частиц на их взаимодействие с клетками; 3) новые подходы к нековалентной модификации липосомальных систем для получения необходимых свойств (рис. 3.1). Затронутые выше исследования представляют большое значение и актуальность в формировании более глубокого физико-химического понимания принципов разработки супрамолекулярных систем для доставки лекарств.

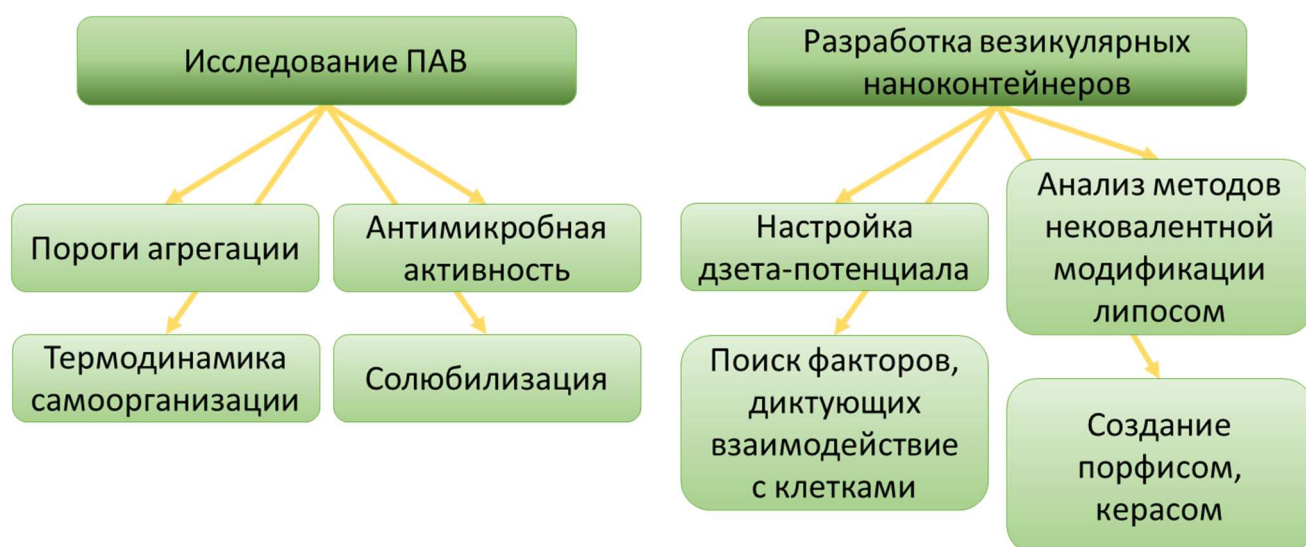


Рисунок 3.1. Задачи, решаемые в работе по направлению исследования новых ПАВ и усовершенствованию везикулярных систем для доставки лекарств.

Как было продемонстрировано в литературном обзоре, геминальные ПАВ безусловно занимают передовую позицию в современных исследованиях; в то же время существует явление очень узкой фокусировки внимания исследовательских групп и нехватки обобщающих и принципиальных вкладов в аспекты дизайна липосомальных супрамолекулярных систем. Поэтому целью данной работы является использование геминальных ПАВ как инструмента для модуляции свойств разрабатываемых везикулярных систем для доставки лекарств и поиска закономерностей, описывающих влияние физико-химических параметров систем на их эффективность при решении биомедицинских задач. А именно, проведено поэтапное исследование, включающее подробное описание особенностей самоорганизации и антимикробной активности нового гомологического ряда дикатионных геминальных ПАВ, которые впоследствии применены в роли модификатора липосомальных систем для выявления зависимостей как между составом частиц и их свойствами, так и между свойствами частиц и их поведением при взаимодействии с биологическими объектами. Для достижения такой цели в рамках диссертационной работы проведены исследования супрамолекулярных систем с применением ряда физико-химических методов: тензиометрии, кондуктометрии, потенциометрии, спектрофотометрии, флуориметрии, динамического и электрофоретического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии; а также ряда биохимических и биологических методов: МТТ-тестов на цитотоксичность, проточной цитометрии, флуоресцентной и конфокальной микроскопии, фармакокинетических исследований. Используемые методы позволяют наблюдать, обобщать фундаментальные взаимосвязи, существующие между структурными особенностями строительных блоков супрамолекулярных систем, и давать характеристику их показателей эффективности при решении биомедицинских проблем.

3.1. Самоорганизация и антимикробная активность дикатионных геминальных ПАВ, содержащих карбаматные фрагменты

Ключевым свойством амфифильных соединений, обуславливающим их широкое применение, является способность к самоорганизации в водных растворах. Поэтому в диссертационной работе новая гомологическая серия карбаматсодержащих геминальных ПАВ n -6- n (Et) (где n = децил, додецил, тетрадецил, гексадецил) была охарактеризована

методами тензиометрии, кондуктометрии, спектрофотометрии и флуориметрии для определения концентрационных порогов образования агрегатов в водных растворах и солюбилизационной емкости мицелл. Одно из важнейших практических свойств катионных ПАВ – их антимикробный потенциал – также был оценен по отношению к 9 различным штаммам микроорганизмов, в том числе к резистентным. Вышеприведенный перечень исследований позволяет обнаружить закономерности типа «структура – свойство».

Анализ самоорганизации проведен с описанием вклада структурных факторов в свободную энергию мицеллообразования [266]. В качестве стабилизирующих взаимодействий, понижающих свободную энергию мицеллообразования рассмотрены следующие: (1) гидрофобный эффект, обусловленный, главным образом, повышением энтропии системы вследствие изоляции углеводородных радикалов ПАВ от контакта с водой; (2) гидратация головных групп ПАВ, приводящая к снижению энтальпии системы. Среди дестабилизирующих факторов, повышающих свободную энергию системы, учтены (1) электростатическое отталкивание одноименно заряженных головных групп (энтальпийный вклад); (2) энергия переноса воды в палисадный слой мицелл, расположенный в углеводородном ядре вблизи головных групп ПАВ.

3.1.1. Влияние длины алкильных фрагментов на пороги агрегации и термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования карбаматсодержащих геминальных ПАВ

Традиционными методами для поиска концентрационных порогов агрегации ПАВ являются тензиометрия и кондуктометрия. Этими методами гомологическая серия геминальных ПАВ была исследована на первом этапе работы (рис. 3.2, 3.3).

Изотермы поверхностного натяжения водных растворов ПАВ позволяют детектировать порог образования агрегатов после насыщения молекулами ПАВ поверхности раздела водный раствор – воздух. Полученные зависимости демонстрируют закономерное снижение порогов агрегации геминальных карбаматсодержащих ПАВ на порядок с ростом длины гидрофобных заместителей на две метиленовые группы (рис. 3.2, табл. 3.1). Значение ККМ для низшего гомолога 10-6-10(Et) 5.8 мМ сравнимо со значением для тетрадецильных производных с диазациклооктановой и морфолиниевой

головными группами (4 мМ) [267]. Значение ККМ для высшего гомолога 16-6-16(Et) составляет 3 мкМ, что втрое ниже, чем значение ККМ для аналогичного геминального ПАВ с гидроксиэтильными фрагментами в головной группе 16-6-16(OH) (9.5 мкМ) [75].

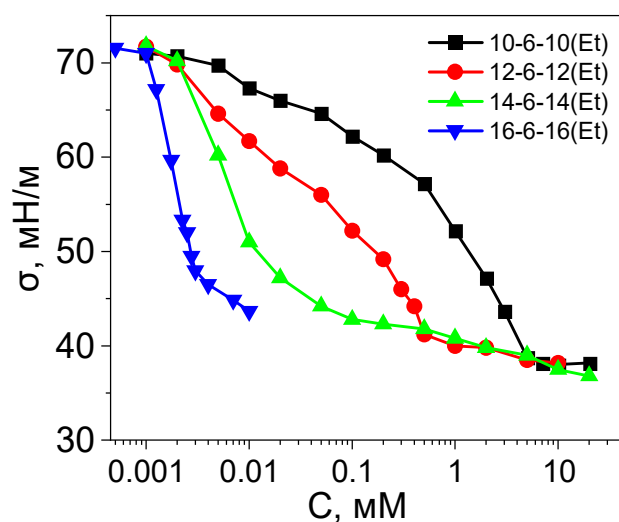


Рисунок 3.2. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов дикарбоксилатсодержащих геминальных карбаматсодержащих ПАВ n-6-n(Et) (n = 10, 12, 14, 16), 25 °С.

Такая разница может быть объяснена тем, что карбаматные фрагменты, содержащие несколько электроотрицательных атомов с неподеленными электронными парами, могут быть гидратированы эффективнее, чем гидроксиэтильные фрагменты, что может способствовать стабилизации агрегатов за счет понижения свободной энергии системы и, следовательно, уменьшению порога агрегации относительно 16-6-16(OH).

Таблица 3.1. Значения порога агрегации карбаматсодержащих геминальных ПАВ, определенные методом тензиометрии, и термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования, 25 °С.

| ПАВ | ККМ, моль/л | $\Delta\Gamma_{\max} \cdot 10^{10}$, 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 |

На зависимостях удельной электропроводности от концентрации ПАВ наблюдали сглаживание перегибов по мере увеличения длины гидрофобных заместителей ПАВ (рис. 3.3). 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 (рис. 3.3, вставка).

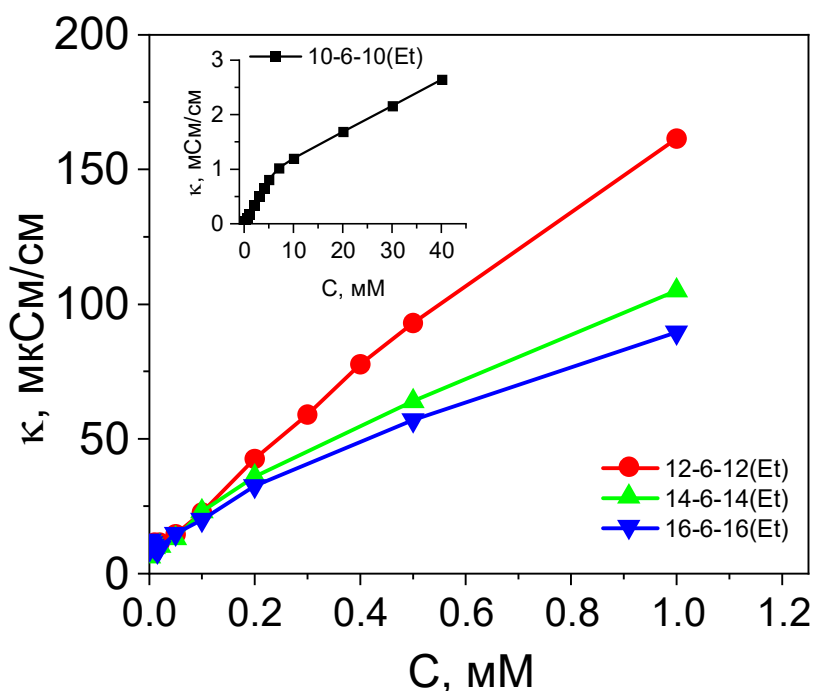


Рисунок 3.3. Зависимость удельной электропроводности от концентрации водных растворов катионных геминальных карбаматсодержащих ПАВ n-6-n(Et) (n = 10, 12, 14, 16), 25 °С.

Похожие результаты ранее получали для других геминальных ПАВ [268,269], а также для мономерных анионных ПАВ [270], и в особенности ярко наблюдали для геминальных анионных ПАВ [32], содержащих в составе головной группы амидный фрагмент и ацетат-анион, хотя в работах с классическими аммонийными геминальными ПАВ с метильными заместителями наблюдали графики с более четким перегибом [271,272]. Авторы объясняют такое явление образованием водородной связи между ацетатной и амидной группами, возникающей в момент формирования мицелл. Таким образом, избыток анионного заряда на поверхности мицеллы скомпенсирован межмолекулярными взаимодействиями, вследствие чего иммобилизация

токопроводящих катионов натрия происходит в меньшей степени. В случае карбаматсодержащих дикатионных ПАВ такое объяснение неприменимо, однако ионизация головных групп может быть обусловлена тем, что положительно заряженные атомы азота более удалены друг от друга в агрегатах по причине большого объема карбаматных фрагментов. С другой стороны, пологий график электропроводности может свидетельствовать о сложном, не мгновенном характере изменения подвижности токопроводящих частиц и степени связывания противоионов в области порога мицеллообразования. Одним из объяснений может быть то, что гидрофильные фрагменты в головных группах геминальных ПАВ способствуют лучшей гидратации и, как следствие, большему энтальпийному выигрышу при образовании агрегатов. Следствием такой особенности является возможность формирования агрегатов из малого числа мономеров, что ранее было показано для геминальных ПАВ (числа агрегации 7-8) [273]. Пологая форма графиков электропроводности растворов геминальных карбаматсодержащих ПАВ с додецильными и более длинными гидрофобными заместителями свидетельствует о постепенном характере изменения концентрации ионов вследствие мицеллообразования и связывания части противоионов, по причине которого определение ККМ методом кондуктометрии оказывается затрудненным для ряда карбаматсодержащих геминальных ПАВ, за исключением 10-6-10(Et).

Термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования, а именно, минимальная равновесная площадь поверхности раздела фаз, приходящаяся на одну молекулу ПАВ A_{\min} , предельная адсорбция Γ_{\max} и свободная энергия мицеллообразования ΔG_{mic} (табл. 3.1) могут быть вычислены по изотермам поверхностного натяжения (рис. 3.2). Продемонстрирован 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. Для додецильного представителя 12-6-12(Et) была рассчитана толщина адсорбционного слоя, которая составила 0.96 нм. Для додецильных гомологов геминальных ПАВ ранее находили толщину монослоя, равную 1 нм, при адсорбции на поверхности слюды [274]. Анализ зависимости свободной энергии мицеллообразования от длины гидрофобных частей ПАВ позволяет получить значение свободной энергии переноса метиленовой группы из воды в неполярное мицеллярное ядро, равное -3.3 кДж/моль (рис. 3.4), что соответствует литературным данным [51].

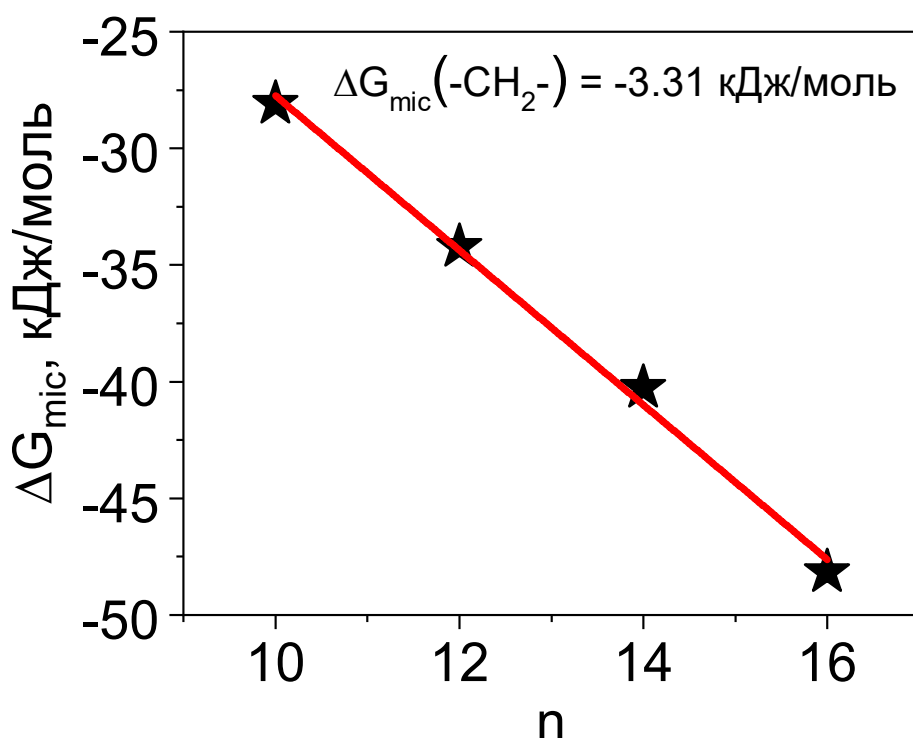


Рисунок 3.4. Зависимость свободной энергии мицеллообразования карбаматсодержащих геминальных ПАВ от числа атомов углерода в гидрофобной части ПАВ (n).

Таким образом, метод тензиометрии позволил количественно охарактеризовать значение концентрационного порога агрегации для каждого представителя гомологического ряда карбаматсодержащих геминальных ПАВ и рассчитать термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования.

3.1.2. Влияние структурных параметров на сольubilизацию и полярность микроокружения в мицеллах карбаматсодержащих геминальных ПАВ

Методы спектрофотометрии и флуориметрии применимы для исследования самоорганизации ПАВ только с использованием зондовых молекул, например, спектрального гидрофобного зонда ООТ и флуоресцентного зонда пирена.

Данные по сольubilизации ООТ предоставляют две значимые характеристики исследуемых ПАВ: значения ККМ и сольubilизационной емкости (рис. 3.5, табл. 3.2, табл. 3.3, приложение, рис. П3, П4).

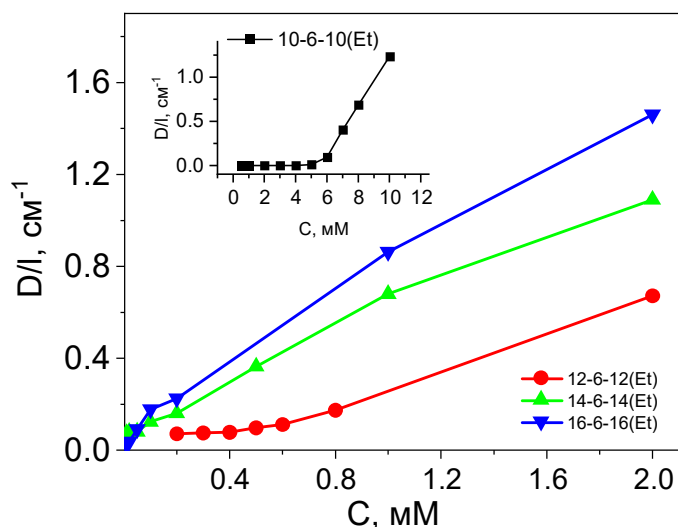


Рисунок 3.5. Приведенная оптическая плотность водных растворов ПАВ, солюбилизирующих гидрофобный краситель ООТ, при различной концентрации, $\lambda=492$ нм, 25 °С.

Таблица 3.2. Значения порога агрегации карбаматсодержащих геминальных ПАВ, установленные методами спектрофотометрии и флуориметрии, и параметра полярности, 25 °С.

| 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 |

Для карбаматсодержащих геминальных ПАВ солюбилизационная емкость растёт с увеличением длины алкильного радикала, поскольку агрегация высших гомологов начинается при более низких концентрациях ПАВ и происходит при меньших числах агрегации, вследствие чего меньшее число молекул необходимо для солюбилизации одной молекулы гидрофобного субстрата. Одновременно с падением значений ККМ и чисел агрегации возрастает концентрация мицелл, способных солюбилизировать гидрофобный краситель (табл. 3.3).

Наименьшее значение S , наблюдаемое для децильного гомолога 10-6-10(Et), составляет 0.015 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ}, что находится на уровне мономерных ПАВ додецилсульфата натрия (ДСН) или додецилтриметиламмония бромиды (ДТАБ) (0.012 и 0.014 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ} соответственно) [275] (табл. 3.3). Для гексадецильных карбаматсодержащих геминальных ПАВ зарегистрировано значение 0.040 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ}, которое значительно выше, чем для мономерных гексадецильных катионных ПАВ, например, ЦТАБ (0.015 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ}) [267]. Аналогичное геминальное ПАВ с гидроксиэтильными фрагментами в головной группе обладает более низкой солюбилизационной емкостью по отношению к зонду ООТ (0.0365 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ}) [75], что может быть обусловлено вкладом карбаматных фрагментов, увеличивающих солюбилизующую способность ПАВ.

Таблица 3.3. 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 [75] | 18* [75] |
| ЦТАБ | 0.015 [267] | 67** [276] |
| ДТАБ | 0.014 [275] | 52** [276] |
| ДСН | 0.012 [275] | 54** [276] |

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

Число молекул ПАВ (N), необходимое для солюбилизации одной молекулы гидрофобного зонда ООТ [261], уменьшается с ростом длины гидрофобных заместителей карбаматсодержащих геминальных ПАВ. В целом, меньшее число молекул геминальных ПАВ требуется для солюбилизации ООТ по сравнению с мономерными ПАВ, такими как ЦТАБ, ДТАБ, ДСН (табл. 3.3).

Если разделить значения солюбилизационной емкости геминальных ПАВ на два, тем самым приводя это значение к эффекту единственного гидрофобного домена ПАВ, то для гексадецильных геминальных гомологов значение $0.020 \text{ моль}_{\text{ООТ}}/\text{моль}_{\text{цепь}}$ будет несколько превосходить аналогичное значение для ЦТАБ ($0.015 \text{ моль}_{\text{ООТ}}/\text{моль}_{\text{ПАВ}}$). Значения солюбилизационной емкости на одну гидрофобную группу для низших гомологов геминальных ПАВ сопоставимы со значениями для их катионных и анионных мономерных аналогов. Преимущество в солюбилизации, наблюдаемое для гексадецильных карбаматсодержащих и гидроксиэтилированных ПАВ (табл. 3.3), может быть объяснено дополнительным объемом, создаваемым за счет присутствия в составе молекул геминальных ПАВ спейсерного фрагмента.

Анализ спектров флуоресценции пирена в водных растворах ПАВ является чувствительным и информативным методом, позволяющим не только определять концентрационные пороги мицеллообразования, но и качественно сравнивать условия микрополярности внутри агрегатов (рис. 3.6).

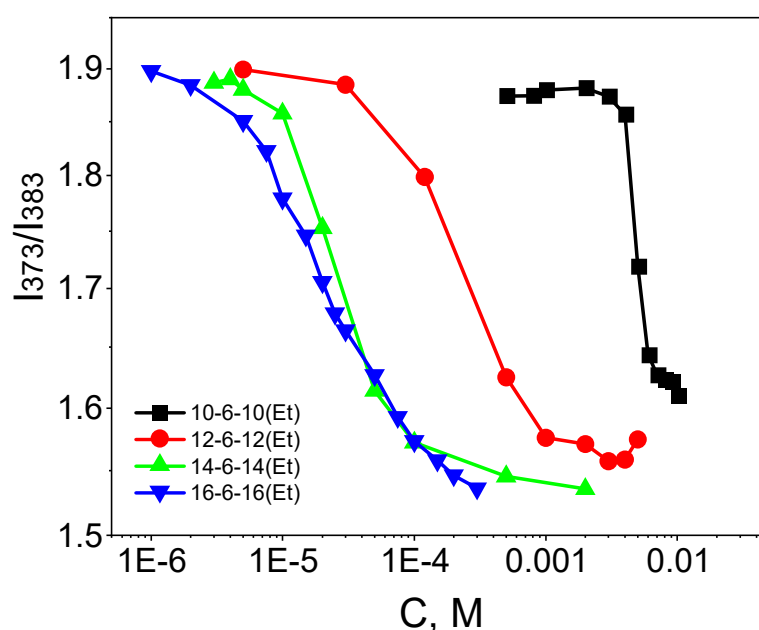


Рисунок 3.6. Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции первого (373 нм) и третьего (383 нм) колебательных пиков пирена от концентрации дикатионных геминальных карбаматсодержащих ПАВ n-6-n(Et), 25 °С.

Значения ККМ, полученные из анализа спектров флуоресценции пирена, представлены в таблице 3.2. На графиках видно, что ПАВ с более короткими гидрофобными заместителями дают зависимость, которая выходит на плато при более

высоких значениях параметра полярности (I_{373}/I_{383}) (рис. 3.5). Это свидетельствует о том, что короткие алкильные заместители создают меньший объем гидрофобного ядра, таким образом оно менее удалено от окружающих молекул воды, что, в свою очередь, увеличивает микрополярность ядер агрегатов. Значения параметра полярности пирена в мицеллярных растворах тетрадецильных и гексадецильных гомологов ПАВ соответствуют отношению I_{373}/I_{383} в пиридине или этилацетате [277]. Данное значение для классического катионного мономерного ПАВ ЦТАБ заметно ниже, чем для геминальных ПАВ, и составляет 1.1, что примерно соответствует значению параметра полярности в изопропанолу [277].

Повышенная полярность в агрегатах карбаматсодержащих геминальных ПАВ может объясняться наличием полярных заместителей и большим объемом головных групп. Иными словами, в водном растворе гидратация головных групп карбаматсодержащих геминальных ПАВ должна обеспечиваться большим числом молекул воды, которые в свою очередь, находясь в непосредственной близости от ядер агрегатов, повышают полярность микроокружения пирена.

В результате анализа процессов самоорганизации ряда карбаматсодержащих геминальных ПАВ с помощью спектральных методов с применением солюбилизируемых зондов 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. 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.

3.1.3. Антимикробная активность карбаматсодержащих геминальных ПАВ

Карбаматсодержащие геминальные ПАВ были протестированы на антимикробную активность по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям и грибам. Как правило, грамотрицательные бактерии более устойчивы к катионным ПАВ, чем грамположительные, что связано со строением их мембраны. Её внешняя сторона насыщена липополисахаридами и белками, которые препятствуют действию антибактериальных соединений [278]. Такая тенденция наблюдается и для исследованного в диссертационной работе ряда геминальных карбаматсодержащих ПАВ.

Геминальные ПАВ ряда n-6-n(Et) проявляют высокую антимикробную активность по сравнению как с антибиотиком ципрофлоксацином, так и с противогрибковым средством кетоконазолом, а также с классическим аммонийным ПАВ ЦТАБ (табл. 3.4).

Таблица 3.4. 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> | <i>Ca</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 | 63±6 |
| 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 | 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±1 |
| 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 | |
| Кетоконазол | | | | | | | | 3.9±0.3 |
| | МБК, мкг/мл | | | | | | | МФК, мкг/мл |
| 10-6-10 (Et) | 7.8±0.6 | 16±1 | 31±3 | 0.5±0.05 | 0.5±0.04 | 16±1 | | 63±6 |
| 12-6-12 (Et) | 31±3 | 16±1 | 3.9±0.2 | 0.5±0.05 | 0.5±0.03 | 7.8±0.5 | | 3.9±0.2 |
| 14-6-14 (Et) | 63±6 | 16±1 | 31±3 | 1.9±0.1 | 1.9±0.1 | 16±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 | |
| Кетоконазол | | | | | | | | 3.9±0.3 |

Значения МИК карбаматсодержащих геминальных ПАВ 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 ципрофлоксацин. 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).

Известно, что антибактериальная активность ПАВ зависит от длины гидрофобного заместителя: существует оптимальная длина цепи для проявления максимальной антибактериальной активности [279–281]. В нашем случае соединение 12-6-12(Et) проявило наибольшую активность в гомологическом ряду в отношении всех штаммов, а в отношении *Sa* его значения МИК (0.5 мкг/мл) были сопоставимы с таковыми для препарата сравнения ципрофлоксацина. Обычно это объясняется так называемым эффектом отсечки [15,70]: амфифилы с додецильными углеводородными заместителями при встраивании в бислои мембран разрыхляют их путём создания свободного объема вследствие несовпадения длины радикалов ПАВ и липидов, что приводит к нарушению структуры мембраны и повышает её проницаемость [280]. Кроме того, додецильные гомологи ПАВ по сравнению с высшими гомологами обладают оптимальной растворимостью для проявления антибактериальной активности [281]. Как правило, с увеличением длины углеводородного радикала геминальных ПАВ антимикробная активность падает [279], наблюдается преимущество гомологов с более короткими углеводородными заместителями (децильными [282] и додецильными [281,283]).

Антимикробную активность карбаматсодержащих геминальных ПАВ сравнивали с активностью новой серии алкилизотиурониевых (C_nSU) солей ($n = 10, 12, 14, 16$) [263]. Для мономерных ПАВ чаще наблюдается максимальная антимикробная активность у гомологов, содержащих в гидрофобных цепях 14 атомов углерода [279,284,285]. Так, наиболее активным представителем в ряду имидазолсодержащих ПАВ с метоксифенильным фрагментом является тетрадецильный гомолог, демонстрирующий МИК на уровне 0.5-1 мкг/мл [284]. Наиболее активным соединением в ряду имидазолсодержащих ПАВ с гидроксиэтильным фрагментом является гексадецильный гомолог [286].

Антимикробную активность C_nSU протестировали в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, значения МИК, МБК и МФК приведены в таблице 3.5. Видно, что все соединения проявляют антимикробную

активность в отношении тест-штаммов грамположительных бактерий *Sa* и *Bc* и дрожжеподобного гриба *Ca*. По бактериостатической активности соединения $C_{10}SU$ – $C_{14}SU$ в 4 раза превосходят препарат сравнения хлорамфеникол в отношении *Sa* и *Bc*. $C_{16}SU$ проявил самую низкую антибактериальную активность, которая в то же время остается на уровне препарата сравнения. В опытах с грамотрицательными бактериями исследуемые соединения в изучаемых концентрациях не проявляли антимикробных свойств. ПАВ с додецильным и тетрадецильным углеводородными радикалами оказывают фунгицидное действие в концентрации 62.5 мкг/мл в отношении дрожжеподобного гриба *Ca*. По сравнению с классическим катионным ПАВ ЦТАБ ряд изотиуриониевых ПАВ оказался менее активным в отношении всех исследованных бактериальных штаммов [287].

Таблица 3.5. Антимикробная активность катионных изотиуриониевых ПАВ.

| Соединение | МИК, мкг/мл | | | | | | |
|---------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| | <i>Sa</i> | <i>Bc</i> | <i>Ec</i> | <i>Pa</i> | <i>An</i> | <i>Tm</i> | <i>Ca</i> |
| $C_{10}SU$ | 16±1 | 16±1 | >500 | >500 | >500 | >500 | 63±6 |
| $C_{12}SU$ | 16±1 | 16±1 | >500 | >500 | >500 | >500 | 63±6 |
| $C_{14}SU$ | 16±1 | 16±1 | >500 | >500 | >500 | >500 | 16±1 |
| $C_{16}SU$ | 31±3 | 63±6 | >500 | >500 | >500 | >500 | 31±3 |
| ЦТАБ** | 0.5 | 3.1 | 6.3 | 250 | 62.5 | 31.3 | 3.1 |
| Хлорамфеникол | 63±6 | 63±6 | 125±10 | - | - | - | - |
| Кетоконазол | - | - | - | - | - | 4.0±0.3 | 4.0±0.3 |
| МБК, мкг/мл | | | | | | | МФК, мкг/мл |
| $C_{10}SU$ | 63±6 | 31±3 | >500 | >500 | >500 | >500 | 125±11 |
| $C_{12}SU$ | 63±6 | 63±6 | >500 | >500 | >500 | >500 | 63±6 |
| $C_{14}SU$ | 63±6 | 63±5 | >500 | >500 | >500 | >500 | 63±6 |
| $C_{16}SU$ | 250±21 | 125±10 | >500 | >500 | >500 | >500 | 125±10 |
| ЦТАБ** | 50 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | 50 |
| Хлорамфеникол | - | - | - | - | - | - | - |
| Кетоконазол | - | - | - | - | - | 3.9±0.2 | 3.9±0.3 |

** – данные взяты из [287].

При анализе ингибирующих и бактерицидных (фунгицидных) концентраций в зависимости от числа атомов углерода в гидрофобной части ПАВ видно, что в ряду геминальных ПАВ наиболее активным соединением является 12-6-12(Et), что проявляется в виде минимума на графиках (рис. 3.7). Такое явление не наблюдается в

случае изотиуриониевых ПАВ, однако в обоих рядах наименее активными соединениями являются гомологи с самым длинным углеводородным радикалом. Среди исследованных серий катионных ПАВ наиболее яркие антимикробные свойства проявляют карбаматсодержащие геминальные ПАВ, в среднем демонстрирующие на порядок более низкие значения МИК и МБК (МФК) по сравнению с изотиуриониевыми амфифилами (рис. 3.7).

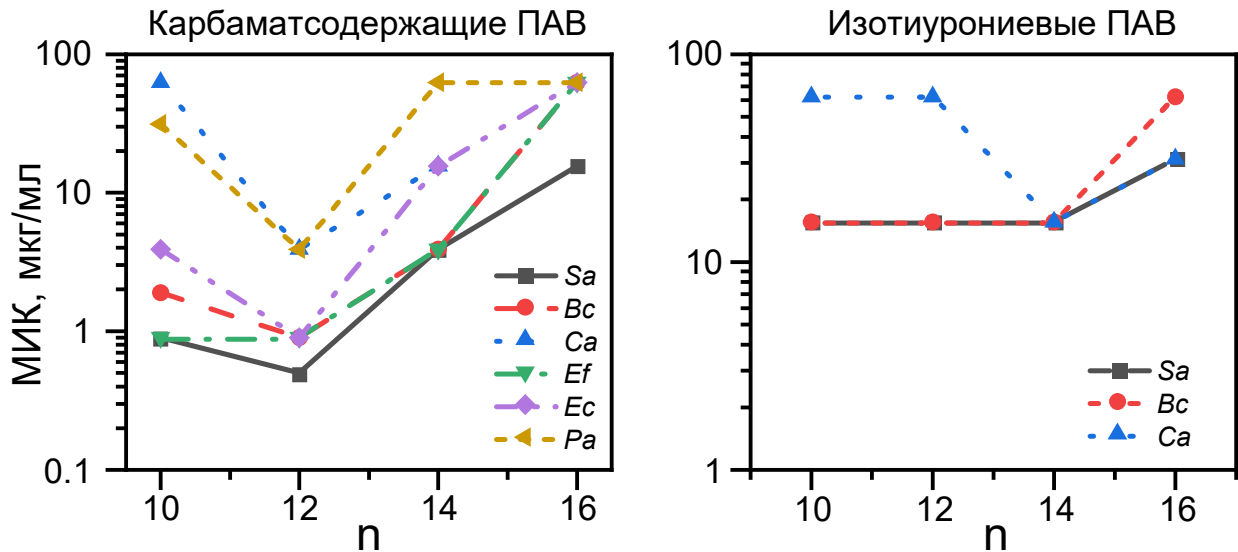


Рисунок 3.7. Зависимость значений МИК для серий карбаматсодержащих геминальных и изотиуриониевых ПАВ от числа атомов углерода в гидрофобной части ПАВ (n).

Таким образом, додецильный гомолог в исследованном ряду геминальных ПАВ представляет наибольший интерес в сфере разработки антимикробных препаратов. Наименьшим значением минимальной ингибирующей концентрации по отношению к дрожжеподобному грибу *Sa* в гомологической серии изотиуриониевых ПАВ обладает тетрадецильный гомолог. Полученные результаты по антимикробной активности для новых гомологических серий катионных амфифилов согласуются с ранее описанными в литературе трендами для моно- и дикатионных ПАВ. Между тем основополагающая характеристика катионных ПАВ, обуславливающая их токсическое действие по отношению к микроорганизмам – способность встраиваться в липидные мембраны – привлекательна и с другой стороны, для модификации липосомальных супрамолекулярных систем.

3.2. Разработка катионных липосом с включением липида ДОТАП, нековалентно модифицированных амфифильными пептидами C₁₂-GGRGD-NH₂ и C₁₂-GGGHK-NH₂

Известно два метода нековалентной модификации липосом: метод гидратации плёнки с добавлением модификаторов в липидную фазу и метод пост-встраивания, в котором модификация осуществляется путём добавления амфифильного соединения к готовому образцу липосом [5]. В свете развития персонализированной медицины задача по экспрессной и гибкой модификации липосом является актуальной. Учитывая недостатки традиционных химических методов ковалентной модификации липосом, такие как относительная трудоемкость, переменный выход, побочные продукты [288,289], нековалентное введение пептидов, конъюгированных с жирными кислотами, в липосомальную мембрану является перспективным для модификации липосом нацеливающими лигандами. Авторами [290] показано, что гексильные и децильные углеводородные радикалы проявляют якорные свойства по отношению к липосомальной мембране на основе фосфатидилхолина. Поэтому в настоящей работе были получены соединения C₁₂-GGRGD-NH₂ (GGRGD) и C₁₂-GGGHK-NH₂ (GGGHK), которые являются RGD- и GHK-пептидами, конъюгированными с додекановой кислотой. Липосомы на основе фосфатидилхолина, холестерина 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). Успешность менее распространенного метода 2 была продемонстрирована для иммобилизации фрагментов антител и пептидов в липосомах [291].

Катионные липосомы на основе фосфатидилхолина (77.8 мол.%), холестерина (19.4 мол.%) и ДОТАП (2.8 мол.%, 1/35 от количества липидов) выбраны в качестве базовой композиции ФХ/Хол/ДОТАП (4:1:0.143), поскольку по сравнению с образцами, содержащими большие мольные доли ДОТАП, обеспечивали более низкую цитотоксичность, удовлетворительное положительное значение дзета-потенциала и усиление поглощения клетками [120]. Полученные липосомы были охарактеризованы методами ДРС и ПЭМ.

Анализ базовой липосомальной композиции и ее модифицированных форм с загрузкой гидрофильным модельным зондом родамином Б производили в

деионизированной воде, чтобы исключить возможность конкурирования между растворёнными молекулами зонда и буфера HEPES за включение в липосомы (табл. 3.6).

Таблица 3.6. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) катионных липосом ФХ/Хол/ДОТАП (4:1:0.143) с добавлением пептидов, оценка параметров инкапсуляции субстратов.*

| Модифицирующий пептид | D_h , нм | ζ , мВ | PdI | EE, % | LC, % |
|-----------------------|------------|--------------|---------------|--------|-----------|
| Без субстрата | | | | | |
| - | 117 ± 2 | 55 ± 2 | 0.190 ± 0.002 | - | - |
| GGRGD | 114 ± 2 | 43 ± 2 | 0.079 ± 0.026 | - | - |
| GGGHK | 117 ± 1 | 54 ± 2 | 0.052 ± 0.005 | - | - |
| GGRGD/GGGHK | 112 ± 2 | 49 ± 1 | 0.061 ± 0.003 | - | - |
| Родамин Б (0.5 мг/мл) | | | | | |
| - | 120 ± 10 | 58 ± 3 | 0.128 ± 0.100 | 53 ± 1 | 3.8 ± 0.1 |
| GGRGD | 109 ± 1 | 43 ± 3 | 0.088 ± 0.015 | 54 ± 2 | 3.9 ± 0.1 |
| GGGHK | 111 ± 3 | 52 ± 4 | 0.124 ± 0.017 | 57 ± 4 | 4.3 ± 0.3 |
| GGRGD/GGGHK | 109 ± 1 | 44 ± 2 | 0.147 ± 0.003 | 53 ± 2 | 3.8 ± 0.1 |

* – Образцы были приготовлены и проанализированы в деионизированной воде при концентрации липидов 1 мМ и мольном соотношении пептид-липид 1:25.

В данных условиях наночастицы демонстрировали мономодальное распределение со средним гидродинамическим диаметром 110–130 нм и дзета-потенциалом +43–58 мВ. Не модифицированные пептидами катионные липосомы с добавлением 1/35 ДОТАП обладают дзета-потенциалом +55 мВ. Для образцов, модифицированных пептидами по методу 1 в мольном соотношении 1/25, наблюдается снижение дзета-потенциала для наноконтейнеров с GGRGD (до +43 мВ), что не происходит при модификации пептидом GGGHK (+54 мВ), совместная модификация обоими типами пептидов индуцирует среднее значение дзета-потенциала (+49 мВ). Это, вероятно, связано с тем, что последовательность GGRGD, хоть и является суммарно нейтральной, содержит терминальный отрицательно заряженный остаток аспарагиновой кислоты с карбоксильной группой, а последовательность GGGHK содержит терминальный

основной остаток лизина с аминогруппой. Загрузка родамина Б не приводит к резким изменениям значений дзета-потенциала. Эффективность инкапсулирования составляет 53–57% и не демонстрирует влияния включения пептидов GGRGD и GGGHK на долю инкапсулированного родамина Б (табл. 3.6).

Поскольку в отсутствие буфера ионизация кислотных и основных групп в составе липидов и пептидов не определена, проводили дополнительный ДРС-анализ липосом в буфере HEPES (pH=7.4) для однозначной трактовки зарядов функциональных групп пептидов в условиях, приближенных к физиологическим (табл. 3.7).

Таблица 3.7. 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 в 50 мМ буфере HEPES (pH=7.4) при концентрации липидов 1 мМ и мольном соотношении пептид-липид 1:25.

Влияние пептидов на дзета-потенциал липосом в деионизированной воде аналогично наблюдали и в присутствии буфера. Пептид GGGHK в соответствии с его ожидаемым суммарным зарядом индуцировал умеренное, но значимое ($p < 0.05$) увеличение дзета-потенциала липосом до +23.1 мВ. В случае пептида GGRGD, нейтральной последовательности, наблюдается понижение дзета-потенциала с +18.9 мВ до +16.2 мВ. Возможно, это связано с тем, что заряд карбоксильной группы

аспарагиновой кислоты, хоть и может быть скомпенсирован катионным зарядом гуанидиновой группы аргинина, всё же находится на внешней части пептида, и тем самым вносит большой вклад в дзета-потенциал липосом. Влияние пептидов на дзета-потенциал подтверждает их иммобилизацию на липосомах за счет включения додецильной цепи в липидный бислой.

Также 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 (табл. 3.7). 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. Хотя известно, что для большинства липидов период уравнивания между слоями мембраны лежит в диапазоне от секунд до нескольких часов [292,293], для пептидов GGRGD и GGGHK с объемными головными группами, возможно, трансмембранный переход затруднён. В случае катионной последовательности GGGHK наблюдали повышение дзета-потенциала до +27.4 мВ, а для последовательности GGRGD – понижение до +11.6 мВ. Количественный анализ с применением ВЭЖХ не выявил свободного пептида GGRGD в растворе после отделения липосом с помощью центрифужного концентратора (его концентрация была ниже предела обнаружения 0.1 мкМ), что указывает на то, что молекулы пептида практически полностью локализованы в липидной мембране. При модификации методом 1 достоверной разницы в значениях гидродинамического диаметра и индекса полидисперсности исходных и модифицированных липосом не наблюдали, однако заметное повышение данных параметров, вызванное встраиванием пептидов в липосомы по методу 2, неоптимально.

Методом ПЭМ проанализированы различные композиции ФХ/Хол/ДОТАП (4:1:0.143) с пептидами, полученные согласно методу 1. Немодифицированные липосомы представляют собой округлые структуры с характерным диаметром 104 нм. Некоторые липосомы имеют тенденцию к агрегации и образованию более крупных структур, по-

видимому продуктов слияния вследствие усиления взаимодействий между частицами при испарении жидкости в условиях съемки (рис. 3.8).

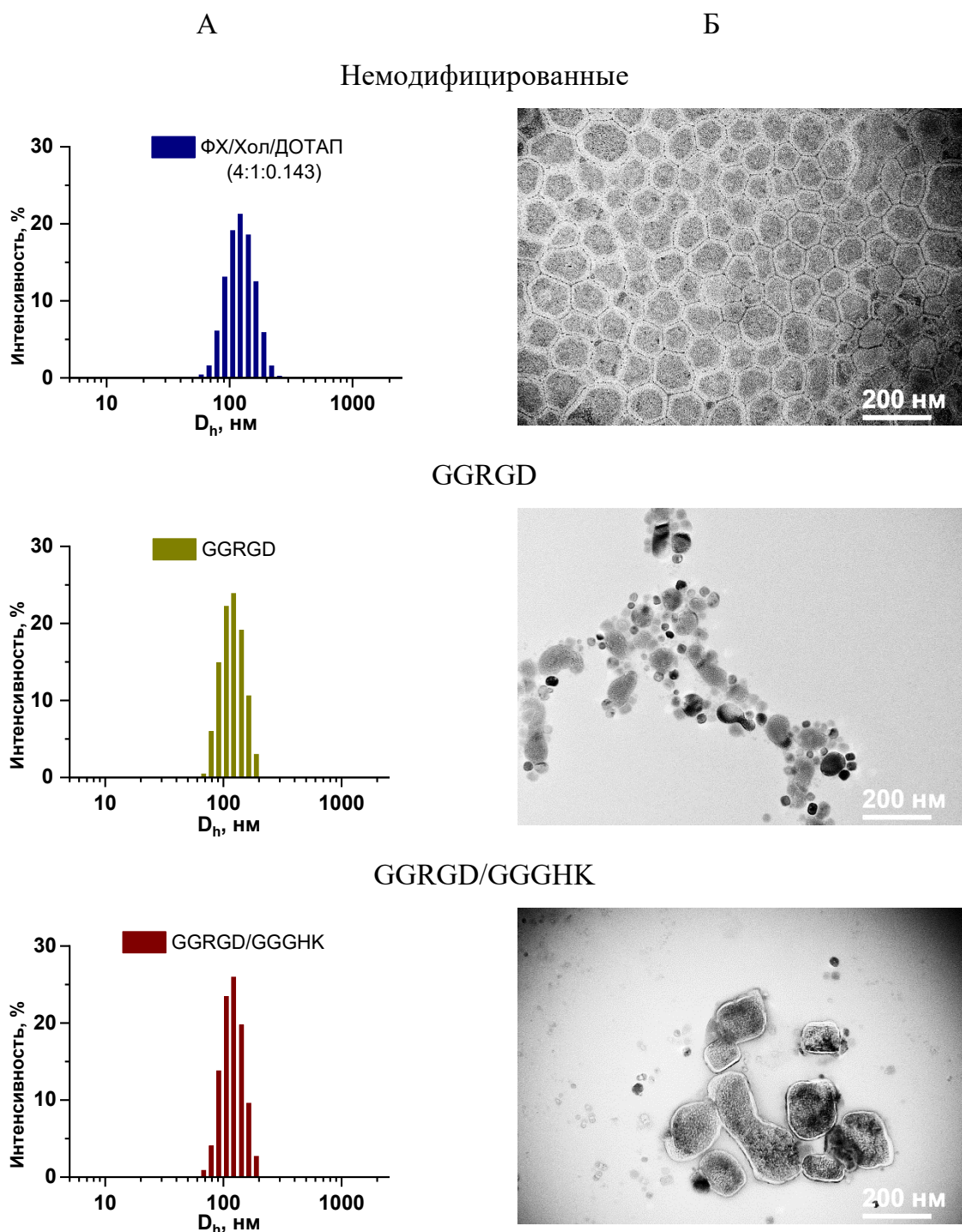


Рисунок 3.8. (А) Распределение частиц по размеру, усредненное по интенсивности, немодифицированных и модифицированных пептидами липосом ФХ/Хол/ДОТАП (4:1:0.143) в деионизированной воде. (Б) ПЭМ-изображения соответствующих липосом.

В случае модифицированных пептидами липосом не наблюдается высокой степени взаимодействия между частицами, что может быть индикатором их повышенной стабильности, обусловленной стерическим экранированием за счет объемных полярных групп GGRGD и GGGHK, выступающих на поверхности.

Таким образом, проведено сравнение ДРС и ПЭМ характеристик для катионных липосом, полученных модификацией амфифильными пептидами GGRGD и GGGHK методами гидратации тонкой липидной пленки и пост-встраивания. Согласно результатам ПЭМ, включение пептидов в состав липосом методом 1 способствует уменьшению взаимодействия частиц друг с другом. В ходе дальнейшей работы обнаружено, что индуцируемый ими эффект по усилению поглощения клетками проявляется при модификации обоими методами, что подтверждает возможность применения метода пост-встраивания для функционализации липосом [120]. С другой стороны, модификация амфифильными соединениями по методу 2 повышает гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности частиц, что неоптимально для дальнейших *in vivo* экспериментов.

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

Как и амфифильные пептиды, катионные ПАВ могут быть встроены в липосомальную мембрану методом пост-встраивания. Поскольку в рамках диссертационной работы представлены разработка и оптимизация подходов к нековалентной модификации липосом катионными ПАВ, необходимым исследованием было встраивание таких ПАВ в липосомы методом 2 и анализ влияния концентрации катионного ПАВ в мембране на дзета-потенциал. На примере немодифицированных липосом из фосфатидилхолина и холестерина в мольном соотношении 3:2 (суммарная концентрация липидов 5 мМ), обозначенных как ФХ/Хол (3:2), произведена нековалентная модификация геминальным дикатионным ПАВ 14-6-14(Et) и монокатионным ПАВ ЦТАБ методом пост-встраивания. Анализ дзета-потенциала проводили при фиксированном физиологическом значении $pH = 7.4$ в буферных растворах для контроля состояния ионизации и нивелирования отклонения дзета-потенциала в силу смещения кислотно-основного равновесия [108].

Дзета-потенциал немодифицированных липосом на основе фосфатидилхолина и холестерина при $\text{pH} = 7.4$ составляет -7.0 мВ. 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 возрастает резко, 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 ЦТАБ). Тем не менее, в литературе было показано, что в случае геминальных ПАВ сольubilизация липидных мембран может начинаться при концентрациях, кратно превышающих ККМ [75]. Это может быть обусловлено наличием гидрофобного спейсерного фрагмента в составе геминальных ПАВ, который увеличивает сродство к липидным мембранам [69]. Наиболее близкая к линейной зависимость получена при построении зависимости дзета-потенциала от логарифма концентрации модифицирующего ПАВ (рис. 3.9). Анализ такой зависимости с помощью линейной аппроксимации проводили в области низких концентраций ПАВ до 0.2 мМ для исключения возможности сольubilизации липидной мембраны. Высокие значения коэффициента достоверности аппроксимации R^2 свидетельствуют о логарифмической природе зависимости дзета-потенциала от концентрации ПАВ. Прямая, построенная по точкам для геминального ПАВ 14-6-14(Et), располагается выше, чем прямая для ЦТАБ, в среднем геминальное ПАВ обеспечивает преимущество в значениях дзета-потенциала на 19 мВ.

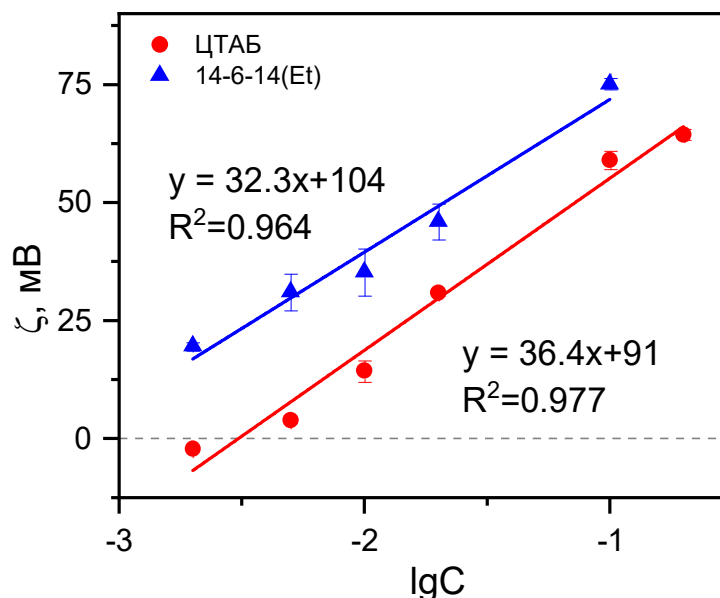


Рисунок 3.9. Зависимость дзета-потенциала липосом композиции ФХ/Хол 3:2 от логарифма концентрации модифицирующего ПАВ, 25 °С, рН = 7.4.

Таким образом, для получения катионных липосом с помощью нековалентной модификации ПАВ безусловным преимуществом обладает геминальное карбаматсодержащее ПАВ 14-6-14(Et) по сравнению с монокатионным ПАВ ЦТАБ. При одинаковых мольных соотношениях с липидами геминальное ПАВ обеспечивает более высокий дзета-потенциал. Кроме того, геминальные ПАВ обладают более высоким сродством к липидному бислою по причине наличия гидрофобного спейсерного фрагмента и эффективно встраиваются в мембраны липосом, не приводя к солюбилизации мембраны даже при концентрациях, превышающих ККМ. Однако с применением метода 2 остаётся незакрытым вопрос о распределении амфифильных молекул между слоями липидной мембраны, что в свою очередь, может оказывать влияние на физико-химические характеристики липосом: дзета-потенциал, гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности и количество активных функций на их поверхности. Кроме того, 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).

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

Карбаматсодержащие геминальные ПАВ зарекомендовали себя как эффективные модифицирующие агенты для обеспечения высокого дзета-потенциала липосом. Положительный заряд наделяет липосомы сродством к некоторым видам раковых тканей, способностью преодолевать биологические барьеры, а также может способствовать их проникновению в клетки. Как правило, в литературе такая модификация осуществляется с применением катионных липидов, нередко обладающих цитотоксичностью и обеспечивающих неудовлетворительные значения дзета-потенциала. Усиление поглощения частиц клетками может осуществляться и другими методами, например модификацией пептидами для подключения комплементарных взаимодействий. Так, классической последовательностью аминокислот для усиления взаимодействий с клетками является фрагмент аргинин – глицин – аспарагиновая кислота (RGD), который связывается с белками, преимущественно экспрессируемыми на мембранах клеток рака простаты РС-3. С помощью такой модификации не только усиливают поглощение наночастиц, но и активно нацеливают их на раковые ткани. В данной части диссертационной работы липосомальные системы на основе фосфатидилхолина и холестерина были модифицированы дикатионными карбаматсодержащими геминальными ПАВ с различной длиной углеводородных заместителей. Физико-химические параметры полученных систем и их взаимодействие с биологическими объектами сравнивали с характеристиками липосом, модифицированных катионным липидом ДОТАП. Катионные составляющие комбинировали с амфифильным пептидом C₁₆-SSRGD-NH₂ (SSRGD), который включали в состав липосом для обеспечения активной нацеленности на клетки РС-3 [107].

3.4.1. Подбор длины гидрофобной части геминального ПАВ для достижения оптимальных значений дзета-потенциала и цитотоксичности

В качестве липидной основы были взяты соевый фосфатидилхолин и холестерин в мольном соотношении 3:2 (ФХ/Хол 3:2). Добавление холестерина в липидный бислой повышает плотность и стабильность мембраны и пролонгирует высвобождение

инкапсулированных субстратов [124,294]. Образцы липосом готовили в буферных растворах в присутствии 25 мМ HEPES с $\text{pH} = 7.4$.

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 [295–297]. В серии карбаматсодержащих геминальных ПАВ гидрофобные заместители варьировали от децильного до гексадецильного производного. Модификацию осуществляли путём добавления модифицирующего катионного компонента в состав тонкой липидной плёнки. В буферном растворе немодифицированные липосомы на основе фосфатидилхолина и холестерина демонстрируют близкий к нейтральному дзета-потенциал -7 мВ. Добавления 1/100 ДОТАП недостаточно для смещения дзета-потенциала липосом в область положительных значений. Только при мольной доле ДОТАП 1/35 от общего количества липидных молекул достигается значение $+19.5$ мВ, а дальнейшее увеличение доли ДОТАП до 1/25 повышает дзета-потенциал до $+26$ мВ (табл. 3.8). Известно, что ДОТАП проявляет токсичность по отношению к здоровым клеткам [120], и его применение для создания катионной липосомальной платформы неоптимально.

Среди липосом, модифицированных геминальными карбаматсодержащими ПАВ с различной длиной гидрофобной части, можно наблюдать нелинейную зависимость дзета-потенциала от длины углеводородного радикала. ПАВ с самыми короткими цепями, 10-6-10(Et), обеспечивает наименьший дзета-потенциал $+18$ мВ по сравнению с другими ПАВ при одинаковой мольной доле 1/25. Подобное явление наблюдается и для других гомологических рядов катионных ПАВ [298,299]. Увеличение длины гидрофобного радикала с 12 до 16 метиленовых групп также сопровождается ростом дзета-потенциала, но уже значительно менее выраженным. При соотношении 1/25 большинство карбаматсодержащих геминальных ПАВ обеспечивают вдвое больший дзета-потенциал, чем ДОТАП, что доказывает их эффективность в качестве модуляторов заряда липосом. Это может быть связано с тем, что геминальные ПАВ имеют в два раза больше положительно заряженных групп на молекулу, чем ДОТАП. С другой стороны, при сравнении липосом, имеющих одинаковое число катионных групп в составе, например композиции с 1/12.5 ДОТАП и липосом с 1/25 14-6-14(Et), показано, что дзета-потенциал

липосом с 14-6-14(Et) на 48% выше (табл. 3.8). Это может быть обусловлено различной степенью ионизации аммонийных групп в структуре липида ДОТАП и катионных ПАВ.

Таблица 3.8. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) липосом ФХ/Хол 3:2 до и после модификации катионным липидом ДОТАП или геминальными карбаматсодержащими ПАВ n-6-n(Et), а также флуоресцентным красителем кумарином 6.

| Модифицирующий компонент | Мольная доля ДОТАП (ПАВ) | D_h , нм | PdI | ζ , мВ |
|--------------------------|--------------------------|------------|-------|--------------|
| ФХ/Хол 3:2 | | | | |
| - | - | 118 ± 1 | 0.078 | -6.9 ± 0.5 |
| ДОТАП | 1/50 | 109 ± 1 | 0.090 | +11.1 ± 0.3 |
| ДОТАП | 1/35 | 104 ± 1 | 0.096 | +19.5 ± 0.5 |
| ДОТАП | 1/25 | 97 ± 1 | 0.093 | +26 ± 2 |
| 10-6-10(Et) | 1/25 | 111 ± 1 | 0.075 | +18 ± 1 |
| 12-6-12(Et) | 1/25 | 110 ± 1 | 0.086 | +41 ± 2 |
| 14-6-14(Et) | 1/25 | 111 ± 2 | 0.090 | +48 ± 2 |
| 16-6-16(Et) | 1/25 | 105 ± 2 | 0.070 | +49 ± 2 |
| ФХ/Хол 3:2 + Кумарин 6 | | | | |
| - | - | 129 ± 1 | 0.081 | -27 ± 1 |
| ДОТАП | 1/50 | 115 ± 2 | 0.082 | -5.0 ± 0.2 |
| ДОТАП | 1/35 | 109 ± 3 | 0.124 | +7.7 ± 0.4 |
| ДОТАП | 1/25 | 99 ± 1 | 0.084 | +19 ± 1 |
| ДОТАП | 1/12.5 | 97 ± 2 | 0.117 | +31 ± 1 |
| 14-6-14(Et) | 1/50 | 109 ± 3 | 0.103 | +24 ± 1 |
| 14-6-14(Et) | 1/35 | 102 ± 5 | 0.078 | +37 ± 2 |
| 14-6-14(Et) | 1/25 | 97 ± 4 | 0.149 | +46 ± 2 |

Для детектирования липосом в биологических экспериментах применяют флуоресцентные метки, локализующиеся преимущественно в липидных мембранах. Так, применяется гидрофобный краситель кумарин 6 [300–303], флуоресценция которого в

зеленой области видимого спектра может быть использована для анализа клеточного поглощения и локализации липосомальных носителей. Добавление кумарина 6 привело к понижению дзета-потенциала липосом (табл. 3.8). Липосомы с 1/25 ДОТАП продемонстрировали понижение дзета-потенциала на 7 мВ, а липосомы с 1/50 ДОТАП изменили значение дзета-потенциала с +11 мВ до -5 мВ, показывая понижение на 16 мВ. На примере 14-6-14(Et) исследовано влияние кумарина 6 на липосомы, модифицированные ПАВ, но для них понижение дзета-потенциала находится в пределах стандартного отклонения.

В рамках развития подходов к нековалентной модификации липосом была разработана последовательность RGD, связанная с пальмитоильным гидрофобным доменом через два остатка серина (SSRGD). Амфифильная форма пептида RGD гарантирует эффективное встраивание в липидные мембраны для модификации липосом. Соединение SSRGD нерастворимо в органических растворителях, но растворимо в водных буферных системах при pH = 7.4. По этой причине модификация липосом данным соединением была осуществима только методом пост-встраивания, путём приготовления дисперсии липосом и последующей инкубации с аликвотой раствора SSRGD в буфере HEPES, после чего образцы липосом выдерживали в течение 12 ч для обеспечения полноценного встраивания амфифила в липосомальную мембрану (табл. 3.9).

Таблица 3.9. 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 |

На примере липосом, модифицированных SSRGD, наблюдается понижение дзета-потенциала за счет карбоксильных групп остатка аспарагиновой кислоты в последовательности SSRGD. Модификация липосом амфифильным пептидом SSRGD значительно понижает дзета-потенциал в случае исходных липосом состава ФХ/Хол (3:2) и липосом с добавлением ПАВ 14-6-14(Et) (снижение значения на 22–23 мВ), но в случае липосом с включением ДОТАП дзета-потенциал 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. Тем не менее, катионная модификация с применением липида ДОТАП и катионного ПАВ 14-6-14(Et) приводит к сохранению положительного дзета-потенциала даже после модификации пептидом SSRGD (+12 мВ для липосом с ДОТАП и +18 мВ при включении 14-6-14(Et)) (табл. 3.9).

Проведено предварительное исследование катионных липосом, полученных путем нековалентной модификации различными катионными компонентами, на цитотоксичность по отношению к клеткам рака простаты РС-3 (рис. 3.10, А). Показано, что статистически достоверное различие наблюдается для липосом, модифицированных геминальным карбаматсодержащим ПАВ 10-6-10(Et) (IC_{50} 0.26 мМ по фосфатидилхолину). ПАВ 10-6-10(Et) также является одним из наиболее активных антимикробных соединений. В то же время цитотоксичность липосом, модифицированных липидом ДОТАП, была еще выше (IC_{50} = 0.215 мМ), что свидетельствует о лучшей биосовместимости карбаматсодержащих геминальных ПАВ. Цитотоксичность липосом, модифицированных 14-6-14(Et), возрастает с увеличением мольной доли ПАВ (рис. 3.10, Б). Значения IC_{50} в диапазоне 0.19–0.39 мМ, рассчитанные по концентрации фосфатидилхолина, соответствуют концентрациям ПАВ 0.003–0.007 мМ, что ниже ККМ соединения 14-6-14(Et) (0.05 мМ). Таким образом, цитотоксический эффект в основном обусловлен мономерной формой геминального ПАВ, включенного в липидную мембрану.

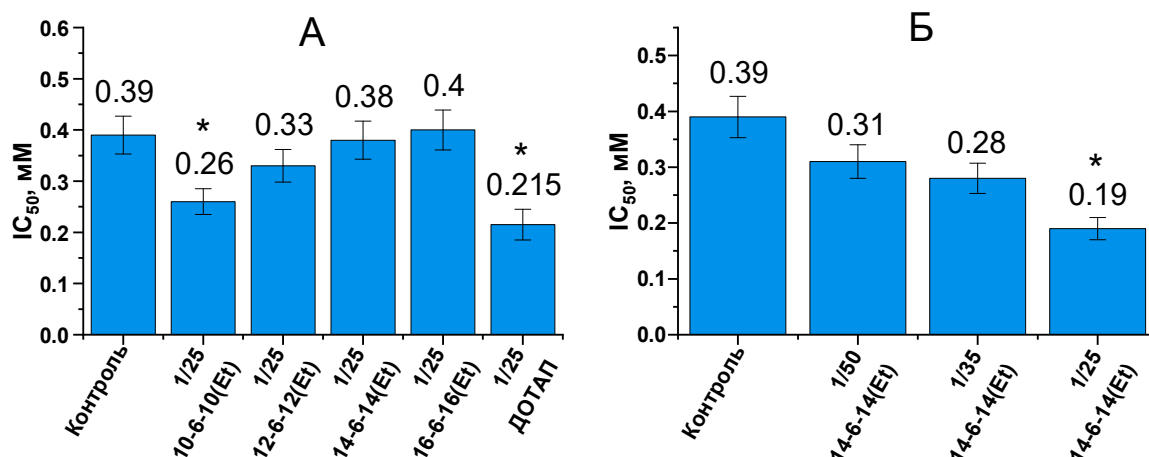


Рисунок 3.10. А) Цитотоксичность липосом ФХ/Хол 3:2, модифицированных карбаматсодержащими геминальными ПАВ с гидрофобными заместителями разной длины, на клетках РС-3. Б) Влияние ПАВ 14-6-14(Et) на цитотоксичность по отношению к клеткам РС-3 при изменении мольной доли ПАВ в составе липосомальной мембраны.

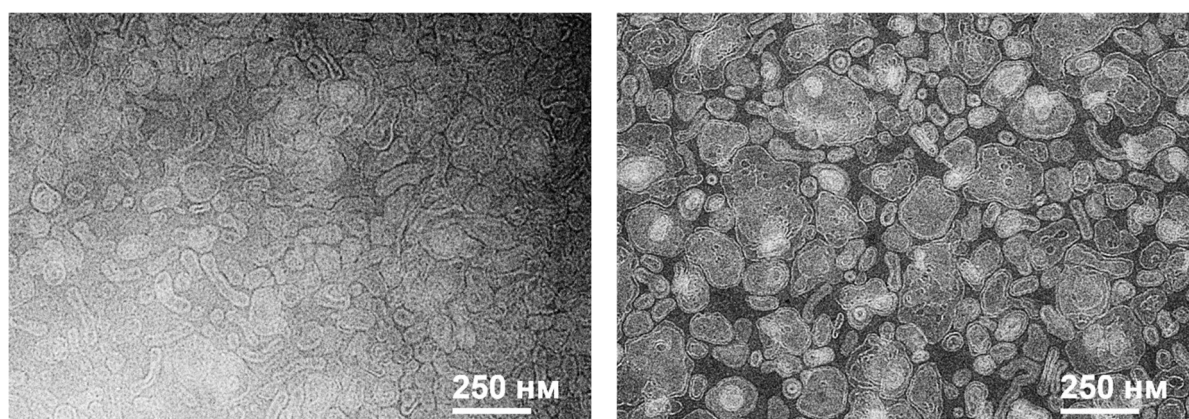
* $p < 0.05$ в сравнении с контролем.

По результатам исследования цитотоксичности ПАВ 14-6-14(Et) было выбрано как оптимальное соединение для нековалентной модификации липосом при дальнейшем выполнении работы. В качестве подходящего соотношения катионной составляющей была выбрана мольная доля 1/35 от общего количества липидов в составе липосом – наибольшая мольная доля, статистически неразличимая по значениям IC₅₀ от контрольного образца немодифицированных липосом. Амфифильный пептид SSRGD не повлиял отрицательно на биосовместимость липосом при включении в мембрану в мольных соотношениях до 1/25 [107].

3.4.2. Изменение морфологических характеристик липосом при модификации карбаматсодержащим геминальным ПАВ и катионным липидом ДОТАП

Состав липосом может варьироваться по числу и соотношению липидов и других компонентов мембраны с сохранением везикулярной структуры частиц, однако некоторые компоненты могут вызывать значительные изменения фазового состояния и морфологии образуемых частиц [304,305]. Геминальные ПАВ относятся к соединениям, способным вызывать подобные эффекты в составе липосом [69,306], а также могут способствовать эффективному поглощению липосом клетками без нарушения

целостности клеточной мембраны [307]. Поэтому с применением ПЭМ проведено исследование морфологии липосом, модифицированных дикатионным карбаматсодержащим геминальным ПАВ 14-6-14(Et) и катионным липидом ДОТАП. На изображениях липосом, модифицированных катионными составляющими, полученных ПЭМ, видно множество плотно расположенных везикулярных агрегатов с четко различимыми мембранами толщиной 4–6 нм, что хорошо соответствует толщине липидного бислоя [308] (рис. 3.11). На подложке с образцом липосом, модифицированных ДОТАП, видны деформированные крупные агрегаты диаметром 200–400 нм, которые, скорее всего, являются продуктами слияния более мелких везикул, которые ранее зафиксированы методом ДРС с диаметром в пределах 120 нм.



14-6-14(Et)

ДОТАП

Рисунок 3.11. ПЭМ-изображения образцов липосом ФХ/Хол 3:2, модифицированных ДОТАП или 14-6-14(Et) в соотношении 1/35. Суммарная концентрация липидов 5 мМ.

Заметны и более мелкие липосомы, состоящие из 1–3 липидных мембран, с диаметром 70–150 нм. На подложке с образцом липосом, модифицированных ПАВ 14-6-14(Et), агрегаты имеют более округлые очертания, более половины липосом представляют собой удлиненные округлые полые структуры диаметром от 50 до 200 нм. В образце с ПАВ заметно меньше крупных везикул, что указывает на низкую степень слияния липосом на подложке. Плотная заполненность подложки агрегатами обусловлена высокой концентрацией образцов (5 мМ). При съемке липосом, модифицированных 14-6-14(Et), при концентрации 0.1 мМ наблюдали сферические агрегаты диаметром около 120 нм (рис. 3.12).

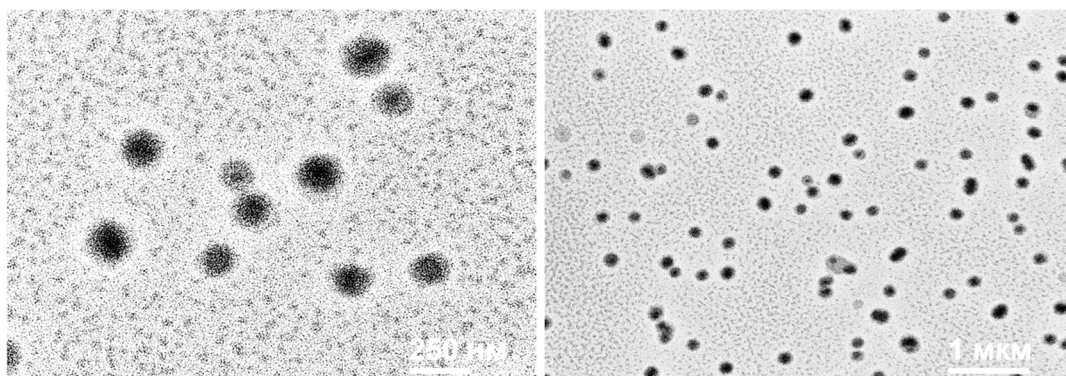


Рисунок 3.12. ПЭМ-изображения образца липосом ФХ/Хол 3:2, модифицированных ПАВ 14-6-14(Et) в соотношении 1/35. Суммарная концентрация липидов 0.1 мМ.

Везикулы в образцах с высокой концентрацией (5 мМ, рис. 3.10) заметно деформированы, причем липосомы, модифицированные ДОТАП, подвержены более значительному отклонению от сферичности, чем липосомы, модифицированные геминальным ПАВ 14-6-14(Et). Сильные отклонения от сферической формы в литературе наблюдали для липосом вследствие модификации полиглицидолом [304], загрузки доксорубицином [309], в случае полимерсом [310] или в связи с особенностями структуры липидов, из которых состоят липосомы [311]. Однако в случае исследованных в данной работе липосом на основе фосфатидилхолина и холестерина, модифицированных ДОТАП и 14-6-14(Et) при малых молярных соотношениях ($\leq 1/25$), представленные в литературе объяснения изменения морфологии не подходят. Скорее всего, наблюдаемая деформация вызвана плотной упаковкой частиц при высокой концентрации. В непосредственной близости друг от друга липидные мембраны могут сливаться [312], что приводит к образованию множественных новых межмолекулярных взаимодействий с отрицательной энтальпией процесса. Предполагается, что липосомы, модифицированные 14-6-14(Et), будут более устойчивы к слиянию в силу более высокого дзета-потенциала и, как следствие, более сильного кулоновского отталкивания. Кроме того, в литературе было рассмотрено влияние геминальных ПАВ на липидный бислои [69] и установлено, что они хорошо интегрируются в него и могут его стабилизировать [75]. В случае геминального ПАВ 14-6-14(Et) две карбаматные группы предоставляют центры для связывания с окружающими молекулами липидов за счет ван-дер-ваальсовых или водородных связей, что может дополнительно стабилизировать везикулярную структуру агрегатов.

Таким образом, при нековалентной модификации липосом с целью получения положительного заряда дикаатионное геминальное карбаматсодержащее ПАВ 14-6-14(Et) лучше сохраняет морфологию липосом по сравнению с катионным липидом ДОТАП.

3.4.3. Влияние катионных компонентов и амфифильного пептида C₁₆-SSRGD-NH₂ на эффективность взаимодействия липосом с мембранами клеток рака простаты PC-3

Липосомы, обладающие высокой способностью проникать в клетки, получают путём встраивания катионных составляющих [105,154,296], а также нацеливающих лигандов [5]. В данной части работы в качестве катионного компонента применены геминальное карбаматсодержащее ПАВ 14-6-14(Et) и катионный липид ДОТАП, а в качестве нацеливающего лиганда – амфифильная форма пептида RGD. С использованием МТТ-теста и проточной цитометрии были показаны преимущества геминальных ПАВ при разработке липосомальных систем доставки лекарств для лечения онкологических заболеваний. На основе липосомальной платформы было протестировано влияние различных модификаторов на взаимодействие с клетками PC-3 (клетки рака простаты человека) и WI-38 (здоровые клетки легкого человека).

Все композиции показали значительно более высокую цитотоксичность, оцененную с использованием МТТ-теста, по отношению к раковым клеткам PC-3 по сравнению со здоровыми клетками WI-38 (рис. 3.13). Наибольшую токсичность проявили катионные композиции с добавлением SSRGD, включающие ДОТАП или 14-6-14(Et). Совместное действие катионного заряда и комплементарных взаимодействий, усиленных пептидом SSRGD, вероятно, приводит к повышенному поглощению частиц клетками и к повышенной интернализации катионной составляющей, обладающей токсичностью.

Липосомы, положительный дзета-потенциал которых обеспечивали путем добавления ДОТАП, в случае обеих клеточных линий проявили большую токсичность, чем липосомы, модифицированные ПАВ 14-6-14(Et) (рис. 3.12). Таким образом, для карбаматсодержащего геминального ПАВ вновь продемонстрирована его биосовместимость.

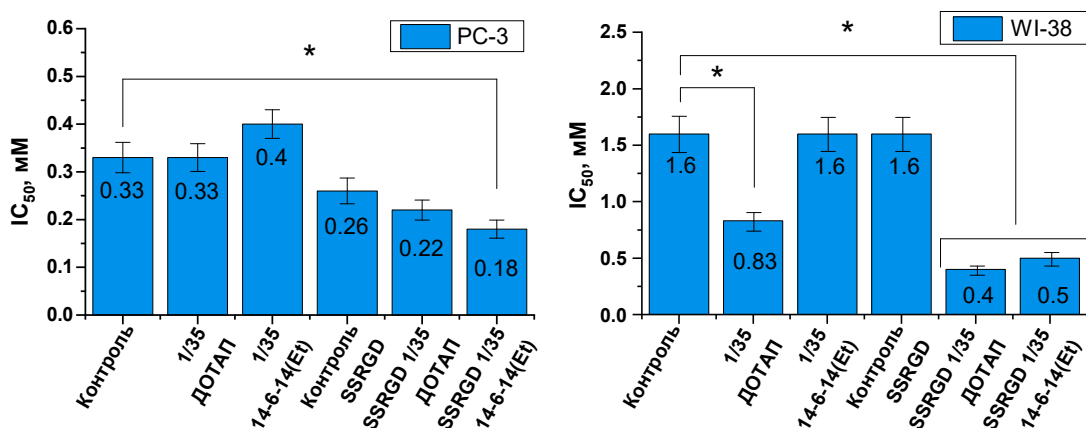


Рисунок 3.13. Цитотоксичность липосом на основе ФХ/Хол 3:2, полученных путем включения ДОТАП или 14-6-14(Et), с добавлением и без добавления SSRGD, по отношению к клеткам PC-3 и WI-38. * $p < 0.05$.

На следующем этапе работы было оценено влияние катионных компонентов на поглощение липосом клетками PC-3. Данные проточной цитометрии свидетельствуют об усилении интернализации липосом при добавлении в их состав положительно заряженных модификаторов (рис. 3.14). Эффект от включения в состав частиц 1/25 ДОТАП составляет 35%, в то время как добавление 1/35 14-6-14(Et) приводит к усилению поглощения на 197%.

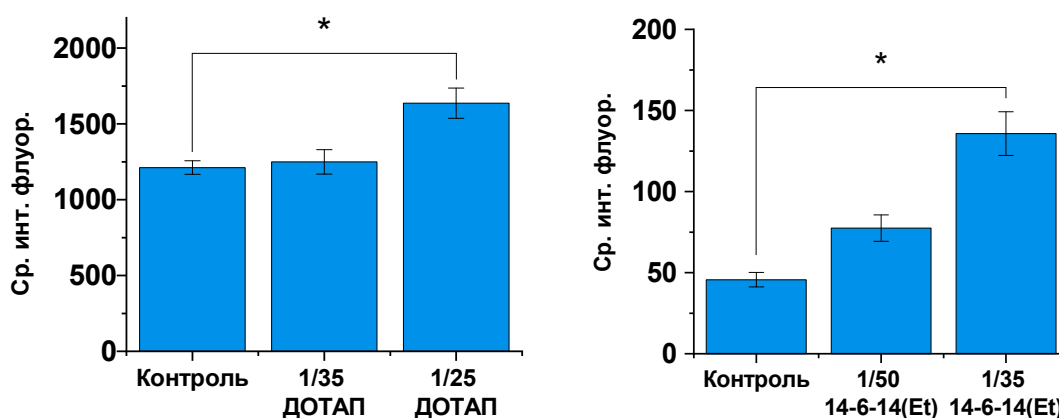


Рисунок 3.14. Сравнение влияния модификации липосом ФХ/Хол 3:2 катионными компонентами ДОТАП и 14-6-14(Et) на поглощение их клетками PC-3. * $p < 0.05$.

Для дифференцирования вкладов катионной и пептидной составляющих с помощью проточной цитометрии проанализированы две группы липосом: с добавлением и без добавления SSRGD. В каждой группе был контрольный образец без добавления

катионных компонентов, а также липосомы, модифицированные геминальным ПАВ и катионным липидом (рис. 3.15). Таким способом 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.

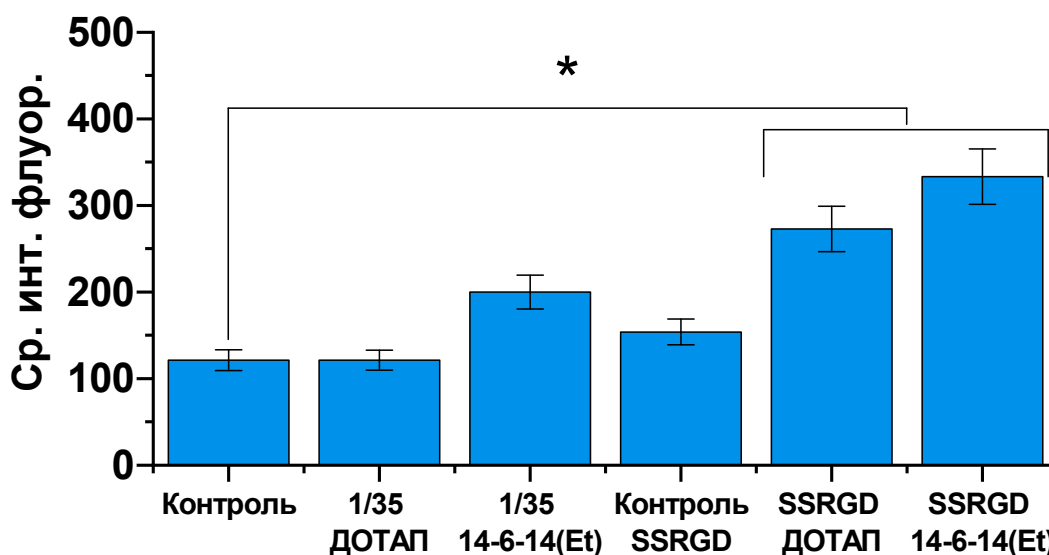
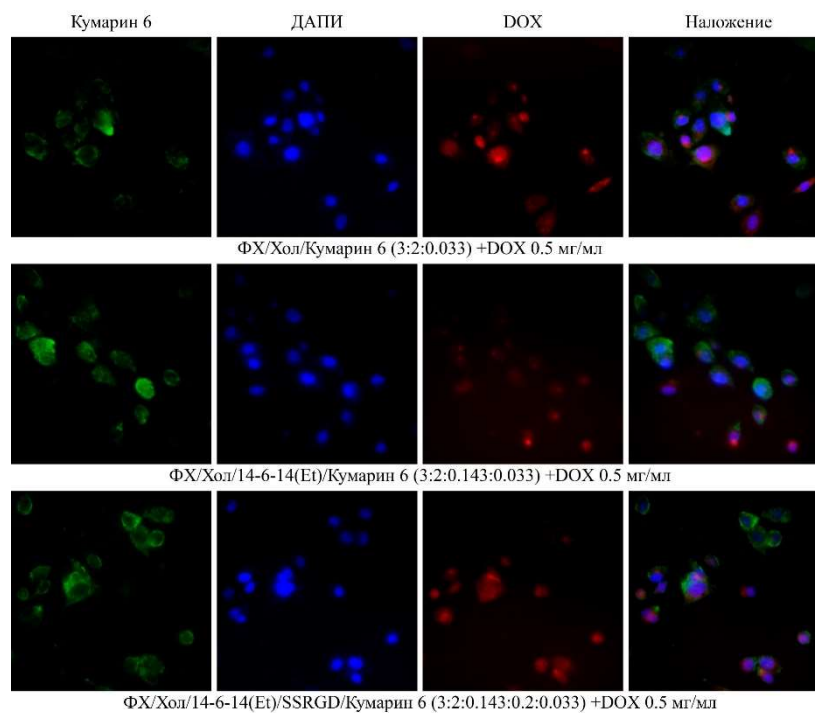


Рисунок 3.15. Поглощение клетками РС-3 немодифицированных и катионных липосом ФХ/Хол 3:2, полученных включением ДОТАП и ПАВ 14-6-14(Et), без добавления и с добавлением амфифильного пептида SSRGD. * $p < 0.05$.

Для установления эффективности разработанных липосомальных систем при транспортировке лекарственных средств в клетки образцы липосом, а именно, 1) немодифицированные 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 DOX и инкубированы с клетками РС-3. Данные флуоресцентной микроскопии образцов через 6 ч и 24 ч после инкубации позволяют одновременно отслеживать расположение ядер клеток (ДАПИ, синий), липосом (кумарин 6, зеленый) и DOX (красный) (рис. 3.15). На протяжении всего эксперимента в ядрах и цитоплазме клеток наблюдали интенсивную красную флуоресценцию, что свидетельствует об успешной доставке DOX в клетки.

6 ч



24 ч

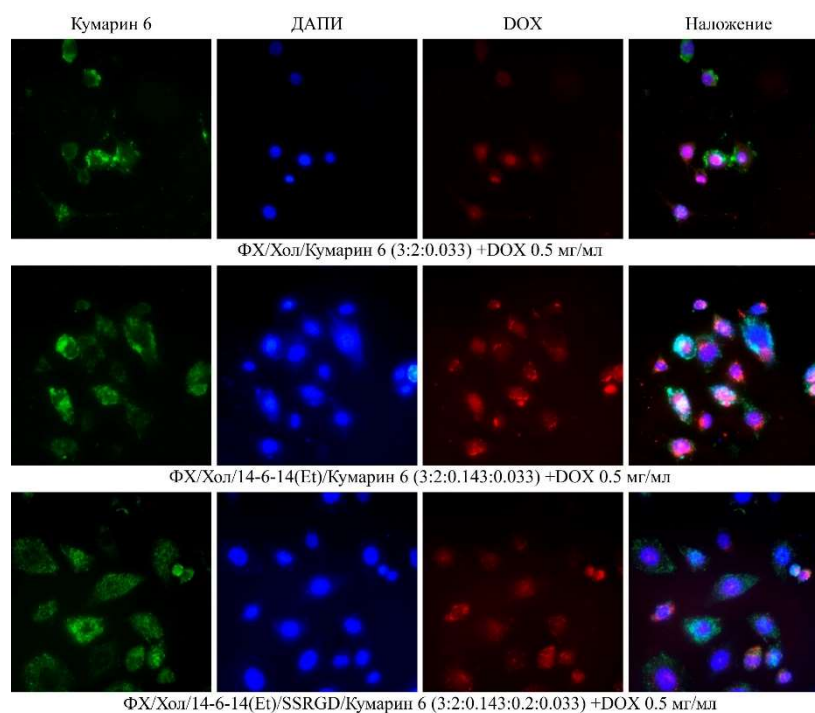


Рисунок 3.16. Интернализация липосом на основе ФХ/Хол (3:2) после 6 и 24 ч инкубации. Зеленый канал: кумарин 6, гидрофобный краситель, нековалентно включенный в мембрану липосом. Синий канал: ДАПИ, ДНК-интеркалирующий краситель. Красный канал: DOX, ДНК-интеркалирующий препарат, который вводили в клетки в свободной или липосомальной форме.

Зеленая флуоресценция кумарина 6, локализованного в бислоях липосом, заметно окрасила мембранные области клеток в случае нейтральных липосом в первые 6 ч инкубации. Для катионных липосом без пептида и SSRGD-содержащих катионных липосом наблюдаются менее выраженная локализация на клеточной мембране и более интенсивное окрашивание цитоплазмы. Через 24 ч в образцах, инкубированных с немодифицированными липосомами, наблюдали более равномерную флуоресценцию кумарина 6, распределенную по клеткам, что указывает на прогресс интернализации частиц клетками. На том же временном промежутке опыта начали наблюдать деформацию и фрагментацию ядер в апоптотические тельца для клеток, инкубированных с образцами с 14-6-14(Et), с 14-6-14(Et) и SSRGD, что говорит о начале процесса апоптоза и свидетельствует об эффективной доставке DOX в клетки PC-3.

МТТ-тест действия DOX на клетки PC-3 и WI-38 выявил селективность в отношении клеточной линии рака предстательной железы, которая была наиболее выраженной для липосом, модифицированных ПАВ 14-6-14(Et). Инкапсулирование препарата DOX в липосомы существенно не изменило значения его IC_{50} в случае клеток PC-3, но обеспечило меньшую токсичность при инкубации с клетками WI-38. Модификация катионным ПАВ 14-6-14(Et) снижает цитотоксичность липосом, содержащих DOX, по отношению к здоровым клеткам WI-38 (рис. 3.17).

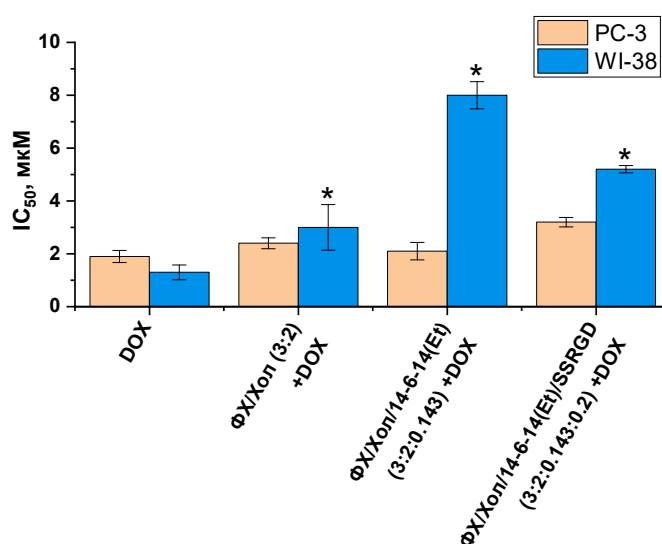


Рисунок 3.17. Цитотоксичность DOX по отношению к клеткам PC-3 и WI-38 в свободной форме или инкапсулированной в немодифицированных липосомах ФХ/Хол 3:2 и в составах ФХ/Хол 3:2, модифицированных ПАВ 14-6-14(Et) и SSRGD. * $p < 0.01$ по сравнению со свободным DOX.

Проведенная работа по модификации липосом свидетельствует о том, что дзета-потенциал является физико-химической характеристикой наноносителя, которая может влиять на его *in vitro* или *in vivo* показатели, такие как цитотоксичность и поглощение клетками. Известно, что клеточные мембраны обладают отрицательным потенциалом и электростатическое притяжение благоприятно для адсорбции наночастиц на мембране клеток и их последующего поглощения. В случае взаимодействия с клетками РС-3 оба катионных компонента, протестированных в работе, действительно увеличивают поглощение, однако карбаматсодержащие геминальные ПАВ оказывают более значимый эффект, чем ДОТАП. Объяснением может быть тот факт, что молекула 14-6-14(Et) содержит сразу два положительно заряженных атома азота и индуцирует на липосомах более высокий дзета-потенциал. Данные проточной цитометрии показывают, что постепенное увеличение мольной доли дикатионного ПАВ в липосомах приводит к пропорциональному увеличению поглощения клетками РС-3. В аналогичном исследовании, сравнивающем результаты проточной цитометрии по поглощению липосом с различным содержанием ДОТАП клетками РС-3, было показано, что заряд липосом играет меньшую роль, чем эффект ПЭГиляции, и в работе не была установлена подобная связь между мольной долей катионного компонента или дзета-потенциала липосом и поглощением клетками [100]. Несоответствие можно объяснить тем, что в данном случае для модификации липосом были использованы другие катионные компоненты и мольные доли другого порядка.

Более того, если соотнести данные проточной цитометрии по поглощению частиц клетками с дзета-потенциалом липосом, наблюдается прямолинейная зависимость с коэффициентом корреляции Пирсона 0.922 (рис. 3.18), что указывает на наличие взаимосвязи между зарядом липосомы и поглощением клетками. В литературе описаны попытки корреляции дзета-потенциала и числа катионных липидов на 100 молекул в липосомах с характеристиками *in vitro* взаимодействия с моноцитами крови человека, но не обнаружены корреляции [313]. Не исключено, что такая прямая зависимость присутствует только в частном случае взаимодействия липосом с клетками рака простаты РС-3.

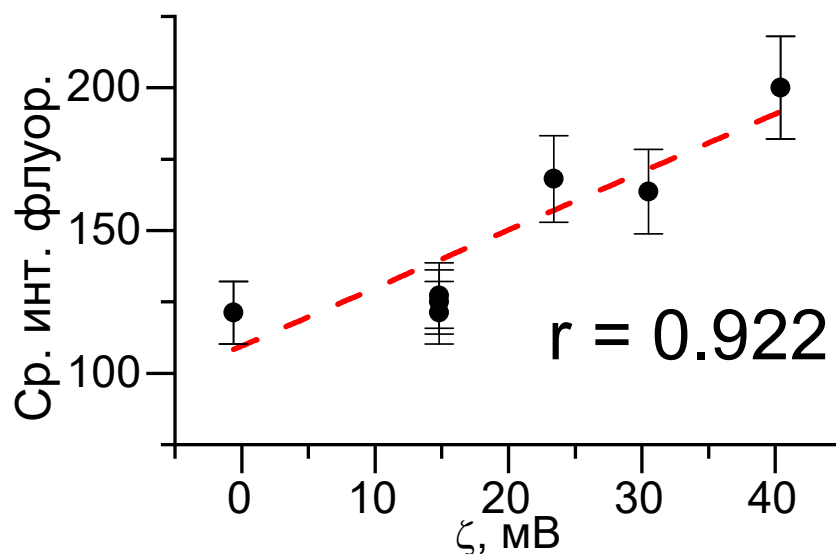


Рисунок 3.18. Корреляция между дзета-потенциалом липосом и их поглощением клетками.

Таким образом, ряд новых карбаматсодержащих геминальных ПАВ n-6-n(Et) проявил более высокую способность индуцировать положительный дзета-потенциал на поверхности липосом при добавлении 2-4 мол.% по сравнению с катионным липидом ДОТАП. Кроме того, геминальные карбаматсодержащие ПАВ более биосовместимы и препятствуют деформации и слиянию модифицированных липосом. Поэтому карбаматсодержащие геминальные ПАВ представляют интерес для нековалентной модификации липосом за счет усиления их сродства к отрицательно заряженным мембранам раковых клеток. Природа поглощения частиц, обусловленная положительным зарядом, неспецифична, и модификацию катионными ПАВ можно комбинировать с лигандами, которые увеличивают поглощение за счет комплементарных взаимодействий для наилучшей эффективности и нацеленного действия наночастиц. Такая комбинация, как дикатионное геминальное ПАВ и амфифильный пептид SSRGD, перспективна для дальнейших исследований в области разработки систем доставки химиотерапевтических препаратов. Более того, обнаружена корреляция между дзета-потенциалом липосом и поглощением липосом клетками PC-3, что связывает физико-химические характеристики липосом с их характеристиками *in vitro*.

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

Неспособность многих лекарственных средств самостоятельно преодолевать биологические барьеры является большой проблемой, ограничивающей потенциал фармакологических разработок и замедляющей создание новых решений в области терапии разных заболеваний. Одним из главных биологических барьеров в организме человека является ГЭБ, для преодоления которого возможно применение катионных липосом. Отравление фосфорорганическими соединениями (ФОС) является тяжелым состоянием, для терапии которого критически важно проникновение антидота в мозг. Согласно литературным данным, такие отравления ежегодно приводят к трём миллионам случаев острых отравлений и двумстам тысячам фатальных исходов [314].

Поэтому в данной части диссертационной работы сформировали липосомальную композицию, способную инкапсулировать антидот пралидоксим хлорид, используемый для терапии отравления ФОС, и доставлять его через ГЭБ, а также оценивали способность липосомальной формуляции 2-ПАМ устранять последствия воздействия яда на центральную нервную систему.

3.5.1. Подбор спейсерного фрагмента геминального ПАВ для достижения оптимальных значений дзета-потенциала и стабильности липосом

На первом этапе работы были сформированы липосомы на основе фосфатидилхолина без добавления холестерина, поскольку в случае терапии отравлений ФОС необходимо быстрое обеспечение высоких концентраций антидота в кровотоке и мозге. Для получения катионного заряда липосомы были модифицированы гидроксиэтилированными геминальными ПАВ 16-s-16(OH) с различной длиной спейсерного фрагмента ($s = 4, 6, 10$) посредством включения катионного ПАВ в тонкую липидную плёнку. Исследование проводили в деионизированной воде во избежание конкурентного гидрофильного субстрата 2-ПАМ с молекулами буфера при инкапсуляции. Методом ДРС были охарактеризованы свойства липосом с включением гидроксиэтилированных ПАВ (табл. 3.10).

Таблица 3.10. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) липосом на основе ФХ при модификации катионными гидроксиэтилированными геминальными ПАВ 16-s-16(OH) (s = 4, 6, 10) после хранения в течение 1 дня, 2 месяцев.

| Образец | 1 день | | | 2 месяца | | |
|------------------------|------------|-------|--------------|------------------|-------|--------------|
| | D_h , нм | PdI | ζ , мВ | D_h , нм | PdI | ζ , мВ |
| ФХ | 122 ± 3 | 0.128 | -17 ± 0.5 | Появление осадка | | |
| ФХ/16-4-16(OH) (50:1) | 122 ± 4 | 0.091 | 50 ± 6 | 115 ± 1 | 0.079 | 51 ± 3 |
| ФХ/16-6-16(OH) (50:1) | 128 ± 2 | 0.112 | 53 ± 1 | 118 ± 1 | 0.101 | 53 ± 1 |
| ФХ/16-10-16(OH) (50:1) | 134 ± 11 | 0.187 | 46 ± 1 | 119 ± 3 | 0.125 | 51 ± 5 |
| ФХ/16-4-16(OH) (35:1) | 129 ± 4 | 0.142 | 64 ± 3 | 113 ± 2 | 0.079 | 60 ± 15 |
| ФХ/16-6-16(OH) (35:1) | 124 ± 3 | 0.104 | 59 ± 1 | 120 ± 1 | 0.100 | 59 ± 7 |
| ФХ/16-10-16(OH) (35:1) | 134 ± 6 | 0.142 | 64 ± 1 | 116 ± 2 | 0.077 | 62 ± 4 |
| ФХ/16-6-16(OH) (25:1) | 121 ± 1 | 0.111 | 63 ± 1 | 117 ± 1 | 0.083 | 63 ± 7 |
| ФХ/16-6-16(OH) (15:1) | 128 ± 5 | 0.151 | 73 ± 1 | 118 ± 1 | 0.080 | 73 ± 10 |

Все модифицированные липосомы в деионизированной воде обладают высоким положительным дзета-потенциалом порядка +45-73 мВ. На примере ПАВ 16-6-16(OH) продемонстрировано монотонное увеличение дзета-потенциала с +50 мВ в случае модификации при соотношении 1/50 16-6-16(OH) до +73 мВ при модификации с добавлением 1/15 гидроксиэтилированного геминального ПАВ. Зависимость дзета-потенциала от длины спейсерного фрагмента не прослеживается. Высокий положительный дзета-потенциал способствует повышению стабильности липосом при хранении. В случае немодифицированных липосом на основе фосфатидилхолина спустя два месяца хранения появляется осадок, и образец более не даёт воспроизводимых достоверных результатов при анализе методом ДРС. В то же время, все модифицированные липосомы продемонстрировали характеристики, близкие к исходным. В основной массе литературных данных абсолютные значения дзета-потенциала липосом выше 30 мВ являются признаком высокой коллоидной стабильности. Следует отметить, что даже при включении в состав липосом 1/15 ПАВ 16-6-16(OH) (6.6 мол.%) методом ДРС наблюдали мономодальное распределение

интенсивности рассеянного сигнала с пиком в области значений гидродинамического диаметра 110 нм. Такая мольная доля 16-6-16(OH) соответствует концентрации 0.33 мМ, что в 35 раз выше, чем значение ККМ геминального гидроксиэтилированного ПАВ с гександиильным спейсерным фрагментом [75]. Полученные агрегаты также анализировали методом ПЭМ (рис. 3.19).

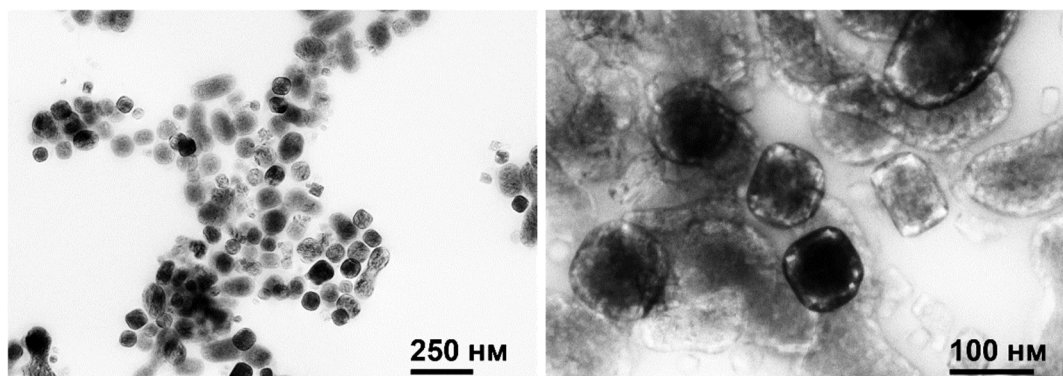


Рисунок 3.19. ПЭМ-изображения катионных липосом, модифицированных гидроксиэтилированным геминальным ПАВ 16-4-16(OH).

Структурный анализ липосом с помощью ПЭМ позволил рассмотреть многочисленные агрегаты со средним диаметром 81 нм. Заметна тенденция везикул приобретать угловатые формы, близкие к прямоугольным. В литературе подобное явление наблюдается для липосом редко [304]. Авторы объясняют угловатую форму везикул сильным взаимным притяжением полиглицидоловых цепей, выступающих над поверхностью мембраны, вследствие чего бислои стремятся к уплощению. В настоящей работе в составе липосом отсутствуют полиглицидол-содержащие компоненты, тем не менее, не исключено, что таким образом проявляется влияние геминальных ПАВ 16-4-16(OH) на морфологические свойства модифицированных липосом.

3.5.2. Инкапсуляция гидрофильных субстратов родамина Б и 2-ПАМ в липосомы и оценка эффективности загрузки

Инкапсуляция лекарственных препаратов в липосомы для доставки – это одна из первостепенных задач, возлагаемых на липосомальную платформу в решении фармакологических задач. Эффективность инкапсуляции и степень загрузки субстратов гидрофильной природы зависят от множества факторов, среди которых липидный состав

мембраны, ионизация полярных групп субстратов и липидов, метод инкапсуляции [315]. Модельный гидрофильный краситель родамин Б, лекарственный препарат прапидоксим хлорид (2-ПАМ) были загружены в липосомы, модифицированные гидроксиэтилированными геминальными ПАВ.

На примере модельного зонда родамина Б в составе липосомальной формуляции из ФХ, модифицированной ПАВ 16-s-16(OH), проварьировали длину спейсерного фрагмента геминальных ПАВ (табл. 3.11).

Таблица 3.11. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) липосом из ФХ, модифицированных гидроксиэтилированными геминальными ПАВ, после хранения в течение 1 дня, 1 месяца, параметры инкапсуляции гидрофильных субстратов родамина Б и 2-ПАМ.

| 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(OH) (35:1) | 49 ± 1 | 6.5 ± 0.5 | 109 ± 1 | 0.070 | 67 ± 1 | 119 ± 2 | 0.447 | 43 ± 4 |
| ФХ/16-6-16(OH) (35:1) | 41 ± 1 | 5.4 ± 0.4 | 114 ± 1 | 0.059 | 64 ± 1 | 122 ± 6 | 0.322 | 57 ± 2 |
| ФХ/16-10-16(OH) (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(OH) (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(OH) (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(OH) (35:1) + 10.5 мг/мл 2-ПАМ | 72 ± 2 | 47 ± 1 | 115 ± 2 | 0.096 | 45 ± 2 | 129 ± 1 | 0.079 | 33 ± 1 |

Наибольшие значения ЕЕ и 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%). Поскольку в рамках данного этапа целью была разработка липосомального наноконтейнера для доставки реактиватора ацетилхолинэстеразы 2-ПАМ в мозг, ЕЕ и LC для данного препарата оценивали в липосомах ФХ/16-4-16(OH) (35:1) вследствие повышенной эффективности инкапсуляции модельного зонда родамина Б в данной 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(ОН).

Методом диализа проведено *in vitro* исследование процесса высвобождения окрашенного зонда родамина Б из липосом ФХ и их модифицированных версий (рис. 3.20). Наиболее значительное замедление процесса высвобождения наблюдали для липосом, модифицированных ПАВ 16-10-16(ОН).

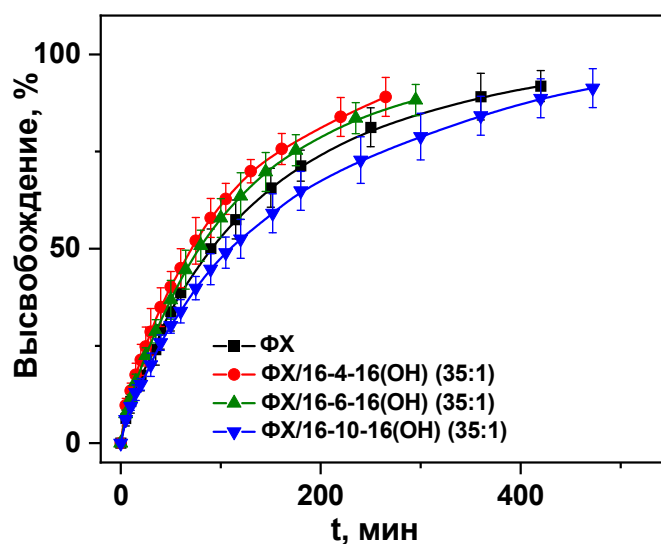


Рисунок 3.20. Высвобождение родамин Б (0.5 мг/мл) *in vitro* из исходной композиции ФХ (5 мМ) и модифицированных липосом геминальными ПАВ 16-s-16(ОН) (s = 4, 6, 10), pH = 7.4, 37 °С.

Замедление высвобождения родамин Б в случае липосом с ПАВ 16-10-16(ОН) наиболее вероятно происходило в силу стабилизирующего эффекта ПАВ с длинным спейсерным фрагментом на липидную мембрану. Ранее было показано выраженное взаимодействие гидроксиэтилированных геминальных ПАВ с додекандиловым спейсерным фрагментом с липидной мембраной из ДПФХ. ПАВ 16-12-16(ОН) занижало температуру фазового перехода мембраны из ДПФХ до 37 °С, в то время как гомологи 16-4-16(ОН) и 16-6-16(ОН) не оказывали влияния. Поскольку целью данной работы

является быстрая доставка антидота 2-ПАМ в мозг для терапии отравления фосфорорганическим ядом, замедление высвобождения не представляет интереса. Как показано выше, в случае ПАВ 16-4-16(ОН) эффективность инкапсуляции выше, поэтому *in vitro* высвобождение 2-ПАМ анализировали на примере немодифицированной композиции ФХ и липосом, модифицированных ПАВ 16-4-16(ОН) (рис. 3.21).

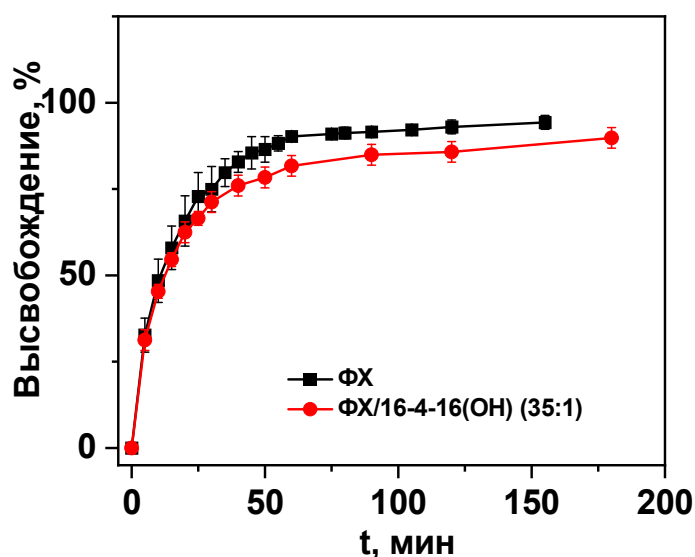


Рисунок 3.21. Высвобождение 2-ПАМ *in vitro* из липосомальной композиции ФХ и ФХ/16-4-16(ОН) (35:1), pH = 7.4, 37 °C.

Высвобождение 2-ПАМ из липосом происходит быстрее, чем высвобождение родамина Б, что может быть связано с меньшей молекулярной массой и размерами пралидоксима хлорида, что ускоряет его диффузию через липидную и диализную мембраны. Включение ПАВ 16-4-16(ОН) в состав липосом незначительно замедляет высвобождение 2-ПАМ, что является преимуществом при таком быстром высвобождении субстрата.

3.5.3. Биосовместимость и проникновение через ГЭБ катионных липосом, модифицированных гидроксиэтилированными геминальными ПАВ

В настоящее время внутривенная терапия является наиболее распространенным способом введения лекарственных препаратов вследствие их быстрого поступления в кровь и достижения терапевтического эффекта. В случае использования положительно

заряженных носителей возникает риск агглютинации красных кровяных телец [316], которая приводит к закупориванию сосудов, поэтому на следующем этапе работы оценивали способность катионных липосом ФХ/16-4-16(ОН) (35:1) вызывать гемагглютинацию (рис. 3.22).

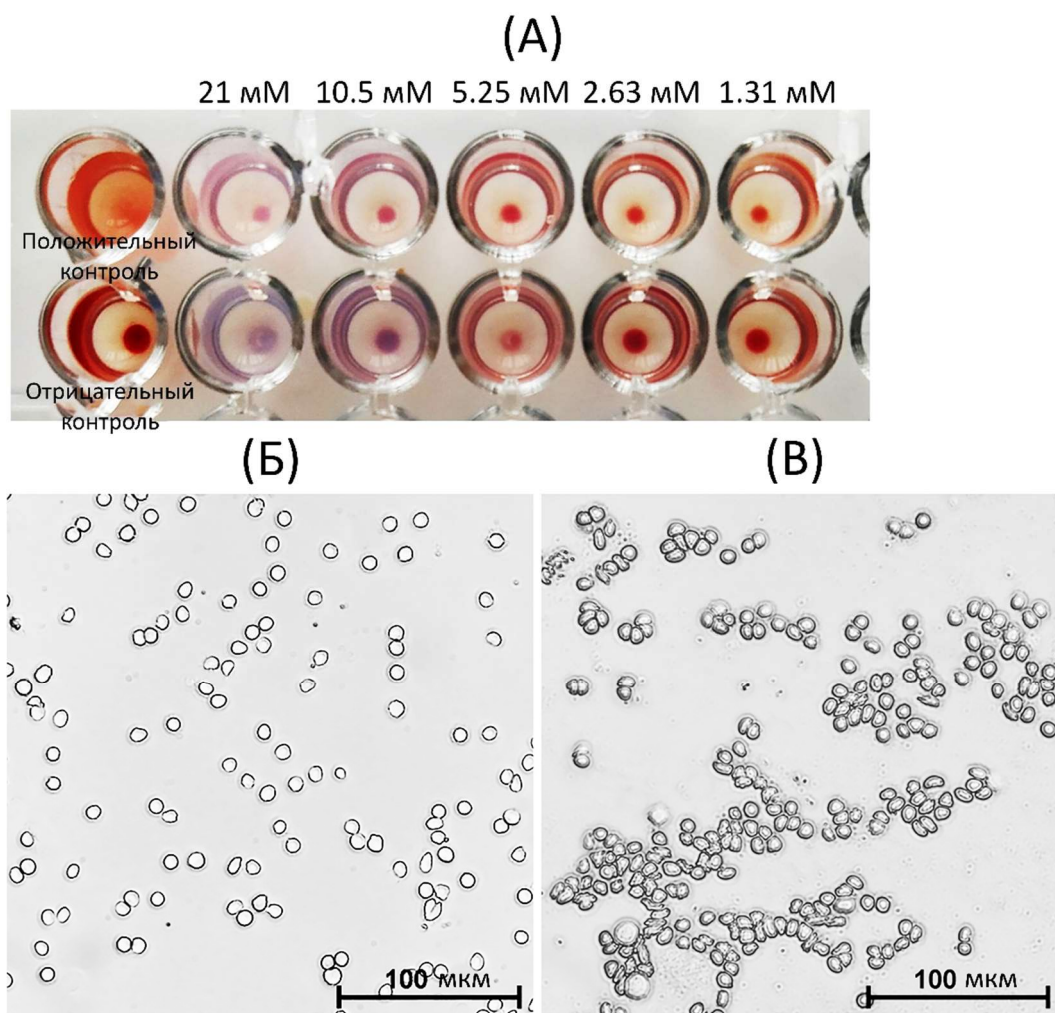


Рисунок 3.22. Результаты исследования гемагглютинации, вызываемой раствором липосом ФХ/16-4-16(ОН) (35:1) с 10.5 мг/мл 2-ПАМ: (А) фотография лунок с массой эритроцитов, инкубированной с образцами липосом разной концентрации; (Б) микрофотография образца массы эритроцитов, инкубированной с липосомальной композицией концентрации 21 мМ; (В) микрофотография смеси эритроцитов I и II группы крови, положительный контроль на гемагглютинацию.

Липосомальная композиция ФХ/16-4-16(ОН) (35:1) не инициировала гемагглютинацию даже при концентрации липидов 21 мМ, что свидетельствует о высокой гемосовместимости липосом и об отсутствии риска закупоривания кровеносных

сосудов даже при объемных инъекциях и инфузиях формуляций антидота. При лечении отравлений токсичными ФОС одной из серьезных проблем является восстановление активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) головного мозга. Известно, что катионные наночастицы способны пересекать мембраны эндотелиальных клеток ГЭБ посредством адсорбционного трансцитоза, движущим фактором которого является электростатическая адсорбция катионной наночастицы на микроучастках мембран эндотелиальных клеток, обладающих выраженным отрицательным потенциалом. В качестве предварительного теста на способность проникать через ГЭБ методом конфокальной микроскопии исследовали наличие зеленой флуоресценции в тканях мозга крыс после внутривенного введения родамина Б, инкапсулированного в катионные липосомы, модифицированные гидроксиэтилированными геминальными ПАВ (рис. 3.23).

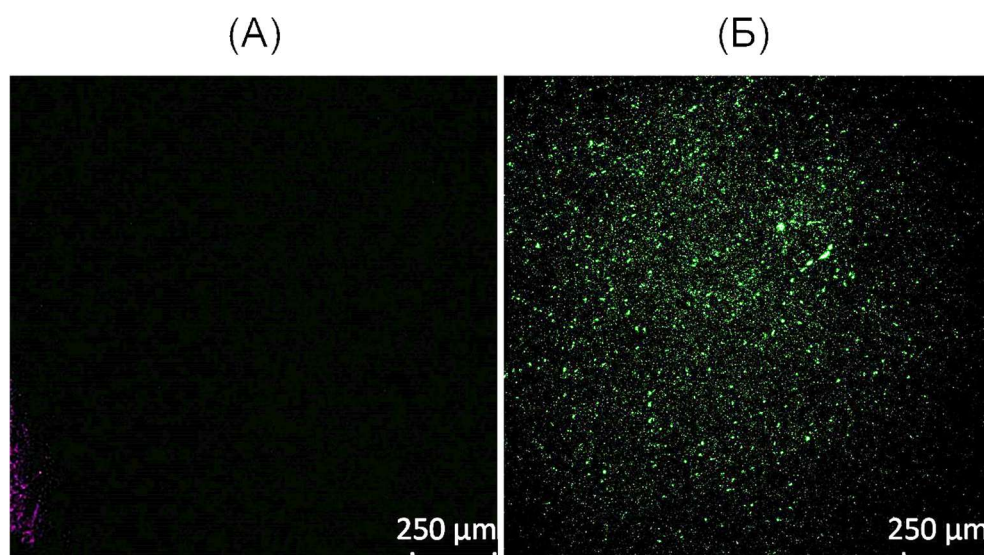


Рисунок 3.23. Срезы головного мозга крысы после (а) введения свободного родамина Б и (б) после введения липосом ФХ/16-4-16(ОН) (35:1), меченных родамином Б.

После введения свободного родамина Б в срезах головного мозга крыс не наблюдается флуоресценция, тогда как после введения родамина Б, инкапсулированного в катионные липосомы, модифицированные ПАВ 16-4-16(ОН), наблюдается множество зеленых точек, свидетельствующих о проникновении родамина Б в мозг. Результаты исследования срезов мозга крыс с помощью конфокальной микроскопии позволяют приступить к *in vivo* экспериментам.

3.5.4. Реактивация ацетилхолинэстеразы головного мозга и фармакокинетика 2-ПАМ, инкапсулированного в катионные липосомы

ФОС являются высокотоксичными из-за наличия электрофильного атома фосфора, способного на продолжительное время связываться с остатком серина в активном центре фермента АХЭ. Этот фермент осуществляет расщепление нейротрансмиттера ацетилхолина при передаче нервных сигналов, поэтому ингибирование АХЭ посредством ковалентного связывания ФОС приводит к критическому нарушению работы нервной системы и может быть фатальным [314]. Подходящим антидотом для дефосфорилирования ингибированной АХЭ являются оксими – зачастую, катионные нуклеофильные молекулы, не способные самостоятельно проникать через ГЭБ и устранять последствия отравления ФОС в мозге. В настоящей работе 2-ПАМ выступает в роли антидота, доставляемого в мозг с помощью катионных липосом, модифицированных гидроксиэтилированными геминальными ПАВ. В качестве модельного ФОС выбран параоксон, внутривенно вводимый крысам в количестве 0.8 от полублетальной дозы.

Фармакокинетические исследования позволили отследить содержание 2-ПАМ в плазме и мозге после внутривенного введения в свободной форме и в составе катионных липосом ФХ/16-4-16(ОН) (35:1) в течение 60 мин после инъекции. Было показано, что концентрация 2-ПАМ в плазме через 5 мин отличается в случаях разных формуляций оксима, в частности, наблюдали концентрацию 820 мкг/мл для свободного 2-ПАМ и 525 мкг/мл для инкапсулированной формы (рис. 3.24). Падение концентрации оксима в плазме было замедлено в случае липосом, и в течение 10 мин более высокое значение наблюдали уже для инкапсулированного 2-ПАМ (255 мкг/мл против 85 мкг/мл для свободной формы). Такое явление можно объяснить тем, что инкапсуляция лекарственного препарата в липосомы защищает его от выведения из кровотока, что свойственно для липосом. Однако в настоящей работе пролонгирование высвобождения 2-ПАМ в плазме не является приоритетом и самостоятельной задачей, поскольку для реактивации фосфорилированной АХЭ необходимо обеспечивать высокую концентрацию оксима в мозге.

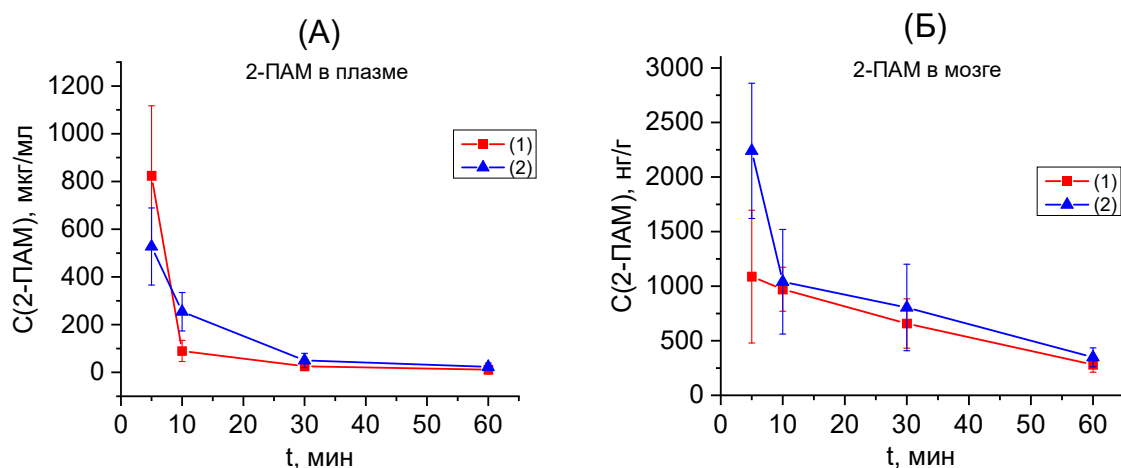


Рисунок 3.24. Фармакокинетические профили 2-ПАМ: (А) в плазме, (Б) в мозге; (1) – незакапсулированный 2-ПАМ, (2) 2-ПАМ в составе липосомальной композиции ФХ/16-4-16(ОН) (35:1).

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). Это может быть объяснено повышенной способностью катионных липосом проникать в мозг и высвобождать инкапсулированный 2-ПАМ, тогда как в свободной форме данный оксим не способен в значительной степени преодолевать ГЭБ.

Повышение концентрации 2-ПАМ в мозге свидетельствует о возможности повысить степень реактивации ингибированной ядом АХЭ с помощью оксима, инкапсулированного в катионные липосомы. Поэтому на следующем этапе работы оценивали долю ингибированной АХЭ в мозге после введения параоксона без лечения, а также после терапии свободной и липосомальной формами 2-ПАМ (рис. 3.25). Было показано, что вследствие введения нейротоксического яда ингибированным оказывается 71% фермента, и после терапии свободной формой оксима доля падает до 66%, однако статистически достоверных различий между выборками данных образцов не обнаружено. В случае терапии катионными липосомами ФХ/16-4-16(ОН) (35:1), содержащими 2-ПАМ, наблюдали падение доли неактивной АХЭ до 44%, и сравнение между данным и контрольным образцом (введение параоксона без терапии) удовлетворило критерию достоверности $p < 0.05$. Таким образом, была продемонстрирована реактивация 27% фермента.

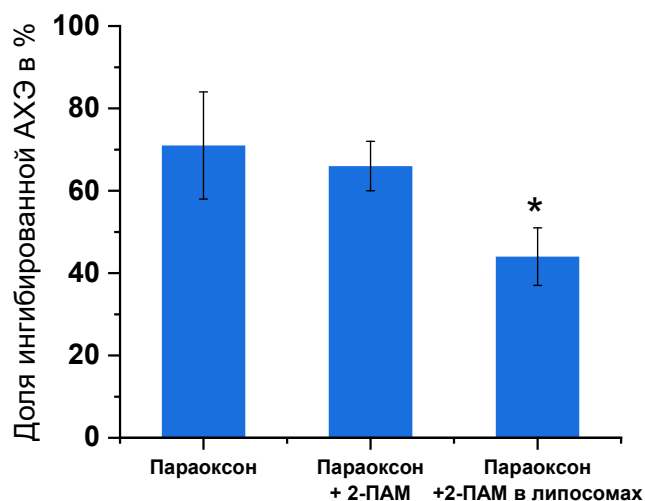


Рисунок 3.25. Доля ингибированной ацетилхолинэстеразы после отравления параоксоном, после отравления параоксоном и последующей терапии 2-ПАМ, после отравления и терапии липосомальной формой 2-ПАМ. * $p < 0.05$.

Таким образом, посредством модификации липосом на основе фосфатидилхолина дикаationными геминальными ПАВ с гидроксизтильными фрагментами в головной группе были получены стабильные катионные наноконтейнеры, способные инкапсулировать 2-ПАМ с эффективностью инкапсуляции до 72%. Катионная липосомальная формуляция увеличила концентрацию оксима, наблюдаемую в мозге крыс после внутривенного введения более, чем вдвое, по сравнению со свободной формой 2-ПАМ. Такое увеличение концентрации позволило зарегистрировать реактивацию ингибированной после отравления параоксоном АХЭ на 27%, что на момент публикации материала в 2020 году было наивысшим показателем в литературе среди липосомальных форм антидота при внутривенной терапии. Впоследствии была продемонстрирована реактивация 36% фермента при помощи твердых липидных наночастиц [317], а также реактивация 25% с подтверждением нейропротекторного эффекта терапии катионными липосомами, содержащими 2-ПАМ [318].

3.6. Разработка порфисом методом нековалентной модификации с использованием очищенных нефтяных порфиринов

В области разработки липосомальных наносистем для доставки лекарств порфирины представляют большой интерес для терапии опухолевых заболеваний в силу способности

генерировать активные формы кислорода под воздействием внешнего электромагнитного излучения и возможности применения для фотодинамической терапии. Включение порфиринов в состав наноконтейнеров является актуальной задачей, поскольку это может повышать эффективность терапии за счет обеспечения таргетности и биодоступности порфириновых фотосенсибилизаторов. В литературе известно множество синтетических производных липидов, содержащих в структуре производные порфина на месте одного из гидрофобных радикалов, однако возможность применения порфиринов, выделенных из нефти, для нековалентной модификации липосом ранее не была изучена. В диссертационной работе ряд демецаллированных 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 C₃₂-ДФЭП-представитель, называемых нефтяными порфиринами (НП), использовали для получения порфисом [260].

3.6.1. Оценка способности липосом инкапсулировать нефтяные порфирины

Для нековалентной модификации липосом гидрофобным компонентом – нефтяными порфиринами – необходимо добавить НП к органической фазе из липидов на стадии формирования тонкой плёнки, после чего её гидратировать. В качестве основной липосомальной композиции для данной работы был выбран состав ФХ/Хол (3:2). Для количественной оценки включения НП в состав липосом на первом этапе были проанализированы их спектры поглощения в видимой области и найдены молярные коэффициенты экстинкции для основных полос. Коэффициенты экстинкции самой интенсивной полосы поглощения Сорет (около 400 нм) и первой Q-полосы (около 500 нм) нефтяных порфиринов в водном буферном растворе HEPES (pH=7.4) и хлороформе представлены в таблице 3.12. В органических средах порфирин обладает значительно более интенсивным поглощением по полосе Сорет ($\epsilon > 185000$ л/моль·см), чем в буферной среде ($\epsilon = 58900$ л/моль·см). Это объясняется образованием H-агрегатов в водной среде [319]. При сравнении поглощения в видимой области, наблюдаемого для НП и синтетического 2,3,7,8,12,13,17,18-октаэтил-21H,23H-порфина, заметно, что оптические характеристики НП в высокой степени соответствуют коммерческому образцу (рис. 3.26,

а). Также наблюдали высокое соответствие спектра 1 мол.% НП в составе липосом 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 (рис. 3.26, б).

Таблица 3.12. Длина волны максимума поглощения и коэффициент экстинкции основных полос нефтяных порфиринов в различных растворителях, 25 °С.

| Растворитель | Сорет | | Q-полоса | |
|-------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | λ_{\max} , нм | ϵ , л/моль·см | λ_{\max} , нм | ϵ , л/моль·см |
| HEPES | 397 | 58900 ± 480 | 512 | 11760 ± 76 |
| EtOH | 397 | 185900 ± 1100 | 499 | 15700 ± 370 |
| CHCl ₃ | 401 | 187000 ± 6700 | 501 | 19170 ± 500 |

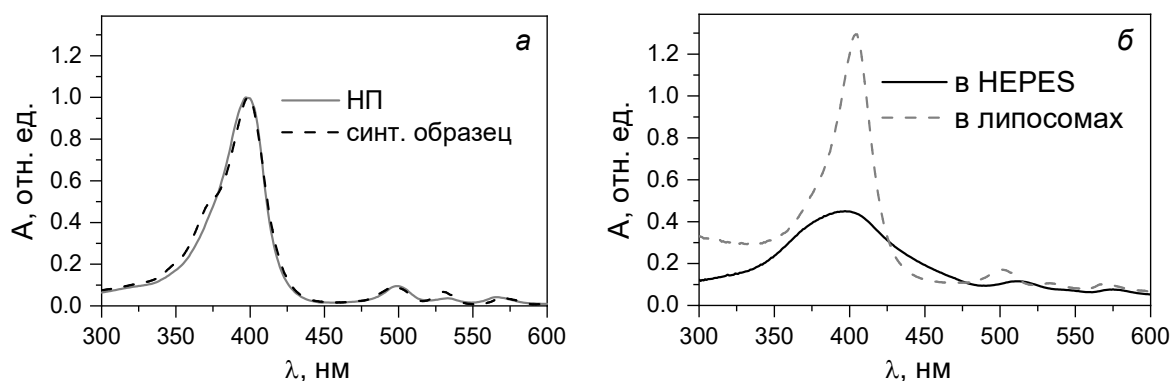


Рис. 3.26. Спектры поглощения порфиринов: а) сравнение выделенных нефтяных порфиринов (сплошная линия) с синтетическим 2,3,7,8,12,13,17,18-октаэтил-21Н,23Н-порфином (пунктир) в хлороформе; б) спектры нефтяных порфиринов в буфере HEPES в индивидуальном виде (сплошная линия) и в составе липосом ФХ/Хол (3:2) (пунктир), 1 мол.%, $l = 0.5$ см, 25 °С.

На следующей стадии работы проведена оценка эффективности встраивания и степени загрузки НП в липосомы. Для этого сформированы системы с различной мольной долей НП от 0.5 до 10 мол.%. Полученные системы охарактеризованы динамическим и электрофоретическим рассеянием света (рис. 3.27, табл. 3.13). Добавление НП в состав липидной мембраны вызывает пропорциональное понижение дзета-потенциала от -11 мВ

для липосом с 0.5 мол.% НП до -22.5 мВ в случае 10 мол.% НП. В то же время 10 мол.% НП приводит к повышению PdI до значений выше 0.2, что неоптимально для липосомальной системы доставки лекарств.

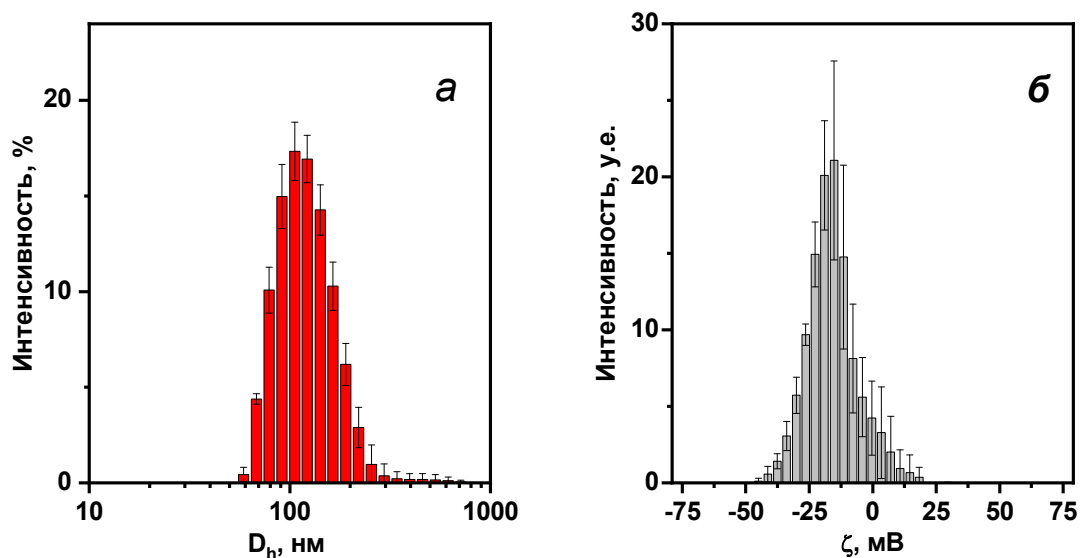


Рис. 3.27. Распределение гидродинамического диаметра частиц по интенсивности рассеянного сигнала (а) и распределение дзета-потенциала по количеству рассеянного сигнала (б) липосом с добавлением 1 мол.% нефтяных порфиринов, 25 °С.

Таблица 3.13. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ), эффективность инкапсуляции (встраивания) 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 |

Липосомы также были проанализированы на содержание НП методом спектрофотометрии (табл. 3.13). С увеличением загружаемой доли НП эффективность инкапсуляции понижается, и при загрузке 5 мол.% НП и больше менее половины

порфиринов детектировали в составе липосом. Поэтому для дальнейшей работы в качестве наиболее перспективной формуляции была выбрана система с 1 мол.% НП, реальное содержание НП в которой составляло 0.84 мол.%. Это значение ниже, чем значения многих гидрофобных субстратов, как, например, паклитаксел, для которого возможна загрузка до 3 мол.% [120]. Низкое значение инкапсулированной доли порфиринов может быть связано с плоской и жесткой структурой молекул НП, включающей алкильные заместители различной длины.

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 [260]. Аналогичные данные были получены в работе [198], где в липосомы встраивали производное хлорофилла и наблюдали понижение значения пересечения корреляционной функции с осью ординат при анализе образцов методом ДРС. Это свидетельствует о разрушении некоторой доли порфисом, что может быть востребовано для дистанционного высвобождения содержимого, инкапсулированного в частицы [260].

Таким образом, впервые была показана возможность создания порфисом, осуществленная путём нековалентной модификации липосом порфиринами, выделенными из нефти. Было показано, что включение НП в состав липидной мембраны пропорционально понижает дзета-потенциал образуемых частиц. Включение мольной доли НП более 2.3% (с учетом значения ζ) оказалось затруднительно, но даже для формуляций с меньшим содержанием порфиринов методом ДРС была продемонстрирована возможность дистанционной дестабилизации порфисом на основе НП путём обработки электромагнитным излучением.

3.6.2. Применение порфисом на основе нефтяных порфиринов для клеточной доставки доксорубина в клетки M-HeLa

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 (табл. 3.14).

Таблица 3.14. Эффективность инкапсуляции и загрузки DOX при различных концентрациях противоракового агента в порфисомы на основе нефтяных порфиринов, 25 °С.

| Состав липосом | DOX, мг/мл | ЕЕ(DOX), % | LC(DOX), % |
|------------------|------------|------------|------------|
| ФХ + Хол | 0.5 | 54 ± 7.5 | 7 ± 3 |
| ФХ + Хол + 1% НП | 0.5 | 23 ± 4 | 3.3 ± 1 |
| ФХ + Хол + 1% НП | 0.75 | 29 ± 1 | 7.1 ± 0.3 |
| ФХ + Хол + 1% НП | 1.0 | 30 ± 2.5 | 9.8 ± 0.8 |

Добавление 1 мол.% НП понижает эффективность инкапсуляции DOX при исходной концентрации 0.5 мг/мл с 54% для немодифицированных липосом до 23%. При повышении концентрации DOX в водной фазе при гидратации липидной плёнки можно увеличить значение ЕЕ, что показано на примере увеличения ЕЕ с 23% до 30% при повышении загружаемой концентрации DOX до 1 мг/мл. Одновременно с ЕЕ вырастает значение эффективности загрузки с 3.3% для образца, гидратируемого раствором DOX 0.5 мг/мл, до 9.8% при концентрации DOX 1.0 мг/мл. Однако прирост при переходе от 0.75 мг/мл DOX с 7.1% до 9.8% невелик, более того, значение ЕЕ наблюдаемое на уровне 29-30%, не растёт при дальнейшем повышении концентрации DOX. В соответствии с этими результатами в качестве оптимальной была выбрана композиция с 0.75 мг/мл препарата (табл. 3.14), которую протестировали на цитотоксичность на клетках опухоли шейки матки М-HeLa и здоровых клетках печени человека Chang Liver (табл. 3.15).

Показано, что не содержащие DOX порфисомы на основе НП отличаются низкой токсичностью по отношению к раковым и здоровым клеткам и не демонстрируют селективного действия. После загрузки DOX в порфисомы наблюдается усиление токсичности систем в 35-55 раз по отношению к клеткам М-HeLa, и в 10-14 раз – по отношению к здоровым клеткам Chang Liver. Анализ данных по цитотоксичности показал, что все системы обладают селективным цитотоксическим действием на раковые клетки (табл. 3.15). 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.

Таблица 3.15. Цитотоксичность липосомальных формуляций с нефтяными порфиринами и DOX (0.75 мг/мл) по отношению к раковым клеткам M-HeLa и здоровым клеткам Chang Liver.

| Состав системы | M-HeLa IC ₅₀ | | Chang liver IC ₅₀ | |
|-----------------------------|-------------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| | (ФХ), мкМ | (DOX), мкг/мл | (ФХ), мкМ | (DOX), мкг/мл |
| ФХ/Хол/НП (3:2:0.05) | 179 ± 8.9 | - | 180 ± 9 | - |
| ФХ/Хол (3:2) + DOX | 4.00 ± 0.20 | 1.00 ± 0.05 | 17.1 ± 0.86 | 4.28 ± 0.21 |
| ФХ/Хол/НП (3:2:0.025) + DOX | 4.36 ± 0.22 | 1.09 ± 0.05 | 18.9 ± 0.95 | 4.73 ± 0.24 |
| ФХ/Хол/НП (3:2:0.05) + DOX | 3.44 ± 0.17 | 0.86 ± 0.04 | 16.2 ± 0.81 | 4.06 ± 0.2 |
| ФХ/Хол/НП (3:2:0.1) + DOX | 2.84 ± 0.14 | 0.71 ± 0.04 | 15.5 ± 0.77 | 3.87 ± 0.19 |

Формуляция с 1% НП на 14% токсичнее, чем контрольный образец липосом без порфирина, а композиция на основе 2% НП дополнительно понизила IC₅₀ на 30% (табл. 3.15). Самый низкий индекс полидисперсности (PdI = 0.083) наблюдается для образцов с 1 мол.% НП, что позволяет рекомендовать эту композицию как наиболее перспективную при дальнейшей разработке порфисом на основе НП.

Использование нефтяных порфиринов для получения порфисом путем их нековалентной иммобилизации в липидном бислое является перспективным методом, представляющим альтернативу ковалентной модификации липидов с помощью производных порфиринов. Показано, что очищенные нефтяные порфирины представлены рядом гомологов ДФЭП, диДФЭП и этиопроизводных с максимальным содержанием С₃₂-ДФЭП со средней молекулярной массой 500.6 г/моль. Установлена высокая цитотоксичность содержащих DOX порфисом по отношению к клеткам рака шейки матки M-HeLa, а также значительная селективность к ним по сравнению со здоровыми клетками Chang Liver. Наноконтейнеры с нефтяными порфиринами сами по себе не обладают высокой цитотоксичностью, для них также показана возможность дистанционного разрушения при помощи электромагнитного лазерного излучения с длиной волны в 405 нм.

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

По сравнению с липосомами керасомы гораздо менее изучены как наноконтейнеры для доставки лекарств, и, согласно проведенному литературному обзору, на сегодняшний день опубликована только одна работа, в которой эти частицы используются для доставки лекарств в мозг [320]. В статье представлены керасомы, модифицированные неионным ПАВ Твин 80 с включением куркумина, которые изучали в качестве системы доставки лекарств в мозг мышей с помощью направленного ультразвукового разрушения микропузырьков для открытия ГЭБ. Керасомы обладают огромным потенциалом благодаря своей способности образовывать ковалентные связи на поверхности агрегатов, обуславливающие их непревзойденную морфологическую стабильность, поэтому исследование их перспективности в качестве системы доставки лекарств представляет научный интерес.

В диссертационной работе керасомы различного состава были получены двумя методами с последующей оценкой их физико-химических свойств с помощью динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии. Полученные частицы с оптимальными показателями загружены противораковым препаратом паклитакселом и протестированы на предмет биосовместимости, а также проанализированы в качестве системы доставки лекарств в клетки глиобластомы T98G *in vitro*, показана их способность преодолевать ГЭБ и проникать в мозг крыс *in vivo*.

3.7.1. Создание и физико-химический анализ керасом, полученных методом инъекции, варьирование условий приготовления

В литературе прибегают к двум основным методам получения керасом: метод инъекции и метод гидратации плёнки, оба из которых были протестированы для получения керасом в данной работе.

Метод инъекции заключается в предварительном растворении керасообразующего липида CFL16 в этаноле с добавлением 1 мМ соляной кислоты для проведения контролируемого гидролиза этоксисилильных групп и последующей дозировки полученного раствора в воду при перемешивании. Сферические частицы везикулярной структуры образуются мгновенно, после чего необходимо инкубировать

раствор в течение суток для завершения гидролиза и ковалентного связывания липидных головных групп в составе агрегатов.

Методом инъекции и последующей экструзии получены агрегаты с гидродинамическим диаметром около 210 нм, PdI в диапазоне 0.1–0.15, с дзета-потенциалом -45 мВ (табл. 3.16). Поскольку способность керасомообразующих липидов к самоорганизации в везикулы в воде очень сильно зависит от степени гидролиза триэтоксисилильной группы, кинетику гидролиза CFL16 в этаноле в присутствии 1 мМ HCl исследовали методом масс-спектрометрии. Установлено, что в растворе с концентрацией 1 мг/мл CFL16 подвергается полному гидролизу за 30 мин, а порядок реакции гидролиза, определенный по методу Вант-Гоффа, равен 0.51 (рис. 3.28).

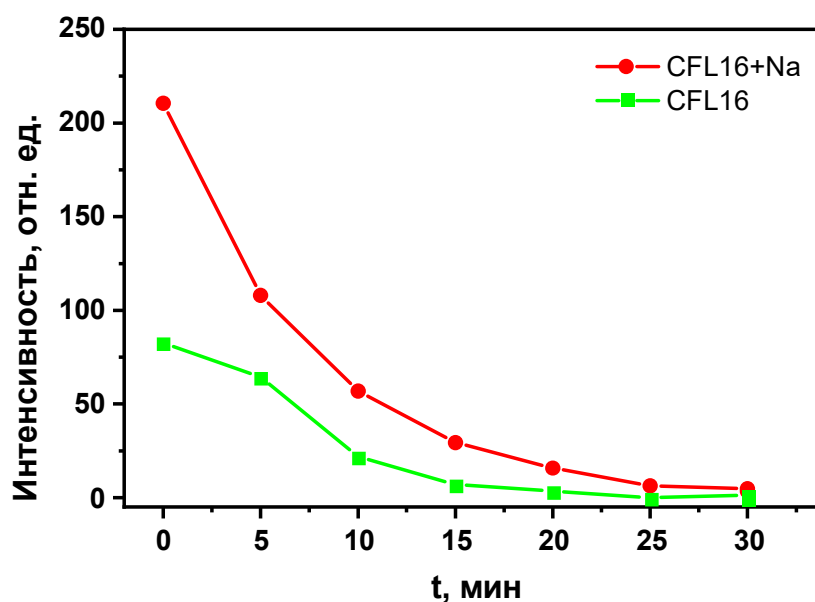


Рисунок 3.28. Изменение интенсивности сигнала негидролизованного CFL16 и его натриевой соли в этаноле с 1 мМ HCl, 25 °С, с течением времени.

Для более концентрированных растворов (25–100 мМ), используемых для получения керасом, требуется гидролиз в течение не менее 24 ч для воспроизводимого получения хороших дисперсий (табл. 3.16). С целью формирования температурно-чувствительных керасом смешанные агрегаты из CFL16 и липида ДПФХ с молярным составом 1:1 получали также путем инъекции. Для получения образцов с низкой полидисперсностью необходимо производить инъекцию при температуре выше температуры фазового перехода ДПФХ (табл. 3.16).

Таблица 3.16. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) керасом на основе CFL16 и гибридных керасом ДПФХ-CFL16 (1:1), полученных методом инъекций, при различной температуре и времени предварительного гидролиза.

| Образец | T, °C | T _{гидролиза} , ч | D_h , нм | PdI | ζ , мВ |
|------------------|-------|----------------------------|------------|-------|--------------|
| CFL16 | 25 | 24 | 212 | 0.128 | -45 |
| CFL16/ДПФХ (1:1) | 25 | 2 | 362 | 0.445 | -31 |
| CFL16/ДПФХ (1:1) | 25 | 24 | 593 | 0.437 | -23 |
| CFL16/ДПФХ (1:1) | 42 | 24 | 237 | 0.227 | -14 |

Изображения, полученные с помощью ПЭМ, подтвердили, что керасомы, приготовленные методом инъекции, имеют диаметр в пределах 200–250 нм и четкую везикулярную структуру с видимыми полостями (рис. 3.29).

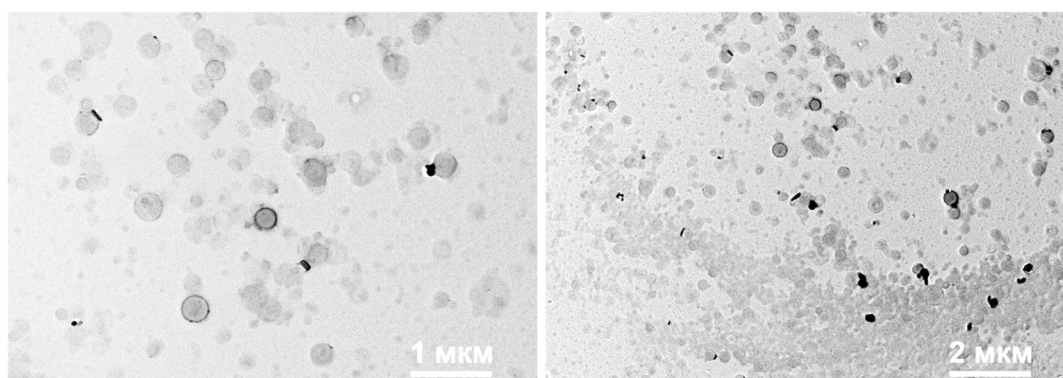


Рисунок 3.29. Изображения ПЭМ с образцами керасом состава CFL16, полученными методом инъекции.

Таким образом, методом инъекции получены керасомы состава CFL16 и CFL16/ДПФХ в разных соотношениях. Однако полученные частицы обладали диаметром порядка 200–300 нм, что неоптимально для систем доставки лекарств [321]. Гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности, дзета-потенциал получаемых наночастиц зависят от правильного подбора условий получения наночастиц. Показано, что оптимальное время гидролиза липида в подкисленном этаноле должно быть не менее 24 ч, а температура раствора, в который производится дозирование органической фазы, должна быть выше температуры фазового перехода составляющих липидной мембраны. Загрузка лекарственных препаратов гидрофильной природы в керасомы, полученные

методом инъекции, не приводит к достижению значений ζ выше 5%, а загрузка гидрофобных субстратов происходит неполноценно, поскольку при приготовлении частиц наблюдали появление осадка.

3.7.2. Создание и физико-химический анализ керасом, полученных методом гидратации тонкой плёнки, варьирование состава и анализ морфологической стабильности

Вторым основным методом получения керасом является традиционный для обычных липосом метод гидратации тонкой плёнки. В случае работы с керасомообразующими липидами процесс усложняется процессом предварительного гидролиза. Эта особенность приводит к необходимости использовать растворы с $\text{pH} = 3$ при гидратации плёнки, что накладывает ограничения на растворимость некоторых видов загружаемых гидрофильных субстратов.

На первом этапе работы тонкие плёнки из CFL16 гидратировали подкисленной водой с $\text{pH} = 3$. Этот метод давал нестабильные результаты: некоторые образцы были получены в соответствии с литературными протоколами, другие системы получить не удалось. Добавление неионогенного ПАВ Твин 80 в керасомы в количестве 10 мол.% сделало процесс подготовки более надежным и воспроизводимым. Поэтому среди приготовленных керасом, которые использовали в дальнейшем в этой части диссертации, все образцы содержали дополнительно 10 мол.% Твин 80 от общей концентрации липидов. Керасомы, образованные из CFL16, как правило, имеют диаметр в пределах 300–400 нм со значениями PdI около 0.3–0.4. Сразу после приготовления дзета-потенциал всех образцов положительный, что связано с тем, что частицы образуются в слабокислом растворе с $\text{pH} = 3$. Однако при разбавлении образцов буферным раствором HEPES с $\text{pH} = 7.4$ дзета-потенциал всех образцов смещается до значений -10 – -20 мВ (табл. 3.17).

Добавление ФХ к CFL16 в липидной пленке приводило к образованию более мелких частиц с гидродинамическим диаметром 100–250 нм и более низкими значениями PdI 0.2–0.35. Добавление ФХ к липидной смеси приводит к уменьшению гидродинамического диаметра с 333 нм для керасом из 100% CFL16 до 89 нм в случае липосом 100% ФХ. ФХ приближает дзета-потенциал частиц к нейтральному: дзета-потенциал увеличивается от -20 мВ (для чистых керасом) до -7.0 мВ (для чистых липосом из PC). Добавление 1/35

мольной доли катионного ПАВ 14-6-14(Et) достаточно, чтобы повысить дзета-потенциал до +40.7 мВ (табл. 3.17).

Таблица 3.17. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) керасом на основе индивидуального CFL16 и гибридных керасом с разной долей ФХ и с модификацией дикатионным ПАВ 14-6-14(Et), полученных путем гидратации тонкой пленки с различным составом липидов в буферном растворе (pH = 7.4).

| Состав образца | D_h , нм | PdI | ζ , мВ |
|----------------------------------|------------|-------|--------------|
| CFL16 | 333 ± 20 | 0.300 | -20 ± 0.3 |
| CFL16/ФХ (90:10) | 252 ± 16 | 0.263 | +16.1 ± 0.7* |
| CFL16/ФХ (80:20) | 216 ± 8 | 0.275 | -15.6 ± 0.2 |
| CFL16/ФХ (70:30) | 203 ± 2 | 0.259 | -14.6 ± 0.4 |
| CFL16/ФХ (60:40) | 191 ± 8 | 0.265 | -13.1 ± 0.2 |
| CFL16/ФХ (50:50) | 153 ± 1 | 0.262 | -12.2 ± 0.1 |
| CFL16/ФХ (25:75) | 88 ± 3 | 0.245 | -7.6 ± 0.4 |
| ФХ | 89 ± 8 | 0.268 | -7.0 ± 0.5 |
| CFL16/ФХ/14-6-14(Et) (1:1:0.057) | 161 ± 8 | 0.268 | +40.7 ± 0.8 |

* – образец анализировали при pH = 3.

Анализ керасом с применением ПЭМ, сформированных методом гидратации тонкой плёнки, показывает образование частиц, обладающих высокой сферичностью, со значениями диаметра 20–200 нм (рис. 3.30). Однако полученные частицы не напоминают везикулярные структуры, не имеют полого пространства внутри, а это означает, что образующиеся этим методом керасомы либо представляют собой многослойные везикулы, либо являются твердыми липидными наночастицами.

Для демонстрации стабильности керасом использовали тест с применением ПАВ Тритон X-100 для разрушения наночастиц, при этом их гидродинамические диаметры и точки пересечения коррелограмм, полученные методом ДРС, контролировали исходно, через 1 ч и 24 ч инкубации с 5-кратным избытком ПАВ (табл. 3.18). Через 1 ч инкубации наблюдаемый диаметр существенно не изменился (в пределах 50 нм от исходного), а образцы, содержащие 75% и 100% ФХ, продемонстрировали наиболее значительное увеличение размера.

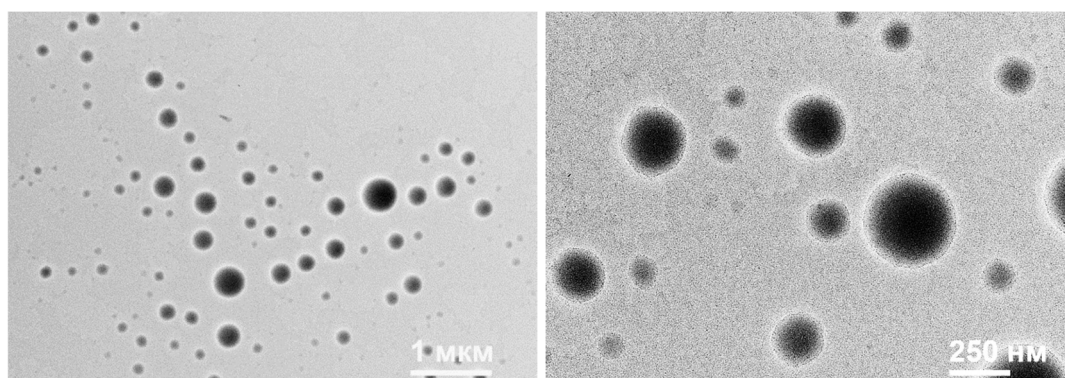


Рисунок 3.30. Изображения ПЭМ образцов керасом состава CFL16/ФХ (1:1), полученных методом гидратации плёнки.

Таблица 3.18. Гидродинамический диаметр (D_h) и точки пересечения коррелограмм, полученные методом ДРС для гибридных керасом CFL16/ФХ (1:1) исходно, через 1 ч и через 24 ч инкубации с 5-кратным избытком ПАВ Triton X-100, 25 °С.

| Состав образца | D_h , нм | | | Пересечение коррелограммы | | |
|------------------|------------|-----|-------|---------------------------|-------|-------|
| | Исходное | 1 ч | 24 ч | Исходное | 1 ч | 24 ч |
| CFL16/ФХ (80:20) | 216 | 188 | 258 | 0.741 | 0.743 | 0.519 |
| CFL16/ФХ (70:30) | 203 | 184 | 222 | 0.750 | 0.763 | 0.370 |
| CFL16/ФХ (60:40) | 191 | 144 | 184 | 0.706 | 0.778 | 0.490 |
| CFL16/ФХ (50:50) | 153 | 117 | 129 | 0.789 | 0.793 | 0.719 |
| CFL16/ФХ (25:75) | 88 | 102 | 190 | 0.739 | 0.537 | 0.158 |
| ФХ | 89 | 73 | 52212 | 0.664 | 0.492 | 0.189 |

Для образца 100% CFL16 не удалось получить значимый результат при анализе методом ДРС через 24 ч инкубации, что говорит о невозможности прибора детектировать частицы, то есть об их разложении. Кроме того, высота точки пересечения коррелограммы с осью ординат является мерой качества анализа с использованием ДРС, оптимальные значения ближе к 1.0, а значения выше 0.7, как правило, обозначают достоверные результаты. В случае наночастиц, образованных с 75% ФХ и 100% ФХ, значение пересечения является самым низким после 24 ч инкубации, что указывает на то, что наночастицы, детектируемые методом ДРС, более не присутствуют в значительном количестве. При этом наиболее качественные результаты после инкубации с ПАВ

наблюдаются для образца CFL16/ФХ (1:1), что позволило выдвинуть данный состав в качестве оптимального для дальнейших опытов.

Дополнительный анализ различных образцов гибридных керасом методом ДРС показал, что увеличение доли ФХ в липидной смеси приводит к уменьшению диаметра (табл. 3.17). Количественный анализ изображений, полученных методом ПЭМ, показал наличие большого количества частиц с диаметрами меньше и больше диаметра 150 нм, наблюдаемых при динамическом светорассеянии. Согласно анализу данных ПЭМ (распределение показано на рис. 3.31), также присутствовало значительное количество частиц диаметром 20–100 нм и 200–400 нм, что соответствует относительно высокой полидисперсности около 0.25.

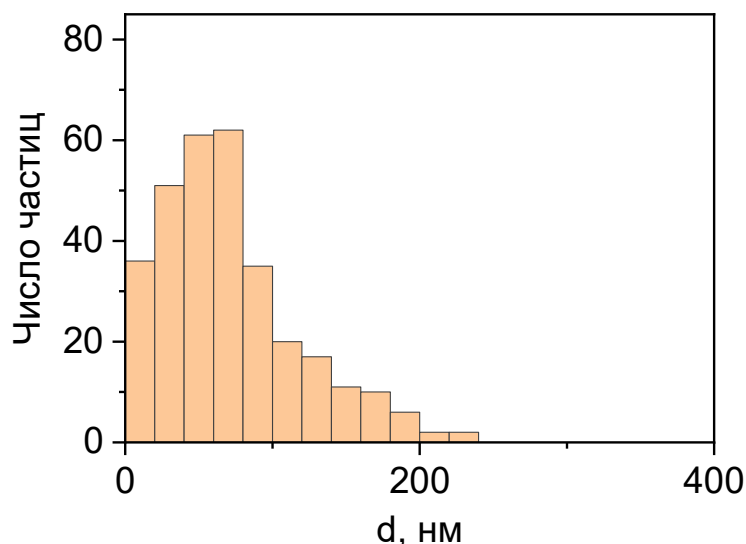


Рисунок 3.31. Распределение частиц гибридных керасом состава CFL16/ФХ (1:1) по диаметру в нм, полученное в результате анализа изображений ПЭМ.

3.7.3. Проверка биосовместимости и доставка противоракового агента паклитаксела в клетки глиобластомы T98G с помощью керасом

Ключевым свойством, необходимым для формуляции противораковых препаратов, является способность ингибировать жизнедеятельность раковых клеток, поэтому на данном этапе работы проводили исследования с помощью МТТ-теста на цитотоксичность по отношению к клеткам глиобластомы T98G (табл. 3.19).

Прежде всего были протестированы пустые керасомы с добавлением ПАВ 14-6-14(Et) и без, и было обнаружено, что ни один из образцов не проявлял полного

ингибирования жизнедеятельности клеток при максимальной протестированной концентрации 1 мМ. Это свидетельствует об отсутствии собственного ярко выраженного токсического действия у наночастиц. В частности, образцы керасом, не содержащие РТХ, на два порядка менее токсичны, чем соответствующие образцы с РТХ. Кроме того, было показано, что IC_{50} РТХ в составе керасом в 22–37 раз ниже, чем у свободного препарата, значит, инкапсуляция в керасомы повышает токсичность по отношению к клеткам Т98G (табл. 3.19).

Таблица 3.19. 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} (CFL), 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

Анализ индукции апоптоза выявил процентное содержание апоптотических и мертвых клеток глиомы Т98G после инкубации со свободным РТХ, керасомами и керасомами с РТХ (рис. 3.32). РТХ сам по себе индуцирует апоптотические процессы, и то же самое наблюдается для керасом, содержащих РТХ, но с большей долей, возрастающей с 8.92% до 11.99% за 4 ч инкубации для керасом состава CFL16/ФХ (1:1). Инкапсуляция РТХ в керасомы позволила повысить долю апоптотических клеток с 12.41% до 15.56% (в случае керасом без добавления ПАВ) и до 13.78% (керасомы с добавлением ПАВ 14-6-14(Et)). Это подтверждает, что наночастицы способны усиливать проапоптотическое действие РТХ.

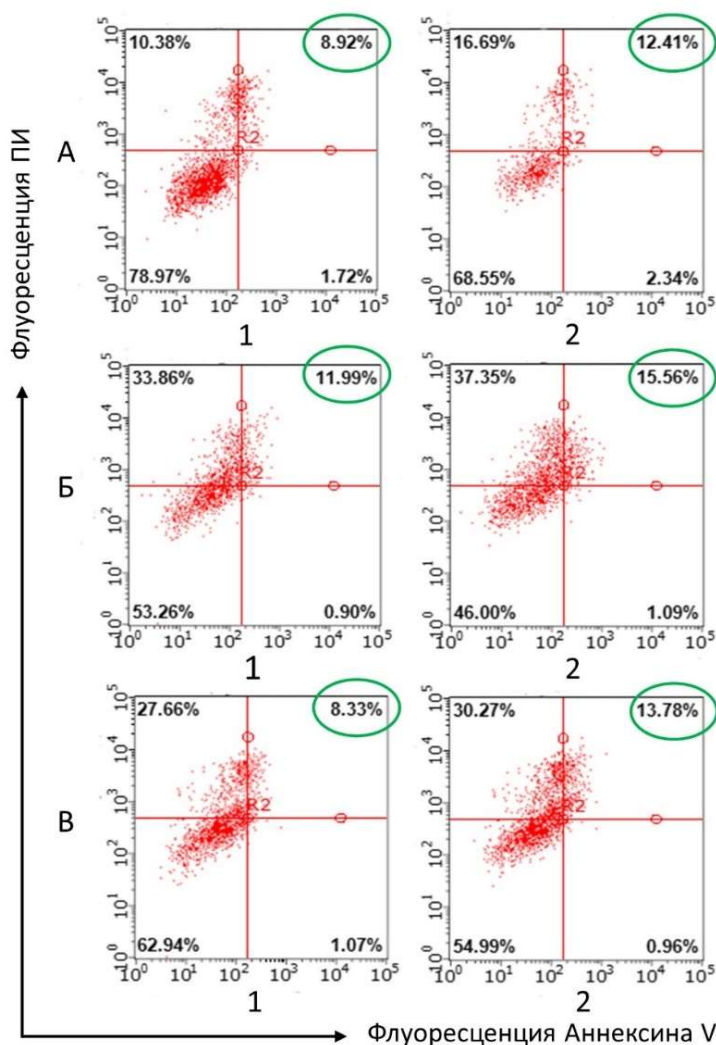


Рисунок 3.32. Индукция апоптоза, оцененная с помощью проточной цитометрии с использованием протокола окрашивания пропидия иодидом (ПИ) и аннексином V. Состав наночастиц: (А) паклитаксел; (Б) CFL16/ФХ/Твин 80/РТХ (1:1:0.2:0.08); (В) CFL16/ФХ/Твин 80/14-6-14(Et)/РТХ (1:1:0.2:0.057:0.08). Образцы разбавляли и тестировали при 0.1 мМ CFL16 (столбец 1) и 0.2 мМ CFL16 (столбец 2) или 4 мкМ и 8 мкМ РТХ соответственно.

Цитотоксичность не содержащих РТХ керасом как анионной, так и катионной (с ПАВ 14-6-14(Et)) природы наблюдали в области значений $IC_{50} \approx 0.5$ мМ общей концентрации липидов (ФХ + CFL16), что значительно ниже, чем для содержащих РТХ керасом. Важно отметить, что инкапсуляция РТХ в керасомы резко увеличивает 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 показывает ценность его инкапсуляции в наночастицы. Анализ клеточного апоптоза также выявляет немного более высокую степень апоптоза для керасом, содержащих РТХ, чем для свободного РТХ.

Все образцы тестировали на гемолитическую активность при суммарных концентрациях 0.5 мМ и менее для наночастиц и до 0.1 мМ и менее для некапсулированного РТХ. Все образцы показали гемолиз менее 50% при концентрации 0.5 мМ, наиболее гемотоксичным был образец керасом с инкапсулированным РТХ без катионного ПАВ 14-6-14(Et), показывающий 12.5% гемолиза при концентрации 0.5 мМ. Значительно меньший гемолиз наблюдали для катионной керасомальной композиции с ПАВ 14-6-14(Et), который составил 7.7% при общей концентрации 0.5 мМ. (табл. 3.20).

Таблица 3.20. Гемолиз, вызванный керасомами различного состава и самим паклитакселом (РТХ)*

| Образец | Концентрация ФХ, мкМ | Гемолиз, % | HC_{50} , мкМ по ФХ |
|--|-------------------------|---------------|--------------------------|
| CFL16/ФХ (1:1) | 500 | 8.7 | >500 |
| | 250 | 3.9 | |
| | 125 | 0 | |
| CFL16/ФХ/14-6-14(Et) (1:1:0.057) | 500 | 7.2 | >500 |
| | 250 | 2.7 | |
| | 125 | 0 | |
| CFL16/ФХ/РТХ (1:1: 0.08) | 500 | 12.5 | >500 |
| | 250 | 6.3 | |
| | 125 | 0 | |
| CFL16/ФХ/14-6-14(Et)/РТХ (1:1:0.057:0.08) | 500 | 7.7 | >500 |
| | 250 | 2.8 | |
| | 125 | 1.6 | |

* – гемолитическая активность РТХ: 11.5% при 100 мкМ, 5.8% при 50 мкМ и 0% при 25 мкМ.

Проточную цитометрию использовали для оценки клеточного поглощения керасом в отсутствие и присутствии РТХ, модифицированных неионным ПАВ Твин 80 и катионным ПАВ 14-6-14(Et) (рис. 3.33). Добавление 10 мол.% Твин 80 повлекло усиление поглощения на 13% при инкубации в течение 6 ч, которое возросло до 35% через 24 ч. Керасомы загрузили кумарином 6 в количестве 1/150 от общей концентрации липидов в качестве флуоресцентной метки. Для образцов без РТХ добавление 14-6-14(Et) увеличивает поглощение примерно на 23% через 6 ч, и эта разница снижается всего до 11% через 24 ч инкубации. Образцы, содержащие РТХ с ПАВ 14-6-14(Et) и без него, существенно не отличаются друг от друга, но их поглощение выше, чем у образцов без РТХ. Наибольшую разницу в 32% наблюдали между керасомами CFL16/ФХ (1:1) без РТХ и CFL16/ФХ/14-6-14(Et)/РТХ (1:1:0.057:0.08) через 6 ч инкубации. Поглощение через 24 ч в среднем в 5.1 раза выше, чем через 6 ч.

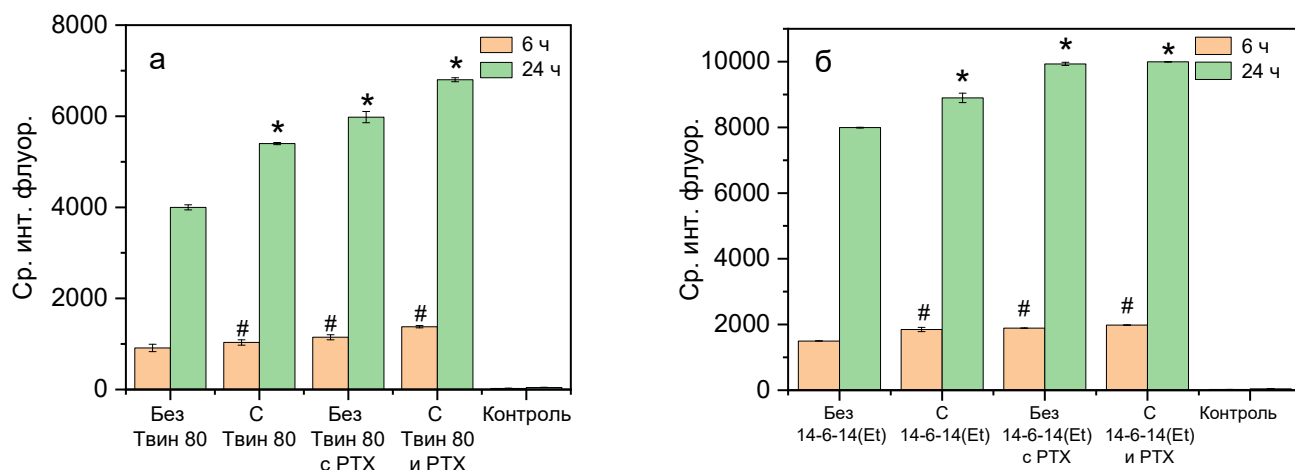


Рисунок 3.33. Клеточное поглощение керасом с РТХ и без него, оцененное с помощью проточной цитометрии через 6 и 24 ч инкубации: (а) сравнение образцов с добавлением 10 мол.% Твин 80 и без ПАВ, (б) сравнение образцов с добавлением 2.86 мол.% 14-6-14(Et) и без ПАВ. Все образцы керасом основаны на композиции CFL16/ФХ (1:1). *,# – $p < 0.01$ через 6 и 24 ч соответственно по сравнению с образцом без ПАВ (Твин 80 для (а) или 14-6-14(Et) для (б)).

Более интенсивное клеточное поглощение также наблюдается для керасом, содержащих РТХ, что может быть объяснено повышенной проницаемостью клеточной мембраны, вызванной токсичностью РТХ. Дикатионное геминальное ПАВ 14-6-14(Et)

ранее в настоящей работе использовали для усиления клеточного поглощения липосом раковыми клетками РС-3, где наблюдали корреляцию между дзета-потенциалом наночастиц и их поглощением клетками [107]. Однако в случае керасом положительный заряд не повлиял существенно на цитотоксичность и клеточное поглощение.

Для изучения поглощения и апоптотических эффектов, вызываемых тестируемыми системами внутри клеток глиобластомы человека (T98G), также использовали флуоресцентную микроскопию через 2, 6 и 24 ч инкубации (рис. 3.34). Ядра окрашивали интеркалирующим ДНК красителем ДАПИ (синяя флуоресценция). Кумарин 6 (зеленая флуоресценция) использовали в качестве флуоресцентного зонда для отслеживания наночастиц. Исследования проводили при концентрациях, соответствующих значениям IC_{50} тестируемых систем. Зеленая флуоресценция, присутствующая в цитоплазматических областях клеток, свидетельствует об эффективном поглощении наночастиц клетками на всех этапах эксперимента. Примечательно, что в большинстве случаев наблюдаются локализованные пузырьки зеленой флуоресценции, что может свидетельствовать о локализации наночастиц в эндосомальных и лизосомальных полостях. После инкубации в течение 2 ч исследуемых объектов для систем со свободным РТХ и CFL/ФХ/Твин 80/РТХ/Кумарин 6 (1:1:0.2:0.08:0.013) наблюдали апоптотические эффекты, характерные для ранней стадии апоптоза. На ранних стадиях апоптоза 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/Кумарин 6 (1:1:0.2:0.057/0.08:0.013), апоптотические эффекты стали более заметны, 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 T98G 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 (три нижних кадра в третьем ряду рисунка 3.34). Проявление признаков апоптоза, детектированное методом флуоресцентной микроскопии, является подтверждением высвобождения РТХ из керасом.

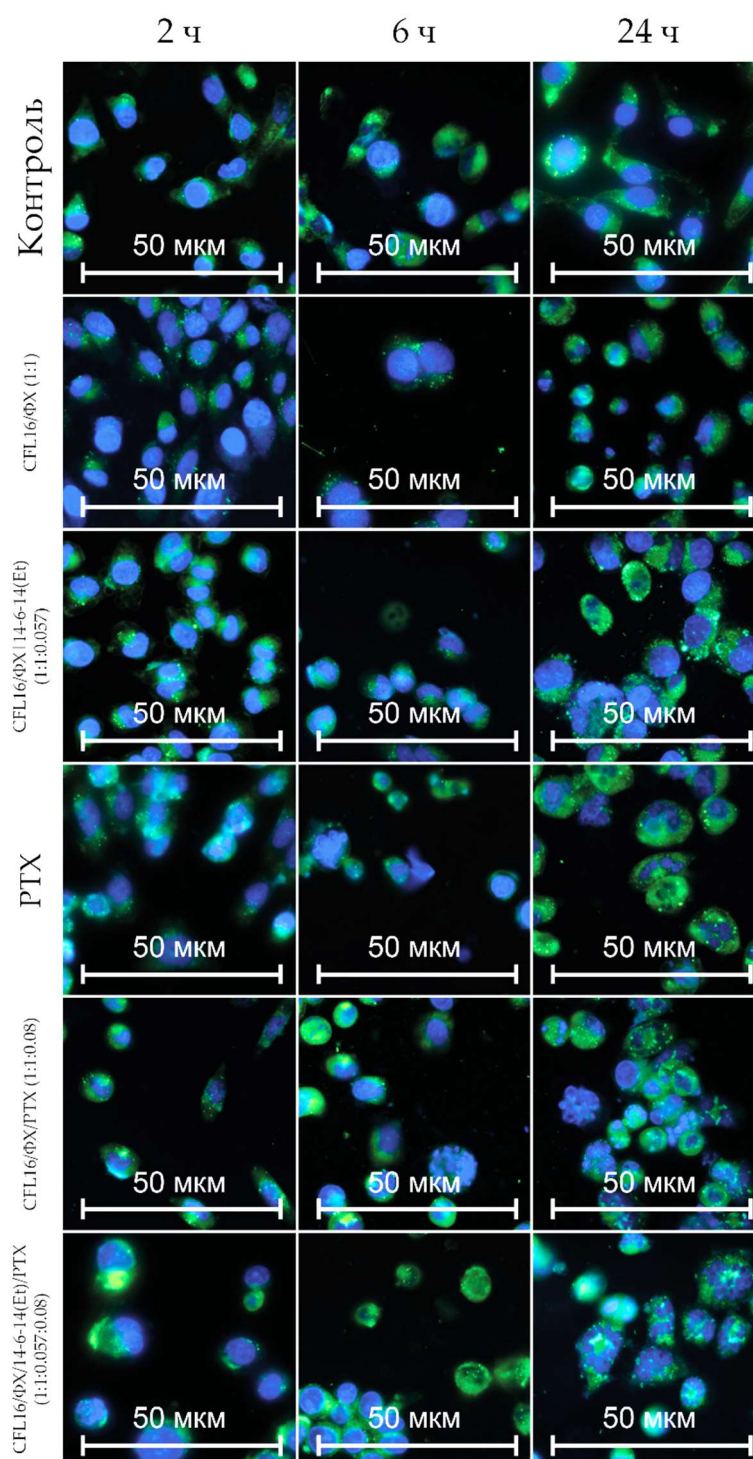


Рисунок 3.34. Интернализация керасом с добавлением 1/150 кумарина 6 и индукция апоптоза в клетках T98G через 2, 6 и 24 ч после инкубации, зарегистрированная методом флуоресцентной микроскопии. Зеленый канал – кумарин 6, синий канал – ДАПИ.

Введение керасом, меченных родамином Б, продемонстрировало способность керасом проникать через ГЭБ. Изображения конфокальной микроскопии срезов

головного мозга крыс показывают практически незаметную зеленую флуоресценцию родамина Б в случае инъекции свободного красителя. При этом для образцов керасом CFL16/ФХ (1:1) и CFL16/ФХ/Твин 80 (1:1:0.2) наблюдаются яркие зеленые пятна, указывающие на проникновение наночастиц, в мозг (рис. 3.35).

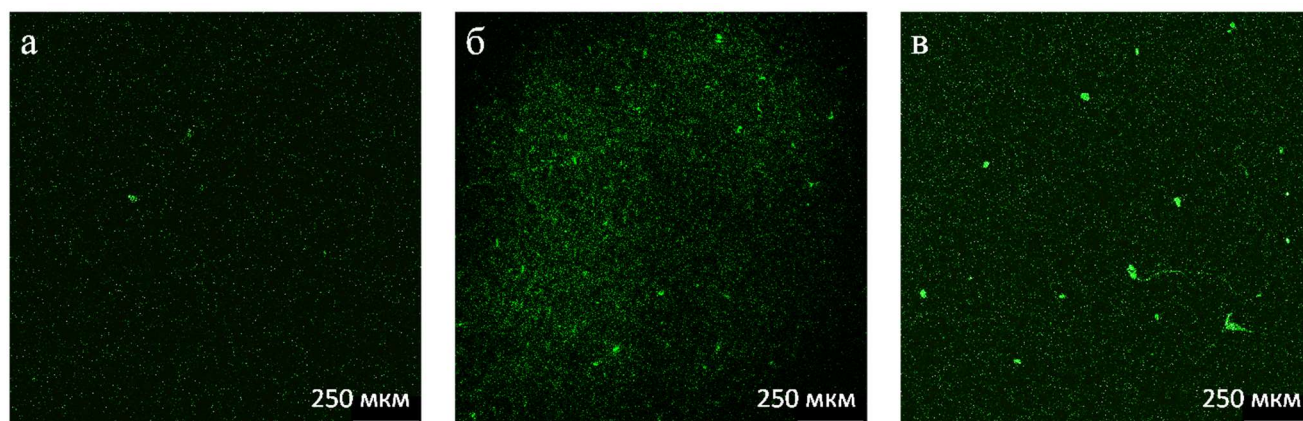


Рисунок 3.35. Срезы головного мозга крысы после введения свободного родамина Б (а), после введения керасом, меченных родамином Б, состава CFL16/ФХ (1:1) (б) и состава CFL16/ФХ/Твин 80 (1:1:0.2) (в).

Известно, что головные группы Твин 80 аффинны к аполипопротеину Е, присутствующему в крови, который и придаёт наночастицам способность к преодолению ГЭБ [322]. Этот подход также был успешно использован при разработке керасом для терапии болезни Паркинсона с помощью керасом [320], а также соответствует современному уровню развития наномедицины, учитывающей условия *in vivo* опсонизации для доставки лекарств [253].

Таким образом, керасомы были оценены как наноконтейнеры для лечения глиомы. Во-первых, керасомы, приготовленные двумя различными методами (инъекция и гидратация в тонкой пленке), сравнивали по параметрам размера и морфологии. Частицы, полученные методом гидратации плёнки, более перспективны, поскольку они более однородны, как видно из изображений ПЭМ, и способны инкапсулировать РТХ без образования осадка. Во-вторых, использование гибридных керасом CFL16/ФХ (1:1) позволило усилить цитотоксичность РТХ по отношению к клеточной линии глиобластомы Т98G в 36 раз, что делает их эффективными наноконтейнерами для лечения глиомы. Наконец, способность керасом, меченных родамином Б, проникать в мозг была подтверждена *in vivo* с помощью конфокальной микроскопии срезов ткани

головного мозга крыс. В целом, керасомы могут быть успешно применены для доставки РТХ через ГЭБ подобно обычным липосомам, но также обладают бесценным свойством исключительной морфологической стабильности, что делает их многообещающими кандидатами для лечения глиомы и разработки новых систем доставки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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} -GGGHK-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 РС-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 – пралидоксим 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 основе 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.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

16-s-16(OH) – гидроксиэтилированные поверхностно-активные вещества N,N'-дигексадецил-N,N'-диметил-N,N'-бис(2-(гидрокси)этил)алкан- α,ω -диаммоний дибромиды

CFL16 – керасомообразующий липид N-[N-(3-триэтоксисилил)пропилсукцинам-моил]дигексадециламин

C_nSU – изотиурониевые поверхностно-активные вещества 2-алкилизотиуроний бромиды

DOX – доксорубицина гидрохлорид

EE – эффективность инкапсуляции

LC – степень загрузки

M-HeLa – клетки аденокарциномы шейки матки

n-6-n(Et) – карбаматсодержащие поверхностно-активные вещества N,N'-диалкил-N,N'-диметил-N,N'-бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)гексан- α,ω -диаммоний дибромиды

OOT – Оранж OT

PC-3 – клетки рака простаты

PTX – паклитаксел

WI-38 – клетки здорового легкого человека

АХЭ – ацетилхолинэстераза

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин

ДРС – динамическое рассеяние света

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТАБ – додецилтриметиламмония бромид

ИЭР – ионизация электрораспылением

МБК – минимальная бактерицидная концентрация

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид

МФК – минимальная фунгицидная концентрация

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

РНК – рибонуклеиновая кислота

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФОС – фосфорорганические соединения

ФХ – фосфатидилхолин

Хол – холестерин

ЦТАБ – гексадецилтриметиламмония бромид

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farokhzad O.C. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery / O.C. Farokhzad, R. Langer // ACS Nano. – 2009. – V. 3. – № 1. – P. 16-20.
2. Shi J. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications / J. Shi, A.R. Votruba, O.C. Farokhzad, R. Langer // Nano Lett. – 2010. – V. 10. – № 9. – P. 3223-3230.
3. Park K. Facing the Truth about Nanotechnology in Drug Delivery / K. Park // ACS Nano. – 2013. – V. 7. – № 9. – P. 7442-7447.
4. 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 // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21. – № 18. – P. 6961.
5. 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 // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – V. 22. – № 13. – P. 7055.
6. Damen M. Transfection by cationic gemini lipids and surfactants / M. Damen, A.J.J. Groenen, S.F.M. Van Dongen, R.J.M. Nolte, B.J. Scholte, M.C. Feiters // MedChemComm. – 2018. – V. 9. – № 9. – P. 1404-1425.
7. Zakharova L.Y. Cationic surfactants: Self-assembly, structure-activity correlation and their biological applications / L.Y. Zakharova, T.N. Pashirova, S. Doktorovova, A.R. Fernandes, E. Sanchez-Lopez, A.M. Silva, S.B. Souto, E.B. Souto // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – V. 20. – № 22. – P. 5534.
8. Zhang N. A review of the surface features and properties, surfactant adsorption and floatability of four key minerals of diasporic bauxite resources / N. Zhang, A. V. Nguyen, C. Zhou // Adv. Colloid Interface Sci. – 2018. – V. 254. – P. 56-75.
9. Lokanathan M. Comparing electrowettability and surfactants as tools for wettability enhancement on a hydrophobic surface / M. Lokanathan, H. Sharma, M. Shabaka, K. Mohanty, V. Bahadur // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. – 2020. – V. 585. – P. 124155.

10. Liu S. Wettability modification and restraint of moisture re-adsorption of lignite using cationic gemini surfactant / S. Liu, X. Liu, Z. Guo, Y. Liu, J. Guo, S. Zhang // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* – 2016. – V. 508. – P. 286-293.
11. Yadav S.K. Mixed micelle formation of cationic gemini surfactant with anionic bile salt: a PAH solubilization study / S.K. Yadav, K. Parikh, S. Kumar // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* – 2017. – V. 522. – P. 105-112.
12. Saha R. Kinetics of micellar catalysis on oxidation of p-anisaldehyde to p-anisic acid in aqueous medium at room temperature / R. Saha, A. Ghosh, B. Saha // *Chem. Eng. Sci.* – 2013. – V. 99. – P. 23-27.
13. Katre Y.R. Effect of cationic micelle on the kinetics of oxidation of citric acid by N-bromophthalimide in acidic medium / Y.R. Katre, S. Patil, A.K. Singh // *J. Dispers. Sci. Technol.* – 2009. – V. 30. – № 2. – P. 159-165.
14. Pashirova T.N. Nontoxic antimicrobial micellar systems based on mono- and dicationic Dabco-surfactants and furazolidone: Structure-solubilization properties relationships / T.N. Pashirova, E.A. Burilova, S.S. Lukashenko, N.K. Gaysin, O.I. Gnezdilov, A.S. Sapunova, A.R. Fernandes, A.D. Voloshina, E.B. Souto, E.P. Zhiltsova, L.Y. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2019. – V. 296. – P. 112062.
15. Zhou C. Structure–activity relationship of cationic surfactants as antimicrobial agents / C. Zhou, Y. Wang // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2020. – V. 45. – P. 28-43.
16. Fait M.E. Cationic surfactants as antifungal agents / M.E. Fait, L. Bakas, G.L. Garrote, S.R. Morcelle, M.C.N. Saparrat // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – V. 103. – № 1. – P. 97-112.
17. Hegazy M.A. Novel cationic surfactants for corrosion inhibition of carbon steel pipelines in oil and gas wells applications / M.A. Hegazy, A.Y. El-Etre, M. El-Shafaie, K.M. Berry // *J. Mol. Liq.* – 2016. – V. 214. – P. 347-356.
18. Chen L. Applications of cationic gemini surfactant in preparing multi-walled carbon nanotube contained nanofluids / L. Chen, H. Xie, Y. Li, W. Yu // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* – 2008. – V. 330. – № 2-3. – P. 176-179.
19. Menger F.M. Gemini surfactants / F.M. Menger, J.S. Keiper // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2000. – V. 39. – № 11. – P. 1906-1920.
20. Holmberg K. Novel Surfactants / K. Holmberg. – CRC Press, 2003. – 648 p.

21. Tehrani-Bagha A. Cleavable surfactants / A. Tehrani-Bagha, K. Holmberg // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2007. – V. 12. – № 2. – P. 81-91.
22. Pisárčik M. Self-assembly properties of cationic gemini surfactants with biodegradable groups in the spacer / M. Pisárčik, M. Polakovičová, M. Markuliak, M. Lukáč, F. Devínsky // *Molecules.* – 2019. – V. 24. – №.1481.
23. Kronberg B. The hydrophobic effect / B. Kronberg // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2016. – V. 22. – P. 14-22.
24. Eastoe J. Surfactants and Nanoscience / J. Eastoe, R.F. Tabor // *Colloidal Foundations of Nanoscience.* – Elsevier, 2014. – P. 135-157.
25. Israelachvili J.N. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers / J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* – 1976. – V. 72. – P. 1525-1568.
26. Stuart M.C.A. Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid–detergent systems / M.C.A. Stuart, E.J. Boekema // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* – 2007. – V. 1768. – № 11. – P. 2681-2689.
27. Coppola L. Structural changes in CTAB/H₂O mixtures using a rheological approach / L. Coppola, R. Gianferri, I. Nicotera, C. Oliviero, G. Antonio Ranieri // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2004. – V. 6. – № 9. – P. 2364-2372.
28. Kamal M.S. A Review of Gemini Surfactants: Potential Application in Enhanced Oil Recovery / M.S. Kamal // *J. Surfactants Deterg.* – 2016. – V. 19. – № 2. – P. 223-236.
29. Mondal M.H. Modernization of surfactant chemistry in the age of gemini and bio-surfactants: a review / M.H. Mondal, S. Malik, A. Roy, R. Saha, B. Saha // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – № 112. – P. 92707-92718.
30. Cheng C. Synthesis of an emerging morpholine-typed Gemini surfactant and its application in reverse flotation carnallite ore for production of potash fertilizer at low temperature / C. Cheng, Z. Huang, R. Zhang, J. Zhou, Z. Liu, H. Zhong, H. Wang, Z. Kang, G. He, X. Yu, Z. Ren, T. Qiu, Y. Hu, W. Fu // *J. Clean. Prod.* – 2020. – V. 261. – P. 121121.
31. Sharma R. Advances in the synthesis, molecular architectures and potential applications of gemini surfactants / R. Sharma, A. Kamal, M. Abdinejad, R.K. Mahajan, H.-B. Kraatz // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2017. – V. 248. – P. 35-68.

32. Rosen M. Gemini Surfactants /M.J. Rosen, J.T. Kunjappu // Surfactants and Interfacial Phenomena. – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. – P. 458-470.
33. Costa C. Effective cytocompatible nanovectors based on serine-derived gemini surfactants and monoolein for small interfering RNA delivery / C. Costa, I.S. Oliveira, J.P.N. Silva, S.G. Silva, C. Botelho, M.L.C. do Vale, M.E.C.D. Real Oliveira, A.C. Gomes, E.F. Marques // J. Colloid Interface Sci. – 2021. – V. 584. – P. 34-44.
34. Fatma N. Ester-bonded cationic gemini surfactants: Assessment of their cytotoxicity and antimicrobial activity / N. Fatma, M. Panda, Kabir-ud-Din, M. Beg // J. Mol. Liq. – 2016. – V. 222. – Ester-bonded cationic gemini surfactants. – P. 390-394.
35. Mohammed Siddiq A. Green (gemini) surfactant mediated gold nanoparticles green synthesis: Effect on triple negative breast cancer cells / A. Mohammed Siddiq, R. Thangam, B. Madhan, Md.S. Alam // Nano-Struct. Nano-Objects. – 2019. – V. 19. – P. 100373.
36. Kirby A.J. Gemini Surfactants: New Synthetic Vectors for Gene Transfection / A.J. Kirby, P. Camilleri, J.B.F.N. Engberts, M.C. Feiters, R.J.M. Nolte, O. Söderman, M. Bergsma, P.C. Bell, M.L. Fielden, C.L. García Rodríguez, P. Guédat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M.C.P. van Eijk // Angew. Chem. Int. Ed. – 2003. – V. 42. – № 13. – P. 1448-1457.
37. Zhang S. Antibacterial Activity, *in Vitro* Cytotoxicity, and Cell Cycle Arrest of Gemini Quaternary Ammonium Surfactants / S. Zhang, S. Ding, J. Yu, X. Chen, Q. Lei, W. Fang // Langmuir. – 2015. – V. 31. – № 44. – P. 12161-12169.
38. Garcia M.T. Hydrophilicity and flexibility of the spacer as critical parameters on the aggregation behavior of long alkyl chain cationic gemini surfactants in aqueous solution / M.T. Garcia, O. Kaczerewska, I. Ribosa, B. Brycki, P. Materna, M. Drgas // J. Mol. Liq. – 2017. – V. 230. – P. 453-460.
39. Zana R. Dimeric (Gemini) Surfactants: Effect of the Spacer Group on the Association Behavior in Aqueous Solution / R. Zana // J. Colloid Interface Sci. – 2002. – V. 248. – № 2. – P. 203-220.
40. Guerrero-Hernández L. Gemini and Bicephalous Surfactants: A Review on Their Synthesis, Micelle Formation, and Uses / L. Guerrero-Hernández, H.I. Meléndez-Ortiz, G.Y. Cortez-Mazatan, S. Vaillant-Sánchez, R.D. Peralta-Rodríguez // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V. 23. – № 3. – P. 1798.

41. Bernheim-Groswasser A. Sphere-to-Cylinder Transition in Aqueous Micellar Solution of a Dimeric (Gemini) Surfactant / A. Bernheim-Groswasser, R. Zana, Y. Talmon // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – V. 104. – № 17. – P. 4005-4009.
42. Johnsson M. Novel sugar-based gemini surfactants: aggregation properties in aqueous solution / M. Johnsson, J.B.F.N. Engberts // *J. Phys. Org. Chem.* – 2004. – V. 17. – № 11. – P. 934-944.
43. Chen H. Temperature-induced micelle transition of gemini surfactant in aqueous solution / H. Chen, Z. Ye, L. Han, P. Luo, L. Zhang // *Surf. Sci.* – 2007. – V. 601. – № 10. – P. 2147-2151.
44. Yu D. Effects of Inorganic and Organic Salts on Aggregation Behavior of Cationic Gemini Surfactants / D. Yu, X. Huang, M. Deng, Y. Lin, L. Jiang, J. Huang, Y. Wang // *J. Phys. Chem. B.* – 2010. – V. 114. – № 46. – P. 14955-14964.
45. Rangel-Yagui C.O. Micellar solubilization of drugs / C.O. Rangel-Yagui, A. Pessoa, L.C. Tavares // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2005. – V. 8. – № 2. – P. 147-165.
46. Choi T.S. Solubilization of disperse dyes in cationic gemini surfactant micelles / T.S. Choi, Y. Shimizu, H. Shirai, K. Hamada // *Dyes Pigments.* – 2000. – V. 45. – № 2. – P. 145-152.
47. Zheng O. Solubilization of pyrene in aqueous micellar solutions of gemini surfactants C_{12} -s- C_{12} -2Br / O. Zheng, J.X. Zhao // *J. Colloid Interface Sci.* – 2006. – V. 300. – № 2. – P. 749-754.
48. Singh S. Self-Assembly in Aqueous Oppositely Charged Gemini Surfactants: A Correlation between Morphology and Solubilization Efficacy / S. Singh, A. Bhadoria, K. Parikh, S.K. Yadav, S. Kumar, V.K. Aswal, S. Kumar // *J. Phys. Chem. B.* – 2017. – V.121. – №37. – P.8756-8766.
49. Tehrani-Bagha A.R. Solubilization of two organic dyes by cationic ester-containing gemini surfactants / A.R. Tehrani-Bagha, R.G. Singh, K. Holmberg // *J. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 376. – № 1. – P. 112-118.
50. Nakano T.-Y. Thermodynamic Study of Mixed Hydrocarbon/Fluorocarbon Surfactant System by Conductometric and Fluorimetric Techniques / T.-Y. Nakano, G. Sugihara, T. Nakashima, S.-C. Yu // *Langmuir.* – 2002. – V. 18. – № 23. – P. 8777-8785.
51. Zana R. Critical micellization concentration of surfactants in aqueous solution and free energy of micellization / R. Zana // *Langmuir.* – 1996. – V. 12. – № 5. – P. 1208-1211.

52. Rosen M.J. Adsorption of Surface-Active Agents at Interfaces: The Electrical Double Layer / M.J. Rosen // *Surfactants Interfacial Phenomena*. – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012 – P. 34-104.

53. Simister E.A. Comparison of neutron reflection and surface tension measurements of the surface excess of tetradecyltrimethylammonium bromide layers at the air/water interface / E.A. Simister, R.K. Thomas, J. Penfold, R. Aveyard, B.P. Binks, P. Cooper, P.D.I. Fletcher, J.R. Lu, A. Sokolowski // *J. Phys. Chem.* – 1992. – V. 96. – № 3. – P. 1383-1388.

54. Mukherjee I. Tensiometric determination of Gibbs surface excess and micelle point: A critical revisit / I. Mukherjee, S.P. Moulik, A.K. Rakshit // *J. Colloid Interface Sci.* – 2013. – V. 394. – № 1. – P. 329-336.

55. Ren Q. Quantitative description of surface adsorption of surfactant in aqueous solution without the Gibbs equation / Q. Ren, F. Chen // *Chem. Commun.* – 2020. – V. 56. – № 95. – P. 15076-15079.

56. Dam Th. Synthesis, surface properties and oil solubilisation capacity of cationic gemini surfactants / Th. Dam, J.B.F.N. Engberts, J. Karthäuser, S. Karaborni, N.M. van Os // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* – 1996. – V. 118. – № 1-2. – P. 41-49.

57. Lu T. Surface properties, aggregation behavior and micellization thermodynamics of a class of gemini surfactants with ethyl ammonium headgroups / T. Lu, Y. Lan, C. Liu, J. Huang, Y. Wang // *J. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 377. – № 1. – P. 222-230.

58. Zhang Q. Effect of hydrocarbon structure of the headgroup on the thermodynamic properties of micellization of cationic gemini surfactants: An electrical conductivity study / Q. Zhang, Z. Gao, F. Xu, S. Tai // *J. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 371. – № 1. – P. 73-81.

59. Pal N. Synthesis, characterization, and physicochemical properties of a series of quaternary gemini surfactants with different spacer lengths / N. Pal, N. Saxena, A. Mandal // *Colloid Polym. Sci.* – 2017. – V. 295. – P. 2261-2277.

60. Borse M.S. Importance of head group polarity in controlling aggregation properties of cationic gemini surfactants / M.S. Borse, S. Devi // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2006. – V. 123-126. – P. 387-399.

61. Zakharova L.Y. Structural, biocomplexation and gene delivery properties of hydroxyethylated gemini surfactants with varied spacer length / L.Y. Zakharova, D.R. Gabdrakhmanov, A.R. Ibragimova, E.A. Vasilieva, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, E.A.

Ermakova, N.E. Gogoleva, D.A. Faizullin, A.G. Pokrovsky, V.A. Korobeynikov, S.V. Cheresiz, Y.F. Zuev // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. – 2016. – V. 140. – P. 269-277.

62. Ahmady A.R. Cationic gemini surfactant properties, its potential as a promising bioapplication candidate, and strategies for improving its biocompatibility: A review / A.R. Ahmady, P. Hosseinzadeh, A. Solouk, S. Akbari, A.M. Szulc, B.E. Brycki // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2022. – V. 299. – P. 102581.

63. Wang H. Synthesis and aggregation properties of dissymmetric phytanyl-gemini surfactants for use as improved DNA transfection vectors / H. Wang, S.D. Wettig // *Phys Chem Chem Phys.* – 2011. – V. 13. – № 2. – P. 637-642.

64. Sharma V.D. Interfacial engineering of pyridinium gemini surfactants for the generation of synthetic transfection systems / V.D. Sharma, E.O. Aifuwa, P.A. Heiney, M.A. Ilies // *Biomaterials*. – 2013. – V. 34. – № 28. – P. 6906-6921.

65. Wettig S. Gemini Surfactants: A New Family of Building Blocks for Non-Viral Gene Delivery Systems / S. Wettig, R. Verrall, M. Foldvari // *Curr. Gene Ther.* – 2008. – V. 8. – № 1. – P. 9-23.

66. Ahmed T. Interactions between DNA and gemini surfactant: impact on gene therapy: part II / T. Ahmed, A.O. Kamel, S.D. Wettig // *Nanomed.* – 2016. – V. 11. – № 4. – P. 403-420.

67. Chen C. Molecular dynamics of the interaction of anionic surfactants with liposomes / C. Chen, C. Jiang, C.P. Tripp // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. – 2013. – V. 105. – P. 173-179.

68. El Maghraby G.M.M. Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes / G.M.M. El Maghraby, A.C. Williams, B.W. Barry // *Int. J. Pharm.* – 2004. – V. 276. – № 1-2. – P. 143-161.

69. Almeida J.A.S. The effect of cationic gemini surfactants upon lipid membranes. An experimental and molecular dynamics simulation study / J.A.S. Almeida, E.F. Marques, A.S. Jurado, A.A.C.C. Pais // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2010. – V. 12. – № 43. – P. 14462-14476.

70. Balgavý P. Cut-off effects in biological activities of surfactants / P. Balgavý, F. Devínsky // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1996. – V. 66. – P. 23-63.

71. Chen A. Cationic Molecular Umbrellas as Antibacterial Agents with Remarkable Cell-Type Selectivity / A. Chen, A. Karanastasis, K.R. Casey, M. Necelis, B.R. Carone, G.A. Caputo, E.F. Palermo // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2020. – V. 12. – № 19. – P. 21270-21282.

72. Lichtenberg D. The Mechanism of Detergent Solubilization of Lipid Bilayers / D. Lichtenberg, H. Ahyayauch, F.M. Goñi // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105. – № 2. – P. 289-299.

73. Nomura F. Capabilities of liposomes for topological transformation / F. Nomura, M. Nagata, T. Inaba, H. Hiramatsu, H. Hotani, K. Takiguchi // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – V. 98. – № 5. – P. 2340-2345.

74. Zhang N. Interaction of phospholipid vesicles with gemini surfactants of different lysine spacer lengths / N. Zhang, R. Qi, H. Li, B. Guan, Y. Liu, Y. Han, Y. Wang // *Soft Matter*. – 2019. – V. 15. – № 46. – P. 9458-9467.

75. 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.

76. Zhou L. Self-Assembly and Chiral Recognition of Chiral Cationic Gemini Surfactants / L. Zhou, J. Yue, Y. Fan, Y. Wang // *Langmuir*. – 2018. – V. 34. – № 43. – P. 12924-12933.

77. Jiao W. pH and light dual stimuli-responsive wormlike micelles with a novel Gemini surfactant / W. Jiao, Z. Wang, T. Liu, X. Li, J. Dong // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* – 2021. – V. 618. – P. 126505.

78. Brycki B. Gemini surfactants as corrosion inhibitors. A review / B. Brycki, A. Szulc // *J. Mol. Liq.* – 2021. – V. 344. – P. 117686.

79. Hellberg P.-E. Cleavable surfactants / P.-E. Hellberg, K. Bergström, K. Holmberg // *J. Surfactants Deterg.* – 2000. – V. 3. – P. 81-91.

80. Tehrani-Bagha A.R. Cationic ester-containing gemini surfactants: Chemical hydrolysis and biodegradation / A.R. Tehrani-Bagha, H. Oskarsson, C.G. van Ginkel, K. Holmberg // *J. Colloid Interface Sci.* – 2007. – V. 312. – № 2. – P. 444-452.

81. Pérez L. Gemini surfactants from natural amino acids / L. Pérez, A. Pinazo, R. Pons, Mr. Infante // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2014. – V. 205. – P. 134-155.

82. Xu D. Synthesis and properties of biodegradable cationic gemini surfactants with diester and flexible spacers / D. Xu, X. Ni, C. Zhang, J. Mao, C. Song // *J. Mol. Liq.* – 2017. – V. 240. – P. 542-548.

83. Garcia M.T. Biodegradability and aquatic toxicity of quaternary ammonium-based gemini surfactants: Effect of the spacer on their ecological properties / M.T. Garcia, O.

Kaczerewska, I. Ribosa, B. Brycki, P. Materna, M. Drgas // *Chemosphere*. – 2016. – V. 154. – P. 155-160.

84. Sang Z. Design, synthesis and biological evaluation of novel O-carbamoyl ferulamide derivatives as multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease / Z. Sang, K. Wang, P. Bai, A. Wu, J. Shi, W. Liu, G. Zhu, Y. Wang, Y. Lan, Z. Chen, Y. Zhao, Z. Qiao, C. Wang, Z. Tan // *Eur. J. Med. Chem.* – 2020. – V. 194. – P. 112265.

85. Ghosh A.K. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry / A.K. Ghosh, M. Brindisi // *J. Med. Chem.* – 2015. – V. 58. – № 7. – P. 2895-2940.

86. Malam Y. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer / Y. Malam, M. Loizidou, A.M. Seifalian // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2009. – V. 30. – № 11. – P. 592-599.

87. Kraft J.C. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems / J.C. Kraft, J.P. Freeling, Z. Wang, R.J.Y. Ho // *J. Pharm. Sci.* – 2014. – V. 103. – № 1. – P. 29-52.

88. Suzuki R. Nanomaterials in Pharmacology / R. Suzuki, D. Omata, Y. Oda, J. Unga, Y. Negishi, K. Maruyama. New York: Humana New York. – 2016. – 485p.

89. Zylberberg C. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape / C. Zylberberg, S. Matosevic // *Drug Deliv.* – 2016. – V. 23. – № 9. – P. 3319-3329.

90. Zununi Vahed S. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells / S. Zununi Vahed, R. Salehi, S. Davaran, S. Sharifi // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2017. – V. 71. – P. 1327-1341.

91. Beltrán-Gracia E. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications / E. Beltrán-Gracia, A. López-Camacho, I. Higuera-Ciapara, J.B. Velázquez-Fernández, A.A. Vallejo-Cardona // *Cancer Nanotechnol.* – 2019. – V. 10. – № 1. – P. 11.

92. Ghosh S. Surface engineered liposomal delivery of therapeutics across the blood brain barrier: recent advances, challenges and opportunities / S. Ghosh, R. Lalani, V. Patel, S. Bhowmick, A. Misra // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2019. – V. 16. – № 12. – P. 1287-1311.

93. Abri Aghdam M. Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release / M. Abri Aghdam, R. Bagheri, J. Mosafer, B. Baradaran, M. Hashemzaei, A. Baghbanzadeh, M. de la Guardia, A. Mokhtarzadeh // *J. Controlled Release.* – 2019. – V. 315. – P. 1-22.

94. Crommelin D.J.A. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? / D.J.A. Crommelin, P. van Hoogevest, G. Storm // *J. Controlled Release*. – 2020. – V. 318. – P. 256-263.

95. Hossein Kiaie S. Axial Pharmaceutical Properties of Liposome in Cancer Therapy: Recent Advances and Perspectives / S. Hossein Kiaie, S. Mojarad-Jabali, F. Khaleseh, S. Allahyari, E. Taheri, P. Zakeri-Milani, H. Valizadeh // *Int. J. Pharm.* – 2020. – V. 581. – P. 119269.

96. Nagayasu A. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs / A. Nagayasu, K. Uchiyama, H. Kiwada // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1999. – V. 40. – № 1-2. – P. 75-87.

97. Laouini A. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art / A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi // *J. Colloid Sci. Biotechnol.* – 2012. – V. 1. – № 2. – P. 147-168.

98. Zhao Z. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers / Z. Zhao, A. Ukidve, V. Krishnan, S. Mitragotri // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2019. – V. 143. – P. 3-21.

99. Sheikholeslami B. Exploring the impact of physicochemical properties of liposomal formulations on their in vivo fate / B. Sheikholeslami, N.W. Lam, K. Dua, M. Haghi // *Life Sci.* – 2022. – V. 300. – P. 120574.

100. Steffes V.M. PEGylation of Paclitaxel-Loaded Cationic Liposomes Drives Steric Stabilization of Bicelles and Vesicles thereby Enhancing Delivery and Cytotoxicity to Human Cancer Cells / V.M. Steffes, Z. Zhang, S. Macdonald, J. Crowe, K.K. Ewert, B. Carragher, C.S. Potter, C.R. Safinya // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2020. – V. 12. – №1. – P.151-162.

101. Bode C. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes: A new option for neovascular targeting for the treatment of prostate cancer / C. Bode, L. Trojan, C. Weiss, B. Kraenzlin, U. Michaelis, M. Teifel, P. Alken, M. Stephan Michel // *Oncol. Rep.* – 2009. – V. 22. – № 3. – P. 321-326.

102. Ho E.A. Characterization of Cationic Liposome Formulations Designed to Exhibit Extended Plasma Residence Times and Tumor Vasculature Targeting Properties / E.A. Ho, E. Ramsay, M. Ginj, M. Anantha, I. Bregman, J. Sy, J. Woo, M. Osooly-Talesh, D.T. Yapp, M.B. Bally // *J. Pharm. Sci.* – 2010. – V. 99. – № 6. – P. 2839-2853.

103. Donahue N.D. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine / N.D. Donahue, H. Acar, S. Wilhelm // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2019. – V. 143. – P. 68-96.

104. Miller C.R. Liposome-cell interactions in vitro: Effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes / C.R. Miller, B. Bondurant, S.D. McLean, K.A. McGovern, D.F. O'Brien // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37. – № 37. – P. 12875-12883.

105. Chen X. Improved tumor-targeting drug delivery and therapeutic efficacy by cationic liposome modified with truncated bFGF peptide / X. Chen, X. Wang, Y. Wang, L. Yang, J. Hu, W. Xiao, A. Fu, L. Cai, X. Li, X. Ye, Y. Liu, W. Wu, X. Shao, Y. Mao, Y. Wei, L. Chen // *J. Controlled Release.* – 2010. – V. 145. – № 1. – P. 17-25.

106. Vigderman L. Quantitative replacement of cetyl trimethylammonium bromide by cationic thiol ligands on the surface of gold nanorods and their extremely large uptake by cancer cells / L. Vigderman, P. Manna, E.R. Zubarev // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2012. – V. 51. – № 3. – P. 636-641.

107. 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.M. Kuznetsov, Ya.A. Ivanov, S.K. Amerkhanova, A.P. Lyubina, A.D. Voloshina, L.Ya. Zakharova // *Smart Mater. Med.* – 2023. – V. 4. – P. 123-133.

108. Smith M.C. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes / M.C. Smith, R.M. Crist, J.D. Clogston, S.E. McNeil // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2017. – V. 409. – № 24. – P. 5779-5787.

109. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? / S. Bhattacharjee // *J. Controlled Release.* – 2016. – V. 235. – P. 337-351.

110. Franzen U. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance–liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography / U. Franzen, J. Østergaard // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1267. – P. 32-44.

111. Shilov V.N. Electroacoustic theory for concentrated colloids with overlapped DLs at arbitrary κa : I. Application to nanocolloids and nonaqueous colloids / V.N. Shilov, Y.B. Borkovskaja, A.S. Dukhin // *J. Colloid Interface Sci.* – 2004. – V. 277. – № 2. – P. 347-358.

112. Nii T. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method / T. Nii, F. Ishii // *Int. J. Pharm.* – 2005. – V. 298. – № 1. – P. 198-205.

113. Costa A.P. Freeze-anneal-thaw cycling of unilamellar liposomes: Effect on encapsulation efficiency / A.P. Costa, X. Xu, D.J. Burgess // *Pharm. Res.* – 2014. – V. 31. – № 1. – P. 97-103.

114. Gregoriadis G. *Liposome technology* / G. Gregoriadis. – New York: Informa Healthcare, 2007. – 286 p.

115. Wallace S.J. Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology / S.J. Wallace, J. Li, R.L. Nation, B.J. Boyd // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2012. – V. 2. – № 4. – P. 284-292.

116. Saarinen-Savolainen P. Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions / P. Saarinen-Savolainen, T. Järvinen, H. Taipale, A. Urtti // *Int. J. Pharm.* – 1997. – V. 159. – № 1. – P. 27-33.

117. Dipali S.R. Comparative Study of Separation of Non-encapsulated Drug from Unilamellar Liposomes by Various Methods / S.R. Dipali, S.B. Kulkarni, G.V. Betageri // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1996. – V. 48. – № 11. – P. 1112-1115.

118. Kuznetsova D.A. Cationic liposomes mediated transdermal delivery of meloxicam and ketoprofen: Optimization of the composition, in vitro and in vivo assessment of efficiency / D.A. Kuznetsova, L.A. Vasileva, G.A. Gaynanova, E.A. Vasilieva, O.A. Lenina, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *Int. J. Pharm.* – 2021. – V. 605. – P. 120803.

119. Maherani B. Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids / B. Maherani, E. Arab-Tehrany, A. Kheiriloom, D. Geny, M. Linder // *Biochimie.* – 2013. – V. 95. – № 11. – P. 2018-2033.

120. 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 // *Mater. Adv.* – 2021. – V. 2. – № 23. – P. 7715-7730.

121. Kong G. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: Importance of triggered drug release / G. Kong, G. Anyarambhatla, W.P. Petros, R.D. Braun, O.M. Colvin, D. Needham, M.W. Dewhirst // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – № 24. – P. 6950-6957.

122. Andresen T.L. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release / T.L. Andresen, S.S. Jensen, K. Jørgensen // *Prog. Lipid Res.* – 2005. – V. 44. – № 1. – P. 68-97.

123. Lin M., Qi X. R. Purification method of drug-loaded liposome / M. Lin, X.R. Qi // *Liposome-based drug delivery systems.* – Berlin: Springer, 2021. – P. 111-121.

124. Briuglia M.-L. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release / M.-L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2015. – V. 5. – № 3. – P. 231-242.

125. Kaddah S. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule / S. Kaddah, N. Khreich, F. Kaddah, C. Charcosset, H. Greige-Gerges // *Food Chem. Toxicol.* – 2018. – V. 113. – P. 40-48.

126. Hossann M. Size of thermosensitive liposomes influences content release / M. Hossann, T. Wang, M. Wiggenhorn, R. Schmidt, A. Zengerle, G. Winter, H. Eibl, M. Peller, M. Reiser, R.D. Issels, L.H. Lindner // *J. Controlled Release.* – 2010. – V. 147. – № 3. – P. 436-443.

127. Allen T.M. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications / T.M. Allen, P.R. Cullis // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – V. 65. – № 1. – P. 36-48.

128. Mufamadi M.S. A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery / M.S. Mufamadi, V. Pillay, Y.E. Choonara, L.C. Du Toit, G. Modi, D. Naidoo, V.M.K. Ndesendo // *J. Drug Deliv.* – 2011. – V. 2011. – P. 1-19.

129. Li J. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems / J. Li, X. Wang, T. Zhang, C. Wang, Z. Huang, X. Luo, Y. Deng // *Asian J. Pharm. Sci.* – 2015. – V. 10. – № 2. – P. 81-98.

130. Monteiro N. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine / N. Monteiro, A. Martins, R.L. Reis, N.M. Neves // *J. R. Soc. Interface.* – 2014. – V. 11. – № 101. – P. 20140459.

131. Rawicz W. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers / W. Rawicz, K.C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, E. Evans // *Biophys. J.* – 2000. – V. 79. – № 1. – P. 328-339.

132. Binder W.H. Domains and Rafts in Lipid Membranes / W.H. Binder, V. Barragan, F.M. Menger // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2003. – V. 42. – № 47. – P. 5802-5827.

133. Bangham A.D. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope / A.D. Bangham, R.W. Horne // *J. Mol. Biol.* – 1964. – V. 8. – № 5. – P. 660-668.

134. Versluis F. In situ modification of plain liposomes with lipidated coiled coil forming peptides induces membrane fusion / F. Versluis, J. Voskuhl, B. Van Kolck, H. Zope, M. Bremmer, T. Albrechtse, A. Kros // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – V. 135. – № 21. – P. 8057-8062.

135. Moreira J.N. Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity / J.N. Moreira, T. Ishida, R. Gaspar, T.M. Allen // *Pharm. Res.* – 2002. – V. 19. – № 3. – P. 265-269.

136. Yang J. Application of Coiled Coil Peptides in Liposomal Anticancer Drug Delivery Using a Zebrafish Xenograft Model / J. Yang, Y. Shimada, R.C.L. Olsthoorn, B.E. Snaar-Jagalska, H.P. Spaank, A. Kros // *ACS Nano.* – 2016. – V. 10. – № 8. – P. 7428-7435.

137. Accardo A. Review peptide-targeted liposomes for selective drug delivery: Advantages and problematic issues / A. Accardo, G. Morelli // *Biopolymers.* – 2015. – V. 104. – № 5. – P. 462-479.

138. Sonju J.J. Peptide-functionalized liposomes as therapeutic and diagnostic tools for cancer treatment / J.J. Sonju, A. Dahal, S.S. Singh, S.D. Jois // *J. Controlled Release.* – 2021. – V. 329. – P. 624-644.

139. Xu Y. Surface Modification of Lipid-Based Nanoparticles / Y. Xu, T. Fourniols, Y. Labrak, V. Pr at, A. Beloqui, A. des Rieux // *ACS Nano.* – 2022. – V. 16. – № 5. – P. 7168-7196.

140. Stefanick J.F. A systematic analysis of peptide linker length and liposomal polyethylene glycol coating on cellular uptake of peptide-targeted liposomes / J.F. Stefanick, J.D. Ashley, T. Kiziltepe, B. Bilgicer // *ACS Nano.* – 2013. – V. 7. – № 4. – P. 2935-2947.

141. Dos Santos N. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: Relating plasma circulation lifetimes to protein binding / N. Dos Santos, C. Allen, A.M. Doppen, M. Anantha, K.A.K. Cox, R.C. Gallagher, G. Karlsson, K. Edwards, G. Kenner, L. Samuels, M.S. Webb, M.B. Bally // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2007. – V. 1768. – № 6. – P. 1367-1377.

142. Annesini M.C. Surfactant as modulating agent of enzyme-loaded liposome activity / M.C. Annesini, C.M. Braguglia, A. Memoli, L.G. Palermiti, S. Di Sario // *Biotechnol. Bioeng.* – 1997. – V. 55. – № 2. – P. 261-266.

143. Aihua Z. Liposome formation in mixed aqueous solution of tripple-tailed cationic surfactant and Phosphatidylcholine / Z. Aihua, G. Qiang, Y. Chunwei, G. Rong // *J. Dispers. Sci. Technol.* – 2004. – V. 25. – № 6. – P. 789-794.
144. Lima L.M.C. Morphological and nanomechanical behavior of supported lipid bilayers on addition of cationic surfactants / L.M.C. Lima, M.I. Giannotti, L. Redondo-Morata, M.L.C. Vale, E.F. Marques, F. Sanz // *Langmuir.* – 2013. – V. 29. – № 30. – P. 9352-9361.
145. Barbosa R.M. Influence of different surfactants on the physicochemical properties of elastic liposomes / R.M. Barbosa, P. Severino, P.S.C. Preté, M.H.A. Santana // *Pharm. Dev. Technol.* – 2017. – V. 22. – № 3. – P. 360-369.
146. Kuznetsova D.A. Novel hybrid liposomal formulations based on imidazolium-containing amphiphiles for drug encapsulation / D.A. Kuznetsova, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, L.R. Ahtamyanova, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Y. Zakharova // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2019. – V. 178. – P. 352-357.
147. Kuznetsova D. Mitochondria-targeted cationic liposomes modified with alkyltriphenylphosphonium bromides loaded with hydrophilic drugs: preparation, cytotoxicity and colocalization assay / D. Kuznetsova, G. Gaynanova, L. Vasileva, G. Sibgatullina, D. Samigullin, A. Sapunova, A. Voloshina, I. Galkina, K. Petrov, L. Zakharova // *J. Mater. Chem. B.* – 2019. – V. 7. – P. 7351-7362.
148. Giuliani C. Remote loading of aloe emodin in gemini-based cationic liposomes / C. Giuliani, B. Altieri, C. Bombelli, L. Galantini, G. Mancini, A. Stringaro // *Langmuir.* – 2015. – V. 31. – № 1. – P. 76-82.
149. Bathula S.R. siRNA Delivery Using a Cationic-Lipid-Based Highly Selective Human DNA Ligase I Inhibitor / S.R. Bathula, K. Sharma, D.K. Singh, M.P. Reddy, P.R. Sajja, A.L. Deshmukh, D. Banerjee // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2018. – V. 10. – № 2. – P. 1616-1622.
150. Logue C.H. Treatment with cationic liposome-DNA complexes (CLDCs) protects mice from lethal Western equine encephalitis virus (WEEV) challenge / C.H. Logue, A.T. Phillips, E.C. Mossel, J.P. Ledermann, T. Welte, S.W. Dow, K.E. Olson, A.M. Powers // *Antiviral Res.* – 2010. – V. 87. – № 2. – P. 195-203.
151. Sarker S.R. Intracellular delivery of universal proteins using a lysine headgroup containing cationic liposomes: Deciphering the uptake mechanism / S.R. Sarker, R. Hokama, S. Takeoka // *Mol. Pharm.* – 2014. – V. 11. – № 1. – P. 164-174.

152. Heuts J. Cationic Liposomes: A Flexible Vaccine Delivery System for Physicochemically Diverse Antigenic Peptides / J. Heuts, E.M. Varypataki, K. van der Maaden, S. Romeijn, J.W. Drijfhout, A.T. van Scheltinga, F. Ossendorp, W. Jiskoot // *Pharm. Res.* – 2018. – V. 35. – P 1-9.

153. Knudsen K.B. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes / K.B. Knudsen, H. Northeved, E.K. Pramod Kumar, A. Permin, T. Gjetting, T.L. Andresen, S. Larsen, K.M. Wegener, J. Lykkesfeldt, K. Jantzen, S. Loft, P. Møller, M. Roursgaard // *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* – 2015. – V. 11. – № 2. – P. 467-477.

154. Abu Lila A.S. Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes / A.S. Abu Lila, T. Ishida, H. Kiwada // *Pharm. Res.* – 2010. – V. 27. – № 7. – P. 1171-1183.

155. Mirgorodskaya A.B. Self-assembly of mixed systems based on nonionic and carbamate-bearing cationic surfactants as a tool for fabrication of biocompatible nanocontainers / A.B. Mirgorodskaya, R.A. Kushnazarova, S.S. Lukashenko, L.Y. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2019. – V. 292. – P.111407.

156. Kuznetsova D.A. Self-assembled systems based on novel hydroxyethylated imidazolium-containing amphiphiles: interaction with DNA decamer, protein and lipid / D.A. Kuznetsova, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, A.S. Sapunova, R.R. Kashapov, L.Ya. Zakharova // *Chem. Phys. Lipids.* – 2019. – V. 223. – P. 104791.

157. Pashirova T.N. Delivery nanosystems based on sterically hindered phenol derivatives containing a quaternary ammonium moiety: Synthesis, cholinesterase inhibition and antioxidant activity / T.N. Pashirova, E.A. Burilova, R.G. Tagasheva, I.V. Zueva, E.M. Gibadullina, I.R. Nizameev, I.A. Sudakov, A.B. Vyshtakalyuk, A.D. Voloshina, M.K. Kadirov, K.A. Petrov, A.R. Burilov, S.V. Bukharov, L.Y. Zakharova // *Chem. Biol. Interact.* – 2019. – V. 310. – P. 108753.

158. Kuznetsov D.M. Liposomes modified with borneol-containing surfactants for transdermal delivery of hydrophilic substrates / D.M. Kuznetsov, D.A. Kuznetsova, L.Ya. Zakharova // *Russ. Chem. Bull.* – 2022. – V. 71. – № 9. – P. 1887-1896.

159. Kuznetsova D.A. Enhancement of the Transdermal Delivery of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Using Liposomes Containing Cationic Surfactants / D.A. Kuznetsova, E.A. Vasilieva, D.M. Kuznetsov, O.A. Lenina, S.K. Filippov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *ACS Omega.* – 2022. – V. 7. – № 29. – P. 25741-25750.

160. Kreuter J. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles / J. Kreuter, P. Ränge, V. Petrov, S. Hamm, S.E. Gelperina, B. Engelhardt, R. Alyautdin, H. Von Briesen, D.J. Begley // *Pharm. Res.* – 2003. – V. 20. – № 3. – P. 409-416.
161. Huang Y.Z. Cationic liposomes modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer / Y.Z. Huang, J.Q. Gao, J.L. Chen, W.Q. Liang // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2006. – V. 49. – № 2. – P. 158-164.
162. Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers / G. Cevc // *Clin. Pharmacokinet.* – 2003. – V. 42. – № 5. – P. 461-474.
163. Riaz M. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review / M. Riaz, M. Riaz, X. Zhang, C. Lin, K. Wong, X. Chen, G. Zhang, A. Lu, Z. Yang // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – № 1. – P. 195.
164. Xia W. Folate-Targeted Therapies for Cancer / W. Xia, P.S. Low // *J. Med. Chem.* – 2010. – V. 53. – № 19. – P. 6811-6824.
165. Lee R.J. Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. / R.J. Lee, P.S. Low // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 5. – P. 3198-3204.
166. Gabizon A. Targeting Folate Receptor with Folate Linked to Extremities of Poly(ethylene glycol)-Grafted Liposomes: In Vitro Studies / A. Gabizon, A.T. Horowitz, D. Goren, D. Tzemach, F. Mandelbaum-Shavit, M.M. Qazen, S. Zalipsky // *Bioconjug. Chem.* – 1999. – V. 10. – № 2. – P. 289-298.
167. Yamada A. Design of Folate-Linked Liposomal Doxorubicin to its Antitumor Effect in Mice / A. Yamada, Y. Taniguchi, K. Kawano, T. Honda, Y. Hattori, Y. Maitani // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – V. 14. – № 24. – P. 8161-8168.
168. Cvjetinović Đ. Bioevaluation of glucose-modified liposomes as a potential drug delivery system for cancer treatment using ¹⁷⁷-Lu radiotracking / Đ. Cvjetinović, Ž. Prijović, D. Janković, M. Radović, M. Mirković, Z. Milanović, M. Mojović, Đ. Škalamera, S. Vranješ-Đurić // *J. Controlled Release.* – 2021. – V. 332. – P. 301-311.
169. Noble G.T. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations / G.T. Noble, J.F. Stefanick, J.D. Ashley, T. Kiziltepe, B. Bilgicler // *Trends Biotechnol.* – 2014. – V. 32. – № 1. – P. 32-45.

170. Mojarad-Jabali S. An update on actively targeted liposomes in advanced drug delivery to glioma / S. Mojarad-Jabali, M. Farshbaf, P.R. Walker, S. Hemmati, Y. Fatahi, P. Zakeri-Milani, M. Sarfraz, H. Valizadeh // *Int. J. Pharm.* – 2021. – V. 602. – P. 120645.

171. Xie F. Investigation of glucose-modified liposomes using polyethylene glycols with different chain lengths as the linkers for brain targeting / F. Xie, F. Xie, Qin, Yuan, Tang, Zhang, Fan, Chen, Hai, Yao, Li, Q. He // *Int. J. Nanomedicine.* – 2012. – V. 7. – P. 163-175.

172. Edelman R. Hyaluronic acid-serum albumin conjugate-based nanoparticles for targeted cancer therapy / R. Edelman, Y.G. Assaraf, I. Levitzky, T. Shahar, Y.D. Livney // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8. – № 15. – P. 24337-24353.

173. Zhang Q. Repeated Administration of Hyaluronic Acid Coated Liposomes with Improved Pharmacokinetics and Reduced Immune Response / Q. Zhang, C. Deng, Y. Fu, X. Sun, T. Gong, Z. Zhang // *Mol. Pharm.* – 2016. – V. 13. – № 6. – P. 1800-1808.

174. Moosavian S.A. Aptamer-functionalized liposomes for targeted cancer therapy / S.A. Moosavian, A. Sahebkar // *Cancer Lett.* – 2019. – V. 448. – P. 144-154.

175. Ning Y. Aptamers used for biosensors and targeted therapy / Y. Ning, J. Hu, F. Lu // *Biomed. Pharmacother.* – 2020. – V. 132. – P. 110902.

176. Wang R. Automated Modular Synthesis of Aptamer–Drug Conjugates for Targeted Drug Delivery / R. Wang, G. Zhu, L. Mei, Y. Xie, H. Ma, M. Ye, F.-L. Qing, W. Tan // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – V. 136. – № 7. – P. 2731-2734.

177. Kadkhoda J. Advances in antibody nanoconjugates for diagnosis and therapy: A review of recent studies and trends / J. Kadkhoda, M. Akrami-Hasan-Kohal, M.R. Tohidkia, S. Khaledi, S. Davaran, A. Aghanejad // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2021. – V. 185. – P. 664-678.

178. Chen H. Lactoferrin-modified procationic liposomes as a novel drug carrier for brain delivery / H. Chen, L. Tang, Y. Qin, Y. Yin, J. Tang, W. Tang, X. Sun, Z. Zhang, J. Liu, Q. He // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2010. – V. 40. – № 2. – P. 94-102.

179. Ulbrich K. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB) / K. Ulbrich, T. Hekmatara, E. Herbert, J. Kreuter // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2009. – V. 71. – № 2. – P. 251-256.

180. Liu Z. Integrin Targeted Delivery of Radiotherapeutics / Z. Liu, F. Wang, X. Chen // *Theranostics.* – 2011. – V. 1. – P. 201-210.

181. Dos Santos Rodrigues B. In vitro and in vivo characterization of CPP and transferrin modified liposomes encapsulating pDNA / B. dos Santos Rodrigues, T. Kanekiyo, J. Singh // *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* – 2020. – V. 28. – P. 102225.

182. Singh M.K. Tumor homing peptide modified liposomes of capecitabine for improved apoptotic activity and HER2 targeted therapy in breast cancer: in vitro studies / M.K. Singh, S.K.S.S. Pindiprolu, B.K. Reddy Sanapalli, V. Yele, G.N.K. Ganesh // *RSC Adv.* – 2019. – V. 9. – № 43. – P. 24987-24994.

183. Suga T. Ligand peptide-grafted PEGylated liposomes using HER2 targeted peptide-lipid derivatives for targeted delivery in breast cancer cells: The effect of serine-glycine repeated peptides as a spacer / T. Suga, Y. Fuchigami, M. Hagimori, S. Kawakami // *Int. J. Pharm.* – 2017. – V. 521. – № 1-2. – P. 361-364.

184. Ying M. A stabilized peptide ligand for multifunctional glioma targeted drug delivery / M. Ying, Q. Shen, C. Zhan, X. Wei, J. Gao, C. Xie, B. Yao, W. Lu // *J. Controlled Release.* – 2016. – V. 243. – P. 86-98.

185. Han B. The influx/efflux mechanisms of d-peptide ligand of nAChRs across the blood–brain barrier and its therapeutic value in treating glioma / B. Han, W. Xie, Y. Zhang, S. Zhou, J. Yang, R. Wang, Y. Sun, X. Wang, J. Xu, D. Chen, Y. Wang, J. Lu, F. Ning, F. Shen, M. Liu, H. Cai, H. Xin, W. Lu, X. Zhang // *J. Controlled Release.* – 2020. – V. 327. – P. 384-396.

186. Guan J. Short Peptide-Mediated Brain-Targeted Drug Delivery with Enhanced Immunocompatibility / J. Guan, Z. Jiang, M. Wang, Y. Liu, J. Liu, Y. Yang, T. Ding, W. Lu, C. Gao, J. Qian, C. Zhan // *Mol. Pharm.* – 2019. – V. 16. – № 2. – P. 907-913.

187. Chen C. Peptide-22 and Cyclic RGD Functionalized Liposomes for Glioma Targeting Drug Delivery Overcoming BBB and BBTB / C. Chen, Z. Duan, Y. Yuan, R. Li, L. Pang, J. Liang, X. Xu, J. Wang // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2017. – V. 9. – № 7. – P. 5864-5873.

188. Liu Y. Tandem peptide based on structural modification of poly-arginine for enhancing tumor targeting efficiency and therapeutic effect / Y. Liu, Z. Lu, L. Mei, Q. Yu, X. Tai, Y. Wang, K. Shi, Z. Zhang, Q. He // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2017. – V. 9. – № 3. – P. 2083-2092.

189. Li J. $\alpha_v\beta_3$ -targeted liposomal drug delivery system with attenuated immunogenicity enabled by linear pentapeptide for glioma therapy / J. Li, Z. Chai, J. Lu, C. Xie, D. Ran, S. Wang, J. Zhou, W. Lu // *J. Control. Release* – 2020. – V. 322. – P. 542-554.

190. Kushnazarova R.A. Niosomes modified with cationic surfactants to increase the bioavailability and stability of indomethacin / R.A. Kushnazarova, A.B. Mirgorodskaya, L.Y. Zakharova // *Russ. Chem. Bull.* – 2021. – V. 70. – № 3. – P. 585-591.

191. Filipczak N. Recent advancements in liposome technology / N. Filipczak, J. Pan, S.S.K. Yalamarty, V.P. Torchilin // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2020. – V. 156. – P. 4-22.

192. Ponomarev V.S. Synthesis of water-soluble chitosan derivatives and their use for the stabilization of liposomal suspensions / V.S. Ponomarev, K. V. Kozhikhova, I.D. Shulepov, M.I. Tokareva, M.N. Ivantsova, M.A. Mironov // *Russ. Chem. Bull.* – 2014. – V. 63. – № 7. – P. 1619-1623.

193. Katagiri K. Preparation and characterization of a novel organic-inorganic nanohybrid «cerasome» formed with a liposomal membrane and silicate surface / K. Katagiri, M. Hashizume, K. Ariga, T. Terashima, J.I. Kikuchi // *Chem. - Eur. J.* – 2007. – V. 13. – № 18. – P. 5272-5281.

194. Hameed S. Cerasomes and bicelles: Hybrid bilayered nanostructures with silica-like surface in cancer theranostics / S. Hameed, P. Bhattarai, Z. Dai // *Front. Chem.* – 2018. – V. 6. – P. 1-17.

195. Barbosa-Barros L. Bicelles: Lipid nanostructured platforms with potential dermal applications / L. Barbosa-Barros, G. Rodríguez, C. Barba, M. Cócera, L. Rubio, J. Estelrich, C. López-Iglesias, A. De La Maza, O. López // *Small.* – 2012. – V. 8. – № 6. – P. 807-818.

196. Jin C.S. Targeting-triggered porphyrin nanostructure disruption for activatable photodynamic therapy / C.S. Jin, L. Cui, F. Wang, J. Chen, G. Zheng // *Adv. Healthc. Mater.* – 2014. – V. 3. – № 8. – P. 1240-1249.

197. Huynh E. Porphyrin nanotechnology: A paradigm shift in lipid-based supramolecular structures / E. Huynh, G. Zheng // *Nano Today.* – 2014. – V. 9. – № 2. – P. 212-222.

198. Belykh D. V. Photodynamic damage to erythrocytes and liposomes sensitized by chlorophyll a derivatives / D. V. Belykh, O.G. Shevchenko, A.M. Firsov, E.A. Kotova, I.S. Khudyaeva, S.N. Plyusnina, Y.N. Antonenko // *Russ. Chem. Bull.* – 2018. – V. 67. – № 8. – P. 1513-1517.

199. Guidolin K. Porphyrin-lipid nanovesicles (Porphyrinsomes) are effective photosensitizers for photodynamic therapy / K. Guidolin, L. Ding, J. Chen, B.C. Wilson, G. Zheng // *Nanophotonics.* – 2021. – V. 10. – № 12. – P. 3161-3168.

200. Мальшакова М.В. Синтез новых производных хлорофилла А с фрагментами глюкозы и оценка их фотоцитотоксической активности / М.В. Мальшакова, Е.Е. Расова, И.О. Велегжанинов, Д.В. Белых. // Изв. АН Сер. Хим. – 2022. – №3. – С. 531-537.

201. Гольдшлегер Н.Ф. Супрамолекулярные ансамбли с участием краун- и фосфорилсодержащих фталоцианинов и их металлокомплексов в микрогетерогенных средах / Н.Ф. Гольдшлегер, М.А. Лапшина, В.Е. Баулин, А.А. Ширяев, Ю.Г. Горбунова, А.Ю. Цивадзе // Изв. АН Сер. Хим. – 2020. – №. 7. – С. 1223-1244.

202. Richter A.M. Liposomal delivery of a photosensitizer, benzoporphyrin derivative monoacid ring a (bpd), to tumor tissue in a mouse tumor model / A.M. Richter, E. Waterfield, A.K. Jain, A.J. Canaan, B.A. Allison, J.G. Levy // Photochem. Photobiol. – 1993. – V. 57. – P. 1000-1006.

203. Frennesson C.I. Encouraging results of photodynamic therapy with Visudyne in a clinical patient material of age-related macular degeneration / C.I. Frennesson, S.E.G. Nilsson // Acta Ophthalmol. Scand. – 2004. – V. 82. – № 6. – P. 645-650.

204. Massiot J. Photo-triggerable liposomal drug delivery systems: from simple porphyrin insertion in the lipid bilayer towards supramolecular assemblies of lipid–porphyrin conjugates / J. Massiot, V. Rosilio, A. Makky // J. Mater. Chem. B. – 2019. – V. 7. – № 11. – P. 1805-1823.

205. Valic M.S. Rethinking translational nanomedicine: Insights from the «bottom-up» design of the Porphysome for guiding the clinical development of imageable nanomaterials / M.S. Valic, G. Zheng // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2016. – V. 33. – P. 126-134.

206. Nikolaeva O.I. Synthesis and study of immobilized porphyrins on the basis of acrylic polymer carriers / O.I. Nikolaeva, T.A. Ageeva, O.I. Koifman // Russ. Chem. Bull. – 2021. – V. 70. – № 9. – P. 1822-1831.

207. Malyasova A.S. Synthesis, acid-base interactions, and photostability of copper(ii) tetrakis(3,5-di-tert-butylbenzoyloxy)phthalocyanine / A.S. Malyasova, E.A. Kostrova, I.G. Abramov, V.E. Maizlish, O.I. Koifman // Russ. Chem. Bull. – 2021. – V. 70. – № 12. – P. 2405-2415.

208. Yue X. Recent advances in liposomal nanohybrid cerasomes as promising drug nanocarriers / X. Yue, Z. Dai // Adv. Colloid Interface Sci. – 2014. – V. 207. – № 1. – P. 32-42.

209. Zhang D. Hybrid Cerasomes Composed of Phosphatidylcholines and Silica Networks for the Construction of Vesicular Materials with Functionalized Shells / D. Zhang, H.R. Culver, C.N. Bowman // ACS Appl. Nano Mater. – 2019. – V. 2. – № 12. – P. 7549-7558.

210. Ma X. High Intensity Focused Ultrasound-Responsive and Ultrastable Cerasomal Perfluorocarbon Nanodroplets for Alleviating Tumor Multidrug Resistance and Epithelial–Mesenchymal Transition / X. Ma, M. Yao, J. Shi, X. Li, Y. Gao, Q. Luo, R. Hou, X. Liang, F. Wang // *ACS Nano*. – 2020. – V. 14. – № 11. – P. 15904-15918.

211. Katagiri K. Preparation and surface modification of novel vesicular nano-particle «cerasome» with liposomal bilayer and silicate surface / K. Katagiri, R. Hamasaki, K. Ariga, J.I. Kikuchi // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* – 2003. – V. 26. – № 1-3. – P. 393-396.

212. Jin Y. Liposomal nanohybrid cerasomes for controlled insulin release / Y. Jin, Y. Li, H. Pan, Z. Dai // *RSC Adv.* – 2014. – V. 4. – № 81. – P. 42808-42815.

213. Gileva A. Lipoamino acid-based cerasomes for doxorubicin delivery: Preparation and in vitro evaluation / A. Gileva, G. Sarychev, U. Kondrya, M. Mironova, A. Sapach, O. Selina, U. Budanova, S. Burov, Y. Sebyakin, E. Markvicheva // *Mater. Sci. Eng. C*. – 2019. – V. 100. – P. 724-734.

214. Kawataki T. Remarkable long-term stability of cerasome as an organicoorganic hybrid nanocontainer for water-soluble macromolecules / T. Kawataki, K. Yasuhara, J.I. Kikuchi // *Chem. Lett.* – 2011. – V. 40. – № 5. – P. 461-463.

215. Ma Y. Gold nanoshell nanomicelles for potential magnetic resonance imaging, light-triggered drug release, and photothermal therapy / Y. Ma, X. Liang, S. Tong, G. Bao, Q. Ren, Z. Dai // *Adv. Funct. Mater.* – 2013. – V. 23. – № 7. – P. 815-822.

216. Liang X. Design and synthesis of lipidic organoalkoxysilanes for the self-assembly of liposomal nanohybrid cerasomes with controlled drug release properties / X. Liang, X. Li, L. Jing, P. Xue, L. Jiang, Q. Ren, Z. Dai // *Chem. - Eur. J.* – 2013. – V. 19. – № 47. – P. 16113-16121.

217. Zhou G. Redox responsive liposomal nanohybrid cerasomes for intracellular drug delivery / G. Zhou, L. Li, J. Xing, S. Jalde, Y. Li, J. Cai, J. Chen, P. Liu, N. Gu, M. Ji // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. – 2016. – V. 148. – P. 518-525.

218. Liang X. Conjugation of Porphyrin to Nanohybrid Cerasomes for Photodynamic Diagnosis and Therapy of Cancer / X. Liang, X. Li, X. Yue, Z. Dai // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2011. – V. 50. – № 49. – P. 11622-11627.

219. Wang Y. Liposomal nanohybrid cerasomes for mitochondria-targeted drug delivery / Y. Wang, B. Wang, H. Liao, X. Song, H. Wu, H. Wang, H. Shen, X. Ma, M. Tan // *J. Mater. Chem. B*. – 2015. – V. 3. – № 36. – P. 7291-7299.

220. Li Y. EGFR-targeted liposomal nanohybrid cerasomes: Theranostic function and immune checkpoint inhibition in a mouse model of colorectal cancer / Y. Li, Y. Du, X. Liang, T. Sun, H. Xue, J. Tian, Z. Jin // *Nanoscale*. – 2018. – V. 10. – № 35. – P. 16738-16749.
221. Sarychev G.A. Stabilized phospholipid dispersions based on organosilicon amphiphiles / G.A. Sarychev, M.S. Mironova, U.A. Budanova, Y.L. Sebyakin // *Mosc. Univ. Chem. Bull.* – 2017. – V. 72. – № 1. – P. 38-41.
222. Li Y. Doping Hydroxylated Cationic Lipid into PEGylated Cerasome Boosts in vivo siRNA Transfection Efficacy / Y. Li, S. Zheng, X. Liang, Y. Jin, Y. Wu, H. Bai, R. Liu, Z. Dai, Z. Liang, T. Shi // *Bioconjug. Chem.* – 2014. – V. 25. – № 11. – P. 2055-2066.
223. Liang X. Nanohybrid Liposomal Cerasomes with Good Physiological Stability and Rapid Temperature Responsiveness for High Intensity Focused Ultrasound Triggered Local Chemotherapy of Cancer / X. Liang, J. Gao, L. Jiang, J. Luo, L. Jing, X. Li, Y. Jin, Z. Dai // *ACS Nano*. – 2015. – V. 9. – № 2. – P. 1280-1293.
224. Leung S.L. Organic–inorganic nanovesicles for doxorubicin storage and release / S.L. Leung, Z. Zha, W. Teng, C. Cohn, Z. Dai, X. Wu // *Soft Matter*. – 2012. – V. 8. – № 21. – P. 5756-5764.
225. Sun S. Bubble-Manipulated Local Drug Release from a Smart Thermosensitive Cerasome for Dual-Mode Imaging Guided Tumor Chemo-Photothermal Therapy / S. Sun, S. Sun, Y. Sun, P. Wang, J. Zhang, W. Du, S. Wang, X. Liang // *Theranostics*. – 2019. – V. 9. – № 26. – P. 8138-8154.
226. Li S. A novel tumor-targeted thermosensitive liposomal cerasome used for thermally controlled drug release / S. Li, G. Yin, X. Pu, Z. Huang, X. Liao, X. Chen // *Int. J. Pharm.* – 2019. – V. 570. – № 24. – P. 118660.
227. Wang Y. Safety evaluation of liposomal nanohybrid cerasomes and their application in the release of 10-hydroxycamptothecin / Y. Wang, Y. Chen, M. Zhang, H. Qu, J. Zheng, Q. Pang, X. Yan // *RSC Adv.* – 2016. – V. 6. – № 20. – P. 16292-16300.
228. Mast M.P. Nanomedicine at the crossroads – A quick guide for IVIVC / M.P. Mast, H. Modh, C. Champanhac, J.W. Wang, G. Storm, J. Krämer, V. Mailänder, G. Pastorin, M.G. Wacker // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2021. – V. 179. – P. 113829.
229. Rizwanullah M. Advancement in design of nanostructured lipid carriers for cancer targeting and theranostic application / M. Rizwanullah, M.Z. Ahmad, A. Garg, J. Ahmad // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* – 2021. – V. 1865. – № 9. – P. 129936.

230. Suzuki R. *Nanomaterials in Pharmacology : Methods in Pharmacology and Toxicology* / R. Suzuki [и др.]; ред. Z.-R. Lu, S. Sakuma. – New York, NY: Springer New York, 2016.

231. Behzadi S. *Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell* / S. Behzadi, V. Serpooshan, W. Tao, M.A. Hamaly, M.Y. Alkawareek, E.C. Dreaden, D. Brown, A.M. Alkilany, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi // *Chem. Soc. Rev.* – 2017. – V. 46. – № 14. – P. 4218-4244.

232. Khan S. *A review on nanotechnology: Properties, applications, and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms* / S. Khan, S. Mansoor, Z. Rafi, B. Kumari, A. Shoaib, M. Saeed, S. Alshehri, M.M. Ghoneim, M. Rahamathulla, U. Hani, F. Shakeel // *J. Mol. Liq.* – 2022. – V. 348. – P. 118008.

233. Broadwell R.D. *Endocytic and exocytic pathways of the neuronal secretory process and trans synaptic transfer of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase in vivo* / R.D. Broadwell, B.J. Balin // *J. Comp. Neurol.* – 1985. – V. 242. – № 4. – P. 632-650.

234. Lu W. *Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle with its transcytosis ability and little toxicity against blood–brain barrier* / W. Lu, Y.-Z. Tan, K.-L. Hu, X.-G. Jiang // *Int. J. Pharm.* – 2005. – V. 295. – № 1-2. – P. 247-260.

235. Lu W. *Cationic Albumin–Conjugated Pegylated Nanoparticles Allow Gene Delivery into Brain Tumors via Intravenous Administration* / W. Lu, Q. Sun, J. Wan, Z. She, X.-G. Jiang // *Cancer Res.* – 2006. – V. 66. – № 24. – P. 11878-11887.

236. Shimon-Hophy M. *Regional blood-brain barrier transport of cationized bovine serum albumin in awake rats* / M. Shimon-Hophy, K.C. Wadhvani, K. Chandrasekaran, D. Larson, Q.R. Smith, S.I. Rapoport // *Am. J. Physiol. Regul.* – 1991. – V. 261. – № 2. – P. R478-R483.

237. Pavlov R.V. *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 // *Int. J. Pharm.* – 2020. – V. 587. – P. 119640.

238. Huang R. *The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain* / R. Huang, W. Ke, Y. Liu, C. Jiang, Y. Pei // *Biomaterials.* – 2008. – V. 29. – № 2. – P. 238-246.

239. Maussang D. *Glutathione conjugation dose-dependently increases brain-specific liposomal drug delivery in vitro and in vivo* / D. Maussang, J. Rip, J. van Kregten, A. van

den Heuvel, S. van der Pol, B. van der Boom, A. Reijerkerk, L. Chen, M. de Boer, P. Gaillard, H. de Vries // *Drug Discov. Today Technol.* – 2016. – V. 20. – P. 59-69.

240. Asha Spandana K.M. A comprehensive review of nano drug delivery system in the treatment of CNS disorders / K.M. Asha Spandana, M. Bhaskaran, V.V.S.N.R. Karri, J. Natarajan // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2020. – V. 57. – P. 101628.

241. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles / E. Fröhlich // *Int. J. Nanomedicine.* – 2012. – V. 7. – P. 5577-5591.

242. Vanbever R. Cationic Nanoliposomes Are Efficiently Taken up by Alveolar Macrophages but Have Little Access to Dendritic Cells and Interstitial Macrophages in the Normal and CpG-Stimulated Lungs / R. Vanbever, C. Loira-Pastoriza, N. Dauguet, C. Hérin, S. Ibouaadata, K. Vanvarenberg, B. Ucakar, D. Tyteca, F. Huaux // *Mol. Pharm.* – 2019. – V. 16. – № 5. – P. 2048-2059.

243. Xia Y. Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery / Y. Xia, J. Tian, X. Chen // *Biomaterials.* – 2016. – V. 79. – P. 56-68.

244. Hirose M. Enhancing the Endocytosis of Phosphatidylserine-Containing Liposomes through Tim4 by Modulation of Membrane Fluidity / M. Hirose, T. Ueno, H. Nagumo, Y. Sato, K. Sakai-Kato // *Mol. Pharm.* – 2022. – V. 19. – № 1. – P. 91-99.

245. Kang J.H. The Effect of Surface Charges on the Cellular Uptake of Liposomes Investigated by Live Cell Imaging / J.H. Kang, W.Y. Jang, Y.T. Ko // *Pharm. Res.* – 2017. – V. 34. – № 4. – P. 704-717.

246. Bombelli C. Efficiency of liposomes in the delivery of a photosensitizer controlled by the stereochemistry of a gemini surfactant component / C. Bombelli, A. Stringaro, S. Borocci, G. Bozzuto, M. Colone, L. Giansanti, R. Sgambato, L. Toccaceli, G. Mancini, A. Molinari // *Mol. Pharm.* – 2010. – V. 7. – № 1. – P. 130-137.

247. Borocci S. How stereochemistry of lipid components can affect lipid organization and the route of liposome internalization into cells / S. Borocci, G. Bozzuto, C. Bombelli, F. Ceccacci, G. Formisano, A. Stringaro, A. Molinari, G. Mancini // *Nanoscale.* – 2021. – V. 13. – № 27. – P. 11976-11993.

248. Zouliati K. Development and evaluation of liposomal nanoparticles incorporating dimethoxycurcumin. In vitro toxicity and permeability studies / K. Zouliati, P. Stavropoulou, M. Chountoulesi, N. Naziris, S. Demisli, E. Mitsou, V. Papadimitriou, M. Chatzidaki, A. Xenakis, C. Demetzos // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* – 2022. – V. 648. – P. 129223.

249. Hervé F. CNS delivery via adsorptive transcytosis / F. Hervé, N. Ghinea, J.M. Scherrmann // *AAPS J.* – 2008. – V. 10. – № 3. – P. 455-472.

250. Sharma G. Advances in nanocarriers enabled brain targeted drug delivery across blood brain barrier / G. Sharma, A.R. Sharma, S.S. Lee, M. Bhattacharya, J.S. Nam, C. Chakraborty // *Int. J. Pharm.* – 2019. – V. 559. – P. 360-372.

251. Hinge N.S. Engineering of structural and functional properties of nanotherapeutics and nanodiagnosics for intranasal brain targeting in Alzheimer's / N.S. Hinge, H. Kathuria, M.M. Pandey // *Appl. Mater. Today.* – 2022. – V. 26. – P. 101303.

252. Yan X. Liposome opsonization / X. Yan, G.L. Scherphof, J.A.A.M. Kamps // *J. Liposome Res.* – 2005. – V. 15. – № 1-2. – P. 109-139.

253. Onishchenko N. Spotlight on the protein corona of liposomes / N. Onishchenko, D. Tretiakova, E. Vodovozova // *Acta Biomater.* – 2021. – V 134. – P. 57-78.

254. Chertok B. Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration / B. Chertok, A.E. David, V.C. Yang // *Biomaterials.* – 2010. – V. 31. – № 24. – P. 6317-6324.

255. Ghitescu L. Surface charge distribution on the endothelial cell of liver sinusoids / L. Ghitescu, A. Fixman // *J. Cell Biol.* – 1984. – V. 99. – № 2. – P. 639-647.

256. Johansson B.B. Blood-Brain Barrier: Role of Brain Endothelial Surface Charge and Glycocalyx / B.B. Johansson // *Ischemic Blood Flow Brain.* – Springer Japan, 2001. – P. 33-38.

257. Mirgorodskaya A.B. Solubilization and catalytic behavior of micellar system based on gemini surfactant with hydroxyalkylated head group / A.B. Mirgorodskaya, E.I. Yackevich, S.S. Lukashenko, L.Y. Zakharova, A.I. Konovalov // *J. Mol. Liq.* – 2012. – V. 169. – P. 106-109.

258. Borse M. Effect of head group polarity and spacer chain length on the aggregation properties of gemini surfactants in an aquatic environment / M. Borse, V. Sharma, V.K. Aswal, P.S. Goyal, S. Devi // *J. Colloid Interface Sci.* – 2005. – V. 284. – № 1. – P. 282-288.

259. Миргородская А.Б. Амфифильные соединения с уретановым фрагментом: синтез, агрегационное поведение, солюбилизационное действие / А.Б. Миргородская, С.С. Лукашенко, Р.А. Кушназарова, Р.Р. Кашапов, Л.Я. Захарова, О.Г. Синяшин // *Журн. орг. химии.* – 2018. – V. 54. – № 7. – P. 985-989.

260. Pavlov R.V. Preparation and cytotoxic properties of porphyrins 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 // Russ. Chem. Bull. – 2022. – V. 71. – № 9. – P. 1992-1997.

261. Schott H. Solubilization of a Water-Insoluble Dye as a Method for Determining Micellar Molecular Weights / H. Schott // J. Phys. Chem. – 1966. – V. 70. – № 9. – P. 2966-2973.

262. Voloshina A.D. Synthesis and antimicrobial and toxic properties of novel 1,3-bis(alkyl)-6-methyluracil derivatives containing 1,2,3- and 1,2,4-triazolium fragments / A.D. Voloshina, V.E. Semenov, A.S. Strobukina, N. V. Kulik, E.S. Krylova, V. V. Zobov, V.S. Reznik // Russ. J. Bioorganic Chem. – 2017. – V. 43. – № 2. – P. 170-176.

263. 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, I.V. Galkina, Sh.K. Latypov, L.Ya. Zakharova // J. Mol. Liq. – 2021. – V. 324. – P. 114721.

264. Banerjee N. Functional alteration of a dimeric insecticidal lectin to a monomeric antifungal protein correlated to its oligomeric status / N. Banerjee, S. Sengupta, A. Roy, P. Ghosh, K. Das, S. Das // PLoS ONE. – 2011. – V. 6. – № 4. – P. e18593.

265. 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 // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – V. 24. – № 4. – P. 3632.

266. Миттел, К. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии / К. Миттел. – Москва: Мир, 1980. – 598 с.

267. 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.

268. Fatma N. Mixed micellization of novel cationic ester-bonded gemini surfactants: Investigations by conductometric and tensiometric measurements / N. Fatma, M. Panda, Kabir-ud-Din // J. Mol. Liq. – 2016. – V. 219. – P. 959-966.

269. Mirgorodskaya A.B. Aggregation behavior and interface properties of mixed surfactant systems gemini 14-s-14/CTABr / A.B. Mirgorodskaya, Y. Karpichev, L.Y.

Zakharova, E.I. Yackevich, I.V. Kapitanov, S.S. Lukashenko, A.F. Popov, A.I. Konovalov // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* – 2014. – V. 457. – № 1. – P. 425-432.

270. Rosen, M. J. *Micelle Formation by Surfactants* / M.J. Rosen, J.T. Kunjappu // *Surfactants and Interfacial Phenomena.* – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. – P. 105-177.

271. Alam M.S. The micellization studies of cationic gemini surfactant, hexanediyl-1,6-bis(dimethylcetylammmonium bromide solutions by conductometric, tensiometric, dye solubilisation, FTIR and ^1H NMR: The influence of adenosine and temperature / M.S. Alam, A. Mohammed Siddiq, M. Ali // *J. Mol. Liq.* – 2022. – V. 349. – P. 118386.

272. Kabir-ud-Din. Conductometric studies of micellization of gemini surfactant pentamethylene-1,5-bis(tetradecyldimethylammmonium bromide) in water and water–organic solvent mixed media / Kabir-ud-Din, P.A. Koya, Z.A. Khan // *J. Colloid Interface Sci.* – 2010. – V. 342. – № 2. – P. 340-347.

273. Pashirova T.N. Synthesis, structure-activity relationship and biological evaluation of tetracationic gemini Dabco-surfactants for transdermal liposomal formulations / T.N. Pashirova, A.S. Sapunova, S.S. Lukashenko, E.A. Burilova, A.P. Lubina, Z.M. Shaihutdinova, T.P. Gerasimova, V.I. Kovalenko, A.D. Voloshina, E.B. Souto, L.Y. Zakharova // *Int. J. Pharm.* – 2020. – V. 575. – P. 118953.

274. Blomberg E. Interactions between Adsorbed Layers of Cationic Gemini Surfactants / E. Blomberg, R. Verrall, P.M. Claesson // *Langmuir.* – 2008. – V. 24. – № 4. – P. 1133-1140.

275. 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.

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

277. Dong D.C. The Py scale of solvent polarities. solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with ϵ_t and γ values / D.C. Dong, M.A. Winnik // *Photochem. Photobiol.* – 1982. – V. 35. – № 1. – P. 17-21.

278. Pérez L. Cationic surfactants from lysine: Synthesis, micellization and biological evaluation / L. Pérez, A. Pinazo, M. Teresa García, M. Lozano, A. Manresa, M. Angelet, M.

Pilar Vinardell, M. Mitjans, R. Pons, M. Rosa Infante // *Eur. J. Med. Chem.* – 2009. – V. 44. – № 5. – P. 1884-1892.

279. Amerkhanova S.K. Antimicrobial properties and cytotoxic effect of imidazolium geminis with tunable hydrophobicity / S.K. Amerkhanova, A.D. Voloshina, A.B. Mirgorodskaya, A.P. Lyubina, D.A. Kuznetsova, R.A. Kushnazarova, V.A. Mikhailov, L.Y. Zakharova // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – № 23. – P. 13148.

280. Zhu H.L. Synthesis, Surface and Antimicrobial Activities of Cationic Gemini Surfactants with Semi-Rigid Spacers / H.L. Zhu, Z.Y. Hu, X.M. Ma, J.L. Wang, D.L. Cao // *J. Surfactants Deterg.* – 2016. – V. 19. – № 2. – P. 265-274.

281. Brycki B.E. Antimicrobial activity of gemini surfactants with ether group in the spacer part / B.E. Brycki, A. Szulc, I. Kowalczyk, A. Koziróg, E. Sobolewska // *Molecules.* – 2021. – V. 26. – № 19. – P. 5759.

282. Hao J. Synthesis, surface properties and antimicrobial performance of novel gemini pyridinium surfactants / J. Hao, T. Qin, Y. Zhang, Y. Li, Y. Zhang // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2019. – V. 181. – P. 814-821.

283. Kowalczyk I. Antimicrobial Activity of Gemini Surfactants with Azapolymethylene Spacer / I. Kowalczyk, M. Pakiet, A. Szulc, A. Koziróg // *Molecules.* – 2020. – V. 25. – № 18. – P. 4054.

284. Kuznetsova D.A. Cationic Imidazolium Amphiphiles Bearing a Methoxyphenyl Fragment: Synthesis, Self-Assembly Behavior, and Antimicrobial Activity / D.A. Kuznetsova, D.M. Kuznetsov, S.K. Amerhanova, E.V. Buzmakova, A.P. Lyubina, V.V. Syakaev, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, A.D. Voloshina, L.Ya. Zakharova // *Langmuir.* – 2022. – V. 38. – № 16. – P. 4921-4934.

285. Kuznetsova D.A. Biocompatible supramolecular systems based on novel cationic imidazolium- and urethane-containing amphiphiles: Self-assembly and antimicrobial properties / D.A. Kuznetsova, D.R. Gabdrakhmanov, D.M. Kuznetsov, S.S. Lukashenko, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Ya. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2020. – V. 319. – P. 114094.

286. Kuznetsova D.A. Supramolecular systems based on cationic imidazole-containing amphiphiles bearing hydroxyethyl fragment: Aggregation properties and functional activity / D.A. Kuznetsova, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, A.S. Sapunova,

N.V. Kulik, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, R.R. Kashapov, L.Ya. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2019. – V. 289. – P. 111058.

287. Zhiltsova E.P. Alkylated 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octanes: self-association, catalytic properties, and biological activity / E.P. Zhiltsova, T.N. Pashirova, R.R. Kashapov, N.K. Gaisin, O.I. Gnezdilov, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, N. V. Kulik, V. V. Zobov, L.Ya. Zakharova, A.I. Konovalov // *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* – 2012. – V. 61. – № 1. – P. 113-120.

288. Allen T.M. Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes / T.M. Allen, P. Sapra, E. Moase // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – V. 7. – № 3. – P. 889-894.

289. Almiñana N. New GHK hydrophobic derivatives: Interaction with phospholipid bilayers / N. Almiñana, M.A. Alsina, F. Reig // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2007. – V. 57. – № 2. – P. 243-249.

290. Liang J. Enhanced solubility and targeted delivery of curcumin by lipopeptide micelles / J. Liang, W. Wu, D. Lai, J. Li, C. Fang // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2015. – V. 26. – № 6. – P. 369-383.

291. Chang M. RGD-modified pH-sensitive liposomes for docetaxel tumor targeting / M. Chang, S. Lu, F. Zhang, T. Zuo, Y. Guan, T. Wei, W. Shao, G. Lin // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2015. – V. 129. – P. 175-182.

292. Yaroslavov A.A. Polymer-Induced Flip-Flop in Biomembranes / A.A. Yaroslavov, N.S. Melik-Nubarov, F.M. Menger // *Acc. Chem. Res.* – 2006. – V. 39. – № 10. – P. 702-710.

293. Moss R.A. Dynamics of a bolaamphiphilic lipid in a bilayer liposome / R.A. Moss, T. Fujita, Y. Okumura // *Langmuir.* – 1991. – V. 7. – № 11. – P. 2415-2418.

294. Kirby C. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. / C. Kirby, J. Clarke, G. Gregoriadis // *Biochem. J.* – 1980. – V. 186. – № 2. – P. 591-598.

295. Safinya C.R. Cationic liposome–nucleic acid complexes for gene delivery and gene silencing / C.R. Safinya, K.K. Ewert, R.N. Majzoub, C. Leal // *New J Chem.* – 2014. – V. 38. – № 11. – P. 5164-5172.

296. Zhen Y. Paclitaxel loading in cationic liposome vectors is enhanced by replacement of oleoyl with linoleoyl tails with distinct lipid shapes / Y. Zhen, K.K. Ewert, W.S. Fisher, V.M. Steffes, Y. Li, C.R. Safinya // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 7311.

297. Zhi D. Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery / D. Zhi, S. Zhang, B. Wang, Y. Zhao, B. Yang, S. Yu // *Bioconjug. Chem.* – 2010. – V. 21. – № 4. – P. 563-577.

298. Kuznetsova D.A. Comparative study of cationic liposomes modified with triphenylphosphonium and imidazolium surfactants for mitochondrial delivery / D.A. Kuznetsova, L.A. Vasileva, G.A. Gaynanova, R. V. Pavlov, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, G. V. Sibgatullina, D. V. Samigullin, K.A. Petrov, L.Y. Zakharova, O.G. Sinyashin // *J. Mol. Liq.* – 2021. – V. 330. – P. 115703.

299. Burilova E.A. Bi-functional sterically hindered phenol lipid-based delivery systems as potential multi-target agents against Alzheimer's disease: Via an intranasal route / E.A. Burilova, T.N. Pashirova, I. V. Zueva, E.M. Gibadullina, S. V. Lushchekina, A.S. Sapunova, R.M. Kayumova, A.M. Rogov, V.G. Evtjugin, I.A. Sudakov, A.B. Vyshtakalyuk, A.D. Voloshina, S. V. Bukharov, A.R. Burilov, K.A. Petrov, L.Y. Zakharova, O.G. Sinyashin // *Nanoscale.* – 2020. – V. 12. – № 25. – P. 13757-13770.

300. Li X. Novel mucus-penetrating liposomes as a potential oral drug delivery system: preparation, in vitro characterization, and enhanced cellular uptake. / X. Li, D. Chen, C. Le, C. Zhu, Y. Gan, L. Hovgaard, M. Yang // *Int. J. Nanomedicine.* – 2011. – V. 6. – P. 3151-3162.

301. Guo C. Enhanced corneal permeation of coumarin-6 using nanoliposomes containing dipotassium glycyrrhizinate: In vitro mechanism and in vivo permeation evaluation / C. Guo, F. Cui, M. Li, F. Li, X. Wu // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – № 92. – P. 75636-75647.

302. Sun X. Cellular uptake and elimination of lipophilic drug delivered by nanocarriers / X. Sun, F. Li, Y. Wang, W. Liang // *Pharmazie.* – 2010. – V. 65. – № 10. – P. 737-742.

303. Pretor S. Cellular uptake of coumarin-6 under microfluidic conditions into HCE-T cells from nanoscale formulations / S. Pretor, J. Bartels, T. Lorenz, K. Dahl, J.H. Finke, G. Peterat, R. Krull, A.T. Al-Halhouli, A. Dietzel, S. Büttgenbach, S. Behrends, S. Reichl, C.C. Müller-Goymann // *Mol. Pharm.* – 2015. – V. 12. – № 1. – P. 34-45.

304. Bakardzhiev P. Unprecedented formation of sterically stabilized phospholipid liposomes of cuboidal morphology / P. Bakardzhiev, A. Forsys, B. Trzebicka, T. Andreeva, S. Rangelov // *Nanoscale.* – 2021. – V. 13. – № 36. – P. 15210-15214.

305. Luchini A. Structural Organization of Cardiolipin-Containing Vesicles as Models of the Bacterial Cytoplasmic Membrane / A. Luchini, D. Cavasso, A. Radulescu, G. D'Errico, L. Paduano, G. Vitiello // *Langmuir.* – 2021. – V. 37. – № 28. – P. 8508-8516.

306. Aleandri S. How stereochemistry affects the physicochemical features of gemini surfactant based cationic liposomes / S. Aleandri, M.G. Bonicelli, F. Bordi, S. Casciardi, M. Diociaiuti, L. Giansanti, F. Leonelli, G. Mancini, G. Perrone, S. Sennato // *Soft Matter*. – 2012. – V. 8. – № 21. – P. 5904-5915.

307. Stefanutti E. Cationic liposomes formulated with DMPC and a gemini surfactant traverse the cell membrane without causing a significant bio-damage / E. Stefanutti, F. Papacci, S. Sennato, C. Bombelli, I. Viola, A. Bonincontro, F. Bordi, G. Mancini, G. Gigli, G. Risuleo // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2014. – V. 1838. – № 10. – P. 2646-2655.

308. Nordström R. Quantitative Cryo-TEM Reveals New Structural Details of Doxil-Like PEGylated Liposomal Doxorubicin Formulation / R. Nordström, L. Zhu, J. Härmark, Y. Levi-Kalisman, E. Koren, Y. Barenholz, G. Levinton, D. Shamrakov // *Pharmaceutics*. – 2021. – V. 13. – № 1. – P. 123.

309. Takahashi N. Determination of Nonspherical Morphology of Doxorubicin-Loaded Liposomes by Atomic Force Microscopy / N. Takahashi, K. Higashi, K. Ueda, K. Yamamoto, K. Moribe // *J. Pharm. Sci.* – 2018. – V. 107. – № 2. – P. 717-726.

310. Wong C.K. Non-spherical polymersomes: Formation and characterization / C.K. Wong, M.H. Stenzel, P. Thordarson // *Chem. Soc. Rev.* – 2019. – V. 48. – № 15. – P. 4019-4035.

311. Neuhaus F. Vesicle Origami: Cuboid Phospholipid Vesicles Formed by Template-Free Self-Assembly / F. Neuhaus, D. Mueller, R. Tanasescu, S. Balog, T. Ishikawa, G. Brezesinski, A. Zumbuehl // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2017. – V. 56. – № 23. – P. 6515-6518.

312. Liu J. Electrostatically Mediated Liposome Fusion and Lipid Exchange with a Nanoparticle-Supported Bilayer for Control of Surface Charge, Drug Containment, and Delivery / J. Liu, X. Jiang, C. Ashley, C.J. Brinker // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – № 22. – P. 7567-7569.

313. Münter R. Mechanisms of selective monocyte targeting by liposomes functionalized with a cationic, arginine-rich lipopeptide / R. Münter, M. Bak, E. Christensen, P.J. Kempen, J.B. Larsen, K. Kristensen, L. Parhamifar, T.L. Andresen // *Acta Biomater.* – 2022. – V. 144. – P. 96-108.

314. Parvaz S. A brief survey on the advanced brain drug administration by nanoscale carriers: With a particular focus on AChE reactivators / S. Parvaz, R. Taheri-Ledari, M.S. Esmaeili, M. Rabbani, A. Maleki // *Life Sci.* – 2020. – V. 240. – P. 117099.

315. Eloy J.O. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery / J.O. Eloy, M. Claro de Souza, R. Petrilli, J.P.A. Barcellos, R.J. Lee, J.M. Marchetti // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. – 2014. – V. 123. – P. 345-363.

316. Eliyahu H. Lipoplex-induced hemagglutination: potential involvement in intravenous gene delivery / H. Eliyahu, N. Serval, A. Domb, Y. Barenholz // *Gene Ther.* – 2002. – V. 9. – № 13. – P. 850-858.

317. Buzyurova D.N. Surface modification of pralidoxime chloride-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced brain reactivation of organophosphorus-inhibited AChE: Pharmacokinetics in rat / D.N. Buzyurova, T.N. Pashirova, I.V. Zueva, E.A. Burilova, Z.M. Shaihutdinova, I.Kh. Rizvanov, V.M. Babaev, K.A. Petrov, E.B. Souto // *Toxicology*. – 2020. – V. 444. – P. 152578.

318. Kuznetsova D.A. Oxime Therapy for Brain AChE Reactivation and Neuroprotection after Organophosphate Poisoning / D.A. Kuznetsova, G.A. Gaynanova, E.A. Vasilieva, R.V. Pavlov, I.V. Zueva, V.M. Babaev, D.M. Kuznetsov, A.D. Voloshina, K.A. Petrov, L.Y. Zakharova, O.G. Sinyashin // *Pharmaceutics*. – 2022. – V. 14. – № 9. – P. 1950.

319. Maiti N.C. J- and H-aggregates of porphyrin - Surfactant complexes: Time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies / N.C. Maiti, S. Mazumdar, N. Periasamy // *J. Phys. Chem. B*. – 1998. – V. 102. – № 9. – P. 1528-1538.

320. Zhang N. Localized delivery of curcumin into brain with polysorbate 80-modified cerasomes by ultrasound-targeted microbubble destruction for improved Parkinson's disease therapy / N. Zhang, F. Yan, X. Liang, M. Wu, Y. Shen, M. Chen, Y. Xu, G. Zou, P. Jiang, C. Tang, H. Zheng, Z. Dai // *Theranostics*. – 2018. – V. 8. – № 8. – P. 2264-2277.

321. Ren H. Role of Liposome Size, Surface Charge, and PEGylation on Rheumatoid Arthritis Targeting Therapy / H. Ren, Y. He, J. Liang, Z. Cheng, M. Zhang, Y. Zhu, C. Hong, J. Qin, X. Xu, J. Wang // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2019. – V. 11. – № 22. – P. 20304-20315.

322. Lin X. Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles / X. Lin, Tian, Wei, Feng, Huang, Wang, Ren, Diao // *Int. J. Nanomedicine*. – 2011. – V. 6. – P. 445.

ПРИЛОЖЕНИЕ

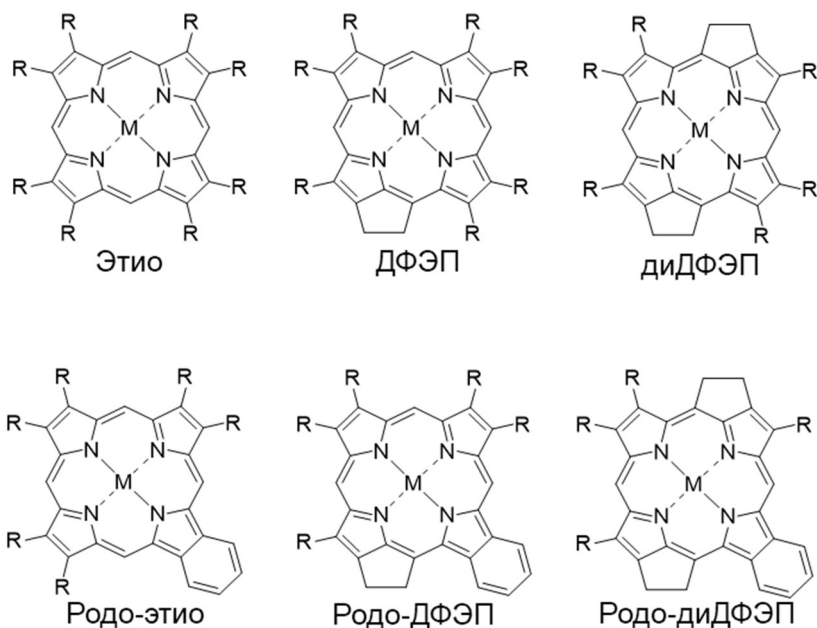


Рисунок П1. Структуры гомологических представителей порфиринов, детектированные в составе порфиринов, выделенных из нефти.

Таблица П1. Массовое распределение представителей в составе порфиринов, выделенных из нефти.

| Порфирин | Этио | ДФЭП | диДФЭП | Родо-этио | Родо-ДФЭП | Родо-диДФЭП |
|------------------|------|------|--------|-----------|-----------|-------------|
| Массовая доля, % | 23.4 | 48.1 | 13.2 | 6.7 | 4.3 | 4.3 |

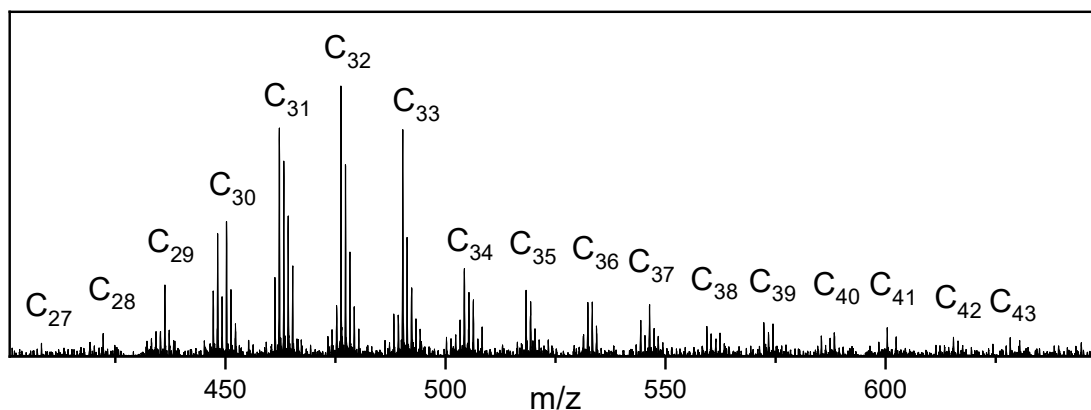


Рисунок П2. Масс-спектр МАЛДИ смеси нефтяных порфиринов, использованных в работе.

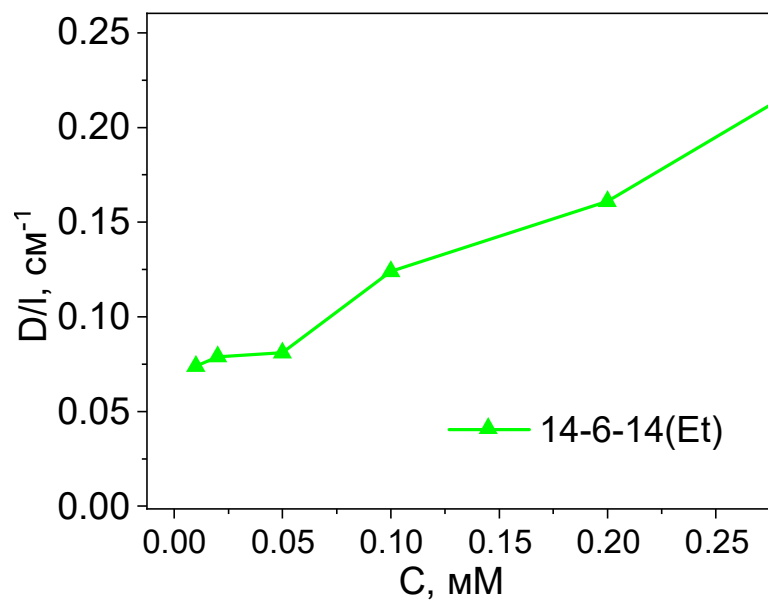


Рисунок П3. Приведенная оптическая плотность растворов ПАВ 14-6-14(Et) разной концентрации при солюбилизации гидрофобного красителя ООТ, 25 °С

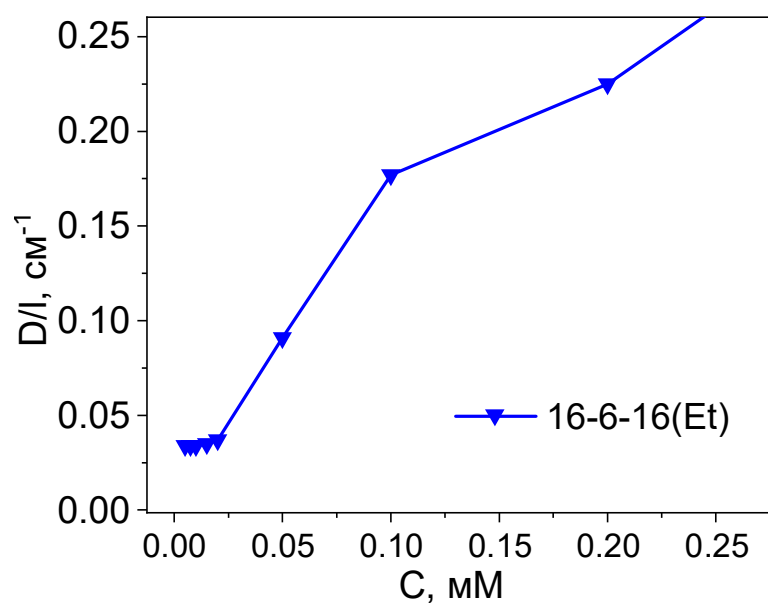


Рисунок П4. Приведенная оптическая плотность растворов ПАВ 16-6-16(Et) разной концентрации при солюбилизации гидрофобного красителя ООТ, 25 °С