

*На правах рукописи*



**Разуваева Юлия Сергеевна**

**СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ КАЛИКС[4]РЕЗОРЦИНОВ  
И ИОННЫХ ПАВ: МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ,  
САМООРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ**

1.4.4. Физическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Казань – 2021**

Работа выполнена на кафедре органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

Научный руководитель: **Кандидат химических наук  
Кашапов Руслан Равилевич**

Официальные оппоненты: **Антина Елена Владимировна**  
доктор химических наук, главный научный сотрудник  
лаборатории 1-7. Физическая химия растворов макроциклических соединений, Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН

**Миронова Диана Александровна**  
кандидат химических наук, доцент кафедры органической и медицинской химии Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физической химии и электрохимии им.  
А.Н.Фрумкина Российской академии наук, г. Москва**

Защита состоится «24» декабря 2021 года в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 24.1.225.01 при ФИЦ КазНЦ РАН по адресу: г. Казань, ул. Академика Арбузова, дом 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, конференц-зал.

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

Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим направлять по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, дом 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, учёному секретарю диссертационного совета, e-mail: [toropchina@iopc.ru](mailto:toropchina@iopc.ru).

Автореферат разослан «    » ноября 2021 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



А.В. Торопчина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В настоящее время наноматериалы с заданными структурой и физико-химическими свойствами находят широкое применение во многих сферах деятельности. Весьма перспективным способом их получения является спонтанная самоорганизация молекулярных строительных блоков при случайных столкновениях в реальных дисперсных системах в растворе и на межфазной границе. В связи с этим, особое внимание приковано к амфифильным молекулам и супрамолекулярным амфифилам (супраамфифилам), которые могут формировать в водной среде различные упорядоченные агрегаты. Одним из направлений применения наноматериалов является создание наноконтейнеров для контролируемого связывания и высвобождения лекарственных средств. Включение лекарственного вещества в наноконтейнер может решить множество проблем, связанных с деградацией лекарств под действием различных факторов, низкой биодоступностью, а также повысить эффективность действия благодаря нацеливающим функциональным фрагментам наноконтейнеров.

Среди всего многообразия амфифильных молекул особый интерес для создания лекарственных наноконтейнеров вызывают амфифильные макроциклы, а именно каликсарены. Низкая токсичность, биосовместимость каликсаренов, а также способность к комплексообразованию с широким спектром органических и неорганических веществ закладывают прочную основу для их применения в медицине и фармацевтике. Кроме того, эти макроциклы имеют гидрофобную полость с регулируемым размером и конформацией, а верхний и нижний ободы каликсаренов могут быть функционализированы разнообразными заместителями, придающими рецепторные, стимул-чувствительные и таргетные свойства. Вышеизложенное обуславливает актуальность представляемой работы и ее практическую значимость.

**Степень разработанности темы исследования.** Хотя возможность применения наноконтейнеров для эффективной адресной доставки лекарств исследуется достаточно давно, использование их на практике широко не распространено и относится в основном к липосомальным формулировкам. Среди исследований, посвященных супраамфифилам на основе каликсаренов и поверхностно-активных веществ (ПАВ), значительная часть сосредоточена на макроциклах, модифицированных сульфонатными и аминотетильными фрагментами. Намного реже встречаются работы, посвященные каликсрезорцинам и каликсаренам, содержащим более сложные структурные фрагменты. С учетом вышеизложенного в рамках диссертационной работы исследованы агрегационные и функциональные свойства каликс[4]резорцинов (К[4]Р), модифицированных сульфонатными, N-метил-D-глюкаминовыми, виологеновыми фрагментами, и смешанных композиций на основе этих макроциклов и ионных ПАВ.

**Целью работы является** создание супрамолекулярных систем на основе амфифильных К[4]Р и смешанных композиций К[4]Р–ПАВ, оценка их физико-химических характеристик и функциональной активности для потенциального применения в качестве наноконтейнеров для биологически активных веществ.

### **Научная новизна работы.**

1. Впервые получены агрегационные характеристики К[4]Р, модифицированных по верхнему ободу N-метил-D-глюкаминовыми группами. Показано влияние структурных факторов (длина и структура гидрофобного фрагмента) на физико-химические свойства амфифильных К[4]Р, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми и виологеновыми группами.

2. Впервые изучены биологические свойства К[4]Р, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми и виологеновыми группами. Обнаружена низкая токсичность модифицированных К[4]Р. Показано, что пришивка N-метил-D-глюкаминовых групп к макроциклическому каркасу улучшает степень проникновения закапсулированного лекарства, а модификация виологеновыми группами снижает токсичность по сравнению с виологеновым ПАВ.

3. Получены агрегационные характеристики бинарных систем К[4]Р–ПАВ. Обнаружено,

что добавка макроцикла к растворам ПАВ снижает значение критической концентрации агрегации (ККА). Впервые обнаружено различное влияние додецилсульфата натрия (ДСН) на агрегационное поведение амфифильных К[4]Р, модифицированных виологеновыми фрагментами, а также катионных ПАВ – на аминометилированные К[4]Р, содержащие сульфогруппы.

4. Охарактеризована функциональная активность индивидуальных К[4]Р, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми и виологеновыми фрагментами, и их смешанных композиций с ПАВ. Определены солубилизирующие способности по отношению к гидрофобным (судан I, рутин и кверцетин) и гидрофильным субстратам (красителю родамину Б и лекарственному препарату доксорубину (DOX)).

5. Впервые исследовано взаимодействие сульфонатных К[4]Р с металлосодержащими ПАВ (металлоПАВ). Выявлен механизм взаимодействия компонентов и определены оптимальные составы композиций для инкапсуляции биологически активных молекул (на примере цисплатина (cisPt)).

6. Оценено влияние инкапсуляции лекарственных препаратов на их биологическую активность. Зафиксировано положительное влияние инкапсуляции DOX в агрегаты индивидуального N-метил-D-глюкаминового К[4]Р и смешанной композиции виологенового К[4]Р с ДСН на противоопухолевую активность лекарства. Показано, что система на основе сульфонатного К[4]Р и металлоПАВ способна к связыванию cisPt, тем самым селективно усиливая противоопухолевую активность лекарственного препарата.

**Методы исследования.** В рамках данной работы применяли широкий комплекс физико-химических методов исследования, в который входили тензиометрия, кондуктометрия, рН-метрия, динамическое и электрофоретическое светорассеяние, спектроскопия <sup>1</sup>H ЯМР, флуориметрия, УФ спектроскопия, турбидиметрия, просвечивающая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия. Оценка биологических свойств включала определение антимикробной активности (метод серийных разведений), гемолитической активности (колориметрический метод), флуориметрическое определение цитотоксичности, степени проникновения лекарств в клетку (проточная цитометрия и флуоресцентная микроскопия).

**Теоретическая и практическая значимость.** В диссертационной работе сформирована информационная база, характеризующая агрегационные, солубилизационные и биологические свойства амфифильных К[4]Р и смешанных композиций К[4]Р–ПАВ. Установлена корреляция «структура – активность» при варьировании длины алкильных радикалов на нижнем ободе макроциклов. Продемонстрировано влияние К[4]Р на агрегационные и солубилизационные свойства ПАВ. Выявленные закономерности самоорганизации и функциональной активности композиций К[4]Р–ПАВ позволяют создавать эффективные биосовместимые наноконтейнеры с контролируемыми свойствами, что имеет важное практическое значение при разработке носителей для доставки лекарственных веществ.

#### **На защиту выносятся:**

1. Закономерность изменения агрегационной способности N-метил-D-глюкаминовых К[4]Р при варьировании структуры их нижнего обода.

2. Количественная оценка агрегационных свойств виологеновых К[4]Р, содержащих углеводородные цепи различной длины на нижнем ободе.

3. Изменение агрегационной активности и структуры агрегатов катионных ПАВ и металлоПАВ в присутствии сульфонатных К[4]Р.

4. Совместная агрегация и функциональная активность виологеновых К[4]Р в присутствии ДСН.

5. Влияние супрамолекулярных систем на основе К[4]Р на увеличение растворимости гидрофобных красителя (судан I) и лекарственных веществ (кверцетин и рутин).

6. Оценка способности супрамолекулярных систем на основе К[4]Р к инкапсуляции гидрофильных красителя (родамин Б) и лекарственных веществ (DOX, cisPt).

7. Селективная цитотоксическая активность виологеновых K[4]P по отношению к опухолевым клеткам M-HeLa, а также усиление противоопухолевой активности DOX и cisPt, связанных агрегатами на основе виологеновых и сульфонатных K[4]P соответственно.

**Обоснованность и достоверность полученных результатов** обусловлена применением широкого ряда физико-химических методов и подтверждается высокой корреляцией данных, полученных разными методами. Результаты работы интерпретированы в рамках современных теоретических представлений, согласуются с имеющимися литературными сведениями и опубликованы в рецензируемых журналах, индексируемых базами данных Web of Sciences, Scopus и РИНЦ.

**Апробация работы.** На основе результатов, представленных в диссертационной работе, сделаны доклады на 1-м Российско-Китайском семинаре по органической и супрамолекулярной химии (Казань, 2018); V Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (Санкт-Петербург, 2018); Марковниковском конгрессе по органической химии (Москва-Казань, 2019); VI Международной конференции «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, 2019); I, II и III школах-конференциях для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2019, 2020, 2021); Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2021); Первой Всероссийской школы по медицинской химии для молодых ученых «MedChemSchool 2021» (Новосибирск, 2021).

**Публикации.** Результаты диссертационного исследования опубликованы в 8 статьях в журналах, входящих в перечень, рекомендуемый ВАК РФ, и 8 тезисах докладов.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы (237 литературных ссылок на публикации отечественных и зарубежных авторов). Общий объем диссертации составляет 140 страниц, включая 24 таблицы, 89 рисунков и 1 приложение.

**Личный вклад автора.** Автор принимал участие в изучении и обобщении литературы по теме диссертации, в постановке задачи, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных данных и формулировании выводов, подготовке публикаций по теме диссертационной работы. Все представленные в диссертации результаты получены автором лично либо при его непосредственном участии.

**Работа выполнена** на кафедре органической химии Казанского национального исследовательского технологического университета. Работа проведена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда РФ 17-73-20253 «Супрамолекулярный дизайн наноконтейнеров на основе макроциклов и амфифилов для инкапсулирования лекарственных веществ».

Автор выражает глубокую признательность руководителю работы с.н.с. Кашапову Р.Р. и г.н.с. Захаровой Л.Я. (лаборатория высокоорганизованных сред, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) за неоценимую помощь в иницировании, координации и развитии исследований в рамках работы; с.н.с. Лукашенко С.С. (лаборатория высокоорганизованных сред, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) и с.н.с. Зиганшиной А.Ю. (лаборатория химии каликсаренов, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) за синтез исследованных ПАВ и K[4]P; н.с. Низамееву И.Р. (лаборатория электрохимического синтеза, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) и д.б.н. Сальникову В.В. (лаборатория микроскопии, КИББ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) за проведение исследований с использованием просвечивающей электронной микроскопии; а также м.н.с. Сапуновой А.С. и с.н.с. Волошиной А.Д. (лаборатория микробиологии, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное

структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) за проведение экспериментов по определению биологических свойств композиций.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Введение** включает обоснование актуальности работы, формулировку цели и задач диссертационного исследования, характеристику практической значимости и научной новизны.

**Первая глава** представляет собой литературный обзор, в котором рассмотрены современные направления исследований в области организованных систем на основе калликсаренов и калликсрезорцинов, их функциональная активность, применение для инкапсулирования лекарственных веществ.

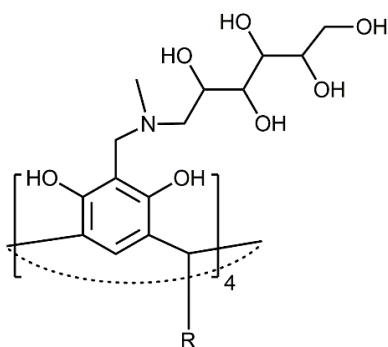
**Вторая глава** представляет собой экспериментальную часть, включающую описание приготовления образцов и проведения физико-химических измерений различными методами, расчет погрешностей измерения.

**Третья глава** посвящена обсуждению результатов исследований агрегационной способности и функциональной активности систем на основе К[4]Р. Для индивидуальных К[4]Р и смешанных систем К[4]Р–ПАВ были определены агрегационные характеристики, охарактеризованы морфологические особенности агрегатов и их солубилизационная способность по отношению к гидрофобному зонду судану I, а также антимикробная активность и цитотоксичность. Для композиций, показавших оптимальные свойства, оценена способность к инкапсуляции противоопухолевых препаратов (DOX и cisPt) и влияние на их противоопухолевую активность.

В рамках диссертационной работы в качестве объектов исследования были выбраны К[4]Р, модифицированные N-метил-D-глюкаминовыми, сульфонатными, виологеновыми фрагментами. Кроме того, в рамках диссертационной работы исследовались смешанные композиции К[4]Р, содержащих сульфонатные и виологеновые фрагменты, с противоположно заряженными ПАВ.

### Супрамолекулярные системы на основе К[4]Р, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами

#### *Агрегационное поведение К[4]Р и их биологические свойства*



- ГКР-1 R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na  
ГКР-2 R = CH<sub>3</sub>  
ГКР-3 R = C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>

Рис. 1. Структуры ГКР-1, ГКР-2, ГКР-3

На первом этапе работ были исследованы агрегационные и солубилизационные характеристики N-метил-D-глюкаминовых К[4]Р, содержащих этилсульфонатные (ГКР-1), метильные (ГКР-2) и n-децильные группы на нижнем ободе (ГКР-3) (рис. 1). Выбор N-метил-D-глюкамина (МГ) в качестве модифицирующего фрагмента обусловлен его способностью к образованию супрамолекулярных аддуктов с органическими соединениями, что значительно увеличивает их растворимость в воде. Кроме того, модификация К[4]Р группами, представляющими собой открытую форму аминасахара, может способствовать повышению эндоцитоза агрегатов за счет поглощения глюкозных фрагментов как источников энергии для раковых клеток.

Стоит отметить низкую водную растворимость немодифицированных К[4]Р с метильными и n-децильными группами на нижнем ободе. Функционализация этих макроциклов МГ-фрагментами незначительно повышает их растворимость. Тем не менее, ГКР-2 растворялся в водном растворе, содержащем двукратный избыток МГ. ГКР-3 предварительно растворяли в ДМСО, а затем добавляли водный раствор МГ до достижения соотношения вода:ДМСО 95:5.

В результате проведенного исследования агрегационного поведения ГКР было обнаружено, что модификация макроциклов МГ-фрагментами снижает значение ККА, что может

быть объяснено благоприятным влиянием водородных связей между гидроксигруппами в составе МГ-фрагментов, причем в растворе ГКР-1 также могут быть реализованы электростатические взаимодействия между отрицательно заряженными сульфогруппами нижнего обода и частично протонированными атомами азота в МГ-группах. Для этилсульфонатного К[4]Р модификация МГ-группами снижает значение ККА с 20 до 14 мМ, а для н-децильного – с 0.33 до 0.13 мМ (табл. 1). В то же время в ряду макроциклов ГКР-1>ГКР-2>ГКР-3 наблюдается снижение значений ККА (табл. 1), обусловленное увеличением влияния гидрофобности нижнего обода.

Табл. 1. Значения ККА для ГКР, определенные методом кондуктометрии.

Соединение	ККА <sub>конд.</sub> , мМ
ГКР-1	14
ГКР-2	7.8
ГКР-3	0.13

Методы динамического рассеяния света (ДРС) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) использовались для определения размера и формы агрегатов, образуемых К[4]Р. В растворе ГКР-1 обнаружено бимодальное распределение размеров (120 и 504 нм) с высокой полидисперсностью. На микрофотографиях ПЭМ молекулы ГКР-1 собраны в агрегаты нечеткой формы размером 40-60 нм (рис. 2а). Вероятной причиной такой высокой полидисперсности являются множественные самосборки по типу «голова к хвосту», образующиеся за счет кулоновских взаимодействий между противоположно заряженными ободами, и/или самосборки по типу «голова к голове», образующиеся за счет водородных связей между МГ-группами соседних молекул. Для ГКР-2 диаметр агрегатов, полученный методом ДРС, соответствует удвоенной молекулярной длине молекулы (3.8 нм), что указывает на образование сферических мицелл благодаря латеральной укладке ароматических колец макроциклов за счет  $\pi$ -стэкинга и водородных связей между соседними молекулами. Изображения ПЭМ подтверждают формирование мелких сферических агрегатов (рис. 2б). В растворе ГКР-3 были зафиксированы агрегаты размером 50-80 нм, которые могут объединяться в более крупные образования, вероятно, благодаря водородному связыванию между МГ-группами, расположенными на поверхности сформированных наночастиц. Изображение ПЭМ подтверждает образование сферических везикулярных структур с отчетливым внутренним ядром (рис. 2в).

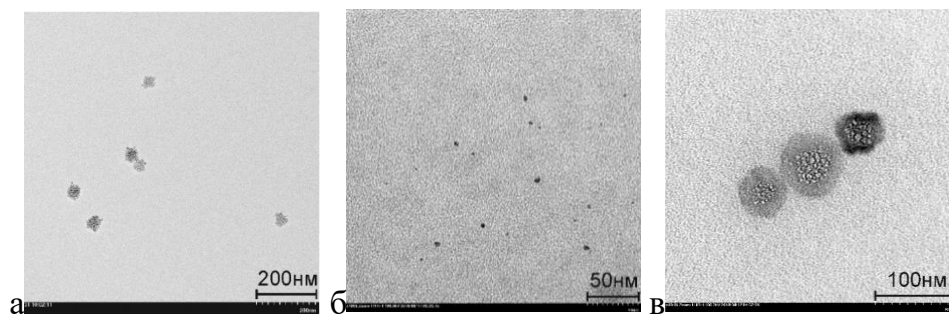


Рис. 2. Изображение ПЭМ для ГКР-1 (а), ГКР-2 (б), ГКР-3 (в).

Исследование солубилизационного действия К[4]Р по отношению к гидрофобному красителю судану I показало неспособность агрегатов, образуемых ГКР-1, к связыванию данного субстрата, что указывает на отсутствие у агрегатов гидрофобного ядра. Молекулы ГКР-2 формируют сферические мицеллярные агрегаты, но объем гидрофобного ядра, образуемого метильными фрагментами, слишком мал для расположения в нем молекул судана I. В то же время агрегаты на основе ГКР-3 способны связывать небольшое количество судана I (рис. 3). Увеличение доли солубилизованного субстрата происходит пропорционально росту концентрации ГКР-3. Относительно невысокая солубилизирующая способность агрегатов ГКР-3 подтверждает образование везикул, имеющих, как правило, небольшую гидрофобную область внутри бислоя.

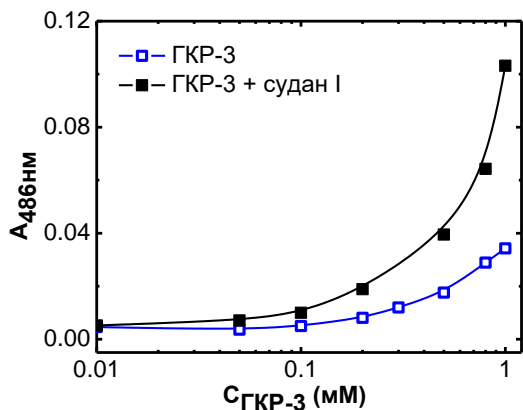


Рис. 3. Концентрационная зависимость оптической плотности при 486 нм в растворах ГКР-3 и ГКР-3 – судан I (вода:ДМСО 95:5),  $l = 10$  мм,  $25^\circ\text{C}$ .

Табл. 2. Цитотоксическая и гемолитическая активность ГКР.

Соединение	HC <sub>50</sub> , мкМ	IC <sub>50</sub> Chang liver, мкМ
ГКР-1	>500	>100
ГКР-2	>500	>100
ГКР-3	>250	>250

ется 0.014 мМ DOX, что соответствует эффективности инкапсуляции (ЭИ) равной 71%.

Было обнаружено, что агрегаты ГКР-3 способны высвобождать инкапсулированный DOX под действием изменения pH среды (рис. 4). В кислой среде происходит протонирование атомов азота в составе МГ-фрагментов, что приводит к их отталкиванию друг от друга. При этом наблюдается изменение структуры агрегатов от везикулярной к мицеллярной, сопровождающееся высвобождением инкапсулированного DOX. Методы ДРС (рис. 5) и ПЭМ подтверждают уменьшение размеров частиц ГКР-3 в кислой среде.

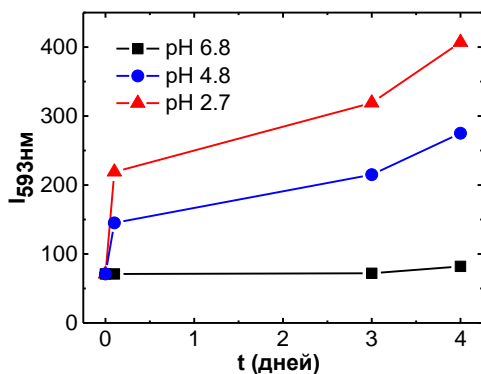


Рис. 4. Изменение интенсивности флуоресценции инкапсулированного DOX в течение 4 дней при различном pH (pH 6.8, 4.8, 2.7),  $25^\circ\text{C}$ .

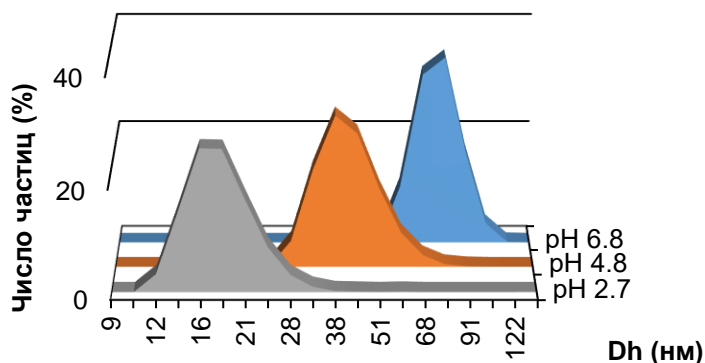


Рис. 5. Распределение размеров агрегатов, усредненное по числу частиц, в водных растворах 0.2 мМ ГКР-3–10 мМ МГ–0.014 мМ DOX, при различном pH (pH 6.8, 4.8, 2.7),  $25^\circ\text{C}$ .

Методом проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии обнаружено, что и свободный, и инкапсулированный DOX способен проникать в клетки. Однако инкапсулированный препарат хуже проникает в ядро, по большей части распределяясь в цитоплазме клетки. Сравнение цитотоксической активности свободного и инкапсулированного DOX показало одинаково высокую токсичность и к опухолевым, и к нормальным клеткам (5.1 и 5.0 мкМ для



Chang liver и M-HeLa, соответственно). Тем не менее, для инкапсулированного препарата наблюдается снижение некротической гибели клеток и повышение числа клеток в стадии апоптоза (рис. 6). Таким образом, лекарственный наноконтейнер на основе ГКР-3 демонстрирует перспективы использования в качестве лекарственного наноконтейнера за счет индукции апоптоза в клеточных линиях M-HeLa.

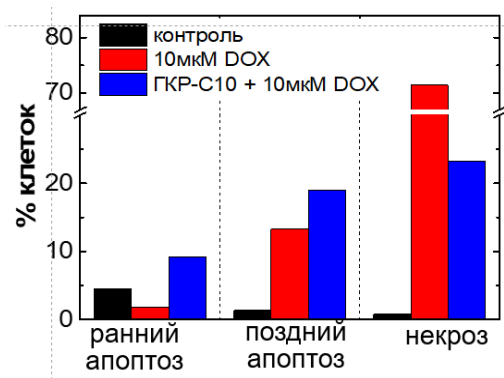


Рис. 6. Гистограмма количества клеток M-HeLa (% от общего количества) на стадиях апоптоза и некроза для контрольного образца и образцов после инкубации с DOX: свободным и инкапсулированным в системе 0.2 мМ ГКР-3–10 мМ МГ.

### Супрамолекулярные системы на основе ГКР-1 и катионных ПАВ

Как было сказано ранее, ГКР-1 (рис. 1) в растворе образует неоднородные агрегаты, не способные с связыванию субстратов. Для формирования более организованных сферических агрегатов требуется наличие в макроциклической структуре длинных алкильных фрагментов, добавить которые к макроциклическому каркасу К[4]Р можно и без использования химического синтеза, т. е. за счет нековалентных взаимодействий. Для исследования взаимодействия с ГКР-1 были выбраны н-гексадецильные производные ПАВ, содержащие виологеновую (В-16) и винилбипиридиновую (ВБП-16) «головные» группы, а также классическое катионное ПАВ ЦТАБ в качестве сравнительного образца (рис. 7). Катионные ПАВ с пиридиниевыми «головными» группами используются в доставке лекарств и генов, косметике, ингибировании коррозии, полимеризации, очистке сточных вод, приготовлении асфальтовых эмульсий, модификации мембран и т.д. Кроме того, амфифильные молекулы на основе пиридиния также могут проявлять прямые фармакологические эффекты и показывают высокую антимикробную активность.

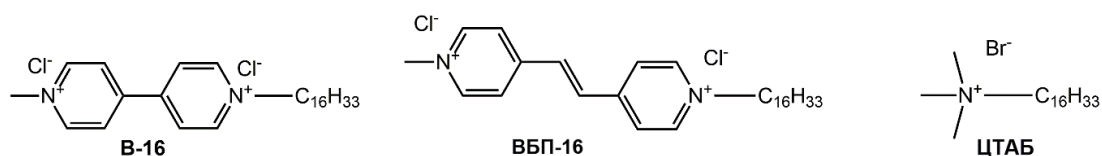


Рис. 7. Структуры бипиридиниевых ПАВ

Набором физико-химических методов, включающим тензио-, кондукто- и спектрофотометрию, было исследовано агрегационное поведение бипиридиниевых ПАВ в водных растворах и оценено влияние добавки ГКР-1 на их агрегационные характеристики. Обнаружено, что присутствие макроцикла снижает порог агрегации (табл. 4). Более того, для смешанных систем ГКР-1–ПАВ зафиксирована меньшая солюбилизующая способность по отношению к гидрофобному судану I. Данное явление может быть связано с изменением структуры смешанных агрегатов, а именно образованием везикулярных структур с меньшей солюбилизационной емкостью. Методами ПЭМ (рис. 8) и ДРС (табл. 5) подтверждено формирование крупных сферических агрегатов в смешанных системах.

Для смешанных систем ГКР-1–ПАВ исследовалась способность к инкапсуляции родамина Б. Были исследованы композиции разного стехиометрического состава и выявлены оптимальные соотношения компонентов ГКР-1 и ПАВ, при которых инкапсулируется наибольшее количество родамина Б. Затем для этих композиций было исследовано влияние общей

концентрации супраамфилов на инкапсулирующую способность систем. В табл. 5 представлены композиции ГКР–ПАВ, показавшие наилучшую инкапсуляцию.

Табл. 4. Значения ККА, определенные различными методами, и солюбилизационной емкости (S), определенные методом солюбилизации Судан I, для индивидуальных ПАВ и в присутствии 1 мМ ГКР-1.

Система	ККА, мМ			S, моль судан I/ моль ПАВ
	Тензиометрия	Кондуктометрия	Солюбилизация гидрофобного зонда	
В-16	2.5	4.2	4.9	0.056
1 мМ ГКР-1–В-16	1	3.8	4	0.011
ВВП-16	1.6	3.9	3.1	0.029
1 мМ ГКР-1–ВВП-16	1.0	1	2.0	0.018

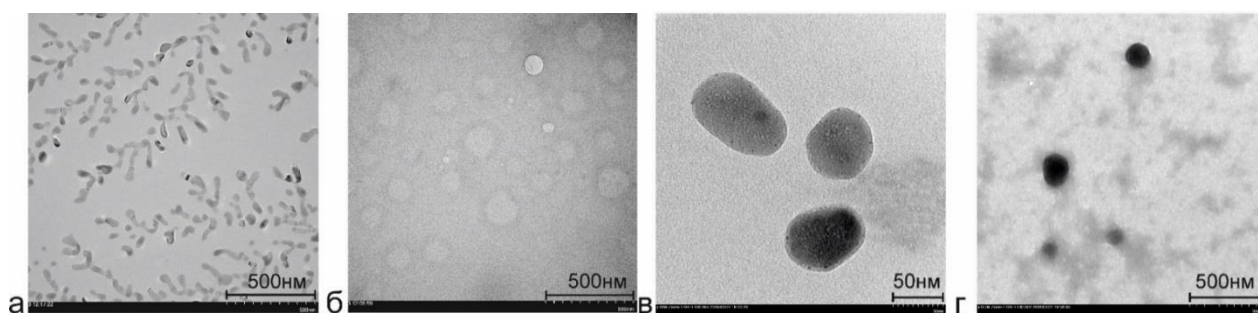


Рис. 8. Изображения ПЭМ для агрегатов ГКР-1:В-16=2:1 (а), ГКР-1:ЦТАБ=1:1 (б), ГКР-1:ВВП-16=1:1 (в) и ГКР-1:ВВП-16<sub>после УФ</sub>=1:2 (г).

Табл. 5. Эффективность инкапсуляции (ЭИ) родамина Б и гидродинамический диаметр ( $D_h$ ) агрегатов в системах ГКР-1–ПАВ.

Состав композиций	ЭИ, %	$D_h$ , нм
1 мМ ГКР-1–1 мМ ЦТАБ	46	136 ± 25
0.5 мМ ГКР-1–0.25 мМ В-16	54	250 ± 5
1 мМ ГКР-1–1 мМ ВВП-16	65	68 ± 11
0.5 мМ ГКР-1–1 мМ ВВП-16 <sub>после УФ</sub>	94	177 ± 13

Важной особенностью ВВП-16 является наличие светочувствительной винилбипиридинеовой группы, способной к цис-транс-изомеризации под действием УФ света. После облучения светом наблюдается снижение и полное исчезновение полосы поглощения при 320 нм, соответствующей транс-форме, и появление полос поглощения при 227 и 258 нм, относящихся к цис-изомеру и продуктам гидратации ПАВ соответственно (рис. 9а). В течение суток наблюдается постепенный обратный переход к транс-форме. Обнаружено, что присутствие ГКР-1 стабилизирует ВВП-16 в транс-изомерной форме (рис. 9б), поскольку при облучении смешанной систем ГКР-1+ВВП-16 изомеризация амфифила не происходит. В растворе ГКР-1+ВВП-16<sub>после УФ</sub>, приготовленном смешением ГКР-1 с предварительно полученной цис-формой ВВП-16, обратный переход в транс-форму также замедляется.

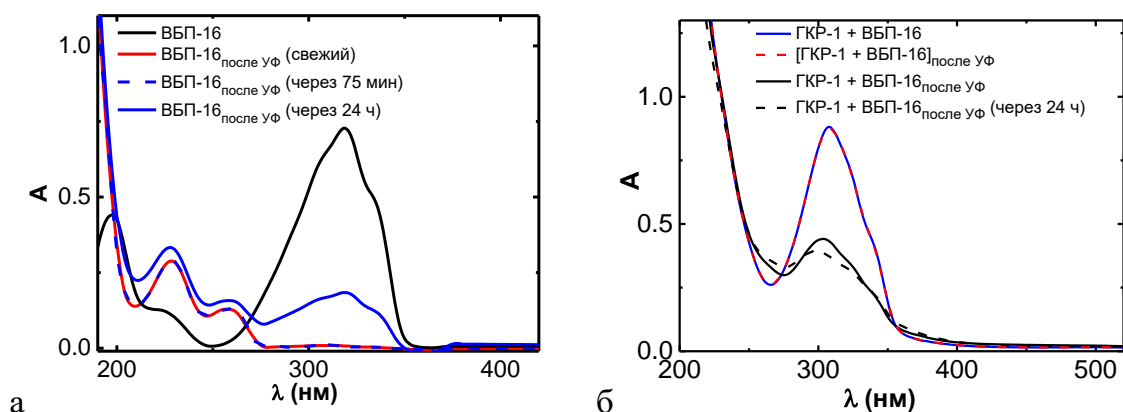


Рис. 9. УФ спектры водных растворов 0.02 мМ ВБП-16 (а) и 0.02 мМ ГКР-1–0.02 мМ ВБП-16 (б),  $l = 10$  мм, 25 °С.

Далее было проведено сравнительное исследование биологической активности смешанных композиций ГКР-1–ПАВ. Индивидуальные ПАВ проявляют высокую антимикробную активность, но в то же время показывают значительную токсичность к нормальным клеткам печени Chang liver и эритроцитам крови. Ожидалось, что электростатическое взаимодействие катионной «головной» группы ПАВ с сульфогруппами ГКР-1 и совместная агрегация снизят токсичность ПАВ, однако данное предположение не подтвердилось. Смешанные композиции сохраняют присущую индивидуальному ПАВ высокую цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам и гемолитическую активность. В связи с этим, использование смешанных систем ГКР-1 с катионными ПАВ для биомедицинского применения невозможно.

### Супрамолекулярные системы на основе сульфонатных К[4]Р и металлоПАВ

Среди множества изученных амфифильных молекул особый интерес представляют ПАВ, содержащие металл в своей структуре. В отличие от традиционных амфифилов, металлоПАВ представляют собой комплекс на основе ПАВ и переходного металла, выступающего в качестве «головной» группы амфифильной структуры. Как и обычные ПАВ, металлоПАВ образуют агрегаты выше ККА, но их структура может отличаться от обычных мицелл, поскольку координация с ионом металла влияет на геометрию молекул. Более того, благодаря наличию переходного металла металлоПАВ может проявлять собственную противораковую активность, а использование наноконтейнеров на основе таких амфифилов позволит повысить эффективность противораковой терапии. В связи с этим, было проведено исследование совместной агрегации К[4]Р, содержащих сульфогруппы на нижнем (СКР) и верхнем ободе (СВКР) (рис. 10а), с металлоПАВ, представляющим собой комплекс нитрата лантана (III) с двумя молекулами *n*-гексадецильных производных 1,4-диазабисцикло[2.2.2]октана (LaS, рис. 10б)<sup>1</sup>.

Для определения наиболее оптимального соотношения К[4]Р–LaS смешанные системы с постоянной концентрацией макроцикла и переменной концентрацией LaS были исследованы методом турбидиметрии (рис. 11а). Максимум на зависимости, соответствующий

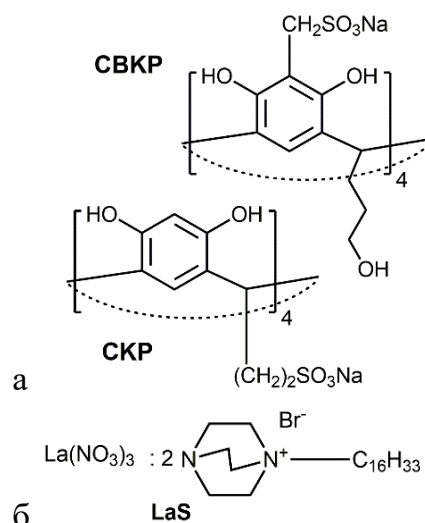
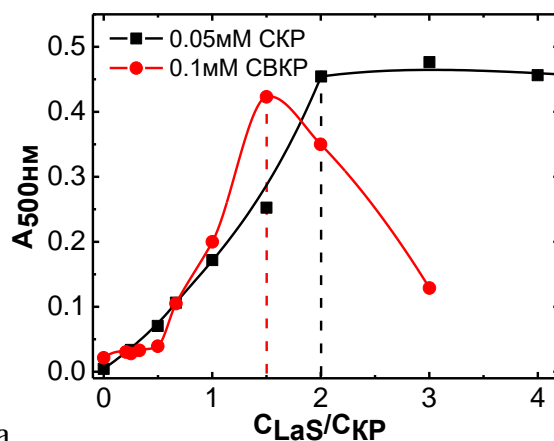


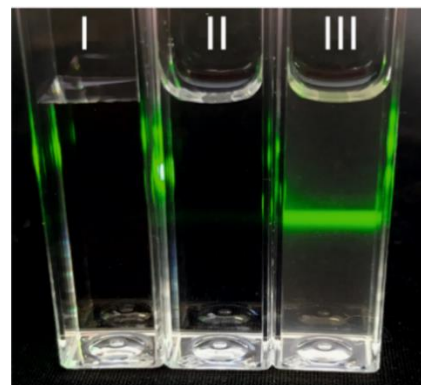
Рисунок 10. Структуры исследуемых К[4]Р (а) и металлоПАВ (б).

<sup>1</sup> Kashapov, R. Supraamphiphilic systems based on metallosurfactant and calix[4]resorcinol: self-assembly and drug delivery potential / R. Kashapov, Y. Razuvayeva, A. Ziganshina, T. Sergeeva, S. Lukashenko, A. Sapunova, A. Voloshina, N. Kashapova, I. Nizameev, V. Salnikov, S. Ziganshina, B. Gareev, L. Zakharova // Inorg. Chem. — 2020. — V. 59, N. 24. — P. 18276–18286.

образованию комплексов, наблюдается при соотношении 2:3 для СВКР:LaS и 1:2 для СКР:LaS. Интересно, что в случае СКР значение абсорбции после перегиба не уменьшается, а остается постоянной. Вероятно, агрегаты, образующиеся при соотношении СКР:LaS 1:2, сохраняются при последующем добавлении LaS. Образование крупных агрегатов в смешанных растворах подтверждается также наличием эффекта Тиндаля (рис. 11б), который не наблюдается для растворов индивидуальных компонентов. Смешанные композиции нестабильны в растворе при повышении общей концентрации системы – при содержании макроциклов выше 0.1 мМ для СКР и 0.5 мМ для СВКР наблюдается образование осадка. Взаимодействие СКР и СВКР с LaS в менее концентрированном растворе сопровождается динамическими изменениями интенсивности поглощения на УФ спектрах и гидродинамических диаметров совместных агрегатов. Отсутствие изменений УФ спектров и размеров агрегатов достигается с течением времени: после приготовления растворов их УФ спектры претерпевают изменения в течение 6–48 часов, но образования осадка при этом не наблюдается. Для дальнейших исследований использовались композиции, содержащие по 0.02 мМ макроциклов, так как при этом количестве смешанные растворы достигали равновесия за 6 часов. Методами ДРС и ПЭМ подтверждается образование агрегатов в смешанных системах макроцикл–металлоПАВ. В растворе, содержащем 0.02 мМ СКР–0.04 мМ LaS, наблюдаются агрегаты размером порядка 90–100 нм (рис. 12а). В то же время в смешанной системе 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS размеры частиц достигают 300 нм (рис. 12б).



а



б

Рис. 11. (а) Зависимость оптической плотности при 500 нм от соотношения компонентов в системе при фиксированной концентрации макроциклов,  $l=10$  мм,  $25^\circ\text{C}$ ; (б) Эффект Тиндаля в растворах индивидуальных компонентов (I – СВКР, II – LaS) и в смешанной системе СВКР:LaS=2:3(III).

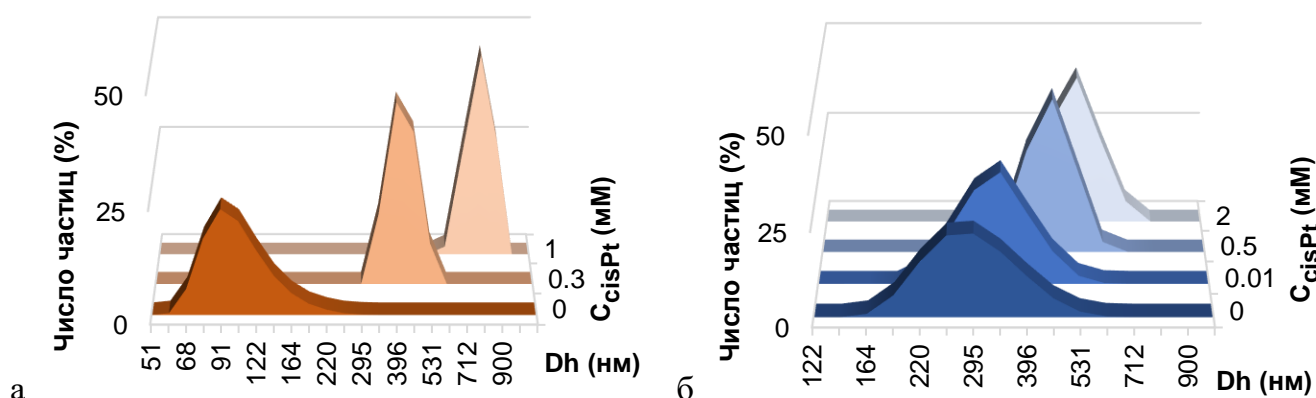


Рис. 12. Распределение агрегатов по размерам, усредненное по числу частиц, в растворах 0.02 мМ СКР–0.04 мМ LaS (а) и 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS (б) в отсутствие и в присутствии различного количества cisPt,  $25^\circ\text{C}$ .

Исследование биологической активности композиций K[4]P–LaS показало, что комплексообразование металлоПАВ с макроциклом не только на порядок снижает цитотоксичность амфифила по отношению к нормальным клеткам, но и придает системе селективность

воздействия на линию опухолевых клеток (табл. 6). В связи с пониженной токсичностью систем К[4]P–LaS к нормальной клеточной линии, далее данные системы были оценены в качестве лекарственных наноконтейнеров.

Табл. 6. Цитотоксическая активность систем на основе К[4]P, LaS и лекарств.

Система (мольное соотношение компонентов)	IC <sub>50</sub> (LaS) / IC <sub>50</sub> (препарат), мкМ	
	Chang liver	M-HeLa
LaS	5.0±0.4	6.0±0.5
СВКР:LaS (2:3)	80.0±0.3	40.0±0.3
cisPt	900±71	60±4.8
LaS–cisPt (3:200)	14.0±1.2/900±69	0.9±0.07/60±5.1
СВКР–LaS–cisPt (2:3:200)	13.0±1.2/900±70	0.2±0.01/14±1.2
СКР–LaS–cisPt (1:2:200)	0.6±0.04/28.5±2.3	1.1±0.08/19±1.6
DOX	6.0±0.5	5.2±0.4
СВКР–LaS–DOX (2:3:0.8)	4.9±0.5/1.3±0.2	4.5±0.4/1.2±0.1
СКР–LaS–DOX (1:2:1.8)	1.1±0.1/1.0±0.1	1.6±0.2/1.4±0.1

### Инкапсуляция гидрофильных субстратов в системах К[4]P–металлоПАВ

Агрегаты, образующиеся в системах К[4]P–LaS, были исследованы в качестве наноконтейнеров для гидрофильных противоопухолевых препаратов DOX и cisPt. Обнаружено, что присутствие третьего компонента в данных системах приводит к снижению её стабильности и выпадению осадка при повышении концентрации композиций. В связи с этим инкапсулирующие свойства и биологическую активность исследовали для композиций, содержащих по 0.02 мМ К[4]P. Система СКР:LaS = 1:2 способна связывать в два раза больше DOX, чем СВКР:LaS = 2:3 (ЭИ = 9 и 4%, соответственно). Эксперименты по определению биологической активности показали, что инкапсуляция DOX в агрегаты К[4]P–LaS усиливает его действие на опухолевые клетки, но в то же время сильно повышает цитотоксичность к нормальным клеткам (табл. 6).

В связи несколько иной, по сравнению DOX, природой cisPt и возможностью формирования комплексов «гость-хозяин» с сульфонатными К[4]P, исследование связывания cisPt агрегатами проводили титрованием растворов СКР:LaS = 2:3 и СВКР:LaS = 1:2 (C<sub>КР</sub> = 0.02 мМ) раствором cisPt (рис. 13). При добавлении cisPt наблюдается уменьшение интенсивности характеристической полосы макроцикла при 289 нм с перегибом при эквимолярном соотношении К[4]P–cisPt, что, вероятно, связано со связыванием молекулы cisPt макроциклом и сопровождается укрупнением частиц (рис. 12).

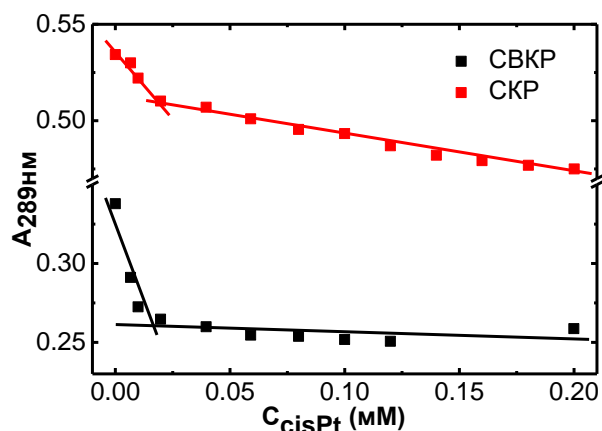


Рис. 13. Изменение абсорбции при 289 нм от концентрации cisPt в системах 0.02 мМ СКР–0.04 мМ LaS и 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS, 25 °С, l=10 мм, 25 °С.

Отдельно стоит отметить влияние смешанных систем К[4]P–металлоПАВ на цитотоксическое действие cisPt (табл. 6). Связывание cisPt в системе СКР–LaS приводит к повышению его цитотоксичности по отношению к нормальным клеткам. В то же время, инкапсуляция cisPt в агрегаты системы СВКР–LaS значительно увеличивает противоопухолевую активность

лекарства, не влияя на цитотоксичность к нормальным клеткам. Такая разница в цитотоксическом действии может говорить об аффинности тройного комплекса СВКР–LaS–cisPt к раковой клеточной линии. Следовательно, включение cisPt в данные агрегаты может быть важным шагом в создании активных химиотерапевтических агентов без усиления их токсических побочных эффектов.

### Супрамолекулярные системы на основе виологеновых K[4]P

Поскольку многие биобарьеры (липидная мембрана, стенка бактериальных клеток, слизистая оболочка, эпителий роговицы) и биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты) имеют отрицательно заряженные фрагменты, большое внимание уделяется катионным наноносителям, которые обеспечивают высокое сродство к клеткам-мишеням. В качестве нацеливающих фрагментов в составе наноконтейнеров могут использоваться виологеновые группы. Однако ПАВ, содержащие такие фрагменты, проявляют высокую цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам, которая не снижается при нековалентных взаимодействиях с K[4]P. Известно, что каликсареновая платформа обеспечивает пространственную предорганизацию структурных фрагментов, что может придавать новые свойства этим фрагментам. Поэтому в работе были синтезированы и исследованы кавитанды на основе K[4]P, функционализированных алкильными фрагментами различной длины по нижнему ободу и виологеновыми фрагментами – по верхнему ободу (BP, рис. 14).

Для BP были определены агрегационные характеристики (табл. 7) и их зависимость от длины алкильных фрагментов. Значения ККА BP в среднем снижаются в два раза при увеличении длины каждого из четырёх гидрофобных радикалов на два метиленовых фрагмента. Подобное поведение характерно для геминальных ПАВ, имеющих две алкильные цепи и две «головные» группы, у которых значения ККА коррелирует не с общим количеством атомов углерода в алкильных цепях, а с числом атомов углерода в одной алкильной цепи. На рис. 15 представлена зависимость десятичного логарифма значений 4ККА (поскольку каждая молекулы K[4]P имеет 4 алкильных радикала) от длины углеводородных фрагментов (n) в структуре BP. Зависимость имеет линейный вид, что указывает на хорошую корреляцию между структурным и агрегационным факторами, и описывается уравнением вида  $\log(4ККА) = A + B \cdot n$  (рис. 15). Значение ККА снижается с увеличением длины алкильных фрагментов и, соответственно, зависимость  $\log(4ККА)$  от длины алкильных групп имеет отрицательный наклон ( $B = -0.229$ ), указывающий на положительный вклад в процесс агрегации гидрофобных взаимодействий между алкильными фрагментами. Значение свободного коэффициента  $A$  обычно положительно для катионных ПАВ, поскольку он включает в себя, в том числе, неблагоприятное влияние на процесс мицеллообразования переноса гидрофильной группы из водной массы в мицеллярную фазу. В данном случае значение коэффициента  $A$  отрицательно ( $-0.568$ ), поскольку он включает в себя вклад не только ионных групп, но и ароматических колец, которые способствуют агрегации благодаря межмолекулярному  $\pi$ -стэкингу.

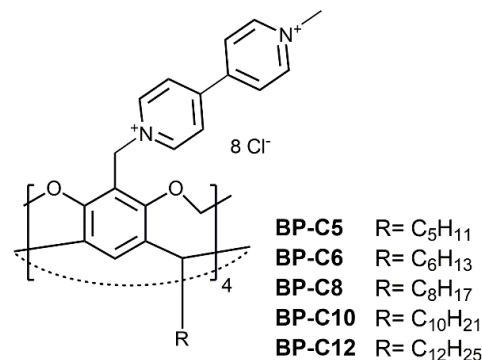


Рис. 14. Структуры BP.

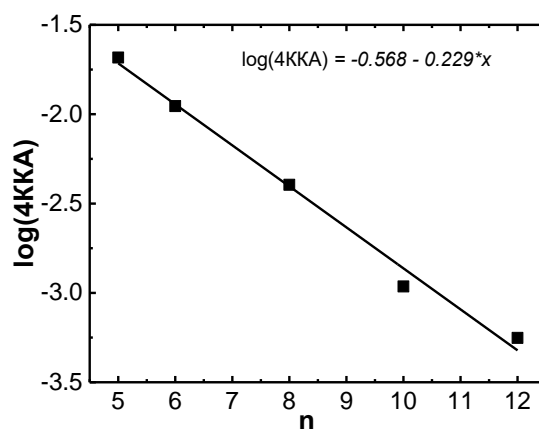


Рис. 15. Зависимость десятичного логарифма 4ККА от количества атомов углерода в составе одного алкильного фрагмента на нижнем ободу BP.

Табл. 7. Значения ККА, определенные различными методами, степени связывания противоионов ( $\beta$ ) и свободной энергии мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ) для индивидуальных ВР.

Соединение	ККА <sub>конд</sub> , мМ	ККА <sub>солюб</sub> , мМ	$\beta$	$\Delta G_m$ , кДж/моль
ВР-С5	5.0*	3.0*	0.5098	-21.54
ВР-С6	2.4	2.8	0.5363	-23.95
ВР-С8	1.1	1.3	0.5927	-28.68
ВР-С10	0.25*	0.30*	0.5953	-32.86
ВР-С12	0.14	0.22	0.5993	-34.95

\* Controlling the size and morphology of supramolecular assemblies of viologen-resorcin[4]arene cavitands / R.R. Kashapov, S. V. Kharlamov, E.D. Sultanova, R.K. Mukhitova, Y.R. Kudryashova, L.Y. Zakharova, A.Y. Ziganshina, A.I. Kononov // Chem. - A Eur. J. — 2014. — V. 20, N. 43. — P. 14018–14025.

Процессы агрегации для всех ВР являются самопроизвольными и термодинамически выгодными, о чем говорят отрицательные значения свободной энергии мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ) (табл. 7). В ряду ВР-С5–ВР-С12 увеличение длины алкильных фрагментов приводит к снижению значений ККА и  $\Delta G_m$ , что вполне закономерно и обусловлено увеличением гидрофобного эффекта (табл. 7). Степень связывания противоионов ( $\beta$ ) возрастает в ряду ВР-С5–ВР-С8, что указывает на формирование более компактных агрегатов с ростом длины алкильных фрагментов (табл. 7). Для длинноцепочечных ВР наблюдаются одинаковые значения  $\beta$ , следовательно, формируемые в их растворах агрегаты имеют одинаковую поверхностную плотность заряда. Изменение  $\beta$  в гомологическом ряду коррелирует с результатами ДРС и ПЭМ (рис. 16), отображающих снижение размеров с увеличением длины алкильных цепей на нижнем ободе. Учитывая литературные данные, можно предположить, что молекулы ВР-С5 и ВР-С6 образуют агрегаты по типу «голова к хвосту» за счет СН- $\pi$ -взаимодействий между алкильными цепями одной молекулы и ароматической полостью другой. Длинноцепочечные производные ВР упорядочены в агрегаты меньшего размера, что указывает на образование мицеллоподобных структур по типу «хвост к хвосту».

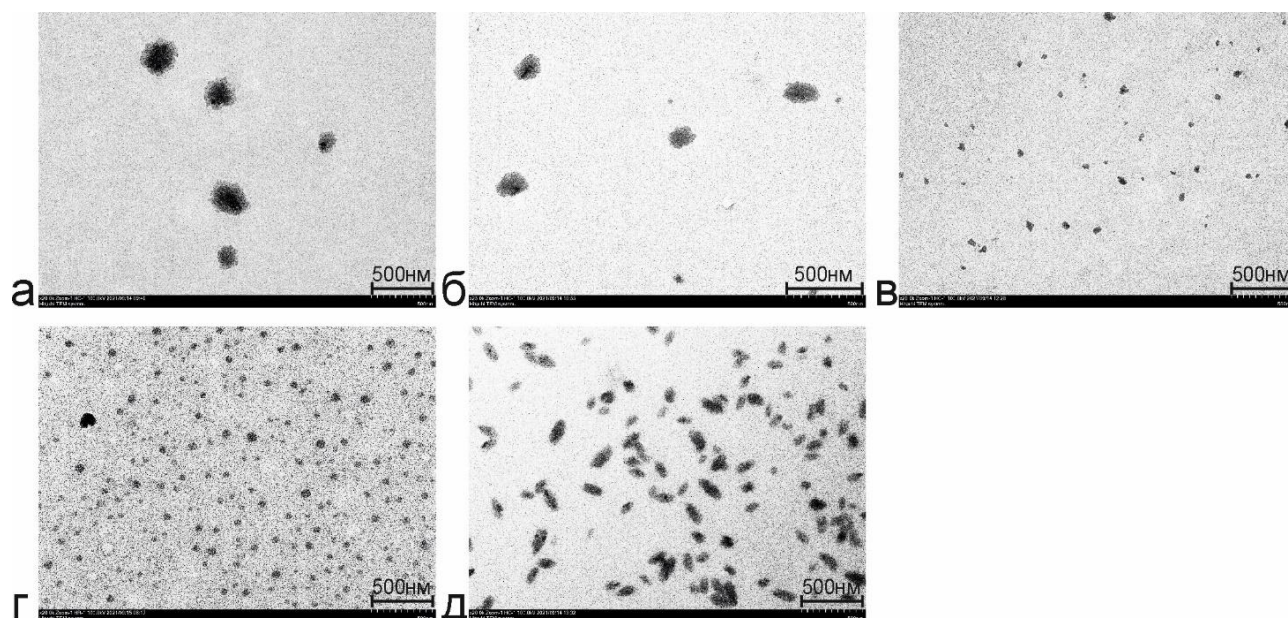


Рис. 16. Изображение ПЭМ для ВР-С5 (а), ВР-С6 (б), ВР-С8 (в), ВР-С10 (г), ВР-С12 (д).

Усиление гидрофобного эффекта в водной среде под действием нижнего обода виологеновых макроциклов отражается на их  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах. Для 10 мМ растворов ВР с увеличением длины алкильных фрагментов на нижнем ободе наблюдается сильнополюсное смещение сигналов протонов ароматических колец *H8*, метиленовых фрагментов *H7*, *H10*, алкильных цепей *H-tail*, а также небольшой сдвиг протонов виологеновых фрагментов *H2*, *H3*, *H4*,

*H5* в слабое поле (рис. 17). Причиной наблюдаемых химических сдвигов сигналов, вероятно, является то, что гидрофобные взаимодействия длинноцепочечных алкильных групп сопровождаются стэкинг-взаимодействиями между ароматическими кольцами соседних молекул. Различный вид и ширина сигналов протонов алкильного фрагмента могут указывать на различную упаковку алкильных цепей ВР в составе формируемых агрегатов.

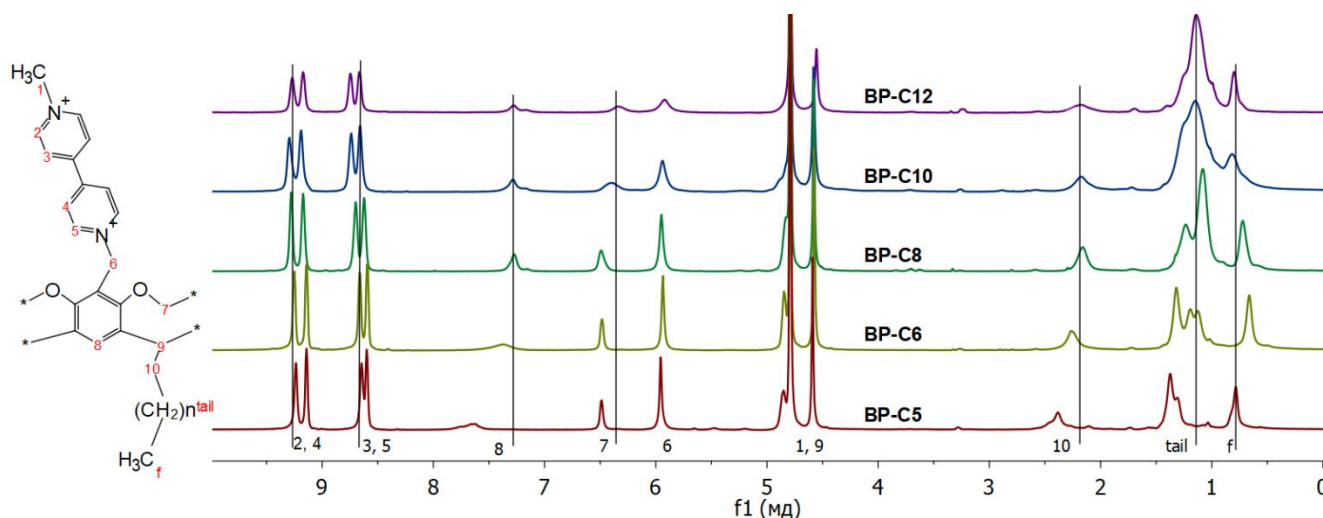


Рис. 17. <sup>1</sup>H ЯМР спектры индивидуальных 10 мМ растворов ВР.

### Функциональная активность ВР

Анализ результатов по оценке биологической активности виологеновых макроциклов показал, что предорганизация виологеновых фрагментов на макроциклическом каркасе позволила значительно снизить их токсичность. Значение  $IC_{50}$  по отношению к нормальным клеткам печени Chang liver для ВР-С5 (110 мкМ) – самого токсичного из исследованных ВР – на порядок ниже, чем для виологенового ПАВ В-16 (10 мкМ). Полученные результаты антимикробной активности, гемолиза и цитотоксичности для серии виологеновых макроциклов указывают на отсутствие корреляции выявленных биологических свойств с гидрофобностью нижнего обода ВР (табл. 8). Тем не менее, в этом ряду стоит отметить макроцикл с самыми длинными *n*-додецильными цепями, для которого наблюдается отсутствие гемотоксичности и избирательная цитотоксичность к больным клеткам.

Табл. 8. Гемолитическая и цитотоксическая активность ВР, цитотоксическая активность и индекс селективности свободного и инкапсулированного DOX.

Соединения	$HC_{50}$ , мкМ	$IC_{50}$ (индивидуальных ВР), мкМ		$IC_{50}$ (DOX в присутствии ВР), мкМ		SI DOX
		Chang liver	M-HeLa	Chang liver	M-HeLa	
ВР-С5	197.17±10.0	110±5.5	150±7.5	>5	>5	1
ВР-С6	162±8.0	360±20	130±6.5	1±0.05	1±0.05	1
ВР-С8	29±1.5	>500	75.6±3.8	4.7±0.2	2.24±0.1	2.1
ВР-С10	83±4.2	>500	>500	4.0±0.3	2.1±0.2	1.9
ВР-С12	>500	387±19	242.6±10	5±0.5	0.6±0.1	8
DOX	-	-	-	6.0±0.5	5.2±0.4	1.1

ВР показывают высокую сольубилизационную способность по отношению к гидрофобному зонду судану I, что сподвигло к исследованию связывания макроциклами гидрофобных флавоноидов рутина и кверцетина, которые обладают антиоксидантными свойствами. Аналогично сольубилизационному поведению судана I, водная растворимость данных флавоноидов возрастала с увеличением доли макроциклов в водной среде. Связывание рутина и кверцетина начинает детектироваться в растворах макроциклов при концентрациях ниже ККА, что, вероятно, указывает



на участие не только гидрофобного домена агрегатов макроциклов, сформированных из алкильных групп, но и верхнего обода макроциклов. В пользу такого эффекта свидетельствует отсутствие определенного влияния длины углеводородных цепей ВР на количество солубилизованных флавоноидов.

Агрегаты ВР способны связывать лекарственный препарат DOX. ЭИ DOX в 1 мМ растворах ВР невысокая (не более 15.5%), и наиболее оптимальные наноструктуры для инкапсуляции DOX формируются виологеновыми кавитандами с *n*-гексильными (ЭИ = 12.1%) и *n*-децильными (ЭИ = 15.5%) цепями на нижнем обode. Эксперименты по определению биологической активности инкапсулированного DOX показали повышение его противоопухолевой активности (табл. 8), что, однако, сопровождается усилением цитотоксичности к нормальным клеткам. На основании полученных данных рассчитывали индекс селективности (SI) DOX, который характеризует избирательность действия системы и представляет собой отношение полуингибирующих концентраций для нормальных и больных клеток. Рассчитанные значения SI DOX в присутствии ВР-С8 и ВР-С10 в 2 раза, а в присутствии ВР-С12 в 8 раз превосходят SI индивидуального лекарства (табл. 8). Результаты проточной флуориметрии и флуоресцентной микроскопии показывают проникновение инкапсулированных форм DOX в клетки М-HeLa. С увеличением длины алкильных фрагментов на нижнем обode ВР степень проникновения DOX в ядро клетки снижается, и наблюдается распределение DOX в цитоплазме.

### **Супрамолекулярные системы на основе виологеновых К[4]Р и ДСН**

Вероятной причиной слабого проникновения ВР в раковые клетки является мицеллярная структура агрегатов, которая не имеет сходства со структурой клеточных мембран. Известно, что в смесевых катионных композициях на основе противоположно заряженных ПАВ возможно образование везикулярных агрегатов, которые в зависимости от состава могут легко встраиваться в липидный слой мембраны клетки и полностью с ней сливаться. В связи с этим, было исследовано влияние анионного ПАВ ДСН на агрегационные и функциональные характеристики ВР. Были исследованы смешанные композиции, содержащие 1 мМ ВР и 0.1–60 мМ ДСН, а также системы с фиксированным соотношением ВР:ДСН = 2:1, 1:1 и 1:3 при варьировании их общей концентрации. Системы с соотношениями компонентов ВР:ДСН = 1:6, 1:8, 1:10, при которых происходит почти полная нейтрализация зарядов, нестабильны и в них наблюдается выпадение осадка.

Было отмечено различное влияние ДСН на агрегационное поведение ВР с короткими и длинными алкильными группами. Обнаружено, что присутствие ПАВ благоприятно влияет на агрегационное поведение ВР-С6 и ВР-С8, значительно снижая значения их ККА и повышая солубилизационную способность по отношению к гидрофобным субстратам. Вероятно, взаимодействие ПАВ, содержащего *n*-додецильный радикал, с короткоцепными ВР приводит к образованию супраамфифилов, конусность которых существенно отличается от конусности индивидуальных молекул ВР вследствие удлинения гидрофобной составляющей. В то же время для ВР-С10 и ВР-С12 в присутствии ДСН характер агрегации незначительно отличается от индивидуальных макроциклов из-за идентичности алкильных цепей. Изменение  $\beta$  и  $\Delta G_m$  в присутствии ДСН зависит от длины алкильных фрагментов макроциклов, но для всех ВР наблюдается отрицательное влияние избытка ПАВ на эти параметры, что обусловлено образованием слаборастворимых комплексов, которые снижают стабильность систем. Для композиций ВР-С6–ДСН наблюдается немонотонное изменение  $\beta$  с увеличением доли ДСН, но в присутствии эквимольного количества ПАВ степень связывания противоионов повышается (табл. 7,9), что говорит о более плотной упаковке «головных» групп в смешанных агрегатах. Кроме того, агрегация ВР-С6 с эквимольным количеством ДСН термодинамически более выгодна, чем в индивидуальном состоянии (табл. 7,9), что может быть объяснено образованием

в смешанных системах комплексов ВР–ДСН, обладающих оптимальной структурой и гидрофильно-липофильным балансом в отличие от композиций с недостатком и трехкратным избытком ПАВ, которые, вероятно, образуют более рыхлые агрегаты. Для систем длинноцепочечных ВР добавка ДСН снижает степень связывания противоионов, причем чем больше длина алкильных групп макроциклов и больше содержание ДСН, тем сильнее уменьшается значение  $\beta$  (табл. 7,9). Снижение степени связывания может быть обусловлено электростатическим взаимодействием макроцикла и ПАВ, в результате которого макроцикл и ПАВ становятся противоионами друг для друга. Свободная энергия мицеллообразования для смешанных систем на основе ВР-С8, ВР-С10, ВР-С12 и ДСН значительно меньше, чем для индивидуальных макроциклов (табл. 7,9), что, вероятно, обусловлено возрастанием конкуренции между алкильными фрагментами ВР и ДСН, в результате чего электростатические взаимодействия преобладают над гидрофобными.

Табл. 9. Значения степени связывания противоионов ( $\beta$ ) и свободной энергии мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ) для смешанных систем ВР:ДСН = 2:1, 1:1 и 1:3.

Макроцикл	$\beta$			$\Delta G_m$ , кДж/моль		
	2:1	1:1	1:3	2:1	1:1	1:3
ВР-С6	0.37	0.64	0.34	-16.53	-27.12	-9.93
ВР-С8	0.57	0.54	0.24	-23.05	-22.56	-8.20
ВР-С10	0.60	0.57	0.31	-25.38	-23.75	-9.60
ВР-С12	0.52	0.40	0.35	-23.01	-19.56	-10.67

Для получения информации о структуре межмолекулярных агрегатов на основе супраамфилов ВР–ДСН был применен метод  $^1\text{H}$  ЯМР. В смешанных композициях наблюдается химический сдвиг протонов алкильных фрагментов, говорящий о гидрофобных взаимодействиях между ВР и ДСН. Кроме того, с увеличением содержания ПАВ в смешанных системах наблюдается небольшое смещение протонов виологеновых групп, что говорит о вкладе электростатических взаимодействий в образование совместных агрегатов. Для 1 мМ ВР-С6 и ВР-С8 при добавлении ДСН наблюдается значительное сильнопольное смещение сигналов ароматических протонов  $H8$  и протонов при первом атоме углерода в алкильном фрагменте вблизи мостикового фрагмента  $H10$  (табл. 10) к положениям, наблюдаемым в растворах индивидуальных ВР при концентрации 10 мМ, т. е. выявленные химические сдвиги обусловлены процессом агрегации макроциклов в присутствии ПАВ. ВР-С10 и ВР-С12 при концентрации 1 мМ находится в агрегированном состоянии, поэтому добавка ДСН незначительно смещает сигналы протонов данных макроциклов.

Табл. 10. Химические сдвиги ароматических протонов  $H8$  и протонов при первом атоме углерода в алкильном фрагменте ВР вблизи мостикового фрагмента  $H10$  в растворах индивидуальных 1 и 10 мМ ВР и смешанных систем ВР:ДСН = 1:1, 1:3 и 1:5,  $C(\text{ВР})=1$  мМ.

Система	$H8$				$H10$			
	ВР-С6	ВР-С8	ВР-С10	ВР-С12	ВР-С6	ВР-С8	ВР-С10	ВР-С12
1 мМ ВР	7.77	7.56	7.27	7.27	2.45	2.35	2.16	2.17
ВР:ДСН=1:1	7.76	7.25	7.3	7.28	2.44	2.15	2.21	2.19
ВР:ДСН=1:3	7.32	7.25	7.31	7.28	2.3	2.16	2.21	2.21
ВР:ДСН=1:5	7.37	7.33	-*	-*	2.26	2.23	-*	-*
10 мМ ВР	7.37	7.28	7.29	7.28	2.27	2.16	2.18	2.16

\* наблюдается тушение пиков из-за низкой стабильности растворов и выпадения осадка

Для смешанных систем, содержащих 1 мМ ВР, при варьировании содержания ДСН и, следовательно, соотношения компонентов наблюдаются морфологические переходы с образованием структур с различными размерами и сольубилизационной способностью (рис. 18). С увеличением содержания ПАВ до пятикратного избытка размеры агрегатов остаются постоянными или немного увеличиваются в случае ВР-С6. Эти агрегаты достаточно хорошо сольубилизируют гидрофобные субстраты. Дальнейшее увеличение количества ДСН приводит к образованию в растворе крупных частиц с низкой стабильностью и сольубилизующей способностью. При дальнейшем увеличении концентрации ДСН размеры агрегатов вновь снижаются, а профиль сольубилизационной зависимости близок к индивидуальному ДСН, что может свидетельствовать о насыщении смешанных агрегатов и образовании мицелл индивидуального ДСН.

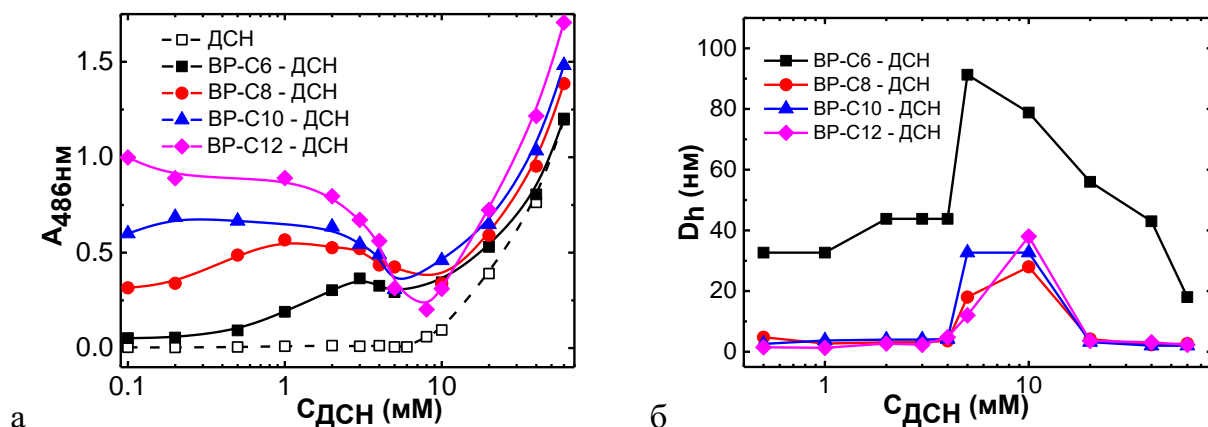


Рис. 18. Изменение сольубилизации судана I (а) и размеров агрегатов (б) в растворах ВР–ДСН,  $C(\text{ВР}) = 1 \text{ мМ}$ ,  $C(\text{ДСН}) = 0.1\text{--}60 \text{ мМ}$ ,  $l = 10 \text{ мм}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Изображения ПЭМ подтверждают формирование совместных агрегатов в смешанных системах (рис. 19). Для эквимольной композиции ВР-С6–ДСН зафиксированы везикулярные агрегаты диаметром порядка 40 нм, что соотносится с результатами ДРС. С увеличением содержания ПАВ в системе наблюдаются слипшиеся частицы, которые трудно идентифицировать, что, вероятно, обусловлено увеличением гидрофобности супраамфилов в результате электростатической компенсации виологеновых групп.

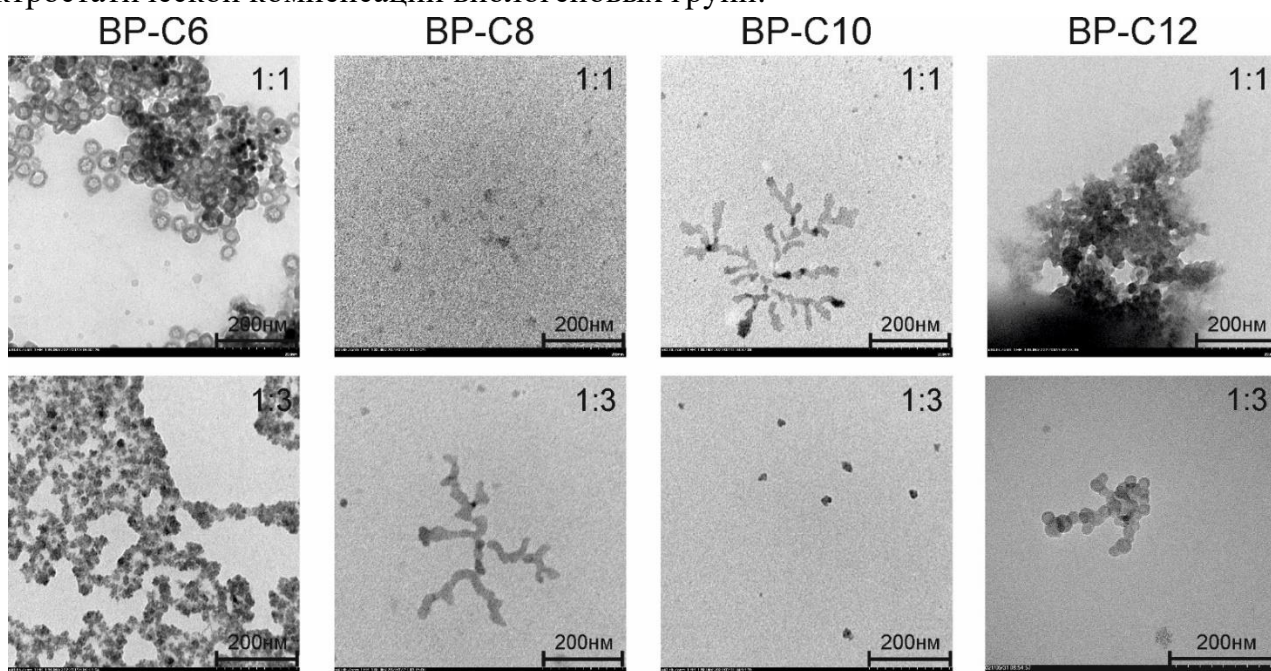


Рис. 19. Изображения агрегатов, полученное методом ПЭМ, для систем ВР:ДСН = 1:1 и 1:3.

## Функциональная активность супрамолекулярных ансамблей на основе ВР и ДСН

Для смешанных композиций ВР с ДСН гемолитическая и цитотоксическая активности выше, чем для индивидуальных макроциклов, что связано с увеличением доли ионов и алкильных фрагментов, вносящих значительный вклад в общую токсичность (табл. 11). Среди исследованных систем наименьшую токсичность к нормальным клеткам показали эквимольные композиции на основе ВР-С6, ВР-С10 и ВР-С12.

Табл. 11. Гемолитическая и цитотоксическая активность систем ВР:ДСН.

Система (мольные соотношения компонентов)	HC <sub>50</sub> (ВР), мкМ	IC <sub>50</sub> (ВР), мкМ	
		Chang liver	M-HeLa
ВР-С6–ДСН (1:1)	38.9±1.9	>500	260±10.0
ВР-С6–ДСН (1:3)	17.2±0.6	250±10.0	100±5.0
ВР-С8–ДСН (1:1)	31±1.6	114±5.7	51.3±2.6
ВР-С10–ДСН (1:1)	38.6±1.9	>250	>250
ВР-С10–ДСН (1:5)	63.0±3.2	>250	60±3.0
ВР-С12–ДСН (1:1)	417.5±15.0	294±14.7	285±14.3

Для оценки потенциала агрегатов ВР–ДСН в качестве наноконтейнеров для гидрофобных препаратов была исследована их солубилизирующая способность по отношению к гидрофобным флавоноидам рутину и кверцетину. С ростом общей концентрации супраамфилов ВР–ДСН водная растворимость флавоноидов возрастает, причем профиль солубилизационных зависимостей аналогичен изменению их растворимости в растворах индивидуальных ВР. Зависимость солубилизационной способности от соотношения ВР:ДСН позволяет управлять связыванием и высвобождением гидрофобных биологически активных веществ путем варьирования доли ПАВ. Эксперименты по определению биологической активности показали, что среди исследованных систем только композиция ВР-С10:ДСН = 1:1 с флавоноидами проявляет селективное цитотоксическое действие на опухолевые клетки.

Основываясь на том, что агрегаты ВР–ДСН при определенном соотношении компонентов могут представлять собой везикулы, была также исследована способность этих систем к инкапсуляции DOX. Обнаружено, что в смешанных композициях ВР–ДСН связывается меньше DOX, чем в растворах индивидуальных ВР. Наибольшее количество DOX связывают системы на основе ВР-С10 (ЭИ составляет 9% и 12.5% для систем ВР-С10:ДСН = 1:1 и 1:5 соответственно). При инкапсуляции DOX наблюдается усиление его противоопухолевой активности (табл. 12). В случае смешанных систем на основе ВР-С6, ВР-С8 и ВР-С12 с ДСН наблюдается также усиление цитотоксичности препарата к нормальным клеткам. В то же время, применение в качестве наноконтейнеров смешанных агрегатов на основе ВР-С10 позволяет добиться более селективного действия лекарственного препарата. При инкапсуляции DOX в агрегаты ВР-С10:ДСН=1:1 его токсичность к нормальным клеткам снижается, а к больным клеткам увеличивается. Интересно, что при совместной загрузке DOX с флавоноидами селективности препарата снижается с 6.2 до 4 и 4.4 для рутин и кверцетин, соответственно. Совместная загрузка DOX с ловастатином позволяет повысить селективность действия препарата до 8, что указывает на синергетическое действие связанных биологически активных молекул. В целом, селективную противоопухолевую активность DOX можно достичь путём его инкапсуляции в агрегаты, сформированные из супраамфилов на основе ВР-С10 и ДСН, что актуально для создания эффективной противораковой терапии.

Табл. 12. Цитотоксическая активность и индекс селективности DOX, инкапсулированного в агрегаты ВР–ДСН.

Системы	IC <sub>50</sub> (DOX), мкМ		SI DOX
	Chang liver	M-HeLa	
DOX	6.0±0.5	5.2±0.4	1.1
ВР-С6:ДСН = 1:1 + DOX	1±0.1	2±0.1	0.5
ВР-С6:ДСН = 1:3 + DOX	1±0.1	4±0.3	0.25
ВР-С8:ДСН = 1:1 + DOX	0.7±0.1	0.7±0.1	1
ВР-С8:ДСН = 1:5 + DOX	0.15±0.01	0.13±0.01	1.2
ВР-С10:ДСН = 1:1+ DOX	>8	1.3±0.1	6.2
ВР-С10:ДСН = 1:1+ рутин + DOX	2.8±0.2	0.7±0.1	4
ВР-С10:ДСН = 1:1 + кверцетин + DOX	>8	1.8±0.1	4.4
ВР-С10:ДСН = 1:1+ ловастатин + DOX	>8	1.0±0.09	8
ВР-С10:ДСН = 1:5+ DOX	1.8±0.2	1.4±0.1	1.3
ВР-С12:ДСН = 1:1+ DOX	0.8±0.1	0.4±0.02	2
ВР-С12:ДСН = 1:5+ DOX	0.4±0.02	0.27±0.01	1.5

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Показано, что агрегация амфифильных каликс[4]резорцинов, замещенных виологеновыми фрагментами по верхнему ободу, (ВР) обусловлена гидрофобными взаимодействиями как алкильных заместителей на нижнем ободу, так и ароматических колец и метиленовых мостиков. С увеличением длины алкильных заместителей на нижнем ободу макроциклов наблюдается снижение ККА, свободной энергии мицеллообразования и размеров агрегатов. В растворах ВР-С5 и ВР-С6 образуются крупные частицы по типу «голова к хвосту», а молекулы ВР-С8, ВР-С10 и ВР-С12 формируют сферические агрегаты меньшего размера по типу «хвост к хвосту».

2. Впервые показано влияние добавки ДСН на агрегационные и термодинамические характеристики ВР. Установлено снижение значений ККА ВР-С6 и ВР-С8 в присутствии ДСН. Обнаружено, что агрегация в системе ВР-С6–ДСН при эквимолярном соотношении компонентов является термодинамически более выгодной, чем для индивидуального ВР-С6, а повышение степени связывания противоионов говорит о более плотной упаковке супраамфилов в смешанных агрегатах. Для длинноцепочечных ВР-С8, ВР-С10 и ВР-С12 добавка ДСН снижает степень связывания противоионов и в меньшей степени изменяет величину ККА. Изменение соотношения ВР:ДСН позволяет варьировать структуру и сольубилизационную емкость образующихся агрегатов.

3. Впервые проведена оценка самоорганизации каликс[4]резорцинов с N-метил-D-глюкаминновыми фрагментами (ГКР). Показано, что агрегационные характеристики и морфология агрегатов зависят от структуры заместителей нижнего обода. ГКР-1, содержащий этилсульфонатные группы на нижнем ободу, формирует крупные агрегаты по типу «голова к голове» и «голова к хвосту». ГКР-2 с метильными группами на нижнем ободу образует небольшие мицеллярные агрегаты. Увеличение длины алкильных заместителей до н-децильных (ГКР-3) способствует формированию более крупных сферических агрегатов, представляющих собой везикулы.

4. Установлено, что добавка сульфонатных каликс[4]резорцинов к растворам катионных ПАВ и металлоПАВ приводит к образованию супраамфилов, агрегационное поведение которых отличается от индивидуальных систем макроцикла и ПАВ/металлоПАВ. Соотношение компонентов в смешанной системе определяет структуру и функциональные свойства образующихся агрегатов. Присутствие ГКР-1 снижает ККА катионных ПАВ и уменьшает

соллобилизационную емкость образующихся агрегатов. В то же время смешанные системы ГКР-1–ПАВ способны с высокой эффективностью инкапсулировать гидрофильный субстрат. Аналогичное поведение наблюдается для совместных композиций незамещенного сульфонатного каликс[4]резорцина или каликс[4]резорцина с сульфонатными группами по верхнему ободу (СВКР) с металлоПАВ.

5. Впервые показано, что функциональная активность супрамолекулярных систем на основе индивидуальных ГКР и ВР зависит от морфологии агрегатов и, следовательно, от структуры заместителей нижнего обода. С увеличением длины алкильных заместителей на нижнем ободу соллобилизующая способность агрегатов по отношению к гидрофобному субстрату возрастает. В случае ВР в связывании флавоноидов рутина и кверцетина участвуют не только гидрофобные фрагменты, но и виологеновые группы по верхнему ободу. Функциональная активность бинарных систем каликс[4]резорцин–ПАВ зависит от соотношения компонентов и от концентрации супраамфифилов в растворе. Установлена низкая токсичность ГКР и ВР по отношению к нормальным клеткам. Впервые показано, что ВР обладают пониженной токсичностью по сравнению с виологеновым ПАВ при одинаковой эффективной концентрации виологеновых групп.

6. Продемонстрирована высокая эффективность бинарных систем СВКР–металлоПАВ и ВР-С10–ДСН в качестве наноконтейнеров для противоопухолевых препаратов цисплатина и доксорубицина, соответственно. Инкапсуляция лекарств повышает их цитотоксичность к опухолевым клеткам, сохраняя цитотоксичность к нормальным клеткам на уровне индивидуального лекарственного препарата или снижая ее. Полученные результаты свидетельствуют о перспективе данных систем в противоопухолевой терапии, так как их использование позволит снизить терапевтические дозы препаратов и, соответственно, побочные эффекты без снижения эффективности.

7. Впервые показана чувствительность наноконтейнеров на основе ГКР-3 и ВР с инкапсулированными лекарственными веществами к внешним стимулам. Везикулярные частицы на основе ГКР-3 проявляют рН-зависимые свойства и могут высвобождать связанный доксорубицин в кислой среде. Структура агрегатов ВР–ДСН зависит от соотношения компонентов, что актуально для контролируемого связывания и высвобождения органических субстратов.

#### **Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:**

1. Kashapov, R.R. Self-assembling and biological properties of single-chain dicationic pyridinium-based surfactants / R.R. Kashapov, **Y.S. Razuvayeva**, A.Y. Ziganshina, R.K. Mukhitova, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, L.Y. Zakharova // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. — 2019. — V. 175. — P. 351–357.
2. Kashapov, R.R. N-Methyl-D-glucamine–calix[4]resorcinarene conjugates: self-assembly and biological properties / R.R. Kashapov, **Y.S. Razuvayeva**, A.Y. Ziganshina, R.K. Mukhitova, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, V.V. Syakaev, S.K. Latypov, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Y. Zakharova // *Molecules*. — 2019. — V. 24, N. 10. — P. 1939.
3. Kashapov, R.R. Aggregation of supramolecular system based on N-methyl-D-glucamine calix[4]resorcinol and CTAB in aqueous medium / R.R. Kashapov, **Y.S. Razuvayeva**, A.Y. Ziganshina, R.K. Mukhitova, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, L.Y. Zakharova // *Macroheterocycles*. — 2019. — V. 12, N. 4. — P. 346–349.
4. Kashapov, R.R. N-methyl-D-glucaminocalix[4]resorcinol and its complexes with N-hexadecyl-N'-methyl viologen: Self-assembly and encapsulation activities / R.R. Kashapov, **Y.S. Razuvayeva**,

- A.Y. Ziganshina, R.K. Mukhitova, L.Y. Zakharova // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* — 2019. — V. 583. — P. 124033.
5. **Razuvayeva, Y.** Calixarene-based pure and mixed assemblies for biomedical applications / **Y. Razuvayeva**, R. Kashapov, L. Zakharova // *Supramol. Chem.* — 2020. — V. 32, N. 3. — P. 178–206.
6. Kashapov, R.R. Design of N-methyl-D-glucamine-based resorcin[4]arene nanoparticles for enhanced apoptosis effects / R.R. Kashapov, **Y.S. Razuvayeva**, A.Y. Ziganshina, R.K. Mukhitova, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Y. Zakharova // *Mol. Pharm.* — 2020. — V. 17, N. 1. — P. 40–49.
7. Kashapov, R. Supraamphiphilic systems based on metallosurfactant and calix[4]resorcinol: self-assembly and drug delivery potential / R. Kashapov, **Y. Razuvayeva**, A. Ziganshina, T. Sergeeva, S. Lukashenko, A. Sapunova, A. Voloshina, N. Kashapova, I. Nizameev, V. Salnikov, S. Ziganshina, B. Gareev, L. Zakharova // *Inorg. Chem.* — 2020. — V. 59, N. 24. — P. 18276–18286.
8. Kashapov, R. Effect of preorganization and amphiphilicity of calix[4]arene platform on functional properties of viologen derivatives / R. Kashapov, **Y. Razuvayeva**, A. Ziganshina, A. Sapunova, A. Lyubina, S. Amerhanova, N. Kulik, A. Voloshina, I. Nizameev, V. Salnikov, L. Zakharova // *J. Mol. Liq.* — 2021. — 117801.
9. **Razuvayeva, Y. S.** Solubilizing properties of aggregates based on glucamine calix[4]resorcinol and surfactants / **Y.S. Razuvayeva**, R.R. Kashapov, A.Y. Ziganshina, L.Y. Zakharova // 1st Russian-Chinese Workshop on Organic and Supramolecular Chemistry: book of abstracts (August 27-29, 2018, Kazan, Russia). Edited by I.S. Antipin, S.E. Solovieva. – Kazan: Publishing house of Kazan University. – 2018. – P.110.
10. Kashapov, R.R. Self-assembling and biological properties of N-methyl-D-glucaminocalix[4]resorcinols / R.R. Kashapov, **Y.S. Razuvayeva**, A.Y. Ziganshina, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, L.Y. Zakharova // 1st Russian-Chinese Workshop on Organic and Supramolecular Chemistry: book of abstracts (August 27-29, 2018, Kazan, Russia). Edited by I.S. Antipin, S.E. Solovieva. – Kazan: Publishing house of Kazan University. – 2018. – P.86.
11. **Razuvayeva, Y.S.** Aggregation behavior and solubilizing properties of systems based on vinylpyridine surfactant / **Y.S. Razuvayeva**, R.R. Kashapov, A.Y. Ziganshina, L.Y. Zakharova // *Book of Abstracts of the V International Conference on Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics.* September 10-14, 2018. – Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. – P. 204.
12. **Разуваева, Ю.С.**, Агрегационные и биологические свойства глюкаминового каликс[4]резорцинов / **Ю.С. Разуваева**, Р.Р. Кашапов, А.Ю. Зиганшина, А.С. Сапунова, А.Д. Волошина, Л.Я. Захарова // *Сборник тезисов конференции «Материалы и технологии 21 века»*, 29-31 октября, 2018. – Казань, КФУ. – С.73.
13. **Razuvayeva, Y.S.** Superamphiphiles based on calix[4]resorcinols and surfactants In drug nanocontainer design / **Y.S. Razuvayeva**, R.R. Kashapov, A.Y. Ziganshina, L.Y. Zakharova // *Book of abstracts Markovnikov Congress on Organic Chemistry.* 21-28 June 2019. – Moscow-Kazan, Russia. – P.199.
14. **Разуваева, Ю.С.** Агрегационные и солюбилизационные свойства систем на основе виологенового каликс[4]резорцина и додецилсульфата натрия / **Ю.С. Разуваева**, Р.Р. Кашапов, А.Ю. Зиганшина, А.С. Сапунова, А.Д. Волошина, И.Р. Низамеев, М.К. Кадиров, Л.Я. Захарова

// Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием), 7-10 октября 2019 г., Казань: тезисы докладов. – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН. – С. 38.

15. Разуваева, Ю.С. Супрамолекулярные агрегаты на основе виологеновых каликс[4]резорцинаренов и ДСН в качестве наноконтейнеров для биологически активных веществ / Ю.С. Разуваева, Р.Р. Кашапов, А.Ю. Зиганшина, А.С. Сапунова, А.Д. Волошина, Л.Я. Захарова // «Современные проблемы органической химии»: Сборник тезисов. – Новосибирск, 2021. – С. 48.

16. Разуваева, Ю.С. Агрегационные и солубилизационные свойства систем на основе виологенового каликс[4]резорцина и додецилсульфата натрия / Ю.С. Разуваева, Р.Р. Кашапов, А.Ю. Зиганшина, А.С. Сапунова, А.Д. Волошина, Л.Я. Захарова // Первая Всероссийская школа по медицинской химии для молодых ученых: Сборник тезисов. – Новосибирск, 2021. – С. 116.