

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КАЗАНСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

РАЗУВАЕВА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

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

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени кандидата химических наук

1.4.4. Физическая химия

Научный руководитель:
Кандидат химических наук
Р.Р. Кашапов

Казань – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ЗАКОНОМЕРНОСТИ АГРЕГАЦИИ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ КАЛИКСАРЕНОВ И КАЛИКСРЕЗОРЦИНОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ	10
1.1. Синтез и конформационные свойства каликсаренов и каликсрезорцинов	11
1.2. Биологические свойства каликсаренов и каликсрезорцинов	14
1.3. Самоорганизация в системах на основе водорастворимых амфифильных каликсаренов	16
1.3.1. Мицеллы и везикулы	16
1.3.2. Капсулы и стопочные структуры	24
1.4. Самоорганизация в смешанных системах на основе водорастворимых каликсаренов	27
1.4.1. Ассоциация в смешанных системах каликсаренов с ПАВ	27
1.4.2. Ассоциация в смешанных системах каликсаренов с ароматическими соединениями	34
1.4.3. Ассоциация в смешанных системах каликсаренов с полимерами	36
1.4.4. Ассоциация в смешанных системах каликсаренов с протеинами, пептидами и аминокислотами	39
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	44
2.1. Исходные вещества и реагенты	44
2.1.1. Каликс[4]резорцины и ПАВ	44
2.1.2. Спектральные зонды, солюбилизаторы (красители и лекарственные вещества)	45
2.2. Приготовление растворов	45
2.3. Методы измерения	46
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. САМООРГАНИЗАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ КАЛИКС[4]РЕЗОРЦИНОВ	51
3.1. Супрамолекулярные системы на основе каликс[4]резорцинов, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами	51
3.1.1. Агрегационное поведение каликс[4]резорцинов, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами	51
3.1.1.1. Влияние N-метил-D-глюкаминового фрагмента на агрегационные свойства макроциклов	52
3.1.1.2. Влияние длины алкильных фрагментов на агрегационные свойства макроциклов	53

3.1.2. Функциональная активность супрамолекулярных ансамблей на основе каликс[4]резорцинов, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами	58
3.1.2.1. Биологическая активность каликс[4]резорцинов, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами	58
3.1.2.2. Инкапсуляция гидрофильных субстратов агрегатами ГКР-3	58
3.1.2.3. Влияние инкапсуляции на противоопухолевую активность доксорубина	60
3.2. Супрамолекулярные системы на основе ГКР-1 и катионных ПАВ	63
3.2.1. Агрегационные и биологические свойства бипиридиновых ПАВ	64
3.2.1.1. Агрегационные свойства	64
3.2.1.2. Биологическая активность	67
3.2.2. Влияние каликс[4]резорцина на агрегационные свойства бипиридиновых ПАВ	69
3.2.3. Инкапсулирующая способность агрегатов каликс[4]резорцин–ПАВ	71
3.2.4. Влияние каликс[4]резорцина на биологическую активность и токсичность ПАВ	76
3.3. Супрамолекулярные системы на основе сульфонатных каликс[4]резорцинов и металлоПАВ	78
3.3.1. Самоорганизация в системах сульфонатных каликс[4]резорцинов и металлоПАВ	78
3.3.2. Инкапсуляция гидрофильных субстратов в системах каликс[4]резорцин–металлоПАВ	81
3.3.3. Биологическая активность систем каликс[4]резорцин–металлоПАВ и их влияние на противоопухолевую активность лекарственных препаратов	84
3.4. Супрамолекулярные системы на основе виологеновых каликс[4]резорцинов	85
3.4.1. Агрегационные свойства виологеновых каликс[4]резорцинов	86
3.4.2. Функциональная активность виологеновых каликс[4]резорцинов	91
3.4.2.1. Солюбилизационная способность каликс[4]резорцинов	91
3.4.2.2. Инкапсулирующая способность каликс[4]резорцинов по отношению к доксорубину	92
3.4.2.3. Биологическая активность и цитотоксичность каликс[4]резорцинов	93
3.5. Супрамолекулярные системы на основе виологеновых каликс[4]резорцинов и ДСН	96
3.5.1. Агрегационные свойства смешанных композиций виологеновых каликс[4]резорцинов и ДСН	96
3.5.2. Функциональная активность смешанных композиций виологеновых каликс[4]резорцинов и ДСН	106
3.5.2.1. Солюбилизационная способность систем	106
3.5.2.2. Инкапсулирующая способность систем по отношению к доксорубину	108

3.5.2.3. Биологическая и цитотоксическая активность наноконтейнеров на основе виологеновых каликс[4]резорцинов и ДСН и их влияние на противоопухолевую активность лекарственных препаратов	108
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	111
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	115
ПРИЛОЖЕНИЕ А	135

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В настоящее время наноматериалы с заданной 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 сложными структурными фрагментами. 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 солубилизирующая способность по отношению к гидрофобным (судан I, рутин и кверцетин) и гидрофильным субстратам (красителю родамину Б и лекарственному препарату доксорубицину (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 ^1H 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, солюбилизационные 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 солюбилизационные 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-глюкаминных 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 сульфатных 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 B) и лекарственных веществ (DOX, cisPt).
7. Селективная цитотоксическая активность виологеновых К[4]Р по отношению к опухолевым клеткам M-HeLa, а также усиление противоопухолевой активности DOX и cisPt, связанных агрегатами на основе виологеновых и сульфатных К[4]Р 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 инициировании, 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.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ЗАКОНОМЕРНОСТИ АГРЕГАЦИИ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ КАЛИКСАРЕНОВ И КАЛИКСРЕЗОРЦИНОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

В настоящее время развивается принципиально новый подход к конструированию новых наноразмерных материалов путем самоорганизации с участием молекулярных единиц в нековалентных взаимодействиях. Спонтанная организация молекулярных и макромолекулярных строительных блоков относительно друг друга позволяет создавать сложные функциональные материалы и системы с иными, чем у отдельных компонентов, функциями. Примерами самосборки за счет слабых нековалентных сил являются такие фундаментальные свойства живой материи, как транскрипция генетической информации в ДНК, вторичные (и более высокие) структуры белков, ферментативные функции и реакция иммунной системы. Немаловажную функцию в живой клетке организма выполняют мембранные липиды, которые благодаря амфифильной природе выстраиваются в бислои, располагая свои полярные группы в сторону водной среды, а липофильные цепи – внутрь бислоя.

Под амфифилом подразумевается молекулярная структура, имеющая в своем составе как гидрофильные, так и гидрофобные части, связанные ковалентными связями. Интерес к амфифильным соединениям вызван их способностью к самоорганизации в упорядоченные агрегаты, такие как мицеллы, везикулы, нанотрубки, наностержни, наноленты и др., которые могут применяться в создании наноустройств, доставке лекарств и генов, темплатном синтезе, визуализации клеток и т.д. [1–7]. Структуры и свойства таких агрегатов, образованных амфифилами, определяются их архитектурой (геометрическими параметрами гидрофильной и гидрофобной частей) и могут варьироваться в зависимости от природы растворителя, концентрации, температуры, рН и ионной силы. В последние годы отмечается повышенный интерес к амфифильным производным каликсаренов, которые могут быть использованы не только в качестве модельных соединений-биомиметиков [8–10], но и для создания новых материалов с заданными свойствами и функциями. [11, 12].

Взаимодействие супрамолекулярной и коллоидной химии привело к формированию нового типа объектов исследования – супрамолекулярных амфифилов. В отличие от традиционных амфифилов, супрамолекулярные амфифилы (или супраамфифилы) построены на основе таких нековалентных взаимодействий, как электростатические (ион-ионные, ион-дипольные, диполь-дипольные, диполь-индуцированные дипольные взаимодействия), водородные связи, π - π -стэкинг, СН- π -, гидрофобные взаимодействия [13]. Как правило, одного слабого взаимодействия недостаточно для обеспечения ассоциации как минимум двух молекул, поэтому обычно одновременно реализуются несколько типов взаимодействий для достижения положительной с энергетической точки зрения кооперации, а также для увеличения

стабильности агрегатов. Такой подход позволяет избежать длительных синтетических процедур при изготовлении полезных наноматериалов с высокой степенью структурной сложности. Кроме того, динамическая и обратимая природа нековалентных взаимодействий наделяет получающиеся супрамолекулярные архитектуры стимул-чувствительными свойствами.

Каликсарены представляют собой макроциклические соединения, включающие четыре или более фенольных фрагмента, соединенных в циклический каркас в мета-положении с помощью метиленовых мостиков. Семейство каликсаренов можно разделить на две основные категории: циклоолигомеры, полученные из фенола – каликс[*n*]арены (K[*n*]A), и циклоолигомеры, полученные из резорцина – каликс[*n*]резорцины (K[*n*]P), где *n* – число ароматических звеньев. Благодаря простоте синтеза и превосходной способности к функционализации каликсаренов проявили себя как третье поколение супрамолекул (после краун-эфиров и циклодекстринов) с широким потенциалом применения в комплексообразовании катионов, анионов и даже нейтральных молекул [14]. Их уникальная молекулярная архитектура и настраиваемый размер внутренней полости делают каликсарены привлекательными строительными блоками для супрамолекулярной химии, где сочетание определенного размера, конформации, предварительной организации формы молекулы, жесткости макроциклического каркаса и реализация нековалентных взаимодействий может привести к созданию очень чувствительных и специфических датчиков. Несмотря на то, что известно множество различных функционализированных водорастворимых каликсаренов, их сульфонатные аналоги, представленные еще в 80-х гг. XX века [15, 16], являются наиболее изученными. Данные макроциклы привлекли значительное внимание из-за высокой растворимости в воде, селективной связывающей способности, каталитических свойств и биологической совместимости [17–21].

Целью литературного обзора был анализ закономерностей образования агрегатов в растворах индивидуальных каликсаренов, в смешанных системах на их основе и применение образующихся супрамолекулярных ансамблей в медицине.

1.1. Синтез и конформационные свойства каликсаренов и каликсрезорцинов

Основным методом получения каликсаренов является разработанный Гютше Д. синтез путем конденсации пара-алкилфенолов с формальдегидом в присутствии NaOH при 110–120 °C [22–24]. Посредством выбора подходящих условий реакции (температуры, концентрации и типа катализатора) могут быть сконструированы макроциклы с различным четным количеством фенольных единиц. В тоже время этот метод малопригоден для получения каликсаренов с нечетным числом арильных фрагментов (K[3]A, K[5]A, K[7]A) [25–27]. Основной способ получения каликсрезорцинов – это конденсация резорцина с различными алифатическими или ароматическими альдегидами при нагревании в смеси спирт–кислота (конц. HCl) [28].

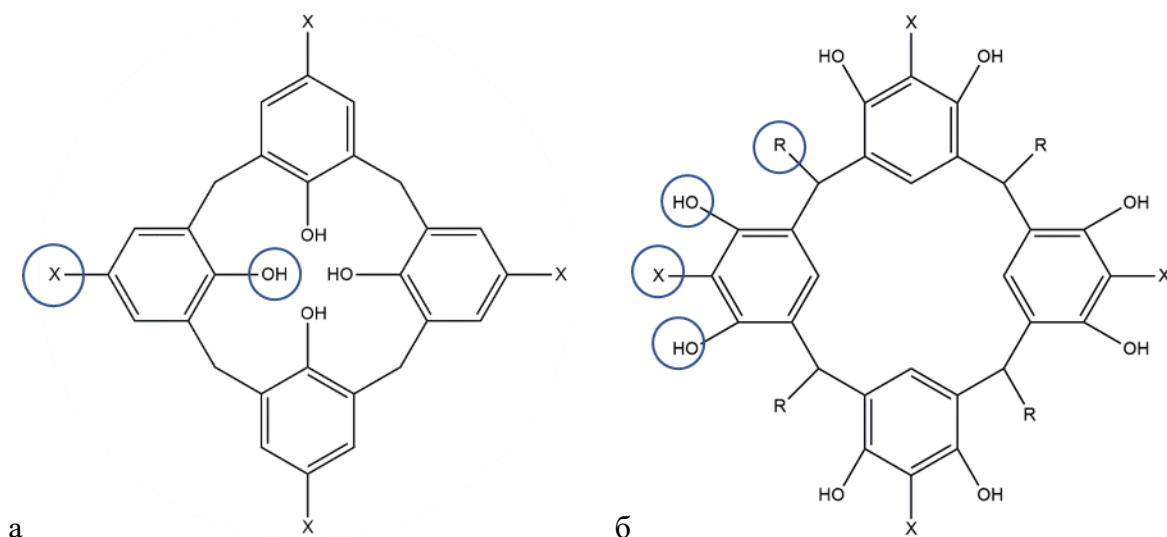


Рисунок 1.1. Возможные реакционные центры молекул K[4]A (а) и K[4]P (б).

Немодифицированные макроциклы непригодны для исследования в водных растворах из-за их ограниченной растворимости и высокой гибкости, приводящей к полной инверсии ароматических колец [23]. Присоединение полярных фрагментов к макроциклам повышает их гидрофильность [19, 29, 30]. Модификация K[4]A может проводиться по двум положениям – на нижнем ободе (фенольные гидроксильные группы) и на верхнем (в пара-положениях относительно OH-группы (рис. 1.1а). Модифицированные K[4]P можно получать с различными заместителями при мостиковых метиленовых группах, OH-группах, а также по верхнему краю в мета-положениях (рис. 1.1б). Существуют два основных подхода к получению функционально замещённых каликсаренов: возможно пришить требуемые фрагменты к готовому макроциклу [31, 32], а также можно провести реакцию получения каликсаренов из исходных соединений, содержащих необходимые функциональные группы [23, 28]. Функциональные группы, введенные на этом этапе, могут быть дополнительно модифицированы последующими реакциями [33].

Различные полезные функции каликсареновых макроциклов обусловлены не только широким набором возможных химических модификаций обоих ободов, но и конформационным разнообразием. Конформационная гибкость каликсаренов объясняется вращением ароматических групп относительно мостиковой метиленовой группы, следовательно, рост числа ароматических звеньев сопровождается увеличением гибкости. Макроцикл K[4]A **1** (рис.1.2), состоящий из четырех фенольных фрагментов, представляет собой жесткую усеченную конусообразную молекулу при соответствующей модификации относительно крупными фрагментами, которые «зафиксируют» структуру и не дадут бензольным кольцам вращаться [23, 34]. Конформации могут быть «зафиксированы» с помощью подходящих заместителей, которые увеличивают барьер вращения в молекуле макроцикла [35, 36]. В конической конформации макроциклы представляют собой «чашу», образованную бензольными кольцами.

Соответственно, молекулярные размеры полостей варьируются в зависимости от количества ароматических единиц (диаметр верхнего края К[4]А составляет $\sim 3,8 \text{ \AA}$, а К[6]А $\sim 5,0 \text{ \AA}$ [37]).

В то время, как К[4]А существует преимущественно в конической форме, амфифильные К[6]А **2** и К[8]А **3** (рис. 1.2) обмениваются между несколькими возможными конформациями, что обусловлено беспрепятственным вращением ароматических фрагментов через кольцевое пространство [20, 37]. В основном, К[6]А в мономерном состоянии принимает псевдо-1,2,3-альтернативную конформацию, а К[8]А является конформационно подвижным [38].

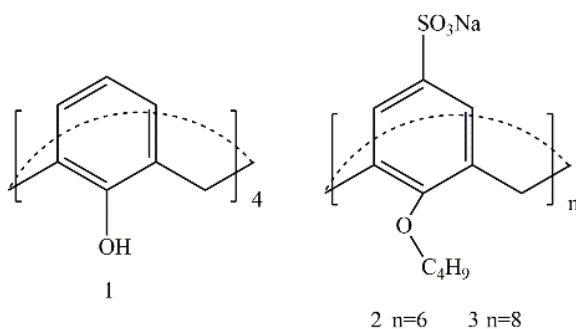


Рисунок 1.2. Структуры К[*n*]А **1-3**.

Молекулы каликсрезорцинов из-за наличия заместителей у метиленовых мостиков обладают большим количеством стереоизомеров, чем каликсарены. Стереохимия этих макроциклов обычно определяется сочетанием трех критериев: (1) относительное положение заместителей у метиленовых мостиков, дающее положения цис-цис-цис (гссс), цис-цис-транс (гсст), цис-транс-транс (гсст), транс-цис-транс (гсст); (2) индивидуальная конфигурация заместителей у метиленовых мостиков, которая в конформациях макроцикла с *C*-симметрией может быть либо аксиальной, либо экваториальной; (3) конформация ароматических колец: «корона» (C_{4v}), «лодка» (C_{2v}), «кресло» (C_{2h}), «алмаз» (C_s) и «седло» (D_{2d}) (рис. 1.3). Как обнаружено на практике, стереоизомер гссс всегда находится в одной из двух конформаций – «лодка» и «корона». Это происходит потому, что два изомера в конформации «лодка» взаимопревращаются через промежуточную конформацию «корона». При стандартных условиях стереоизомеры гсст были обнаружены только в конформации «кресла», изомеры гсст имеют «алмазную» конформацию, а гсст – конформацию «седло» [39]. Обычно в растворе существует либо один вид изомеров, либо два – три вида с преобладанием одного из них.

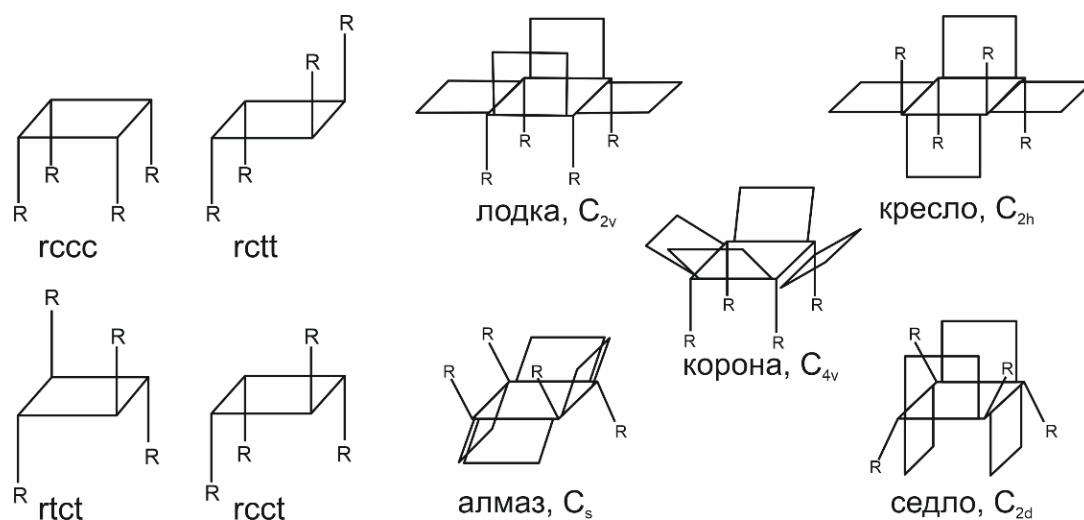
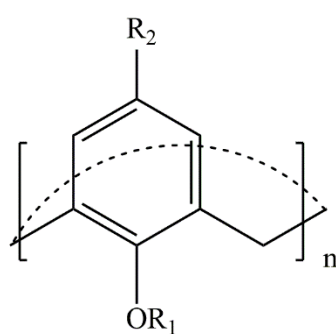


Рисунок 1.3. Возможные стереоизомеры и конформации K[4]P.

Конформационные переходы в макроциклах, содержащих свободные гидроксильные группы, затруднены за счет образования внутримолекулярных водородных связей OH...OR [40–43], поэтому каликсрезорцины с заместителями при метиленовых мостиках в полностью цис-положении или с незамещенными метиленовыми мостиками обнаруживаются только в конической конформации как в растворе, так и в кристаллах [44]. Данная конформация является наиболее термодинамически стабильной [45].

1.2. Биологические свойства каликсаренов и каликсрезорцинов

Каликсарены и каликсрезорцины используются в биологических и медицинских системах благодаря их нетоксичности и неиммуногенности [46–52]. *In vitro* исследования показали, что наиболее широко исследованный сульфатный K[4]A **4** (рис. 1.4) слаботоксичен в отношении различных линий клеток [53] и не обладает гемолитической активностью при концентрациях до 5 мМ [54]. Причем среди сульфатных каликсаренов с различным числом ароматических звеньев циклические тетрамеры в значительно меньшей степени разрушают эритроциты, чем их гекса- и октамерные аналоги [54]. Тем не менее, влияние числа ароматических фрагментов в сульфатной каликсареновой «чашке» на нейтрофилы (клетки неспецифической иммунной системы организма человека) не было выявлено. По сравнению с контрольным образцом, доля клеток, погибших как в результате апоптоза, так и некроза, не изменяется в присутствии K[4]A, K[6]A, K[8]A независимо от размера их ароматической полости [46]. Кроме того, имеются данные об отсутствии влияния данных макроциклов на протеинкиназу, активирующую НАДФН оксидазу, которая в свою очередь участвует в клеточной противомикробной защитной системе. Следовательно, данные макроциклы являются биосовместимыми и не вызывают неспецифический иммунный ответ [46]. В работе [55] на мышах была изучена токсичность K[4]A **4**, меченого радиоактивной серой (S^{35}). Данный макроцикл нетоксичен в концентрационном диапазоне до 100 мг/кг, не накапливается в печени и селезенке, не проникает в мозг и быстро выводится с мочой.



4	n = 4	R ₁ = H	R ₂ = SO ₃ H
5	n = 4	R ₁ = H	R ₂ = CH ₂ COOH
6	n = 4	R ₁ = H	R ₂ = CH ₂ PO ₃ H ₂
7	n = 6	R ₁ = H	R ₂ = SO ₃ H
8	n = 8	R ₁ = H	R ₂ = SO ₃ H
9	n = 6	R ₁ = H	R ₂ = N=N-Ph-SO ₃ H
10	n = 4	R ₁ = H	R ₂ = N=N-Ph
11	n = 4	R ₁ = H	R ₂ = OH
12	n = 4	R ₁ = CH(CH ₃) ₂	R ₂ = CH ₂ -CO-N(C ₂ H ₅) ₂

Рисунок 1.4. Структуры К[n]А 4–12.

Некоторые виды каликсаренов могут сами по себе использоваться в качестве лекарств. Например, запатентованы методы лечения ВИЧ, герпеса и гриппа с использованием К[4]А 4–6 (рис. 1.4), имеющих полярные (сульфонатные, карбоксилатные и фосфатные) заместители [56]. Тетра-, гекса- и октамерный сульфонатные каликсарены 4, 7–12 (рис. 1.4) эффективно ингибируют активность грамположительной бактерии *Corynebacterium*, а также обладают селективной фунгицидной активностью против грибковых штаммов *Fusarium solani f. sp. Mori*, *Rosellinia necatrix* и *Colletotrichum dematium* [57]. К[4]А 13 (рис. 1.5), содержащий N-метилдиэтанолламмониевые группы, в композициях с тетрациклином не только повышает его стабильность в водном растворе, но также усиливает антибиотический эффект против грамотрицательной бактерии *P. aeruginosa* за счет аддитивного эффекта [58]. При *in vitro* изучении антитромботической активности наибольшей эффект проявили октамерные аналоги 8, 14, 15 (рис. 1.5) [59]. К[6]А 7 (рис. 1.4) способен ингибировать образование амилоидных фибрилл инсулиновых молекул [60]. Колеманом А. и соавторами в своем патенте была описана противоопухолевая активность широкого ряда фосфатных К[4]А [53]. Полигидроксиаминное производное К[4]А 16 (рис. 1.5) является высокоэффективным в индукции гибели клеток в клетках рака яичника человека [61]. Макроцикл 17 (рис. 1.5), полученный из арбутина (природного антитирозидазного средства), помимо улучшенной растворимости демонстрирует повышенную антитирозидазную и антимеланомную активность по сравнению с мономером. Что касается каликсрезорцинов, то только в одной работе сообщалось об их цитотоксической активности в отношении раковых клеток [31]. В этой работе было показано, что модификация резорцинареновой платформы с помощью дендримеров 18, 19 (рис. 1.5) приводит к увеличению противоопухолевой активности, которая зависит от природы клеточной линии, но эти исследования проводились в диметилсульфоксиде (ДМСО) из-за низкой растворимости данных макроциклов в воде.

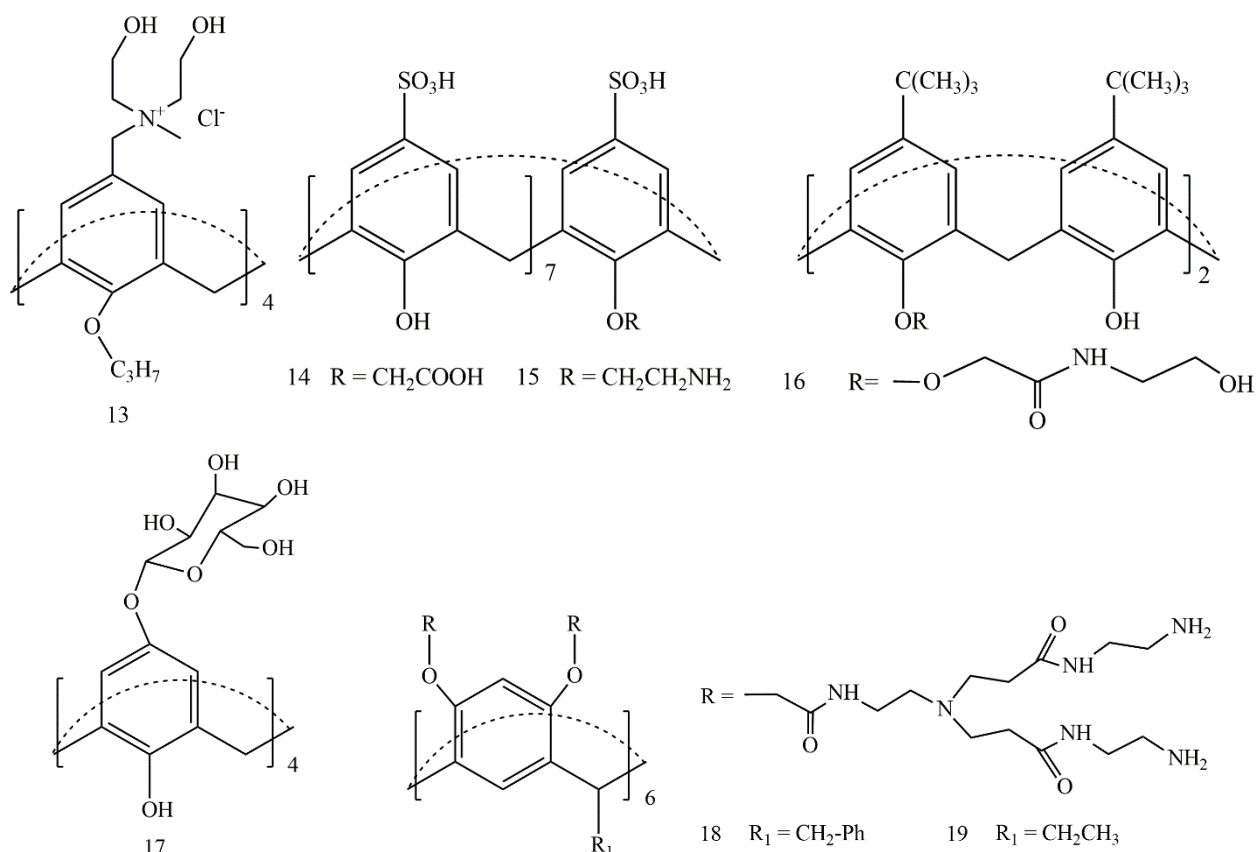
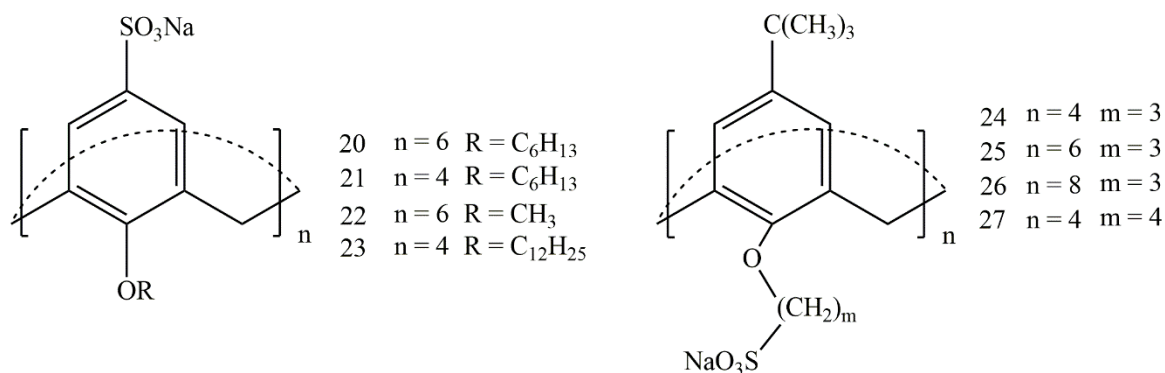


Рисунок 1.5. Структуры K[n]A 13–17 и K[6]P 18, 19.

1.3. Самоорганизация в системах на основе водорастворимых амфифильных каликсаренов

1.3.1. Мицеллы и везикулы

Каликсарены, содержащие гидрофильные группы на одном ободе и гидрофобные фрагменты на противоположном ободе, могут проявлять амфифильные свойства. Конусообразная форма у такого типа макроциклов является предпосылкой для агрегации [62, 63], а относительно жесткая структура макроциклического каркаса может повысить стабильность формируемых агрегатов [64]. В 1984-86 годах Синкай С. и соавторы описали сульфатный K[6]A с *n*-гексильными группами на нижнем ободе **20** (рис. 1.6), который образует в водном растворе сферические мицеллы выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), равной 0.6 мМ [15, 16]. Чуть позже этой же группой была показана связь между агрегационной способностью сульфатного макроцикла и длиной алкильных фрагментов на нижнем ободе [20]. Немодифицированные макроциклы или имеющие метильный фрагмент на нижнем ободе (**4**, **7**, **8**, **22**, рис. 1.4, 1.6) не образуют мицелл, а K[n]A **24–26** (рис. 1.6) с *n*-бутильными и более длинными цепями самоорганизуются в мицеллы.

Рисунок 1.6. Структуры K[n]A **20–27**.

Влияние алкильной цепи и количества мономерных звеньев в макроциклическом каркасе на агрегационные свойства каликсаренов изучалось также группой Базилио Н. [38]. Авторами было обнаружено, что значение ККМ производных сульфонатных K[4]A в конической конформации уменьшается при увеличении длины алкильных цепей из-за более сильных гидрофобных взаимодействий. Свободная энергия Гиббса мицеллообразования с увеличением длины гидрофобного фрагмента становится более отрицательной [65], что согласуется с тенденцией, наблюдаемой и для обычных ПАВ. С другой стороны, значения ККМ каликсаренов возрастает с увеличением количества мономерных звеньев. Эти результаты можно объяснить тем, что модифицированные K[4]A, как было сказано ранее, находятся в конической конформации, которая благоприятна для образования глобулярных агрегатов, а производные K[6]A и K[8]A находятся в иных конформациях. Изменение этих конформаций на конусную, требуемую для образования агрегатов, подразумевает дополнительные энергетические затраты [38, 65]. Амфифильный сульфонатный K[4]A с н-додецильными фрагментами на нижнем ободе **23** (рис. 1.6) в водных растворах самоассоциирует в наноагрегаты, способные к солюбилизации гидрофобного антибактериального препарата кларитромицина [66]. Бактерицидные свойства препарата значительно усиливаются при его загрузке и вызывают максимальное ингибирование роста бактерий, биопленки и разрушение клеток при более низких концентрациях.

Сульфонатный K[8]A с н-гексильными фрагментами **26** (рис. 1.6) образует мицеллы, способные солюбилизировать гидрофобные препараты, а затем медленно их высвободить [67]. Барбера Л. и соавторы описали мицеллы, формируемые K[4]A **27** (рис. 1.6) с сульфогруппами на концах алкильных фрагментов на нижнем ободе, то есть гидрофобное ядро мицелл сформировано пара-трет-бутильными фрагментами верхнего обода, а поверхность частиц состоит из тетра-О-бутилсульфонатных групп [68]. В мицеллярном состоянии молекулы этого макроцикла располагаются в шахматном порядке. Заключение сделано на основе наличия кросс-пиков на 2D NOESY спектрах, указывающих на близость трет-бутильных атомов водорода и остатков бутилсульфонатных групп молекул K[4]A **27**. Гидрофобное ядро этих мицелл

используется для повышения растворимости в воде таких лекарств, как напроксен и флурбипрофен.

Амфифильные каликсарены, содержащие фосфонатные группы, действуют как имитаторы фосфолипидов и могут образовывать различные агрегаты с полярными группами, направленными наружу к полярным растворителям [25, 69–71]. Фосфатный K[4]A с н-октильными группами **28** (рис. 1.7) в водном растворе образует сферические мицеллы диаметром 4–5 нм, которые стабильны в широком диапазоне pH и способны интеркалировать куркумин в качестве модельного антиоксиданта. Эти мицеллы демонстрируют более низкую токсичность по отношению к клеткам феохромоцитомы крыс (клеточная линия PC12) по сравнению с их мономерными аналогами, что делает их возможными кандидатами для целевой доставки лекарств [69]. Фосфонатный макроцикл с н-октадецильными фрагментами **29** (рис. 1.7) в растворе агрегирует в нановолокна диаметром 6 нм, которые способны инкапсулировать флуорофор, что актуально при изготовлении тканевых каркасов [25]. Метилфосфатные K[4]A с н-гексильными **30** [70] и н-додецильными **31** [71] фрагментами на нижнем ободе (рис. 1.7) образуют в водном растворе везикулы с примерно одинаковым диаметром 107 нм. Данные агрегаты стабильны при физиологическом pH, но быстро разрушаются при $\text{pH} < 6$ и могут высвободить инкапсулированный лекарственный препарат [70]. Агрегаты, образованные макроциклом **30**, можно использовать для совместной доставки гидрофобных противоопухолевых препаратов паклитаксел и карбоплатин [72]. В этом случае карбоплатин располагается в ароматической полости макроцикла, а паклитаксел солюбилизируется в гидрофобном слое, образованном алкильными фрагментами макроцикла. Эта композиция была эффективно поглощена двумя клеточными линиями рака толстой кишки и показала большую цитотоксичность, чем простая смесь двух препаратов.

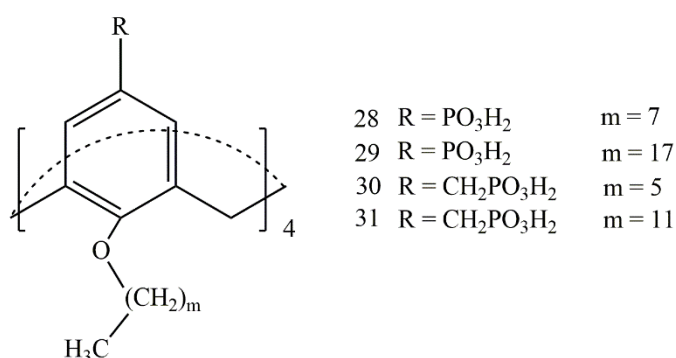


Рисунок 1.7. Структуры K[n]A **28–31**.

Совместная солюбилизация двух типов лекарств различной растворимости была реализована также в работе [73]. K[4]A **32** (рис. 1.8), содержащий сукцинильные группы на верхнем ободе и н-додецильные цепи на нижнем ободе, формирует многослойные везикулы в водном растворе. Вследствие плохой растворимости данного макроцикла в воде везикулярные

частицы были получены методом испарения растворителя из эмульсии. Согласно компьютерному моделированию, молекулы макроцикла образуют везикулы из четырех слоев, которые удерживаются благодаря водородным связям между карбоксильными группами. В тоже время, формирование каждого слоя осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий алифатических групп, бокового π - π -стэкинга и водородных связей между соседними латеральными карбоксильными группами. Размер и индекс полидисперсности полученной коллоидной дисперсии не изменялся в течение более двух лет. Такая хорошая стабильность приписывается поверхностному дзета-потенциалу, равному -40 мВ, что достаточно для генерации отталкивающих сил между агрегатами и предотвращения дальнейшей агрегации между ними. Таким образом, полученные везикулы на основе амфифильного сукцинильного К[4]А **32** имеют преимущество перед традиционными липосомами, которые могут гидролизироваться или окисляться.

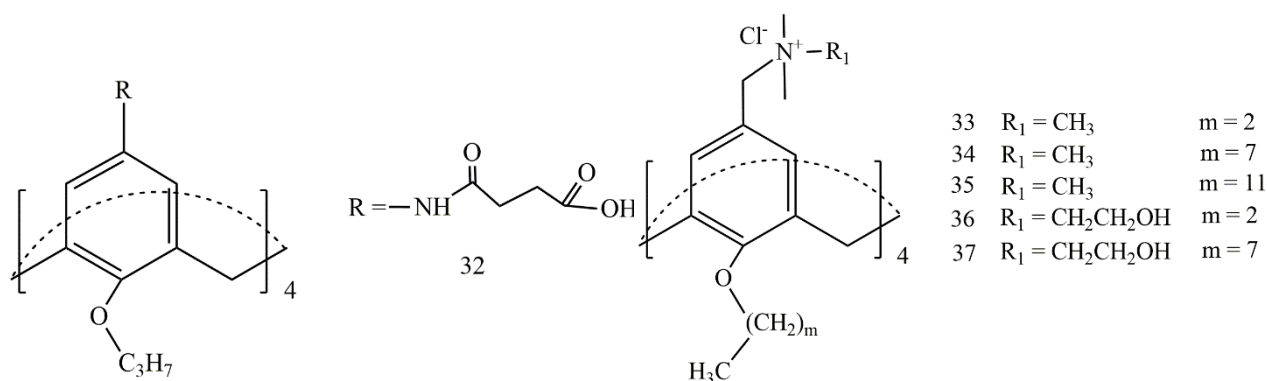


Рисунок 1.8. Структуры К[4]А **32–37**.

Большое количество работ посвящено изучению агрегации амфифильных каликсаренов с алкиламмониевыми группами [64, 74, 75]. Такой интерес к ним связан с протонированием азота в кислой среде и, следовательно, возможностью рН-индуцируемого изменения морфологии агрегатов. Макроциклы **34**, **35** (рис. 1.8) образуют мицеллы диаметром порядка 5 нм [71], которые при высоких концентрациях переходят в прямоугольные лиотропные жидкие кристаллы [74]. Однако если смешать макроцикл **35** с идентичным по нижнему ободу К[4]А **31** (рис. 1.8), но имеющим фосфонатные группы на верхнем ободу, то наблюдается формирование везикулярных частиц с размером около 100 нм, которые могут быть обернуты в пептид-гликолевую оболочку для целевой доставки лекарства.

Мчедлов-Петроссян Н. и соавторы также отметили схожесть агрегационного поведения К[4]А **36** (рис. 1.8) с ионным ПАВ [75]. Было предположено, что сдвиги полос поглощения и излучения в видимой области, а также изменения значений константы диссоциации свидетельствуют об агрегации, или мицеллообразовании, макроцикла подобно традиционному амфифилу. Методы динамического и электрофоретического рассеяния света показали, что агрегаты появляются в воде при концентрации макроцикла выше 6×10^{-3} М, их диаметр

составляет примерно 3–4 нм, а дзета-потенциал +66 мВ [75]. Позже Ухатская Е. и соавторы дополнили эти исследования и обнаружили, что везикулярные агрегаты на основе **33**, **36** и **37** (рис. 1.8) образуются уже при концентрациях свыше 8.79×10^{-6} М, 367×10^{-6} М и 47.8×10^{-6} М соответственно [76]. При больших концентрациях в растворах **36** и **37** (рис. 1.8) наблюдалось сосуществование везикул с агрегатами другого типа (предположительно мицеллами). Для катионных ПАВ переход везикул в мицеллы с увеличением концентрации известен [77] и объясняется тем, что взаимодействия между гидрофобными фрагментами усиливаются с увеличением концентрации ПАВ, поэтому они более плотно упакованы.

Амфифильные К[4]А с амино- (**38**) и имидазолевыми (**39–41**) группами на верхнем ободе (рис. 1.9) самоассоциируют в водных растворах, демонстрируя две критические концентрации агрегации (ККА) [78]. В растворе с концентрацией ниже первого значения ККА₁ формируются мелкие мицеллярные агрегаты, в концентрационном диапазоне между ККА₁ и ККА₂ одновременно сосуществуют мицеллы и везикулы, а после достижения ККА₂ увеличивается доля крупных или многослойных везикул. Агрегаты во всем диапазоне концентраций показывают высокую инкапсулирующую способность по отношению к противораковому препарату DOX, однако данные везикулы обладают низкой стабильностью при 37 °С, что является серьезным ограничением их использования в качестве лекарственного наноконтейнера.

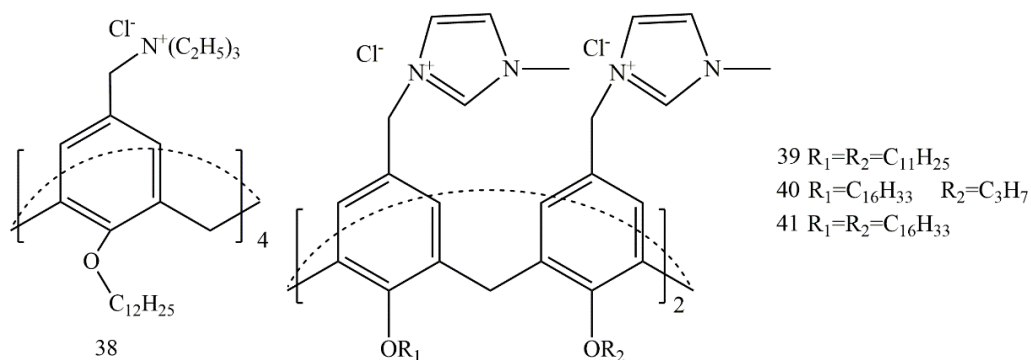


Рисунок 1.9. Структуры К[4]А **38–41**.

Ли М. и соавторы описали не только влияние длины гидрофобных фрагментов на размер и структуру агрегата, но и структурный переход везикула-мицелла при изменении pH в водной среде амфифильных К[4]А с *n*-децильными фрагментами на нижнем ободе и олигоэтиленоксидными фрагментами, пришитыми к аминогруппе на верхнем ободе **42–44** (рис. 1.10) [64]. К[4]А **42** с одним этиленоксидным звеном образует крупные везикулярные агрегаты. Увеличение длины этиленоксидной цепи приводит к уменьшению размера формируемых частиц и переходу от везикул к мицеллам. Снижение pH приводит к протонированию аминогрупп, что увеличивает площадь поверхности гидрофильной «головной» группы и, следовательно, увеличивает «конусность» молекулы. Изменение pH с 7 до 6 для агрегатов на основе **43** вызывает резкое уменьшение диаметра агрегатов с 36 до 6 нм, то есть наблюдается переход от везикул к

мицеллам. Этот фазовый переход может способствовать высвобождению лекарственного средства, предварительно инкапсулированного в везикулы.

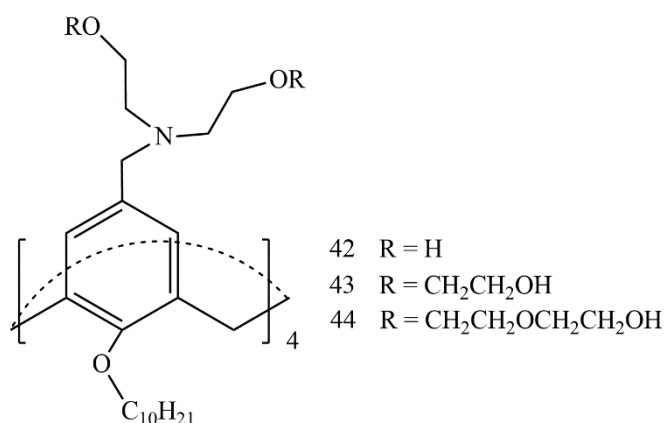


Рисунок 1.10. Структуры K[4]A **42–44**.

Агрегация производных K[4]A, содержащих первичные аминогруппы на верхнем ободе и алкильные фрагменты различной длины (н-пропил-, н-гексил-), в водной среде с различным значением pH была исследована Фуджи С. и соавторами [79]. В кислой среде из-за сильного отталкивания протонированных аминогрупп макроциклы **45** и **46** (рис. 1.11) образуют сферические мицеллы. При повышении pH среды (частичном депротонировании аминогрупп **45**) наблюдается переход сферических мицелл в цилиндрические мицеллы, а в случае с **46** происходит последовательный переход сферических мицелл в цилиндрические мицеллы, а затем в однослойные везикулы, что объясняется изменением «конусности» молекул макроциклов. Увеличение pH до 10 в растворе **45** приводит к формированию сетчатой структуры и гелеобразованию. Для макроцикла с более длинными алкильными цепями (н-нонил-) **47** (рис. 1.11) цилиндрические мицеллы формируются уже при кислом pH, а подщелачивание раствора приводит к выпадению осадка. Кроме того, добавление ахирального K[4]A **45** к хиральному K[4]A **48** (рис. 1.11) вызывает морфологическую перестройку везикул на основе **48** в нитевидные цилиндрические смешанные агрегаты с усиленной хиральностью [80]. При стехиометрическом соотношении макроциклов цилиндры собираются в лентоподобные плоские структуры. При избытке **45** в растворе начинают образовываться ахиральные цилиндры из индивидуального **45**, и количество смешанных цилиндрических агрегатов, образованных из **45** и **48**, уменьшается. Подобные цилиндрические структуры образуются при смешении аммонийного **49** и сульфатного **50** макроциклов (рис. 1.11) [81]. Однако, в отличие от работы [79] переход сфера–цилиндр в смешанной системе **49–50** происходит не за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий, а благодаря электростатическому притяжению между противоположно заряженными группами на верхних ободах макроциклов. Данные макроциклы имеют схожие н-гептильные цепи на нижнем ободе и в индивидуальном состоянии формируют монодисперсные

мицеллы с низким числом агрегации. При эквимольном смешивании **49** и **50** происходит полная нейтрализация их зарядов, и в смешанной системе формируются везикулы с размером около 100 нм.

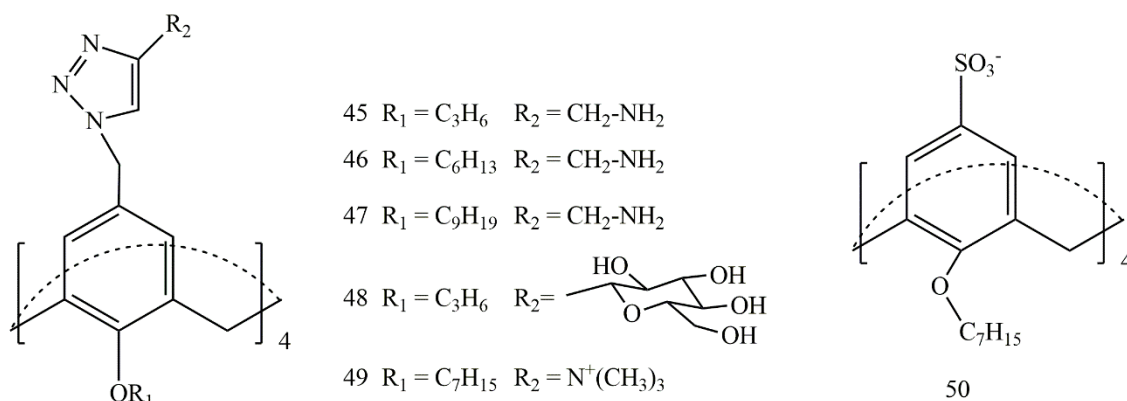


Рисунок 1.11. Структуры K[4]A **45–50**.

Функционализированные аланиновыми фрагментами молекулы K[4]A **51** (рис. 1.12) формируют в кислой среде (рН 3) сферические агрегаты диаметром 200–250 нм [82]. При увеличении рН до нейтрального наблюдается образование 500-нм ожерельеобразных агрегатов, сформированных за счет сильных межмолекулярных водородных связей. Последующее подщелачивание до рН 9 приводит к разрушению этих агрегатов. Далее были получены дендритные трехмерные наноструктуры, в которых серебро осаждено на поверхности полученных агрегатов K[4]A. Таким образом, агрегаты на основе амфифильного K[4]A **51**, функционализированного аминокислотными фрагментами, можно использовать в качестве стабилизаторов и регуляторов формы в реакциях восстановления металлов из их солей.

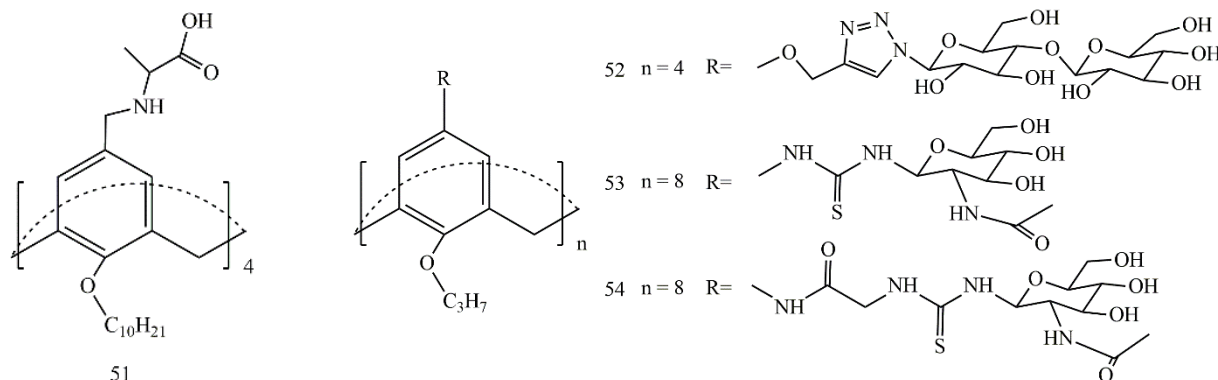


Рисунок 1.12. Структуры K[n]A **51–54**.

Модификация каликсаренов углеводными группами может применяться для нацеливания агрегатов на конкретные клеточные рецепторы. Амфифильный K[4]A **52** (рис. 1.12), модифицированный крупными углеводными, а именно целлобиозными фрагментами, в растворе формирует цилиндрические мицеллы [83]. Изменение рН или температуры вызывает разрушение водородных связей между сахаридными фрагментами, увеличение объема «головной» группы макроцикла и морфологический переход цилиндрической структуры в сферическую. Молекулы K[8]A **53**, **54**, модифицированных *n*-пропильными группами по нижнему ободу и

глюкозаминогруппами по верхнему ободу (рис. 1.12), находятся в агрегированной форме в водной среде в широком диапазоне pH. Они образуют везикулярные агрегаты в нейтральной и щелочной среде, но в кислой среде ($\text{pH} < 4.5$), когда происходит протонирование азота и, следовательно, изменяется поверхностный заряд агрегатов, происходит переход от везикулы к мицелле [84]. Такое pH-чувствительное поведение агрегатов K[8]A вместе с их способностью молекулярного распознавания открывает перспективы применения в качестве систем селективной доставки гидрофильных лекарственных средств (например, при инфекциях или опухолях с кислой средой).

Природа ионной группы амфифильных каликсаренов является ключевым параметром для контроля их агрегации в водном растворе. Если карбоксилированные K[4]A образовывали бислоиные структуры (везикулы и ламеллярные жидкие кристаллы), то K[4]A с триметиламмониевыми группами, как было сказано ранее, образуют небольшие мицеллы диаметром менее 5 нм, агрегирующие при более высоких концентрациях в прямоугольные лиотропные жидкие кристаллы [74]. В другой работе [62] описан амфифильный дендро-K[4]A **55** (рис. 1.13), который самостоятельно агрегирует в абсолютно однородные и структурно устойчивые мицеллы из семи молекул макроцикла. Мицеллярная форма агрегатов, движущей силой образования которых, вероятно, является водородное связывание, подтверждена инкапсуляцией нерастворимых в воде производных порфирина и фуллерена. Другие дендримерные конъюгаты на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), бензамида и амфифильных K[4]A, содержащих различные алкильные цепи (н-пропил-, н-пентил- и н-децил-) **56–58** (рис. 1.13), образуют в водном растворе мицеллярные структуры [85]. Однако гидрофобные противовоспалительные лекарства напроксен и ибупрофен инкапсулируются не в гидрофобном ядре данных мицелл, а внутри полостей макроциклов за счет водородных связей и π - π -стэкинга. Взаимодействие «гость-хозяин» между лекарством и макроциклом «раздвигает» заместители на верхнем ободу и инициирует формирование полых мицелл большего диаметра. Интересно, что увеличение длины алкильного фрагмента на нижнем ободу приводит к снижению стабильности комплексов. Такое влияние объясняется тем, что более длинные алкильные фрагменты сильнее отталкивают от себя бензамидные заместители, что сужает полость для капсулирования препаратов. Соответственно, чем короче алкильные группы на нижнем ободу макроцикла, тем больше лекарства инкапсулируется. K[4]P в конформациях «кресло» и «лодка» могут быть модифицированы метокси-ПЭГ по гидроксильным группам через гидразонные мостики с получением дендримероподобных и амфифильных конъюгатов (**59**, **60**, рис. 1.13), соответственно [86]. В растворе оба вида конъюгатов образуют ассоциаты, способные к связыванию противоопухолевого препарата DOX, и его высвобождению в кислой среде в результате гидролиза конъюгатов. Данные конъюгаты и продукты их гидролиза

продемонстрировали низкую гемолитическую активность и низкую цитотоксичность в отношении клеток Chang liver. Между тем была обнаружена улучшенная цитотоксичность и фотодинамическая активность инкапсулированных в конъюгаты гидрофильных субстратов (DOX и метиленового синего).

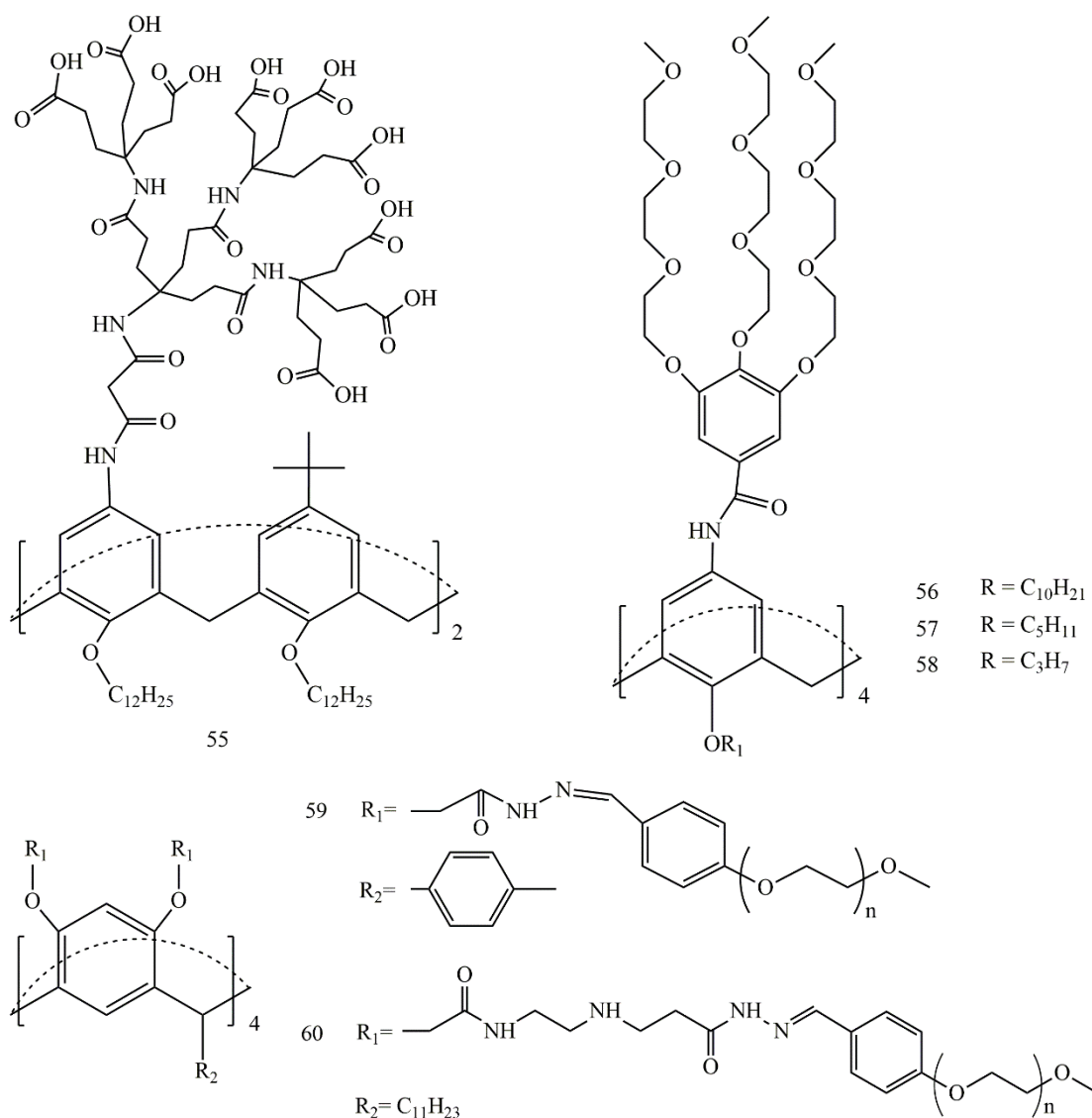


Рисунок 1.13. Структуры К[4]А 55–58 и К[4]Р 59, 60.

1.3.2. Капсулы и стопочные структуры

Макроциклические соединения способны образовывать не только сферические агрегаты, но и формировать капсульные и стопочные структуры, главным образом, за счет водородных связей или электростатических сил. Значительное количество капсул, образованных для разных «гостей», показано на примерах К[4]Р [43, 87–91]. В таких случаях инкапсуляция «гостей» наблюдается в полости, образованной между «чашами» макроциклов [92]. За счет образования водородных связей между гидроксильными группами амфифильный К[4]Р 61 (рис. 1.14) может формировать капсулы, состоящие из 6 молекул макроцикла и 8 молекул воды. Данные капсулы могут использоваться как нанореакторы для проведения реакций циклизации [93, 94],

биполярного циклоприсоединения [95], окисления тиоэфиров до сульфоксидов [96]. Возможность проведения этих процессов без присутствия катализаторов, сохраняя при этом высокий выход продукта и большую селективность, в том числе и стереоселективность, привлекает большое внимание к этим макроциклическим системам.

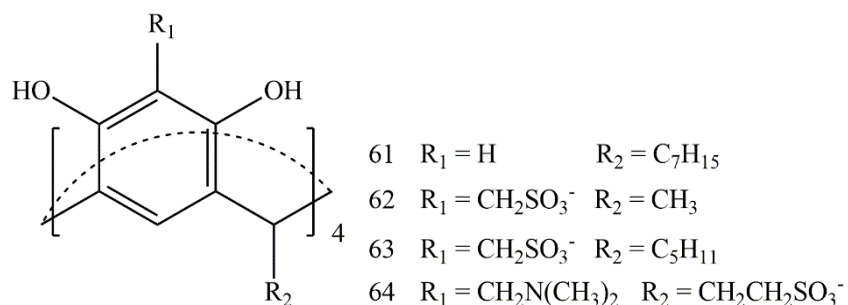


Рисунок 1.14. Структуры K[4]P **61–64**.

Капсулы могут быть образованы путем нековалентного взаимодействия противоположно заряженных K[4]A **68** и **69** (рис. 1.15). В работе [97] показано образование таких капсул в эквимольном растворе данных макроциклов в полярных растворителях в результате множественных ионных взаимодействий. Полученные капсулы имеют внутреннюю полость, которая может вместить такие катионные молекулы, как ацетилхолин, тетраметиламмоний и N-метилхиноклидиний. Подобная система была получена в смеси виологенового **66** (рис. 1.15) и сульфонатного K[4]P **62** (рис. 1.14). Стабильность молекулярной капсулы зависит от степени окисления виологена: полное восстановление виологеновых групп приводит к разрушению капсулы и ее диссоциации [98].

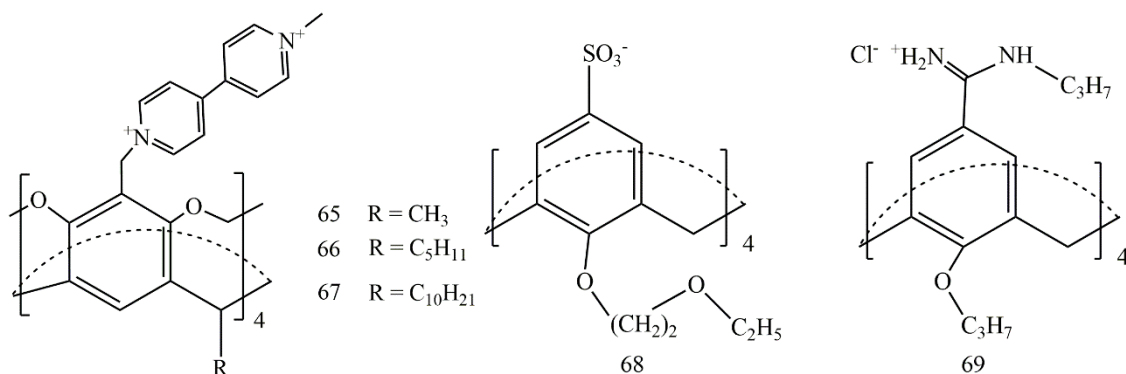


Рисунок 1.15. Структуры K[4]P **65–67** и K[4]A **68, 69**.

Молекулы K[5]A **70** (рис. 1.16) с фосфоновыми группами на верхнем ободе образуют бисмолекулярные капсулы размером 2 нм, которые стабильны в водном растворе в широком диапазоне pH (2–10), но разрушаются в присутствии полярного апротонного растворителя (N,N-диметилформамид). Структура капсул также нарушается при интенсивном перемешивании, что в свою очередь позволяет инкапсулировать противораковый препарат карбоплатин с эффективностью инкапсуляции 85%. Удаление воды из данной системы приводит к высвобождению инкапсулированного лекарства и образованию нановолокон диаметром 2 нм, в

которых «чаша» одного К[5]А вложена в «чашу» другого [99]. В работе [100] описано образование стопочных агрегатов «голова к хвосту» за счет электростатических взаимодействий в растворе К[8]А **71** (рис. 1.16) в узком диапазоне рН 7.05–7.58. Изменение кислотности среды (подкисление или подщелачивание) приводит к разрушению данных агрегатов. Подобная нековалентная полимеризация мономерных единиц на основе К[4]Р **64** (рис. 1.14) с противоположно заряженными ободами была реализована Коршиным Д. и соавторами в работе [101]. Сформированный таким образом супрамолекулярный олигомер может связывать гидрофобный 1,5-диаминонафталин. Однако подкисление данной смеси приводило не только к протонированию всех четырех аминогрупп верхнего обода **64**, но и появлению катионной формы 1,5-диаминонафталина, которая в кислой среде крепко связывалась с нижним сульфатным ободом **64**, что разрушало полимерную природу агрегатов с образованием индивидуальных комплексов «гость-хозяин».

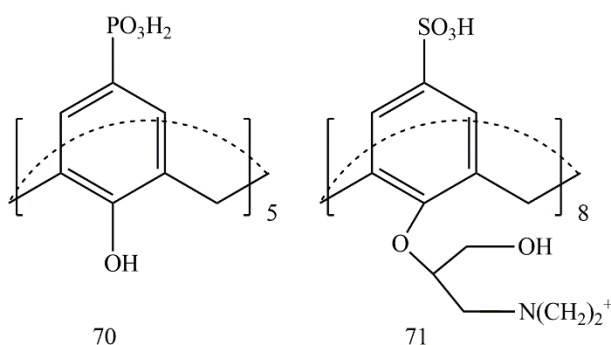


Рисунок 1.16. Структуры К[*n*]А **70**, **71**.

Агрегация молекул каликсаренов по типу «голова к хвосту» может быть реализована не только за счет электростатических взаимодействий, но и кооперативного эффекта слабых гидрофобных взаимодействий. Сякаев В. и соавторы исследовали зависимость типов агрегатов К[4]Р от длины алкильных фрагментов. В то время как макроцикл с метильными группами не агрегировал, макроцикл с *n*-гептильными группами образует в водном и водно-метанольном растворах «классические» мицеллы. Стопочные структуры «голова к хвосту» для К[4]Р с *n*-пентильными фрагментами **63** (рис. 1.14) формируются благодаря СН–π или π–π взаимодействиям. Связывание «гостей» (тетраметиламмоний и *N*-метилпиридиний) приводит к дополнительной стабилизации стопочной структуры агрегатов [102, 103]. Было показано, что связывание молекул «гостей» агрегатами К[4]Р более эффективно, чем индивидуальными молекулами макроцикла, потому что в этом случае молекулы «гостя» входят в капсулу, образованную двумя макроциклическими молекулами [103, 104]. Кашапов Р. и соавторы исследовали агрегацию тетравиологеновых К[4]Р в водных средах и описали влияние длины алкильных групп на нижнем ободу на структуру агрегатов [105]. Макроцикл с метильными фрагментами **65** (рис. 1.15) не образовывал агрегатов, а кавитанд с *n*-децильными фрагментами

67 (рис. 1.15) собирался в сферические агрегаты, вероятно, везикулярного строения. Для кавитанда с *n*-пентильными фрагментами **66** (рис. 1.15) наблюдалось формирование стопочных структур по типу «голова к хвосту». Такое поведение необычно для классических ПАВ, но, как видно из приведенных выше примеров, этот тип агрегации характерен для К[4]Р с *n*-пентильными группами на нижнем ободе.

1.4. Самоорганизация в смешанных системах на основе водорастворимых каликсаренов

В современной супрамолекулярной химии наиболее широко используемым подходом к формированию ансамблей с полезными свойствами является объединение нескольких компонентов различной структуры путем их нековалентной самосборки. Данный подход позволил создать большое число систем, обладающих свойствами наноконтейнеров [106], нанореакторов [107] и молекулярных устройств [108]. Супрамолекулярный подход может сделать синтез сложных структур более простым и обратимым по сравнению с ковалентной модификацией. В этом ключе создание супрамолекулярных амфифилов (супраамфифилов) является одной из активно развивающихся областей. В отличие от традиционных амфифильных соединений, в супраамфифилах гидрофильные и гидрофобные фрагменты связаны нековалентными взаимодействиями [109]. Динамический характер образования нековалентных связей может дать всей системе обратимое изменение физико-химических параметров, что является ключевой характеристикой супрамолекулярных систем, поскольку позволяет контролировать процесс самосборки под воздействием внешних раздражителей и, следовательно, применять супраамфифилы в качестве основы интеллектуальных наноматериалов. В этом разделе рассматриваются явления смешанной агрегации каликсаренов и потенциальное применение данных смешанных систем на практике с особым акцентом на доставку лекарств и другие аспекты биомедицины.

1.4.1. Ассоциация в смешанных системах каликсаренов с ПАВ

Каликсарены могут быть использованы в качестве строительных блоков для супраамфифилов, а именно в качестве гидрофильного фрагмента, проявляющего рецепторную способность для другой молекулы с гидрофобным фрагментом [110, 111]. Ряд исследований посвящен образованию агрегатов при смешивании сульфонатных макроциклов с катионными ПАВ. Эквимольные комплексы, образующиеся при смешении К[4]А **4** (рис. 1.4) или К[6]А **7** (рис. 1.4) с ЦТАВ, могут формировать мицеллоподобные агрегаты [112]. При добавлении неагрегирующего и поверхностно-неактивного К[6]А **22** (рис. 1.6) к катионному ПАВ с *n*-додецильным алкильным фрагментом образуются супрамолекулярные амфифилы, агрегирующие в мицеллы [113]. В отсутствие **22** значение ККМ данного ПАВ, определенная тензиометрически, составляет 14 мМ, однако в присутствии 5 мМ **22** первый перегиб на концентрационной зависимости поверхностного натяжения наблюдается уже при 0.2 мМ ПАВ.

Ниже этой концентрации в растворе существуют комплексы «гость-хозяин» соотношением 1:1, а после достижения 0.2 мМ формируются супрамолекулярные мицеллы. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ поверхностное натяжение начинает снова снижаться и при 30 мМ достигает значения, равного значению индивидуального ПАВ. Учитывая, что в структуре макроцикла имеется шесть сульфонатных групп, диссоциирующих в водной среде с образованием шести отрицательных зарядов, перегиб, наблюдаемый при соотношении ПАВ:22 =6:1, вероятно, соответствует полной компенсации зарядов компонентов в комплексе, и после 30 мМ в растворе образуются индивидуальные мицеллы ПАВ, проявляющие солюбилизирующий эффект к молекулам 22 [113, 114].

При смешивании сульфонатного К[4]А 4 (рис. 1.4) с триметиламмонийным ПАВ с н-тетрадецильным фрагментом было выявлено образование однослойных везикул, а не мицелл. В смешанной системе 4:ПАВ при соотношении 1:2.5 после обработки водной дисперсии ультразвуком с последующей лиофилизацией и регидратацией образуются стабильные везикулы [115]. Причина формирования агрегатов немиецеллярного строения в данной работе, вероятно, связана с использованием более мелкой полости макроцикла. Присутствие сульфонатного К[4]А в роли гидрофильного фрагмента придает супрамолекулярному амфифилу цилиндрическую, а не конусообразную форму, что приводит к формированию двухслойных структур.

Комплексообразование катионного ПАВ с анионным макроциклом приводит к образованию амфифилов с другими поверхностно-активными свойствами, которые агрегируют при более низких концентрациях, чем чистое ПАВ. Следует отметить, что значение ККА в присутствии К[6]А 22 уменьшается в 70 раз [113]. В другой работе было продемонстрировано снижение значения ККА геминальных ПАВ в 1000 раз в присутствии сульфонатного К[4]А 4 (рис. 1.4) [116]. Для сравнения в присутствии криптанов значение КKM снижается в 5 раз [117], а циклодекстрины наоборот повышают КKM ПАВ [118]. Более того, при изучении комплексообразования циклодекстринов, кукурбитурилов и сульфонатных каликсаренов с аммонийным производным тетрафенилэтилена было выявлено, что помимо электростатического фактора, решающую роль в эффективной совместной агрегации «гостя» в присутствии макроцикла играют предварительно организованные циклические каркасы и инкапсулирующая способность внутренней полости макроцикла [119].

Снижение значения КKM ПАВ в присутствии К[4]Р также было показано Кашаповым Р. и соавторами [120, 121]. В работах исследовалось взаимодействие аминотетраметилрованных производных сульфонатных К[4]Р 64 (рис. 1.14), 72 (рис. 1.17) с катионным ПАВ бромидом 1-гексадецил-4-аза-1-азониабицикло[2.2.2]октана (DABCO-16). Обнаружено, что при избытке макроцикла смешанные агрегаты формируются под действием электростатических сил, а при избытке ПАВ в растворе наблюдается формирование смешанных мицелл за счет

межмолекулярных дисперсионных сил, проявляющихся при контакте неполярных частей ПАВ. Варьирование соотношения компонентов в супрамолекулярной системе позволяет контролировать процесс связывания и высвобождения гидрофобных субстратов. Совместная агрегация К[4]Р **72** с анионным ПАВ додецилсульфатом натрия при нейтральных или щелочных значениях рН отсутствует или слабо выражена [122]. Однако, снижение рН до кислотных значений вызывает протонирование аминогрупп макроцикла и его электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными сульфогруппами ПАВ. В результате образования смешанных агрегатов происходит морфологический переход от сферических мицелл ПАВ к смешанным стержнеобразным мицеллам. Данная морфологическая перестройка агрегатов сопровождается увеличением инкапсуляции гидрофобного флавоноида кверцетина. Подобные изменения в супрамолекулярных структурах были реализованы в смешанной системе на основе сульфонатного К[4]А **4** (рис. 1.4) и н-гексадецильного ПАВ с сериновой «головной» группой [123]. Добавление небольшого количества **4** к раствору ПАВ сначала вызывает образование небольших мицеллярных агрегатов, а по мере увеличения содержания макроцикла в растворе появляются трубчатые структуры и везикулы из-за снижения «конусности» супрамолекулярных амфифилов.

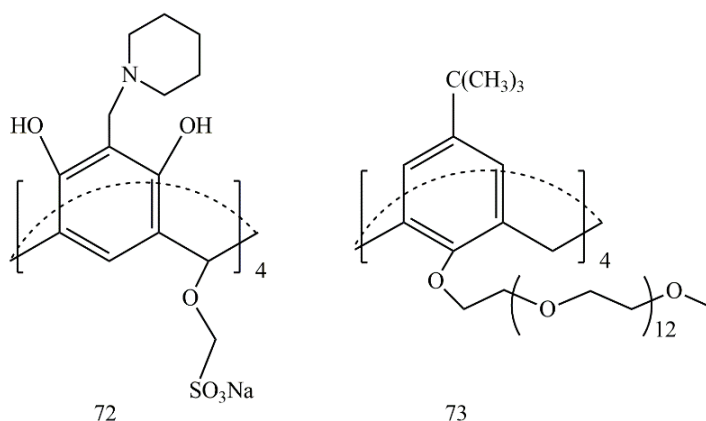


Рисунок 1.17. Структуры К[4]Р **72** и К[4]А **73**.

В работе [111] продемонстрировано образование комплекса «гость-хозяин» между гидрофобным фенилпальмитатом и гидрофильным конъюгатом на основе К[4]А и ПЭГ **73** (рис. 1.17). Данный комплекс может формировать в водном растворе различные агрегаты в зависимости от соотношения компонентов. При избытке макроцикла супраамфилилы агрегируют в везикулярные частицы диаметром 270 нм. Увеличение количества гидрофобного ПАВ до эквимольного соотношения сдвигает равновесие от везикул до мицеллярных частиц с диаметром 130 нм, а избыток ПАВ приводит к образованию сетчатых агрегатов. Таким образом, путем изменения условий среды можно регулировать высвобождение инкапсулированных препаратов.

В работе [124] Харангозо Дж. и соавторы представили исследования о влиянии размера

макроцикла на агрегацию супрамолекулярных амфифилов на основе сульфонатных К[4]А **4** и К[8]А **8** (рис. 1.4) с 1-метил-3-тетрадецилимидазолием в водных растворах. Если макроцикл с четырьмя звеньями **4** при взаимодействии с ПАВ формирует крупные наночастицы, то К[8]А образует мицеллы, которые перестраиваются в наночастицы в присутствии 50 мМ хлорида натрия. Далее эта же группа ученых исследовала влияние изменений в составе «головной» группы ПАВ на самосборку супрамолекулярных амфифилов [125]. Когда доминирует гидрофобная составляющая в «головной» группе ПАВ, то супраамфифилы с К[6]А **7** (рис. 1.4) образуют наночастицы. Молекулы ПАВ, содержащие более гидрофильные «головные» группы с большей плотностью заряда, способны формировать с макроциклом не только в наночастицы, но и в супрамолекулярные мицеллы в зависимости от соотношения компонентов, концентрации соли и температуры. Сульфонатные каликсарены **4** и **7** (рис. 1.4) формируют с бромидом 1-алкил-3-метилимидазолия комплекс 1:1 за счет катион- π и π - π взаимодействий между имидазолиевым фрагментом «гостя» и ароматической полостью макроциклов [126]. Причем комплекс «гостя» с К[4]А **4** имеет большую стабильность в отличие от комплекса с К[6]А **7**, но стабильность последнего увеличивалась с удлинением алкильного фрагмента (с метильного до н-децильного) в структуре «гостя». Методами крио-ПЭМ и малоуглового рассеяния нейтронов показано формирование стабильных сферических и многослойных частиц в водной среде К[6]А с подобными «гостями», имеющими более длинные алкильные фрагменты (от н-додецильного до н-гексадецильного) [127].

Бизе С. и соавторы описали спонтанное образование везикул на основе комплексов амино-К[6]А **74** (рис. 1.18) и ПАВ, содержащего сахарный фрагмент и карбоксильную группу на разных концах алкильной цепи [128]. Везикулы диаметром 300–600 нм обладали хорошей стабильностью во времени (в течение месяца) в широком диапазоне рН (от 4 до 11). Однако сильноокислотная среда приводила к разрушению везикул из-за протонирования аминогрупп макроцикла и карбоксильных групп ПАВ. Пенг Ш. и соавторы сконструировали динамическую везикулу из супраамфифилов на основе электростатического взаимодействия (додецилоксибензил)-трипропаргиламмония и сульфонатного К[4]А **4** (рис. 1.4) и затем сшили их клик-реакцией [129]. Сшитая таким образом везикула имеет улучшенную стабильность по сравнению с динамической везикулой и капсулирует гидрофильное лекарство гидроксисафлор желтый, но высвободить инкапсулированное лекарство можно только разрушив везикулу с помощью специальных молекул-триггеров. Поскольку молекулы противоположно заряженных К[4]А и ПАВ имеют высокое сродство друг к другу, то данные макроциклы также могут выступать в качестве эффективных триггеров высвобождения лекарств, инкапсулированных в мицеллах ПАВ (рис. 1.19.). Добавление избытка макроцикла **75** (рис. 1.18) к раствору ЦТАБ с солюбилизированным в мицеллы субстратом приводит к переходу мицелл в везикулярные

агрегаты, что может инициировать высвобождение инкапсулированного субстрата [130].

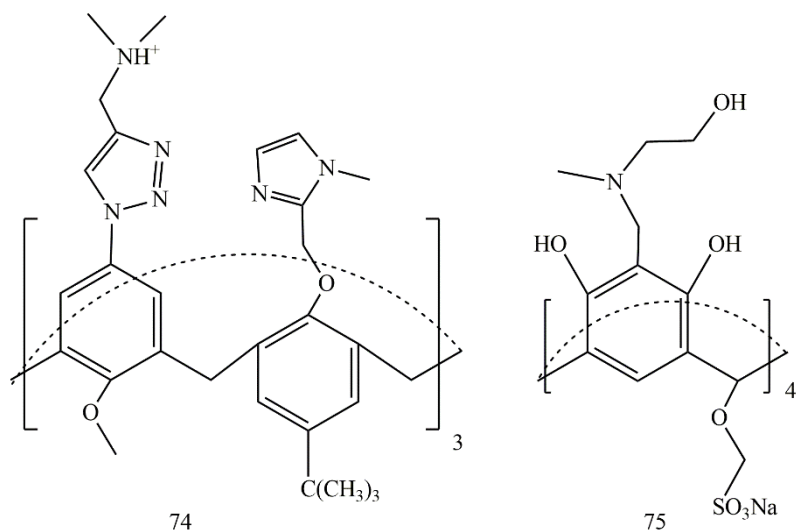


Рисунок 1.18. Структуры K[6]A **74** и K[4]P **75**.

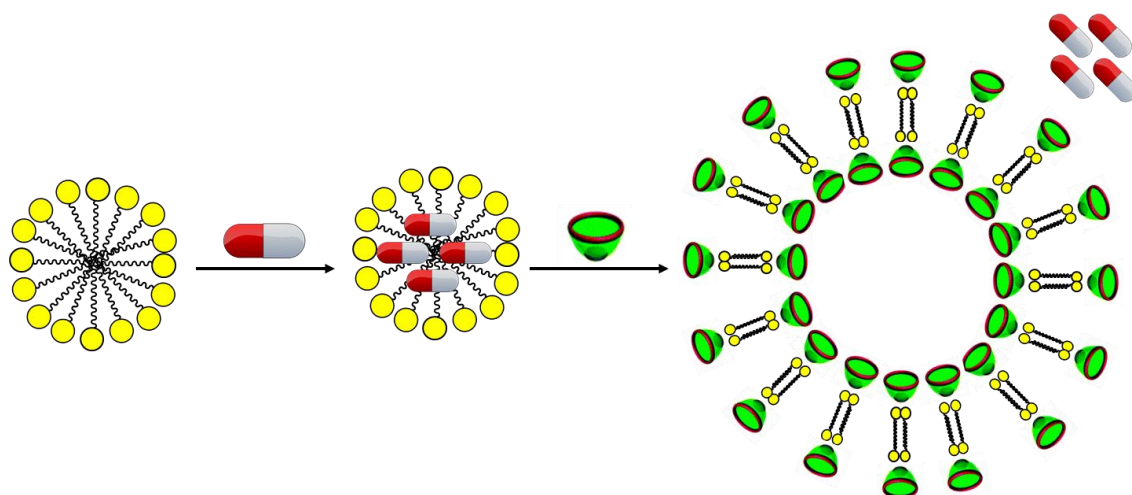


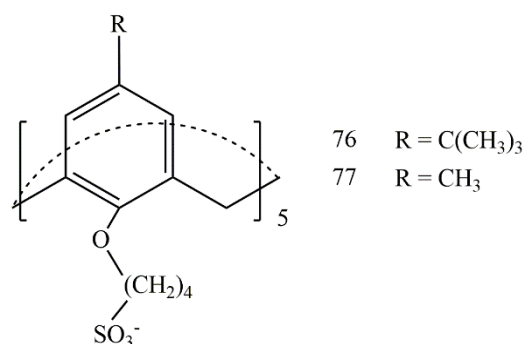
Рисунок 1.19. Высвобождение лекарств из гидрофобной области мицелл ПАВ при добавлении каликсаренов.

Стимул-чувствительная система для доставки и контролируемого высвобождения DOX на основе агрегатов сульфатного K[4]A **4** (рис. 1.4) и двукратного избытка виологенового ПАВ с додецильными фрагментами описана в статье [131]. Сформированные везикулы состояли из супраамфилов, образованных электростатическим взаимодействием отрицательно заряженных сульфогрупп одной молекулы макроцикла с положительно заряженными «головными» группами двух молекул ПАВ. При избытке **4** везикулы распадаются на отдельные комплексы «гость-хозяин» 1:1. Поскольку комплексообразование является экзотермическим процессом, нагрев приводит к разрушению агрегатов. Добавление гидрофильного β -циклодекстрина приводит к конкурентному комплексообразованию с ПАВ, что также разрушает везикулы. Восстановление виологеновой группы до нейтральной формы приводило к разрушению супраамфилов и диссоциации агрегатов.

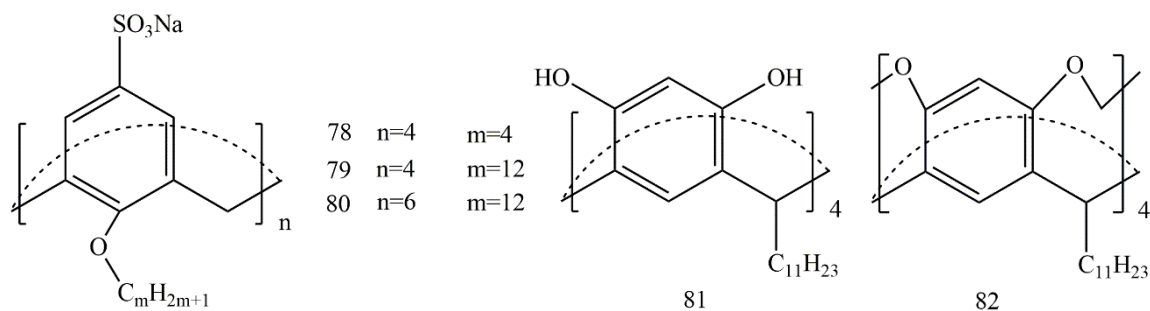
Внимание ученых при изучении комплексов каликсаренов уделялось вопросу связывания

производных холина с целью создания биосовместимых агрегатов для доставки лекарств, которые будут высвобождать капсулированный препарат под действием ферментов в организме человека. Мураяма К. и Аоки К. в 1997 г. показали возможность связывания аммониевой части нейротрансмиттера ацетилхолина с ароматическими кольцами K[4]P за счет множественных катион-π-взаимодействий [132]. В работе [133] описано получение везикулярных агрегатов из сульфонатного K[4]A **4** (рис. 1.4) и природного миристоилхолина, который может расщепляться ферментами холинэстеразы, сверхэкспрессирующимися у пациентов с болезнью Альцгеймера. Хотя гидрофобные лекарственные средства могут быть загружены и в мицеллы из индивидуального амфифильного миристоилхолина в водной среде, они не могут быть высвобождены, поскольку миристоилхолин расщепляется до миристиновой кислоты, не разрушая агрегаты. Однако комбинация **4** с миристоилхолином при молярном соотношении 1:10 дает бинарные везикулы, образованные из комплексов «гость-хозяин». Такие агрегаты распадаются под действием холинэстеразы, поскольку макроцикл не образует комплексов с миристиновой кислотой.

Писагатти И. и соавторы исследовали изменение морфологии агрегатов сульфонатного K[5]A **76** (рис. 1.20) при добавлении бола-амфифила [134]. Образующийся супрамолекулярный бола-амфифил более чем в 1000 раз увеличивает растворимость противоопухолевого препарата тамоксифена в воде. В зависимости от длины молекулы бола-амфифила возможно образование не только смешанных везикул на основе супраамфифилов, но и капсул. Авторы работы [135] отметили селективность образования таких капсул в смешанных растворах, содержащих K[5]A **76** и **77** (рис. 1.20) с пара-трет-бутильной и метильной группами соответственно и бола-амфифилами различной длины. Когда ПАВ с н-децильной цепью смешивали со смесью двух макроциклов, одна молекула бола-амфифила образовывала капсулу только с двумя молекулами макроцикла **76**. Результаты эксперимента DOSY ЯМР в этом растворе исключают взаимодействие этого ПАВ со вторым макроциклом **77**, присутствующим в растворе. Сформированные капсулы **76** с ПАВ состава 2:1 очень стабильны при температуре выше 50 °C и при 5-кратном разбавлении. Добавление к этому раствору второго болаамфифила с н-октильной цепью привело к его комплексообразованию с **77** с образованием капсул. Интересно, что ни один из других восьми возможных комплексов не образовался, даже когда оба ПАВ были одновременно добавлены в смесь двух макроциклов.

Рисунок 1.20. Структуры К[5]А **76**, **77**.

Ванг И. и соавторы получили липосомы дипальмитоилфосфатидилхолина, модифицированные сульфонатными К[4]А **21** (рис. 1.6), **78** (рис. 1.21) [136]. Макроцикл интегрировался в бислою цвиттер-ионного фосфоглицерида, что увеличило стабильность агрегатов. Особый интерес представляет возможность встраивания модифицированных каликсаренов, которые будут придавать липосомам требуемые свойства, например, таргетность. Сульфонатные К[4]А и К[6]А с *n*-додецильными группами на нижнем ободе **79**, **80** (рис. 1.21) образовывали стабильные совместные липосомы с 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (РОРС) в молярном соотношении 1:9 [137]. В водном растворе гексамерный К[6]А **80** проявляет более слабую связывающую способность, чем тетрамерный К[4]А **78**, из-за конформационной гибкости. В то же время, интеркалированный в липосомы и предварительно организованный в конической конформации макроцикл **80** проявляет более сильную связывающую способность, чем **79**. Встроенные в однослойные липосомы РОРС К[4]Р **81** (рис. 1.21) и кавитанд на его основе **82** (рис. 1.21) улучшали их стабильность [138]. Причем, поскольку значительную роль в агрегации играли водородные связи между гидроксильными группами К[4]Р и с полярными «головными» группами фосфолипидов, стабильность липосом с К[4]Р **81** была выше, чем для липосом в кавитандом **82**.

Рисунок 1.21. Структуры К[*n*]А **78–80** и К[4]Р **81**, **82**.

Принципы супрамолекулярной агрегации каликсаренов с молекулами ПАВ могут быть использованы в создании биосенсоров. В работе [139] описано образование комплексов «гость-хозяин» между амфифильным К[5]А **83** (рис. 1.22) и лизофосфатидной кислотой, сопровождающееся вытеснением связанного флуоресцентного красителя из «чаши» макроцикла. Лизофосфатидная кислота относится к биологически активным фосфолипидам и считается

идеальным биомаркером для раннего выявления рака яичников и других гинекологических раковых заболеваний. Таким образом, молекулярное распознавание макроциклов с молекулами ПАВ может быть использовано для инженерии биомедицинских сенсоров.

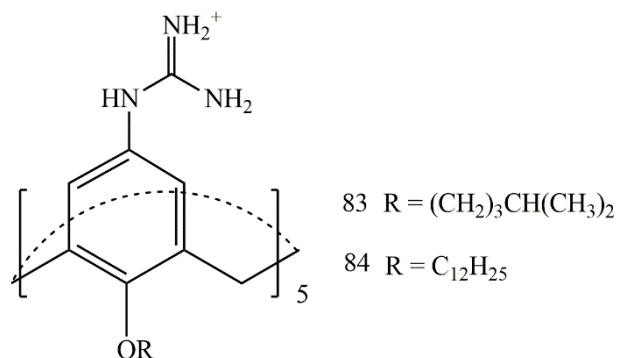


Рисунок 1.22. Структуры K[5]A **83**, **84**.

1.4.2. Ассоциация в смешанных системах каликсаренов с ароматическими соединениями

Спонтанное образование совместных агрегатов также возможно при смешивании каликсаренов с молекулами, у которых гидрофобная часть представлена не алкильным фрагментом, а ароматическим фрагментом. Супрамолекулярные везикулы могут быть сформированы на основе комплексообразования между противоположно заряженными сульфатным K[5]A **85** (рис. 1.23) и 1-пиренеметиламином [21]. Образование агрегатов происходит при соотношении «хозяин»:«гость» = 1:4, а избыток макроцикла приводит к деструкции везикул и формированию комплексов включения состава 1:1. Полученные везикулы обладают термической обратимостью и могут распадаться при повышении температуры до 35–40 °С, высвобождая предварительно загруженный в них DOX.

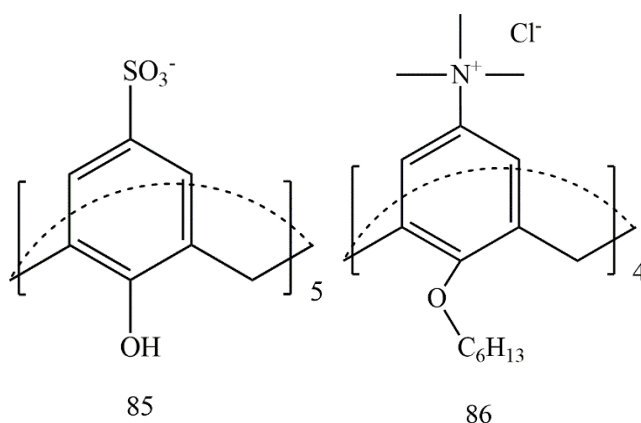


Рисунок 1.23. Структуры K[n]A **85**, **86**.

Фотолизируемые супраамфилилы на основе эквимольного комплекса сульфатного K[4]A **4** (рис. 1.4) и производного антрацена агрегируют в наночастицы со средним диаметром 266 нм [140]. При облучении УФ светом с длиной волны 365 нм производное антрацена медленно разлагалось на антрахинон и алканол, но скорость его разложения заметно возрастает в агрегированном состоянии с макроциклом, что сопровождается распадом супраамфила. Кроме

того, данные комплексы могут подвергаться эффективному фотолизу под действием видимого света с длиной волны 520 нм в присутствии эозина Y в качестве экзогенного фотосенсибилизатора. Этот подход может быть использован для создания различных фотореагирующих самосборных материалов, что делает агрегацию, индуцированную K[4]A, перспективной стратегией при создании систем для фотодинамической терапии и фотодеградации загрязняющих веществ.

Супрамолекулярные везикулы, чувствительные к фосфатазе, могут быть получены на основе АТФ и амфифильного K[4]A **86** (рис. 1.23), содержащего катионные аминогруппы на верхнем ободе [141]. Под воздействием фосфатазы молекулы нуклеозидтрифосфата распадаются до монофосфата аденозина, который не может образовывать стабильный комплекс с макроциклом, в результате чего агрегаты распадаются. Поскольку фосфатаза сверхэкспрессируется во многих опухолевых клетках, чувствительные к этому ферменту агрегаты на основе K[4]A и АТФ могут использоваться в системах доставки противоопухолевых препаратов.

Для доставки лекарств могут использоваться смешанные везикулы на основе K[4]A и лекарственного препарата. Цинь Ж. и соавторы сконструировали агрегаты на основе взаимодействия сульфонатных K[4]A **4** (рис. 1.4) и **50** (рис. 1.11) с катионным антипсихотическим препаратом хлорпромазином [142]. В обоих случаях образуются многослойные сферические мицеллы большого размера, которые можно нековалентно модифицировать таргетными агентами, такими как триметилированный хитозан. Однако в агрегатах с **4** эффективность загрузки лекарства составляет 61%, а в агрегатах с **50** – 46%. Аналогично были получены совместные агрегаты на основе амфифильного K[4]A **21** (рис. 1.6), содержащего н-гексильные группы на нижнем ободе, и противораковых препаратов иринотекан и митоксантрон [143]. Наночастицы, полученные за счет электростатического и гидрофобного взаимодействий между макроциклом и лекарствами, обладали высокой эффективностью загрузки (65.2% для композиции с иринотеканом и 43% – с митоксантроном) и предотвращали деградацию лекарств. Поверхность наночастиц может быть нековалентно модифицирована пиридиниевыми производными гиалуроновой кислоты (для агрегатов с иринотеканом) и биотина (для агрегатов с митоксантроном). Таким образом, выявленные в данной работе супрамолекулярные стратегии позволяют создавать контейнеры для лекарств и зондов для визуализации с направленным действием, что актуально для эффективной диагностики и терапии.

Инкапсуляция гидрофобных молекул в ароматическую полость K[4]A может, в свою очередь, инициировать совместную агрегацию. Супрамолекулярные агрегаты на основе гидрофобного фотосенсибилизатора и K[4]A **87** (рис. 1.24), модифицированного по нижнему ободу гидрофильными ПЭГ-фрагментами, сформированы в работе [144]. Немодифицированный

широкий верхний обод макроцикла капсулирует в полость молекулу хлорина еб с образованием супрамолекулярного амфифильного комплекса, который агрегирует в водном растворе в полимерные мицеллы диаметром менее 200 нм, что подходит для пассивной направленной доставки. Капсулирование гидрофобного холина еб, использующегося в фотодинамической терапии рака, позволяет более качественно доставлять его к опухолевым тканям.

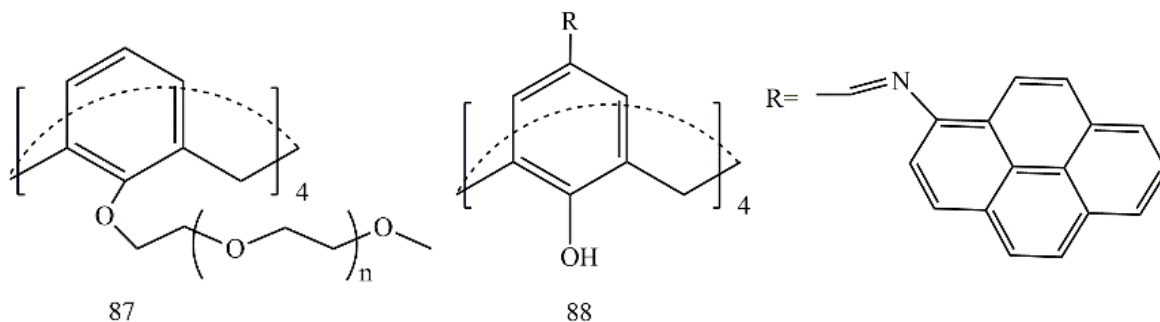


Рисунок 1.24. Структуры К[4]А **87**, **88**.

К[4]А **88** (рис. 1.24), содержащий флуоресцирующие пиреновые фрагменты на верхнем ободе, селективно связывает тринитрофенол (в растворе, в твердом виде, на поверхности силикагеля и целлюлозы), при этом комплексообразовании наблюдается усиление флуоресценции в несколько раз [145]. Образование комплекса «гость-хозяин» происходит за счет захвата тринитрофенола двумя смежными пиреновыми фрагментами посредством стэкинг-взаимодействий. В растворе молекулы макроцикла **88** существуют в виде сферических частиц диаметром 272 ± 42 нм, а добавление тринитрофенола приводит к уменьшению размеров агрегатов примерно в три раза и их слипанию в удлиненные цепочные агрегаты размером 98 ± 22 нм.

1.4.3 Ассоциация в смешанных системах каликсаренов с полимерами

В качестве гидрофобной составляющей в создании супраамфилов на основе каликсаренов могут быть использованы не только ПАВ, но и полимеры. Как известно, полимеры также, как и молекулы ПАВ могут формировать мицеллярные частицы, но в отличие от мицелл традиционных амфифилов полимерные наночастицы обладают большей стабильностью. Супрамолекулярные полимерные везикулы могут быть получены путем взаимодействия сульфонатного К[4]А **4** (рис. 1.4) и хитозана [146]. Основной движущей силой формирования агрегатов являются многочисленные электростатические взаимодействия между сульфогруппами макроцикла и аминогруппами хитозана. Данные супраамфифильные системы распадаются при повышении рН из-за частичного депротонирования хитозана. Добавление конкурирующего «гостя» также может разрушить совместные агрегаты каликсарена с полимером. По тому же принципу происходит образование смешанных агрегатов **4** и катионного полипептида протамина [147]. Клеточные эксперименты и флуоресцентная визуализация на мышцах показали, что формируемые везикулы являются нетоксичными и могут расщепляться под действием фермента трипсина с контролируемым высвобождением инкапсулированных

гидрофильных лекарств. Таким образом, представленная система может повысить эффективность лекарственного средства в местах со сверхэкспрессией трипсина и минимизировать нежелательные побочные эффекты.

Влияние внешних факторов на совместную агрегацию сульфонатных K[4]A и хитозана было исследовано Харангозо Й. и соавторами [148]. В смешанных системах с K[4]A **4** (рис. 1.4) формируются частицы меньшего размера, чем в системах с более крупными K[6]A **7** и K[8]A **8** (рис. 1.4). Увеличение концентрации хитозана приводит к увеличению диаметра наночастиц, в то время как концентрация макроцикла на размер частиц не влияет. В смешанной системе с **8** обеспечивается дополнительное связывание с алкалоидными молекулами благодаря своей большой полости, то есть этот макроцикл может заменить часто используемый триполифосфатный сшивающий агент с дополнительным преимуществом образования комплексов включения с лекарственными молекулами. Подобные закономерности смешанной агрегации и инкапсуляции алкалоидов были выявлены Винтгенсом В. и соавторами при исследовании взаимодействия различных сульфонатных каликсаренов и молекул декстрана с метилимидазольными боковыми группами [149].

ПЭГилированные супрамолекулярные системы на основе каликсаренов могут быть использованы для фототераностики, реализующей как селективную визуализацию опухолей, так и адресную терапию *in vivo*. Для адресной доставки лекарств и фотосенсибилизаторов в раковую опухоль могут использоваться смешанные мицеллы на основе эквимольного комплекса K[5]A **84** (рис. 1.22), содержащего гуанидиновые фрагменты на верхнем ободе и *n*-додециловые группы на нижнем ободе, и ПЭГилированного ПАВ с алкильным фрагментом той же длины [150–152]. Доставляемые молекулы хорошо связываются с «чашей» макроцикла. В случае фотосенсибилизаторов при этом наблюдается практически полное тушение их флуоресценции и снижение фотоактивности за счет механизма фотоиндуцированного переноса электрона. Высокое сродство макроцикла к АТФ, сверхэкспрессирующемуся в опухолевых тканях, при комплексообразовании сохраняется. Конкурентное связывание с АТФ приводит к высвобождению доставляемого субстрата (лекарства или фотосенсибилизатора) в раковой клетке. Таким образом, композиция с макроциклом не только способна избирательно визуализировать опухоль в режиме реального времени, но также обеспечивает гораздо более эффективную доставку противоопухолевых препаратов.

Вместо природных полимеров для создания супрамолекулярных систем с каликсаренами может быть использован также генетический полимер. Описанные ранее агрегаты K[4]A с амино- и имидазольными группами на верхнем ободе (**38–41**, рис. 1.9) достаточно сильно взаимодействуют с полинуклеотидом, инвертируя его заряд. Мицеллы макроцикла демонстрируют более высокий потенциал в качестве векторов в генной терапии, так как в

отличие от везикул мицеллярные частицы полностью уплотняют полинуклеотид [78].

Сансоне Ф. и соавторами было проведено получение серии функционализированных каликсаренов (рис. 1.25) с гуанидиниевыми группами и изучение их способности к связыванию с ДНК. К[4]А с *n*-гексильными **90** и *n*-октильными **91** цепями на нижнем ободе показали большую эффективность в трансфекции, по сравнению с К[4]А с *n*-пропильными фрагментами на нижнем ободе **89**, что хорошо согласуется с подтверждёнными данными, полученными для катионных ПАВ, которые широко используются в данной области. В отличие от данных К[4]А, существующих в растворе в конической конформации, конформационно подвижные К[6]А **92** и К[8]А **93** одновременно взаимодействуют не с одной молекулой ДНК, а с несколькими, образуя межмолекулярные агрегаты [153]. Позже Родик Р. и соавторы синтезировали нетоксичные амфифильные К[4]А с аммониевыми и имидазольными группами на верхнем ободе и алкильными цепями на нижнем, образующие мицеллы диаметром 3–4 (**94**) и 6 нм (**95** и **96**) [154]. К[4]А с *n*-пропильными фрагментами на нижнем ободе **94** показал низкую эффективность трансфекции, в то время как взаимодействие **95** и **96** с ДНК обуславливалось как электростатическими, так и гидрофобными взаимодействиями. Более того, мицеллы, образованные этими макроциклами, были способны конденсировать ДНК в наночастицы со средними размерами 65 и 55 нм соответственно. По сравнению с векторами на основе липидов ключевым преимуществом катионных каликсаренов является точный контроль их агрегации в небольшие наноструктуры, в то время как липидные системы взаимодействуют с ДНК, образуя относительно крупные агрегаты. По сравнению с классическими катионными ПАВ, которые также образуют небольшие мицеллярные частицы, системы на основе каликсаренов формируют гораздо более стабильные комплексы с ДНК в силу своего жёсткого ароматического каркаса.

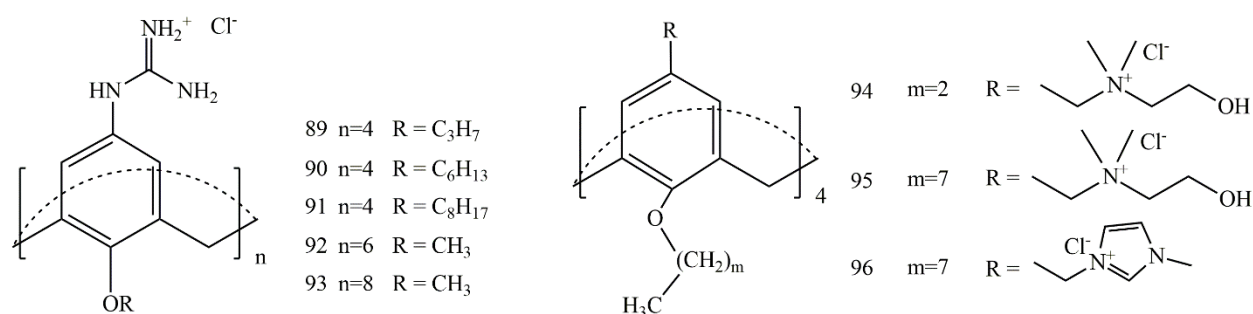


Рисунок 1.25. Структуры К[*n*]А **89–96**.

Амфифильный К[4]Р **97** (рис. 1.26) с сахаридными фрагментами в качестве гидрофильных групп на верхнем ободе и *n*-ундецильными цепями на нижнем ободе образует мицеллярные агрегаты с диаметром 4–6 нм в воде [155]. Данные агрегаты демонстрируют хорошую стабильность главным образом благодаря межмолекулярным связям между боковыми сахаридными фрагментами. При взаимодействии этих агрегатов с плазмидой ДНК образуются наночастицы размером 50 нм, что делает их превосходными кандидатами в качестве невирусных векторов [156].

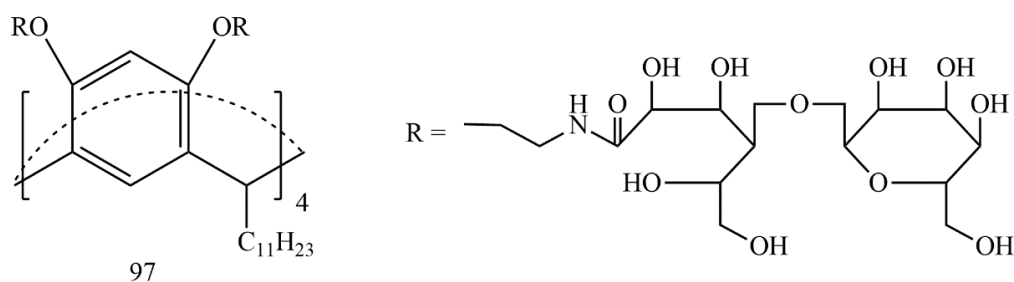


Рисунок 1.26. Структура K[4]P 97.

Боно Н. и соавторы синтезировали амфифилы на основе K[4]A, содержащие олигомерные аминокликозиды [157]. Полученные макроциклы продемонстрировали высокую способность к связыванию и упаковке ДНК с образованием совместных стабильных агрегатов размером около 150 нм. Интересно, что такие смешанные системы не только показали хорошую эффективность трансфекции, но и обладают низкой или незначительной цитотоксичностью и проявляют заметную антимикробную активность против грамотрицательных бактерий, даже большую, чем у отдельных макроциклов. Таким образом, выявленные закономерности раскрывают потенциал K[4]A в качестве перспективных средств доставки нуклеиновых кислот с уникальными антибактериальными свойствами.

1.4.4. Ассоциация в смешанных системах каликсаренов с протеинами, пептидами и аминокислотами

Исследования по распознаванию белков с использованием нековалентных взаимодействий представляют большой интерес. Комплексообразование каликсаренов с белками происходит путем связывания относительно коротких пептидных последовательностей посредством линейного или трехмерного распознавания. Соответственно, направленная функционализация макроциклов способствует специфическому распознаванию и связыванию конкретных типов белков. Различные производные K[4]A, (тиа)K[4]A и сульфонил-K[4]A, несущие фосфонатные группы на верхнем ободе, (**98–107**, рис. 1.27) проявляют ингибирующую активность по отношению к протеин-тирозинфосфатазе типа 1В (PTP1B), которая является одной из терапевтических мишеней для лечения диабета 2 типа [158–160]. Было обнаружено, что введение второй бисфосфонатной группы в структуру макроцикла (**99**, **101**, рис. 1.27) или наличие гидроксильных групп (**100**, **101**, рис. 1.27) приводит к снижению ингибирующей активности по сравнению с монозамещенными аналогами [158]. Соединения **98**, **100** и **105** (рис. 1.27) проявляют ингибирующую активность не только к PTP1B, но также взаимодействуют с другой фосфотирозинфосфатазой SHP2, которая считается первым онкогеном в суперсемействе протеинтирозинфосфатаз. Замена метиленового мостика на сульфидную **102–104**, **106** (рис. 1.27) или сульфоновую группу **107** (рис. 1.27) в структуре макроцикла приводит к более эффективному ингибированию ферментов. Кроме того, тиаK[4]A **103**, **104** и **106** проявляли на порядок более высокую селективность к PTP1B по сравнению с незамещенными макроциклами [159, 160].

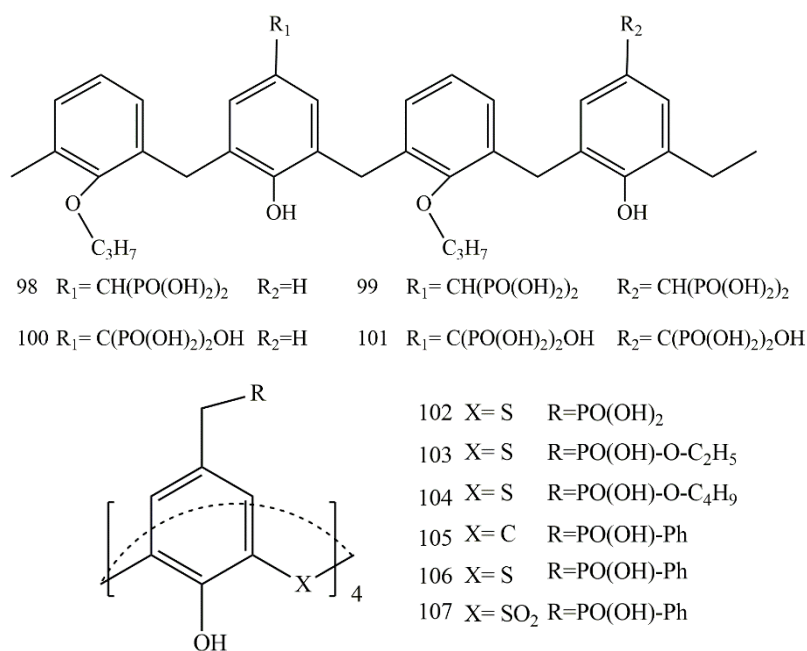


Рисунок 1.27. Структуры К[4]А **98–101**, **105** и тиаК[4]А **102–104**, **106**, **107**.

К[4]А **108** (рис. 1.28) способен связать белок β -лактоглобулин, и структура белка при этом практически не изменялась [161]. Связывание лактоглобулина может происходить за счет нескольких механизмов, включая силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобные взаимодействия и водородные связи. В свободном состоянии белки обладают собственной флуоресценцией благодаря наличию в составе ароматических аминокислотных остатков, но при образовании эквимольного комплекса с **108** наблюдается тушение флуоресценции, что указывает на его связывание макроциклом.

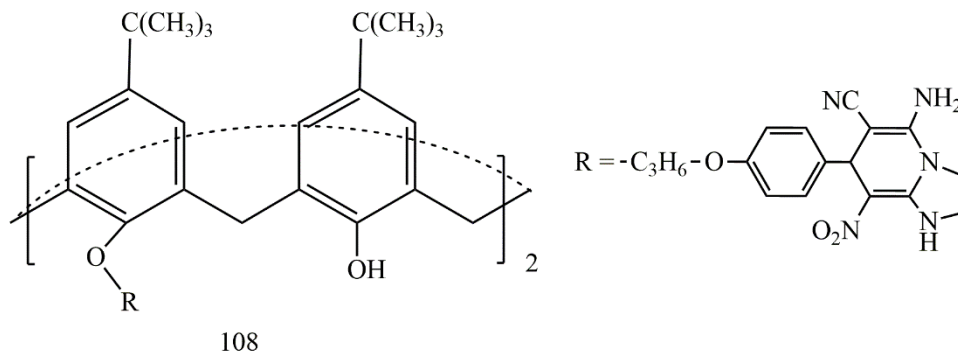


Рисунок 1.28. Структура К[4]А **108**.

Сульфатный К[4]А **4** способен образовывать комплексы с цитохромом С в кристаллическом состоянии. Замещение одной сульфогруппы на бром **109** или фенил **110** (рис. 1.29), то есть снижение симметрии макроцикла, незначительно влияет на механизм связывания белка, но усиливает взаимодействие с белком [162]. Большее взаимодействие цитохрома наблюдается для **110**, поскольку, помимо связывания лизина гидрофобной полостью макроцикла за счет образования солевых мостиков, СН- π и катион- π взаимодействий, наблюдается взаимодействие фенильной группы с гидрофобным участком, содержащим аланин

и тирозин. Увеличение количества звеньев в структуре макроцикла также усиливает связывание белка [163]. Конформационно подвижный К[6]А **7** принимает в растворе конфигурацию «1,2-альтернат», благодаря которой он может одновременно связывать две молекулы лизина, что облегчает димеризацию цитохрома С. Молекула К[8]А **8** может находиться в различных конформационных состояниях, которые связывают большую поверхность белковой молекулы. При увеличении концентрации **8** в растворе наблюдается самопроизвольное образование тетрамеров цитохрома С и последующий их распад.

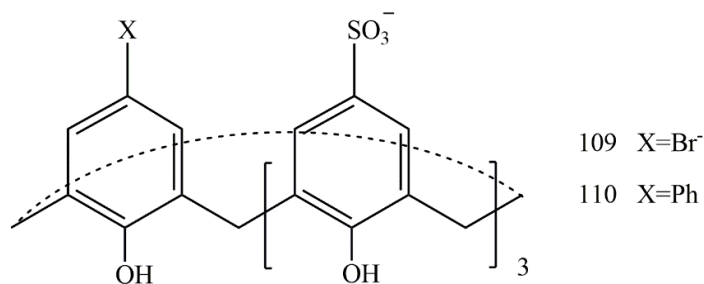
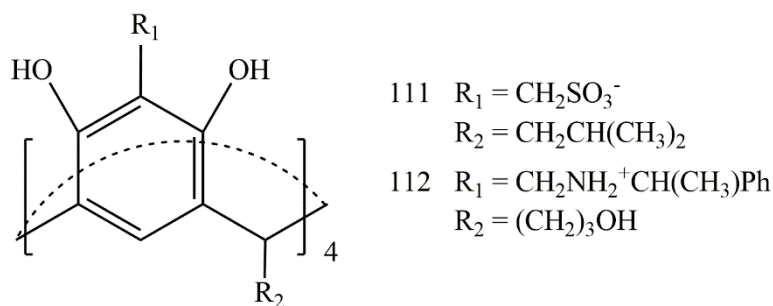


Рисунок 1.29. Структуры К[4]А **109**, **110**.

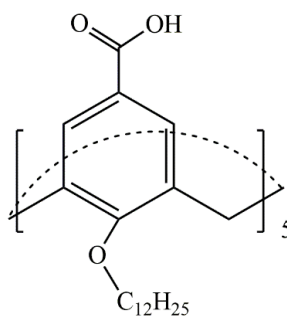
Независимо от числа ароматических звеньев сульфонатные К[4]А **4**, **7** и **8** (рис. 1.4) способны связывать катионные белки, обладающие противогрибковой активностью, в частности против пеницилла [164]. Несмотря на различный размер и конформационную гибкость все три макроцикла аналогичным образом связывают один и тот же белковый участок, состоящий из пролина, лизина и фенилаланина, причем, чем больше размер полости макроцикла, тем большая часть поверхности белка связывается. В частности, К[8]А проявляет себя как бидентатный лиганд, который облегчал димеризацию фунгицидного белка. Таким образом, благодаря супрамолекулярным взаимодействиям молекулы каликсаренов могут быть использованы для регуляции активности и агрегации биологически активных белков.

Молекула сульфонатного К[4]Р **111** (рис. 1.30) способна формировать комплексы с двумя молекулами производных основных аминокислот (дигидрохлориды метиловых эфиров лизина, аргинина и гистидина) за счет электростатических взаимодействий в метаноле и смеси метанол/вода [165]. При комплексообразовании хиральность «гостей» передается всему комплексу. Учитывая достаточно сильное взаимодействие с аминокислотами, данный макроцикл может использоваться как модулятор кристаллизации белков. Аналогичные закономерности связывания и переноса хиральности наблюдаются при образовании капсул **111** с хиральным фенилэтиламинометиловым К[4]Р **112** (рис. 1.30).

Рисунок 1.30. Структуры K[4]P **111**, **112**.

ТиаK[4]A, модифицированные олигомерами молочной кислоты, в растворе формируют мицеллоподобные и везикулярные агрегаты в зависимости от конформации макроцикла [166]. Если тиаK[4]A в конформации «конус» формирует мицеллоподобные структуры, то макроциклы с конформацией «частичный конус» и «1,3-альтернат» склоны к образованию удлиненных везикул. Данные макроциклы проявляют способность к связыванию белков (БСА, гемоглобин, лизин), формируя сферические (с БСА и гемоглобином) и дендримерные (с лизином) структуры. Наилучшее связывание белков обеспечивает олиголактатный макроцикл в конформации «частичный конус».

Амфифильные K[5]A **113** (рис. 1.31) и β -циклодекстрин, модифицированные одинаковыми *n*-додецильными фрагментами, при смешивании в водном растворе образуют совместные везикулярные агрегаты [167]. Поскольку данные макроциклы имеют различные сайты связывания, то поверхность полученных агрегатов представляет собой гетеромультивалентную платформу, на которой чередуются два вида рецепторов. Если полость циклодекстрина инкапсулирует ароматическую аминокислоту тирозин, то молекула K[5]A, содержащая карбоксильные группы, связывает такие положительно заряженные аминокислоты, как лизин и аргинин. Совместные агрегаты K[5]A–циклодекстрин связывают модельные пептиды, содержащие чередующиеся тирозиновые и лизиновые фрагменты, лучше, чем везикулярные агрегаты индивидуальных макроциклов, благодаря синергетическому действию двух сайтов связывания. Кроме того, обнаружено ингибирующее действие смешанных агрегатов на фибрилляцию амилоид- β -пептидов, которая является отличительной чертой болезни Альцгеймера.



113

Рисунок 1.31. Структура K[5]A **113**.

Анализ литературы показал, что каликсарены имеют широкое биомедицинское применение для направленного конструирования наноразмерных систем с функциональными свойствами. Использование супрамолекулярного подхода для создания лекарственных наноконтейнеров открывает новые возможности для доставки значимых молекул с желаемой эффективностью и рационального поиска оптимальных композиций для нужд медицины и биологии. Каликсарены являются перспективными строительными блоками для создания данных наноконтейнеров благодаря наличию полости для связывания лекарств, а также возможности различной функционализации каликсареновой платформы, обеспечивающей способность к спонтанной агрегации. Индивидуальная и совместная агрегация макроциклов служит универсальной стратегией получения многофункциональных наноплатформ, которые могут быть иерархически модифицированы таргетными или стимул-чувствительными агентами, что позволяет повысить терапевтическую активность инкапсулированного лекарства. Таким образом, актуальность создания различных систем доставки на основе амфифильных каликсаренов не вызывает сомнений. Но в этих областях существуют нерешённые проблемы. Большое внимание в литературе уделено повышению биодоступности слаборастворимых препаратов благодаря комплексообразованию с макроциклами или солюбилизации в гидрофобную область супрамолекулярных агрегатов. Однако инкапсуляция гидрофильных лекарств с помощью везикул на основе макроциклов и механизм действия закапсулированных лекарственных форм недостаточно исследованы. В основном для капсуляции гидрофильных субстратов предлагается использовать липосомальные формулировки. В то же время липосомы имеют ряд существенных недостатков, к основным из которых можно отнести низкую стабильность, быструю деградацию, малое количество транспортируемого соединения, а также высокую стоимость реагентов и сложность получения. Использование самоорганизующихся систем на основе каликсаренов позволяет решить часть этих недостатков. Более того, значительная часть литературы, посвященная смешанным композициям каликсарен–ПАВ, сосредоточена на сульфонатных макроциклах. Супрамолекулярные системы на основе ПАВ с макроциклами, модифицированными более сложными и биологически активными фрагментами, встречаются гораздо реже. Также практически отсутствуют исследования, посвященные ассоциации и функциональной активности K[4]P в присутствии ПАВ. Поэтому в рамках диссертационной работы были исследованы агрегационные и функциональные свойства K[4]P, модифицированных сульфонатными, N-метил-D-глюкаминовыми и виологеновыми фрагментами и смешанных композиций на основе этих макроциклов и ПАВ.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Исходные вещества и реагенты

2.1.1. Каликс[4]резорцины и ПАВ

Использованные в работе макроциклы были синтезированы в лаборатории химии каликсаренов ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН (Зиганшиной А.Ю.). К[4]Р с сульфогруппами на нижнем ободе (СКР) был синтезирован по литературной методике [168]. К[4]Р, модифицированный этилсульфонатными группами по верхнему ободу, (СВКР) был получен в две стадии. На первой стадии по реакции конденсации резорцина с 2,3-дигидрофураном был получен К[4]Р, замещенный гидроксипропильными группами по нижнему ободу [169]. На второй стадии метилсульфонатные группы были введены по верхнему ободу согласно методике, описанной в [170]. N-метил-D-глюкаминные К[4]Р (ГКР) были получены по реакции Манниха путём трехкомпонентной конденсации К[4]Р с этилсульфонатными, метильными и н-децильными группами на нижнем ободу [168, 171], вторичного амина N-метил-D-глюкамина и формальдегида (рис. 2.1а) [172].

Виологеновые каликс[4]резорциновые кавитанды (ВР) были получены реакцией монометилвиологена [173] с бромметилрезорцин[4]ареном с различными алкильными группами на нижнем ободу [174] с последующей заменой противоионов гексафторфосфатами, а затем хлорид-ионами (рис. 2.1б).

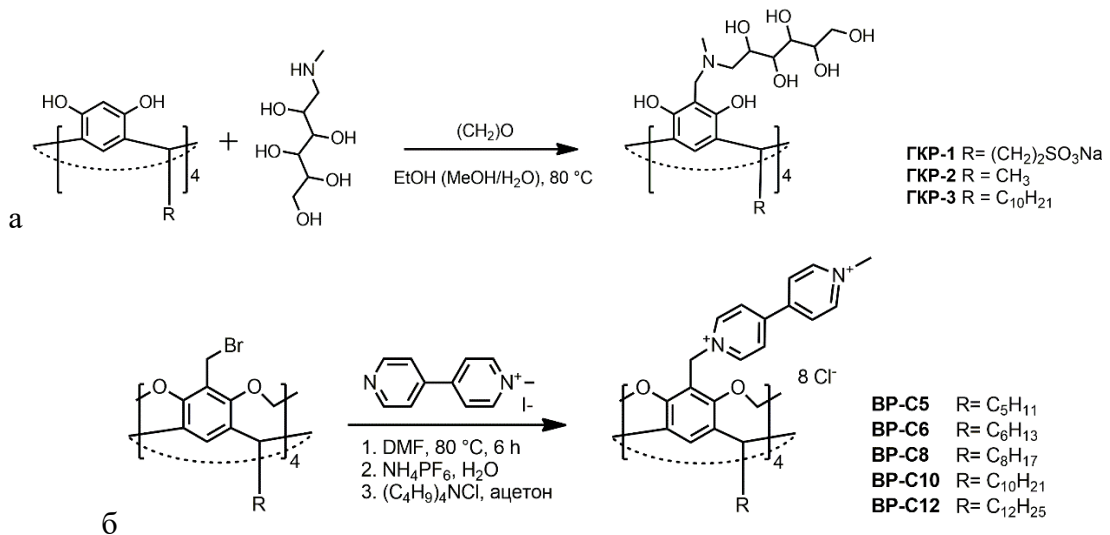


Рисунок 2.1. Синтез ГКР (а) и ВР (б).

Использованные в работе ПАВ дихлорид N-метил-N-гексадецил-4,4-бипиридиния (В-16) и дихлорид N-метил-N-гексадецил-1,2-ди(пиридин-4-ил)этена (ВБП-16) были синтезированы в лаборатории химии каликсаренов ИОФХ Зиганшиной А.Ю. [175]. МеталлоПАВ, представляющее собой комплекс DAVCO-16 и нитрата лантана (LaS), был синтезирован в лаборатории высокоорганизованных сред ИОФХ Лукашенко С.С. [176]. В работе использовались

коммерчески доступные ПАВ: бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ, Acros Organics, 99%) и додецилсульфат натрия (ДСН, Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$).

2.1.2. Спектральные зонды, солюбилизаты (красители и лекарственные вещества)

Для спектрофотометрических экспериментов по определению солюбилизационной способности композиций использовали 1-фенилазо-2-нафтол (судан I, Acros Organics, рис. 2.2) в качестве гидрофобного зонда. Для экспериментов по определению инкапсулирующей способности агрегатов в качестве гидрофильного зонда использовался краситель родамин Б (RhB, Sigma Aldrich, 95 %, рис. 2.2). Для солюбилизации и инкапсулирования в агрегаты использовали гидрофобные лекарственные вещества кверцетин (Sigma Aldrich, $\geq 95\%$), рутин (Acros Organics, $>97\%$), а также гидрофильные лекарственные препараты цисплатин (cisPt, Sigma Aldrich) и доксорубицин гидрохлорид (DOX, Acros Organics, $>97\%$) (рис. 2.2).

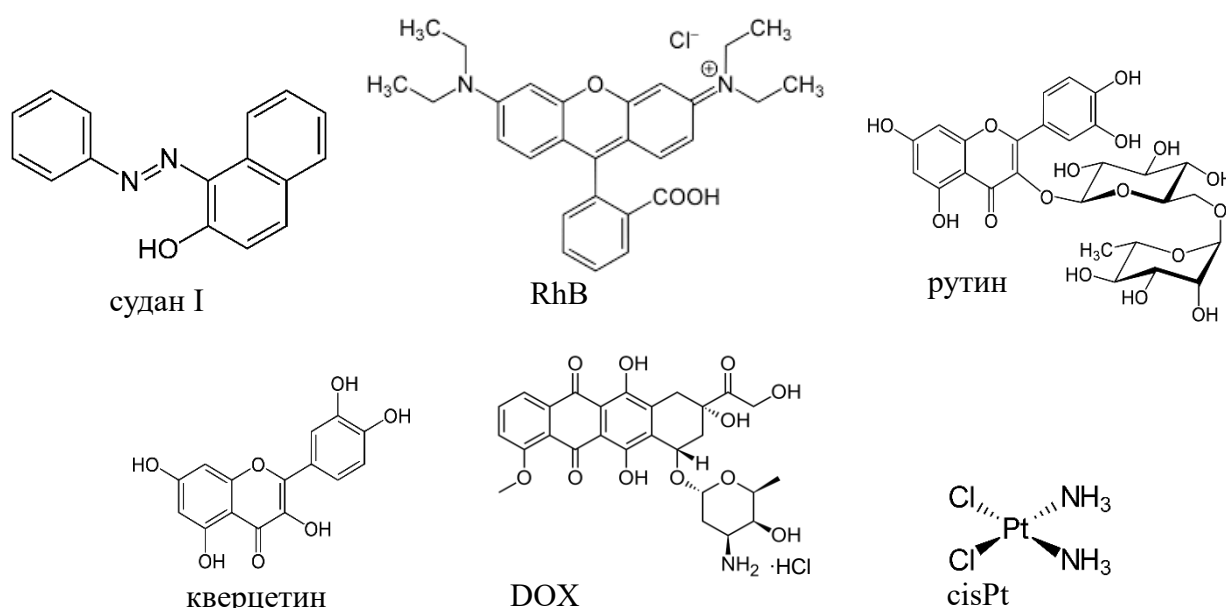


Рисунок 2.2. Структуры спектральных зондов (судан I, RhB) и лекарственных препаратов (рутин, кверцетин, cisPt, DOX).

2.2. Приготовление растворов

Для приготовления растворов макроциклов, ПАВ и смешанных композиций использовали воду, очищенную с помощью системы очистки воды Merck Millipore Direct-Q® 5 UV (Merck Millipore, Германия,). Растворы с определенной концентрацией готовили методом объемного смешения из исходных растворов компонентов. Для получения исходных растворов навеску соединения взвешивали в мерной колбе (пикнометре) и добавляли необходимое количество растворителя.

Композиции с гидрофобными препаратами готовились следующим образом: избыток кристаллического гидрофобного субстрата добавляли к растворам в определенной концентрации и выдерживали в течение двух суток при комнатной температуре до достижения предельной

растворимости субстрата. Затем растворы с солюбилизированным препаратом отделялись от нерастворившегося субстрата.

Композиции с инкапсулированными гидрофильными субстратами – красителем RhB или лекарственным препаратом DOX – готовились методом объемного смешения. Затем несвязанный субстрат удаляли диализом – 3 мл раствора диализировали против 250 мл воды в течение 24 часов (размер пор диализного мешка – 2кДа). Расчет эффективности инкапсулирования (ЭИ) и емкость загрузки (ЕЗ) проводили по уравнениям (2.1) и (2.2).

$$\text{ЭИ} = \frac{m_0 - m}{m_0} * 100\% \quad (2.1)$$

$$\text{ЕЗ} = \frac{m_0 - m}{m_{\text{нч}}} * 100\% \quad (2.2),$$

где m_0 – масса добавленного красителя или лекарства, m – масса свободного (несвязанного агрегатами) красителя или лекарства, $m_{\text{нч}}$ – масса наночастиц.

2.3. Методы измерения

Поверхностное натяжение на границе раздела вода/воздух (γ , мН*м⁻¹) для растворов объемом 10 мл определяли методом отрыва кольца (Дю Нуи) с использованием тензиометра Krüss K-6 (Krüss GmbH, Германия). Платиновое кольцо между измерениями обрабатывали этиловым спиртом и насухо вытирали.

Удельная электропроводность (χ , мкСм*см⁻¹) измерялась с помощью кондуктометра InoLab Cond7110. Используя полученные кондуктометрические зависимости были рассчитаны значения свободной энергии мицеллообразования (ΔG_m) по формуле (2.3) [177]:

$$\Delta G_m = RT \left(\frac{1}{j} + \beta \frac{i Z_s}{j Z_c} \right) \ln(\text{ККА}) + RT \left(\frac{i Z_s}{j Z_c} \beta \ln \left(\frac{i Z_s}{j Z_c} \right) - \frac{\ln(j)}{j} \right) \quad (2.3),$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – температура, i – количество заряженных групп с зарядом противоиона Z_s , j – количество алкильных цепей, ККА – критическая концентрация агрегации, β – степень связывания противоиона, определенная по формуле (2.4):

$$\beta = 1 - \frac{[d\chi/dC]_{C > \text{ККА}}}{[d\chi/dC]_{C < \text{ККА}}} \quad (2.4),$$

то есть из соотношения тангенсов угла наклона концентрационной зависимости удельной электропроводности раствора ПАВ, соответственно, после и до значения ККА [177, 178].

рН растворов измеряли с помощью рН-метра HI 2210 (Hanna Instruments) с использованием стеклянного мембранного электрода HI 1093.

Изменение размерных и зарядовых характеристик систем проводили методами динамического (ДРС) и электрофоретического рассеяния света с использованием системы фотонной корреляционной спектроскопии Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания).

Угол рассеяния света составлял 173° . Источником лазерного излучения служил газовый He-Ne-лазер с длиной волны 632,8 нм и мощностью 4 мВ. Полученные сигналы анализировали на основании частотного и фазового анализа рассеянного света при помощи программного обеспечения, прилагаемого к прибору на основании уравнения Стокса-Эйнштейна для сферических частиц (2.5):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (2.5),$$

где k – константа Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя, R – гидродинамический радиус.

Микрофотографии просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7700 (Токио, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ. Образцы наносили на медную сетку (с размером ячеек 300 меш), покрытую непрерывным слоем формвара.

Микрофотографии атомно-силовой микроскопии (АСМ) получали с помощью атомно-силового микроскопа Titanium (NT-MDT, Россия). Сканирование осуществляли на воздухе в полуконтактном режиме с использованием стандартных кремниевых кантилеверов с коэффициентом жесткости 2.5-10 Н/м и резонансной частотой 115-190 кГц (NT-MDT, Россия). Образцы объемом 5 мкл наносили на поверхность пластинок слюды (5×5 мм) с последующей сушкой в токе теплого воздуха при 45°C .

Турбидиметрические исследования проводили после смешивания растворов макроцикла и ПАВ и затем измерялась абсорбция при 500 нм на спектрофотометре Specord 250 Plus (Analytik Jena AG, Германия).

Спектры ЯМР ^1H регистрировали на спектрометрах AVANCE-400 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 400 МГц и AVANCE-600 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 600 МГц относительно внутреннего стандарта Me_4Si .

Солюбилизация гидрофобного зонда судана I в водных растворах изучалась с использованием УФ спектроскопии на спектрофотометре Specord 250 Plus (Analytik Jena AG, Германия). Избыток кристаллического красителя добавляли к водным растворам в определенной концентрации и выдерживали в течение двух суток при комнатной температуре до достижения предельной растворимости. Значение растворимости красителя фиксировали по значению оптической плотности полосы поглощения при длине волны $\lambda = 486$ нм (максимум поглощения судана I) в отфильтрованных растворах. Способность системы к солюбилизации органического субстрата может быть количественно охарактеризована солюбилизационной емкостью (S). Значение S , равное числу молей красителя, солюбилизированного молем мицеллярного вещества, может быть рассчитано по формуле (2.6):

$$S = b/\varepsilon \quad (2.6),$$

где ε – коэффициент экстинкции судана I ($8700 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), b – наклон зависимости $A/l = f(C_{\text{K[4]P}})$ (A – оптическая плотность, l – толщина ячейки, $C_{\text{K[4]P}}$ – концентрация K[4]P).

Солюбилизация гидрофобных препаратов рутина и кверцетина проводилась по такой же методике. Растворимость препаратов фиксировали по изменению оптической плотности при длинах волн 365 и 374 нм для рутина и кверцетина соответственно.

Бактериостатическая и фунгистатическая активность отдельных макроциклов и смешанных композиций оценивалась *in vitro* в отношении патогенных представителей грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus* 209p, *Bacillus cereus* 8035) и дрожжей (*Candida albicans* 855-653). Минимальные ингибирующие концентрации (МИК), при которых наблюдается задержка роста тест-микроорганизма, оценивали с помощью методов серийных разведения бактерий и грибов в жидкой питательной среде [179]. Минимальные бактерицидную и фунгицидную концентрации, вызывающие полную гибель тест-микроорганизмов, определяли по литературной методике [180]. Антибактериальные и противогрибковые анализы проводили в стандартных питательных средах: бульоне Хоттингера (HiMe-dia Laboratories Pvt. Ltd Mumbai, Индия) и бульоне декстрозы Sabouraud (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd Мумбаи, Индия). Все эксперименты повторяли три раза.

Гемолитическую активность соединений оценивали путем сравнения оптической плотности раствора, содержащего тестируемое соединение, и крови с оптической плотностью крови при 100% гемолизе. В качестве объекта исследования использовали 10% суспензию эритроцитов человека. Исследуемые композиции в соответствующем разведении добавляли к суспензии эритроцитов. Высвобождение гемоглобина контролировали путем измерения оптической плотности супернатанта на цифровом фотоэлектроколориметре AP-101 (ApeI, Япония) при $\lambda=540$ нм. Эксперименты были повторены трижды, и данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Цитотоксическая активность. Водные растворы макроциклов и смешанных композиций были исследованы на цитотоксичность в отношении нормальной и опухолевой клеточных линий человека. Для экспериментов использовали опухолевые культуры клеток М-Hela клон 11 (эпителиоидная карцинома шейки матки, сублиния Hela, клон М-Hela) и культуру нормальных клеток печени (Chang liver). Оценку их цитотоксического действия проводили путем подсчета жизнеспособных клеток с помощью многофункциональной системы Cytell Cell Imaging (GE Helthcare Life Science, Швеция), используя приложение Cell Viability BioApp, которое позволяет оценить их жизнеспособность на основании интенсивности флуоресценции. Степень ингибирования роста клеток под действием тестируемого агента рассчитывали по уравнению (2.7).

$$N = \left(1 - \frac{\text{Exp}}{\text{Control}}\right) * 100\% \quad (2.7),$$

где Exp – количество неингибированных клеток в исследуемой пробе, Control – количество неингибированных клеток в контрольной пробе. Затем определяли IC₅₀ (концентрацию, которая вызывала 50% ингибирование роста клеток) по кривой зависимости роста культуры клеток от концентрации макроцикла. Эксперименты повторяли трижды, и результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

На основании полученных данных рассчитывали индекс селективности (SI), который характеризует избирательность действия системы по уравнению (2.8):

$$SI = IC_{50 \text{ Chang liver}} / IC_{50 \text{ M-HeLa}} \quad (2.8),$$

где IC_{50 Chang Liver} и IC_{50 M-HeLa} – концентрация полумаксимального ингибирования роста клеток Chang liver и M-HeLa, соответственно.

Проточная цитометрия использовалась для создания статистики поглощения лекарства клетками. Необработанные клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки высевали в 24-луночные планшеты по 5×10^4 клеток на лунку и инкубировали в течение 24 часов. Затем клетки культивировали с исследуемыми растворами. К контрольным клеткам добавляли свежую культуральную среду без тестируемых соединений. После обработки клетки трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором для удаления любых свободных тестируемых соединений. Затем клетки обрабатывали трипсином и ресуспендировали в свежем фосфатном буфере с 10% фетальной бычьей сывороткой. Суспензии клеток анализировали с использованием Guava easy Cyte (Merck Millipore, США).

Анализ клеточного апоптоза. Клетки собирали при 2000 об/мин в течение 5 минут и затем дважды промывали ледяным фосфатным буфером с последующим повторным суспендированием в связывающем буфере. Затем образцы инкубировали с 5 мкл аннексина V-FITC (Sigma Aldrich, Merck) и 5 мкл йодида пропидия в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После этого клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (Guava easy Cyte Millipore, Merck, США). Эксперименты были повторены три раза.

Флуоресцентная микроскопия. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 (синий). После обработки исследуемыми композициями съемка проводилась с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ci-S (Nikon, Япония) при увеличении $\times 1000$.

Расчет погрешностей измерений. Относительную погрешность *i*-того измерения ($\delta_{r,i}$) рассчитывали по формуле (2.9):

$$\delta_{r,i} = \frac{\delta_{x,i}}{X} \quad (2.9),$$

где X – среднеарифметическое значение измеряемой величины (2.10):

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i)}{n} \quad (2.10),$$

где n – число измерений.

Количество измерений n составляло 3–5 в кондуктометрическом эксперименте, 10–15 – в тензиометрическом, 2–4 – в флуориметрическом. В кондуктометрическом и тензиометрическом экспериментах учитывались только те измерения, погрешность которых не превышала 2%, в методе ДРС – не более 4 %. Количественный анализ полученных данных выполняли с использованием стандартных и оригинальных программ.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. САМООРГАНИЗАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ КАЛИКС[4]РЕЗОРЦИНОВ

В рамках диссертационной работы было проведено комплексное исследование супрамолекулярных систем на основе индивидуальных амфифильных К[4]Р, модифицированных по верхнему краю N-метил-D-глюкаминовыми и виологеновыми фрагментами, а также смешанных композиций К[4]Р, модифицированных сульфонатными, N-метил-D-глюкаминовыми и виологеновыми фрагментами, с катионными и анионным ПАВ. Выбор объектов исследования обусловлен тем, что модификация макроциклов природными фрагментами аминокислот обеспечивает низкую токсичность и биосовместимость, а наличие виологеновых фрагментов повышает водную растворимость и нацеливание на отрицательно заряженные биобарьеры (липидная мембрана, стенка бактериальных клеток, слизистая оболочка, эпителий роговицы) и биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты). Функциональную активность супрамолекулярных систем оценивали по способности: 1) увеличивать водную растворимость липофильных субстратов; 2) капсулировать гидрофильные субстраты; 3) проявлять биологическую (гемолитическую, антимикробную, противораковую) активность; 4) благоприятно изменять селективность цитотоксического действия лекарственных веществ, загруженных в супрамолекулярные системы.

Как было отмечено в литературном обзоре, функциональная активность супрамолекулярных систем на основе индивидуальных амфифильных соединений определяется их молекулярной структурой, а на основе смешанных композиций – также соотношением компонентов. Для систем доставки лекарств особое внимание уделяется их собственной токсичности, специфичности и чувствительности к патогену. Поэтому целью данной работы являлось создание новых супрамолекулярных систем на основе амфифильных К[4]Р и смешанных композиций К[4]Р–ПАВ, оценка их агрегационной, функциональной и биологической активности для определения потенциала в качестве наноконтейнеров для биологически активных веществ. Для достижения поставленной цели в рамках работы проводили исследования физико-химических и биологических свойств К[4]Р и супрамолекулярных систем на их основе широким набором современных физико-химических методов.

3.1. Супрамолекулярные системы на основе каликс[4]резорцинов, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами

3.1.1. Агрегационное поведение каликс[4]резорцинов, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами

На первом этапе работ были исследованы физико-химические свойства N-метил-D-глюкаминовых К[4]Р, содержащих этилсульфонатные (ГКР-1), метильные (ГКР-2) и н-децильные группы на нижнем ободе (ГКР-3) (рис. 3.1.) [172, 181]. 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 [182]. Это свойство широко используется в фармацевтической промышленности для увеличения растворимости лекарств и их стабилизации в водных растворах [182, 183]. Кроме того, наличие N-метил-D-глюкаминных фрагментов в составе наноносителей должно способствовать повышению эндоцитоза этих наночастиц за счет поглощения глюкозных фрагментов как источников энергии для раковых клеток [184].

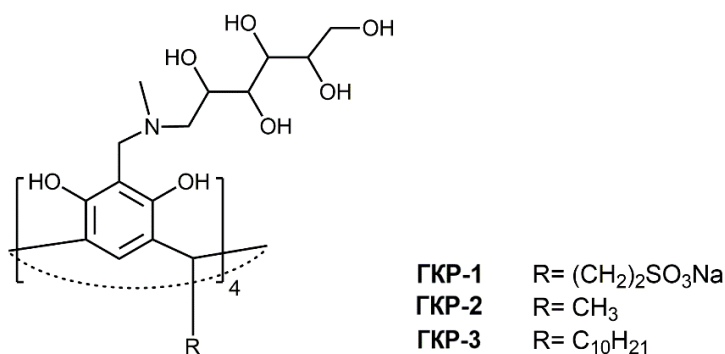


Рисунок 3.1. Структуры ГКР-1, ГКР-2 и ГКР-3.

В зависимости от структуры заместителей нижнего обода макроциклы обладают разной растворимостью. ГКР-1, содержащий этилсульфонатные группы на нижнем обode, хорошо растворяется в воде. Макроциклы с алкильными фрагментами на нижнем обode имеют большую гидрофобность, чем ГКР-1, что выражается в том числе в слабой водной растворимости. В связи с этим для получения растворов ГКР-2 и ГКР-3 в воде использовались вспомогательные вещества. Растворы ГКР-2 готовили растворением навески в водном растворе двукратного избытка МГ. Растворы ГКР-3 получали следующим образом: навеску ГКР-3 сначала растворяли в диполярном апротонном растворителе ДМСО, а затем разбавляли его водным раствором двадцатикратного избытка МГ до достижения содержания ДМСО 5% об. Прямое растворение ГКР-3 в водном растворе МГ или разбавление раствора в ДМСО водой (без МГ) приводило к получению нестабильных быстро осаждающихся растворов.

3.1.1.1. Влияние N-метил-D-глюкаминового фрагмента на агрегационные свойства макроциклов

На первом этапе работ комплексом физико-химических методов (тензиометрия, кондуктометрия, спектрофотометрия, рН-метрия, ДРС и электрофоретическое рассеяние света) были изучены агрегационные свойства ГКР-1, ГКР-2 и ГКР-3. Для начала было оценено влияние МГ-фрагментов на агрегационные характеристики данных макроциклов. Обнаружено, что модификация верхнего обода К[4]Р облегчает самоассоциацию макроциклов в водной среде. Кондуктометрическое значение ККА для К[4]Р, содержащего этилсульфонатные группы на нижнем обode (СКР), равно 20 мМ, в то время как для модифицированного макроцикла оно

составляет 14 мМ (рис. 3.2а). Аналогичное снижение значений ККА (с 0.33 до 0.13 мМ) наблюдается при сравнении немодифицированного К[4]Р с н-децильными фрагментами (КР-3) с ГКР-3 (рис. 3.2б). Вероятно, при формировании агрегатов данных макроциклов важную роль играют водородные связи между гидроксильными группами N-метил-D-глюкаминных фрагментов. Значения рН среды в водных растворах ГКР-1, ГКР-3 составляют 8 и 10, соответственно (рис. 3.3), что отражает частичное протонирование аминогрупп верхнего обода. Стабильное значение рН, наблюдаемое в широком диапазоне концентраций макроцикла, свидетельствует о том, что N-метил-D-глюкаминная группа является эффективной буферной компонентой. В отличие от ГКР-1, рН в водных растворах СКР существенно снижается с увеличением доли макроцикла в растворе и выходит на плато после достижения значения ККА (рис. 3.3а).

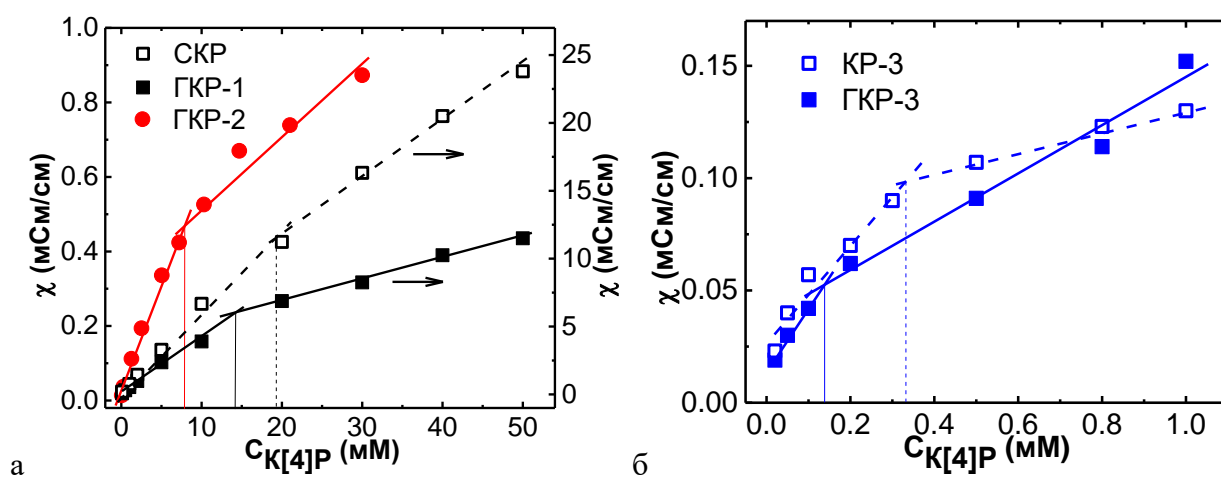


Рисунок 3.2. Концентрационные зависимости удельной электропроводности водных растворов макроциклов, 25 °С: (а) СКР, ГКР-1 и ГКР-2; (б) КР-3 и ГКР-3.

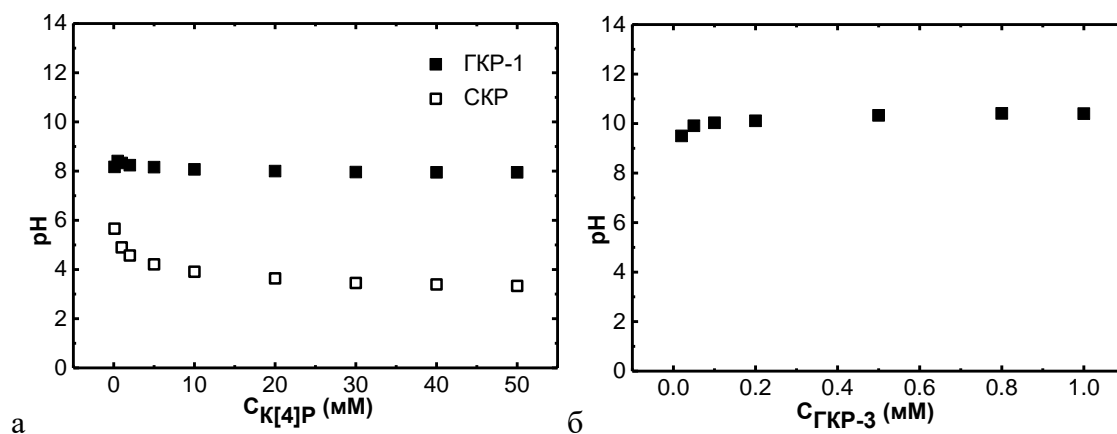


Рисунок 3.3. Концентрационная зависимость рН водных растворов СКР, ГКР-1 (а) и ГКР-3 (б), 25 °С.

3.1.1.2. Влияние длины алкильных фрагментов на агрегационные свойства макроциклов

Далее было оценено влияние длины алкильных фрагментов на нижнем ободу на агрегацию N-метил-D-глюкаминных макроциклов. Методами тензиометрии (рис. 3.4а),

кондуктометрии (рис. 3.2) и спектрофотометрии (рис. 3.4б) изучены агрегационные свойства макроциклов. Поверхностное натяжение уменьшается с увеличением концентрации ГКР-1 и ГКР-2, и при достижении ККА угол наклона концентрационной зависимости поверхностного натяжения снижается. Методом тензиометрии не удалось определить значение ККА для ГКР-3, так как в исследуемом диапазоне концентраций поверхностное натяжение водных растворов данного макроцикла изменялось незначительно. Значения ККА для ГКР-1 и ГКР-2, определенные методами тензио- и кондуктометрии хорошо соотносятся между собой (табл. 3.1). Увеличенная способность к агрегации ГКР-2 по сравнению с ГКР-1 обусловлена его большей гидрофобностью. Наличие метильных групп на нижнем ободе по соседству с ароматическими кольцами снижает гидрофильно-липофильный баланс, что способствует формированию агрегатов за счет межмолекулярных водородных связей и π - π -стэкинга между ароматическими кольцами соседних молекул ГКР-2.

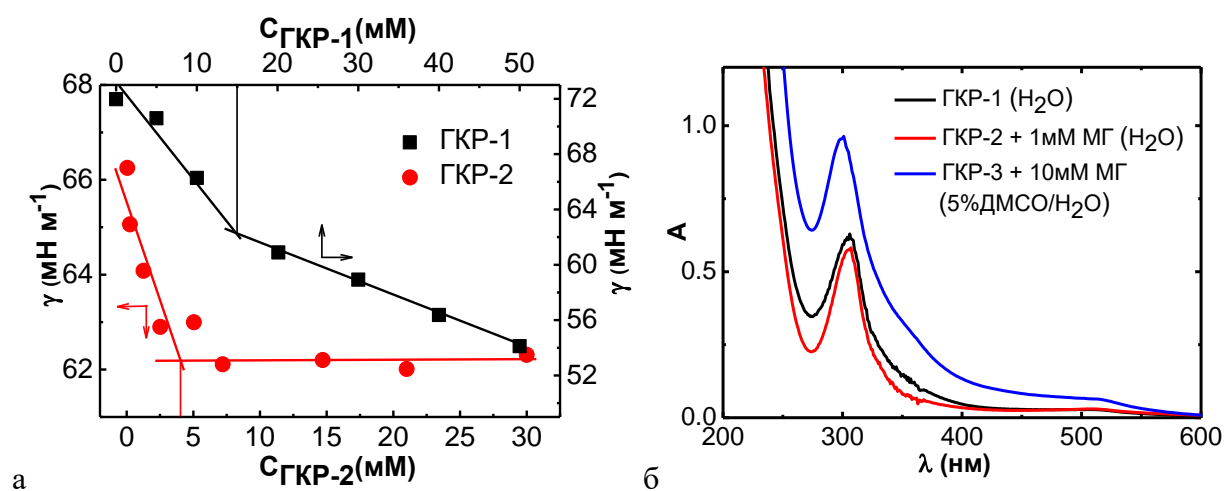


Рисунок 3.4. (а) Концентрационные зависимости поверхностного натяжения водных растворов ГКР-1 и ГКР-2, 25 °С; (б) Спектры поглощения водных растворов ГКР, $C(\text{ГКР}) = 0.5$ мМ, 25 °С, оптический путь 1 мм.

Таблица 3.1. Значения ККА ГКР, определенные различными методами.

Соединение	ККА, мМ	
	Тензиометрия	Кондуктометрия
ГКР-1	15	14
ГКР-2	4.9	7.8
ГКР-3	-	0.13

УФ спектры поглощения растворов макроциклов имеют максимумы поглощения в области 296–300 нм, что соответствует разрешенному $n \rightarrow \pi^*$ -переходу, и плечо в области 500 нм, отражающее наличие цвиттер-ионной структуры макроцикла с переносом протона ОН-группы на азот (рис. 3.4б). Следовательно, есть вероятность того, что агрегаты ГКР-1 формируются не только за счет водородных связей между гидроксильными группами, но и за счет электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными сульфатными

группами на нижнем ободке и частично положительно заряженными N-метил-D-глюкаминовыми группами на верхнем ободке. Изменение оптической плотности при 500 нм с увеличением концентрации ГКР-1, ГКР-2 из-за формирования ассоциатов в растворе отклоняется от линейной зависимости выше ККА (рис. 3.5а). В то же время абсорбция в растворе ГКР-3 линейно возрастает с увеличением концентрации макроцикла (рис. 3.5б), что указывает на неизменность морфологии агрегатов, формирующихся в указанном диапазоне концентраций.

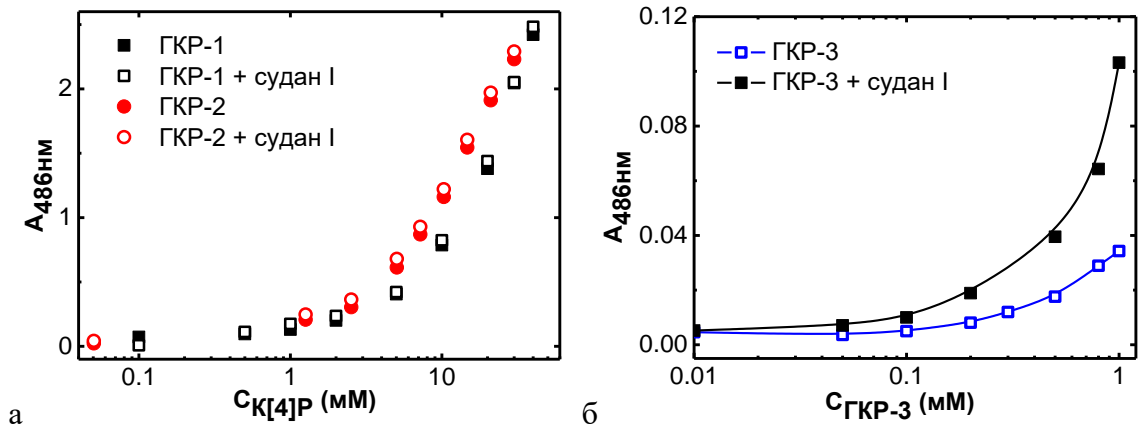


Рисунок 3.5. Концентрационная зависимость оптической плотности водных растворов ГКР и ГКР–судан I, 25 °С, оптический путь 1 мм.

Методы ДРС и электрофоретического рассеяния света были использованы для подтверждения формирования агрегатов в растворе. В водных растворах ГКР-1 с концентрацией 1 мМ наблюдается присутствие небольших частиц с гидродинамическим диаметром 2.9 нм (рис. 3.6а). В растворе ГКР-1 с концентрацией выше ККА (50 мМ) наблюдается бимодальное распределение с пиками при 120 нм и 504 нм. Чтобы подтвердить морфологию и размер агрегатов ГКР-1, были получены изображения ПЭМ (рис. 3.7а), где было показано, что молекулы ГКР-1 собраны в несферические крупные агрегаты. Вероятной причиной такой высокой полидисперсности являются множественные межмолекулярные взаимодействия по типу «голова к хвосту» между противоположно заряженными ободками и/или по типу «голова к голове», образующиеся за счет водородных связей в N-метил-D-глюкаминовых группах соседних молекул. В растворах ГКР-2 увеличение концентрации не приводит к значительному росту размера агрегатов (рис. 3.6б). Измеренный диаметр агрегатов (3.8 нм) соответствует удвоенной молекулярной длине ГКР-2, что указывает на образование сферических мицелл благодаря латеральной укладке ароматических «стенок» макроциклов за счет π -стэкинга и водородным связям между соседними молекулами. Изображения ПЭМ подтверждают формирование мелких сферических агрегатов (рис. 3.7б). В растворе ГКР-3 при очень низкой концентрации 0.5 мкМ были зафиксированы агрегаты с размером 53 нм. Дальнейшее увеличение концентрации ГКР-3 показало, что помимо данных частиц формируются более крупные агрегаты. В водных растворах с концентрацией ГКР-3 свыше 0.02 мМ наблюдается бимодальное

распределение, то есть формирование двух типов агрегатов, размер которых с увеличением доли ГКР-3 возрастает (рис. 3.6в). Изображение ПЭМ подтверждает образование сферических везикулярных структур с отчетливым внутренним ядром (рис. 3.7в). Дзета-потенциал всех исследованных агрегатов был отрицательным (рис. 3.6), что указывает на локализацию отрицательного заряда на атомах кислорода резорцинольных фрагментов, а также диссоциацию сульфонатных групп в случае ГКР-1. Высокое значение электрокинетического потенциала системы по абсолютной величине для ГКР-1 и ГКР-3 свидетельствует об образовании стабильных частиц.

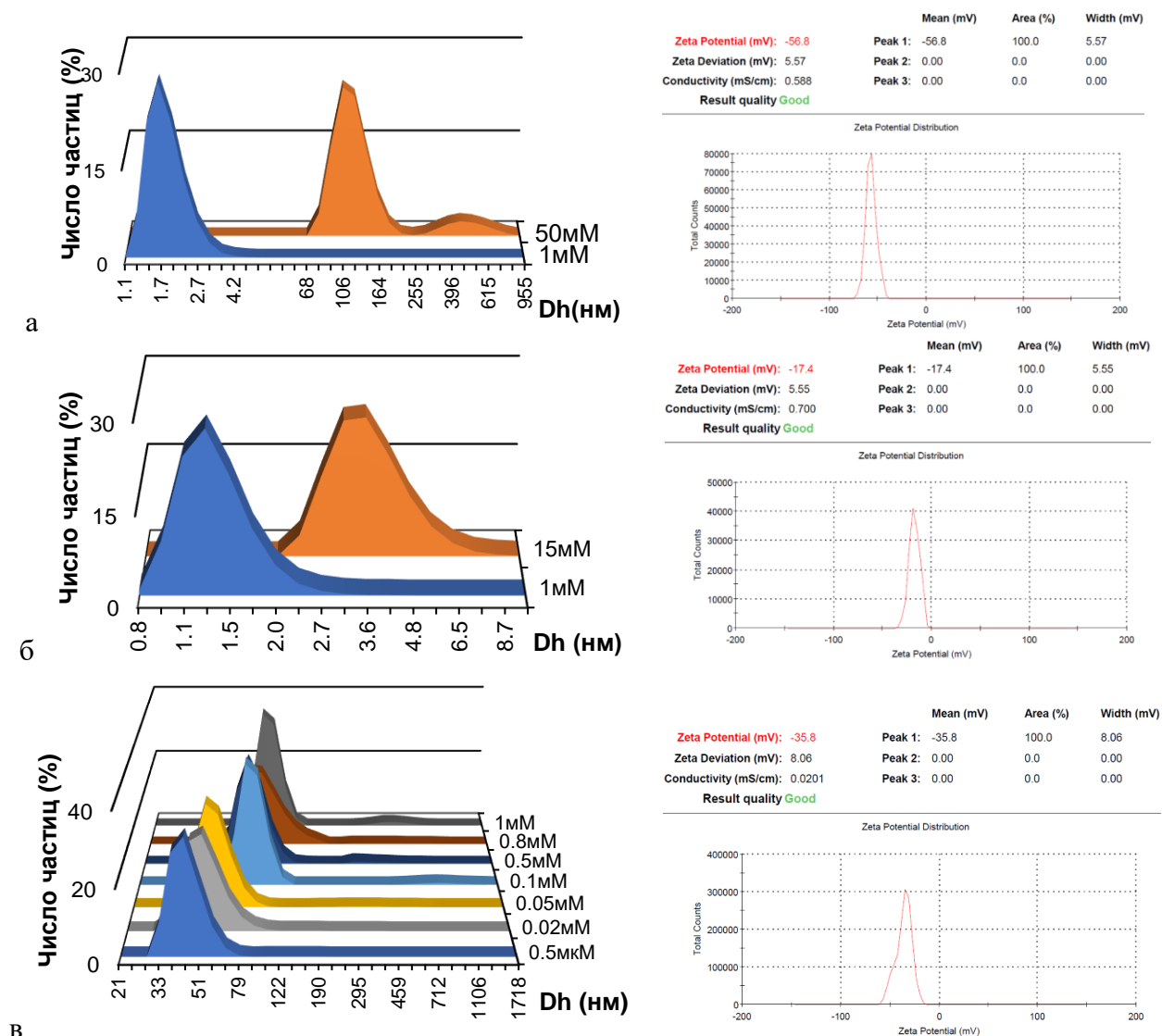


Рисунок 3.6. Распределение размеров агрегатов, усредненное по числу частиц, и дзета-потенциал агрегатов в 0.5 мМ растворах ГКР: (а) ГКР-1; (б) ГКР-2; (в) ГКР-3.

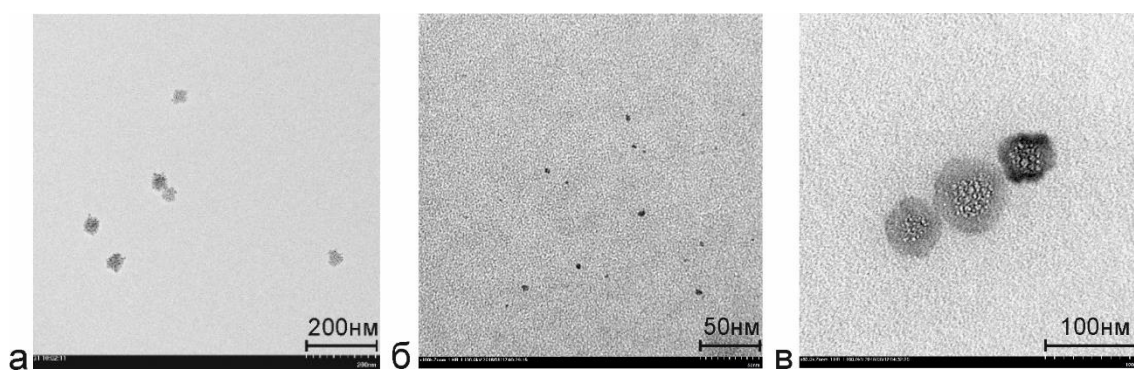


Рисунок 3.7. Изображения ПЭМ агрегатов ГКР-1 (а), ГКР-2 (б), ГКР-3 (в).

Известно, что мицеллярные растворы амфифилов способны увеличивать растворимость гидрофобных веществ, и эта особенность лежит в основе метода солюбилизации для изучения агрегации ПАВ в растворе. Спектрофотометрическим методом было определено значение ККА исследуемых макроциклов. В качестве солюбилизата использован краситель судан I с полосой поглощения в видимой части спектра при 486 нм. В насыщенных красителем растворах ГКР-1 и ГКР-2 во всём исследуемом диапазоне концентраций полосы поглощения судана I отсутствуют (рис. 3.5а), то есть солюбилизация красителя агрегатами данного макроцикла не происходит. Из этого следует, что в структуре ассоциатов данных макроциклов отсутствует или очень мала гидрофобная область, способная солюбилизировать гидрофобный зонд. Можно предположить, что агрегаты ГКР-1 имеют стопочную структуру, образованную либо по типу «голова к голове» за счет водородных связей между гидроксильными группами, либо по типу «голова к хвосту» за счет электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными сульфонатными группами нижнего обода и положительно заряженным верхним ободом. Методом ДРС для растворов ГКР-2 были обнаружены мицеллы. Вероятно, размер их внутреннего гидрофобного ядра слишком мал для солюбилизации молекул гидрофобного субстрата, поскольку короткие метильные группы макроцикла обеспечивают достаточно высокую плотность упаковки агрегатов. В то же время агрегаты на основе ГКР-3 способны солюбилизировать некоторое количество судана I (рис. 3.5б). Увеличение доли красителя происходит пропорционально росту концентрации ГКР-3. Невысокая солюбилизующая способность агрегатов ГКР-3, высокое поверхностное натяжение растворов и большой гидродинамический диаметр подтверждают образование везикул из молекул ГКР-3 в присутствии 5% ДМСО и МГ. Увеличение размера частиц, сопровождающееся увеличением эффективности солюбилизации гидрофобного зонда, указывает на образование многослойных везикул [185].

3.1.2. Функциональная активность супрамолекулярных ансамблей на основе каликс[4]резорцинов, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами

3.1.2.1. Биологическая активность каликс[4]резорцинов, модифицированных N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами

Была изучена биологическая активность N-метил-D-глюкаминовых макроциклов. Антимикробная активность данных макроциклов была достаточно низкой (табл. 3.2), но незначительно возрастала с увеличением длины алкильных фрагментов на нижнем ободе. Оценка цитотоксического действия на эритроциты человека (гемолитический эффект) и клеточную линию печени Chang liver (табл. 3.3) показала, что исследуемые К[4]Р обладают низкой токсичностью. Среди исследованных макроциклов ГКР-3 продемонстрировал самую низкую токсичность.

Таблица 3.2. Антимикробная активность ГКР.

Соединение	Минимальные ингибирующие концентрации, мМ		
	<i>S. aureus</i> 209P	<i>B. cereus</i> 8035	<i>Candida albicans</i> 855-653
Бактериостатическая и фунгистатическая активность			
ГКР-1	1.00±0.07	>1	>1
ГКР-2	0.13±0.01	0.25±0.02	>0.5
ГКР-3	0.13±0.01	0.13±0.01	>0.25
Бактерицидная и фунгицидная активность			
ГКР-1	1.00±0.06	>1	>1
ГКР-2	1.00±0.08	>1	>0.5
ГКР-3	>0.25	>0.25	>0.25

Таблица 3.3. Гемолитическая и цитотоксическая активность ГКР.

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

3.1.2.2. Инкапсуляция гидрофильных субстратов агрегатами ГКР-3

Исходя из предположения о везикулярной структуре агрегатов, формируемых ГКР-3, и их низкой токсичности была оценена возможность использования их в качестве наноконтейнеров для доставки гидрофильного противоракового препарата DOX. Поскольку высокощелочная среда, наблюдаемая в растворах ГКР-3–МГ, приводит к быстрой деградации DOX, в качестве растворителя использовали ацетатный буфер. Серией дополнительных экспериментов было подтверждено, что присутствие буфера не влияет на агрегацию ГКР-3 и позволяет получить растворы с pH 6.8.

Прежде чем приступить к инкапсуляции самого лекарства, была исследована способность агрегатов ГКР-3 к связыванию модельной гидрофильной метки RhB. Были получены зависимости ЭИ от концентрации компонентов в системе ГКР-3–МГ (рис. 3.8). Выбор концентраций ГКР-3 (0.1 мМ, 0.2 мМ, 0.3 мМ и 0.5 мМ) обусловлен тем, что более

концентрированные растворы ГКР-3 (1 мМ и выше) нестабильны во времени и выпадают в осадок, что, вероятно, вызвано агломерацией частиц из-за множественных межмолекулярных водородных связей между N-метил-D-глюкаминовыми группами на поверхности агрегатов [2]. В целом, растворы ГКР-3 демонстрируют высокую инкапсулирующую способность, и наибольшее значение ЭИ соответствует композиции, содержащей 0.2 мМ ГКР-3 и 10 мМ МГ. В агрегатах капсулируется 0.0097 мМ RhB (ЭИ = 95.7%). Далее именно эта система была задействована для инкапсуляции DOX. Учитывая, что в результате инкапсуляции DOX наблюдается снижение абсорбции и эмиссии DOX, ЭИ определялась по количеству неинкапсулированного субстрата, перешедшего во внешнюю среду в результате диализа. В композиции, содержащей 0.2 мМ ГКР-3 и 10 мМ МГ, агрегатами связывается 0.014 мМ DOX (ЭИ = 71%).

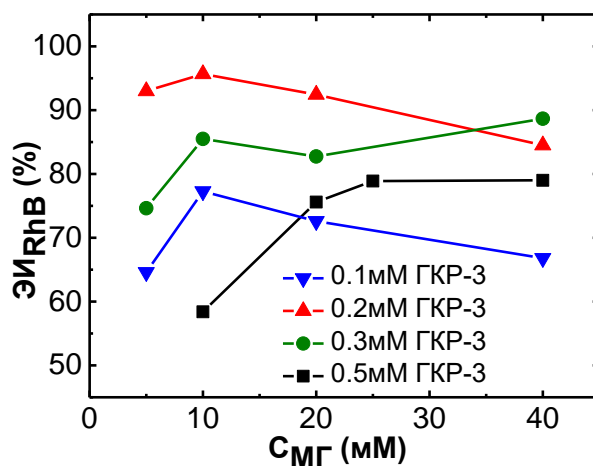


Рисунок 3.8. Зависимость значений ЭИ RhB в системе ГКР-3–МГ от концентрации МГ, $C(\text{ГКР-3}) = 0.10\text{--}0.5$ мМ; $C(\text{МГ}) = 5\text{--}40$ мМ.

Обнаружено, что сформированная система на основе ГКР-3 обладает чувствительностью к кислотности среды. При подкислении данной системы с инкапсулированным лекарством до pH 2.76 наблюдается увеличение интенсивности эмиссии (рис. 3.9), что говорит о высвобождении DOX. В кислой среде происходит протонирование атомов азота на верхнем ободе макроцикла, что приводит к отталкиванию N-метил-D-глюкаминовых фрагментов друг от друга как внутри одной молекулы, так и между соседними. При этом наблюдается увеличение «конусности» молекул и изменение морфологии агрегатов от везикулярной к мицеллярной, сопровождающееся высвобождением инкапсулированного DOX. Методы ДРС и ПЭМ подтверждают уменьшение размеров частиц в кислой среде (рис. 3.10). Таким образом, данные наноконтейнеры могут быть использованы для хранения и pH-контролируемого высвобождения гидрофильных субстратов в опухолевых тканях.

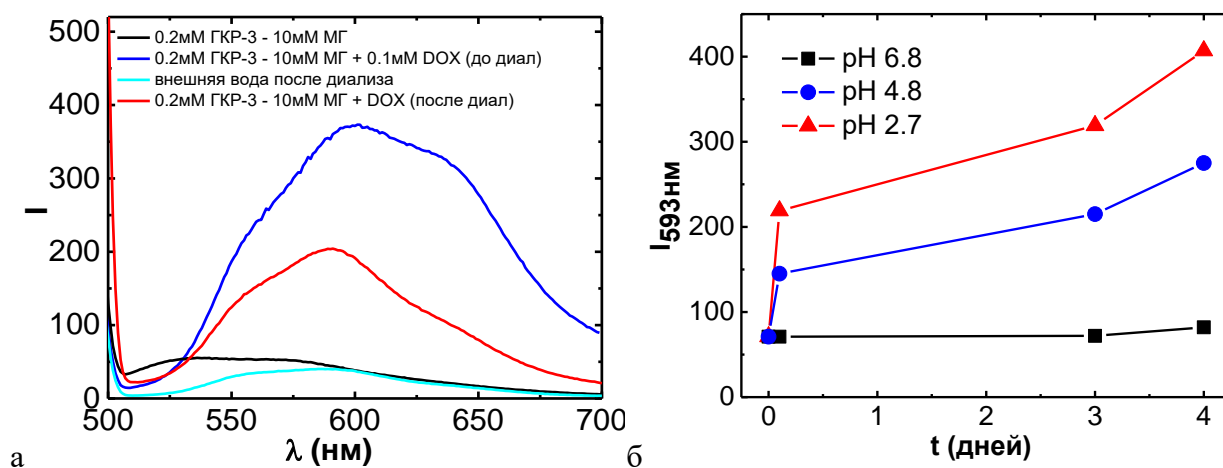


Рисунок 3.9. (а) Спектры флуоресценции растворов DOX, ГКР-3–DOX до и после диализа, 25 °С; (б) Изменение интенсивности флуоресценции инкапсулированного DOX в течение 4 дней при различном pH (2.7, 4.8, 6.8), 25 °С.

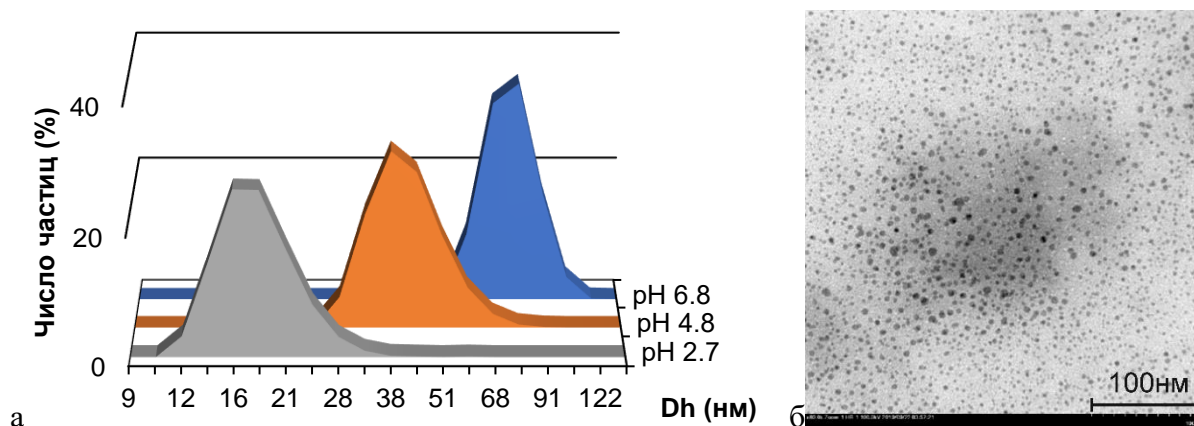


Рисунок 3.10. (а) Распределение размеров агрегатов, усредненное по числу частиц, в водных растворах ГКР-3, нагруженных DOX, при различном pH, 25 °С. (б) Изображение ПЭМ системы 0.2 мМ ГКР-3–10 мМ МГ (5%об. ДМСО) при pH 3.

3.1.2.3. Влияние инкапсуляции на противоопухолевую активность доксорубицина

Следующим этапом исследования стало изучение цитотоксического действия DOX в отсутствие и присутствии ГКР-3 в отношении нормальной и опухолевой клеточных линий человека. Для экспериментов использовали культуру опухолевых клеток (M-HeLa) и культуру нормальных клеток печени (Chang liver). Показано, что DOX в индивидуальном состоянии проявляет высокую цитотоксичность на опухолевой линии M-HeLa. Примерно при этой же концентрации происходит и гибель половины нормальных клеток (табл. 3.4). Инкапсуляция DOX в агрегаты ГКР-3 меняет картину не в лучшую сторону: противоопухолевая активность инкапсулированного препарата повысилась как по отношению к опухолевым, так и нормальным клеткам. В то же время DOX в присутствии 10 мМ МГ не проявляет противоопухолевую активность, что является следствием ингибирования под действием щелочной среды. Аналогично, отсутствовала токсичность DOX, инкапсулированного в агрегаты

немодифицированного макроцикла КР-3. В случае КР-3 отсутствие МГ-фрагментов на макроциклической платформе, вероятно, снижает сродство к тестируемым клеткам. Можно сказать, что основная роль в специфичности и активности DOX определяется присутствием N-метил-D-глюкаминных групп в структуре инкапсулирующих агрегатов.

Таблица 3.4. Значения IC_{50} для DOX в отсутствие и в присутствии ГКР-3, КР-3 и МГ.

Система	IC_{50} (DOX), мкМ	
	Chang liver	M-HeLa
DOX	6.0 ± 0.5	5.2 ± 0.4
DOX + ГКР-3	5.1 ± 0.3	5.0 ± 0.3
DOX + МГ	>100	>100
DOX + КР-3	>100	>100

Для оценки клеточного проникновения свободного и инкапсулированного в агрегаты DOX использовали метод проточной цитометрии, благодаря которому определяли интенсивность флуоресценции раковых клеток M-HeLa после инкубации с исследуемыми растворами. После 24 часов инкубации клетки промывались для удаления адсорбированных частиц с поверхности клеток. Полученные результаты показали, что DOX действительно проникает в раковые клетки, однако его инкапсуляция в агрегаты немного снижает проникающую способность (рис. 3.11). Пониженная проницаемость агрегатов через клеточную мембрану может быть связана с их большими размерами в нейтральной среде (более 200 нм).

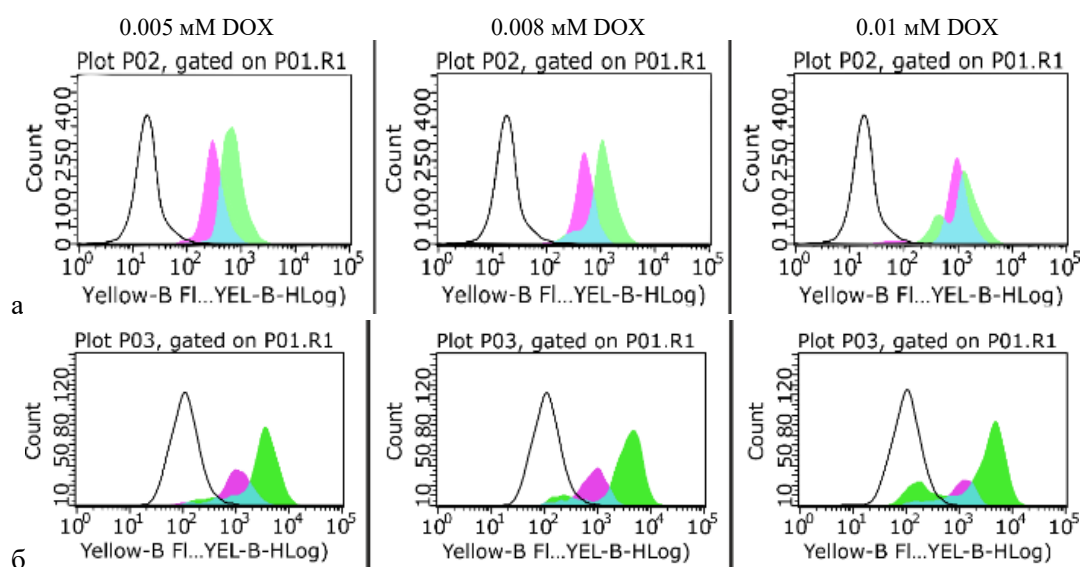


Рисунок 3.11. Данные проточной цитометрии для клеток Chang liver (а) и M-HeLa (б), инкубированных со свободным (зеленый) и инкапсулированным (розовый) DOX.

Дополнительно с помощью флуоресцентной микроскопии было исследовано распределение противоопухолевого препарата внутри клеток. Краситель Hoechst 33342, интеркалирующий в ДНК, использовался для отображения ядер клеток (синее окрашивание), в то время как проникновение DOX в ядра клеток детектировалось проявлением красной флуоресценции (рис. 3.12). После обработки клеток инкапсулированным DOX проникновение лекарства в ядро не происходит, и нагруженные лекарством наноконтейнеры распределяются в

цитоплазме клетки. Стоит подчеркнуть тот факт, что инкапсуляция DOX снижает число некротических клеток и увеличивает число клеток, находящихся на стадиях апоптоза (рис. 3.13). Таким образом, лекарственный наноконтейнер на основе ГКР-3 демонстрирует перспективы использования в качестве лекарственного наноконтейнера за счет индукции апоптоза в клеточных линиях M-HeLa.

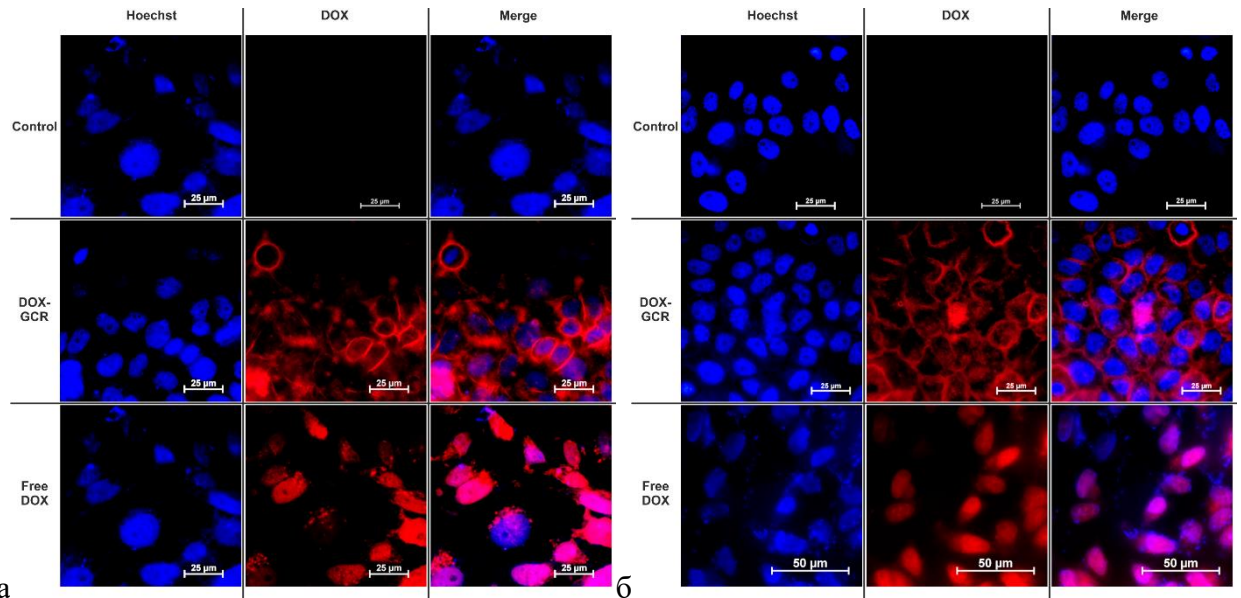


Рисунок 3.12. Изображения флуоресцентной микроскопии клеток линий Chang liver (а) и M-HeLa (б), окрашенных Hoechst 33342: контрольных образцов и образцов после инкубации с инкапсулированным и свободным DOX.

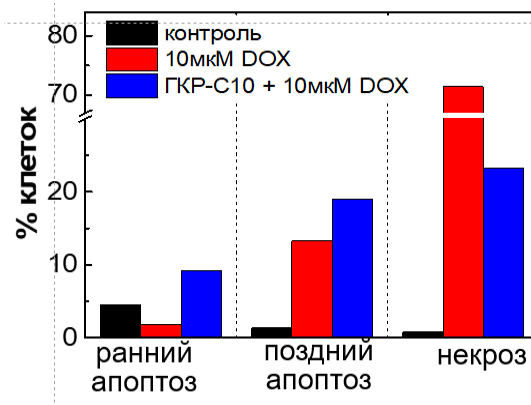


Рисунок 3.13. Гистограмма количества клеток M-HeLa (% от общего количества) на ранней и поздней стадиях апоптоза и некроза для контрольного образца и образцов после инкубации с инкапсулированным и свободным DOX.

Таким образом, для ряда синтезированных K[4]P с N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами на верхнем ободе обнаружено влияние структуры нижнего обода на тип агрегации. Молекулы ГКР-1 и ГКР-2 образуют агрегаты, не способные к связыванию субстратов различной гидрофобности. Везикулярные частицы, формируемые ГКР-3, способны инкапсулировать гидрофильные субстраты, а именно противоопухолевый препарат DOX. Эти агрегаты чувствительны к изменению pH и могут высвободить связанный DOX в кислой среде.

Полученный наноконтейнер ГКР-3 с DOX не обладает селективностью и показывает одинаково высокую цитотоксичность по отношению как к нормальным, так и к раковым клеткам. В то же время инкапсуляция DOX в агрегаты ГКР-3 приводит к индуцированию апоптоза и снижению некроза в опухолевых клетках.

3.2. Супрамолекулярные системы на основе ГКР-1 и катионных ПАВ

Как было сказано ранее, N-метил-D-глюкаминоновый K[4]P с группами на нижнем ободе ГКР-1 в растворе образует неоднородные стопочные агрегаты, характеризующиеся достаточно высоким индексом полидисперсности. Для формирования более организованных структур требуется наличие в макроциклической структуре длинных алкильных групп. Добавить такой гидрофобный фрагмент к макроциклу можно и без использования химического синтеза. В последнее десятилетие при создании мицеллярных и везикулярных агрегатов широко используются супраамфифильные системы, в которых амфифильность достигается путём объединения гидрофобной и гидрофильной частей за счет нековалентных взаимодействий [114, 122, 124, 125, 186–190].

Для исследования взаимодействия с ГКР-1 были выбраны n-гексадецильные производные бипиридиниевых ПАВ, содержащие виологеновый (В-16) и винилбипиридиниевый (ВБП-16) «головные» группы, а также классическое катионное ПАВ ЦТАБ для сравнительного образца (рис. 3.14). Соединения на основе пиридиния представляют собой важный класс молекул, имеющих множество применений во многих областях науки и медицины [191]. Катионные ПАВ с пиридиниевыми «головными» группами используются в доставке лекарств и генов, модификации мембран, косметике, а также для ингибирования коррозии, полимеризации, очистки сточных вод, приготовления асфальтовых эмульсий и т.д. Кроме того, амфифильные молекулы на основе пиридиния также привлекают внимание ученых, поскольку они могут проявлять прямые фармакологические эффекты [192]. Например, соединения пиридиния с гидрофобными алкильными цепями проявляют высокую антимикробную активность [192–194].

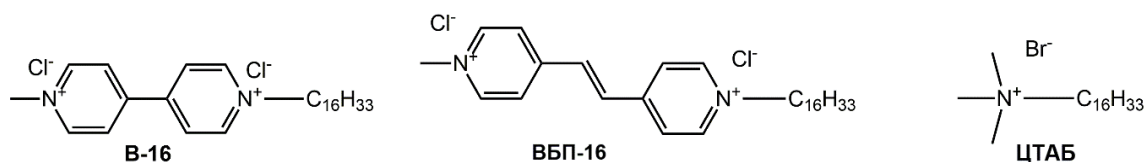


Рисунок 3.14. Структуры бипиридиниевых ПАВ.

Важной особенностью молекулярной структуры ВБП-16 является светочувствительная винилбипиридиниевая группа, способная к изомеризации под действием УФ света. Данное свойство винилбипиридиниевого ПАВ можно использовать для осуществления морфологических переходов, управляемых внешним стимулом. После 15-минутного облучения раствора ВБП-16 УФ светом с длиной волны 365 нм на спектрах наблюдаются изменения, характерные для процесса фотоиндуцированной транс-цис-изомеризации: уменьшение

интенсивности длинноволновой полосы при 320 нм и небольшое увеличение интенсивности поглощения в области 228 нм (рис. 3.15). При длительном облучении (90 мин) полоса транс-изомера при 320 нм полностью исчезает. При этом увеличивается интенсивность полосы цис-изомера при 228 нм, и появляется новая полоса поглощения с максимумом при 258 нм с изменением цвета раствора от желтого к красному. Вероятно, это связано с дополнительным появлением продукта гидролиза ВБП-16, который дает полосу поглощения при 258 нм [195]. УФ спектры, полученные для всех водных растворов ВБП-16, не изменялись в течение 75 мин при дневном свете, то есть фото-стационарное равновесие между изомерами устанавливается при комнатной температуре сразу после облучения.

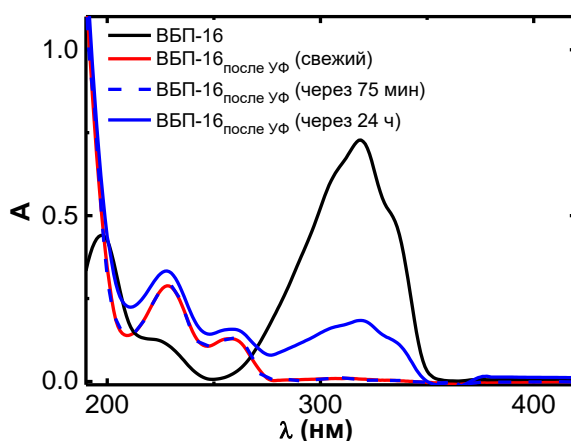


Рисунок 3.15. УФ спектры поглощения водного раствора 0.02 мМ ВБП-16 до и после воздействия УФ света и их изменение во времени, 25 °С, оптический путь 10 мм.

3.2.1. Агрегационные и биологические свойства бипиридиниевых ПАВ

3.2.1.1. Агрегационные свойства

Набором физико-химических методов, включающим тензиометрию, кондуктометрию и спектрофотометрию, было исследовано агрегационное поведение бипиридиниевых ПАВ в водных растворах [175]. На рисунке 3.16а приведены изотермы поверхностного натяжения γ исследуемых амфифилов. При больших концентрациях ВБП-16 демонстрирует более выраженное снижение поверхностного натяжения. Тензиометрическое значение ККМ В-16 составляло 2.5 мМ, что хорошо коррелирует с литературными данными [196]. ВБП-16 имеет более низкое значение ККМ, что указывает на его меньшую гидрофильность из-за наличия двойной связи в «головной» группе. После длительного облучения (90 минут) значение ККМ ВБП-16 становится немного ниже (1 мМ), чем для транс-формы ПАВ. Наиболее вероятной причиной такого снижения значения ККМ является появление гидроксильной группы у углерода в винильном фрагменте, что вносит дополнительный вклад межмолекулярных водородных связей в мицеллообразование [197].

Процесс агрегации также фиксировался с помощью кондуктометрии (рис. 3.16б). Значения ККМ, полученные этим методом, немного превосходят тензиометрические значения

(табл. 3.5). Известно, что метод тензиометрии фиксирует изменения молекулярного расположения на границе раздела, тогда как изменение удельной электропроводности вызвано изменением количества заряженных частиц в объеме раствора. При сравнении тензиометрических и кондуктометрических данных сохраняется корреляция между значениями ККМ для В-16 и необлученного ВБП-16. Однако для раствора облученного винилбипиридиниевого ПАВ перегиб кондуктометрической зависимости наблюдается при гораздо большей концентрации (5.9 мМ), что соответствует литературным данным, согласно которым значение ККМ катионных ПАВ в транс-форме ниже, чем в цис-форме из-за различной плотности упаковки молекул на границе раздела [198, 199]. В отличие от цис-молекул, транс-изомеры демонстрируют регулярную и компактную адсорбцию на границе раздела воздух-вода. Вероятно, метод кондуктометрии оказывается более чувствительным к наличию цис-формы, чем к продуктам фотогидратации, которые обнаруживаются методом тензиометрии.

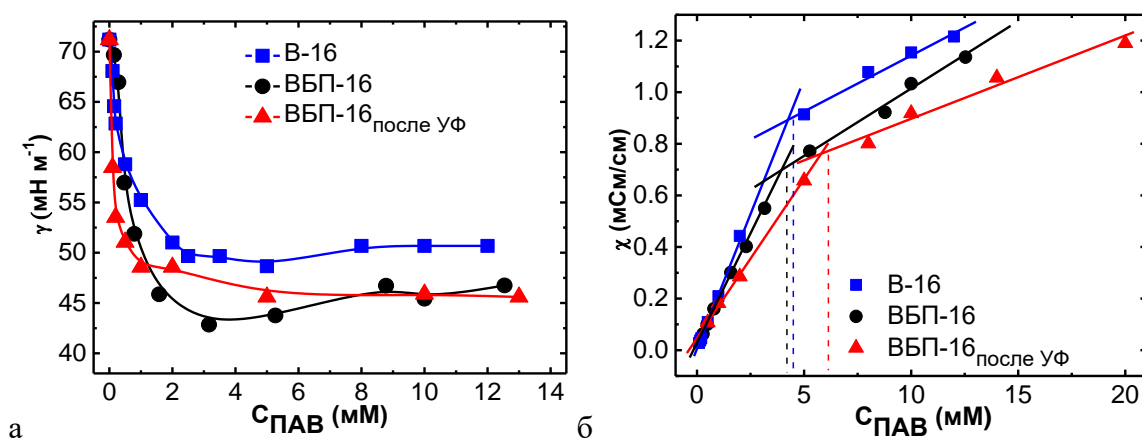


Рисунок 3.16. Концентрационные зависимости поверхностного натяжения (а) и удельной электропроводности (б) бипиридиниевых ПАВ, 25 °С.

Таблица 3.5. ККМ и солюбилизационная емкость (S), определенная методом солюбилизации судан I, катионных ПАВ В-16 и ВБП-16.

Соединение	ККМ, мМ			S , моль судан I/моль ПАВ
	Тензиометрия	Кондуктометрия	Солюбилизация гидрофобного зонда	
В-16	2.5	4.2	4.9	0.056
ВБП-16	1.6	3.9	3.1	0.029
ВБП-16 после УФ	1.0	5.9	1.0	0.008

Измерения солюбилизации гидрофобного зонда судана I применяли для подтверждения агрегации в растворах ПАВ. Растворение зонда фиксировалось спектрофотометрически по появлению полосы поглощения в области 486 нм. На рисунке 3.17 показаны графики зависимости интенсивности поглощения судана I от концентрации ПАВ. При концентрации выше ККМ поглощение гидрофобного субстрата начинает возрастать с увеличением содержания ПАВ в системе. Наибольшей солюбилизующей способностью из исследуемых ПАВ обладает В-16 (табл. 3.5). Для ВБП-16 наблюдается снижение солюбилизующей способности судана I с

увеличением времени облучения. В цис-форме «головная» группа ВБП-16 имеет более объемную структуру и более короткую кажущуюся длину гидрофобного фрагмента, чем транс-форма. Следовательно, гидрофобность цис-формы ниже и, следовательно, с увеличением ее содержания в растворе солюбилизующая способность ВБП-16 снижается.

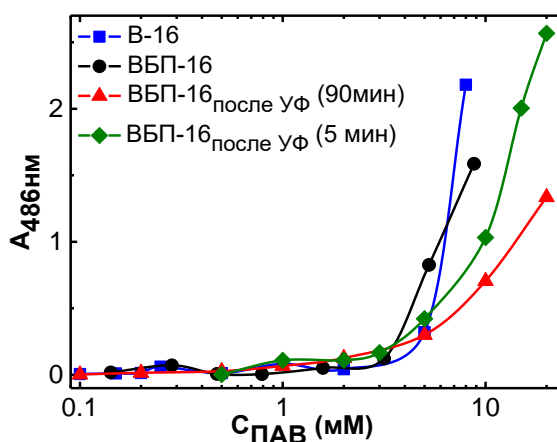


Рисунок 3.17. Зависимость оптической плотности полосы поглощения судана I в водных растворах бипиридиниевых ПАВ от их концентрации, 25 °С, оптический путь 1 мм.

Агрегация в растворах ПАВ подтверждается также экспериментами по ДРС. Исследовались растворы как выше, так и ниже ККМ. Крупные частицы диаметром 140 и 200 нм образуются в водных 0.25 мМ растворах ВБП-16 и В-16 (рис. 3.18), что хорошо коррелирует с данными, полученными в работе [200], где показано образование везикулярных структур в растворе с низким содержанием молекул амфифильных производных виологена. Увеличение количества В-16 до 12 мМ приводит к уменьшению гидродинамического диаметра и увеличению показателя полидисперсности, что обусловлено дополнительным образованием мицеллоподобных структур. Аналогичное поведение наблюдается для ВБП-16: ниже ККМ наблюдаются крупные сферические частицы размером 140 нм, а выше ККМ – мицеллы диаметром 2.3 нм. Примечательно, что в растворе ПАВ ЦТАБ, не имеющего в своем составе пиридиниевых фрагментов, при концентрации ниже ККМ наблюдается мономодальное распределение частиц с размером 0.6 нм, соответствующем отдельной молекуле ЦТАБ. В водных растворах ВБП-16_{после} УФ при концентрациях выше ККМ наблюдается превращение мелких мицелл диаметром 2.3 нм в более крупные наночастицы со средним диаметром 18.2 нм. Таким образом, обобщая результаты ДРС и методов солюбилизации, можно сказать, что, несмотря на более гидрофобную «головную» группу, ВБП-16 имеет более низкую солюбилизующую способность по отношению к гидрофобному красителю по сравнению с В-16 из-за небольшого размера образующихся агрегатов. Однако облучение ВБП-16 УФ светом, приводящее к росту его агрегатов, также приводит к снижению солюбилизующей способности. В этом случае транс-ВБП-16 превращается как в цис-изомер, так и в продукт фотогидратации, которые имеют немного большую «головную» группу. Из-за этого изменяется форма упаковки молекул, что

приводит к увеличению размера частиц, что, в свою очередь, вероятно, приводит к образованию более крупных агрегатов с рыхлой гидрофобной «сердцевинкой».

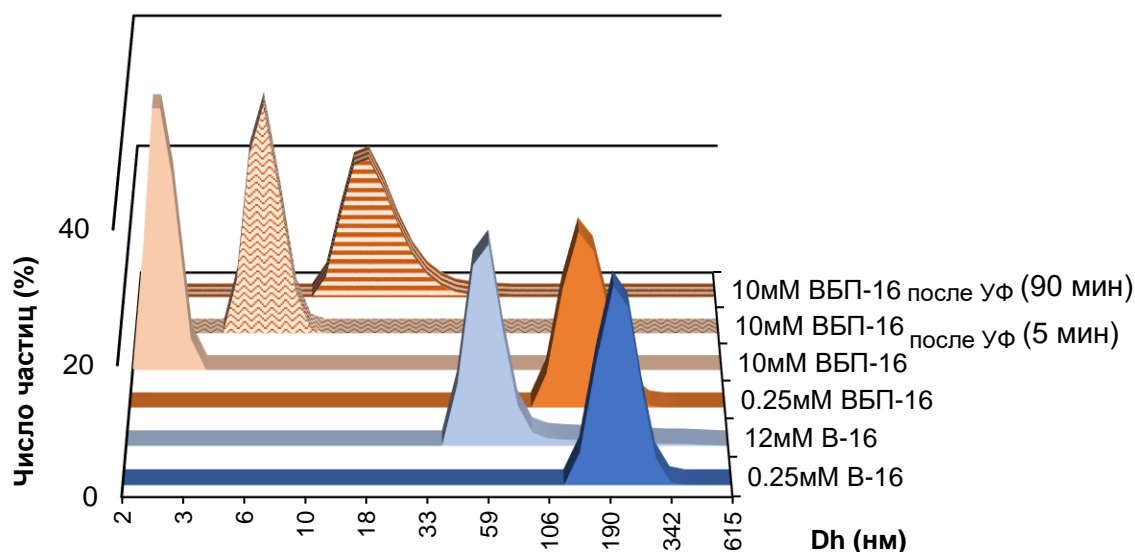


Рисунок 3.18. Распределение агрегатов по размерам, усредненное по числу частиц, в водных растворах бипиридиниевых ПАВ различной концентрации, 25 °С.

3.2.1.2. Биологическая активность

Антимикробная (бактериостатическая, фунгистатическая, бактерицидная и фунгицидная) активность исследуемых катионных ПАВ была изучена *in vitro* и представлена в таблице 3.6. Анализ полученных результатов показал, что изученные соединения избирательно действуют на грамположительные бактерии (*S. aureus 209P* и *B. cereus 8035*) и культуру дрожжей *C. albicans 855-653*. ПАВ показали очень высокую антимикробную активность в диапазоне концентраций (1–500 мкМ). Антимикробная и фунгицидная активность В-16 и ВБП-16 в отношении грамположительных бактерий и дрожжей *C. Albicans* выше по сравнению с ЦТАБ. Интересно отметить, что 5-минутное УФ облучение приводит к снижению биологической активности ВБП-16 в отношении грамположительных бактерий. Следовательно, цис-форма молекул имеет пониженную активность. Продолжительное время облучения привело к дополнительному образованию продуктов фотогидратации в транс-форме, и в связи с тем, что в растворе сосуществуют различные формы ВБП-16, УФ воздействие приводит к неоднозначным результатам антимикробной активности.

Таблица 3.6. Антимикробная активность катионных ПАВ.

Соединения	МИК, мкМ		
	<i>S. aureus</i> 209P	<i>B. cereus</i> 8035	<i>C.albicans</i> 855-653
Бактериостатическая и фунгистатическая активности			
ЦТАБ	6.3±0.5	25±1.9	25±2.0
В-16	1.00±0.09	2.0±0.1	31.0±2.4
ВВП-16	1.00±0.09	2.0±0.2	63±5.6
ВВП-16 _{после УФ (5 мин)}	20.0±1.8	100.0±8.6	63±5.8
ВВП-16 _{после УФ (90 мин)}	4.0±0.3	240±21	13.0±1.1
Бактерицидная и фунгицидная активности			
ЦТАБ	25±2.2	200±19	200±16
В-16	3.0±0.2	12±1.0	31.0±2.7
ВВП-16	3.0±0.3	12±1.1	63±5.4
ВВП-16 _{после УФ (5 мин)}	20.0±1.9	200±18	63±5.6
ВВП-16 _{после УФ (90 мин)}	31.0±2.4	500±43	13.0±1.2

Далее была исследована токсичность ПАВ на эритроцитах крови человека в концентрационном диапазоне от 0.25 мМ до 5 мМ. Из таблицы 3.7 видно, что все ПАВ являются достаточно токсичными, поскольку гемолиз составляет 100%. Оценка цитотоксичности по отношению к линии нормальных клеток печени человека (Chang liver) в диапазоне концентраций 1-50 мкМ показала, что все катионные ПАВ оказывают достаточно сильное цитотоксическое действие на клетки (табл. 3.8). Значение IC₅₀ В-16 составляло приблизительно 10 мкМ, что сопоставимо с таковым для ЦТАБ. Напротив, расчетное значение IC₅₀ для ВВП-16 было значительно выше (примерно 26 мкМ), что говорит о его меньшей токсичности. Однако УФ облучение этого ПАВ приводит к снижению концентрации полумаксимального ингибирования, что указывает на повышение токсичности, вызванное транс-цис-изомеризацией и дальнейшим гидролизом «головной» группы. Этот результат важен с точки зрения разработки препаратов для доставки лекарств, реагирующих на раздражители.

Таблица 3.7. Гемолитическая активность катионных ПАВ

Соединения	Гемолиз, %				
	5 мМ	2 мМ	1 мМ	0.5 мМ	0.25 мМ
ЦТАБ	100	100	100	100	100
В-16	100	100	100	100	100
ВВП-16	100	100	100	100	100
ВВП-16 _{после УФ (5 мин)}	100	100	100	100	100

Таблица 3.8. Концентрации полумаксимального ингибирования роста клеток печени

Соединения	IC ₅₀ Chang liver, мкМ
ЦТАБ	10.00±0.01
В-16	10.00±0.01
ВВП-16	26.00±2.20
ВВП-16 _{после УФ (5 мин)}	25.00±2.00
ВВП-16 _{после УФ (90 мин)}	20.00±1.60

Таким образом, были исследованы агрегационные свойства индивидуальных пиридиниевых ПАВ с *n*-гексадецильными группами. Показано, что значения ККМ, размер формируемых агрегатов и их солубилизационная способность напрямую зависят от структурных факторов, а именно от размера «головной» группы. Оценка биологической и цитотоксической активности ПАВ показала их хорошую антибактериальную активность, но вместе с тем и высокую токсичность к клеткам крови и печени человека.

3.2.2. Влияние каликс[4]резорцина на агрегационные свойства бипиридиниевых ПАВ

Далее было изучено влияние макроцикла на агрегационное поведение ПАВ [201]. Из данных тензиометрии хорошо видно, что перегиб на концентрационной зависимости для смешанной системы проявляется при меньшей концентрации ПАВ, чем для индивидуального амфифила (рис. 3.19а). Данный тензиометрический сдвиг обусловлен изменением состава поверхностного слоя на границе раздела вода-воздух, что указывает на межмолекулярное взаимодействие между макроциклом и ПАВ. Влияние молекул К[4]Р на агрегационное поведение ПАВ подтверждается также методом кондуктометрии, являющимся одним из наиболее чувствительным к ионным молекулам. Кондуктометрическая зависимость удельной электропроводности для смешанной композиции на основе ПАВ и макроцикла также имеет перегиб при более низкой концентрации, чем в случае с индивидуальной системой ПАВ (рис. 3.19б). Значения ККА, полученные с помощью кондуктометрии, немного превосходят тензиометрические значения (табл. 3.9), что обусловлено различной спецификой методов.

Чтобы выяснить природу получаемых смешанных агрегатов, был привлечен метод солубилизации гидрофобного зонда. В качестве лиофильной метки был использован судан I (рис. 3.19в). *S* смешанных агрегатов ГКР-1–ПАВ намного меньше, чем для мицелл индивидуальных ПАВ (табл. 3.9) Данное явление может быть связано с образованием в растворе везикул, сформированных совместными комплексами ГКР-1–В-16. В смешанной системе с ВВП-16 солубилизация субстрата хоть и снижается при добавлении ГКР-1, но это происходит не так сильно. Вероятно, в агрегатах, образуемых супраамфилами ГКР-1–ВВП-16, объем гидрофобной области больше, чем в агрегатах на основе ГКР-1–В-16.

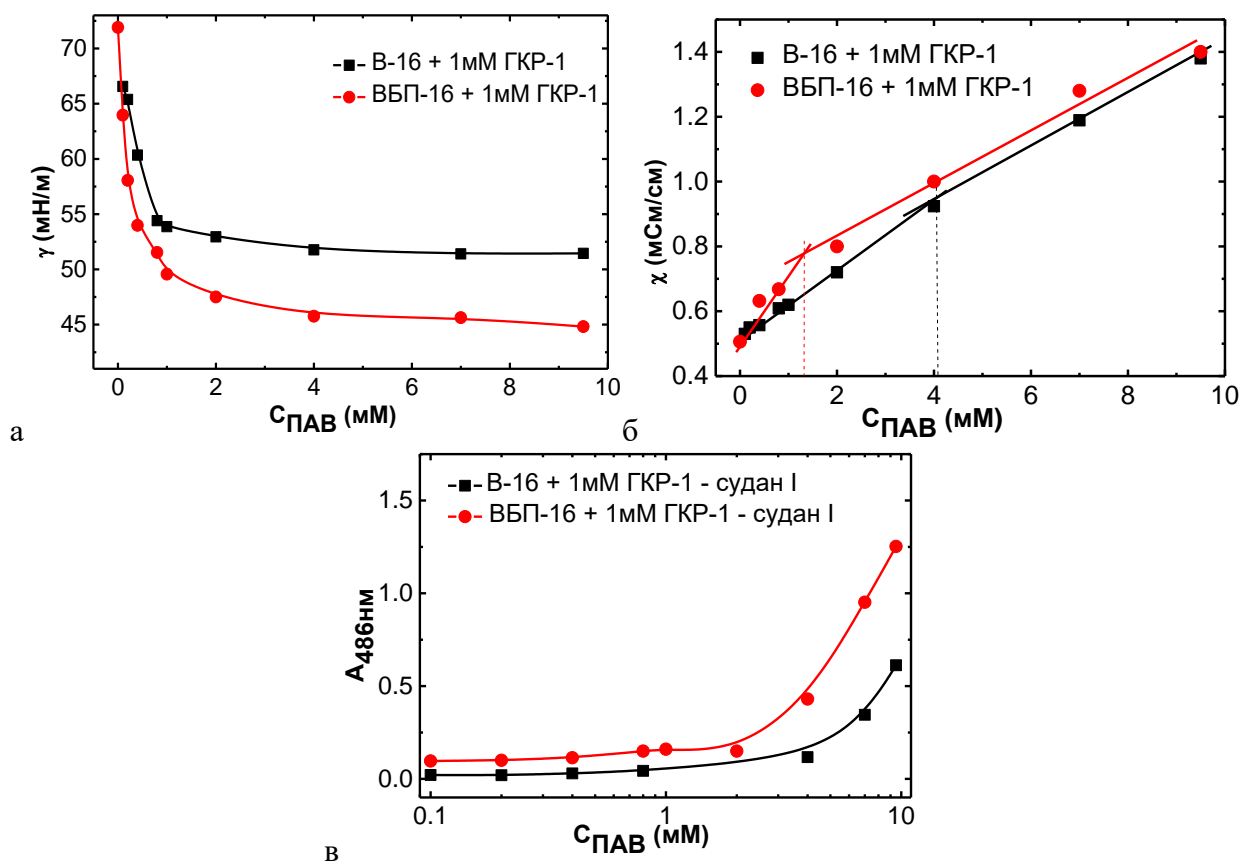


Рисунок 3.19. Зависимости поверхностного натяжения (а), удельной электропроводности (б) и оптической плотности (оптический путь 1 мм) полосы поглощения судана I (в) от концентрации ПАВ в присутствии 1 мМ ГКР-1, 25 °С.

Таблица 3.9. Значения ККА и солюбилизационной емкости S , определенной методом солюбилизации судана I, для систем ПАВ и ГКР-1–ПАВ

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
ВБП-16	1.6	3.9	3.1	0.029
1 мМ ГКР-1–ВБП-16	1.0	1	2.0	0.018

Для оценки зарядовых характеристик в смешанных системах применяли метод электрофоретического рассеяния света. Молекула сульфонатного макроцикла заряжена отрицательно вследствие диссоциации сульфонатоэтильных групп в водной среде, поэтому добавление в систему катионного ПАВ позволяет ожидать связывания компонентов по электростатическому механизму. Это подтверждают экспериментальные данные, согласно которым при увеличении концентрации ПАВ в системе во всех случаях наблюдается переход значений дзета-потенциала из отрицательной области в положительную (рис. 3.20а). Кроме того, увеличение доли ПАВ в растворе с макроциклом приводит к снижению рН (рис. 3.20б), вызванному взаимодействием катионных групп ПАВ с сульфонатными группами К[4]Р, что приводит к высвобождению ионов водорода, окружавших сульфогруппы макроцикла.

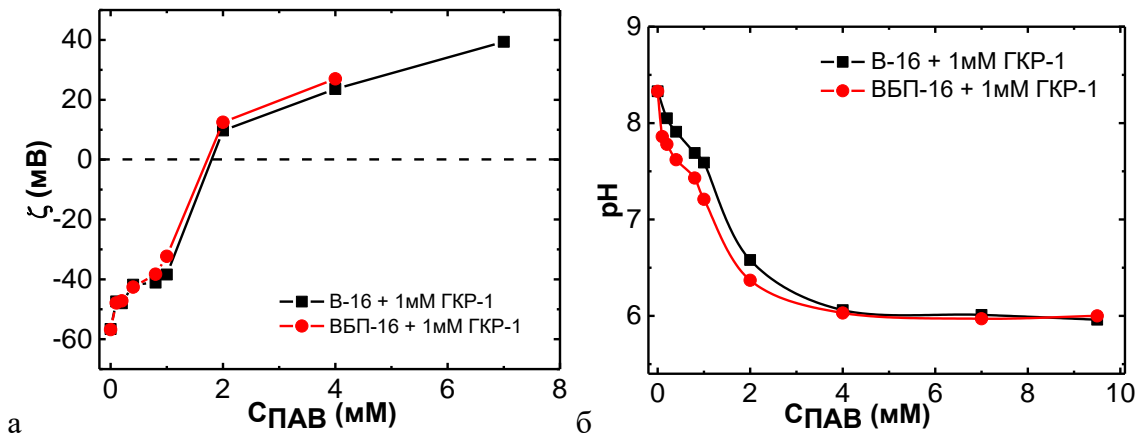


Рисунок 3.20. Зависимость дзета-потенциала (а) и рН (б) в водных растворах В-16 и ВБП-16 от концентрации ПАВ в присутствии 1 мМ ГКР-1, 25 °С.

Важной особенностью лекарственных наноконтейнеров является способность к стимул-чувствительному высвобождению инкапсулированного препарата. Как было отмечено ранее, молекула ВБП-16 способна изомеризоваться под действием УФ света. Однако, в смешанной системе ГКР-1–ВБП-16 после облучения светом никаких изменений в УФ спектрах не происходит (рис. 3.21). В то же время, если приготовить смешанную композицию макроцикла с предварительно облученным ПАВ, то в этом смешанном растворе обратный переход в транс-форму будет замедлен по сравнению с индивидуальным ВБП-16 (рис. 3.21). Вероятно, присутствие макроцикла стабилизирует транс-форму благодаря электростатическому взаимодействию, фиксирующему «головные» группы ВБП-16.

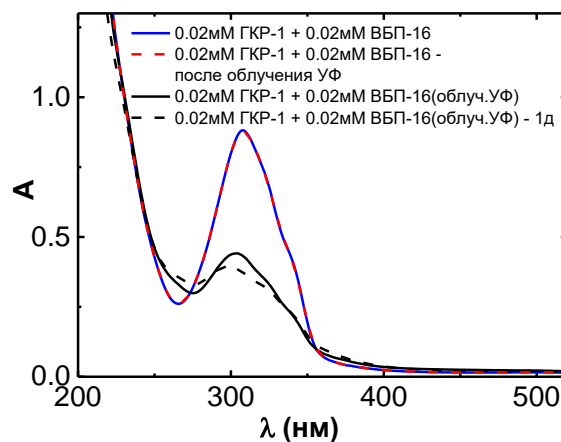


Рисунок 3.21. УФ спектры растворов ГКР-1–ВБП-16 необлученного и облученного УФ светом, а также раствора ГКР-1 с облученным УФ светом ВБП-16 (свежий и через сутки), 25 °С, оптический путь 10 мм.

3.2.3. Инкапсулирующая способность агрегатов каликс[4]резорцин–ПАВ

Для определения молярного соотношения ГКР-1:ПАВ, наиболее благоприятного для смешанной агрегации, использовался метод турбидиметрии, в основе которого лежит явление светорассеяния на оптических неоднородностях среды, то есть на частицах дисперсной фазы. Поскольку характеристические пики ГКР-1 и ПАВ изменяются при взаимодействии (рис. 3.22а,

3.23а), для фиксации агрегации использовали длину волны 600 нм, при которой нет полос поглощения у компонентов, и изменение интенсивности света, прошедшего через дисперсную систему, будет связано только с совместной агрегацией. На рисунках 3.22б, 3.23б показано изменение абсорбции при 600 нм от концентрации ПАВ в растворе при фиксированной концентрации макроцикла. С увеличением доли ПАВ сначала наблюдается резкое увеличение интенсивности, вызванное появлением частиц дисперсной фазы, а затем обратное уменьшение. Полученные зависимости имеют максимум при соотношении ГКР-1:ПАВ 1:2, что соответствует полной компенсации зарядов в системе. Однако, данные композиции обладали низкой стабильностью и с течением времени выпадали в осадок. В связи с этим для выявления композиции с наилучшими инкапсулирующими свойствами далее приводились эксперименты по определению ЭИ гидрофильной метки RhV в системах ГКР-1–ПАВ различного состава [201, 202]. RhV был выбран в качестве модельного зонда, который можно легко идентифицировать с помощью спектрофотометрии, чтобы подтвердить инкапсулирующую способность образованных агрегатов.

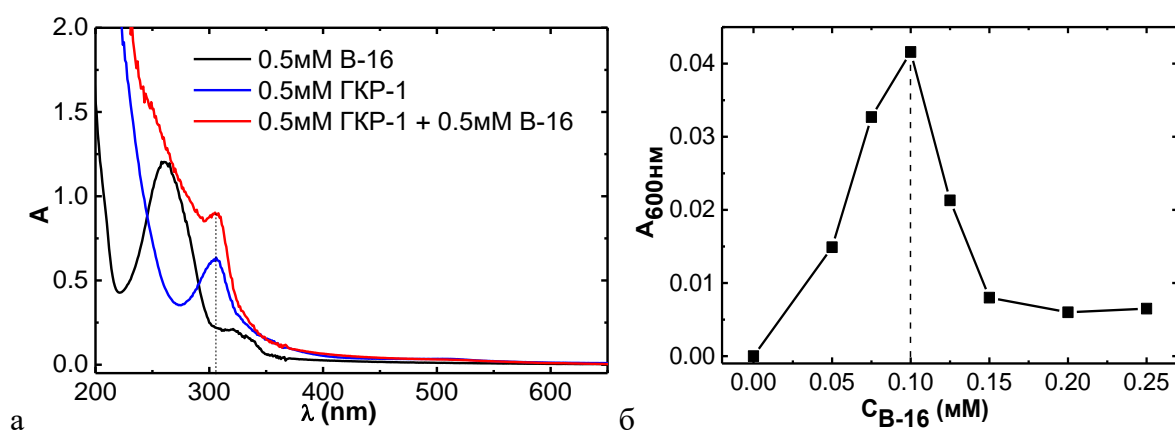


Рисунок 3.22. (а) УФ спектры индивидуальных ГКР-1 и В-16 и их эквимольной смеси, 25 °С, оптический путь 1 мм; (б) зависимость интенсивности поглощения при 600 нм от количества В-16 в смеси с 0.05 мМ ГКР-1, 25 °С, оптический путь 10 мм.

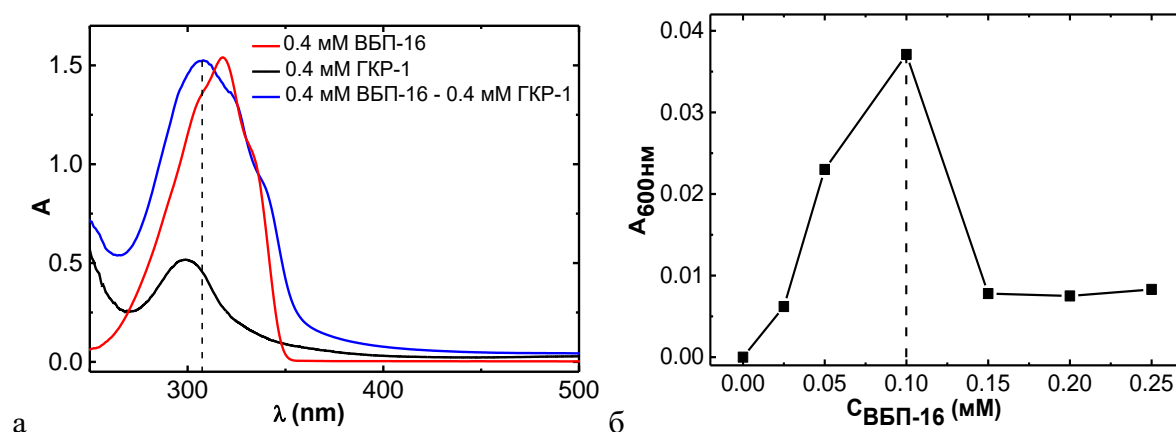


Рисунок 3.23. (а) УФ спектры индивидуальных ГКР-1 и ВБП-16 и их эквимольной смеси, 25 °С, оптический путь 1 мм; (б) зависимость интенсивности поглощения при 600 нм от количества ВБП-16 в смеси с 0.05 мМ ГКР-1, 25 °С, оптический путь 10 мм.

Инкапсулирующая способность системы ГКР-1–В-16. Способность смешанных композиций к инкапсуляции RhV определяли для систем ГКР-1–В-16, содержащих фиксированную концентрацию макроцикла (0.05 мМ) и различные концентрации ПАВ (рис. 3.24а). Соотношение компонентов в супраамфильной системе, при котором ЭИ максимальна, составило 2 молекулы макроцикла к 1 молекуле ПАВ. Также при этом наблюдалась обратная корреляция между ЭИ и размерами агрегатов (рис. 3.24а). При увеличении концентрации ПАВ в смешанной системе образуются большие агрегаты с низкой инкапсулирующей способностью по отношению к связываемому субстрату. На основании этих данных можно предположить, что увеличение доли ПАВ в смеси способствует образованию многослойных везикул.

Далее для соотношения ГКР-1:В-16=2:1 было исследовано влияние общей концентрации супраамфилов в системе. При увеличении концентрации до 0.5 мМ ГКР-1–0.25 мМ В-16 наблюдается увеличение связанного RhV и увеличение гидродинамического диаметра частиц (рис. 3.24б). Смешанные системы с более высокой концентрацией были нестабильными во времени, что, вероятно, связано с осаждением крупных агрегатов и, как следствие, наблюдается уменьшение инкапсуляции. Формирование везикул в растворе 0.5 мМ ГКР-1–0.25 мМ В-16 подтверждено изображением ПЭМ (рис. 3.25а).

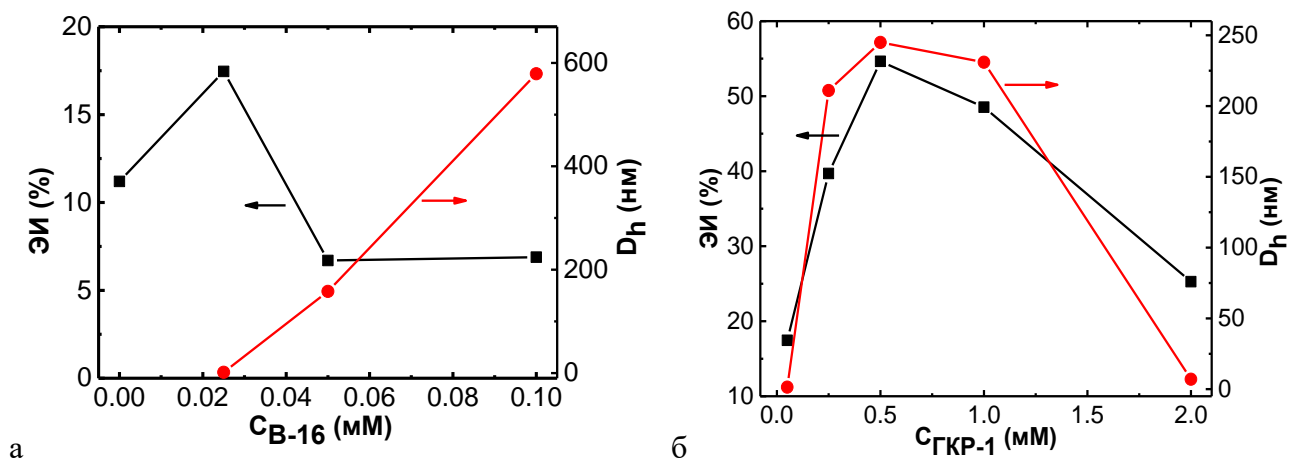


Рисунок 3.24. Изменение значений ЭИ RhV и размеров агрегатов, 25 °С: (а) от концентрации В-16 при фиксированной концентрации ГКР-1 0.05 мМ; (б) от концентрации ГКР-1, ГКР-1:В-16=2:1.

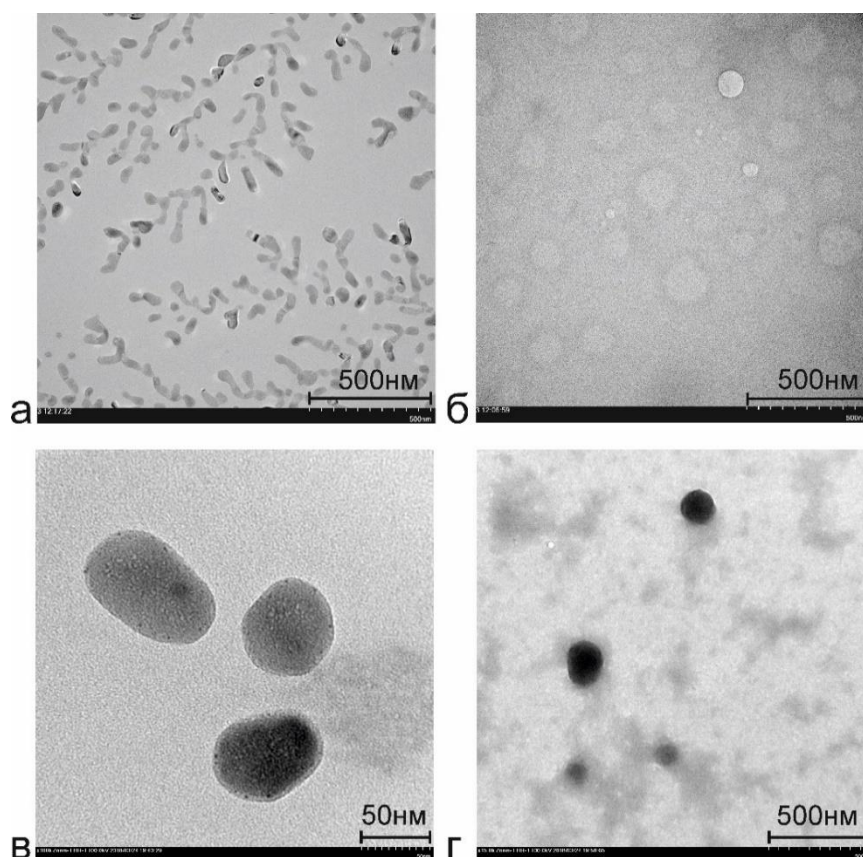


Рисунок 3.25. Изображения ПЭМ для систем ГКР-1:В-16=2:1 (а), ГКР-1:ЦТАБ=1:1 (б), ГКР-1:ВБП-16=1:1 (в) и ГКР-1:ВБП-16_{после} УФ=1:2 (г).

Инкапсулирующая способность системы ГКР-1–ВБП-16. Способность капсулировать гидрофильный зонд RhV была исследована для смешанных систем, содержащих облученный и необлученный ВБП-16. Обнаружено, что при увеличении соотношения ПАВ:К[4]Р наблюдается сначала увеличение, а потом снижение ЭИ и размера формируемых агрегатов (рис. 3.26а, 3.27а). При больших избытках ПАВ образуются агрегаты с меньшим диаметром с низкой капсулирующей способностью. Вероятно, эти агрегаты представляют собой мицеллы индивидуального ВБП-16. При такой низкой концентрации инкапсулирующая способность агрегатов небольшая, а наибольшую ЭИ (10%) показала эквимольная композиция. Для смешанных систем с облученным ПАВ наибольшая ЭИ наблюдается при соотношении ГКР-1:ВБП-16_{после} УФ=1:2. Несмотря на достаточно большие размеры, агрегаты ГКР-1–ПАВ инкапсулируют незначительное количество субстрата, что может говорить об их многослойности. Образование везикул при этих соотношениях было также подтверждено изображениями ПЭМ (рис. 3.25в,г).

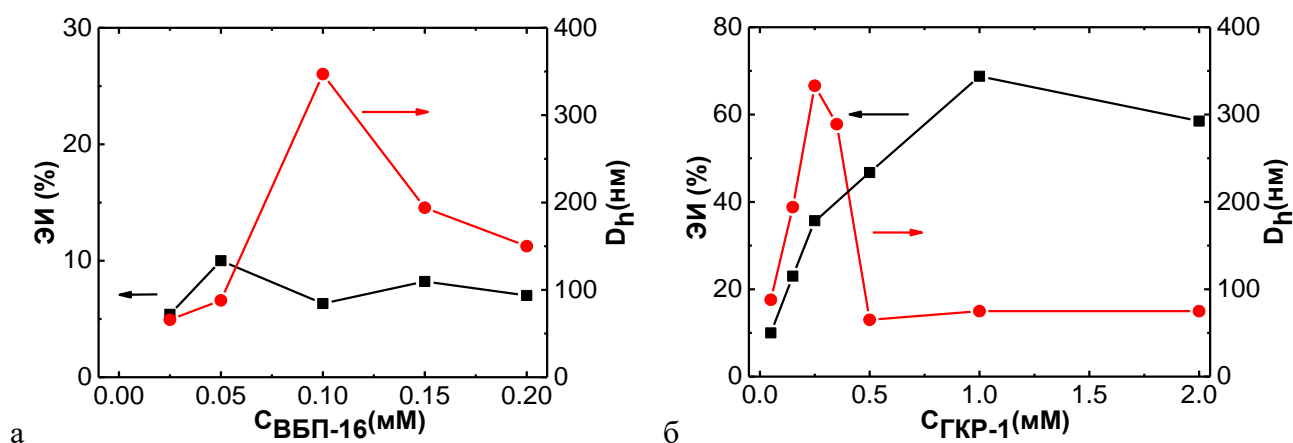


Рисунок 3.26. Изменение значений ЭИ RhV и размеров агрегатов, 25 °С: (а) от концентрации ВБП-16 при фиксированной концентрации ГКР-1 0.05 мМ; (б) от концентрации ГКР-1, ГКР-1:ВБП-16=1:1.

Поскольку агрегационные и инкапсулирующие свойства систем зависят не только от соотношения компонентов, но и от концентрации компонентов в целом, в дальнейшем были исследованы изменения ЭИ и размеров частиц с ростом концентрации супраамфилов в соотношениях ГКР-1:ВБП-16=1:1 (рис. 3.26б) и ГКР-1:ВБП-16_{после УФ}=1:2 (рис. 3.27б). Максимальная ЭИ (92%) наблюдается в системе, содержащей 0.5 мМ макроцикла и 1 мМ облученного ПАВ. Для необлученного ПАВ наибольшая ЭИ имеет меньшее значение (68%) и соответствует системе, содержащей 1 мМ ГКР-1 и 1 мМ ВБП-16.

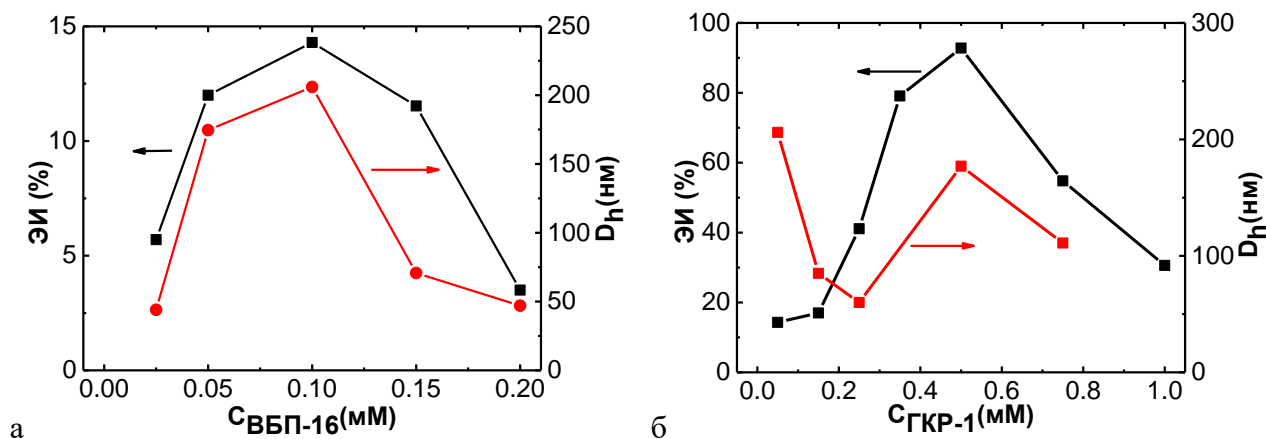


Рисунок 3.27. Изменение значений ЭИ RhV и размеров агрегатов, 25 °С: (а) от концентрации ВБП-16_{после УФ} при фиксированной концентрации ГКР-1 0.05 мМ; (б) от концентрации ГКР-1, ГКР-1:ВБП-16_{после УФ}=1:2.

Инкапсулирующая способность системы ГКР-1–ЦТАБ. Для сопоставления данных, полученных для смешанных систем ГКР-1 с дикатионными ПАВ, была исследована супрамолекулярная композиция на основе того же К[4]Р и классического катионного ПАВ ЦТАБ [202]. При изучении инкапсуляции субстрата от соотношения компонентов в данной смешанной системе (рис. 3.28а), максимальное значение ЭИ наблюдается для эквимольной композиции. При этом наблюдается прямая корреляция между ЭИ и размерами агрегатов ГКР-1–ЦТАБ.

Вероятно, увеличение содержания ПАВ в смеси приводит к образованию мицелл индивидуального ЦТАБ, неспособных к капсулированию гидрофильной метки и снижающих средний диаметр агрегатов в смешанной системе. Увеличение концентрации эквимольной системы приводит к увеличению капсулирующей способности и уменьшению гидродинамического диаметра частиц (рис. 3.28б). Предположительной версией такого поведения является снижение числа бислоев в структуре везикул с ростом концентрации супраамфилолов, а также возможным образованием мицеллярных структур на основе супраамфилолов. Образование везикул при этом соотношении было также подтверждено изображением ПЭМ (рис. 3.25б).

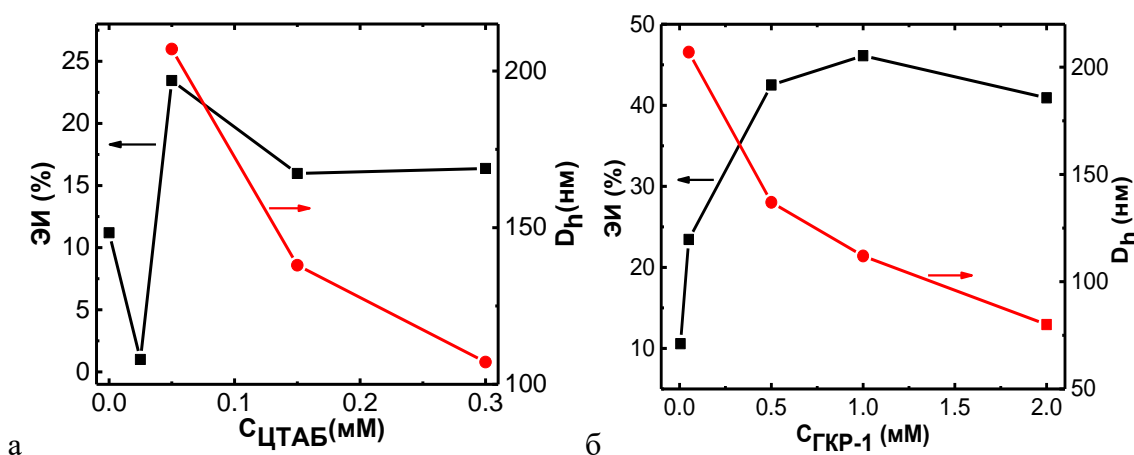


Рисунок 3.28. Изменение значений ЭИ RhV и размеров агрегатов, 25 °С: (а) от концентрации ЦТАБ при фиксированной концентрации ГКР-1 0.05 мМ; (б) от концентрации ГКР-1, ГКР-1:ЦТАБ=1:1.

Композиции ГКР-1–ПАВ, показавшие наилучшую инкапсулирующую способность, и размеры агрегатов в этих системах, представлены в таблице 3.10. Результаты показали, что в качестве наноконтейнера с наилучшей ЭИ проявила композиция ГКР-1 с цис-формой ВБП-16. Выявленные закономерности различной инкапсуляции, вероятно, связаны с изменением размера гидрофильного ядра везикулярных агрегатов, размер которого увеличен в случае с цис-формой, полученной в результате УФ облучения.

Таблица. 3.10. ЭИ RhV и гидродинамический диаметр агрегатов в системах ГКР-1–ПАВ.

Система	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 ВБП-16	65	68 ± 11
0.5 мМ ГКР-1–1 мМ ВБП-16(5 мин УФ)	94	177 ± 13

3.2.4. Влияние каликс[4]резорцина на биологическую активность и токсичность ПАВ

Далее было проведено сравнительное исследование биологической активности смешанных композиций макроцикл–ПАВ в отношении грамположительных и

грамотрицательных бактерий и грибов. Сами ПАВ проявляют очень высокую антимикробную активность в диапазоне концентраций ниже ККМ, в то же время ГКР-1 показывает только незначительную антибактериальную активность. Добавление эквимольного количества макроцикла к ЦТАБ практически не влияет на его антимикробную активность (табл. 3.11). Те же самые закономерности реализуются при оценке гемолитической активности, то есть молекулы ПАВ вызывают полный гемолиз, ГКР-1 практически не разрушает эритроциты, в смешанных композициях снова наблюдается высокая гемолитическая активность (табл. 3.12). Смешанные композиции на основе катионного ПАВ и ГКР-1 сохраняют присущую индивидуальному ПАВ токсичность и гемолитическую активность. Поскольку выявленные закономерности агрегации ГКР-1 с катионными ПАВ аналогичны, можно предположить, что макроцикл не снижает гемотоксичность В-16 и ВБП-16, поэтому выявление антимикробной и гемолитической активности для смешанных систем ГКР-1 с данными ПАВ не проводилось.

Таблица 3.11. Антимикробная активность индивидуальных (ЦТАБ и ГКР-1) и смешанной эквимольной композиции.

Система	Минимальные ингибирующие концентрации, мМ		
	<i>S. aureus</i> 209P	<i>B. cereus</i> 8035	<i>C. albicans</i> 855-653
Бактериостатическая и фунгистатическая активность			
ГКР-1	1	>1	>1
ЦТАБ	0.001	0.002	0.016
ГКР-1–ЦТАБ (1:1)	0.0016	0.002	0.013
Бактерицидная и фунгицидная активность			
ГКР-1	1	>1	>1
ЦТАБ	0.003	0.012	0.031
ГКР-1–ЦТАБ (1:1)	0.063	0.063	0.025

Таблица 3.12. Гемолитическая активность индивидуальных ПАВ и ГКР-1 и смешанной эквимольной композиции.

Система	Гемолиз, %				
	2 мМ	1 мМ	0.5 мМ	0.25 мМ	0.125 мМ
ГКР-1	34.4	16.99	8.8	4.8	0
ЦТАБ	100	100	100	100	100
ГКР-1–ЦТАБ (1:1)		100	100	100	100

Таким образом, было показано, что добавка ГКР-1 к ПАВ снижает значение ККА системы. При этом в растворе наблюдается образование супрамолекулярных амфифилов, способных формировать везикулярные частицы. Полученные везикулы инкапсулируют гидрофильный субстрат, эффективность инкапсуляции которого зависит не только от соотношения компонентов, но и от концентрации супраамфила. К сожалению, комплексообразование K[4]P с ПАВ не влияет на биологические свойства последних, и смешанные композиции обладают высокой токсичностью на уровне индивидуальных ПАВ. В связи с этим, использование смешанных систем с катионными ПАВ для биомедицинского применения невозможно.

3.3. Супрамолекулярные системы на основе сульфонатных каликс[4]резорцинов и металлоПАВ

Среди множества изученных амфифильных молекул особый интерес представляют молекулы ПАВ, содержащие металл в своей структуре. В отличие от традиционных амфифилов, металлоПАВ представляют собой комплекс молекул ПАВ и переходного металла в качестве «головной» группы амфифильной структуры [203, 204]. Как и обычные амфифилы, металлоПАВ агрегируют в растворе выше критической концентрации [204–206], но морфология агрегатов может отличаться, поскольку координация с ионом металла влияет на геометрию молекул. Кроме того, переходные металлы, входящие в состав «головной» группы, могут обладать собственной противораковой активностью. В литературе представлены исследования свойств индивидуальных металлоПАВ [206–208], взаимодействия с белками и ДНК [209–212], а также образование супрамолекулярных комплексов с порфиринами [213] и циклодекстринами [205, 212, 214]. Изучение супрамолекулярных взаимодействий металлоПАВ с каликсаренами никем ранее не проводилось. В связи с этим, нами было проведено исследование совместной агрегации К[4]Р, содержащего сульфогруппы на нижнем (СКР) или верхнем ободке (СВКР), с металлоПАВ, представляющим собой комплекс нитрата лантана с двумя молекулами DABCO-16 (LaS) (рис. 3.29). Сформированные агрегаты были задействованы для инкапсуляции *cisPt* и DOX, и далее были исследованы цитотоксические свойства полученной тройной системы.

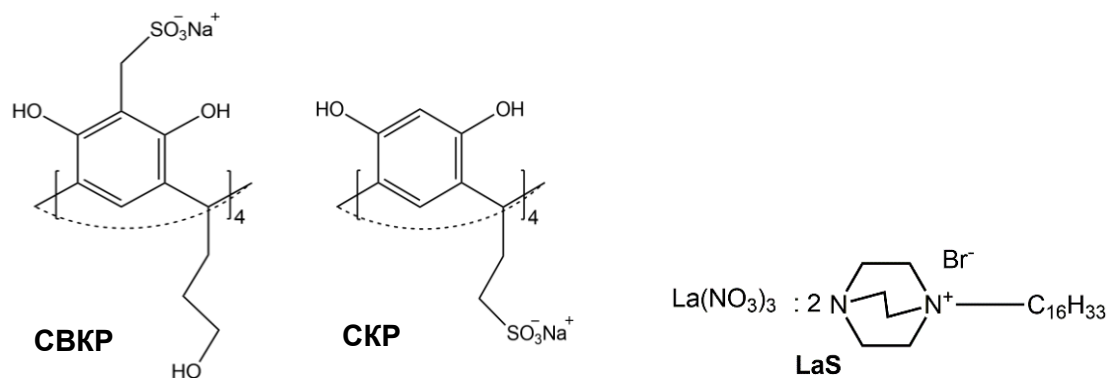


Рисунок 3.29. Структуры исследуемых К[4]Р и металлоПАВ.

3.3.1. Самоорганизация в системах сульфонатных каликс[4]резорцинов и металлоПАВ

На первом этапе работы необходимо было определить наиболее оптимальное соотношение макроцикла и металлоПАВ для смешанной агрегации в водных растворах. УФ спектры сульфонатных К[4]Р имеют полосу поглощения в области 293 нм, которая связана с электронными $n\text{-}\pi^*$ -переходами. LaS не имеет поглощения в видимой и УФ областях, а его смешивание с макроциклом приводит к гиперхромному эффекту по сравнению с полосой поглощения индивидуального К[4]Р (рис. 3.30). Фактически увеличение поглощения смешанного раствора указывает на образование крупных агрегатов, способных рассеивать свет. Для определения наиболее оптимального соотношения макроцикл:металлоПАВ смешанная

система с постоянной концентрацией K[4]P и переменной концентрацией металлоПАВ была исследована с помощью турбидиметрии. При добавлении LaS абсорбция при 500 нм сначала возрастает с увеличением концентрации металлоПАВ, а затем после достижения максимума уменьшается в смеси с СВКР и остается постоянной в смеси с СКР (рис. 3.31а). Максимум на зависимости, соответствующий образованию комплексов, наблюдается при соотношении СВКР:LaS=2:3 и СКР:LaS=1:2. Интересно, что в случае СКР абсорбция после перегиба не уменьшается, а остается постоянной. Вероятно, агрегаты, образующиеся при соотношении СКР:LaS=1:2, сохраняются в размере при увеличении соотношения компонентов. Образование крупных агрегатов в смешанных растворах подтверждается также наличием эффекта Тиндалля (рис. 3.31б), который не наблюдается для растворов индивидуальных компонентов.

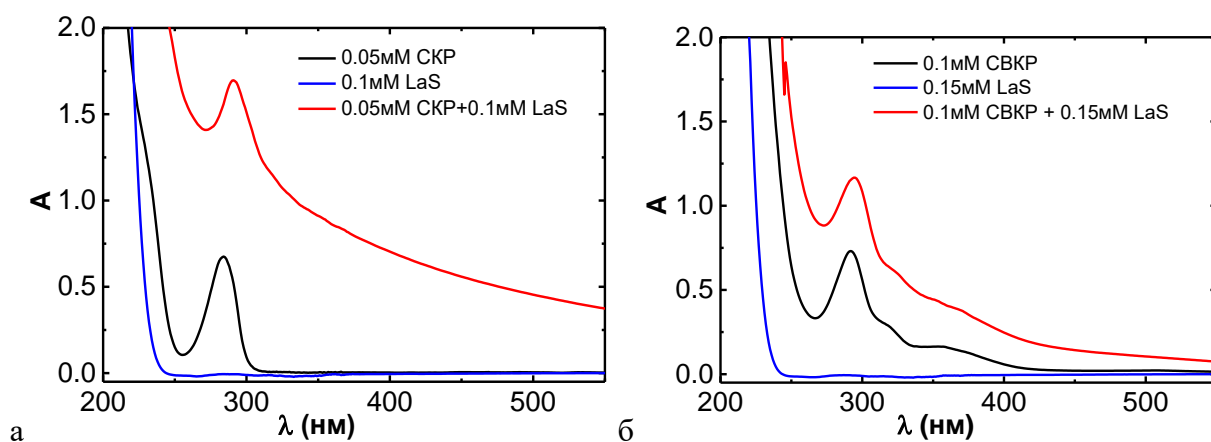


Рисунок 3.30. УФ спектры LaS, индивидуальных макроциклов и смешанных композиций, 25 °С, оптический путь 10 мм.

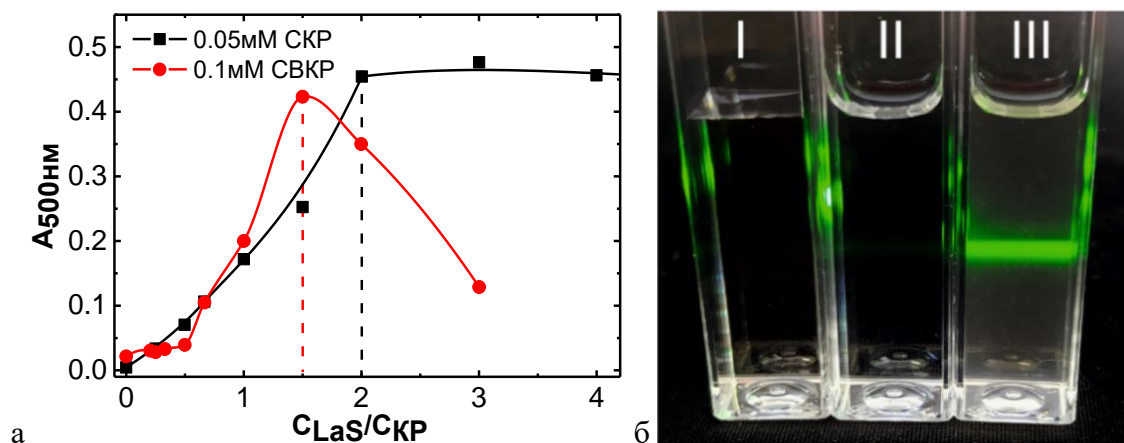


Рисунок 3.31. (а) Зависимость оптической плотности при 500 нм от соотношения компонентов в системе при фиксированной концентрации макроциклов, оптический путь 10 мм, 25 °С; (б) Эффект Тиндалля в растворах индивидуальных компонентов (I – СВКР, II – LaS) и в смешанной системе СВКР:LaS=2:3 (III).

При приготовлении смешанных композиций наблюдается образование осадка при концентрации макроциклов выше 0.1 мМ для СКР и 0.5 мМ для СВКР. Стабилизация менее концентрированных растворов достигается с течением времени: после приготовления растворов

их УФ спектры претерпевают изменения в течение 6–48 часов, но образования осадка при этом не наблюдается. Например, в системе состава 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS снижение интенсивности поглощения в УФ спектрах наблюдается в течение 6 часов после приготовления (рис. 3.32а). Эти изменения, вероятно, связаны с динамическим процессом образования совместных агрегатов.

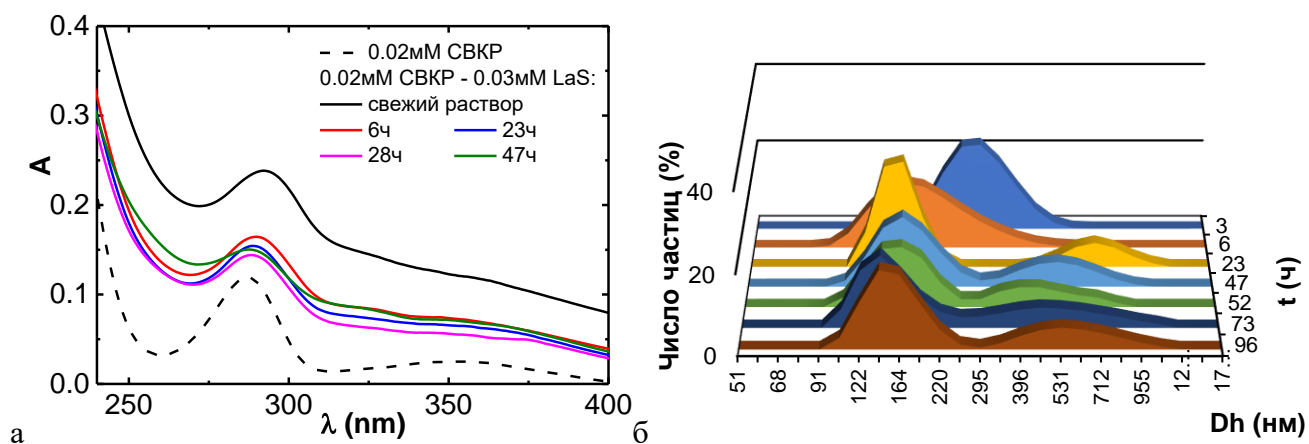


Рисунок 3.32. Изменение во времени УФ спектров (25 °С, оптический путь 10 мм) (а) и распределения агрегатов по размерам, усредненного по числу частиц, (б) в растворе 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS.

Метод ДРС не зафиксировал каких-либо агрегатов в водных растворах сульфатных макроциклов при исследуемых концентрациях. В то же время молекулы LaS в водном растворе с концентрацией ниже ККМ (0.33 мМ [176]) формируют в растворе крупные агрегаты размером 50 нм (рис. 3.33). Известно, что обычные ПАВ могут образовывать везикулы в растворах данном концентрационном диапазоне [175, 215]. ДРС подтверждает образование агрегатов в смешанных системах K[4]P–LaS. В растворе, содержащем 0.02 мМ СКР и 0.04 мМ LaS, формируются агрегаты размеров порядка 90–100 нм с относительно невысокой полидисперсностью. В то же время в системе на основе СВКР размеры частиц намного больше и достигают 300 нм (рис. 3.33). В течение 6 часов после приготовления наблюдается один тип частиц, а их диаметр уменьшается с 300 до 160 нм (рис. 3.32б). Через сутки в растворе наблюдается бимодальное распределение размеров с появлением крупных агрегатов, что, вероятно, указывает на слипание частиц. Изображения ПЭМ и АСМ, полученные для этих систем, показали наличие агрегатов с большим распределением по размерам от 60 до 160 нм (рис. 3.34), что соотносится с данными ДРС. Метод электрофоретического светорассеяния показал отрицательное значение дзета-потенциала макроциклов (–27.2 мВ для СВКР) и положительное значение комплекса металла (+31 мВ). Смешивание растворов K[4]P и LaS привело к практически полной нейтрализации зарядов: дзета-потенциал двойных систем составлял всего –7 мВ для СВКР–LaS, что объясняет низкую стабильность агрегатов. Таким образом, движущей силой образования совместных агрегатов является электростатическое взаимодействие между сульфогруппами макроциклов и катионными фрагментами металлоПАВ.

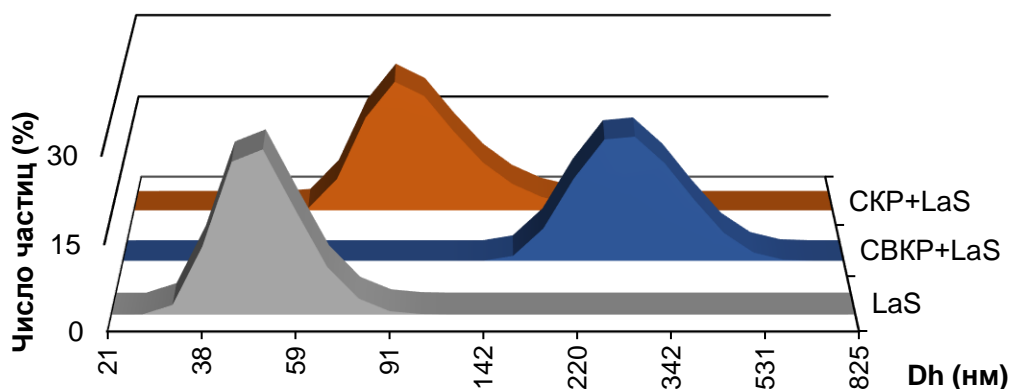


Рисунок 3.33. Распределение агрегатов по размерам, усредненное по числу частиц, в растворах индивидуального 0.03 мМ LaS и смешанных системах 0.02 мМ СКР–0.04 мМ LaS, 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS.

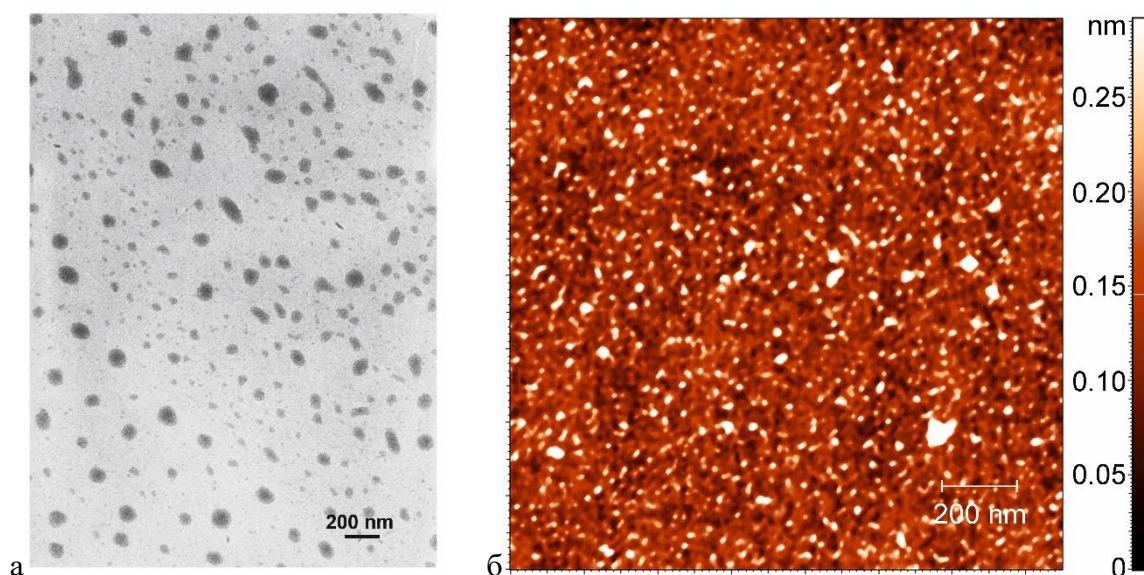


Рисунок 3.34. Изображения ПЭМ (а) и АСМ (б) для системы 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS.

3.3.2. Инкапсуляция гидрофильных субстратов в системах каликс[4]резорцин – металлоПАВ

Поскольку в системах К[4]Р–металлоПАВ образуются крупные агрегаты, предположительно везикулярного строения, была исследована их способность к инкапсуляции гидрофильных субстратов. На первом этапе была исследована инкапсулирующая способность систем по отношению к гидрофильной метке RhB. Исследовались системы состава СКР:LaS=1:2 и СВКР:LaS=2:3. Как видно из рисунке 3.35а, концентрация компонентов не сильно влияет на ЭИ RhB в агрегатах СВКР:LaS=2:3 (ЭИ = $38 \pm 4\%$), а при высоких концентрациях (более 0.2 мМ) образуется осадок. Для систем СКР:LaS=1:2 (рис. 3.35б) уже при концентрации макроцикла 0.05 мМ после добавления третьего компонента выпадает осадок, а при меньшей концентрации наночастицами связывается до 5.4 мкМ RhB (ЭИ = $54 \pm 3\%$). Сравнение ЭИ систем К[4]Р–LaS при

одинаковых концентрациях макроцикла (0.02 мМ) показало, что агрегаты СКР–LaS связывают в полтора раза больше гидрофильного субстрата, чем агрегаты СВКР–LaS. После инкапсуляции RhB размеры агрегатов в исследуемых системах немного увеличиваются с 300 и 100 нм до 340 и 120 нм для систем на основе СВКР и СКР, соответственно (рис. 3.36).

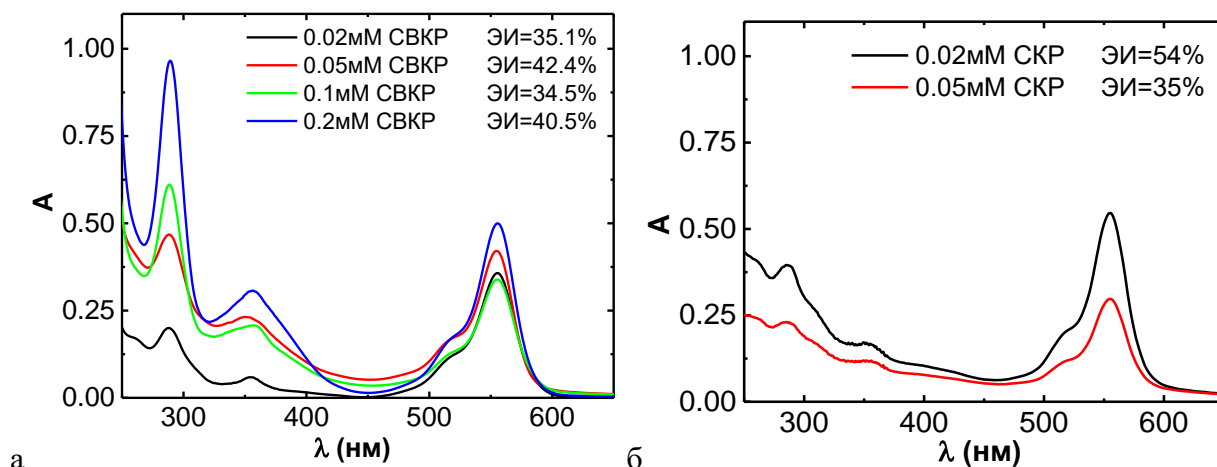


Рисунок 3.35. УФ спектры композиций СВКР:LaS=2:3 (а) и СКР:LaS=1:2 (б) с инкапсулированным в них RhB, 25 °С, оптический путь 10 мм. С(СВКР)=0.02–0.2 мМ, С(СКР)=0.02–0.05 мМ.

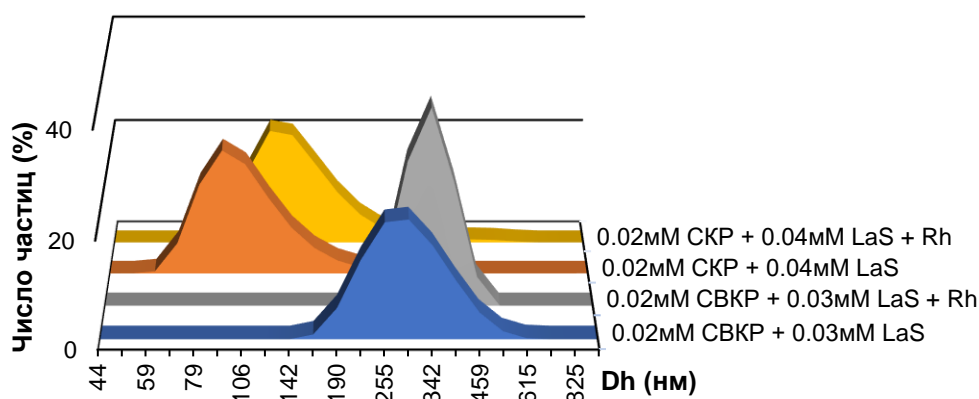


Рисунок 3.36. Распределение агрегатов по размерам, усредненное по числу частиц, в растворах 0.02 мМ СКР–0.04 мМ LaS, 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS до и после связывания RhB, 25 °С.

Дальнейшие исследования по инкапсуляции противораковых препаратов DOX и cisPt проводились для композиций, содержащих по 0.02 мМ макроциклов, поскольку более концентрированные системы показывают неудовлетворительную стабильность. ЭИ DOX у исследуемых систем оказалась выше, чем для RhB. Согласно полученным данным, использование композиций 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS и 0.02 мМ СКР–0.04 мМ LaS позволяет связать 8 мкМ (ЭИ = 40%) и 18 мкМ (ЭИ = 90%) лекарственного препарата соответственно.

Далее была исследована возможность инкапсуляции другого противоопухолевого препарата цисплатина (cisPt), который представляет собой комплексный хлорид-аммиакат двухвалентной платины, цис-[Pt(NH₃)₂Cl₂]. На рисунке 3.37а показано изменение интенсивности

характеристической полосы поглощения смешанных композиций СКР:LaS=1:2 и СВКР:LaS=2:3 от концентрации cisPt. При добавлении лекарственного средства сначала наблюдается уменьшение абсорбции с перегибом при соотношении К[4]Р:cisPt = 1:1, что, вероятно, связано с инкапсуляцией cisPt макроциклом, сопровождающейся с формированием тройного комплекса. Скорее всего, молекулы cisPt способны участвовать в совместной агрегации с супраамфилами К[4]Р–LaS, которая приводит к укрупнению агрегатов (рис. 3.38). Более того, агрегаты, нагруженные cisPt, имеют более темный цвет на изображении ПЭМ (рис. 3.37б), что характерно для агрегатов, содержащих неорганические вещества [216, 217]. Это наблюдение подтверждает связывание cisPt агрегатами К[4]Р–LaS. Метод электрофоретического светорассеяния показал, что связывание cisPt практически не изменяет ζ -потенциал (–6 мВ) агрегатов, то есть cisPt не участвует в электростатических взаимодействиях с макроциклом или металлоПАВ, что позволяет предположить о формирование водородных связей между cisPt и комплексов К[4]Р–LaS.

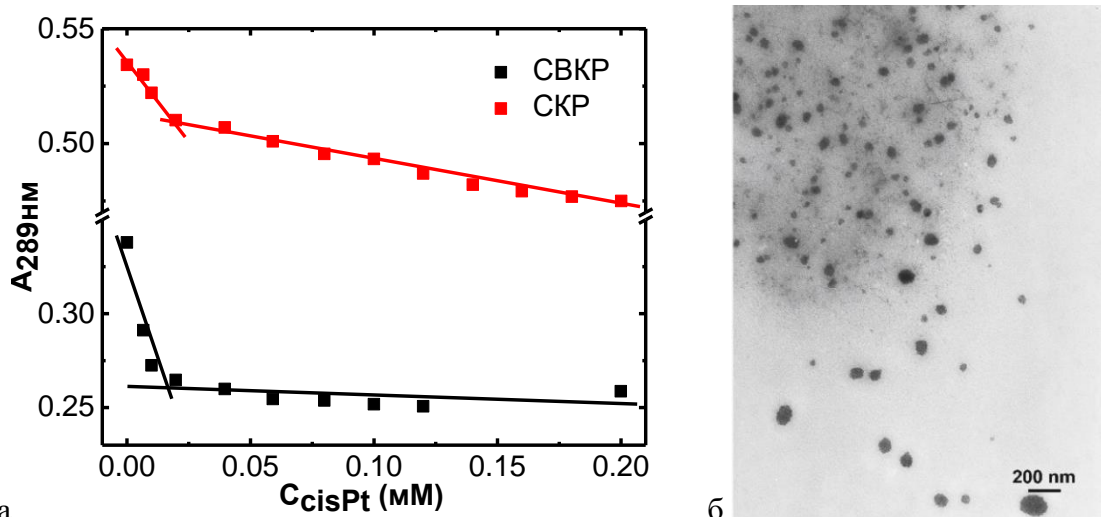


Рисунок 3.37. (а) Изменение абсорбции при 289 нм от концентрации cisPt в системах 0.02 мМ СКР–0.04 мМ LaS и 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS, 25 °С, оптический путь 10 мм; (б) изображение ПЭМ для системы 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS–0.01 мМ cisPt.

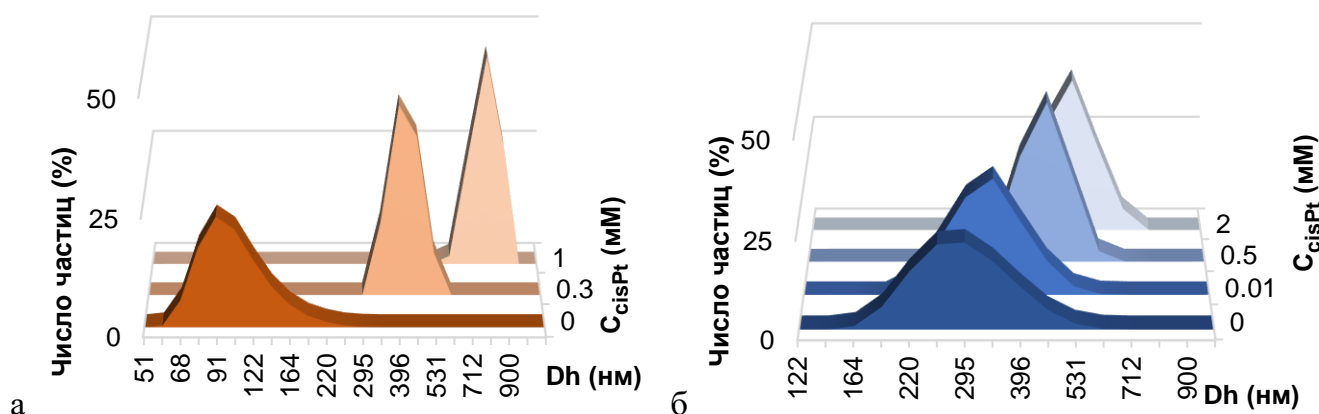


Рисунок 3.38. Распределение агрегатов по размерам, усредненное по числу частиц, в растворах 0.02 мМ СКР–0.04 мМ LaS (а) и 0.02 мМ СВКР–0.03 мМ LaS (б) в присутствии различного количества cisPt, 25 °С.

Для более точного определения влияния cisPt была задействована спектроскопия ^1H ЯМР. Поскольку из-за низкой стабильности двойных систем при концентрациях, необходимых для получения ЯМР спектров, было исследовано взаимодействие cisPt с отдельными растворами макроцикла и металлоПАВ (приложение А, рис. А1, А2). Добавление cisPt к индивидуальному раствору LaS не вызывает каких-либо изменений химических сдвигов (приложение А, рис. А2). При сравнении спектров макроцикла в отсутствие и присутствии cisPt (приложение А, рис. А1) наибольший химический сдвиг наблюдается для метиленовых протонов около гидроксильных групп на нижнем ободе. Принимая во внимание, что сульфогруппы на верхнем ободе макроцикла участвуют в электростатическом взаимодействии с металлоПАВ, можно предположить, что cisPt располагается около свободного противоположного обода макроцикла, содержащего гидроксипропильные группы. Таким образом, подобные изменения в УФ и ЯМР спектрах, вероятно, указывают на то, что лекарство интегрируется в существующие агрегаты и не конкурирует за сайты связывания с металлоПАВ. Движущей силой загрузки cisPt могут являться водородные связи между аммиачными группами препарата и гидроксильными группами макроцикла.

3.3.3. Биологическая активность систем каликс[4]резорцин–металлоПАВ и их влияние на противоопухолевую активность лекарственных препаратов

Цитотоксическая активность свободных лекарственных препаратов и связанных агрегатами на основе К[4]Р–металлоПАВ была исследована в отношении клеточных линий печени Chang liver и M-HeLa. Значение IC_{50} для всех исследуемых систем рассчитывали как по LaS, так и по лекарственному препарату. Было определено, что индивидуальный LaS проявляет высокую токсичность как для опухолевых, так и для нормальных клеток (табл. 3.13). Известно, что катионные ПАВ демонстрируют высокую биологическую активность в даже диапазоне концентраций до ККМ, что объясняется катионным зарядом и высокой гидрофобностью [176]. Комплексообразование амфифила с макроциклом снижает эту биологическую активность примерно на 1 порядок по сравнению с чистым LaS, но улучшает селективность воздействия на линию опухолевых клеток.

Таблица 3.13. Цитотоксическая активность

Система	IC_{50} (LaS) / IC_{50} (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

Далее было исследовано влияние инкапсуляции в агрегаты на противоопухолевую активность лекарственных препаратов. Инкапсуляция DOX в агрегаты K[4]P–LaS усиливает его токсичность как к опухолевым, так и к нормальным клеткам (табл. 3.13). Интересно, что активность cisPt, инкапсулированного в агрегаты, отличается для двух макроциклов. Связывание cisPt в системе СКР–LaS приводит к повышению его токсичности к нормальным клеткам. В то же время, инкапсуляция cisPt в агрегаты системы СВКР–LaS значительно увеличивает активность препарата против опухолевых клеток, не влияя на токсичность к нормальным клеткам. Такая разница в цитотоксическом действии говорит о аффинности тройного комплекса СВКР–LaS–cisPt к раковой клеточной линии.

Таким образом, нековалентное взаимодействие сульфонатных K[4]P с металлоПАВ на основе лантана приводит к спонтанному образованию супрамолекулярных агрегатов. В смешанной системе агрегаты образуются при низких концентрациях компонентов. Данные композиции способны инкапсулировать гидрофильные субстраты, а именно противораковые препараты DOX и cisPt. Композиции с cisPt проявляют более высокую цитотоксическую активность по отношению к больным клеткам по сравнению со свободным лекарством. Следовательно, включение cisPt в агрегаты СВКР–LaS может быть важным шагом в создании активных химиотерапевтических агентов без усиления их токсических побочных эффектов.

3.4. Супрамолекулярные системы на основе виологеновых каликс[4]резорцинов

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 [218]. Как было сказано ранее, в качестве нацеливающих фрагментов в составе наноконтейнеров могут использоваться виологеновые группы. Однако ПАВ, содержащие такие фрагменты, очень токсичны, и нековалентные взаимодействия с макроциклами не могут исправить эту ситуацию. Поэтому нами были исследованы макроциклы с ковалентно пришитыми виологеновыми группами. В качестве макроциклического компонента мы использовали кавитанд на основе K[4]P, функционализированный по нижнему ободу алкильными группами различной длины и виологеновыми фрагментами по верхнему ободу, (BP, рис. 3.39). Ранее Зиганшиной А. и соавторами были описаны агрегационные свойства BP с *n*-пентильными (BP-C5) и *n*-децильными (BP-C10) алкильными фрагментами [105]. Кавитанды с *n*-гексильными, *n*-октильными и *n*-додецильными алкильными группами ранее не исследовались.

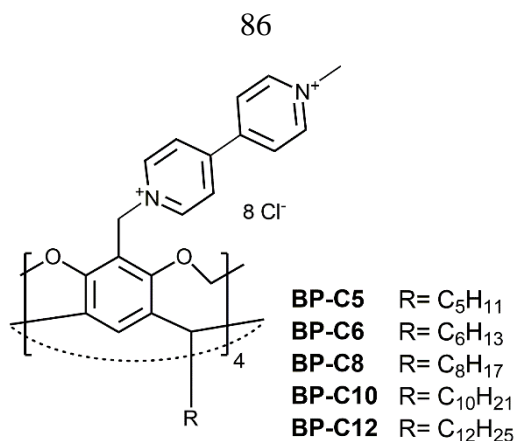


Рисунок 3.39. Структура исследуемых ВР.

3.4.1. Агрегационные свойства виологеновых каликс[4]резорцинов

В первую очередь были определены агрегационные параметры синтезированных макроциклов и определена зависимость агрегационных характеристик от длины алкильных фрагментов. Метод тензиометрии не использовался для определения значений ККА, поскольку поверхностное натяжение в растворах макроциклов с ростом концентрации изменялся незначительно и на изотерме поверхностного натяжения отсутствовали перегибы. В 10 мМ растворах ВР поверхностное натяжение составляет 62.2 мН/м для ВР-С6, 66.7 мН/м для ВР-С8, 70 мН/м для ВР-С10 и 73.1 мН/м для ВР-С12. Перегибы на кондуктометрических зависимостях, соответствующие ККА, наблюдаются при концентрациях макроциклов 2.4 мМ для ВР-С6, 1.1 мМ для ВР-С8 и 0.14 мМ для ВР-С12 (рис. 3.40а,б). Полученные зависимости абсорбции судана I от логарифмических концентраций макроциклов имеют отчетливые перегибы при концентрациях 2.8 мМ для ВР-С6, 1.53 мМ для ВР-С8 и 0.22 мМ для ВР-С12 (рис. 3.40в), что хорошо соотносится с кондуктометрическими значениями ККА. В концентрационной диапозоне выше ККА абсорбция судана I в водных растворах макроциклов изменяется прямо пропорционально их концентрации, что указывает на расположение гидрофобного субстрата в гидрофобных доменах агрегатов ВР. Величины S агрегатов ВР по отношению к красителю были определены по тангенсу угла наклона изотермы солюбилизации в агрегационной области после ККА. Характер зависимости S (табл. 3.14) от роста длины алкильных фрагментов на нижнем ободке ВР обуславливается механизмом прямой солюбилизации судана I в гидрофобные домены агрегатов ВР.

Водные растворы ВР обладают кислым рН, снижающимся с ростом концентрации макроциклов (рис. 3.40г). Вероятно, в водной среде ВР происходит достаточно сильная поляризация молекул воды виологеновыми фрагментами вплоть до их ионизации в сольватных оболочках макроциклов. В результате взаимодействия диполей воды с высоким положительным зарядом ВР образуются гидроксид-ионы и сопряженные ионы гидроксония. В силу своего меньшего размера по сравнению с хлорид-противоионами, гидроксид-ионы могут связываться с виологеновыми группами, в то время как остаточные свободные протоны вызывают подкисление водной среды ВР.

Интересно отметить, что для короткоцепочечных ВР-С5 и ВР-С6 наблюдается большее снижение рН с увеличением их концентрации в воде. Менее значительное изменение рН среды, наблюдаемое для длинноцепочечных ВР-С8, ВР-С10 и ВР-С12, вероятно, связано с формированием агрегатов иной формы, позволяющей в меньшей степени ионизировать молекулы воды.

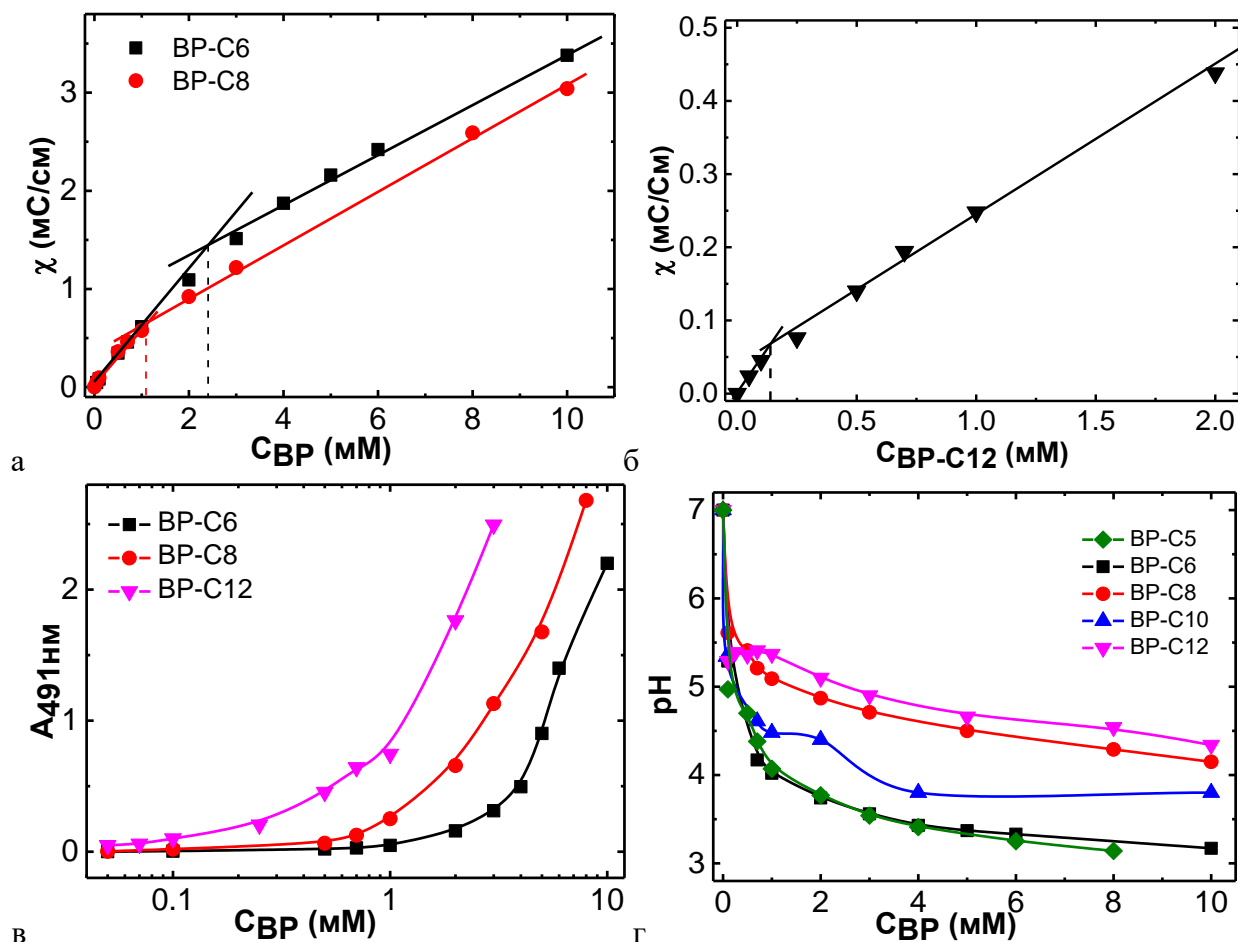


Рисунок 3.40. Концентрационные зависимости удельной электропроводности (а,б), солюбилизации судана I (оптический путь 1 мм) (в) и рН (г) для ВР, 25 °С, $C(\text{BP})=0.05\text{--}20$ мМ.

Таблица 3.14. Значения ККА, полученные методами кондуктометрии и солюбилизации гидрофобного зонда, солюбилизационной емкости S , определенной методом солюбилизации судан I, степени связывания противоионов (β) и свободной энергии мицеллообразования (ΔG_m) для ВР.

Соединение	ККА, мМ		S , моль судан I / моль ВР	β	ΔG_m , кДж/моль
	Кондуктометрия	Солюбилизация гидрофобного зонда			
ВР-С5	5.0 [105]	3.0 (Оранж ОТ) [105]	-	0.5098	-21.54
ВР-С6	2.4	2.8 (Судан I)	0.32	0.5363	-23.95
ВР-С8	1.1	1.3 (Судан I)	0.39	0.5927	-28.68
ВР-С10	0.25 [105]	0.3 (Оранж ОТ) [105]	-	0.5953	-32.86
ВР-С12	0.14	0.22 (Судан I)	0.96	0.5993	-34.95

Процессы агрегации для всех исследуемых амфифилов являются самопроизвольными и термодинамически выгодными, о чем говорят отрицательные значения свободной энергии мицеллообразования (ΔG_m). Этот процесс с увеличением длины радикала становится более

энергетически выгодным, что объясняется увеличением вклада гидрофобного эффекта (табл. 3.14). В таблице 3.14 также представлены значения степени связывания противоионов (β). Более высокие значения степени связывания возникают из-за более плотной упаковки «головных» групп и более высокой поверхностной плотности заряда на границе раздела агрегат–раствор [219]. Наблюдаемое увеличение плотности поверхностного заряда в ряду ВР-С5 – ВР-С6 – ВР-С8 указывает на формирование более компактных агрегатов с ростом длины алкильных фрагментов. Для ВР-С8, ВР-С10 и ВР-С12 значение β практически не зависит от длины алкильной цепи. Это говорит о том, что гидратация виологеновых групп длинноцепочечных макроциклов не изменяется с длиной цепей на нижнем ободке, а агрегаты на их основе имеют одинаковую поверхностную плотность заряда, и как следствие, сходную геометрию.

Полученные нами значения ККА коррелируют со значениями для ВР-С5 и ВР-С10, полученных в работе [105] (табл. 3.14). Наблюдаемое нами уменьшение значений ККА с увеличением длины гидрофобных фрагментов (табл. 3.14) аналогично агрегационному поведению нециклических амфифильных соединений и объясняется увеличением гидрофобности. Более того, значения ККА ВР в среднем снижаются в два раза при увеличении длины каждого из четырёх гидрофобных радикала 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 [220]. На рисунке 3.41 представлена зависимость десятичного логарифма $4KKA$ (поскольку каждая молекула макроцикла имеет четыре алкильных группы) от длины углеводородных фрагментов (n) в структуре ВР. Зависимость имеет линейный вид, что указывает на хорошую корреляцию между структурным и агрегационным фактором, и описывается уравнением вида $\log(4KKA) = A + B \cdot n$ (рис. 3.41а). Для исследуемых макроциклов, как и для традиционных ПАВ, наблюдается отрицательный наклон кривой (-0.229), указывающий на положительный вклад гидрофобных взаимодействий в процесс мицеллообразования. Значение свободного коэффициента A обычно положительно для катионных ПАВ [221–224], что показывает неблагоприятное влияние на процесс мицеллообразования переноса гидрофильной группы из водной массы в мицеллярную фазу. В нашем случае значение коэффициента A отрицательно (-0.568), поскольку он включает не только отрицательное влияние ионных групп, но и положительный вклад ароматических колец и метиленовых мостиков, которые должны способствовать образованию агрегатов из-за кооперативных супрамолекулярных (гидрофобных, СН- π и π - π -стэкинг) взаимодействий [38]. Полученные отрицательный наклон и точка пересечения с осью ординат аналогичны результатам, полученных в работах с катионными [225] и анионными [38] К[4]А.

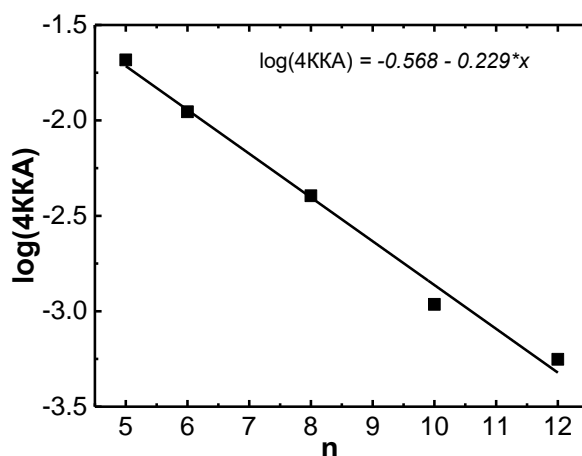


Рисунок 3.41. Зависимость десятичного логарифма 4ККА от количества атомов углерода (n) в составе одного алкильного фрагмента на нижнем ободе ВР.

Для определения морфологии агрегатов, формируемых виологеновыми макроциклами, был привлечен метод ПЭМ (рис. 3.42). Изображения ПЭМ были получены для 0.05мМ водных растворов ВР. Выбор данного количества, соответствующего концентрационному диапазону до ККА, связан с предотвращением неблагоприятной агломерацией агрегатов во время пробоподготовки. Как видно из рис. 3.42, достаточно интересная тенденция изменения морфологии агрегатов, сформированных из виологеновых макроциклов, наблюдается при изменении длины алкильных групп на нижнем ободе. Для ВР-С5 и ВР-С6 наблюдаются крупные полидисперсные агрегаты. Как было отмечено в [105], молекулы ВР-С5 формируют агрегаты по типу «голова к хвосту» за счет гидрофобного эффекта между алкильными цепями одной молекулы макроцикла и ароматической полостью другой молекулы макроцикла за счет СН-π-взаимодействий. Увеличение длины алкильных фрагментов на нижнем ободе приводит к образованию сферических агрегатов меньшего размера по типу «хвост к хвосту».

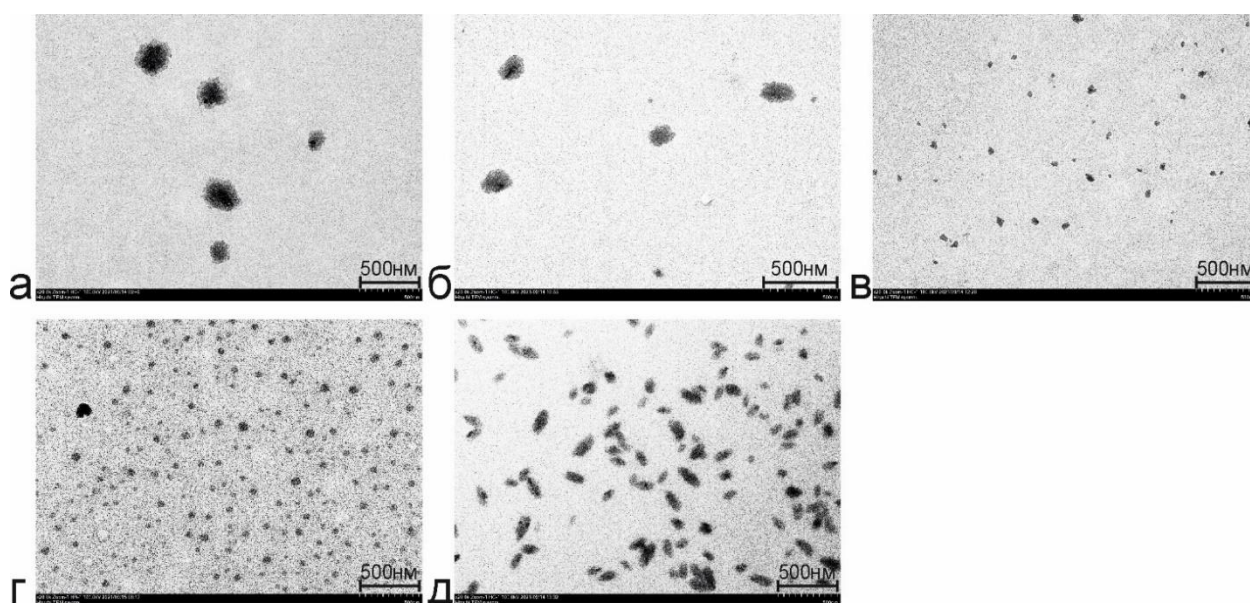


Рисунок 3.42. Изображение ПЭМ для (а) ВР-С5, (б) ВР-С6; (в) ВР-С8; (г) ВР-С10; (д) ВР-С12.

Выявленные закономерности формирования агрегатов виологеновых макроциклов в зависимости от длины алкильных групп на нижнем ободе подтверждено методом ДРС (рис. 3.43): увеличение длины алкильных цепей на нижнем ободе приводит к снижению размера агрегатов, формируемых виологеновыми макроциклами. Раствор ВР-С5 демонстрирует одномодальное распределение частиц (и по их числу, и по интенсивности) со средним диаметром частиц 220 нм, что хорошо согласуется с изображением ПЭМ. Увеличение длины алкильных хвостов на нижнем ободе макроциклов приводит к появлению мультимодальных систем, а величина первой моды уменьшается до 1.3 нм с увеличением гидрофобности нижнего обода. Существенное различие значений размеров агрегатов, определенных с помощью методов ДРС и ПЭМ, можно объяснить не только различной спецификой этих методов, но и возможно различной исследуемой концентрации. Тем не менее, оба метода подтвердили то, что виологеновые макроциклы в зависимости от длины алкильных групп на нижнем ободе образуют агрегаты различной морфологии в водной среде, и их размеры снижаются с увеличением гидрофобности на нижнем ободе.

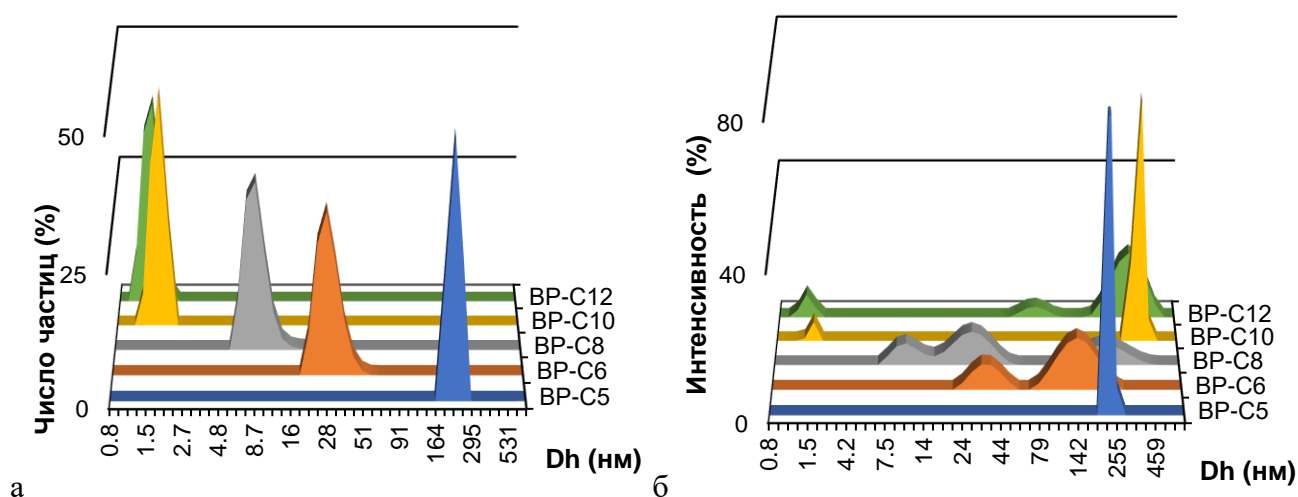


Рисунок 3.43. Распределения размеров агрегатов, усредненные по числу частиц (а) и по интенсивности (б), в водных растворах 10 мМ ВР, 25 °С.

Усиление гидрофобного эффекта в водной среде под действием нижнего обода виологеновых макроциклов отражается на их ^1H ЯМР спектрах. При сравнении химических сдвигов протонов четырех макроциклов с одинаковой концентрацией выше ККА (10 мМ), увеличение длины алкильного фрагмента на нижнем ободе приводит к значительному сильнопольному сдвигу протонов ароматических колец H_8 , метиленовых фрагментов H_7 , H_{10} , алкильных цепей $H\text{-tail}$, и при этом наблюдается небольшой сдвиг протонов виологеновых фрагментов H_2 , H_3 , H_4 , H_5 в слабое поле (рис. 3.44). Причиной наблюдаемых изменений химических сдвигов, вероятно, является то, что гидрофобные взаимодействия длинноцепочечных алкильных групп сопровождаются стэкинг-взаимодействиями между

ароматическими кольцами соседних молекул. Различный вид и ширина сигналов *H-tail* могут указывать на различную геометрию формируемых агрегатов [226], что согласуется с данными ПЭМ и ДРС. Виологеновые фрагменты на верхнем ободе молекул ВР-С5 снижают гидрофобное взаимодействие н-пентильных фрагментов между собой, что приводит к их включению в ароматическую полость другой молекулы ВР-С5 за счет СН-π-взаимодействий по типу «голова к хвосту». Вероятно, при таком типе межмолекулярных взаимодействий короткоцепных виологеновых макроциклов морфология их агрегатов неоднородна вследствие низкой энергии СН-π-связи и сильного электростатического отталкивания виологеновых фрагментов друг от друга. Увеличение длины алкильных групп на нижнем ободе виологеновых макроциклов усиливает гидрофобный эффект, в результате чего дисперсионным силам между длинноцепочечными алкильными цепями легче преодолеть электростатическое отталкивание, что приводит к образованию небольших мицеллоподобных агрегатов по типу «хвост к хвосту». Поэтому с увеличением длины алкильного фрагмента наблюдается сильнополюсный сдвиг *Hδ*.

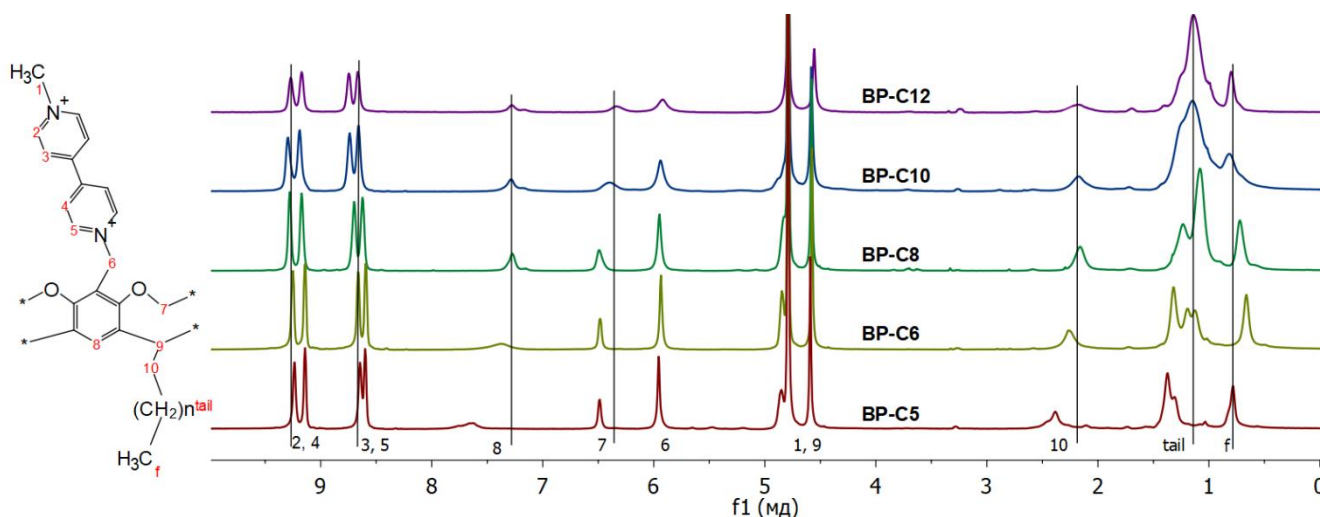


Рисунок 3.44. ^1H ЯМР спектры индивидуальных 10 мМ растворов ВР.

3.4.2. Функциональная активность виологеновых каликс[4]резорцинов

3.4.2.1. Солюбилизационная способность каликс[4]резорцинов

Убедившись в связывающей способности ВР по отношению к гидрофобному судану I, далее была исследована солюбилизирующая способность данных макроциклов по отношению к биологически активным веществам, а именно к флавоноидам рутину и кверцетину. Аналогично солюбилизационному поведению судана I, водная растворимость данных флавоноидов возрастала с увеличением доли макроциклов (рис. 3.45). Кроме того, солюбилизация рутина и кверцетина наблюдается в растворах макроциклов уже при концентрациях меньше ККА, что, вероятно, указывает на участие не только гидрофобного домена агрегатов макроциклов, сформированных из алкильных групп, но и верхнего обода макроциклов. Для более гидрофобного кверцетина обнаруживается корреляция между количеством солюбилизированного флавоноида и длиной алкильных цепей ВР, но в обоих случаях

наблюдаются нелинейные зависимости солубилизационной способности от длины алкильного фрагмента, что связано с различной морфологией агрегатов. Макроциклы ВР-С8, ВР-С10 и ВР-С12 в большей степени солубилизировали кверцетин, что указывает на мицеллярную морфологию агрегатов, благоприятную для солубилизации гидрофобного субстрата. Примерно одинаковая *S* данных длинноцепочечных ВР по отношению к рутину указывает на то, что в его растворении возможно участвует не только гидрофобное ядро агрегатов, сформированное из алкильных фрагментов макроциклов, но верхний обод. Известно, что рутин и кверцетин являются донорами электронов прежде всего благодаря пирокатехиновому фрагменту [227], который возможно формирует комплекс с переносом заряда с виологеновыми фрагментами макроциклов. Также надо учесть благоприятный вклад гидроксильных групп флавоноидов, которые, вероятно, участвуют в образовании водородных связей с мостиковыми атомами кислорода.

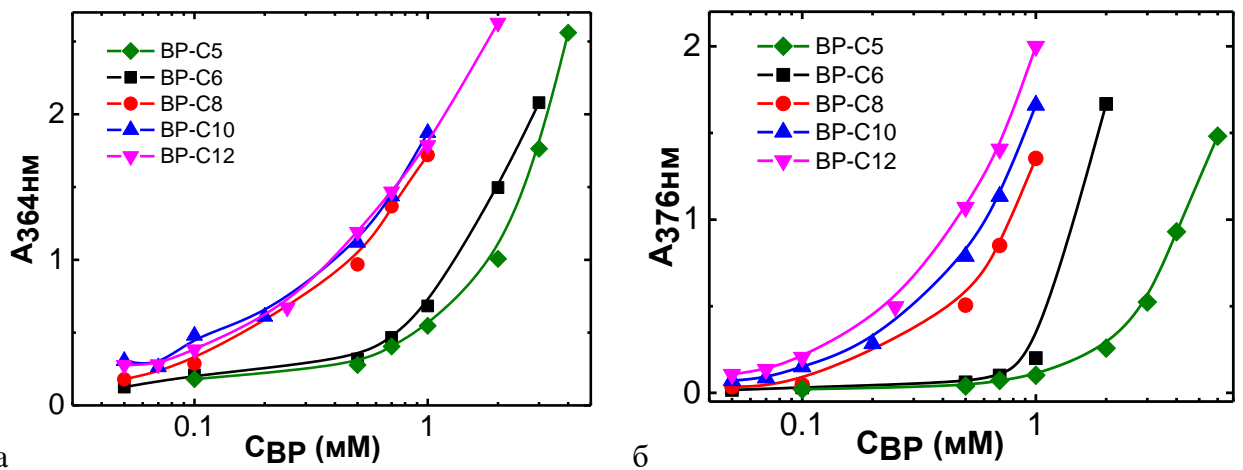


Рисунок 3.45. Зависимость оптической плотности полос поглощения рутина (а) при 364 нм и кверцетина (б) при 376 нм в водных растворах ВР от концентрации макроцикла, 25 °С, оптический путь 1 мм.

3.4.2.2. Инкапсулирующая способность каликс[4]резорцинов по отношению к доксорубину

Агрегаты, формируемые в 1 мМ растворах виологеновых макроциклов, также способны связывать DOX. Оценку ЭИ и ЕЗ данного химиопрепарата проводили в водных растворах ВР с одинаковой концентрацией (1 мМ). Выбор данной концентрации обусловлен тем, что, если исследовать все пять ВР в агрегационном состоянии, то есть при концентрации ВР выше 5 мМ, то они будут вызывать гемолиз эритроцитов. Кроме того, при определении цитотоксической активности проводится разбавление растворов питательной средой в два раза, что позволит первоначально определить цитотоксичность раствора с концентрацией 0.5 мМ, при которой не происходит гемолиз в растворе ВР-С12. Поэтому для сравнительного анализа инкапсулирующей способности по отношению к DOX для всех ВР была выбрана единая концентрация (1 мМ), и полученные значения ЭИ и ЕЗ оказались невысокими (табл. 3.15). Такая низкая

солюбилизационная способность ВР, вероятно, обусловлена формированием мицеллоподобных структур, в которых отсутствует полярное ядро, присутствующее в везикулярных агрегатах. Наибольшие значения инкапсуляции показывают агрегаты виологеновых кавитандов с н-гексильными и н-децильными группами на нижнем ободе.

Таблица 3.15. Концентрация, ЭИ и ЕЗ DOX в агрегатах, образуемых в растворах 1 мМ ВР.

Система	C(DOX), мМ	ЭИ, %	ЕЗ, %
ВР-С5	0.01	5.0	0.32
ВР-С6	0.024	12.1	0.74
ВР-С8	0.016	8.0	0.46
ВР-С10	0.031	15.5	0.85
ВР-С12	0.017	8.4	0.43

3.4.2.3. Биологическая активность и цитотоксичность каликс[4]резорцинов

Анализ результатов по оценке биологической активности исследуемых макроциклических соединений показал снижение биологической активности виологеновых макроциклов в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*. 209P и *Bacillus cereus* ATCC 8035 с увеличением длины алкильного фрагмента (табл. 3.16). Однако, бактерицидная активность ВР против *B. cereus* 8035 не претерпевает значительных изменений с изменением длины алкильных фрагментов, что указывает на ответственность виологеновых фрагментов ВР за антибактериальное действие. Стоит также отметить отсутствие противогрибковой активности у всех ВР в концентрационном диапазоне до 0.5 мМ.

Таблица 3.16. Антимикробная активность ВР.

Соединения	МИК, мкМ		
	<i>S. aureus</i> 209P	<i>B. cereus</i> 8035	<i>C.albicans</i> 855-653
Бактериостатическая и фунгистатическая активности			
ВР-С5	3.9±0.1	15.6±1.3	>500
ВР-С6	3.9±0.2	15.6±1.3	>500
ВР-С8	1.9±0.2	15.6±2.5	>500
ВР-С10	125	125	>500
ВР-С12	62.5±5.4	500±43	>500
Бактерицидная и фунгицидная активности			
ВР-С5	3.9±0.2	>500	>500
ВР-С6	3.9±0.1	500±43	>500
ВР-С8	62.5±5.7	>500	>500
ВР-С10	250	>500	>500
ВР-С12	>500	500±45	>500

Исследование гемолитической активности ряда ВР показало различные тенденции в её изменении в зависимости от длины алкильных групп (таблица 3.17). Степень гемолиза возрастает при переходе от ВР-С5 к ВР-С8, обладающему наибольшей гемолитической активностью, а затем снижается с увеличением длины алкильных фрагментов ВР, и ВР-С12 не вызывает гемолиз эритроцитов в концентрационном диапазоне до 0.5 мМ. Высокая гемолитическая активность ВР-С8 связана, по-видимому, со специфическим влиянием катионных виологеновых фрагментов и

алкильных цепей. Причем известно, что более гидрофобные амфифилы в большей степени вызывают повреждение эритроцитов [228]. Значительно сниженная гемолитическая активность ВР-С12 по сравнению с ВР-С8, вероятно, обусловлена с лабильностью длинноцепочечных алкильных цепей, которые могут сворачиваться в воде [229], в результате чего уменьшается длина гидрофобной части макроцикла. Таким образом, основным структурным фактором, влияющим на гемолитическую активность ВР, является природа алкильных радикалов при виологеновых макроциклических фрагментах.

Ковалентное связывание виологеновых фрагментов с макроциклическим каркасом позволяет значительно снизить цитотоксическую активность виологеновой составляющей. Цитотоксическая активность самого цитотоксичного в исследуемой ряду ВР-С5 по отношению к нормальным клеткам печени ($IC_{50}=110$ мкМ) на порядок ниже, чем для виологенового ПАВ В-16 (10 мкМ). Более того, В-16 является достаточно гемотоксичным, поскольку гемолиз его водного раствора с концентрацией 250 мкМ составляет 100%, что значительно превышает аналогичный показатель для ВР-С12, имеющего самые длинные алкильные цепи на нижнем ободе. Учитывая наличие четырех виологеновых и четырех алкильных групп в структуре виологеновых макроциклов в отличие от наличия таких же групп в структуре ПАВ в единственном числе, можно сказать об удивительном эффекте предорганизации функциональных групп на каликсареновой платформе, позволяющем благоприятно изменить биологические свойства. Более того, при сравнении цитотоксического действия ВР в отношении нормальных и раковых клеток можно сделать вывод, что молекулы ВР проявляют большую цитотоксичность к раковым клеткам. Отсутствие благоприятной селективной цитотоксичности у ВР-С5 указывает на значение амфифильности макроциклической платформы в создании биосовместимых композиций. Остальные ВР с более длинными алкильными цепями на нижнем ободе демонстрируют цитотоксичность к раковым клеткам при более низких концентрациях, чем в отношении нормальных клеток.

Таблица 3.17. Гемолитическая активность ВР и цитотоксическая активность ВР и DOX в присутствии ВР по отношению к клеточным линиям Chang liver и M-HeLa.

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

Далее была исследована цитотоксическая активность DOX, инкапсулированного в агрегаты ВР. Несмотря на невысокую инкапсуляцию препарата (не более 15.5%), DOX,

инкапсулированный в агрегаты длинноцепочечных ВР, проявляет усиленный противоопухолевый эффект с незначительным усилением цитотоксичности к нормальным клеткам. На основании полученных данных рассчитывали индекс селективности (SI) DOX, представляющий собой отношение полуингибирующих концентраций для нормальных и больных клеток, который характеризует избирательность действия системы. 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. 3.17).

Для подтверждения проникновения связанного DOX в раковые клетки была задействована флуоресцентная микроскопия с использованием М-HeLa, ядра которых были контрастированы с Hoechst 33342. Свободный DOX локализуется, как и ожидаемо, в ядрах раковых клеток (рис. 3.46). В случае использования инкапсулированных форм препарата границы ядер клеток были размыты, что говорит об их частичном повреждении. Интенсивность флуоресцентного окрашивания клеточных ядер снижается с увеличением длины алкильных групп на нижнем ободе ВР, и при этом ядра клеток не полностью разрушаются. В случае использования ВР-С10 молекулы DOX в большей степени распределяются по цитоплазме клеток нежели в ядре как в случае использования короткоцепочечных ВР. Интересно, что молекулы DOX, инкапсулированного агрегатами длинноцепочечного ВР-С12, в меньшей степени локализуются в цитоплазме, что указывает на абсорбцию комплексов ВР-С12 с DOX на отрицательно заряженной плазмалемме клеток М-HeLa, и при это наблюдается наибольший цитотоксический эффект в отношении раковых клеток.

Таким образом, для ряда синтезированных K[4]P с виологеновыми фрагментами на верхнем ободе обнаружено влияние структуры нижнего обода на их агрегационные, солюбилизационные и биологические свойства [230]. Проведенные исследования солюбилизационной активности амфифильных ВР подтверждают их способность капсулировать гидрофобные субстраты (в том числе, биологически активные рутин и кверцетин), что предопределяет потенциал формирования лекарственных наноконтейнеров на основе данных соединений. Низкая токсичность самих макроциклов (относительно виологенового ПАВ), способность к солюбилизации гидрофобных флавоноидов и инкапсуляции гидрофильного DOX, а также влияние на противоопухолевую активность инкапсулированного DOX позволяет рассматривать супрамолекулярные системы на их основе в качестве наноконтейнеров для практически важных веществ.

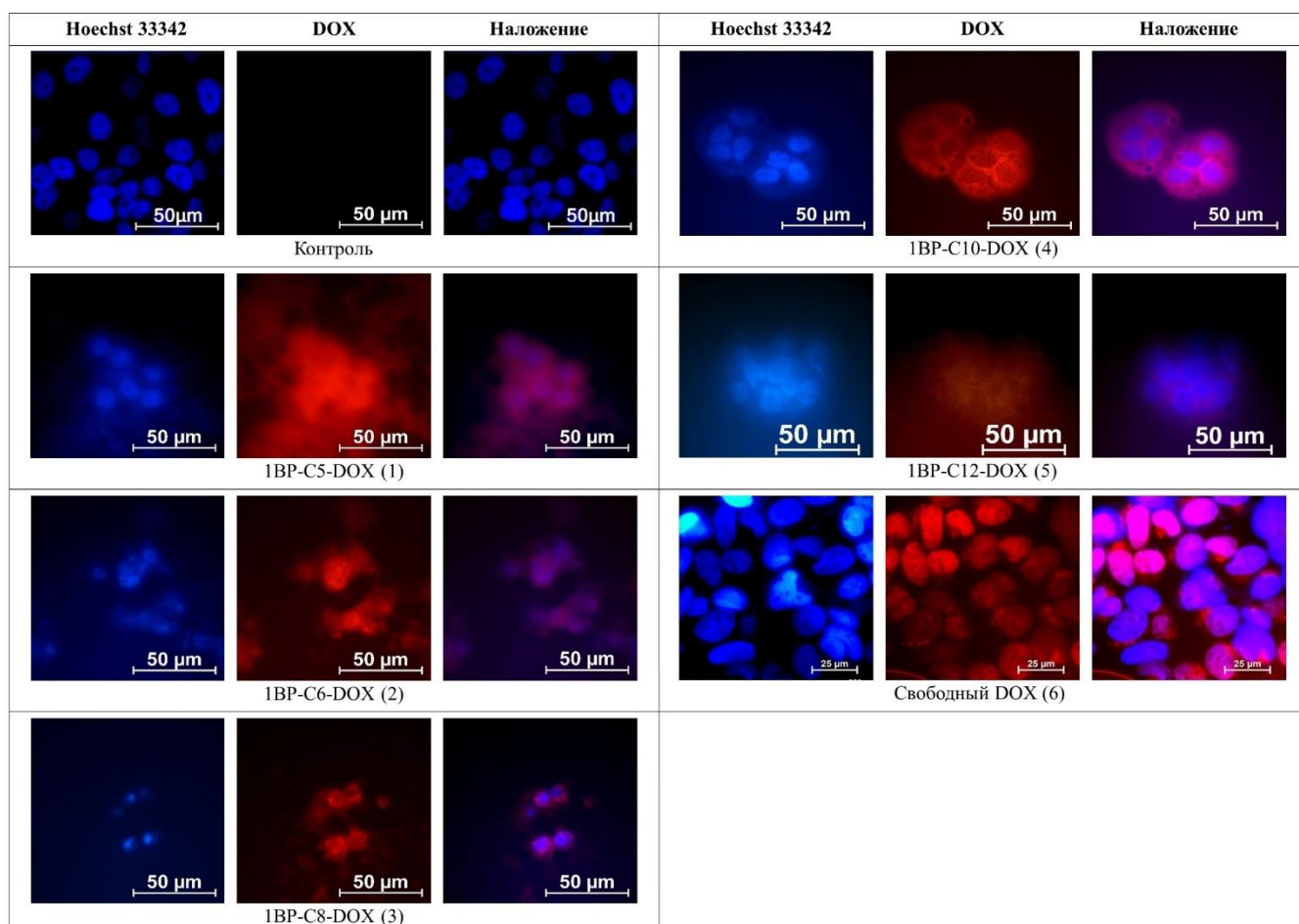


Рисунок 3.46. Изображения флуоресцентной микроскопии клеток М-HeLa: контрольных образцов и образцов после инкубации со свободным и инкапсулированным в агрегаты ВР DOX.

3.5. Супрамолекулярные системы на основе виологеновых каликс[4]резорцинов и ДСН

Вероятной причиной слабого проникновения в раковые клетки К[4]Р с виологеновыми фрагментами на верхнем ободке является мицеллярная структура агрегатов, которые не имеют сходство 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, в качестве ПАВ в создании супраамфилолов с ВР использовали классическое анионное ПАВ ДСН.

3.5.1. Агрегационные свойства смешанных композиций виологеновых каликс[4]резорцинов и ДСН

Были исследованы смешанные системы 1 мМ ВР с ДСН. Выбор данной концентрации основан на необходимости корреляции с результатами анализа смешанной системы 1 мМ ГКР-1 с виологеновым ПАВ. Важно отметить, что 1 мМ для ВР-С10 и ВР-С12 – это концентрация выше значений их ККА, равных 0.3 и 0.22 мМ, соответственно, для ВР-С8 – примерно соответствует ККА (1.1 мМ), а для ВР-С6 – ниже ККА (2.7 мМ). Диапазон исследуемых концентраций ПАВ (0.1–60 мМ) захватывает как истинный, так и коллоидный растворы ДСН. Как видно на рисунке

3.45, смешанные растворы демонстрируют явный эффект Тиндалля, указывающий на присутствие в растворе агрегатов. С увеличением концентрации ПАВ до соотношения ВР:ДСН=1:5 рассеивание луча света увеличивается, что говорит об увеличении доли агрегатов в растворе. Для всех макроциклов композиции с соотношениями компонентов, при которых происходит почти полная нейтрализация зарядов (ВР:ДСН=1:6, 1:8, 1:10), нестабильны, и в них наблюдается выпадение осадка (рис. 3.47). При добавлении к 1 мМ ВР 20–40-кратного избытка ДСН в первый момент в растворе наблюдается образование осадка, который достаточно быстро растворяется. Интересно, что с увеличением длины алкильных фрагментов макроцикла увеличивается время, при котором раствор ВР:ДСН=1:10 остается стабильным и снижается эффект Тиндалля в системах с 20–60 кратным избытком ДСН.

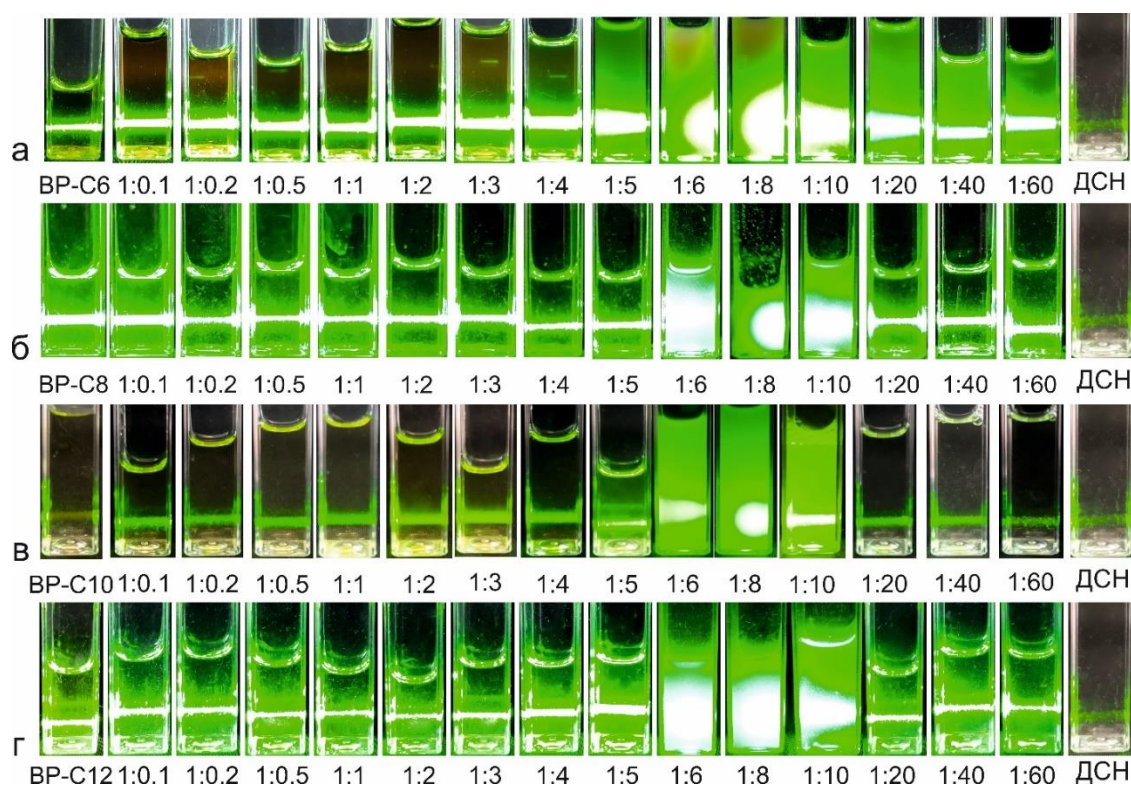


Рисунок 3.47. Эффект Тиндалля для растворов ВР–ДСН, $C(\text{ВР}) = 1 \text{ мМ}$, $C(\text{ДСН}) = 0.1\text{--}60 \text{ мМ}$:

(а) ВР-С6, (б) ВР-С8, (в) ВР-С10, (г) ВР-С12.

Влияние ВР на агрегационное поведение ДСН было изучено комплексом методов, включающим тензиометрию, кондуктометрию и солубилизацию гидрофобного красителя. На рисунке 3.48 видно, что поверхностное натяжение растворов, содержащих ВР-С6 и ВР-С8, ниже, чем для индивидуального ДСН. Изотермы поверхностного натяжения для смешанных систем со всеми виологеновыми макроциклами не имеют минимумов поверхностного натяжения, обусловленного присутствием *n*-додецилового спирта, который образуется в результате гидролиза индивидуального ДСН. Таким образом, взаимодействие виологеновых кавитандов с ДСН стабилизирует ПАВ, предотвращая его от гидролиза. При концентрациях ДСН (более 10 мМ) поверхностное натяжение смешанных растворов ВР–ПАВ и индивидуального ДСН

идентично, что говорит о присутствии на поверхности раздела фаз только молекул ПАВ, а все молекулы К[4]Р связаны в совместные агрегаты и находятся в объеме раствора.

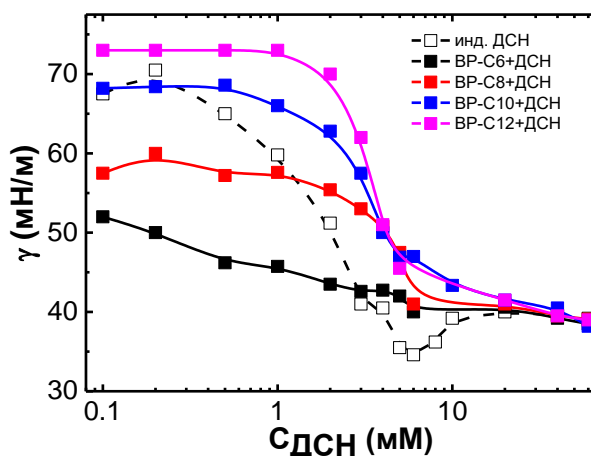


Рисунок 3.48. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов ВР–ДСН, $C(\text{ВР}) = 1 \text{ мМ}$, $C(\text{ДСН}) = 0.1\text{--}60 \text{ мМ}$, $25 \text{ }^\circ\text{С}$.

На кондуктометрических кривых для смешанных систем ВР–ДСН наблюдается 2 перегиба (рис. 3.49а,б). До соотношения ВР:ДСН=2:1 (для ВР-С12), 1:1 (для ВР-С10), 1:2 (для ВР-С8) и 1:3 (для ВР-С6) электропроводность не изменяется и сохраняется на уровне индивидуального макроцикла, что говорит о преимущественном электростатическом взаимодействии между макроциклом и ПАВ до достижения соответствующего стехиометрического соотношения. Последующее добавление ДСН приводит к быстрому увеличению проводимости, свидетельствующее об увеличении доли свободных мономеров ПАВ в растворе. Вероятно, часть этих молекул связывается в агрегаты ВР–ДСН, образуя смешанные агрегаты различного состава. Второй перегиб, после которого угол наклона кривой уменьшается, идентичен для всех ВР и наблюдается при 12 мМ ДСН, что выше значения ККМ индивидуального ДСН. При этой концентрации смешанные агрегаты, вероятно, «насыщены» молекулами ПАВ, и добавляемые в систему молекулы ДСН независимо ассоциируют с образованием индивидуальных мицелл ПАВ.

Для смешанных композиций со всеми ВР наблюдается скачок рН при соотношении ВР:ДСН=1:8. В отличие от систем с макроциклами с длинными алкильными цепями, где это изменение мало, в системе с 1 мМ ВР-С6 рН повышается более чем на единицу (с 4.3 до 5.5) (рис. 3.49в). Таким образом, эффективность взаимодействия ДСН с виологеновыми макроциклами определяется с агрегационной формой последних. Мономерная форма макроцикла сильнее взаимодействует с ДСН, что приводит к электростатической компенсации виологеновых фрагментов макроцикла сульфогруппами ПАВ, и после полной компенсации при восьмикратном избытке ДСН происходит повышение рН в результате увеличения доли противоионов натрия, инициирующих повышение рН среды.

Кривые сольubilизации гидрофобного зонда в агрегатах ВР–ДСН имеют профиль, отличный от кривой индивидуального ПАВ, а также отличаются между собой для разных макроциклов (рис. 3.49г). Для ВР-С10 и ВР-С12 с увеличением концентрации ДСН до 2 мМ (ВР:ДСН=1:2) значения S практически не изменяются. Для системы ВР-С8–ДСН, по сравнению с индивидуальным макроциклом, сольubilизация судана I немного увеличивается при добавлении ПАВ до соотношения ВР-С8:ДСН=1:3. Аналогично, индивидуальный 1 мМ ВР-С6 практически не связывает судан I, но с добавлением ПАВ (до соотношения ВР-С6:ДСН=1:3) S системы ВР-С6–ДСН значительно возрастает. При дальнейшем увеличении концентрации ДСН во всех системах наблюдается небольшое снижение сольubilизационной емкости. В системе начинают образовываться плохорастворимые комплексы ВР–ДСН, которые не сольubilизируют судан I. После 8-кратного избытка ПАВ количество связываемого субстрата вновь возрастает. Причем профиль сольubilизационных кривых близок к индивидуальному ДСН, что может свидетельствовать о насыщении смешанных агрегатов и образовании мицелл индивидуального ДСН.

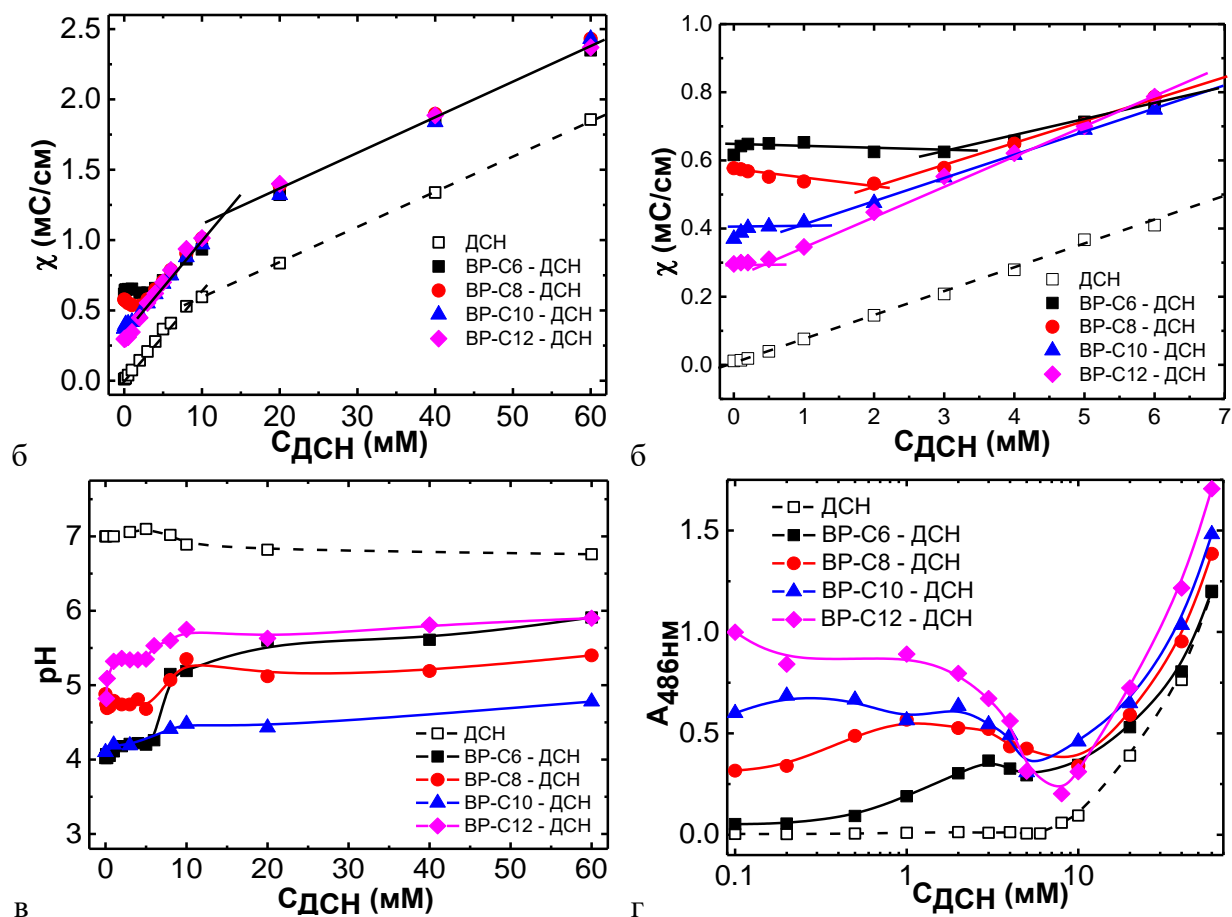


Рисунок 3.49. Зависимость удельной электропроводности (а,б), pH (в) и сольubilизации судана I (оптический путь 1 мм) (г) от концентрации ДСН в растворах ВР–ДСН, $C(\text{ВР}) = 1 \text{ мМ}$, $C(\text{ДСН}) = 0.1\text{--}60 \text{ мМ}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Поскольку нет возможности зафиксировать изменение оптической плотности в исследуемых растворах из-за слишком высокой оптической плотности растворов 1 мМ ВР в присутствии ДСН, было проведено турбидиметрическое титрование 0.01 мМ растворов макроциклов раствором ДСН (рис. 3.50). До соотношения ВР:ДСН=1:3 абсорбция при 500 нм остается неизменной. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ оптическая плотность начинает возрастать, достигая максимума при 9–10-кратном избытке ДСН, и потом резко снижается. Это также говорит о формировании слаборастворимых комплексов, повышающих мутность системы. Их количество достигает максимума при 10-кратном избытке ПАВ, а далее они постепенно растворяются, солюбилизируясь в мицеллах ПАВ.

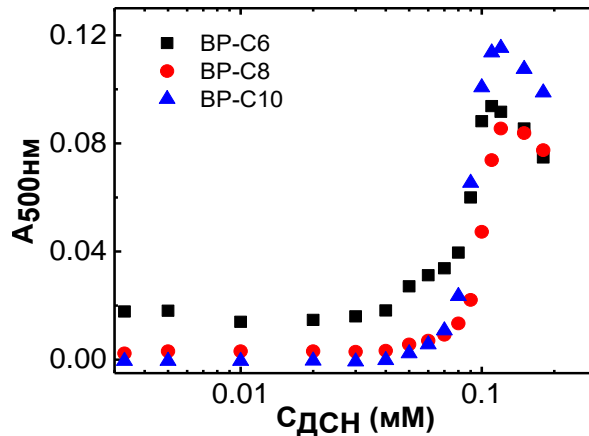


Рисунок 3.50. Зависимость оптической плотности при 500 нм в смешанных системах ВР–ДСН от концентрации ПАВ, $C(\text{ВР}) = 0.01$ мМ, 25 °С, оптический путь 1 мм.

Далее было исследовано агрегационное поведение смешанных систем с фиксированным соотношением компонентов ВР:ДСН=2:1, 1:1 и 1:3 при варьировании их общей концентрации. Поведение смешанных систем зависит от длины алкильных фрагментов макроциклов. Присутствие ПАВ благоприятно влияет на агрегационное поведение макроциклов с длиной алкильных цепей, состоящих из 5, 6 и 8 углеродных атомов (рис. 3.51). Значения ККА для смешанных систем на основе ВР-С10 и ВР-С12 в присутствии ДСН практически не изменяется. 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.

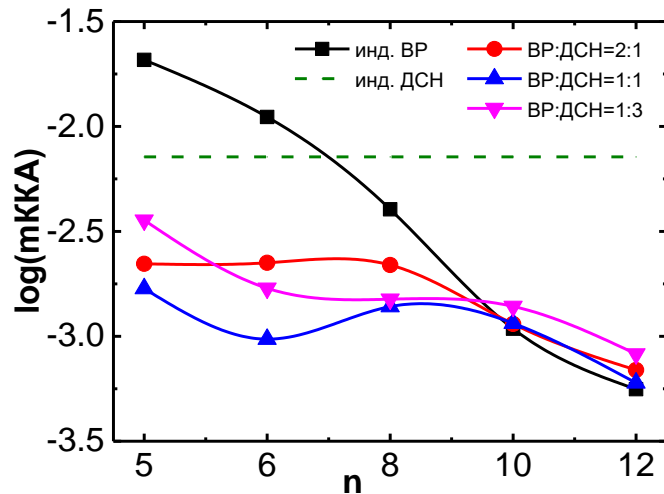


Рисунок 3.51. Зависимость десятичного логарифма ККА, выраженной в молях алкильных фрагментов (m – количество гидрофобных фрагментов в системе) от количества атомов углерода в составе одной алкильной цепи на нижнем ободе ВР для индивидуальных макроциклов и смешанных систем ВР–ДСН.

Как было сказано ранее, поверхностное натяжение в растворах индивидуальных виологеновых макроциклом с ростом концентрации ВР уменьшается незначительно, однако в присутствии ДСН значение γ снижается, причем изменение тем сильнее, чем короче алкильные фрагменты на нижнем ободе (рис. 3.52а). Для систем на основе ВР-С6 и ВР-С8 наблюдается значительное снижение поверхностного натяжения и выход на плато после 0.2 мМ. В то же время значения γ с ростом концентрации изменяются незначительно или не меняются совсем для ВР-С10 и ВР-С12, соответственно, что говорит о преобладающем влиянии макроциклов в этих смешанных системах. Интересно, что перегибы на кондуктометрических кривых (рис. 3.52б) и на кривых солюбилизации гидрофобного зонда (рис. 3.52в) для смешанных систем на основе ВР-С6 и ВР-С8 наблюдаются при меньших концентрациях, чем для индивидуальных макроциклов. Для ВР-С10 и ВР-С12 присутствие ДСН никак не влияет на солюбилизацию судана I. Также важно отметить, что хотя значения кондуктометрических ККА совпадают для индивидуальных и смешанных систем на основе ВР-С10 и ВР-С12 (табл. 3.14, 3.18, рис. 3.51), углы наклона кондуктометрических зависимостей отличаются, что далее влияет на рассчитываемые термодинамические параметры.

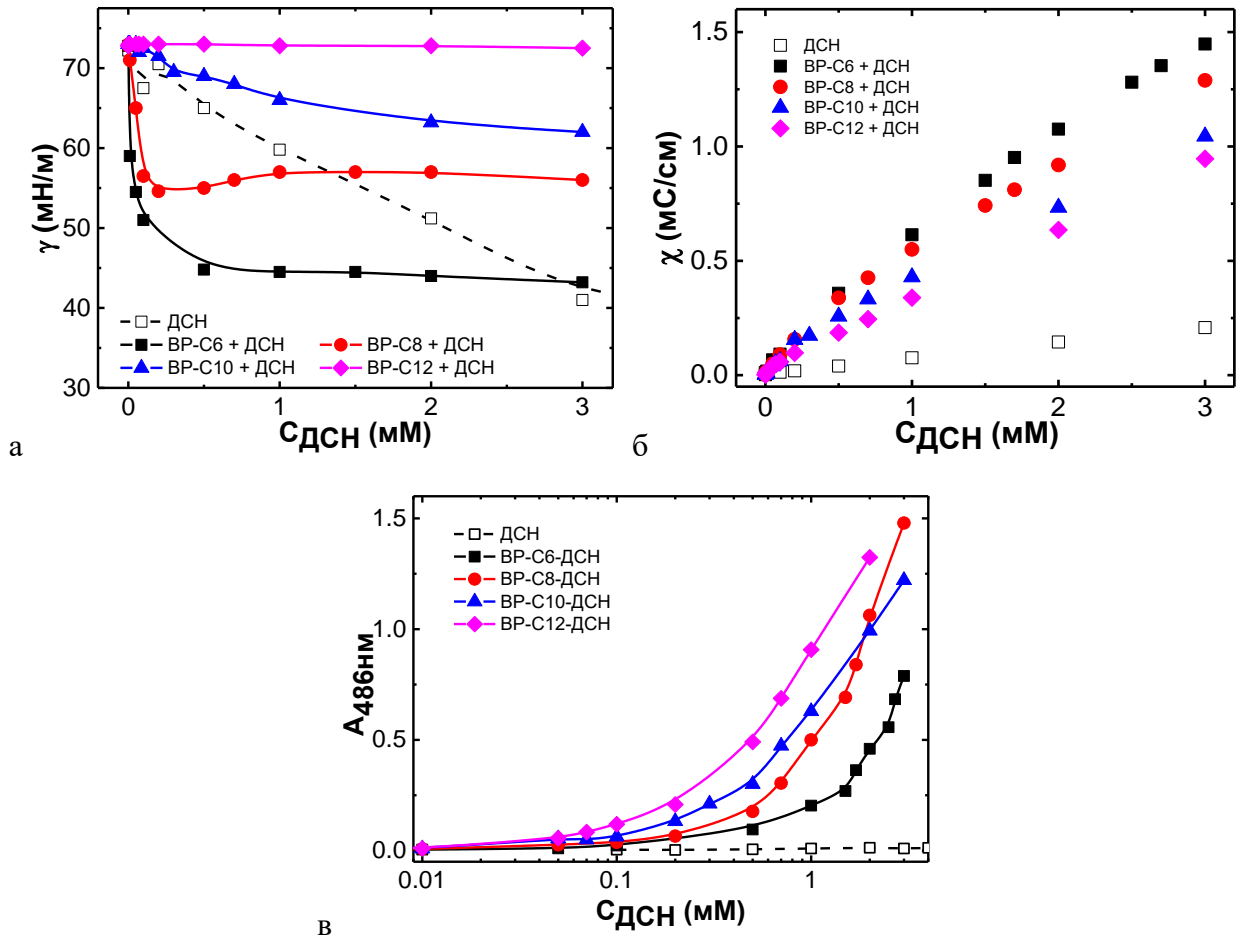


Рисунок 3.52. Зависимость удельной электропроводности (а, б), рН (в) и солюбилизации судана I (оптический путь 1 мм) (г) от концентрации ДСН в растворах ВР:ДСН=1:1, $C(\text{ДСН}) = 0\text{--}3$ мМ, 25 °С.

Таблица 3.18. Значения ККА, полученные методами кондуктометрии и солюбилизации гидрофобного зонда, и солюбилизационной емкости S , определенной методом солюбилизации судан I, для систем ВР:ДСН=1:1 в пересчете на ВР.

Система	ККА, мМ		S , моль судан I/ моль ВР
	Кондуктометрия	Солюбилизация гидрофобного зонда	
ВР-С6–ДСН	0.19	0.95	0.37
ВР-С8–ДСН	0.22	0.90	0.60
ВР-С10–ДСН	0.23	0.33	0.71
ВР-С12–ДСН	0.12	0.26	1.02

Изменение степени связывания противоионов (β , табл. 3.19) и свободной энергии мицеллообразования (ΔG_m , табл. 3.19) в присутствии ДСН зависит от длины алкильных фрагментов макроциклов, но для смесей со всеми ВР наблюдается снижение β и увеличение ΔG_m для систем с избытком ПАВ, что обусловлено образованием слаборастворимых комплексов, которые снижают стабильность систем. Для смесей с ВР-С6 наблюдается немонотонное изменение β с увеличением доли ДСН, но в присутствии эквимольного количества ПАВ значение степени связывания противоионов повышается, что говорит о более плотной упаковке

«головных» групп в смешанных агрегатах. В присутствии эквимольного количества ДСН агрегация ВР-С6 термодинамически более выгодна, чем в индивидуальном состоянии, что может быть объяснено образованием в эквимольной системе 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 фрагментов макроциклов и больше содержание ДСН, тем сильнее уменьшается значение β . Снижение степени связывания может быть обусловлено электростатическим взаимодействием макроцикла и ПАВ, в результате которого макроцикл и ПАВ становятся противоионами друг для друга. Частичная компенсация заряда придает неионный характер ассоциированным частицам, так что заряженные «головные» группы чередуются с неионными [120]. Свободная энергия мицеллообразования для всех смешанных систем на основе ВР-С8, ВР-С10, ВР-С12 и ДСН значительно меньше, чем для индивидуальных макроциклов (табл. 3.19). Это, вероятно, обусловлено возрастанием конкуренции между алкильными фрагментами ВР и ДСН, в результате чего электростатические взаимодействия преобладают над гидрофобными.

Таблица 3.19. Значения степени связывания противоионов (β) и свободной энергии мицеллообразования (ΔG_m) для ВР, ДСН и смешанных систем ВР:ДСН 2:1, 1:1 и 1:2.

Соединение	Индивидуальные компоненты	ВР:ДСН=2:1	ВР:ДСН=1:1	ВР:ДСН=1:3
β				
ВР-С6	0.5363	0.3745	0.6367	0.3162
ВР-С8	0.5927	0.5679	0.5364	0.2360
ВР-С10	0.5954	0.5585	0.4832	0.3130
ВР-С12	0.5993	0.5226	0.4049	0.3513
ДСН	0.6602	-	-	-
ΔG_m , кДж/моль				
ВР-С6	-23.9	-16.5	-27.1	-9.6
ВР-С8	-28.7	-23.0	-22.6	-8.2
ВР-С10	-32.9	-23.9	-20.3	-9.5
ВР-С12	-35.0	-23.0	-19.6	-10.7
ДСН	-22.5	-	-	-

Для получения информации о структуре межмолекулярных агрегатов на основе супраамфилов ВР–ДСН и механизме взаимодействия агрегатов с субстратами был применен метод ^1H ЯМР. В смешанных композициях наблюдается химический сдвиг протонов алкильных групп, свидетельствующий о гидрофобных взаимодействиях между ВР и ДСН (приложение А, рис. А3–А6). 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. В присутствии К[4]Р значительное

смещение наблюдается для протонов вблизи сульфогруппы ДСН *Ha* и следующих за ними метиленовых протонов в составе *n*-додецильной цепи *Hb*. С увеличением содержания ПАВ сигналы данных протонов претерпевают слабополюный сдвиг, приближаясь к положению сигналов индивидуального ДСН. Смещение сигналов *Ha* примерно одинаковое для всех смесей с ВР, в то время как сигналы *Hb* смещаются меньше всего в присутствии ВР-С6. Что касается протонов ВР, то наибольшее изменение показали сигналы протонов *H8* и *H10* (табл. 3.20). С увеличением длины алкильных групп макроциклов изменение химических сдвигов под влиянием ДСН снижается. Положение сигналов в растворах ВР-С6 и ВР-С8 в присутствии ДСН соответствует их положению в растворах индивидуальных 10 мМ макроциклов. Таким образом, эти сдвиги могут быть вызваны агрегацией макроциклов в присутствии ПАВ. Макроциклы ВР-С10 и ВР-С12 при концентрации 1 мМ уже находится в агрегированном состоянии, поэтому для него смещение в смеси с ДСН незначительно. Стоит отметить, что в отличие от ВР-С8 для ВР-С6 наибольшее смещение пиков наблюдается не в эквимольной системе, а при 3-кратном избытке ДСН. Это также соотносится с перегибами на кривых изменения удельной электропроводности и солубилизации судана I (рис. 3.49).

Таблица 3.20. Химические сдвиги протонов *H8* и *H10* в системах индивидуальных ВР и смешанных систем ВР:ДСН = 1:1, 1:3 и 1:5, С(ВР) = 1 мМ.

Система	<i>H8</i>			
	ВР-С6	ВР-С8	ВР-С10	ВР-С12
1 мМ ВР	7.77	7.56	7.27	7.27
ВР:ДСН=1:1	7.76	7.25	7.3	7.28
ВР:ДСН=1:3	7.32	7.25	7.31	7.28
ВР:ДСН=1:5	7.37	7.33	-*	-*
10 мМ ВР	7.37	7.28	7.29	7.28
	<i>H10</i>			
1 мМ ВР	2.45	2.35	2.16	2.17
ВР:ДСН=1:1	2.44	2.15	2.21	2.19
ВР:ДСН=1:3	2.3	2.16	2.21	2.21
ВР:ДСН=1:5	2.26	2.23	-*	-*
10 мМ ВР	2.27	2.16	2.18	2.16
* наблюдается тушение пиков из-за низкой стабильности растворов и выпадения осадка				

Изменение размеров агрегатов в системах ВР–ДСН фиксировалось с помощью метода ДРС (рис. 3.53). Первые порции ДСН к растворам макроциклов не влияют или незначительно увеличивают размер агрегатов в растворе. При 5- и 10-кратном избытке ПАВ наблюдается значительное увеличение диаметра частиц до 90 нм для ВР-С6 и 20–40 нм для остальных макроциклов. При дальнейшем увеличении концентрации ДСН размеры агрегатов вновь снижаются, что связано с появлением индивидуальных мицелл ПАВ в смесях с ВР. Среди исследованных систем самой стабильной во времени оказалась эквимольная композиция ВР-С10 с ДСН. Агрегаты в растворе оставались стабильными более двух месяцев. Для

эквимольных композиций ВР–ДСН при варьировании общей концентрации системы (0.05–3 мМ) размеры агрегатов остаются постоянными.

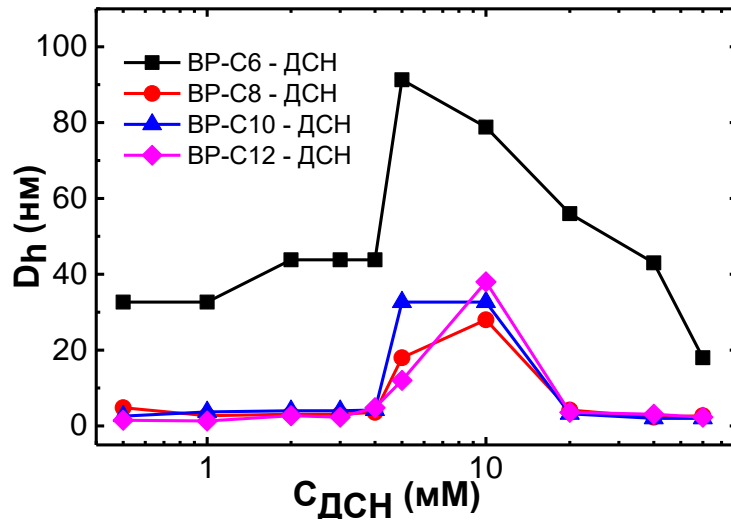


Рисунок 3.53. Изменение размеров агрегатов в растворах ВР–ДСН, $C(\text{ВР}) = 1 \text{ мМ}$, $C(\text{ДСН}) = 0.1\text{--}60 \text{ мМ}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Изображения ПЭМ (рис. 3.54) подтверждают формирование совместных агрегатов в смешанных системах. 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. В исследуемых системах наблюдается слипание частиц что, вероятно, обусловлено увеличением гидрофобности супраамфилов в результате электростатической компенсации виологеновых групп. Суммируя полученные изображения ПЭМ и значения β и ΔG_m для смешанных композиций ВР–ДСН (табл. 3.19), можно предположить о зависимости степени влияния ДСН на ВР. При взаимодействии эквимольных количеств ДСН и ВР-С6 происходит благоприятное формирование везикулярных частиц, сферическая поверхность которых связывает противоионы в большей степени, чем индивидуальный ВР-С6. Однако дальнейшее увеличение доли ПАВ в смеси с ВР-С6 приводит к уменьшению формируемых частиц, которые притягиваются друг к другу за счет постепенной электростатической компенсации виологеновых фрагментов анионным ДСН, в результате чего значение β снижается аналогично изменению β в смешанных композициях длинноцепочечных ВР. Добавление ДСН к сформированным агрегатам на основе длинноцепочечных ВР-С8, ВР-С10 и ВР-С12 вызывает неблагоприятное изменение ΔG_m , вероятной причиной которого является конкурентное взаимодействие алкильных цепей макроцикла и ПАВ, и, как следствие, на изображениях ПЭМ данных смешанных композиций представлены неупорядоченные агрегаты.

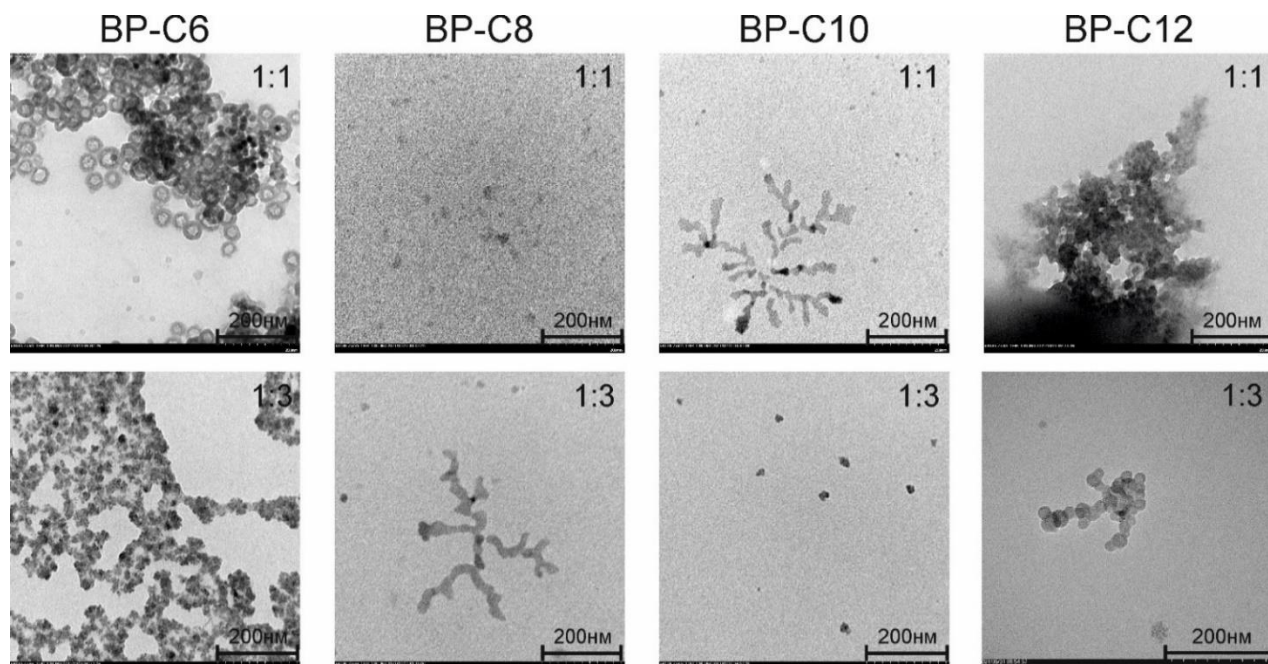


Рисунок 3.54. Изображения ПЭМ для растворов ВР:ДСН 1:1 и 1:3, $C(\text{ВР}) = 0.05$ мМ: (а) ВР-С6; (б) ВР-С8; (в) ВР-С10; (г) ВР-С12.

3.5.2. Функциональная активность смешанных композиций виологеновых каликс[4]резорцинов и ДСН

3.5.2.1. Солюбилизирующая способность систем

Для оценки возможного использования агрегатов ВР–ДСН в качестве наноконтейнеров для гидрофобных препаратов была исследована их солюбилизирующая способность по отношению к гидрофобным флавоноидам рутину и кверцетину (рис. 3.55). Как было определено ранее, присутствие ВР способствует увеличению растворимости флавоноидов, причем даже при концентрациях ниже ККА. Аналогично солюбилизирующему поведению ВР по отношению к судану I, водная растворимость флавоноидов изменялась в зависимости от соотношения компонентов в смешанной системе. В случае связывания рутина (рис. 3.55а) первые порции ПАВ, добавленные к ВР (до соотношения ВР:ДСН 1:1 – 1:3), незначительно влияют на солюбилизирующие свойства системы. Затем количество связываемого субстрата начинает резко уменьшаться с ростом концентрации ПАВ в системе, и при 10-кратном избытке ДСН смешанные композиции обладают солюбилизирующей способностью на уровне раствора индивидуального ПАВ такой же концентрации. При дальнейшем увеличении соотношения компонентов солюбилизация субстратов вновь возрастает, вероятно, за счет формирования мицелл индивидуального ДСН. При связывании кверцетина (рис. 3.55б) профили солюбилизирующих кривых для ВР-С8, ВР-С10 и ВР-С12 имеют схожую тенденцию с зависимостями солюбилизации рутина. Солюбилизирующая емкость 1 мМ раствора индивидуального ВР-С6 по отношению к кверцетину достаточно низкая и возрастает с увеличением содержания ДСН до 3 мМ, а далее ведет себя аналогично остальным ВР. Как и в

случае солюбилизации судана I, можно сказать, что после достижения соотношения ВР:ДСН=1:10 связывание флавоноидов происходит в основном за счет мицелл ДСН. Таким образом, для доставки гидрофобных флавоноидов оптимально использовать эквимольные композиции ВР-С8, ВР-С10 и ВР-С12 с ДСН. Для смешанных систем с ВР-С6 интерес представляет система ВР-С6:ДСН=1:3, но также была исследована эквимольная система для сравнения результатов между всеми макроциклами.

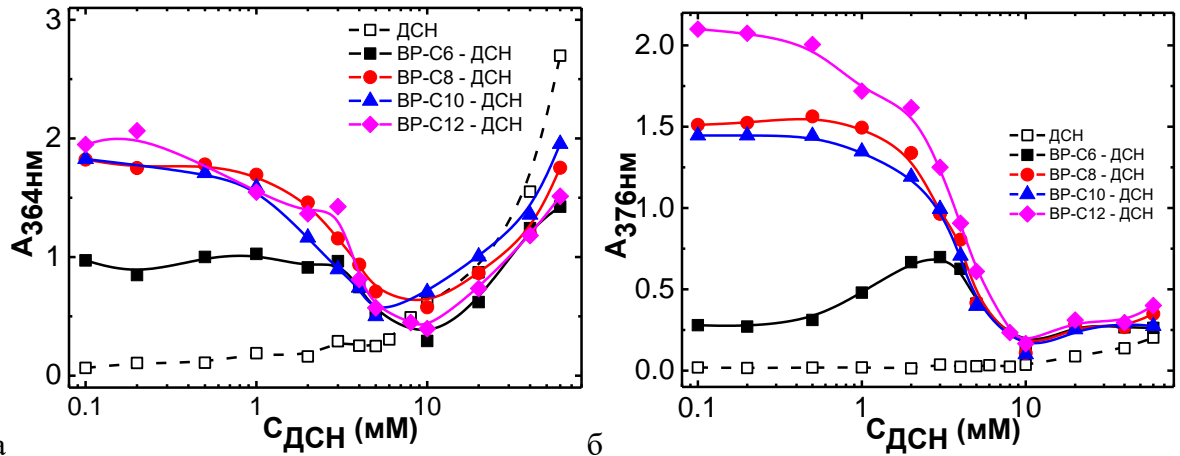


Рисунок 3.55. Зависимость оптической плотности полос поглощения рутина (а) при 364 нм и кверцетина (б) при 376 нм от концентрации ДСН в водных растворах ВР–ДСН, $C(\text{ВР}) = 1 \text{ мМ}$, $C(\text{ДСН}) = 0.1\text{--}60 \text{ мМ}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, оптический путь 1 мм.

Для эквимольных композиций было исследовано влияние общей концентрации супраамфифильной системы на способность к связыванию флавоноидов (рис. 3.56). Как и для индивидуальных макроциклов, солюбилизация флавоноидов возрастает с ростом концентрации супраамфифильной системы (рис. 3.45, 3.56). Интересно, что супраамфифилы ВР–ДСН проявляют большую солюбилизационную способность по сравнению с индивидуальным ПАВ в связи с тем, что солюбилизация рутина и кверцетина может реализоваться не только благодаря гидрофобному домену формируемых агрегатов, но виологеновым фрагментам.

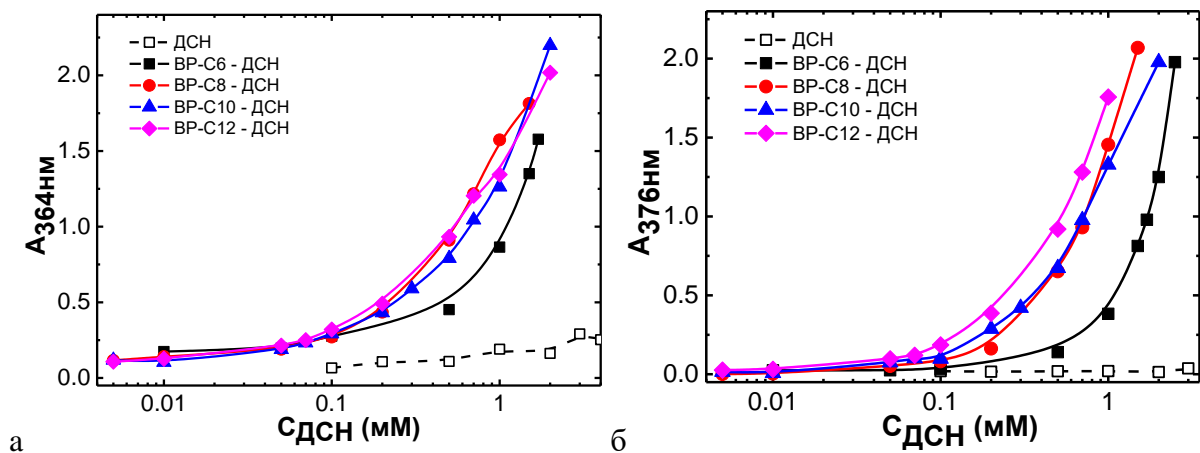


Рисунок 3.56. Зависимость оптической плотности полос поглощения рутина (а) при 364 нм и кверцетина (б) при 376 нм от концентрации ДСН в водных растворах ВР:ДСН=1:1, $C(\text{ДСН}) = 0.005\text{--}3 \text{ мМ}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, оптический путь 1 мм.

После солюбилизации флавоноидов размеры агрегатов ВР–ДСН немного увеличиваются. Известно, что гидрофобные молекулы, имеющие в своей структуре полярные заместители, располагаются в гидрофобном ядре агрегатов вблизи «головной» группы амфифильной молекулы за счет комбинации межмолекулярных взаимодействий [231]. Встроившиеся молекулы связанного субстрата «раздвигают» молекулы амфифилов, делают упаковку более рыхлой, а сами агрегаты более крупными.

3.5.2.2. Инкапсулирующая способность систем по отношению к доксорубину

Основываясь на том, что агрегаты ВР–ДСН при определенном соотношении компонентов могут представлять собой везикулы, была также исследована способность этих систем к инкапсуляции гидрофильного противоракового препарата DOX. Обнаружено, что в смешанных композициях ВР–ДСН связывается меньше DOX, чем в агрегатах индивидуальных ВР. Тем не менее, наилучшую инкапсулирующую способность проявили системы на основе ВР-С10 (ЭИ составляет 9% и 12.5% для систем ВР-С10:ДСН 1:1 и 1:5 соответственно, табл. 3.21).

Таблица 3.21. Концентрация, ЭИ и ЕЗ DOX в агрегатах, образуемых в растворах ВР–ДСН.

Система	С(DOX), мМ	ЭИ, %	ЕЗ, %
1 мМ ВР-С6 – 1 мМ ДСН	0.0152	7.6	0.40
1 мМ ВР-С6 – 3 мМ ДСН	0.0146	7.3	0.31
1 мМ ВР-С8 – 1 мМ ДСН	0.0107	5.4	0.27
1 мМ ВР-С8 – 5 мМ ДСН	0.0036	1.8	0.06
1 мМ ВР-С10 – 1 мМ ДСН	0.0180	9.0	0.43
1 мМ ВР-С10 – 5 мМ ДСН	0.0256	12.8	0.42
1 мМ ВР-С12 – 1 мМ ДСН	0.0056	2.8	0.13
1 мМ ВР-С12 – 5 мМ ДСН	0.0036	1.8	0.06

DOX может как инкапсулироваться в гидрофильном ядре агрегатов, так и образовывать комплекс с виологеновыми группами макроциклов. Точное расположение DOX в агрегатах ВР–ДСН определить достаточно сложно, поскольку спектроскопия ¹Н ЯМР не показала изменений спектров DOX в присутствии ВР (приложение А, рис. А7, А8). Более того, на спектрах флуоресценции наблюдается снижение флуоресценции DOX, что, основываясь на проведенных ранее экспериментах, может быть объяснено как самотушением молекул при инкапсуляции, так и образованием комплекса.

3.5.2.3. Биологическая и цитотоксическая активность наноконтейнеров на основе виологеновых каликс[4]резорцинов и ДСН и их влияние на противоопухолевую активность лекарственных препаратов

Были определены гемолитическая и цитотоксическая активности смешанных композиций ВР–ДСН. Как видно из таблицы 3.22, в присутствии эквимольного количества ДСН гемолитическая и цитотоксическая активность макроциклов возрастают. Избыток ПАВ в смеси с ВР приводит к неоднозначным результатам: в случае смеси с ВР-С6 гемотоксичность повышается, а в смеси с ВР-С10 – снижается. В то же время с увеличением содержания ДСН в

смешанных системах их цитотоксичность возрастает как к опухолевым, так и к нормальным клеткам. Среди исследованных систем наименьшую токсичность к нормальным клеткам показали эквимольные композиции ВР-С6, ВР-С10 и ВР-С12 с ДСН. ВР-С8 как индивидуальный, так и в присутствии ДСН, проявил достаточно высокую цитотоксическую активность по отношению к клеточной линии Chang liver.

Таблица 3.22. Гемолитическая и цитотоксическая активность систем ВР–ДСН.

Система (мольные соотношения компонентов)	HC ₅₀ (ВР), мкМ	IC ₅₀ (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

Таблица 3.23. Цитотоксическая активность систем ВР–ДСН–флавоноид.

Система	Соотношение компонентов и наличие субстрата	IC ₅₀ (ВР) / IC ₅₀ (флавоноид), мкМ	
		Chang liver	M-HeLa
ВР-С6:ДСН	1:1 + рутин	179±9.0 / 80±4.0	156±7.8 / 80±4.0
	1:1 + кверцетин	179±9.0 / 30±1.5	153±7.7 / 30±1.5
	1:3 + рутин	70±3.5 / 37±1.9	70±3.5 / 37±1.9
	1:3 + кверцетин	70±3.5 / 24±1.2	70±3.5 / 24±1.2
ВР-С8:ДСН	1:1 + рутин	76±3.8 / 76±3.8	74±3.7 / 74±3.7
	1:1 + кверцетин	74±3.7 / 53±2.7	59±3.0 / 43±2.2
ВР-С10:ДСН	1:1 + рутин	147±7.4 / 91±4.6	80±4.0 / 50±2.5
	1:1 + кверцетин	>250 / >137	90±4.5 / 50±2.5

Из литературы известно, что рутин и кверцетин обладают не только антиоксидантными, но и противораковыми свойствами [232–235]. Данные таблицы 3.23 показывают, что после солюбилизации флавоноидов в агрегаты их цитотоксичность по отношению к раковым клеткам активность немного снижается относительно литературных данных (IC₅₀ кверцетина к клеткам M-HeLa составляет 35.5 мкМ, а IC₅₀ рутина – 30 мкг/мл или 50 мкМ) [236, 237]. В то же время в исследуемом диапазоне концентраций флавоноиды проявляют такую же токсичность к нормальным клеткам, как и к опухолевым. Среди исследованных систем эквимольная композиция ВР-С10–ДСН благоприятно снижает цитотоксичность рутина и кверцетина к нормальным клеткам.

Как было показано ранее (табл. 3.17), присутствие ВР в той или иной степени усиливает токсичность DOX как к опухолевым, так и к нормальным клеткам. Аналогичные закономерности наблюдаются для смешанных систем ВР-С6, ВР-С8 и ВР-С12 с ДСН (табл. 3.24). Использование смешанных композиций на основе этих макроциклов для инкапсуляции DOX нецелесообразно из-за отсутствия селективности, то есть агрегаты, формируемые в данных системах, не защищают нормальные клетки от токсического действия DOX. В то же время, использование системы ВР-С10:ДСН=1:1 в качестве наноконтейнеров позволяет повысить селективность

действия (SI) DOX в 6 раз (табл. 3.24). Интересно, что при совместной загрузке в эти агрегаты DOX с флавоноидами селективность систем снижается и равна 4 и 4.4 для композиций с рутином и кверцетином соответственно, а совместная загрузка с ловастатином повышает селективность систем до 8, что указывает на синергетическое действие связанных биологически активных молекул.

Таблица 3.24. Цитотоксическая активность и индекс селективности DOX, инкапсулированного в агрегаты ВР–ДСН.

Система	IC ₅₀ (ВР) / IC ₅₀ (DOX), мкМ		SI
	Chang liver	M-HeLa	
DOX	6.0±0.5	5.2±0.4	1.1
ВР-С6:ДСН = 1:1 + DOX	65.8±3.3 / 1±0.1	131.6±6.0 / 2±0.1	0.5
ВР-С6:ДСН = 1:3 + DOX	68.5±4.0 / 1±0.1	274.0±13.0 / 4±0.3	0.25
ВР-С8:ДСН = 1:1 + DOX	65.4±3.2 / 0.7±0.1	65.4±3.2/0.7±0.1	1
ВР-С8:ДСН = 1:5 + DOX	41.7±2.1 / 0.15±0.01	36.1±1.8 / 0.13±0.01	1.2
ВР-С10:ДСН = 1:1+ DOX	>250 / >8	72.2±5.5 / 1.3±0.1	6.2
ВР-С10:ДСН = 1:5+ DOX	70.3±7.0 / 1.8±0.2	54.7±5.5 / 1.4±0.1	1.3
ВР-С10:ДСН = 1:1+ рутин + DOX	25.5±1.0 / 2.8±0.2	6.4±0.5 / 0.7±0.1	4
ВР-С10:ДСН = 1:1 + кверцетин + DOX	>250 / >8	22.2±1.2 / 1.8±0.1	4.4
ВР-С10:ДСН = 1:1+ ловастатин + DOX	>250 / >8	62.5±5.6 / 1.0±0.09	8
ВР-С12:ДСН = 1:1+ DOX	142.8±7.1 / 0.8±0.1	71.4±3.6 / 0.4±0.02	2
ВР-С12:ДСН = 1:5+ DOX	111.1±5.6 / 0.4±0.02	75±3.8 / 0.27±0.01	1.5

Таким образом, на основе проведенных экспериментов по взаимодействию ВР с ДСН были получены следующие результаты. Обнаружено, что добавка ДСН влияет на физико-химические и биологические свойства ВР. Причем присутствие ПАВ положительно влияет на агрегационное поведение ВР-С6, снижая значения ККА и свободной энергии мицеллообразования. С увеличением длины алкильных фрагментов макроциклов взаимодействие ВР с ДСН становится все менее выгодным. Кроме того, в зависимости от соотношения компонентов в смешанной системе изменяются морфология и функциональные свойства образующихся частиц. Смешанные агрегаты способны связывать как гидрофобные, так и гидрофильные субстраты. Исследования показали, что включение DOX в эти агрегаты улучшает его противоопухолевую активность и снижает токсичность к нормальным клеткам. Чувствительность сформированных систем к концентрации компонентов, собственная цитотоксичность к раковым клеткам и улучшение противоопухолевой активности DOX говорят о высоком потенциале данных систем в качестве лекарственных наноконтейнеров, способных к контролируемому высвобождению препаратов.

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 эквимольном 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 сольubilизационную емкость образующихся агрегатов.

3. Впервые проведена оценка самоорганизации каликс[4]резорцинов с N-метил-D-глюкаминными 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 ККМ катионных ПАВ и уменьшает сольubilизационную 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 ободе солюбилизирующая способность агрегатов по отношению к гидрофобному субстрату возрастает. В случае ВР в связывании флавоноидов рутин и кверцетин 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 супраамфилов 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.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ПАВ – поверхностно-активное вещество

металлоПАВ – металлосодержащее поверхностно-активное вещество

K[n]A – каликс[n]арен, n=4,5,6,8

K[4]P – каликс[4]резорцин

ДМСО – диметилсульфоксид

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

ККА – критическая концентрация агрегации

DOX – доксорубицина гидрохлорид

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ДАВСО-16 – 1-гексадецил-4-аза-1-азониабцикло[2.2.2]октан бромид

ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид

СКР – каликс[4]резорцин, модифицированный этилсульфонатными группами по нижнему ободу

СВКР – каликс[4]резорцин, модифицированный этилсульфонатными группами по верхнему ободу и гидроксипропильными – по нижнему ободу

ГКР – каликс[4]резорцин, модифицированный N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами по верхнему ободу

ГКР-1 – каликс[4]резорцин, модифицированный N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами по верхнему ободу и этилсульфонатными фрагментами по нижнему

ГКР-2 – каликс[4]резорцин, модифицированный N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами по верхнему ободу и метильными фрагментами по нижнему

ГКР-3 – каликс[4]резорцин, модифицированный N-метил-D-глюкаминовыми фрагментами по верхнему ободу и н-децильными фрагментами по нижнему

ВР – кавитанд на основе каликс[4]резорцина, модифицированный виологеновыми фрагментами по верхнему ободу

ВР-С_n, n=5,6,8,10,12 – кавитанд на основе каликс[4]резорцина, модифицированный виологеновыми фрагментами по верхнему ободу и н-пентильными, н-гексильными, н-октильными, н-децильными и н-додецильными фрагментами, соответственно, по нижнему.

В-16 - N-метил-N-гексадецил-4,4-бипиридиния

ВБП-16 - дихлорид N-метил-N'-гексадецил-1,2-ди(пиридин-4-ил)этена

LaS – комплекс нитрита лантана (III) и двух молекул ДАВСО-16

ДСН – додецилсульфат натрия

Судан I – 2-гидроксинафталин-1-азобензол

RhB – родамин B

cisPt – цисплатин

ЭИ – эффективность инкапсуляции

ЕЗ – емкость загрузки

ΔG_m – свободная энергия мицеллообразования

β – степень связывания противоионов

S – солюбилизационная емкость

ДРС – динамическое рассеяние света

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

АСМ – атомно-силовая микроскопия

спектроскопия ЯМР ^1H – спектроскопия ядерного магнитного резонанса на протонах

УФ спектроскопия – спектроскопия в ультрафиолетовом диапазоне

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

M-HeLa – раковые клетки шейки матки

Chang liver – клетки печени человека

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

SI – индекс селективности

МГ – N-метил-D-глюкамин

КР-3 – каликс[4]резорцин, модифицированный по нижнему ободу n-децильными фрагментами

Dh – гидродинамический диаметр частиц

УФ свет – свет с длиной волны 365 нм

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DNA Nanotechnology Enters Cell Membranes / S. Huo, H. Li, A.J. Boersma, A. Herrmann // *Adv. Sci.* — 2019. — V. 6, N. 10. — P. 1–17.
2. 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.Y. Zakharova // *J. Mol. Liq.* — 2019. — V. 289. — 111058.
3. 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.Y. Zakharova // *Chem. Phys. Lipids.* — 2019. — V. 223. — 104791.
4. Alkyl triphenylphosphonium surfactants as nucleic acid carriers: complexation efficacy toward DNA decamers, interaction with lipid bilayers and cytotoxicity studies / L.Y. Zakharova, G.I. Kaupova, D.R. Gabdrakhmanov, G.A. Gaynanova, E.A. Ermakova, A.R. Mukhitov, I. V. Galkina, S. V. Cheresiz, A.G. Pokrovsky, P. V. Skvortsova, Y. V. Gogolev, Y.F. Zuev // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2019. — V. 21, N. 30. — P. 16706–16717.
5. 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. — 111407.
6. Delivery nanosystems based on sterically hindered phenol derivatives containing a quaternary ammonium moiety: Synthesis, cholinesterase inhibition and antioxidant activity / T.N. Pashirova, E.A. Buriylova, 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. Buriylov, S.V. Bukharov, L.Y. Zakharova // *Chem. Biol. Interact.* — 2019. — V. 310. — 108753.
7. Consoli, G.M.L. Calixarene-based micelles: Properties and applications // *Design and Development of New Nanocarriers* / G.M.L. Consoli, G. Granata, C. Geraci. — Elsevier Inc., 2018. — P. 89–143
8. Calixarenes: From biomimetic receptors to multivalent ligands for biomolecular recognition / F. Sansone, L. Baldini, A. Casnati, R. Ungaro // *New J. Chem.* — 2010. — V. 34, N. 12. — P. 2715–2728.
9. Moerkerke, S. Selective Recognition of Phosphatidylcholine Lipids by a Biomimetic Calix[6]tube Receptor / S. Moerkerke, J. Wouters, I. Jabin // *J. Org. Chem.* — 2015. — V. 80, N. 17. — P. 8720–8726.
10. Selective recognition of neutral guests in an aqueous medium by a biomimetic calix[6]cryptamide receptor / A. Lascaux, G. De Leener, L. Fusaro, F. Topić, K. Rissanen, M. Luhmer, I. Jabin // *Org. Biomol. Chem.* — 2016. — V. 14, N. 2. — P. 738–746.
11. Wang, J. Assembly behaviors of calixarene-based amphiphile and supra-amphiphile and the applications in drug delivery and protein recognition / J. Wang, X. Ding, X. Guo // *Adv. Colloid Interface*

Sci. — 2019. — V. 269. — P. 187–202.

12. Functional calixarenes for material and life science / R. Rodik, S. Cherenok, O. Kalchenko, O. Yesypenko, J. Lipkowski, V. Kalchenko // *Curr. Org. Chem.* — 2018. — V. 22, N. 22. — P. 2200–2222.

13. Schneider, H.J. Binding mechanisms in supramolecular complexes / H.J. Schneider // *Angew. Chemie - Int. Ed.* — 2009. — V. 48, N. 22. — P. 3924–3977.

14. Shinkai, S. Calixarenes - The Third Generation of Supramolecules / S. Shinkai // *Tetrahedron.* — 1993. — V. 49, N. 40. — P. 8933–8968.

15. New water-soluble host molecules derived from calix[6]arene / S. Shinkai, S. Mori, T. Tsubaki, T. Sone, O. Manabe // *Tetrahedron Lett.* — 1984. — V. 25, N. 46. — P. 5315–5318.

16. Hexasulfonated calix[6]arene derivatives: a new class of catalysts, surfactants, and host molecules / S. Shinkai, S. Mori, H. Koreishi, T. Tsubaki, O. Manabe // *J. Am. Chem. Soc.* — 1986. — V. 108, N. 9. — P. 2409–2416.

17. Guo, D.S. Selective binding behaviors of p-sulfonatocalixarenes in aqueous solution / D.S. Guo, K. Wang, Y. Liu // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* — 2008. — V. 62, N. 1–2. — P. 1–21.

18. Perret, F. Biochemistry of anionic calix[n]arenes / F. Perret, A.W. Coleman // *Chem. Commun.* — 2011. — V. 47, N. 26. — P. 7303–7319.

19. Perret, F. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes / F. Perret, A.N. Lazar, A.W. Coleman // *Chem. Commun.* — 2006. — N. 23. — 2425.

20. Syntheses and aggregation properties of new water-soluble calixarenes / S. Shinkai, T. Arimura, K. Araki, H. Kawabata, H. Satoh, T. Tsubaki, O. Manabe, J. Sunamoto // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* — 1989. — N. 11. — 2039.

21. Wang, K. Temperature-controlled supramolecular vesicles modulated by p-sulfonatocalix[5]arene with pyrene / K. Wang, D.S. Guo, Y. Liu // *Chem. - A Eur. J.* — 2010. — V. 16, N. 27. — P. 8006–8011.

22. Kappe, T. The early history of calixarene chemistry / T. Kappe // *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* — 1994. — V. 19, N. 1–4. — P. 3–15.

23. Gutsche, C.D. the Calixarenes / C.D. Gutsche // *Top. Curr. Chem.* — 1984. — V. 123. — P. 1–47.

24. Calixarenes. 4. The Synthesis, Characterization, and Properties of the Calixarenes from p-tert-Butylphenol / C.D. Gutsche, B. Dhawan, K.H. No, R. Muthukrishnan // *J. Am. Chem. Soc.* — 1981. — V. 103. — P. 3782–3792.

25. Calix[3]arene-Analogous Metacyclophanes: Synthesis, Structures and Properties with Infinite Potential / M. Islam, P.E. Georghiou, S. Rahman, T. Yamato // *Molecules.* — 2020. — V. 25, N. 18 — 4202.

26. Supramolecular Chemistry of p-Sulfonatocalix[5]arene: A Water-Soluble, Bowl-Shaped Host with a Large Molecular Cavity / J.W. Steed, C.P. Johnson, C.L. Barnes, R.K. Juneja, J.L. Atwood, S.

- Reilly, R.L. Hollis, P.H. Smith, D.L. Clark // *J. Am. Chem. Soc.* — 1995. — V. 117, N. 46. — P. 11426–11433.
27. Convergent synthesis of p-benzylcalix[7]arene: Condensation and UHIG of p-benzylcalix[6 or 8]arenes / J.L. Atwood, M.J. Hardie, C.L. Raston, C.A. Sandoval // *Org. Lett.* — 1999. — V. 1, N. 10. — P. 1523–1526.
28. Weinelt, F. Mechanisms of Macrocyclic Genesis. The Condensation of Resorcinol with Aldehydes / F. Weinelt, H.J. Schneider // *J. Org. Chem.* — 1991. — V. 56, N. 19. — P. 5527–5535.
29. Gutsche, C.D. Calixarenes - an introduction / C.D. Gutsche. — *Angewandte Chemie*, 2008. — 276 p.
30. Rodik, R. V Calixarenes in Bio-Medical Researches / R. V Rodik, V.I. Boyko, V.I. Kalchenko // *Curr. Med. Chem.* — 2009. — V. 16, N. 2. — P. 1630–1655.
31. Consoli, G.M.L. Design, synthesis, and drug solubilising properties of the first folate-calix[4]arene conjugate / G.M.L. Consoli, G. Granata, C. Geraci // *Org. Biomol. Chem.* — 2011. — V. 9, N. 19. — P. 6491–6495.
32. Synthesis of 5-aryl-1,4-benzodiazepine derivatives attached in resorcinaren-PAMAM dendrimers and their anti-cancer activity / S. Cortez-Maya, S. Hernández-Ortega, T. Ramírez-Apan, I. V. Lijanova, M. Martínez-García // *Bioorganic Med. Chem.* — 2012. — V. 20, N. 1. — P. 415–421.
33. Ryu, E.H. Efficient synthesis of water-soluble calixarenes using click chemistry / E.H. Ryu, Y. Zhao // *Org. Lett.* — 2005. — V. 7, N. 6. — P. 1035–1037.
34. Ikeda, A. Novel Cavity Design Using Calix[n]arene Skeletons: Toward Molecular Recognition and Metal Binding / A. Ikeda, S. Shinkai // *Chem. Rev.* — 1997. — V. 97. — P. 1713–1734.
35. Iwamoto, K. Conformations and Structures of Tetra- O -alkyl-p-tert -butylcalix[4]arenes. How Is the Conformation of Calix[4]arenes Immobilized? / K. Iwamoto, K. Araki, S. Shinkai // *J. Org. Chem.* — 1991. — V. 56, N. 16. — P. 4955–4962.
36. On the Conformational Isomers in Tetra-O-alkylcalix[4]arenes / K. Araki, K. Iwamoto, S. Shinkai, T. Matsuda // *Chem. Lett.* — 1989. — P. 1747–1750.
37. Shinkai, S. Does the calixarene cavity recognise the size of guest molecules? On the ‘hole-size selectivity’ in water-soluble calixarenes / S. Shinkai, K. Araki, O. Manabe // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* — 1988. — N. 3. — P. 187–189.
38. Basilio, N. Calixarene-based surfactants: Evidence of structural reorganization upon micellization / N. Basilio, L. Garcia-Río, M. Martín-Pastor // *Langmuir.* — 2012. — V. 28, N. 5. — P. 2404–2414.
39. Nuclear magnetic resonance elucidation of ring-inversion processes in macrocyclic octaols / L. Abis, E. Dalcanale, A. Du Vosel, S. Spera // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* — 1990. — N. 12. — P. 2075–2080.
40. Calixarenes 2001 / Z. Asfari, V. Böhmer, J. Harrowfield, J. Vicens. — Springer Netherlands,

2001. — 694 p.

41. Rappoport, Z. *The Chemistry of Phenols, Part 1* / Z. Rappoport ; ed. Z. Rappoport. — John Wiley & Sons, 2003. — 1667 p.

42. Schneider, H.-J. *Host-Guest Complexes with Water-Soluble Macrocyclic Polyphenolates Including Induced Fit and Simple Elements* / H.-J. Schneider, D. Giittes, U. Schneider // *J. Am. Chem. Soc.* — 1988. — V. 110, N. 8. — P. 6449–6454.

43. Alkoxy-, acyloxy-, and bromomethylation of resorcinarenes / S. Nummelin, D. Falabu, A. Shivanyuk, K. Rissanen // *Org. Lett.* — 2004. — V. 6, N. 17. — P. 2869–2872.

44. Thondorf, I. *Conformational Properties of Methylene Bridged Resorcarenes* / I. Thondorf, J. Brenn, V. Bohmer // *Tetrahedron.* — 1998. — V. 54. — P. 12823–12828.

45. Misra, T.K. *Phase transfer of gold nanoparticles from aqueous to organic solution containing resorcinarene* / T.K. Misra, T.S. Chen, C.Y. Liu // *J. Colloid Interface Sci.* — 2006. — V. 297, N. 2. — P. 584–588.

46. *An absence of non-specific immune response towards para-sulphonato-calix[n]arenes* / M.H. Paclet, C.F. Rousseau, C. Yannick, F. Morel, A.W. Coleman // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* — 2006. — V. 55, N. 3–4. — P. 353–357.

47. *Shahgaldian, P. Miscibility studies on amphiphilic calix[4]arene-natural phospholipid mixed films* / P. Shahgaldian, A.W. Coleman // *Langmuir.* — 2003. — V. 19, N. 13. — P. 5261–5265.

48. *Conjugation, immunoreactivity, and immunogenicity of calix[4]arenes; model study to potential calix[4]arene-based Ac³⁺ chelators* / M.H.B. Grote Gansey, A.S. De Haan, E.S. Bos, W. Verboom, D.N. Reinhoudt // *Bioconjug. Chem.* — 1999. — V. 10, N. 4. — P. 613–623.

49. *Synthesis, characterization, X-ray structure and biological activities of c-5-bromo-2-hydroxyphenylcalix[4]-2-methyl resorcinarene* / H.M. Abosadiya, S.A. Hasbullah, M.M. Mackeen, S.C. Low, N. Ibrahim, M. Koketsu, B.M. Yamin // *Molecules.* — 2013. — V. 18, N. 11. — P. 13369–13384.

50. *Comparative study on the antioxidant and anti-Toxoplasma activities of vanillin and its resorcinarene derivative* / C.B.S. Oliveira, Y.S.R. Meurer, M.G. Oliveira, W.M.T.Q. Medeiros, F.O.N. Silva, A.C.F. Brito, D.L. De Pontes, V.F. Andrade-Neto // *Molecules.* — 2014. — V. 19, N. 5. — P. 5898–5912.

51. *A resorcinarene for inhibition of A β fibrillation* / X. Han, J. Park, W. Wu, A. Malagon, L. Wang, E. Vargas, A. Wikramanayake, K.N. Houk, R.M. Leblanc // *Chem. Sci.* — 2017. — V. 8, N. 3. — P. 2003–2009.

52. *Preliminary investigation of novel tetra-tailed macrocycle amphiphile based nano-vesicles for amphotericin B improved oral pharmacokinetics* / I. Ali, J. ur Rehman, S. Ullah, M. Imran, I. Javed, B.M. El-Haj, H. Saad Ali, M. Arfan, M.R. Shah // *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* — 2018. — V. 46, N. sup3. — P. S1204–S1214.

53. Пат. US 2010/0056482 A1. Calixarene derivatives as anticancer agent / W.A. Coleman, L.G. Baggetto, A.N. Lazar, M.H. Michaud, S. Magnard.
54. Silva, E. Da Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]- arenes / E. Da Silva, P. Shahgaldian, A.W. Coleman // *Int. J. Pharm.* — 2004. — V. 273, N. 1–2. — P. 57–62.
55. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice / A.W. Coleman, S. Jebors, S. Cecillon, P. Perret, D. Garin, D. Marti-Battle, M. Moulin // *New J. Chem.* — 2008. — V. 32, N. 5. — P. 780–782.
56. Пат. 5,441,983 U.S. Treatment of infection by enveloped virus with calix(n)arene compounds / K.M. Hwang, Y.M. Qi, S.-Y. Liu, W. Choy, J. Chen.
57. Antimicrobial activity of calixarenes / R. Lamartine, M. Tsukada, D. Wilson, A. Shirata // *Comptes Rendus Chim.* — 2002. — V. 5, N. 3. — P. 163–169.
58. Design, synthesis and antibacterial evaluation of a polycationic calix[4]arene derivative alone and in combination with antibiotics / G.M.L. Consoli, G. Granata, R. Picciotto, A.R. Blanco, C. Geraci, A. Marino, A. Nostro // *Medchemcomm.* — 2018. — V. 9, N. 1. — P. 160–164.
59. Silva, E. Da Anti-thrombotic activity of water-soluble calix[n]arenes / E. Da Silva, D. Ficheux, A.W. Coleman // *J. Incl. Phenom.* — 2005. — V. 52, N. 3–4. — P. 201–206.
60. Inhibition and disintegration of insulin amyloid fibrils: A facile supramolecular strategy with p-sulfonatocalixarenes / M.N. Shinde, N. Barooah, A.C. Bhasikuttan, J. Mohanty // *Chem. Commun.* — 2016. — V. 52, N. 14. — P. 2992–2995.
61. Synthesis, X-ray crystal structure and anti-tumor activity of calix[n]arene polyhydroxyamine derivatives / L. An, L.L. Han, Y.G. Zheng, X.N. Peng, Y.S. Xue, X.K. Gu, J. Sun, C.G. Yan // *Eur. J. Med. Chem.* — 2016. — V. 123. — P. 21–30.
62. The first account of a structurally persistent micelle / M. Kellermann, W. Bauer, A. Hirsch, B. Schade, K. Ludwig, C. Böttcher // *Angew. Chemie - Int. Ed.* — 2004. — V. 43, N. 22. — P. 2959–2962.
63. Israelachvili, J.N. Intermolecular and Surface Forces / J.N. Israelachvili. — Elsevier, 2011. — 676 p.
64. Lee, M. Stimuli-Responsive Supramolecular Nanocapsules from Amphiphilic Calixarene Assembly / M. Lee, S. Lee, L. Jiang // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — V. 126, N. 40. — P. 12724–12725.
65. Basilio, N. Calixarene-based surfactants: Conformational-dependent solvation shells for the alkyl chains / N. Basilio, L. Garcia-Rio // *ChemPhysChem.* — 2012. — V. 13, N. 9. — P. 2368–2376.
66. Amphiphilic p-sulfonatocalix[6]arene based self-assembled nanostructures for enhanced clarithromycin activity against resistant *Streptococcus Pneumoniae* / I. Ali, M. Imran, S. Saifullah, H.W. Tian, D.S. Guo, M.R. Shah // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* — 2020. — V. 186, N. November 2019. — P. 110676.
67. Supramolecular nanocapsules from the self-assembly of amphiphilic calixarene as a carrier for

paclitaxel / M.X. Chen, T. Li, S. Peng, D. Tao // *New J. Chem.* — 2016. — V. 40, N. 12. — P. 9923–9929.

68. Self-assembly of amphiphilic anionic calix[4]arenes and encapsulation of poorly soluble naproxen and flurbiprofen / L. Barbera, G. Gattuso, F.H. Kohnke, A. Notti, S. Pappalardo, M.F. Parisi, I. Pisagatti, S. Patan??, N. Micali, V. Villari // *Org. Biomol. Chem.* — 2015. — V. 13, N. 23. — P. 6468–6473.

69. Synthesis and toxicology of p-phosphonic acid calixarenes and O-alkylated analogues as potential calixarene-based phospholipids / A.D. Martin, E. Houlihan, N. Morellini, P.K. Eggers, E. James, K.A. Stubbs, A.R. Harvey, M. Fitzgerald, C.L. Raston, S.A. Dunlop // *Chempluschem.* — 2012. — V. 77, N. 4. — P. 308–313.

70. Shear induced carboplatin binding within the cavity of a phospholipid mimic for increased anticancer efficacy / J. Mo, P.K. Eggers, X. Chen, M.R.H. Ahamed, T. Becker, L.Y. Lim, C.L. Raston // *Sci. Rep.* — 2015. — V. 5, March. — P. 1–9.

71. Composite fluorescent vesicles based on ionic and cationic amphiphilic calix[4]arenes / P.K. Eggers, T. Becker, M.K. Melvin, R.A. Boulos, E. James, N. Morellini, A.R. Harvey, S.A. Dunlop, M. Fitzgerald, K.A. Stubbs, C.L. Raston // *RSC Adv.* — 2012. — V. 2, N. 15. — P. 6250–6257.

72. Characterization of an Amphiphilic Phosphonated Calixarene Carrier Loaded With Carboplatin and Paclitaxel: A Preliminary Study to Treat Colon Cancer in vitro and in vivo / M. Li, L. Mao, M. Chen, M. Li, K. Wang, J. Mo // *Front. Bioeng. Biotechnol.* — 2019. — V. 7, October. — P. 1–15.

73. Supramolecular assembly of a succinyl-calix[4]arene derivative in multilamellar vesicles / G. Granata, G.M.L. Consoli, R. Lo Nigro, G. Malandrino, C. Geraci // *Supramol. Chem.* — 2016. — V. 28, N. 5–6. — P. 377–383.

74. Self-assembly of amphiphilic calix [4]arenes in aqueous solution / M. Strobel, K. Kita-Tokarczyk, A. Taubert, C. Vebert, P.A. Heiney, M. Chami, W. Meier // *Adv. Funct. Mater.* — 2006. — V. 16, N. 2. — P. 252–259.

75. The nature of aqueous solutions of a cationic calix[4]arene: A comparative study of dye-calixarene and dye-surfactant interactions / N.O. Mchedlov-Petrossyan, L.N. Vilкова, N.A. Vodolazkaya, A.G. Yakubovskaya, R. V. Rodik, V.I. Boyko, V.I. Kalchenko // *Sensors.* — 2006. — V. 6, N. 8. — P. 962–977.

76. Surface activity and self-aggregation ability of three cationic quaternized aminocalix[4]arenes / E. V. Ukhatskaya, S. V. Kurkov, R. V. Rodik, V.I. Kalchenko, S.E. Matthews, P. Jansook, T. Loftsson // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* — 2014. — V. 79, N. 3–4. — P. 473–483.

77. Molecular conformation-controlled vesicle/micelle transition of cationic trimeric surfactants in aqueous solution / C. Wu, Y. Hou, M. Deng, X. Huang, D. Yu, J. Xiang, Y. Liu, Z. Li, Y. Wang // *Langmuir.* — 2010. — V. 26, N. 11. — P. 7922–7927.

78. Self-aggregation in aqueous solution of amphiphilic cationic calix[4]arenes. Potential use as vectors and nanocarriers / F.J. Ostos, J.A. Lebrón, P. López-Cornejo, M. López-López, M. García-Calderón, C.B. García-Calderón, I. V. Rosado, V.I. Kalchenko, R. V. Rodik, M.L. Moyá // *J. Mol. Liq.* — 2020. — V. 304. — 112724.
79. A stimulus-responsive shape-persistent micelle bearing a calix[4]arene building block: Reversible pH-dependent transition between spherical and cylindrical forms / S. Fujii, Y. Sanada, T. Nishimura, I. Akiba, K. Sakurai, N. Yagi, E. Mylonas // *Langmuir*. — 2012. — V. 28, N. 6. — P. 3092–3101.
80. Supramolecular Chirality: Vesicle-to-Chiral Helix Transition of the Micelles Consisting of a Sugar-Bearing Calix[4]arene Surfactant / S. Sakamoto, S. Fujii, K. Yoshida, K. Sakurai // *Langmuir*. — 2016. — V. 32, N. 47. — P. 12434–12441.
81. Morphological Transition of Oppositely Charged Calix[4]arene Surfactant Mixture / J.H. Lee, S. Fujii, R. Takahashi, K. Sakurai // *Langmuir*. — 2018. — V. 34, N. 40. — P. 12109–12115.
82. Stimuli-responsive supramolecular nanostructure from amphiphilic calix[4]arene and its three-dimensional dendritic silver nanostructure / E.J. Cho, J.K. Kang, W.S. Han, J.H. Jung // *Langmuir*. — 2008. — V. 24, N. 10. — P. 5229–5232.
83. Dual and multiple stimuli-responsive platonic micelles bearing disaccharides / R. Miyake, S. Fujii, J.H. Lee, R. Takahashi, K. Sakurai // *J. Colloid Interface Sci.* — 2019. — V. 535. — P. 8–15.
84. Vesicle-to-micelle transition in aqueous solutions of amphiphilic calixarene derivatives / N. Micali, V. Villari, G.M.L. Consoli, F. Cunsolo, C. Geraci // *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* — 2006. — V. 73, N. 5. — P. 1–8.
85. Inclusion complexes of a new family of non-ionic amphiphilic dendrocalix[4]arene and poorly water-soluble drugs naproxen and ibuprofen / K. Khan, S. Lal Badshah, N. Ahmad, H.U. Rashid, Y. Mabkhot // *Molecules*. — 2017. — V. 22, N. 5. — P. 783–793.
86. The pH-responsive calix[4]resorcinarene-mPEG conjugates bearing acylhydrazone bonds: Synthesis and study of the potential as supramolecular drug delivery systems / A.M. Shumatbaeva, J.E. Morozova, V. V. Syakaev, Y. V. Shalaeva, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, A.T. Gubaidullin, O.B. Bazanova, V.M. Babaev, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, I.S. Antipin // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* — 2020. — V. 589, December. — 124453.
87. Designed self-assembly of a bimolecular calix[4]resorcinarene capsule held together by hydrogen bonds / R. Becker, G. Reck, R. Radeglia, A. Springer, B. Schulz // *J. Mol. Struct.* — 2006. — V. 784, N. 1–3. — P. 157–161.
88. Hydrogen bond-stabilised N-alkylammonium resorcinarene halide cavitands / N.K. Beyeh, M. Cetina, M. Lofman, M. Luostarinen, A. Shivanyuk, K. Rissanen // *Supramol. Chem.* — 2010. — V. 22, N. 11–12. — P. 737–750.
89. Self-Complementary Dimers of Oxalamide-Functionalized Resorcinarene Tetrabenzoxazines / Z.

- Džolić, N.K. Beyeh, M. Cetina, L. Turunen, K. Rissanen // *Chem. - An Asian J.* — 2018. — V. 13, N. 2. — P. 164–169.
90. Recognition of N-Alkyl and N-Aryl acetamides by N-Alkyl ammonium resorcinarene chlorides / N. Kodiah Beyeh, A. Ala-Korpi, M. Cetina, A. Valkonen, K. Rissanen // *Chem. - A Eur. J.* — 2014. — V. 20, N. 46. — P. 15144–15150.
91. Beyeh, N.K. N-Alkyl Ammonium Resorcinarene Chloride Receptors for Guest Binding in Aqueous Environment / N.K. Beyeh, F. Pan, R.H.A. Ras // *Asian J. Org. Chem.* — 2016. — V. 5, N. 8. — P. 1027–1032.
92. Bamboo-like Chained Cavities and Other Halogen-Bonded Complexes from Tetrahaloethynyl Cavitands with Simple Ditopic Halogen Bond Acceptors / L. Turunen, F. Pan, N.K. Beyeh, J.F. Trant, R.H.A. Ras, K. Rissanen // *Cryst. Growth Des.* — 2018. — V. 18, N. 1. — P. 513–520.
93. Sesquiterpene cyclizations catalysed inside the resorcinarene capsule and application in the short synthesis of isolongifolene and isolongifolenone / Q. Zhang, J. Rinkel, B. Goldfuss, J.S. Dickschat, K. Tiefenbacher // *Nat. Catal.* — 2018. — V. 1, N. 8. — P. 609–615.
94. Discovering Monoterpene Catalysis Inside Nanocapsules with Multiscale Modeling and Experiments / E. Pahima, Q. Zhang, K. Tiefenbacher, D.T. Major // *J. Am. Chem. Soc.* — 2019. — V. 141, N. 15. — P. 6234–6246.
95. The hexameric resorcinarene capsule as an artificial enzyme: Ruling the regio and stereochemistry of a 1,3-dipolar cycloaddition between nitrones and unsaturated aldehydes / P. La Manna, M. De Rosa, C. Talotta, C. Gaeta, A. Soriente, G. Floresta, A. Rescifina, P. Neri // *Org. Chem. Front.* — 2018. — V. 5, N. 5. — P. 827–837.
96. Supramolecular Activation of Hydrogen Peroxide in the Selective Sulfoxidation of Thioethers by a Self-Assembled Hexameric Capsule / G. La Sorella, L. Sporni, G. Strukul, A. Scarso // *Adv. Synth. Catal.* — 2016. — V. 358, N. 21. — P. 3443–3449.
97. Guest encapsulation and self-assembly of molecular capsules in polar solvents via multiple ionic interactions / F. Corbellini, R. Fiammengo, P. Timmerman, M. Crego-Calama, K. Versluis, A.J.R. Heck, I. Luyten, D.N. Reinhoudt // *J. Am. Chem. Soc.* — 2002. — V. 124, N. 23. — P. 6569–6575.
98. Electrochemical behaviour of a molecular capsule based on methylviologen-resorcinarene and sulfonatomethylene-resorcinarene / A.Y. Ziganshina, S. V. Kharlamov, D.E. Korshin, R.K. Mukhitova, E.K. Kazakova, S.K. Latypov, V. V. Yanilkin, A.I. Konovalov // *Tetrahedron Lett.* — 2008. — V. 49, N. 36. — P. 5312–5315.
99. Multifunctional water-soluble molecular capsules based on p-phosphonic acid calix[5]arene / A.D. Martin, R.A. Boulos, L.J. Hubble, K.J. Hartlieb, C.L. Raston // *Chem. Commun.* — 2011. — V. 47, N. 26. — P. 7353–7355.
100. Amphoteric calix[8]arene-based complex for pH-triggered drug delivery / Y. Xue, Y. Guan, A.

- Zheng, H. Xiao // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. — 2013. — V. 101. — P. 55–60.
101. Self-assembly of an aminoalkylated resorcinarene in aqueous media: Host-guest properties / D.E. Korshin, R.R. Kashapov, L.I. Murtazina, R.K. Mukhitova, S. V. Kharlamov, S.K. Latypov, I.S. Ryzhkina, A.Y. Ziganshina, A.I. Konovalov // *New J. Chem.* — 2009. — V. 33, N. 12. — P. 2397–2401.
102. Head-to-tail aggregates of sulfonatomethylated calix[4]resorcinarene in aqueous solutions / V. V. Syakaev, A.R. Mustafina, J.G. Elistratova, S.K. Latypov, A.I. Konovalov // *Supramol. Chem.* — 2008. — V. 20, N. 5. — P. 453–460.
103. Guest controlled aggregation of amphiphilic sulfonatomethylated calix[4]resorcinarenes in aqueous solutions / V. V. Syakaev, E.K. Kazakova, J.E. Morozova, Y. V. Shalaeva, S.K. Latypov, A.I. Konovalov // *J. Colloid Interface Sci.* — 2012. — V. 370, N. 1. — P. 19–26.
104. Complexes of tetramethylsulfonatocalix[4]resorcinarene aggregates with methyl orange: Interactions with guests and driving force of color response / M.T. Kadyrov, J.E. Morozova, I.R. Nizameev, L.A. Muslinkina, E.K. Kazakova, D.A. Mironova, Y. V. Shalaeva, A.I. Konovalov // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* — 2015. — V. 468. — P. 339–345.
105. 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. Konovalov // *Chem. - A Eur. J.* — 2014. — V. 20, N. 43. — P. 14018–14025.
106. Neri, P. *Calixarenes and beyond* / P. Neri, M. Wang, J.L. Sessler ; ed. M.-X.W. Placido Neri, Jonathan L. Sessler. — Cham : Springer, 2016. — 1053 p.
107. Keil, F.J. *Molecular Modelling for Reactor Design* / F.J. Keil // *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* — 2018. — V. 9, N. 1. — P. 201–227.
108. Macroscopic switches constructed through host-guest chemistry / Y. Sun, J. Ma, D. Tian, H. Li // *Chem. Commun.* — 2016. — V. 52, N. 25. — P. 4602–4612.
109. Molecular engineering of polymeric supra-amphiphiles / Y. Chang, Y. Jiao, H.E. Symons, J.F. Xu, C.F.J. Faul, X. Zhang // *Chem. Soc. Rev.* — 2019. — V. 48, N. 4. — P. 989–1003.
110. Пат. WO/2008/020126. Supramolecular co-colloids produced using macrocyclic polyanionic systems / A.W. Coleman, A.N. Lazar, J.-Y.P.P. Renault.
111. Self-assembly of supramolecular amphiphile constructed by hydrophilic calix[4]arene derivative and phenol palmitate / X. Yu, C. Tu, L. He, R. Wang, G. Sun, D. Yan, X. Zhu // *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* — 2009. — V. 46, N. 4. — P. 360–367.
112. Study on the fluorescence behavior of p-sulfonated calix[4,6]arene in cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide solution and its analytical application / Y. Zhou, C. Liu, H. Xu, H. Yu, Q. Lu, L. Wang // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* — 2007. — V. 66, N. 4–5.

— P. 919–923.

113. Basilio, N. Sulfonated calix[6]arene host-guest complexes induce surfactant self-assembly / N. Basilio, L. García-Río, L. Garcia-Río // *Chem. - A Eur. J.* — 2009. — V. 15, N. 37. — P. 9315–9319.

114. Exploring the charged nature of supramolecular micelles based on p-sulfonatocalix[6]arene and dodecyltrimethylammonium bromide / N. Basílio, D.A. Spudeit, J. Bastos, L. Scorsin, H.D. Fiedler, F. Nome, L. García-Río // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2015. — V. 17, N. 39. — P. 26378–26385.

115. Novel catanionic vesicles from calixarene and single-chain surfactant / V. Francisco, N. Basilio, L. Garcia-Rio, J.R. Leis, E.F. Marques, C. Vázquez-Vázquez // *Chem. Commun.* — 2010. — V. 46, N. 35. — P. 6551–6553.

116. Supramolecular vesicles of cationic gemini surfactants modulated by p-sulfonatocalix[4]arene / Z.Q. Li, C.X. Hu, Y.Q. Cheng, H. Xu, X.L. Cao, X.W. Song, H.Y. Zhang, Y. Liu // *Sci. China Chem.* — 2012. — V. 55, N. 10. — P. 2063–2068.

117. Quintela, P.A. Cryptand 222 complexation of anionic surfactant counterions. Drastic decrease of the critical micelle concentration of sodium dodecyl and sodium decyl sulfates / P.A. Quintela, R.C.S. Reno, A.E. Kaifer // *J. Phys. Chem.* — 1987. — V. 91, N. 13. — P. 3582–3585.

118. Effects of cyclodextrins as additives on surfactant CMC / B.Y. Jiang, J. Du, S.Q. Cheng, J.W. Pan, X.C. Zeng, Y.J. Liu, Y. Shunzo, S. Yoshimi // *J. Dispers. Sci. Technol.* — 2003. — V. 24, N. 1. — P. 63–66.

119. Fluorescent nanoassemblies between tetraphenylethenes and sulfonatocalixarenes: A systematic study of calixarene-induced aggregation / Y.C. Liu, Y.Y. Wang, H.W. Tian, Y. Liu, D.S. Guo // *Org. Chem. Front.* — 2016. — V. 3, N. 1. — P. 53–61.

120. Novel self-assembling system based on resorcinarene and cationic surfactant / R.R. Kashapov, T.N. Pashirova, S. V. Kharlamov, A.Y. Ziganshina, E.P. Ziltsova, S.S. Lukashenko, L.Y. Zakharova, W.D. Habicher, S.K. Latypov, A.I. Konovalov // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2011. — V. 13, N. 35. — P. 15891.

121. A supramolecular amphiphile based on calix[4]resorcinarene and cationic surfactant for controlled self-assembly / S. V. Kharlamov, R.R. Kashapov, T.N. Pashirova, E.P. Zhiltsova, S.S. Lukashenko, A.Y. Ziganshina, A.T. Gubaidullin, L.Y. Zakharova, M. Gruner, W.D. Habicher, A.I. Konovalov // *J. Phys. Chem. C.* — 2013. — V. 117, N. 39. — P. 20280–20288.

122. Supramolecular assemblies involving calix[4]resorcinol and surfactant with pH-induced morphology transition for drug encapsulation / R.R. Kashapov, S. V. Kharlamov, Y.S. Razuvayeva, A.Y. Ziganshina, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, S.K. Latypov, L.Y. Zakharova // *J. Mol. Liq.* — 2018. — V. 261. — P. 218–224.

123. Supramolecular self-assembly between an amino acid-based surfactant and a sulfonatocalixarene driven by electrostatic interactions / C. Costa, V. Francisco, S.G. Silva, M.L.C. do Vale, L. García-Río,

- E.F. Marques // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* — 2015. — V. 480. — P. 71–78.
124. Effect of Macrocycle Size on the Self-Assembly of Methylimidazolium Surfactant with Sulfonatocalix[n]arenes / J.G. Harangozó, V. Wintgens, Z. Miskolczy, J.M. Guigner, C. Amiel, L. Biczók // *Langmuir*. — 2016. — V. 32, N. 41. — P. 10651–10658.
125. Effect of Headgroup Variation on the Self-Assembly of Cationic Surfactants with Sulfonatocalix[6]arene / V. Wintgens, J.G. Harangozó, Z. Miskolczy, J.M. Guigner, C. Amiel, L. Biczók // *Langmuir*. — 2017. — V. 33, N. 32. — P. 8052–8061.
126. Wintgens, V. Thermodynamics of host-guest complexation between p-sulfonatocalixarenes and 1-alkyl-3-methylimidazolium type ionic liquids / V. Wintgens, L. Biczók, Z. Miskolczy // *Thermochim. Acta*. — 2011. — V. 523, N. 1–2. — P. 227–231.
127. 4-Sulfonatocalix[6]Arene-Induced Aggregation of Ionic Liquids / V. Wintgens, C. Le Coeur, C. Amiel, J.M. Guigner, J.G. Harangozó, Z. Miskolczy, L. Biczók // *Langmuir*. — 2013. — V. 29, N. 25. — P. 7682–7688.
128. Spontaneous formation of vesicles in a catanionic association involving a head and tail functionalized amino-calix[6]arene / C. Bize, J.C. Garrigues, M. Blanzat, I. Rico-Lattes, O. Bistri, B. Colasson, O. Reinaud // *Chem. Commun.* — 2010. — V. 46, N. 4. — P. 586–588.
129. Facile fabrication of cross-linked vesicle via “surface clicking” of calixarene-based supra-amphiphiles / S. Peng, J. Gao, Y. Liu, D.S. Guo // *Chem. Commun.* — 2015. — V. 51, N. 92. — P. 16557–16560.
130. Controlling the release of hydrophobic compounds by a supramolecular amphiphilic assembly / R.R. Kashapov, R.I. Rassadkina, A.Y. Ziganshina, R.K. Mukhitova, V.A. Mamedov, N.A. Zhukova, M.K. Kadirov, I.R. Nizameev, L.Y. Zakharova, O.G. Sinyashin // *RSC Adv.* — 2016. — V. 6, N. 45. — P. 38548–38552.
131. Multistimuli responsive supramolecular vesicles based on the recognition of p - sulfonatocalixarene and its controllable release of doxorubicin / K. Wang, D.S. Guo, X. Wang, Y. Liu // *ACS Nano*. — 2011. — V. 5, N. 4. — P. 2880–2894.
132. Murayama, K. Molecular recognition involving multiple cation– π interactions: the inclusion of the acetylcholine trimethylammonium moiety in resorcin[4]arene / K. Murayama, K. Aoki // *Chem. Commun.* — 1997. — N. 1. — P. 119–120.
133. Cholinesterase-responsive supramolecular vesicle / D.S. Guo, K. Wang, Y.X. Wang, Y. Liu // *J. Am. Chem. Soc.* — 2012. — V. 134, N. 24. — P. 10244–10250.
134. Tuning the aggregation of an amphiphilic anionic calix[5]arene by selective host–guest interactions with bola-type dications / I. Pisagatti, L. Barbera, G. Gattuso, V. Villari, N. Micali, E. Fazio, F. Neri, M.F. Parisi, A. Notti // *New J. Chem.* — 2019. — V. 43, N. 20. — P. 7628–7635.
135. Guest-length driven high fidelity self-sorting in supramolecular capsule formation of

- calix[5]arenes in water / I. Pisagatti, L. Barbera, G. Gattuso, M.F. Parisi, S. Geremia, N. Hickey, A. Notti // *Org. Chem. Front.* — 2019. — V. 6, N. 22. — P. 3804–3809.
136. Multifunctional vehicle of amphiphilic calix[4]arene mediated by liposome / Y.X.Y.L. Wang, Y.M. Zhang, Y.X.Y.L. Wang, Y. Liu // *Chem. Mater.* — 2015. — V. 27, N. 8. — P. 2848–2854.
137. Tian, H.W. Assembly-enhanced molecular recognition of calix[6]arene / H.W. Tian, Y.C. Pan, D.S. Guo // *Supramol. Chem.* — 2018. — V. 30, N. 7. — P. 562–567.
138. Embedding calix[4]resorcinarenes in liposomes: Experimental and computational investigation of the effect of resorcinarene inclusion on liposome properties and stability / R. Zappacosta, M. Aschi, A. Ammazalorso, P. Di Profio, A. Fontana, G. Siani // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* — 2019. — V. 1861, N. 6. — P. 1252–1259.
139. Ultrasensitive and specific fluorescence detection of a cancer biomarker: Via nanomolar binding to a guanidinium-modified calixarene / Z. Zheng, W.C. Geng, J. Gao, Y.Y. Wang, H. Sun, D.S. Guo // *Chem. Sci.* — 2018. — V. 9, N. 8. — P. 2087–2091.
140. Wang, Y.X. Photolysis of an Amphiphilic Assembly by Calixarene-Induced Aggregation / Y.X. Wang, Y.M. Zhang, Y. Liu // *J. Am. Chem. Soc.* — 2015. — V. 137, N. 13. — P. 4543–4549.
141. Phosphatase-responsive amphiphilic calixarene assembly / Y.X. Wang, D.S. Guo, Y. Cao, Y. Liu // *RSC Adv.* — 2013. — V. 3, N. 21. — P. 8058–8063.
142. Supra-amphiphilic aggregates formed by p-sulfonatocalix[4]arenes and the antipsychotic drug chlorpromazine / Z. Qin, D.S. Guo, X.N. Gao, Y. Liu // *Soft Matter.* — 2014. — V. 10, N. 13. — P. 2253–2263.
143. Amphiphilic p-Sulfonatocalix[4]arene as “drug Chaperone” for Escorting Anticancer Drugs / Y.X. Wang, D.S. Guo, Y.C. Duan, Y.J. Wang, Y. Liu // *Sci. Rep.* — 2015. — V. 5. — P. 4–10.
144. Supramolecular polymeric micelles by the host-guest interaction of star-like calix[4]arene and chlorin e6 for photodynamic therapy / C. Tu, L. Zhu, P. Li, Y. Chen, Y. Su, D. Yan, X. Zhu, G. Zhou // *Chem. Commun.* — 2011. — V. 47, N. 21. — P. 6063–6065.
145. Supramolecular Sensing of 2,4,6-Trinitrophenol by a Tetrapyrenyl Conjugate of Calix[4]arene: Applicability in Solution, in Solid State, and on the Strips of Cellulose and Silica Gel and the Image Processing by a Cellular Phone / S.K. Dinda, M. Althaf Hussain, A. Upadhyay, C.P. Rao // *ACS Omega.* — 2019. — V. 4, N. 16. — P. 17060–17071.
146. Supramolecular polymeric vesicles formed by p-sulfonatocalix[4]arene and chitosan with multistimuli responses / S. Peng, K. Wang, D.-S.S. Guo, Y. Liu // *Soft Matter.* — 2015. — V. 11, N. 2. — P. 290–296.
147. A Supramolecular Vesicle Based on the Complexation of p-Sulfonatocalixarene with Protamine and its Trypsin-Triggered Controllable-Release Properties / K. Wang, D.-S. Guo, M.-Y. Zhao, Y. Liu // *Chem. - A Eur. J.* — 2016. — V. 22, N. 4. — P. 1475–1483.

148. Nanoparticle formation of chitosan induced by 4-sulfonatocalixarenes: utilization for alkaloid encapsulation / J.G. Harangozó, V. Wintgens, Z. Miskolczy, C. Amiel, L. Biczók // *Colloid Polym. Sci.* — 2016. — V. 294, N. 11. — P. 1807–1814.
149. 4-Sulfonatocalixarene-induced nanoparticle formation of methylimidazolium-conjugated dextrans: Utilization for drug encapsulation / V. Wintgens, J.-M. Guigner, Z. Miskolczy, C. Amiel, L. Biczók // *Carbohydr. Polym.* — 2019. — V. 223, April. — 115071.
150. Biomarker Displacement Activation: A General Host-Guest Strategy for Targeted Photothranostics in Vivo / J. Gao, J. Li, W.C. Geng, F.Y. Chen, X. Duan, Z. Zheng, D. Ding, D.S. Guo // *J. Am. Chem. Soc.* — 2018. — V. 140, N. 14. — P. 4945–4953.
151. A host-guest drug delivery nanosystem for supramolecular chemotherapy / X.Y. Hu, J. Gao, F.Y. Chen, D.S. Guo // *J. Control. Release.* — 2020. — V. 324, N. December 2019. — P. 124–133.
152. A host-guest ATP responsive strategy for intracellular delivery of phosphopeptides / B.B. Han, Y.C. Pan, Y.M. Li, D.S. Guo, Y.X. Chen // *Chem. Commun.* — 2020. — V. 56, N. 41. — P. 5512–5515.
153. DNA condensation and cell transfection properties of guanidinium calixarenes: Dependence on macrocycle lipophilicity, size, and conformation / F. Sansone, M. Dudič, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, R. Ungaro // *J. Am. Chem. Soc.* — 2006. — V. 128, N. 45. — P. 14528–14536.
154. Virus-sized DNA nanoparticles for gene delivery based on micelles of cationic calixarenes / R. V. Rodik, A.S. Klymchenko, N. Jain, S.I. Miroshnichenko, L. Richert, V.I. Kalchenko, Y. Mély // *Chem. - A Eur. J.* — 2011. — V. 17, N. 20. — P. 5526–5538.
155. Remarkably Size-Regulated Cell Invasion by Artificial Viruses. Saccharide-Dependent Self-Aggregation of Glycoviruses and Its Consequences in Glycoviral Gene Delivery / T. Nakai, T. Kanamori, S. Sando, Y. Aoyama // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003. — V. 125. — P. 8465–8475.
156. Artificial Viruses and Their Application to Gene Delivery. Size-Controlled Gene Coating with Glycocluster Nanoparticles / Y. Aoyama, T. Kanamori, T. Nakai, T. Sasaki, S. Horiuchi, S. Sando, T. Niidome // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003. — V. 125, N. 12. — P. 3455–3457.
157. Design and synthesis of biologically active cationic amphiphiles built on the calix[4]arene scaffold / N. Bono, C. Pennetta, A. Sganappa, E. Giupponi, F. Sansone, A. Volonterio, G. Candiani // *Int. J. Pharm.* — 2018. — V. 549, N. 1–2. — P. 436–445.
158. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B / V. V. Trush, S.O. Cherenok, V.Y. Tanchuk, V.P. Kukhar, V.I. Kalchenko, A.I. Vovk // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* — 2013. — V. 23, N. 20. — P. 5619–5623.
159. Phosphonate monoesters on a thiacalix[4]arene framework as potential inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B / V. V. Trush, S.G. Kharchenko, V.Y. Tanchuk, V.I. Kalchenko, A.I. Vovk //

Org. Biomol. Chem. — 2015. — V. 13, N. 33. — P. 8803–8806.

160. Calixarene-based phosphinic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatases / V.M. Buldenko, V. V. Trush, O.L. Kobzar, A.B. Drapailo, V.I. Kalchenko, A.I. Vovk // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* — 2019. — V. 29, N. 6. — P. 797–801.

161. Esmailzade Rostami, M. Calix[4]arene-based Multifunctional Ligand as Potent Protein Binding Agent / M. Esmailzade Rostami, B. Gorji, R. Zadmard // *J. Heterocycl. Chem.* — 2018. — V. 55, N. 11. — P. 2532–2537.

162. Doolan, A.M. Protein Recognition by Functionalized Sulfonatocalix[4]arenes / A.M. Doolan, M.L. Rennie, P.B. Crowley // *Chem. - A Eur. J.* — 2018. — V. 24, N. 4. — P. 984–991.

163. Auto-regulated Protein Assembly on a Supramolecular Scaffold / M.L. Rennie, G.C. Fox, J. Pérez, P.B. Crowley // *Angew. Chemie - Int. Ed.* — 2018. — V. 57, N. 42. — P. 13764–13769.

164. Calixarene-mediated assembly of a small antifungal protein / J.M. Alex, M.L. Rennie, S. Engilberge, G. Lehoczki, H. Dorotyya, Á. Fizil, G. Batta, P.B. Crowley // *IUCrJ.* — 2019. — V. 6, N. 2. — P. 238–247.

165. Setner, B. Complexation of chiral amines by resorcin[4]arene sulfonic acids in polar media – circular dichroism and diffusion studies of chirality transfer and solvent dependence / B. Setner, A. Szumna // *Beilstein J. Org. Chem.* — 2019. — V. 15. — P. 1913–1924.

166. Thiocalixarene “knot” effect on protein binding by oligolactic acid particles / O.A. Mostovaya, V. V. Gorbachuk, O.B. Bazanova, A. V. Gerasimov, V.G. Evtugyn, Y.N. Osin, V.D. Myakushev, I.K. Rizvanov, I.I. Stoikov // *Mater. Chem. Front.* — 2019. — V. 3, N. 2. — P. 292–300.

167. Heteromultivalent peptide recognition by co-assembly of cyclodextrin and calixarene amphiphiles enables inhibition of amyloid fibrillation / Z. Xu, S. Jia, W. Wang, Z. Yuan, B.J. Ravoo, D.S. Guo // *Nat. Chem.* — 2019. — V. 11, N. 1. — P. 86–93.

168. Complexation of Hydrophobic Sugars and Nucleosides in Water with Tetrasulfonate Derivatives of Resorcinol Cyclic Tetramer Having a Polyhydroxy Aromatic Cavity: Importance of Guest–Host CH– π Interaction / K. Kobayashi, Y. Asakawa, Y. Kato, Y. Aoyama // *J. Am. Chem. Soc.* — 1992. — V. 114, N. 26. — P. 10307–10313.

169. Gibb, B.C. Synthesis of Hydroxyl-Footed CavitanDs / B.C. Gibb, R.G. Chapman, J.C. Sherman // *J. Org. Chem.* — 1996. — V. 61, N. 4. — P. 1505–1509.

170. Closed polymer containers based on phenylboronic esters of resorcinarenes / T.Y. Sergeeva, R.K. Mukhitova, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, P.D. Klypina, A.Y. Ziganshina, A.I. Konovalov // *Beilstein J. Nanotechnol.* — 2018. — V. 9, N. 1. — P. 1594–1601.

171. Improved synthesis and purification of cavitanDs / J.P. Kass, L.A. Slasor, C.H. Zambrano, E.E. Dueno // *Org. Prep. Proced. Int. New J. Org. Synth.* — 2006. — V. 38, N. 5. — P. 480–483.

172. 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.

173. Yamaguchi, H. Supramolecular formation of antibodies with viologen dimers: Utilization for amplification of methyl viologen detection signals in surface plasmon resonance sensor / H. Yamaguchi, A. Harada // *Biomacromolecules*. — 2002. — V. 3, N. 6. — P. 1163–1169.

174. Wu, R. Influence of a resorcin[4]arene core structure on the spatial directionality of multi-arm poly(ϵ -caprolactone)s / R. Wu, T.F. Al-Azemi, K.S. Bisht // *RSC Adv.* — 2014. — V. 4, N. 32. — P. 16864–16870.

175. 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.

176. Complexes of 1-hexadecyl-4-aza-1-azoniabicyclo[2.2.2]octane bromide with transition metal nitrates. Micelle-forming, solubilizing, and adsorption properties / E.P. Zhiltsova, M.R. Ibatullina, S.S. Lukashenko, F.G. Valeeva, T.N. Pashirova, M.P. Kuttyreva, L.Y. Zakharova // *Colloid J.* — 2017. — V. 79, N. 5. — P. 621–629.

177. Zana, R. Critical micellization concentration of surfactants in aqueous solution and free energy of micellization / R. Zana // *Langmuir*. — 1996. — V. 12, N. 5. — P. 1208–1211.

178. Zana, R. Ionization of cationic micelles: Effect of the detergent structure / R. Zana // *J. Colloid Interface Sci.* — 1980. — V. 78, N. 2. — P. 330–337.

179. Macrocyclic and acyclic 1,3-bis[5-(trialkylammonio)pentyl]-5(6)-substituted uracil dibromides: synthesis, antimicrobial properties, and the structure–activity relationship / V.E. Semenov, A.D. Voloshina, N. V. Kulik, A.S. Strobkykina, R.K. Giniyatullin, L.F. Saifina, A.E. Nikolaev, E.S. Krylova, V. V. Zobov, V.S. Reznik // *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* — 2015. — V. 64, N. 12. — P. 2885–2896.

180. 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. Strobkykina, N. V. Kulik, E.S. Krylova, V. V. Zobov, V.S. Reznik // *Russ. J. Bioorganic Chem.* — 2017. — V. 43, N. 2. — P. 170–176.

181. 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.

182. Kinetic parameters for thermal decomposition of supramolecular polymers derived from flunixin-meglumine adducts / D.L. Cassimiro, C.A. Ribeiro, J.M. V Capela, M.S. Crespi, M. V. Capela // *J. Therm. Anal. Calorim.* — 2011. — V. 105. — P. 405–410.

183. Aloisio, C. Characterization, inclusion mode, phase-solubility and in vitro release studies of inclusion binary complexes with cyclodextrins and meglumine using sulfamerazine as model drug / C. Aloisio, A. Gomes De Oliveira, M. Longhi // *Drug Dev. Ind. Pharm.* — 2014. — V. 40, N. 7. — P. 919–928.
184. Adekola, K. Glucose transporters in cancer metabolism / K. Adekola, S.T. Rosen, M. Shanmugam // *Curr. Opin. Oncol.* — 2012. — V. 24, N. 6. — P. 650–654.
185. Architecture-controlled “SMART” calix[6]arene self-assemblies in aqueous solution / S. Houmadi, D. Coquière, L. Legrand, M.C. Fauté, M. Goldmam, O. Reinaud, S. Rémita // *Langmuir.* — 2007. — V. 23, N. 9. — P. 4849–4855.
186. Stepwise noncovalent synthesis leading to dendrimer-based assemblies in water / T.M. Hermans, M.A.C. Broeren, N. Gomopoulos, A.F. Smeijers, B. Mezari, E.N.M. Van Leeuwen, M.R.J. Vos, P.C.M.M. Magusin, P.A.J. Hilbers, M.H.P. Van Genderen, N.A.J.M. Sommerdijk, G. Fytas, E.W. Meijer // *J. Am. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129, N. 50. — P. 15631–15638.
187. Complexes between β -cyclodextrin and aliphatic guests as new noncovalent amphiphiles: Formation and physicochemical studies / T. Bojinova, Y. Coppel, N. Lauth-de Viguerie, A. Milius, I. Rico-Lattes, A. Lattes // *Langmuir.* — 2003. — V. 19, N. 13. — P. 5233–5239.
188. Gohy, J.-F. Metallo-Supramolecular Block Copolymer Micelles / J.-F. Gohy, B.G.G. Lohmeijer, U.S. Schubert // *Macromolecules.* — 2002. — V. 35. — P. 4560–4563.
189. Spontaneous formation of vesicles from complexes of block ionomers and surfactants / A. V. Kabanov, T.K. Bronich, V.A. Kabanov, K. Yu, A. Eisenberg // *J. Am. Chem. Soc.* — 1998. — V. 120, N. 38. — P. 9941–9942.
190. Francisco, V. Counterion exchange as a decisive factor in the formation of host: Guest complexes by p-sulfonatocalix[4]arene / V. Francisco, N. Basilio, L. García-Riño // *J. Phys. Chem. B.* — 2012. — V. 116, N. 17. — P. 5308–5315.
191. Pyridinium salts: From synthesis to reactivity and applications / S. Sowmiah, J.M.S.S. Esperança, L.P.N. Rebelo, C.A.M. Afonso // *Org. Chem. Front.* — 2018. — V. 5, N. 3. — P. 453–493.
192. Synthesis, antimicrobial activity and physico-chemical properties of some n-alkyldimethylbenzylammonium halides / S. El Hage, B. Lajoie, J.L. Stigliani, A. Furiga-Chusseau, C. Roques, G. Baziard // *J. Appl. Biomed.* — 2014. — V. 12, N. 4. — P. 245–253.
193. 1-Alkyl-(N,N-dimethylamino)pyridinium bromides: Inhibitory effect on virulence factors of *Candida albicans* and on the growth of bacterial pathogens / M. Sundararaman, R.R. Kumar, P. Venkatesan, A. Ilangovan // *J. Med. Microbiol.* — 2013. — V. 62, N. PART 2. — P. 241–248.
194. Pernak, J. Synthesis and anti-microbial activities of some pyridinium salts with alkoxyethyl hydrophobic group / J. Pernak // *Eur. J. Med. Chem.* — 2001. — V. 36, N. 11–12. — P. 899–907.
195. Xia, D. Controlling the photochemical reaction of an azastilbene derivative in water using a water-

soluble pillar[6]arene / D. Xia, P. Wang, B. Shi // *Org. Biomol. Chem.* — 2017. — V. 15, N. 36. — P. 7618–7622.

196. Micelle formation and surface activity of functional redox relays: viologens substituted by a long alkyl chain / M. Krieg, M.P. Pileni, A. Braun, M. Gratzel // *J. Colloid Interface Sci.* — 1981. — V. 83, N. 1. — P. 209–213.

197. Dicationic hydroxylic surfactants: Aggregation behavior, guest-host interaction and catalytic effect / A.B. Mirgorodskaya, F.G. Valeeva, S.S. Lukashenko, R.A. Kushnazarova, T.M. Prokop'eva, T.M. Zubareva, V.A. Mikhailov, L.Y. Zakharova // *J. Mol. Liq.* — 2018. — V. 250. — P. 229–235.

198. Insight into a Fast-Phototuning Azobenzene Switch for Sustainably Tailoring the Foam Stability / S. Chen, Y. Zhang, K. Chen, Y. Yin, C. Wang // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2017. — V. 9, N. 15. — P. 13778–13784.

199. Reversible release control of an oily substance using photoresponsive micelles / Y. Orihara, A. Matsumura, Y. Saito, N. Ogawa, T. Saji, A. Yamaguchi, H. Sakai, M. Abe // *Langmuir.* — 2001. — V. 17, N. 20. — P. 6072–6076.

200. Dual-responsive self-assembly of a bola-type supra-amphiphile constructed from a new pillar[6]arene-based recognition motif in water and its application in controlled release / D. Xia, L. Shanguan, M. Xue, B. Shi // *New J. Chem.* — 2016. — V. 40, N. 12. — P. 9890–9894.

201. 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.

202. 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.

203. Kaur, R. Self aggregating metal surfactant complexes: Precursors for nanostructures / R. Kaur, S.K. Mehta. — Elsevier B.V., 2014. — 37–54 p.

204. Metallosurfactants: Interfaces and micelles / P.C. Griffiths, I.A. Fallis, T. Chuenpratoom, R. Watanesk // *Adv. Colloid Interface Sci.* — 2006. — V. 122, N. 1–3. — P. 107–117.

205. Using inclusion complexes with cyclodextrins to explore the aggregation behavior of a ruthenium metallosurfactant / N. Iza, A. Guerrero-Martínez, G. Tardajos, M.J. Ortiz, E. Palao, T. Montoro, A. Radulescu, C.A. Dreiss, G. González-Gaitano // *Langmuir.* — 2015. — V. 31, N. 9. — P. 2677–2688.

206. Aqueous solutions of transition metal containing micelles / P.C. Griffiths, I.A. Fallis, T. Tatchell, L. Bushby, A. Beeby // *Adv. Colloid Interface Sci.* — 2008. — V. 144, N. 1–2. — P. 13–23.

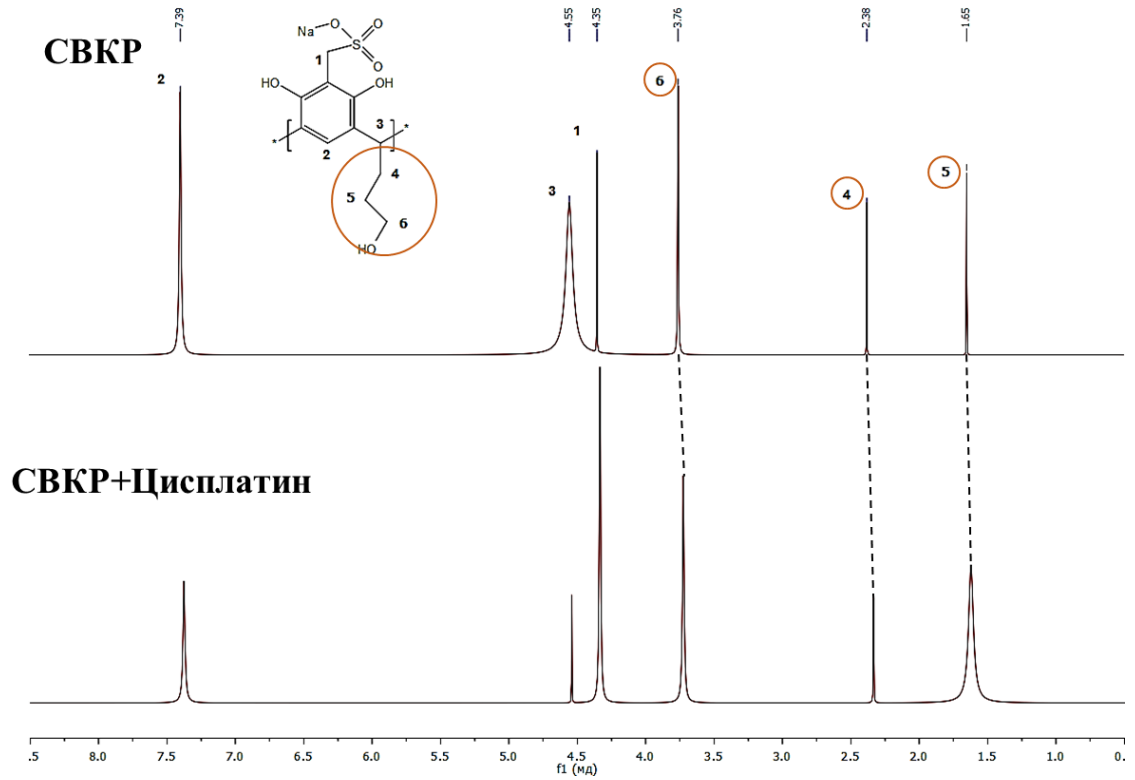
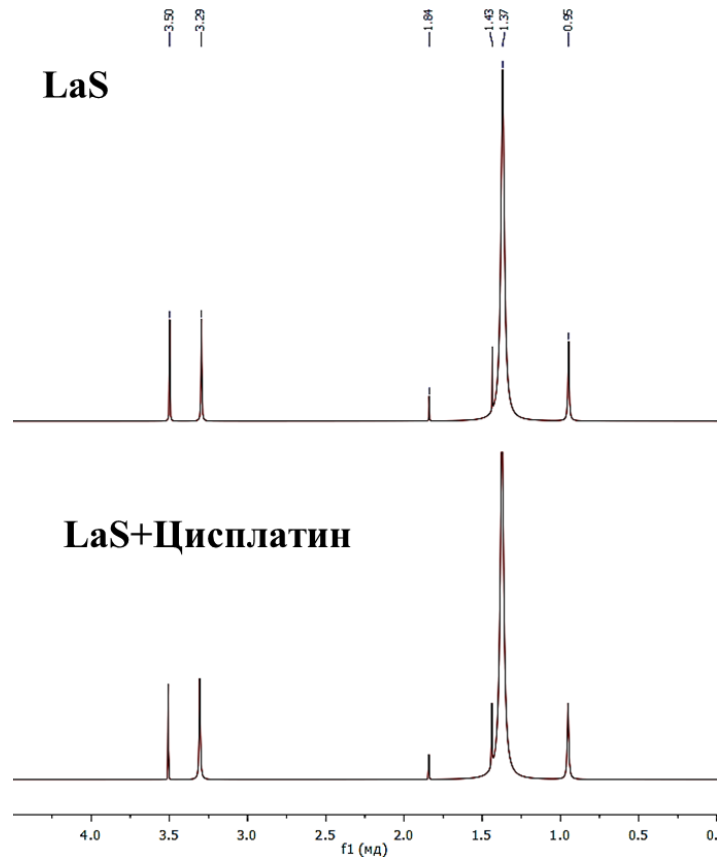
207. Owen, T. Metallosurfactants of bioinorganic interest: Coordination-induced self assembly / T.

- Owen, A. Butler // *Coord. Chem. Rev.* — 2011. — V. 255, N. 7–8. — P. 678–687.
208. Metallosurfactants Cn–Cu–Cn: vesicle formation and its drug-controlled release properties / Q. Zha, Q. Xie, Y. Hu, J. Han, L. Ge, R. Guo // *Colloid Polym. Sci.* — 2016. — V. 294, N. 5. — P. 841–849.
209. Molecular interaction studies of some Co(III)-surfactants with the transport protein / G. Vignesh, M. Parthiban, R. Senthilkumar, S. Arunachalam // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* — 2018. — V. 169. — P. 160–167.
210. Antiproliferative and apoptosis-induction studies of a metallosurfactant in human breast cancer cell MCF-7 / A. Riyasdeen, R. Senthilkumar, V.S. Periasamy, P. Preethy, S. Srinag, M. Zeeshan, H. Krishnamurthy, S. Arunachalamb, M.A. Akbarsha // *RSC Adv.* — 2014. — V. 4, N. 91. — P. 49953–49959.
211. Alkyl Length Effects on the DNA Transport Properties of Cu (II) and Zn(II) Metallovesicles: An In Vitro and In Vivo Study / I.Z. Arroyo, C. Gomez, H. Alarcon, A. Jimenez, A. Pardo, G. Montaña, R.X. Armijos, J.C. Noveron // *J. Drug Deliv.*—2018.—V.2018.—P.1–11.
212. Cooperative interaction between metallosurfactants, derived from the [Ru(2,2'-bpy)₃]²⁺ complex, and DNA / J.A. Lebrón, F.J. Ostos, M.L. Moyá, M. López-López, C.J. Carrasco, P. López-Cornejo // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* — 2015. — V. 135. — P. 817–824.
213. Molecular organization and effective energy transfer in iridium metallosurfactant-porphyrin assemblies embedded in Langmuir-Schaefer films / C. Roldán-Carmona, A.M. González-Delgado, A. Guerrero-Martínez, L. De Cola, J.J. Giner-Casares, M. Pérez-Morales, M.T. Martín-Romero, L. Camacho // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2011. — V. 13, N. 7. — P. 2834–2841.
214. Reversible luminescence switching accompanied by assembly-disassembly of metallosupramolecular amphiphiles based on a platinum(II) complex / N. Liu, B. Wang, W. Liu, W. Bu // *J. Mater. Chem. C.* — 2013. — V. 1, N. 6. — P. 1130–1136.
215. Charge-Transfer Supra-Amphiphiles Built by Water-Soluble Tetrathiafulvalenes and Viologen-Containing Amphiphiles: Supramolecular Nanoassemblies with Modifiable Dimensions / Z. Lv, B. Chen, H. Wang, Y. Wu, J. Zuo // *Small.* — 2015. — V. 11, N. 29. — P. 3597–3605.
216. Coencapsulation of arsenic-and platinum-based drugs for targeted cancer treatment / H. Chen, S. Pazicni, N.L. Krett, R.W. Ahn, J.E. Penner-Hahn, S.T. Rosen, T. V. O'Halloran // *Angew. Chemie - Int. Ed.* — 2009. — V. 48, N. 49. — P. 9295–9299.
217. Liposomes loaded with a dirhenium compound and cisplatin: Preparation, properties and improved in vivo anticancer activity / Z. Li, N.I. Shtemenko, D.Y. Yegorova, S.O. Babiy, A.J. Brown, T. Yang, A. V. Shtemenko, K.R. Dunbar // *J. Liposome Res.* — 2015. — V. 25, N. 1. — P. 78–87.
218. 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, N. 18. — P. 1–47.
219. Quirion, F. Growth and counterion binding of cetyltrimethylammonium bromide aggregates at 25 °C: A neutron and light scattering study / F. Quirion, L.J. Magid // *J. Phys. Chem.* — 1986. — V. 90, N. 21. — P. 5435–5441.
220. Zana, R. Alkanediyl- α,ω -bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants. 1. Effect of the spacer chain length on the critical micelle concentration and micelle ionization degree / R. Zana, M. Benrraou, R. Rueff // *Langmuir* — 1991. — V. 7, N. 6. — P. 1072–1075.
221. 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, S.K. Latypov, L.Y. Zakharova // *J. Mol. Liq.* — 2021. — V. 324. — 114721.
222. 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. — 112062.
223. 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, N. 22. — 5534.
224. Rosen, M.J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*/ M.J. Rosen — Wiley — 2004 — 455 p.
225. Ammonium and imidazolium-based amphiphilic tetramethoxy resorcinarenes: Adsorption, micellization, and protein binding / J. Wang, D. Liu, X. Guo, C. Yan // *J. Mol. Liq.* — 2020. — V. 313. — 113587
226. Nişancı, B. Aromatic stacking of a perylenetetracarboxylic tetraester: Self-assembly in both water and chloroform / B. Nişancı, A. Daştan, Ö.A. Bozdemir // *Tetrahedron Lett.* — 2018. — V. 59, N. 39. — P. 3558–3562.
227. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? / S. V Jovanovic, S. Steenken, Y. Hara, M.G. Simic // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* — 1996. — V. 2, N. 11. — 2497.
228. Logviniuk, D. Serum Prevents Interactions between Antimicrobial Amphiphilic Aminoglycosides and Plasma Membranes / D. Logviniuk, M. Fridman // *ACS Infect Dis.* — 2020. — V.6, N.12. — P. 3212–3223.
229. Lin, I.J. Estimation of the effective number of $-CH_2-$ groups in long-chain surface active agents / I. J. Lin, B. M. Moudgil, P. Somasundaran // *Colloid Polym. Sci.* — 1974. — V. 252. — P. 407-414.
230. 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.
231. Tehrani-Bagha, A.R. Solubilization of hydrophobic dyes in surfactant solutions / A.R. Tehrani-Bagha, K. Holmberg // *Materials (Basel)*. — 2013. — V. 6, N. 2. — P. 580–608.
232. Xiang, T. Quercetin suppresses HeLa cells by blocking PI3K/Akt pathway / T. Xiang, Y. Fang, S. X. Wang // *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* — 2014. — V. 34, N. 5. — P. 740–744.
233. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo / M. Hashemzaei, A.D. Far, A. Yari, R.E. Heravi, K. Tabrizian, S.M. Taghdisi, S.E. Sadegh, K. Tsarouhas, D. Kouretas, G. Tzanakakis, D. Nikitovic, N.Y. Anisimov, D.A. Spandidos, A.M. Tsatsakis, R. Rezaee // *Oncol. Rep.* — 2017. — V. 38, N. 2. — P. 819–828.
234. Antiproliferative activity of rutin on hela cell line induced cervical cancer in rats / U. Vadapalli, S. Muvvala, R. Alluri, B.V.S. Lakshmi // *Int. J. Pharm. Sci. Res.* — 2017. — V. 8, N. 11. — P. 4803–4811.
235. Anticancer activity of rutin and its combination with ionic liquids on renal cells / R. Caparica, A. Júlio, M.E.M. Araújo, A.R. Baby, P. Fonte, J.G. Costa, T.S. de Almeida // *Biomolecules*. — 2020. — V. 10, N. 2. — 233.
236. Antioxidant action and cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 cells of new quercetin derivatives / M. Danihelová, M. Veverka, E. Šturdík, S. Jantová // *Interdiscip. Toxicol.* — 2013. — V. 6, N. 4. — P. 209–216.
237. A novel rutin-fucoidan complex based phytotherapy for cervical cancer through achieving enhanced bioavailability and cancer cell apoptosis / M.S. Deepika, R. Thangam, T.S. Sheena, R. Sasirekha, S. Sivasubramanian, M.D. Babu, K. Jeganathan, R. Thirumurugan // *Biomed. Pharmacother.* — 2019. — V. 109, N. September 2018. — P. 1181–1195.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Рисунок А1. ¹Н ЯМР спектры индивидуального СВКР и в присутствии цисплатина.Рисунок А2. ¹Н ЯМР спектры индивидуального металлоПАВ и в присутствии цисплатина.

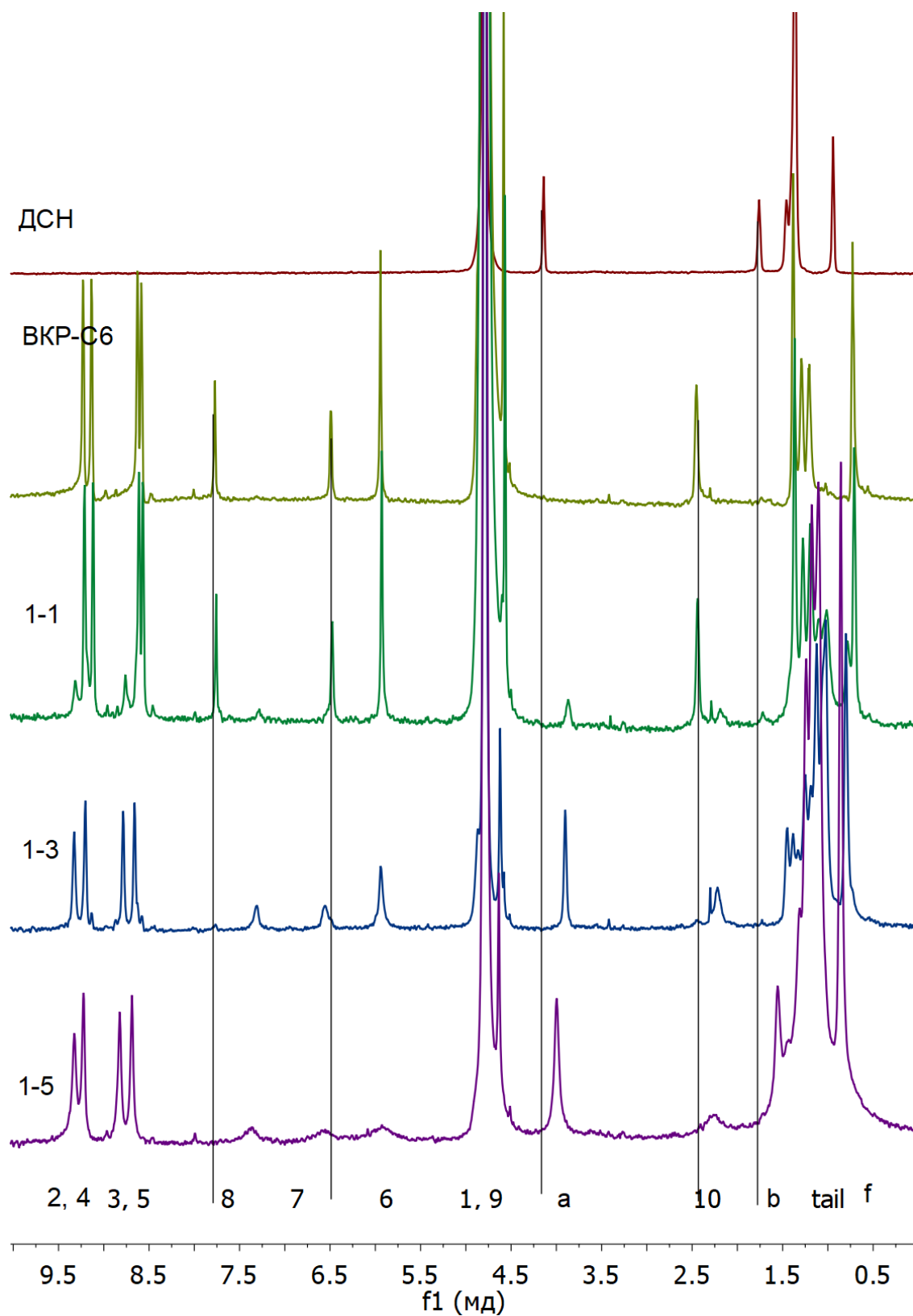


Рисунок А3. ^1H ЯМР спектры индивидуальных 1 мМ растворов ВР-С6, 5 мМ ДСН и смешанных композиций ВР-С6:ДСН=1:1, 1:3 и 1:5.

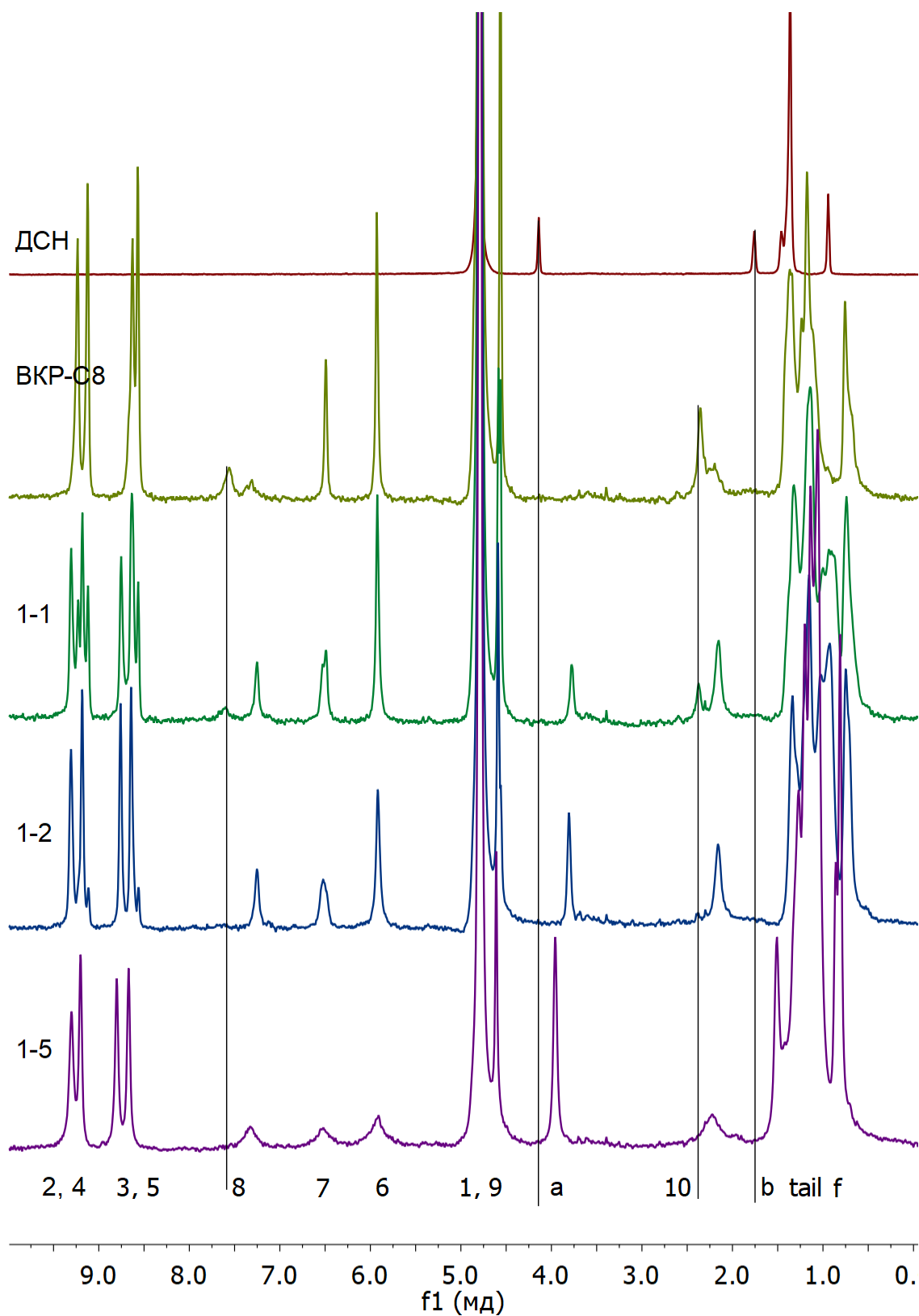


Рисунок А4. ¹H ЯМР спектры индивидуальных 1 мМ растворов ВР-С8, 5 мМ ДСН и смешанных композиций ВР-С8:ДСН=1:1, 1:2 и 1:5.

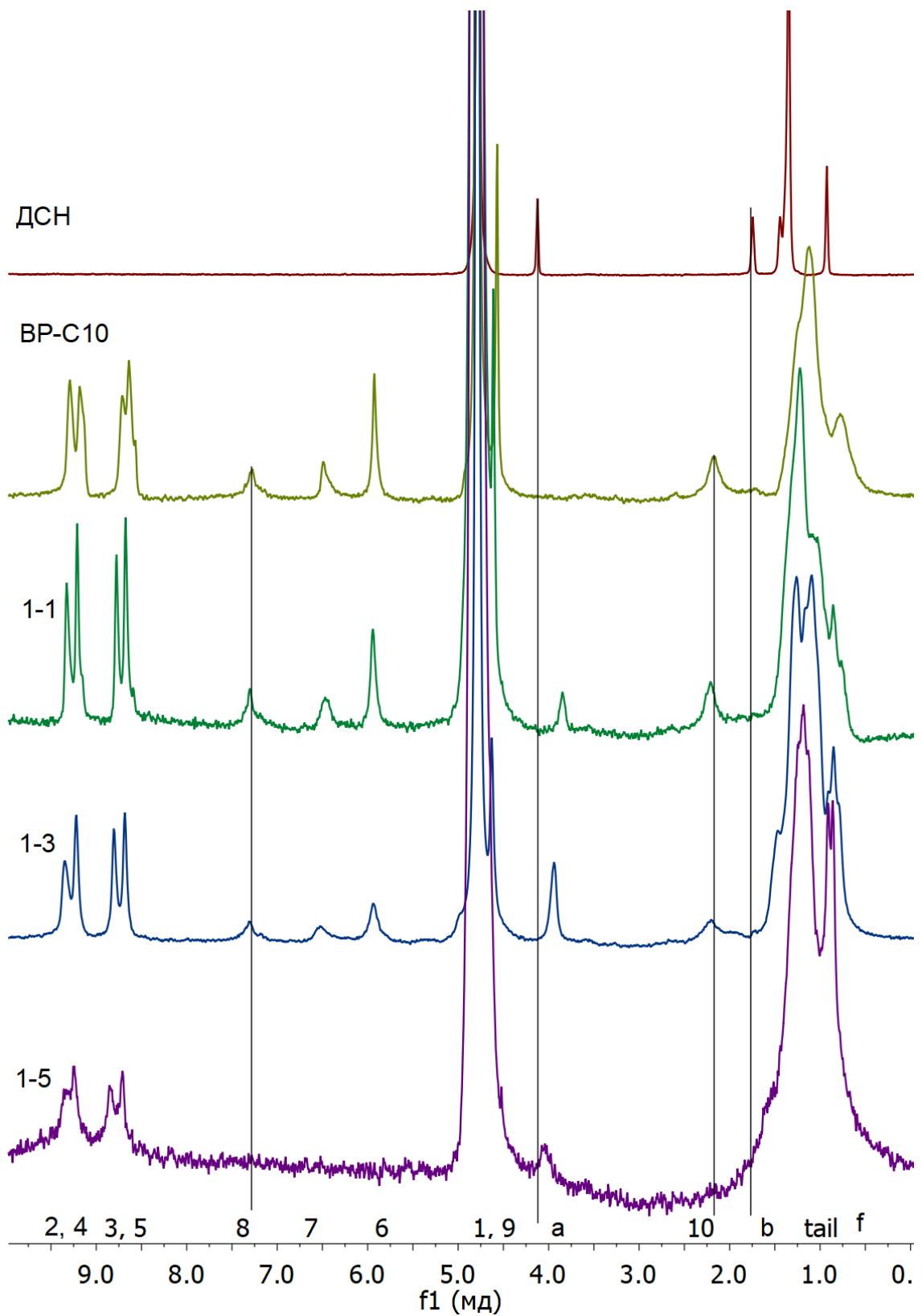


Рисунок А5. ^1H ЯМР спектры индивидуальных 1 мМ растворов ВР-С10, 5 мМ ДСН и смешанных композиций ВР-С10:ДСН=1:1, 1:3 и 1:5.

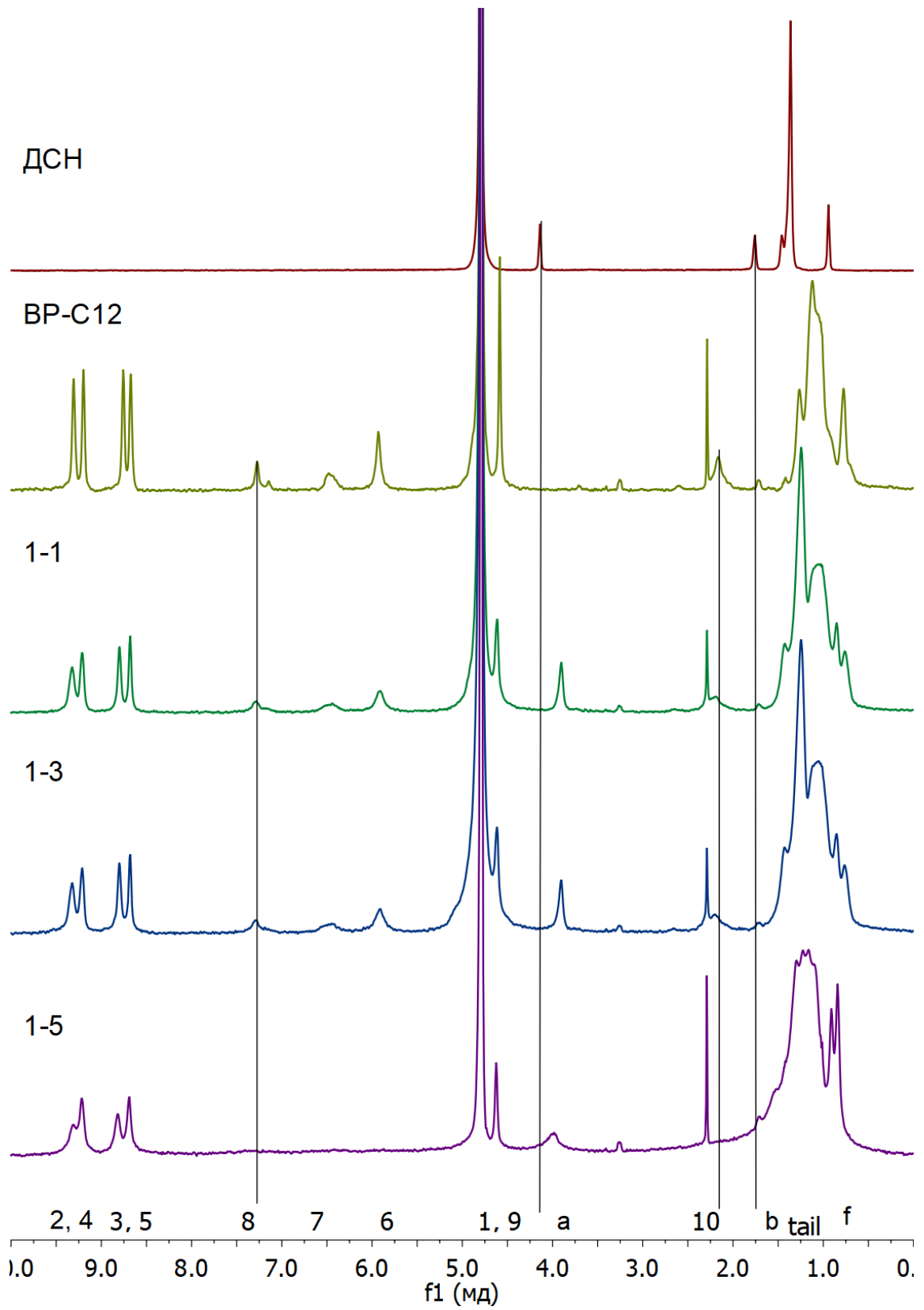


Рисунок А6. ^1H ЯМР спектры индивидуальных 1 мМ растворов ВР-С12, 5 мМ ДСН и смешанных композиций ВР-С12:ДСН=1:1, 1:3 и 1:5.

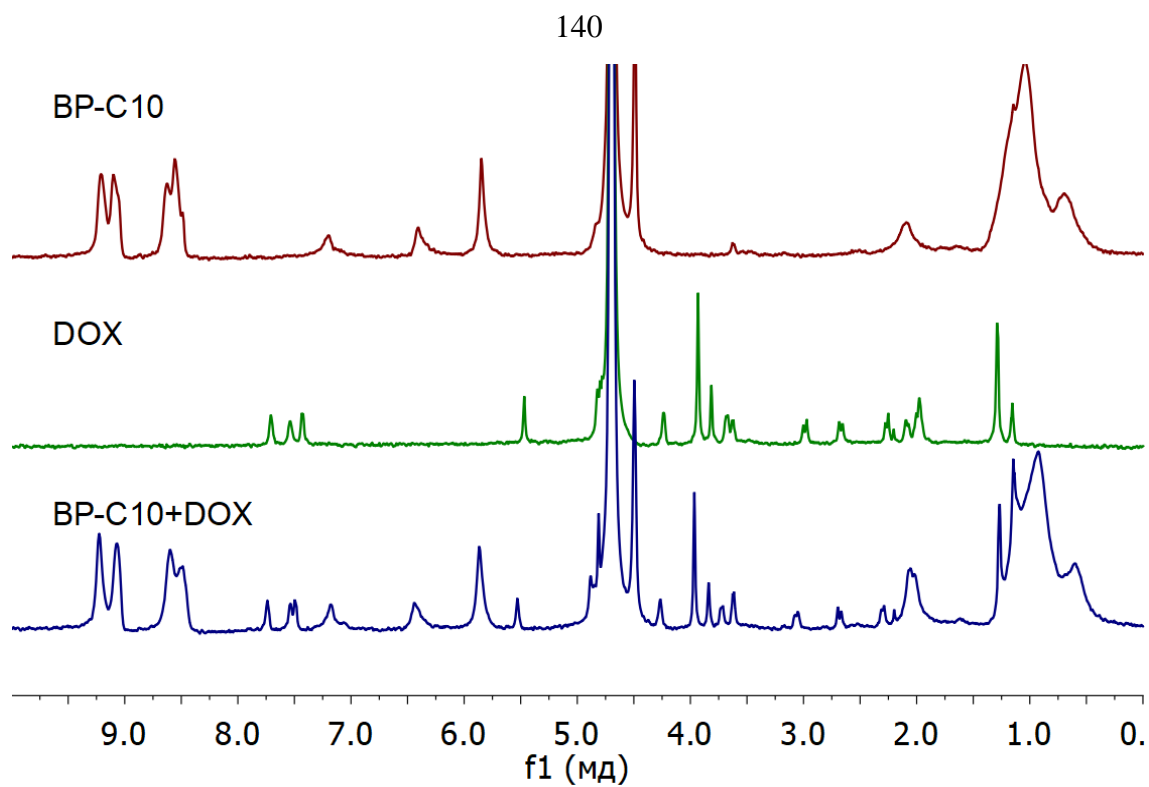


Рисунок А7. ^1H ЯМР спектры индивидуальных 1 мМ растворов **BP-C10**, 1 мМ **DOX** и их смеси.

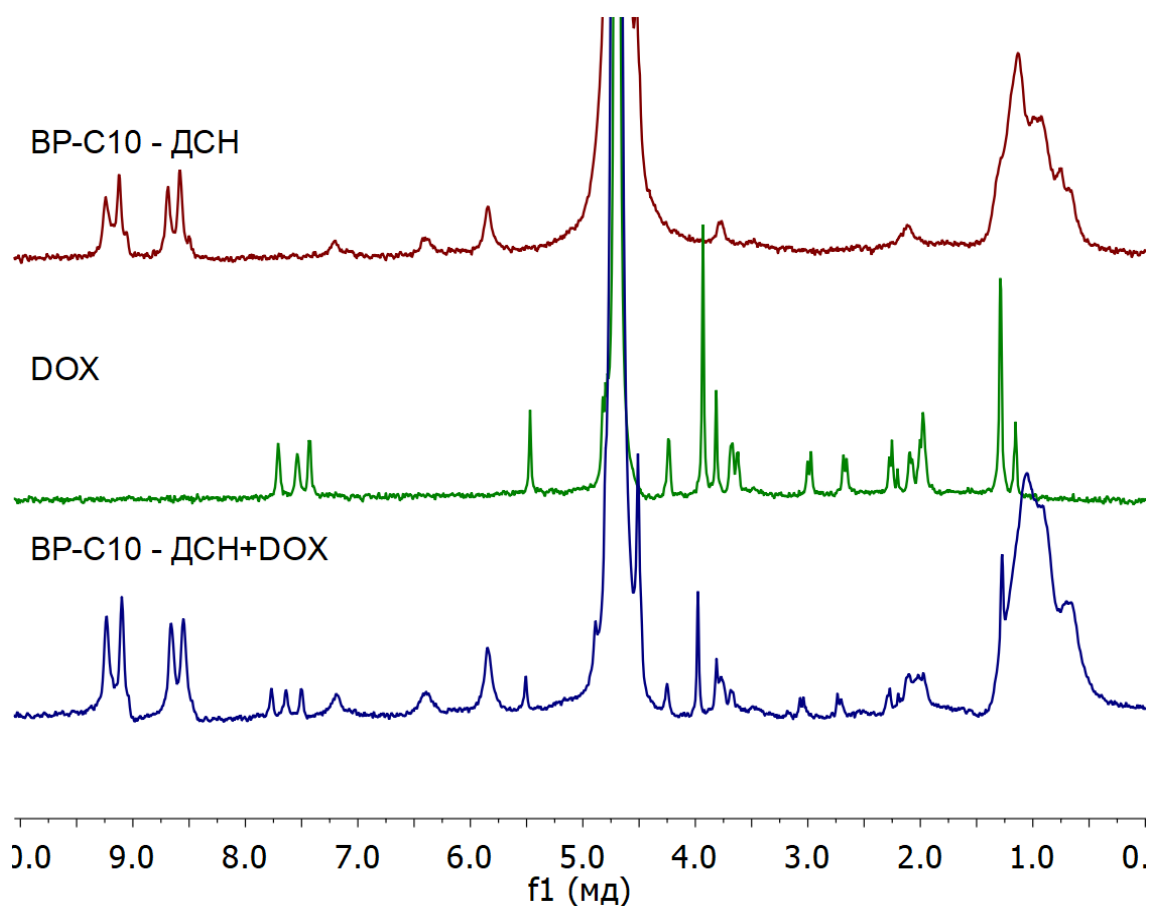


Рисунок А8. ^1H ЯМР спектры растворов **BP-C10:ДСН=1:1**, **DOX** и их смеси.