

На правах рукописи

Васильева Лейсан Альбертовна

**ЛИПИДНЫЕ НАНОКОНТЕЙНЕРЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ
МОНОКАТИОННЫМИ ФОСФОНИЕВЫМИ И ДИКАТИОННЫМИ
АММОНИЕВЫМИ ПАВ С КАРБАМАТНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ:
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ
АКТИВНОСТЬ**

Специальность 1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2023

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

Научный руководитель: кандидат химических наук
Гайнанова Гульнара Ахатовна

Официальные оппоненты: доктор химических наук
Шилова Светлана Владимировна,
профессор кафедры физической и коллоидной химии
Казанского национального исследовательского
технологического университета, г. Казань

кандидат химических наук
Поповецкий Павел Сергеевич,
старший научный сотрудник, заведующий
лабораторией химии экстракционных процессов
Института неорганической химии им. А.В. Николаева
Сибирского отделения Российской академии наук, г.
Новосибирск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки **Институт органической химии им. Н.Д.
Зелинского Российской академии наук,** г. Москва

Защита диссертации состоится **«31» января 2024 года в 14 часов 30 минут** на заседании диссертационного совета 24.1.225.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, большой конференц-зал.

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

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

Автореферат разослан «11» декабря 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного
совета, кандидат химических наук



Торопчина А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Использование супрамолекулярных систем, в том числе на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ), для формирования наноразмерных систем доставки лекарств является динамично развивающейся областью современных фундаментальных и прикладных исследований. Широкое практическое применение ПАВ обусловлено их способностью адсорбироваться на границе раздела фаз, самопроизвольно образовывать агрегаты выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) и солубилизировать гидрофобные соединения. Выбор амфифилов определяется в первую очередь поставленными целями. Преимущества катионных ПАВ в биомедицинской сфере обусловлены сродством к отрицательно заряженным поверхностям, а неионные амфифилы характеризуются низкой токсичностью. Особый интерес представляют монокатионные ПАВ с объемной головной группой и дикатионные ПАВ за счет ярко выраженной поверхностной активности по сравнению с классическими катионными амфифилами. Поиск путей оптимизации структуры амфифилов (синтез новых гомологических серий ПАВ с различными функциональными группами) и состава мицеллярных систем (комбинация нескольких типов ПАВ) является одним из ключевых направлений создания супрамолекулярных систем с оптимальным балансом между высокой функциональной активностью и низкой токсичностью. Кроме того, амфифильная природа ПАВ позволяет интегрировать их в липидные формулировки, не прибегая к синтетическим манипуляциям и тем самым создавая новый тип наноконтейнеров с регулируемыми свойствами. Стратегия нековалентной модификации липосом с использованием ПАВ требует тщательного подбора компонентов и их соотношения, а также глубокого анализа полученных результатов для выявления системы-лидера.

Степень разработанности темы исследования. Наиболее изученным типом липидных наноконтейнеров являются липосомы преимущественно за счет биосовместимости и универсальности в контексте природы загружаемого в наночастицы вещества. Несмотря на то, что первое упоминание о липосомах датируется 60-ми годами двадцатого века, интерес к ним несколько не угас, более того, многолетние исследования привели к появлению разнообразных по свойствам и применению подтипов липосом, таких как инвасомы, этосомы, трансферсомы, трансэтосомы и т.д., которые обладают улучшенной способностью преодолевать различные биологические барьеры. Наряду с этим, органелл-специфическая направленность липосом, в частности, митохондриально-направленная доставка лекарств, стала новой вехой в эволюции наноконтейнеров. Митохондрии являются одними из наиболее важных органелл клетки, отвечающих за широкий ряд функций и поддерживающих их жизнедеятельность. Известна ведущая роль митохондрий в патогенезе онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Катион трифенилфосфония является одним из самых известных митотропных лигандов, однако упоминания о влиянии гомологической серии амфифильных фосфониевых ПАВ на физико-химические свойства и биологическую активность липосом в литературе отсутствуют, и большинство исследований сосредоточено на ковалентной модификации наноконтейнеров, преимущественно полимерной природы. В данном контексте применение ПАВ для придания нацеливающих свойств липосомам представляется новым, малоизученным, но перспективным направлением.

Целью работы является создание наноконтейнеров с улучшенной способностью преодолевать биологические барьеры за счет нековалентной модификации катионными и неионными ПАВ, оценка их физико-химических характеристик и установление закономерностей влияния структурных параметров на функциональную активность *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна работы:

1. Сформированы смешанные мицеллярные системы на основе катионного ПАВ гексадецилтрифенилфосфоний бромида и неионного ПАВ Бридж®35, обладающие низкими порогами агрегации и высокой солюбилизационной активностью по отношению к модельному красителю Оранж ОТ и нестероидному противовоспалительному препарату индометацину.

2. Исследованы агрегационные, солюбилизационные и антимикробные свойства новых дикаатионных геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами и додекановым спейсером. Проведен сравнительный анализ ключевых характеристик гомологических серий геминальных амфифилов, различающихся длиной спейсерного фрагмента ($n-12-n(\text{Et})$ и $n-6-n(\text{Et})$).

3. Впервые показано, что трансдермальная доставка формулированного пралидоксима хлорида совместно с внутривенным введением антидота приводит к увеличению выживаемости крыс, отравленных летальной дозой параоксона, с 55% до 90%.

4. Осуществлена нековалентная модификация липосом алкилтрифенилфосфоний бромидами для лечения резистентных к традиционным видам химиотерапии онкологических заболеваний. Установлено, что цитотоксическое действие загруженного в катионные липосомы ротенона по отношению к клеточной линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки (HuTu 80) увеличивается в 40 раз с индексом селективности, равным 307.

5. Получены липосомы, модифицированные тетрадецилтрифенилфосфоний бромидом и новыми геминальными карбаматсодержащими ПАВ, с двойной загрузкой субстратов (α -токоферол и донепезила гидрохлорид) для интраназальной терапии трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера. Показано улучшение когнитивных функций и снижение уровня амилоидных отложений в гиппокампе и энторинальной коре головного мозга трансгенных животных.

Методы исследования. Результаты, представленные в диссертационной работе, получены с использованием широкого комплекса физико-химических методов, включающего тензиометрию, кондуктометрию, динамическое и электрофоретическое рассеяние света, флуориметрию, спектрофотометрию, просвечивающую электронную микроскопию, проточную цитометрию, оптическую, флуоресцентную и конфокальную микроскопию, высокоэффективную жидкостную хроматографию.

Теоретическая и практическая значимость. Важные с фундаментальной точки зрения результаты работы состоят в расширении банка данных по значениям порогов агрегации, солюбилизационной емкости и антимикробной активности индивидуальных и смешанных композиций с участием катионных ПАВ. Установленные корреляции «структура-свойство» для фосфониевых и карбаматсодержащих аммониевых амфифилов позволяют наметить дальнейшие практически важные шаги по синтезу катионных ПАВ и формированию смешанных композиций с оптимальным балансом между функциональной активностью и токсичностью. Разработаны протоколы по формированию мультифункциональных катионных липосом, в которых ПАВ

играют роль не только агентов, придающих положительный заряд, но и лигандов, обладающих либо нацеливающими свойствами, либо терапевтическим действием.

На защиту выносятся:

1. Закономерности изменения агрегационной и солюбилизующей способности смешанных мицеллярных систем на основе неионного амфифила Бридж®35 и катионного ПАВ гексадецилтрифенилфосфоний бромида при варьировании мольной доли компонентов.

2. Оценка влияния длины углеводородного радикала дикатионных карбаматсодержащих геминальных ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом на агрегационные, солюбилизационные и антимикробные свойства.

3. Оценка влияния доли фосфониевых и карбаматсодержащих геминальных ПАВ в составе липосом на значения дзета-потенциала, стабильность наноконтейнеров, кинетику и механизм высвобождения субстратов с использованием математических моделей Корсмейера-Пеппаса, Хигучи и первого порядка.

4. Оптимизация состава ультрадеформируемых липосом и определение их потенциала для лечения острого отравления ФОС.

5. Результаты оценки способности липосом, модифицированных алкилтрифенилфосфоний бромидами, колокализироваться с митохондриями клеток и увеличивать цитотоксичность ротенона в рамках терапии онкологических заболеваний.

6. Установление способности катионных липосом, модифицированных тетрадецилтрифенилфосфоний бромидом и карбаматсодержащими геминальными ПАВ, замедлять развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей *in vivo*.

Обоснованность и достоверность полученных результатов, обсуждаемых в диссертационной работе, обусловлены применением широкого комплекса физико-химических методов и подтверждаются высокой степенью согласования экспериментальных данных, полученных разными методами. Результаты работы интерпретированы в рамках современных теоретических представлений, не противоречат имеющимся литературным данным, опубликованы в рецензируемых профильных и междисциплинарных журналах.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на Всероссийских и Международных конференциях: Марковниковском конгрессе по органической химии (Казань, 2019); I, II, IV Школах-конференциях для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2019, 2020, 2022); II Научной конференции «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений» (Казань, 2020); Симпозиуме «Нековалентные взаимодействия в синтезе, катализе и кристаллохимическом дизайне» (Томск, 2021); XXIII Международной конференции по химической термодинамике в России (Казань, 2022); XXXIV Симпозиуме «Современная химическая физика» (Туапсе, 2022); VI Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (IC CСРСМ), посвященной 125-летию со дня рождения П.А. Ребиндера (Казань, 2023).

Публикации. Материал, представленный в диссертационной работе, опубликован в 10 статьях в журналах, входящих в перечень, рекомендуемый ВАК РФ, и 10 тезисах докладов.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы, списка условных обозначений и сокращений, приложения (277 литературных ссылок на публикации отечественных и зарубежных авторов). Общий объем диссертации составляет 176 страниц, включая 30 таблиц, 63 рисунка. Объем приложения 2 страницы.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных по теме диссертационной работы, участии в постановке задач, разработке плана исследования, в получении, обработке, анализе и визуализации результатов физико-химических исследований, анализе результатов биологических экспериментов, а также в подготовке экспериментального материала к публикации в периодических изданиях. Экспериментальные данные, включающие определение порогов агрегации ПАВ, характеристику водных и гелевых форм наноконтейнеров, эффективность инкапсулирования гидрофобных и гидрофильных субстратов в липосомы, анализ кинетики высвобождения субстратов из липосом с использованием математических моделей, результаты микроскопических съемок культур клеток методом конфокальной микроскопии, получены соискателем самостоятельно.

Автор выражает искреннюю благодарность руководителю диссертационной работы с.н.с. Гайнановой Г.А., а также руководителю лаборатории Высокоорганизованных сред г.н.с. Захаровой Л.Я. за помощь в инициировании, координации и развитии исследований; н.с. Кузнецову Д.М. и научной группе профессора Галкиной И.В. за синтез катионных ПАВ; руководителю Международного научно-инновационного Центра нейрoхимии и фармакологии Петрову К.А. и с.н.с. Волошиной А.Д. за проведение биологических экспериментов; с.н.с. Самигуллину Д.В. и н.с. Сибгатуллиной Г.В. за помощь в проведении исследований по колокализации наночастиц с митохондриями клеток; и.о. г.н.с. Горшковой Т.А. и н.с. Петровой А.А. за проведение исследований по оценке проникающей способности наноконтейнеров через клеточные мембраны растительного происхождения; директору Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» Евтюгину В.Г. за проведение исследований на просвечивающем электронном микроскопе.

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором рассмотрены современные направления исследований в области высокоорганизованных сред на основе

катионных амфифилов с фокусом на ПАВ с объемной головной группой и геминальные амфифилы, а также описано современное состояние научных разработок липосомальных формуляций, включая стратегии их модификации амфифильными молекулами для доставки лекарственных препаратов.

Вторая глава включает описание приготовления исследуемых образцов и проведения физико-химических измерений различными методами, а также характеристики использованных в работе коммерческих реагентов и синтезированных соединений.

Третья глава содержит обсуждение полученных результатов. Диссертационная работа выстроена путем усложнения полученных супрамолекулярных систем от изучения закономерностей агрегации монокатионных фосфониевых и дикатионных аммониевых ПАВ в водных растворах до оптимизации состава модифицированных липидных наноконтейнеров. В качестве ключевых этапов исследования выделены «синтез новых амфифильных соединений – агрегация ПАВ – нековалентная модификация липидных наноконтейнеров амфифилами – определение их физико-химических характеристик – оценка эффективности липосом в экспериментах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*».

Смешанные мицеллярные системы на основе катионного ПАВ гексадецилтрифенилфосфоний бромида и неионного ПАВ Бридж®35

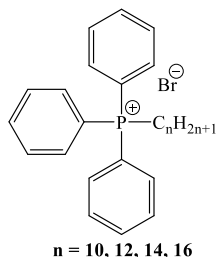


Рисунок 1. Структурная формула *n*-алкилтрифенилфосфоний бромидов (ТФФБ-*n*).

В диссертационной работе исследованы индивидуальные и смешанные композиции на основе катионного ПАВ гексадецилтрифенилфосфоний бромида (ТФФБ-16) (рис. 1) и неионного амфифила Бридж®35. Выбор объектов исследования основан на высокой поверхностной и функциональной активности катионных ПАВ с трифенилфосфониевой головной группой, и комбинация их с неионными ПАВ может привести к улучшению физико-химических и адсорбционных свойств (за счет катионного ПАВ) и к уменьшению токсичности всей системы (за счет неионного ПАВ). Основная задача данной части работы

состояла в определении оптимального содержания катионного ПАВ ТФФБ-16, поэтому изотермы поверхностного натяжения получены при варьировании мольной доли катионного ПАВ (α_1) в следующих пределах: $\alpha_1 = 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1$. Согласно данным, представленным в таблице 1, значения ККМ индивидуальных систем на основе Бридж®35 и ТФФБ-16 достаточно близки (0.08 и 0.10 мМ соответственно), а в смешанных системах наблюдается синергетический эффект, выражающийся в снижении ККМ (0.04, 0.05, 0.06 мМ) по мере возрастания содержания катионного ПАВ. Добавление неионного ПАВ, вероятно, способствует снижению электростатического отталкивания между головными группами ТФФБ-16. Для всех изученных смесей ККМ ниже значений, рассчитанных по уравнению Клинга, что наиболее выражено при мольной доле ТФФБ-16, равной 0.3 и 0.5 (табл. 1).

По изотермам поверхностного натяжения были рассчитаны термодинамические параметры процессов адсорбции и мицеллообразования. Согласно данным, представленным в таблице 1,

Таблица 1. Значения ККМ и термодинамических параметров адсорбции и мицеллообразования: максимальная адсорбция (Γ_{max}), минимальная поверхность в расчете на молекулу ПАВ (A_{min}) и свободная энергия мицеллообразования (ΔG_m) для смешанных систем ТФФБ-16/Бридж®35 в условиях варьирования доли катионного ПАВ (α_1 – доля катионного ПАВ), 25 °С.

α_1	ККМ, мМ		$\Gamma_{max} \cdot 10^6$, моль/см ²	A_{min} , нм ²	$-\Delta G_m$, кДж/моль
	Эксперимент	Расчет			
0	0.08	-	1.17	1.42	46.2
0.3	0.04	0.085	1.19	1.39	49.6
0.5	0.05	0.089	1.19	1.39	48.5
0.7	0.06	0.093	1.23	1.35	47.6
1	0.10	-	1.49	1.12	45.1

Одним из высокочувствительных методов исследования свойств коллоидных систем является флуориметрия. Данный метод предоставляет возможность изучить не только пороги агрегации ПАВ, но и предполагаемую морфологию мицелл (по анизотропии (r) 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГ)) и числа агрегации (N_{agr}). Пороги формирования агрегатов в смешанных системах на основе ТФФБ-16/Бридж®35 снижаются по сравнению со значениями ККМ индивидуальных ПАВ с минимальным значением для $\alpha_1 = 0.5$ (табл. 2). Стоит заметить, что этот результат хорошо согласуется с тензиометрическими данными (табл. 1). Показано, что по мере увеличения мольной доли ТФФБ-16 в системе значения чисел агрегации уменьшаются и для ТФФБ-16 равны 9. Из-за объемной головной группы ТФФБ-16 в агрегаты может включиться гораздо меньше мономеров по сравнению с неионными ПАВ (табл. 2).

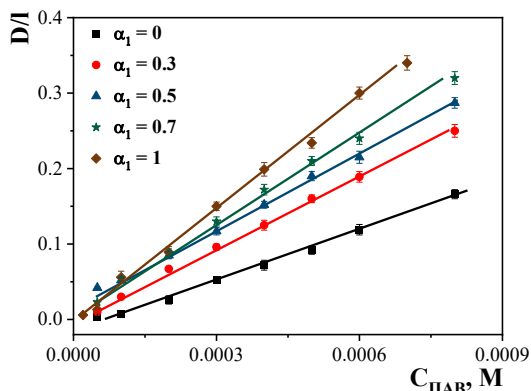


Рисунок 2. Зависимость приведенной оптической плотности насыщенных растворов Оранж ОТ при максимуме поглощения (495 нм) от общей концентрации ПАВ для системы ТФФБ-16/Бридж®35 (α_1 – доля катионного ПАВ), 25 °С.

значения ΔG_m являются отрицательными, что свидетельствует о том, что процесс мицеллообразования в смешанной системе термодинамически выгоден и протекает самопроизвольно. Важно отметить, что абсолютные значения ΔG_m достигают максимума при $\alpha_1 = 0.3$ и 0.5 , что согласуется с минимальными значениями ККМ для указанных α_1 .

Таблица 2. Значения ККМ, чисел агрегации и анизотропии ДФГ, определенные методом флуориметрии, для системы ТФФБ-16/Бридж®35 с различной мольной долей катионного ПАВ (α_1 – доля катионного ПАВ), 25 °С.

α_1	0	0.3	0.5	0.7	1
ККМ _{флуор} , мМ	0.08	0.06	0.05	0.06	0.10
N_{agr}	35	14	12	6	9
r	0.060	-	0.089	-	0.120

Способность ПАВ солюбилизовать гидрофобные субстраты, включая лекарственные вещества, является одним из важных свойств амфифильных соединений. В рамках исследования смешанной системы ТФФБ-16/Бридж®35 в качестве солюбилизаторов были выбраны модельный краситель Оранж ОТ (ООТ) и нестероидный противовоспалительный препарат индометацин (ИНД). Как видно из зависимостей на рисунке 2, для всех систем наблюдается резкий рост солюбилизации ООТ после образования в растворе мицеллярных агрегатов, что позволяет определить значения

ККМ и солюбилизационной емкости (S). Установлено, что в системе ТФФБ-16/Бридж®35 наблюдается снижение значений ККМ до 0.05 мМ при $\alpha_1 = 0.3$ и 0.7 (табл. 3), что подтверждает рассуждения о появлении синергизма при смешивании катионного и неионного ПАВ. Оптимальным значением мольной доли катионного ПАВ, при котором солюбилизационная емкость смешанных систем равна 0.022 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ}, является $\alpha_1 = 0.7$ (табл. 3). Стоит отметить, что в этом случае в системе катионного ПАВ на 30% меньше, однако солюбилизационная емкость сравнима со значениями для индивидуальной системы на основе ТФФБ-16.

Таблица 3. Значения солюбилизационной емкости по отношению к Оранж ОТ и индометацину, определенные методом спектрофотометрии, для системы ТФФБ-16/Бридж®35 с различной мольной долей катионного ПАВ (α_1 – доля катионного ПАВ).

α_1	0	0.3	0.5	0.7	1
ККМ _{спектр} , мМ*	0.10	0.05	0.05	0.05	0.10
S _{ООТ} , моль _{ООТ} /моль _{ПАВ}	0.013	0.018	0.019	0.022	0.028
S _{ИНД} , моль _{ИНД} /моль _{ПАВ}	0.027	0.196	0.385	0.380	0.399

*Значения ККМ, определенные по зависимостям оптической плотности насыщенных растворов ООТ от общей концентрации ПАВ.

Агрегационная, солюбилизационная и антимикробная активность дикатионных геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами

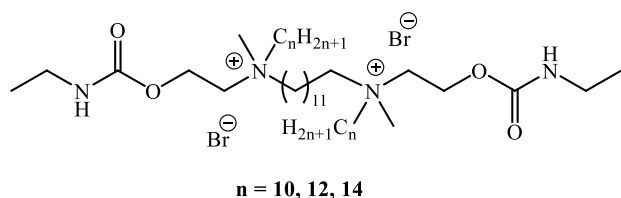


Рисунок 3. Структурная формула N,N'-диалкил-N,N'-бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)-N,N'-диметилдодекан-1,12-диаммоний дибромидов (n-12-n(Et)).

является одобренным лекарственным препаратом карбаматного типа для лечения нейродегенеративных заболеваний, что обуславливает перспективность использования геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами в качестве модификаторов липосом при дизайне наноконтейнеров для лекарственных препаратов в рамках терапии болезни Альцгеймера. Методами тензиометрии, кондуктометрии и флуориметрии были определены пороги агрегации гомологической серии геминальных ПАВ. Изотермы поверхностного натяжения для n-12-n(Et) представлены на рисунке 4. Показано, что увеличение длины алкильных цепей ПАВ приводит к уменьшению значений ККМ (1, 0.11 и 0.013 мМ для 10-12-10(Et), 12-12-12(Et), 14-12-14(Et) соответственно).

Установлено, что значения солюбилизационной емкости для геминальных ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом в отношении ООТ выше, чем для геминальных

карбаматсодержащих ПАВ n-6-n(Et): 0.015, 0.024, 0.032 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ} для 10-6-10(Et), 12-6-12(Et), 14-6-14(Et) соответственно¹ и 0.021, 0.029, 0.047 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ} для 10-12-10(Et), 12-12-12(Et), 14-12-14(Et) соответственно. Причем это различие наиболее отчетливо наблюдается для 14-12-14(Et), что может указывать на благоприятную ориентацию додеканового спейсера, обеспечивающую увеличение солюбилизационной активности 14-12-14(Et) в 1.5 раза. Как и в случае с ООТ, увеличение длины углеводородных радикалов ПАВ приводит к возрастанию значений солюбилизационной емкости в отношении индометацина (0.013, 0.064, 1.51 моль_{IND}/моль_{ПАВ} для 10-12-10(Et), 12-12-12(Et), 14-12-14(Et) соответственно).

На следующем этапе была протестирована антимикробная активность геминальных ПАВ в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов (табл. 4). Выявлено, что значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) карбаматсодержащих ПАВ зависят от длины углеводородных радикалов с максимумом для 10-12-10(Et). Стоит отметить, что ципрофлоксацин на два порядка менее эффективен по отношению к метициллин-резистентному штамму MRSA-1, чем 10-12-10(Et).

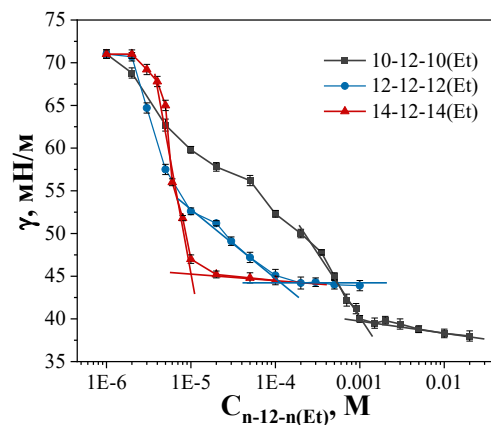


Рисунок 4. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов геминальных карбаматсодержащих ПАВ, 25 °С.

Таблица 4. Антибактериальная и противогрибковая активность геминальных карбаматсодержащих ПАВ.

n-12-n(Et)	Грамположительные бактерии					Грамотрицательные бактерии	
	МИК, мкг/мл						
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ef</i>	<i>MRSA-1</i>	<i>MRSA-2</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>
10-12-10(Et)	0.5±0.03	0.5±0.04	0.5±0.03	0.5±0.03	0.5±0.03	0.5±0.03	1.9±0.1
12-12-12(Et)	0.9±0.07	7.8±0.6	1.9±0.1	1.9±0.1	0.9±0.07	15.6±1.3	125±9
14-12-14(Et)	3.9±0.2	125±10	3.9±0.3	7.8±0.6	7.8±0.7	31.3±2.5	125±10
Ципрофлоксацин ¹	0.5±0.03	0.5±0.04	3.9±0.3	125±11	0.9±0.07	0.5±0.03	0.5±0.03
МБК, мкг/мл							
10-12-10(Et)	0.5±0.04	0.5±0.03	0.5±0.04	1.9±0.1	3.9±0.3	0.5 ± 0.03	3.9±0.3
12-12-12(Et)	0.9±0.07	15.6±1.3	3.9±0.2	1.9±0.1	0.9±0.06	15.6±1.2	125±10
14-12-14(Et)	3.9±0.3	125±9	3.9±0.2	7.8±0.6	7.8±0.7	31.3±2.6	125±10
Ципрофлоксацин ¹	0.5±0.03	0.5±0.04	3.9±0.3	125±11	0.9±0.07	0.5±0.03	0.5±0.03
n-12-n(Et)	Грибы						
	МИК, мкг/мл			МФК, мкг/мл			
	<i>Ca</i>	<i>Tm</i>	<i>An</i>	<i>Ca</i>	<i>Tm</i>	<i>An</i>	
10-12-10(Et)	0.9±0.07	0.9±0.07	250±19	15.6±1.2	15.6±1.3	> 250	
12-12-12(Et)	3.9±0.3	3.9±0.3	> 250	7.8±0.6	7.8±0.6	> 250	
14-12-14(Et)	250±19	250±19	> 250	250±21	250±18	> 250	
Кетоконазол	3.9±0.3	3.9±0.3	15.6±1.3	3.9±0.3	3.9±0.3	125±10	

Sa – *S. aureus*, *Bc* – *B. Cereus*, *Ef* – *E. Faecalis*, *MRSA-1* и *MRSA-2* – метициллин-резистентные штаммы *S. aureus*, *Ec* – *E. Coli*, *Pa* – *P. Aeruginosa*, *Ca* – *C. albicans*, *Tm* – *T. mentagrophytes*, *An* – *A. niger*.

¹ данные из статьи Pavlov R.V. et al. *Smart Mater. Med.*, **2023**, Vol. 4, P. 123–133. doi:10.1016/j.smaim.2022.09.001.

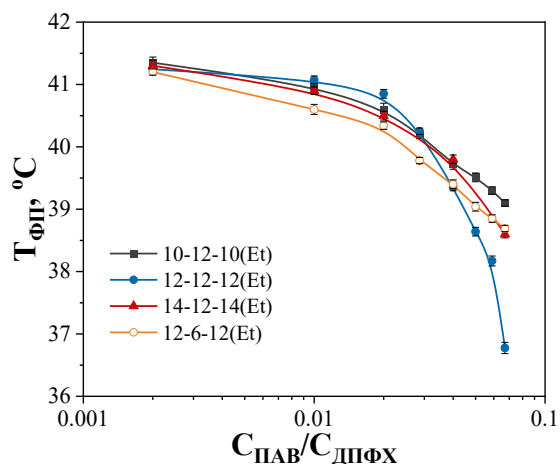


Рисунок 5. Температура фазового перехода ДПФХ в зависимости от мольного соотношения n-12-n(Et)/ДПФХ.

12(Et) сильнее снижает температуру фазового перехода ДПФХ по сравнению с другими гомологами, тогда как 12-6-12(Et) демонстрирует тот же эффект, что 10-12-10(Et) и 14-12-14(Et).

Получение трансферсом для трансдермальной доставки оксима 2-РАМ

Трансферсомы представляют собой липидные наноконтейнеры, способные проникать через поры значительно меньшего размера, чем собственные, что обусловлено их высокой деформируемостью. Трансферсомы исследуются в контексте трансдермальной доставки лекарственных веществ, которая имеет преимущества перед пероральным или внутривенным введением, а именно простота, безболезненность, возможность назначения пациентам, испытывающим трудности с жеванием и глотанием. В рамках диссертационной работы были протестированы трансферсомы классического состава для лечения острого отравления фосфорорганическими соединениями (ФОС) путем трансдермальной доставки реактиватора ацетилхолинэстеразы (АХЭ) прапидоксима хлорида (2-РАМ). В качестве неионного ПАВ для модификации липосом на основе яичного (E PC S) и соевого (S75) фосфатидилхолина (ФХ) выбран Твин®20. Мольное соотношение липид/Твин®20 было проварьировано в ряду 95/5, 85/15, 75/25. Согласно результатам, все полученные системы обладали гидродинамическим диаметром (D_h) в диапазоне от 70 до 120 нм. Распределение размеров трансферсом было высокомономодисперсным, что подтверждают значения индекса полидисперсности (PdI), не превышающие 0.3 даже после 5 месяцев хранения. Частицы были визуализированы с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) (рис. 6). Как видно, размер частиц с четко выраженной сферической формой немного превышает 100 нм.

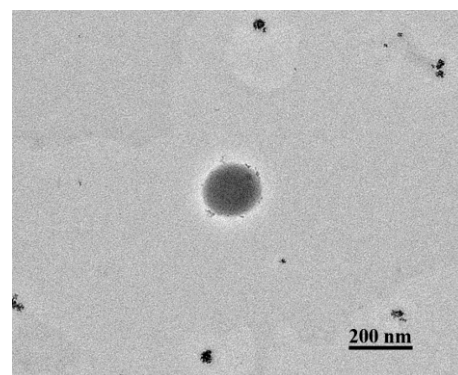


Рисунок 6. ПЭМ-изображение трансферсом на основе E PC S/Твин®20 при мольном соотношении компонентов 95/5 (E-2), 25 °C.

Фосфорорганические соединения угнетают активность фермента АХЭ, что приводит к накоплению в синапсах ацетилхолина. Так как связь между ФОС и АХЭ через некоторое время становится необратимой, начинать введение антидота необходимо безотлагательно. Трансдермальное введение позволяет поддерживать постоянную концентрацию лекарства в крови непосредственно до или во время контакта с ФОС. Комбинация трансдермального введения оксимов с традиционным лечением может расширить «окно» для эффективной терапии острого отравления ФОС и, соответственно, увеличить выживаемость. Поэтому, продолжая работу с известными в литературе липосомами, модифицированными неионными ПАВ, в трансферсомы был загружен оксим 2-РАМ. Поскольку состав трансферсом был уже оптимизирован, модификация липосом была осуществлена с включением 20% Твин®20. Трансферсомы обладали высокой монодисперсностью с гидродинамическим диаметром приблизительно 100 нм. Дзета-потенциал (ζ) липосом при модификации их молекулами Твин®20 менялся незначительно, даже спустя несколько месяцев хранения. Эффективность инкапсулирования (ЕЕ) 2-РАМ была выше 50% как для обычных липосом, так и для трансферсом. Высвобождение 2-РАМ *in vitro* было исследовано с помощью метода диализа в натрий-фосфатном буфере (PBS). Видно, что добавление ПАВ слегка замедляет процесс высвобождения 2-РАМ (рис. 7). Подобное пролонгированное действие может обеспечить равномерное поступление лекарственного вещества в кровь, снижая его токсическое действие. Кривые высвобождения были обработаны с помощью математических моделей Корсмейера-Пеппаса, Хигучи и первого порядка. Анализ линеаризованных кривых, представленных на рисунке 7, показывает, что модели Корсмейера-Пеппаса и первого порядка лучше описывают экспериментально полученные точки, о чем свидетельствуют высокие значения коэффициента корреляции ($R^2 \geq 0.95$), тогда как для модели Хигучи значения R^2 ниже 0.72. Согласно значениям диффузионной экспоненты (n), высвобождение 2-РАМ осуществляется посредством диффузии, подчиняющейся первому закону Фика ($n = 0.23 \pm 0.04$).

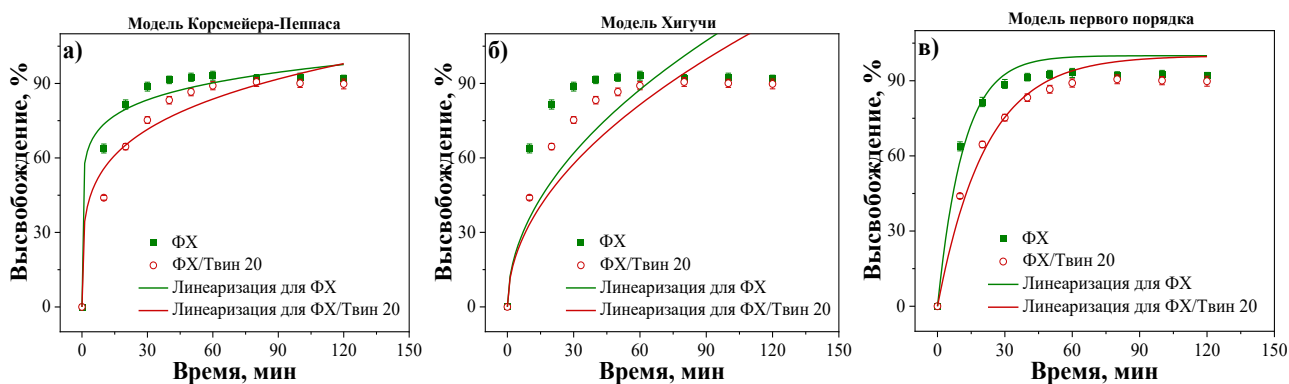


Рисунок 7. Кривые высвобождения 2-РАМ из липосом и трансферсом *in vitro*, аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса, б) Хигучи и в) первого порядка, PBS (0.025 M), pH = 7.4, 37 °C.

Оценка способности проникновения лекарств через кожу с использованием ячеек Франца является ключевым этапом исследования систем для дермальной или трансдермальной доставки лекарств. На рисунке 8 представлены кривые высвобождения формулированного 2-РАМ через кожу крыс линии Вистар. Установлено, что включение в состав везикул ПАВ увеличивает концентрацию 2-РАМ, проникающую через кожу крыс, по сравнению с обычными липосомами.

Для дальнейшей оценки эффективности трансферсом *in vivo* была разработана гелевая форма везикул с использованием Carbopol®940. Для определения уровня реактивации ацетилхолинэстеразы в крови *in vivo* были протестированы несколько форм 2-РАМ. Согласно результатам, гелевая форма ФХ/Твин®20 показала статистически значимый уровень реактивации АХЭ ($23.65 \pm 7.23\%$, $p = 0.005$) через 6 ч после нанесения формулировки на кожу крыс, тогда как гелевая форма свободного 2-РАМ практически не проявляла активности (4.46 ± 9.30 , $p = 0.483$). После того, как было показано, что 2-РАМ в трансферсомах эффективно реактивирует АХЭ в эритроцитах, была проведена оценка выживаемости крыс, отравленных летальной дозой параоксона, после лечения их гелевой формой трансферсом с 2-РАМ. Согласно полученным результатам, трансдермальное и внутривенное введение 2-РАМ по отдельности является недостаточным для достижения высокой степени выживаемости крыс (40% и 55% соответственно), тогда как профилактическое введение 2-РАМ, загруженного в трансферсомы, через кожу в сочетании с традиционным методом лечения повышало выживаемость крыс до 90%.

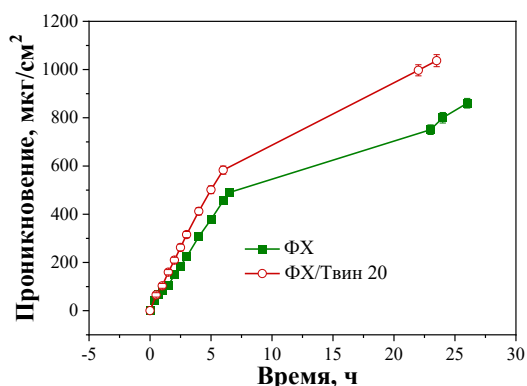


Рисунок 8. Проникновение 2-РАМ, загруженного в трансферсомы, через кожу крыс линии Вистар (мкг/см²), PBS (0.025 M), pH = 7.4, 34 °C.

Липосомы, нековалентно модифицированные ПАВ с трифенилфосфониевой головной группой, для терапии онкологических заболеваний

В настоящее время большое внимание уделяется митохондриям как ключевым мишеням для лечения целого ряда серьезных заболеваний. Предполагается, что комбинация митотропных агентов с традиционными химиотерапевтическими препаратами (доксорубин, паклитаксел) или блокаторами окислительного фосфорилирования (ротенон, антимицин А, олигомицин) может стать эффективной стратегией запуска апоптоза опухолевых клеток. В диссертационной работе апробирована методика нековалентной модификации липидных наноносителей гомологической серией ПАВ с трифенилфосфониевой головной группой. Изучение способности катионных ПАВ модулировать свойства липосом начали с подбора оптимального гомолога ТФФБ-*n* и его концентрации в липосомах на основе липида ДПФХ. Показано, что увеличение гидрофобности амфифильных производных трифенилфосфония приводит к увеличению дзета-потенциала липосом с +6 мВ (для немодифицированных липосом) до +50-60 мВ в случае ТФФБ-12 и ТФФБ-14. Для инкапсулирования доксорубина (DOX) были выбраны две системы: немодифицированные липосомы и модифицированные ТФФБ-14 липосомы при мольном соотношении липид/ПАВ 35/1. Установлено, что модифицированные липосомы с DOX стабильны в течение четырех месяцев, в то время как липосомы на основе ДПФХ, загруженные DOX, разрушаются через 2 недели.

На следующем этапе исследования разработанные формулировки были оптимизированы путем замены ДПФХ на соевый ФХ и холестерин. Одной из основных причин подобных изменений в составе липосом является высокая стоимость ДПФХ, поэтому применение этого липида может оказаться нецелесообразным с экономической точки зрения. На данном этапе

работы внимание было сосредоточено на более широком ряде гомологов ТФФБ-*n*, а именно на ТФФБ-10, ТФФБ-12, ТФФБ-14, ТФФБ-16, и на трех мольных соотношениях (ФХ/Хол)/ПАВ (50/1,

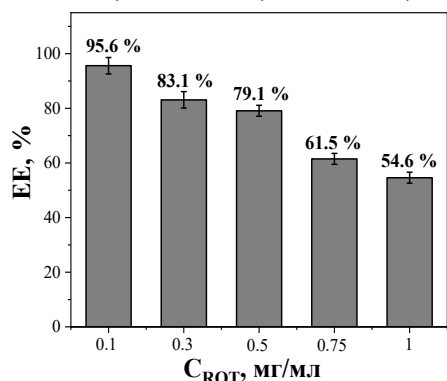


Рисунок 9. Значения эффективности инкапсулирования ROT в липосомах ФХ/Хол/ТФФБ-14 при мольном соотношении компонентов 50/1, 25 °С.

моделями, а именно моделями Корсмейера-Пеппаса и Хигучи (рис. 10). Модель Корсмейера-Пеппаса лучше описывает профили высвобождения ROT из модифицированных липосом по сравнению с моделью Хигучи, поскольку коэффициент корреляции (R^2) во всех случаях превышает 0.98. Показано, что увеличение длины алкильного радикала ПАВ приводит к небольшому возрастанию скорости высвобождения ROT, вероятно, из-за разрыхления липидного бислоя. Судя по значениям диффузионной экспоненты, высвобождение ROT из липосом на основе ФХ/Хол/ТФФБ-*n* осуществляется по механизму диффузии, не подчиняющемуся первому закону Фика ($0.45 < n < 0.89$), то есть при высвобождении наблюдается комбинация механизмов диффузии субстрата и дестабилизации фосфолипидного бислоя липосом.

Далее проведено изучение способности липосом, загруженных родамином Б (RhB), проникать в клетки и колокализироваться с митохондриями. Качественно степень колокализации липосом с митохондриями опухолевых клеток можно оценить по появлению желтого окрашивания на фотографиях, полученных с помощью конфокального микроскопа. Установлено, что колокализация модифицированных липосом с митохондриями клеток выше по сравнению с немодифицированными липосомами (рис. 11). Для количественного определения степени колокализации липосом с митохондриями был проведен расчет коэффициента корреляции Пирсона для всех клеточных линий. Установлено, что переход от липосом на основе ДПФХ к липосомам с ФХ/Хол позволил увеличить разницу между степенью колокализации

35/1 и 25/1), тогда как соотношение ФХ/Хол было неизменно (9/1). В оптимизированные липосомы был загружен блокатор окислительного фосфорилирования ротенон (ROT). На рисунке 9 показаны значения эффективности инкапсулирования для пяти различных концентраций ROT в липосомах на основе ФХ/Хол/ТФФБ-14 при мольном соотношении липид/ПАВ, равном 50/1. Согласно результатам, наиболее оптимальной загружаемой концентрацией ROT является 0.1 мг/мл.

Далее была оценена скорость высвобождения ROT из модифицированных липосом *in vitro*. Полученные зависимости были обработаны двумя математическими

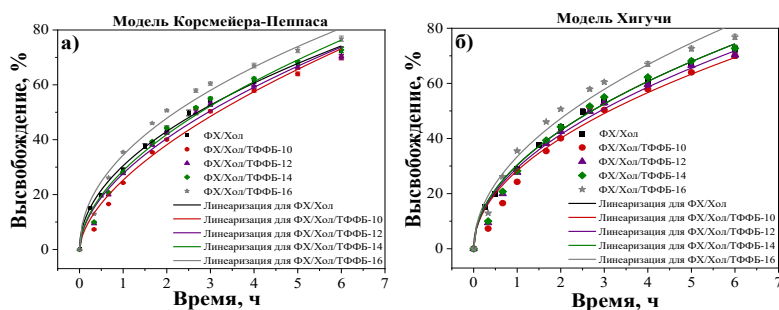


Рисунок 10. Кривые высвобождения ROT из модифицированных липосом при варьировании длины углеводородного радикала ТФФБ-*n* при мольном соотношении 50/1, аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса и б) Хигучи, 37 °С.

модифицированных и немодифицированных липосом с митохондриями с 13% до 65% и с 5% до 52% в случае клеточных линий карциномы поджелудочной железы (PANC-1) и аденокарциномы двенадцатиперстной кишки (HuTu 80) соответственно.

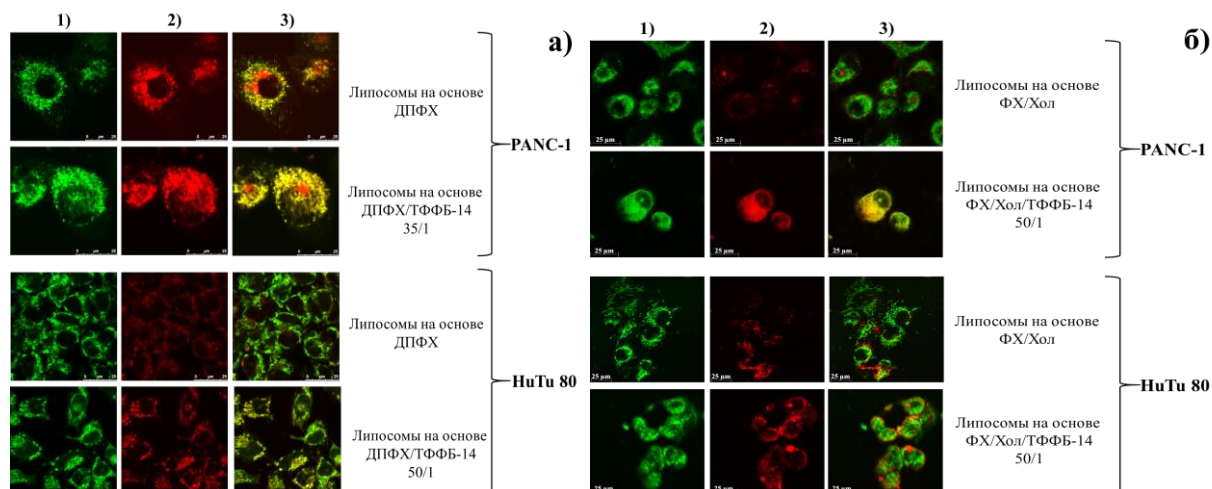


Рисунок 11. Анализ колокализации немодифицированных и модифицированных липосом на основе а) ДПФХ и б) ФХ/Хол с митохондриями опухолевых клеток линии PANC-1 и HuTu 80: 1) флуоресценция красителя MitoTracker Green FM (митохондрии); 2) флуоресценция RhB (липосомы); 3) объединенное желтое изображение указывает на колокализацию двух зондов.

Следующим этапом исследования биологической активности было определение цитотоксичности липосом, загруженных доксорубином и ротеноном, по отношению к опухолевым и нормальным клеточным линиям *in vitro*. Как видно из данных, представленных в таблице 5, свободный ROT проявляет высокую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам ($IC_{50} = 2.8$ мкМ), сопоставимую с цитотоксичностью DOX. Важно отметить, что свободный ROT обладает высоким индексом селективности ($SI = 173$) по отношению к клеточной линии HuTu 80, который увеличивается при инкапсулировании его в липосомы ФХ/Хол/ТФФБ-14 ($SI = 307$). Этот результат указывает на синергический эффект комбинации модифицированных ТФФБ-14 липосом с ROT. Инкапсулирование DOX в модифицированные липосомы также привело к увеличению селективности химиотерапевтического препарата по отношению к клеткам HuTu 80 в 3 раза по сравнению со свободной формой DOX.

Таблица 5. Цитотоксичность и индекс селективности ротенона и доксорубина гидрохлорида в немодифицированных и модифицированных липосомах (мольное соотношение 50/1) по отношению к нормальным и опухолевым клеточным линиям.

Система	IC ₅₀ , мкМ			SI ^{Chang liver/HuTu 80}
	Линии опухолевых клеток		Линия нормальных клеток	
	HuTu 80	PANC-1	Chang liver	
ROT	2.8	>1000	484	173
ФХ/Хол/ROT	5.0	13.2	125	25
ФХ/Хол/ТФФБ-14/ROT	0.07	4.9	21.5	307
DOX	2.6	-	3.0	1.1
ДПФХ/ТФФБ-14/DOX	0.6	-	2.0	3.3

Липосомы, нековалентно модифицированные фосфониевыми ПАВ, для интраназальной терапии трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера

Поскольку на предыдущем этапе исследования было показано, что липосомы, модифицированные ТФФБ-14, обладают улучшенной митотропной активностью, были разработаны катионные липосомы с двойной загрузкой антиоксиданта α -токоферол (ТОС) и ингибитора холинэстеразы донепезила гидрохлорид (DNP) для интраназальной терапии болезни Альцгеймера. Для достижения цели, поставленной в рамках данного направления, были выбраны липосомы классического состава ФХ/Хол с соотношением липид/ПАВ 50/1. Установлено, что включение ТОС в липидный бислои снижает дзета-потенциал модифицированных липосом (табл. 6). Эти различия статистически значимы и наблюдаются как в первый день приготовления липосом, так и через 5 месяцев хранения. Поскольку ТОС является гидрофобным субстратом, можно предположить, что совместное включение антиоксиданта и ТФФБ-14 в липидный бислои создает конкуренцию, и ТОС препятствует включению молекул ПАВ в состав липосом. Обнаружено, что различия в эффективности инкапсулирования ТОС от концентрации липидов не наблюдается (95% для 15 мМ, 96% для 20 мМ и 30 мМ). В случае DNP были обнаружены некоторые различия, а именно, чем выше концентрация липидов, тем выше ЕЕ (63, 65 и 79% для модифицированных липосом ФХ/Хол/ТФФБ-14 с концентрацией липидов 15, 20 и 30 мМ соответственно).

Таблица 6. Физико-химические характеристики и стабильность липосом, модифицированных ТФФБ-14 и загруженных антиоксидантом ТОС, 25 °С.

Система	D _h , нм	PdI	ζ, мВ	D _h , нм	PdI	ζ, мВ
	1 день			5 месяцев		
15 мМ						
ФХ/Хол	107±2	0.071±0.027	-9.2±1.2	116±4	0.116±0.005	-10.6±1.7
ФХ/Хол/ТФФБ-14	105±2	0.109±0.010	+8.2±1.3	115±3	0.114±0.014	+24.3±1.9
ФХ/Хол/ТОС	105±2	0.067±0.012	-1.8±0.8***	114±3	0.115±0.004	-17.0±1.4**
ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14	110±3	0.133±0.011	+6.8±0.4	121±2	0.101±0.010	+22.7±3.4
20 мМ						
ФХ/Хол	108±2	0.078±0.006	-7.6±0.5	116±2	0.085±0.008	-1.6±0.5
ФХ/Хол/ТФФБ-14	110±2	0.193±0.010	+14.3±2.2	115±1	0.114±0.013	+36.6±0.5
ФХ/Хол/ТОС	104±3	0.071±0.01	-2.9±1.4**	116±2	0.101±0.005	-7.9±1.4**
ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14	113±2	0.231±0.015	+11.0±1.0	122±1***	0.105±0.008	+30.5±0.3***
30 мМ						
ФХ/Хол	115±2	0.067±0.015	-4.9±0.5	121±1	0.083±0.012	-5.0±0.9
ФХ/Хол/ТФФБ-14	115±2	0.120±0.01	+23.9±3.4	126±1	0.142±0.029	+35.1±1.4
ФХ/Хол/ТОС	103±2**	0.077±0.005	-3.6±0.7*	158±1***	0.147±0.016	-4.0±0.2
ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14	110±1*	0.148±0.017	+11.3±2.8**	120±1**	0.103±0.021	+27.3±0.9**

*Разница с аналогичной системой без ТОС статистически значима при $p \leq 0.05$; ** при $p \leq 0.01$; *** при $p \leq 0.001$. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного теста ANOVA.

Липосомы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14/DNP, загруженные как ингибитором холинэстеразы DNP, так и антиоксидантом ТОС, были протестированы в качестве системы доставки лекарств для лечения мышей с моделью болезни Альцгеймера. Первый этап был посвящен поведенческому тесту «распознавание нового объекта». Было показано, что в контрольной группе дикого типа (TG-) мыши предпочитали новый объект знакомому с вероятностью $69.4 \pm 4.3\%$ (рис. 12). В

случае контрольной группы трансгенных мышей (TG+) предпочтение нового объекта было значительно ниже ($43.3 \pm 4.8\%$, $p = 0.0006$). В то же время трансгенные мыши, которым интраназально были введены липосомы в течение 21 дня, проявляли интерес к новому объекту с вероятностью $57.1 \pm 2.8\%$, что статистически не отличается от значений для контрольной группы мышей дикого типа ($p = 0.077$) (рис. 12). Важно отметить, что при интраназальном введении липосом, загруженных DNP и ТОС, в течение 21 дня побочных эффектов у мышей выявлено не было.

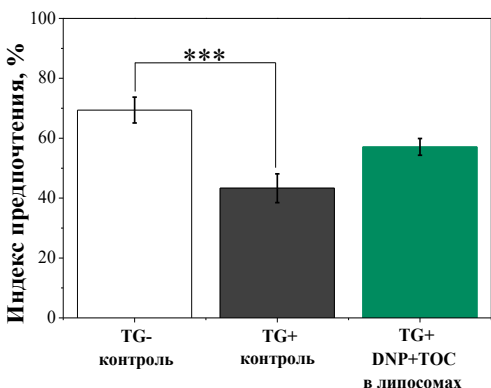


Рисунок 12. Индекс предпочтения в контрольной группе мышей дикого типа (TG-), в контрольной группе трансгенных мышей (TG+) и в группе трансгенных мышей (TG+), которым интраназально вводили липосомы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14/DNP.

загрузкой субстратов среднее количество Аβ бляшек в энторинальной коре было снижено с 5.86 ± 0.46 до 3.72 ± 0.25 ($p = 0.00013$), в зубчатой извилине гиппокампа (DG) – с 2.61 ± 0.31 до 1.41 ± 0.30 ($p = 0.0008$), в области CA1 – с 1.41 ± 0.28 до 0.68 ± 0.29 ($p = 0.012$) (рис. 13а). Средняя площадь Аβ бляшек в энторинальной коре и зубчатой извилине гиппокампа была уменьшена с $0.12 \pm 0.01\%$ до $0.07 \pm 0.01\%$ ($p = 0.0008$) и с $0.09 \pm 0.01\%$ до $0.06 \pm 0.01\%$ ($p = 0.03$) соответственно (рис. 13б).

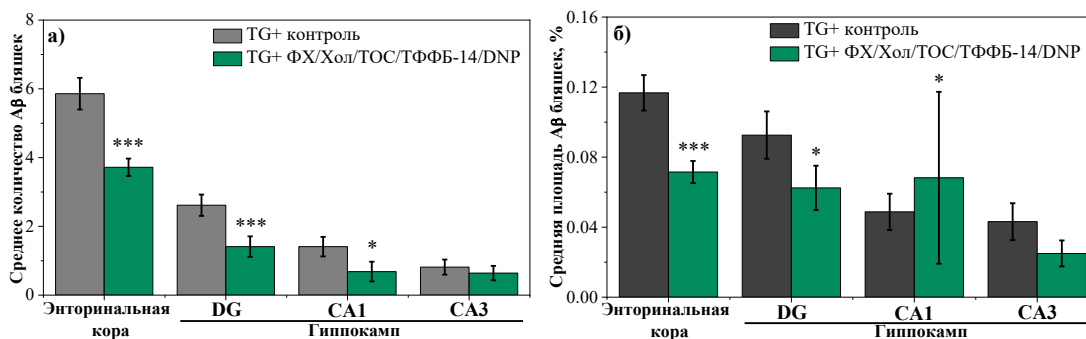


Рисунок 13. а) Среднее количество и б) средний процент общей площади Аβ бляшек в энторинальной коре и гиппокампе головного мозга в контрольной группе трансгенных мышей (TG+) и в группе трансгенных мышей (TG+), которым интраназально вводили липосомы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14/DNP.

Нековалентная модификация липосом дикатионными карбаматсодержащими ПАВ для интраназальной терапии трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера

После подтверждения способности липосом, модифицированных фосфониевыми ПАВ, замедлять развитие болезни Альцгеймера, была осуществлена модификация липосом геминальными ПАВ с фармакофорными карбаматными фрагментами. Липосомы, модифицированные n-12-n(Et) с соотношением липид/ПАВ 35/1, были загружены α-токоферолом и донепезила гидрохлоридом. В случае с ТОС эффективность инкапсулирования для всех систем составила более 90% (табл. 7). Также стоит отметить, что инкапсулирование ТОС способствует

увеличению гидродинамического диаметра липосом. Подобный эффект наблюдался только в случае загрузки гидрофобного субстрата ТОС, что также было показано для некоторых систем, модифицированных фосфониевыми ПАВ (табл. 6), тогда как при загрузке гидрофильного субстрата DNP размер липосом оставался неизменным.

Была проведена оценка способности липосом ФХ/Хол/ТОС/14-12-14(Et) с RhB достигать головного мозга крыс при интраназальном введении. Изображения срезов головного мозга демонстрируют, что интенсивность флуоресценции липосомальной формы RhB значительно выше (рис. 14б) по сравнению со свободной формой зонда (рис. 14а). Вероятно, это различие связано с тем, что модифицированные липосомы способны удерживаться на слизистой оболочке носа в течение более длительного периода времени, в первую очередь, благодаря их высокому положительному дзета-потенциалу.

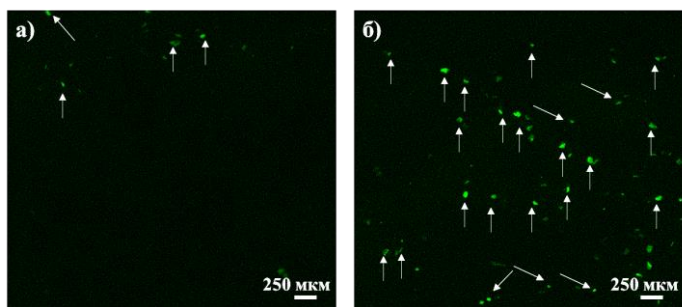


Рисунок 14. Срезы головного мозга крыс: а) после введения свободного RhB; б) после интраназального введения RhB, загруженного в липосомы ФХ/Хол/ТОС/14-12-14(Et).

трансгенных мышей примерно на 22.6% по сравнению с группой, не получавшей лечения (рис. 15а). Более того, индекс предпочтения мышей, которым вводили липосомальную форму лекарственных веществ ($68.7 \pm 4.98\%$), достиг уровня значений здоровых мышей дикого типа (TG-) ($66.8 \pm 9.9\%$). Стоит отметить, что в случае введения липосом с ТФФБ-14 индекс предпочтения увеличивается лишь на $\approx 14\%$, что статистически не отличается от контрольной группы мышей дикого типа (рис. 12) и подтверждает эффективность выдвинутой стратегии по синтезу геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами для двойной загрузки ТОС и DNP. Далее эффективность липосомальной терапии была определена путем подсчета количества Аβ бляшек в области энторинальной коры и гиппокампа головного мозга трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера. Согласно полученным данным, интраназальное введение липосомальной формы ТОС и DNP достоверно снижало количество Аβ бляшек на 37.6%, 40.5% и 72.6% в областях энторинальной коры, зубчатой извилины и СА1 гиппокампа соответственно

Таблица 7. Физико-химические характеристики липосом ФХ/Хол/n-12-n(Et) (35/1), загруженных ТОС и DNP, 25 °С*.

n-12-n(Et)	ЕЕ, %	D _h , нм	PdI	ζ, мВ
ТОС				
10-12-10(Et)	95.8±0.6	142±2	0.124±0.009	+41±2
12-12-12(Et)	91±1	141±2	0.077±0.027	+38±2
14-12-14(Et)	96.1±0.5	132±1	0.081±0.006	+37±2
DNP				
10-12-10(Et)	97.8±0.6	107±1	0.089±0.024	+41±3
12-12-12(Et)	97.9±0.4	109±1	0.090±0.013	+50±2
14-12-14(Et)	98.0±0.5	110±1	0.088±0.005	+40±2

*Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n = 5).

Вышеописанные результаты послужили основой для дальнейших исследований, включающих оценку когнитивных функций мышей с моделью болезни Альцгеймера и количественную оценку Аβ бляшек после интраназального введения липосом с двойной загрузкой субстратов. Согласно результатам, полученным при проведении теста «распознавание нового объекта», введение липосом приводило к повышению индекса предпочтения

по сравнению с контрольной группой мышей с моделью болезни Альцгеймера, не получавшей лечения (рис. 15б).

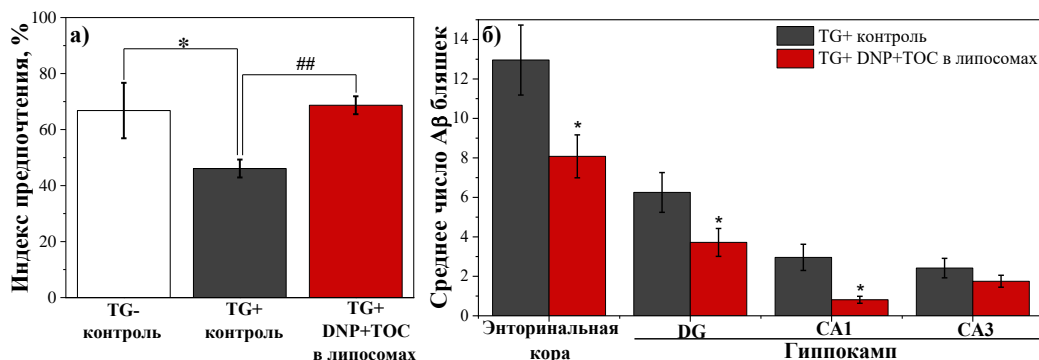


Рисунок 15. а) Индекс предпочтения и б) среднее количество Аβ бляшек в энторинальной коре и гиппокампе головного мозга в контрольной группе мышей дикого типа (TG-), в контрольной группе трансгенных мышей (TG+) и в группе трансгенных мышей (TG+), которым интраназально вводили липосомы ФХ/Хол/ТОС/14-12-14(Et)/DNP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Сформированы смешанные мицеллярные композиции на основе гексадецилтрифенилфосфоний бромида и неионного ПАВ Бридж®35 при варьировании мольной доли компонентов. Комплексом физико-химических методов показано, что переход к смешанным системам способствует снижению порогов агрегации с сохранением высокой солюбилизационной активности по отношению к модельному зонду Оранж ОТ и нестероидному противовоспалительному препарату индометацину.

2. Установлены закономерности самоорганизации новой гомологической серии дикаатионных карбаматсодержащих геминальных ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом. Показано, что увеличение длины гидрофобного радикала приводит к снижению значений критической концентрации мицеллообразования и увеличению солюбилизационной емкости по отношению к Оранж ОТ и индометацину. Изменение антимикробной активности имеет противоположную тенденцию: для децильного гомолога продемонстрирована наиболее высокая активность в отношении широкого ряда бактерий и грибов, включая резистентные штаммы, по ряду показателей превосходящая коммерческие препараты ципрофлоксацин и кетоконазол.

3. Разработан протокол оптимизации состава липидных наноконтейнеров для инкапсулирования биологически активных субстратов различной природы и назначения. Установлена оптимальная концентрация амфифилов для нековалентной модификации липосом и определено влияние различных соотношений липид/ПАВ на физико-химические характеристики наноконтейнеров: гидродинамический диаметр, полидисперсность, дзета-потенциал, скорость высвобождения субстратов. Математическая оценка кинетики высвобождения по модели Корсмейера-Пеппаса позволила установить, что высвобождение субстратов из липидных наноконтейнеров осуществляется посредством диффузии, подчиняющейся первому закону Фика, за исключением процесса высвобождения ротенона, при котором наблюдается комбинация механизмов диффузии и дестабилизации липидного бислоя.

4. Впервые получены ультрадеформируемые липосомы (трансферсомы), для которых в *in vitro* и *ex vivo* тестах показана способность проникать через модельные и клеточные мембраны

животного и растительного происхождения. Разработана гелевая форма трансферсом с использованием Carborol®940, которая исследована *in vivo* для терапии острого отравления фосфорорганическими соединениями. Трансдермальная доставка формулированного пралидоксима хлорида совместно с внутривенным введением антидота приводит к увеличению выживаемости крыс, отравленных летальной дозой параоксона, с 55% до 90%.

5. Получены новые липосомы, модифицированные фосфониевыми ПАВ, для доставки противоопухолевого препарата доксорубина гидрохлорида и блокатора окислительного фосфорилирования ротенона. Для катионных липосом продемонстрирована улучшенная способность проникать в опухолевые клетки и колокализоваться с митохондриями. Установлено увеличение цитотоксичности митохондриального яда в 40 раз и индекса селективности ($SI_{\text{Chang liver/HuTu 80}}$) до 307 при переходе от свободного к формулированному ротенону.

6. Разработан протокол получения стабильных липосомальных систем, нековалентно модифицированных тетрадецилтрифенилфосфоний бромидом и новыми дикатионными карбаматсодержащими геминальными ПАВ, с двойной загрузкой субстратов, антиоксиданта α -токоферола и ингибитора холинэстеразы донепезила гидрохлорида. Показано, что интраназальное введение катионных липосом приводит к восстановлению когнитивных функций мышцей с моделью болезни Альцгеймера, а также замедляет скорость образования бета-амилоидных бляшек в областях энторинальной коры и гиппокампа головного мозга. Сравнительный анализ показал, что модификация липосом геминальными ПАВ является более эффективной для терапии болезни Альцгеймера за счет наличия фармакофорных карбаматных фрагментов в структуре.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Полученные в рамках диссертационной работы корреляции «структура-свойство» для катионных ПАВ являются фундаментом для расширения структурного многообразия амфифилов с целью достижения высокой функциональной активности и низкой токсичности. Апробированный протокол оптимизации состава и исследования липосомальных систем, модифицированных амфифильными соединениями, позволяет наметить дальнейшие шаги по созданию новых липидных наноконтейнеров для увеличения их эффективности. Перспективой развития данной темы является также расширение ряда лекарственных соединений для загрузки в предложенные наноконтейнеры, включая митохондриальные яды (олигомицин, антимицин) и ингибиторы холинэстераз (ривастигмин), с целью достижения более высоких показателей эффективности терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Kuznetsova, D.A. Mitochondria-targeted cationic liposomes modified with alkyltriphenylphosphonium bromides loaded with hydrophilic drugs: preparation, cytotoxicity and colocalization assay / D.A. Kuznetsova, G.A. Gaynanova, **L.A. Vasileva**, G.V. Sibgatullina, D.V. Samigullin, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, I.V. Galkina, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2019. – Vol. 7. – № 46. – P. 7351-7362. <https://doi.org/10.1039/C9TB01853K>.

2. Gaynanova, G. Self-assembling drug formulations with tunable permeability and biodegradability / G. Gaynanova, **L. Vasileva**, R. Kashapov, D. Kuznetsova, R. Kushnazarova, A. Tyryshkina, E. Vasilieva, K. Petrov, L. Zakharova, O. Sinyashin // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 22. – P. 6786. <https://doi.org/10.3390/molecules26226786>.

3. Kuznetsova, D.A. Comparative study of cationic liposomes modified with triphenylphosphonium and imidazolium surfactants for mitochondrial delivery / D.A. Kuznetsova, **L.A. Vasileva**, G.A. Gaynanova, R.V. Pavlov, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, G.V. Sibgatullina, D.V. Samigullin, K.A. Petrov, L.Y. Zakharova, O.G. Sinyashin // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol. 330. – P. 115703. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115703>.

4. **Vasileva, L.A.** Mixed micellar systems – efficient nanocontainers for the delivery of hydrophobic substrates / L.A. Vasileva, R.F. Eyupova, F.G. Valeeva, G.A. Gaynanova, L.Ya. Zakharova // *Russian Chemical Bulletin*. – 2022. – Vol. 71. – № 9. – P. 1897-1906. <https://doi.org/10.1007/s11172-022-3607-y>.

5. **Vasileva, L.A.** Enhanced potato tuber penetration of carboxin *via* ultradeformable liposomes / L.A. Vasileva, G.A. Gaynanova, I.R. Nizameev, A.A. Petrova, M.K. Kadirov, T.A. Gorshkova, L.Ya. Zakharova // *Food Bioscience*. – 2022. – Vol. 50. – P. 102003. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102003>.

6. **Vasileva, L.** Transdermal delivery of 2-PAM as a tool to increase the effectiveness of traditional treatment of organophosphate poisoning / L. Vasileva, G. Gaynanova, I. Zueva, A. Lyubina, S. Amerhanova, D. Buzyurova, V. Babaev, A. Voloshina, K. Petrov, L. Zakharova // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 23. – P. 14992. <https://doi.org/10.3390/ijms232314992>.

7. Zakharova, L. Recent nanoscale carriers for therapy of Alzheimer's disease: Current strategies and perspectives / L. Zakharova, G. Gaynanova, E. Vasileva, **L. Vasileva**, R. Pavlov, R. Kashapov, K. Petrov, O. Sinyashin // *Current Medicinal Chemistry*. – 2023. – Vol. 30. – № 33. – P. 3743-3774. <https://doi.org/10.2174/092986733066622115103513>.

8. **Vasileva, L.** Mitochondria-targeted delivery strategy of dual-loaded liposomes for Alzheimer's disease therapy / L. Vasileva, G. Gaynanova, F. Valeeva, G. Belyaev, I. Zueva, K. Bushmeleva, G. Sibgatullina, D. Samigullin, A. Vyshtakalyuk, K. Petrov, L. Zakharova, O. Sinyashin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 13. – P. 10494. <https://doi.org/10.3390/ijms241310494>.

9. **Vasileva, L.** Synthesis, properties, and biomedical application of dicationic gemini surfactants with dodecane spacer and carbamate fragments / L. Vasileva, G. Gaynanova, F. Valeeva, E. Romanova, R. Pavlov, D. Kuznetsov, G. Belyaev, I. Zueva, A. Lyubina, A. Voloshina, K. Petrov, L. Zakharova // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 15. – P. 12312. <https://doi.org/10.3390/ijms241512312>.

10. **Vasileva, L.A.** Mitochondria-targeted lipid nanoparticles loaded with rotenone as a new approach for the treatment of oncological diseases / L.A. Vasileva, G.A. Gaynanova, D.A. Kuznetsova, F.G. Valeeva, A.P. Lyubina, S.K. Amerhanova, A.D. Voloshina, G.V. Sibgatullina, D.V. Samigullin, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 20. – P. 7229. <https://doi.org/10.3390/molecules28207229>.

11. **Vasileva, L.A.** Cationic liposomes modified with alkyltriphenylphosphonium bromides / L.A. Vasileva, D.A. Kuznetsova, D.I. Bakhtiyarov, G.A. Gaynanova, I.V. Galkina, L.Ya. Zakharova // *Markovnikov Congress on Organic Chemistry*. – Kazan, Russia. – 2019. – June 24-28. – P. 245.

12. **Васильева, Л.А.** Липосомы, модифицированные алкилтрифенилфосфоний бромидами, для инкапсулирования гидрофильных субстратов / Л.А. Васильева, Д.А. Кузнецова, Г.А. Гайнанова, Д.И. Бахтияров, И.В. Галкина, Г.В. Сибгатуллина, Д.В. Самигуллин, К.А. Петров // *I*

Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием). – Казань, Россия. – 2019. – 7-10 Октября. – С. 62.

13. **Васильева, Л.А.** Исследование ко-локализации липосом, модифицированных катионными ПАВ, с митохондриями опухолевых клеток / Л.А. Васильева, Д.А. Кузнецова, Г.А. Гайнанова, Д.И. Бахтияров, И.В. Галкина, Г.В. Сибгатуллина, Д.В. Самигуллин, С.С. Лукашенко, К.А. Петров, Л.Я. Захарова // *II Научная конференция «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений».* – Казань, Россия. – 2020. – 11-13 Ноября. – С. 80.

14. **Васильева, Л.А.** Трансферсомы для инкапсулирования фунгицида карбоксин / Л.А. Васильева, Г.А. Гайнанова, Э.А. Васильева, Ф.Г. Валеева, Л.Я. Захарова // *II Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием).* – Казань, Россия. – 2020. – 19-21 Октября. – С. 67.

15. **Vasileva, L.A.** Ultra-deformable lipid nanocarriers for agricultural application / L.A. Vasileva, G.A. Gaynanova, L.Ya. Zakharova // *Symposium «Non-covalent interactions in crystallo-chemical design and supramolecular chemistry».* – Tomsk, Russia. – 2021. – May 17-20. – P. 419.

16. Pavlov, R.V. Physicochemical characteristics of nanoformulated rotenone / R.V. Pavlov, **L.A. Vasileva**, R.F. Eyupova, G.A. Gaynanova, L.Ya. Zakharova // *XXIII International conference on chemical thermodynamics in Russia.* – Kazan, Russia. – 2022. – August 22-27. – P. 281.

17. **Vasileva, L.A.** Mitotropic activity of liposomes modified with triphenylphosphonium surfactant toward different cancer cell lines / L.A. Vasileva, F.G. Valeeva, G.A. Gaynanova, G.V. Sibgatullina, A.D. Voloshina, D.V. Samigullin, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova // *IV School conference for young scientists “Supramolecular strategies in chemistry, biology, and medicine: Fundamental problems and perspectives” (with international participation).* – Kazan, Russia. – 2022. – October 3-6. – P. 56.

18. **Vasileva, L.A.** The development of multifunctional liposomes for intranasal delivery of donepezil / L.A. Vasileva, G.A. Gaynanova, F.G. Valeeva, I.V. Zueva, K.N. Bushmeleva, A.B. Vyshtakalyuk, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *IV School conference for young scientists “Supramolecular strategies in chemistry, biology, and medicine: Fundamental problems and perspectives” (with international participation).* – Kazan, Russia. – 2022. – October 3-6. – P. 57.

19. **Васильева, Л.А.** Трансдермальная доставка оксимов как новый подход в терапии отравления фосфорорганическими соединениями / Л.А. Васильева, Г.А. Гайнанова, Р.Ф. Эюпова, И.В. Зуева, А.Д. Волошина, К.А. Петров, Л.Я. Захарова // *XXXIV Симпозиум «Современная химическая физика».* – Туапсе, Россия. – 2022. – 16-25 Сентября. – С. 51.

20. **Vasileva, L.A.** Development and optimization of nanoscaled dosage forms with customized properties to overcome biological barriers: micelles, liposomes, transfersomes / L.A. Vasileva, G.A. Gaynanova, F.G. Valeeva, E.A. Romanova, D.M. Kuznetsov, G.P. Belyaev, I.V. Zueva, A.S. Sapunova, A.P. Lyubina, G.V. Sibgatullina, A.D. Voloshina, D.V. Samigullin, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *VI International conference on colloid chemistry and physicochemical mechanics (IC CCPCM), dedicated to the 125th anniversary of the birth of P.A. Rebinder.* – Kazan, Russia. – 2023. – October 23-26. – P. 43.