

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

*На правах рукописи*

**ВАСИЛЬЕВА ЛЕЙСАН АЛЬБЕРТОВНА**

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

1.4.4. ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:  
кандидат химических наук  
**Гайнанова Гульнара Ахатовна**

Казань – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ДИЗАЙН И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ПАВ И ЛИПИДОВ .....	11
1.1. Супрамолекулярные системы на основе амфифильных молекул .....	12
1.1.1. Стратегические подходы в синтезе новых ПАВ .....	13
1.1.2. Факторы, влияющие на агрегационную и функциональную активность ПАВ .....	17
1.1.3. Особенности самоорганизации и функциональной активности фосфониевых ПАВ .....	21
1.1.4. Агрегация дикатионных геминальных ПАВ. Влияние длины алкильных радикалов и спейсерного фрагмента.....	24
1.2. Липидные формулировки как перспективные системы доставки лекарств.....	27
1.2.1. Физико-химические свойства липосом, определяющие их эффективность.....	29
1.2.2. Функционализация липосом различными лигандами для решения задач биомедицинского профиля.....	36
1.2.3. Потенциал амфифильных молекул в области модификации свойств липосом .....	40
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	46
2.1. Исходные вещества и реагенты .....	46
2.2. Приготовление мицеллярных растворов и липидных систем .....	51
2.3. Методы исследования .....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. НАНОСИТЕЛИ С ИНТЕГРИРОВАННЫМИ В СОСТАВ КАТИОННЫМИ И НЕИОННЫМИ ПАВ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ БАРЬЕРОВ.....	63
3.1. Смешанные мицеллярные системы на основе катионного ПАВ гексадецилтрифенилфосфоний бромида и неионного ПАВ Бридж®35.....	65
3.1.1. Пороги агрегации и термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования смешанных систем .....	65

3.1.2. Солюбилизационная активность и гидродинамический диаметр смешанных мицелл .....	72
3.2. Агрегационные, солюбилизационные и антимикробные свойства дикаатионных геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами .....	77
3.2.1. Пороги агрегации и термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования карбаматсодержащих геминальных ПАВ.....	77
3.2.2. Солюбилизация гидрофобных веществ геминальными карбаматсодержащими ПАВ .....	81
3.2.3. Антимикробная активность и встраивание карбаматсодержащих геминальных ПАВ в липидный бислой.....	84
3.3. Получение трансферсом для доставки фунгицида карбоксина и оксима 2-РАМ ..	88
3.3.1. Приготовление и оптимизация состава трансферсом. Загрузка фунгицида карбоксина .....	89
3.3.2. Загрузка пралидоксима хлорида в трансферсомы. Оценка физико-химических свойств и биологической активности .....	97
3.4. Липосомы, нековалентно модифицированные фосфониевыми ПАВ, для терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний .....	103
3.4.1. Липосомы, нековалентно модифицированные ПАВ с трифенилфосфониевой головной группой, для терапии онкологических заболеваний .....	104
3.4.1.1. Приготовление и характеристика модифицированных фосфониевыми ПАВ липосом. Загрузка доксорубина гидрохлорида и ротенона .....	104
3.4.1.2. Определение цитотоксичности и степени колокализации липосом с митохондриями опухолевых клеток .....	115
3.4.2. Липосомы, нековалентно модифицированные фосфониевыми ПАВ, для интраназальной терапии трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера ...	120
3.4.2.1. Приготовление и характеристика модифицированных фосфониевыми ПАВ липосом. Загрузка $\alpha$ -токоферола и донепезила гидрохлорида .....	121
3.4.2.2. Определение способности липосом колокализоваться с митохондриями и замедлять развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей.....	125

3.5. Нековалентная модификация липосом дикатионными карбаматсодержащими ПАВ для интраназальной терапии трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера	130
3.5.1. Получение и оптимизация состава липосом. Загрузка $\alpha$ -токоферола и донепезила гидрохлорида.....	131
3.5.2. Определение способности модифицированных липосом замедлять развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей .....	135
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	140
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	173
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	175

## ВВЕДЕНИЕ

**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 солюбилизовать 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 нисколько 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 солубилизационной активностью по отношению к модельному красителю Оранжевый OT и нестероидному противовоспалительному препарату индометацину.

2. Исследованы агрегационные, солубилизационные и антимикробные свойства новых дикатионных геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами и додекановым спейсером. Проведен сравнительный анализ ключевых характеристик гомологических серий геминальных амфифилов, различающихся длиной спейсерного фрагмента (n-12-n(Et) и n-6-n(Et)).

3. Впервые показано, что трансдермальная доставка формулированного пралидоксима хлорида совместно с внутривенным введением антитоксина 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 ( $\alpha$ -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, солубилизационной 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 солубилизирующей 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 (ICSSRCM), 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.

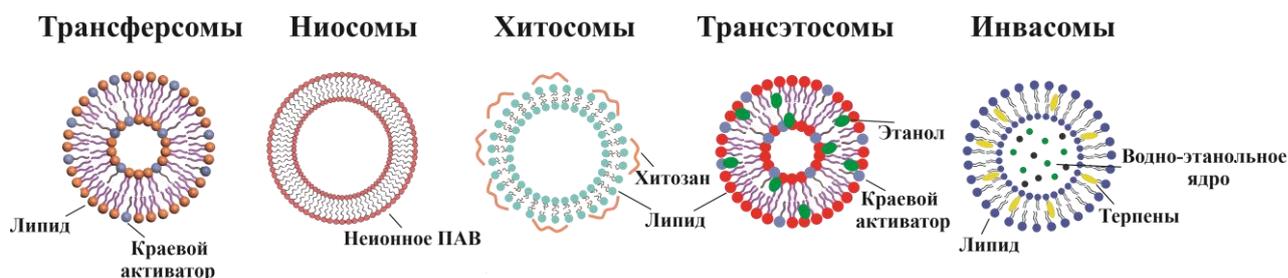
Автор выражает искреннюю благодарность руководителю диссертационной работы с.н.с. Гайнановой Г.А., а также руководителю лаборатории Высокоорганизованных сред г.н.с. Захаровой Л.Я. за помощь в инициировании, координации и развитии исследований; н.с. Кузнецову Д.М. и научной группе профессора Галкиной 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».

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ДИЗАЙН И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ПАВ И ЛИПИДОВ

Нанотехнологию, передовое и перспективное направление современной науки, многие преподносят как следующую веху в эволюции развития различных отраслей. За последние три десятилетия благодаря выдающимся достижениям в области нанотехнологий удалось добиться огромного прогресса в сфере наномедицины [1]. Перспективным направлением является формирование наноразмерных систем доставки лекарств, среди которых на сегодняшний день наиболее широко изучаемыми являются липидные наноконтейнеры благодаря своей биосовместимости, биоразлагаемости и нетоксичности [2]. С момента выпуска первого липосомального препарата Doxil® в 1995 году было одобрено 14 препаратов на основе липосом, а это означает, что преимущества липосом не раскрыты в полной мере [3].



**Рисунок 1.1.** Разновидности липидных наноконтейнеров.

На сегодняшний день известен ряд наноконтейнеров на основе липосом, таких как инвасомы, трансферсомы, хитосомы, этосомы, трансэтосомы и т.д. (рис. 1.1) [4]. Подобное многообразие липосомальных систем доставки лекарств обуславливается выбором модифицирующего свойства липосом агента, что в свою очередь зависит от целей использования конечной формулировки. Трудно переоценить роль ПАВ при получении модифицированных липосом с заданными параметрами. Например, неионные ПАВ широко используются для получения ультрадеформируемых липосом, трансферсом, для трансдермального введения лекарств, а катионные ПАВ – для получения положительно заряженных липосом, которые обладают высоким сродством к отрицательно заряженным мишеням. Это в первую очередь интересно с точки зрения внутриклеточной доставки лекарств, например к митохондриям, которые участвуют в

ряде функций, включая производство аденозинтрифосфата, буферизацию клеточных ионов кальция, генерацию активных форм кислорода и инициацию запрограммированной клеточной гибели – апоптоза [5]. Концепция митохондриального нацеливания основана на потенциале митохондриальной мембраны, который составляет примерно -180 мВ, что по величине в несколько раз выше, чем у цитоплазматической мембраны [6]. Кроме того, было показано, что митохондрии опухолевых клеток обладают более отрицательным трансмембранным потенциалом по сравнению с нормальными клетками. Предполагается, что катионные липосомы способны больше накапливаться в митохондриях клеток и воздействовать на функциональные центры органеллы, сдвигая клеточные процессы в ту или иную сторону. Однако формирование подобных систем на основе ПАВ требует тщательного подбора объектов и их концентрации во избежание низкой эффективности и высокой токсичности всей системы. В зависимости от предполагаемых целей, первым шагом является целенаправленный выбор или синтез ПАВ и оценка их физико-химических свойств. В рамках обзора литературы диссертационной работы преимущественно будут обсуждаться особенности самоорганизации и функциональной активности катионных ПАВ, а также их роль в модификации свойств липосомальных систем.

### **1.1. Супрамолекулярные системы на основе амфифильных молекул**

ПАВ представляют собой уникальный инструмент супрамолекулярной химии, интерес к которым сохраняется на протяжении десятилетий и продолжает расти. Это объясняется тем, что ПАВ в зависимости от природы находят широкое применение во многих областях, включая нефтяную промышленность, сельское хозяйство, производство средств бытовой химии и косметических продуктов [7–9]. Большой интерес вызывает использование ПАВ в фармацевтической промышленности благодаря способности солюбилизировать различные липофильные субстраты, включая лекарственные вещества [10]. Среди многообразия ПАВ, на сегодняшний день все больше исследований ведется в области синтеза и изучения катионных амфифилов благодаря их антикоррозионным свойствам, а также высокому сродству к отрицательно заряженным биологическим мембранам, что обуславливает их высокую антимикробную активность. Несмотря на преимущества, синтетические ПАВ обладают рядом недостатков, таких как токсичность и неспособность к биоразложению. Поэтому основная часть исследовательских работ на

сегодняшний день сосредоточена на поиске путей сохранения функциональной активности катионных ПАВ, снижая при этом их токсичность.

### 1.1.1. Стратегические подходы в синтезе новых ПАВ

Уникальным свойством ПАВ является способность адсорбироваться на границе раздела фаз и при достижении ККМ формировать наноразмерные агрегаты – мицеллы. Результатом формирования мицеллярных агрегатов является их способность к коллоидному растворению (солубилизации) липофильных соединений, включая лекарственные вещества. В зависимости от структуры, параметра упаковки и концентрации ПАВ в растворах возможно образование агрегатов различной формы, таких как сферические, обращенные, цилиндрические мицеллы, бислои, везикулы (рис. 1.2) [11].



**Рисунок 1.2.** Структура мицеллярных агрегатов в зависимости от значения параметра упаковки [11].

В зависимости от природы головной группы различают анионные, катионные, неионные и цвиттер-ионные ПАВ. Каждый из этих классов ПАВ нашел свое применение

благодаря уникальным физико-химическим характеристикам [12]. Например, катионные ПАВ демонстрируют высокий потенциал с точки зрения их средства к отрицательно заряженным клеточным мембранам, способности интегрироваться в липидный бислой, взаимодействия с полианионами, например ДНК [13–15]. В то же время известно, что катионные ПАВ достаточно токсичны и обладают плохой биоразлагаемостью [16], что ограничивает их применение. Неионные ПАВ, напротив, менее токсичны и лучше поддаются разложению, однако наличие точек помутнения делает их непригодными для использования при высоких температурах [17]. Таким образом, поиск амфифилов с оптимальным балансом полезных свойств и токсичности является актуальной задачей, что обуславливает рост количества публикаций в области синтеза новых ПАВ. На основе анализа литературных данных можно выделить несколько ключевых направлений в данной области:

(1) *Синтез ПАВ с циклическими фрагментами в головной группе.*

К данной группе соединений относятся ПАВ, которые содержат объемные циклические фрагменты в гидрофильной части молекул, такие как имидазолиевые, пиридиниевые, пирролидиниевые, пиперидиниевые, фосфониевые и т.д. [18,19]. Особенностью данной группы ПАВ является делокализация положительного заряда, что способствует его экранированию от диполей воды и приданию головным группам свойств липофильности, что в случае фосфониевых ПАВ обуславливает их улучшенную способность проникать через клеточные мембраны [20]. Также известно, что ПАВ со стерически загруженными головными группами характеризуются низкими значениями ККМ по сравнению с классическими амфифилами, что позволяет осуществить переход к микромолярному концентрационному диапазону с сохранением высокой функциональной активности [21].

(2) *Синтез ПАВ на основе природного сырья.*

Развитие биотехнологии сделало возможным синтез ПАВ на основе природного сырья путем ферментации природных субстратов, таких как алканы, масла, сахара в присутствии бактерий или дрожжей. Амфифилы на основе природного сырья являются биоразлагаемыми, обладают низкой токсичностью и ведут себя аналогично синтетическим ПАВ [22,23]. Хорошим примером являются ПАВ, полученные с использованием дегидроабиетиновой кислоты в качестве сырья, для которых была показана зависимость морфологии мицелл от рН среды, что преимущественно связано с

изменением параметра упаковки ПАВ [24]. Одними из широко известных природных ПАВ являются сапонины, которые сопоставимы по поверхностной активности с известным коммерчески доступным неионным ПАВ Твин®80, что делает природные ПАВ конкурентоспособными на мировом рынке [25]. Стоит отметить, что при получении природных ПАВ, большое внимание уделяется не только поиску сырья, но и условиям реакции, чтобы исключить влияние агрессивных растворителей. Успешно это было продемонстрировано на примере синтеза мономерных имидазольных амфифилов из жирных кислот [26] и катионных ПАВ на основе сахаров и аминокислот [27].

(3) *Включение биоразлагаемых фрагментов в молекулы амфифилов.*

ПАВ, полученные на основе природного сырья, более биоразлагаемы по сравнению с синтетическими аналогами [28], однако следует отметить, что получение природных ПАВ является дорогостоящим процессом. В этом случае хорошей альтернативой являются синтетические ПАВ, содержащие сложноэфирные, амидные, дисульфидные, карбаматные или другие разлагаемые фрагменты [29–31]. Все большее внимание привлекают ПАВ на основе аминокислот, которые под действием ферментов могут расщепляться на нетоксичные фрагменты. Например, эфиры бетаина гидролизуются с образованием двух безвредных продуктов – аминокислоты и длинноцепочечного спирта [32], поэтому были синтезированы катионные бетаиновые ПАВ, которые продемонстрировали высокую степень биодegradации по сравнению с дикатионными ПАВ без сложноэфирных фрагментов [30]. Стоит отметить, что включение в структуру ПАВ функциональных групп влияет не только на их биоразлагаемость, но также может снижать концентрационные пороги формирования мицеллярных агрегатов.

(4) *Переход от мономерных к димерным ПАВ.*

Геминальные ПАВ имеют две гидрофильные головные группы и два гидрофобных радикала и характеризуются высокой плотностью заряда и низкими значениями ККМ по сравнению с классическими мономерными амфифилами, что позволяет существенно снизить действующие концентрации амфифилов и токсичность ПАВ [33]. Кроме того, они обладают высоким потенциалом применения в различных областях, таких как доставка лекарств и генетического материала, ингибирование коррозии. Такие подходы, как изменение природы спейсера, длины гидрофобных радикалов и структуры гидрофильных головных групп, расширяют структурное многообразие геминальных ПАВ, что позволяет напрямую манипулировать их функциональной активностью.

(5) *Формирование смешанных композиций.*

Помимо синтетических инструментов создания новых амфифильных молекул существует также стратегия комбинации в системе представителей различных классов ПАВ (рис. 1.3) [34]. Известно, что смешанные мицеллярные системы при подборе оптимального соотношения компонентов могут приводить к синергетическому эффекту, проявляющемуся в снижении значений ККМ и увеличении солюбилизационной активности, что было показано для смеси Тритон®X-100 и цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) [35]. Однако стоит учитывать, что данная стратегия требует тщательного подбора соотношения компонентов, поскольку комбинация различных ПАВ в одной системе может привести к антагонизму и ухудшить свойства мицеллярных систем на основе индивидуальных амфифилов. Изучение смешанных систем во многом связано с необходимостью снижения токсичности катионных ПАВ. Сообщается, что токсичность додецилтриметиламмоний бромида выше, чем у анионных и неионных амфифилов, тогда как комбинация катионного ПАВ с анионным додецилбензолсульфонатом натрия значительно снижает данный эффект. Кроме того, электростатическое притяжение между анионными и катионными ПАВ вызывает образование компактных мицеллярных структур и приводит к снижению значений ККМ по сравнению с индивидуальными системами [36,37]. Взаимодействие разнотипных ПАВ в смеси может быть описано с помощью модели идеального смешения, предложенной в 1950-х годах [38]. Расширенная модель бинарного смешения Клинта [39,40] успешно применяется и по сей день для прогнозирования поведения ПАВ в смеси.

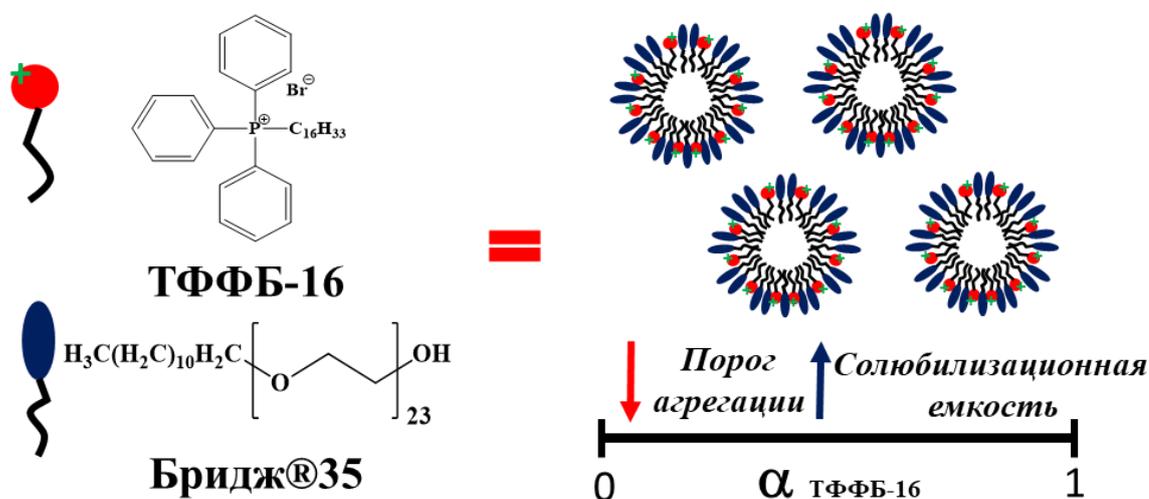


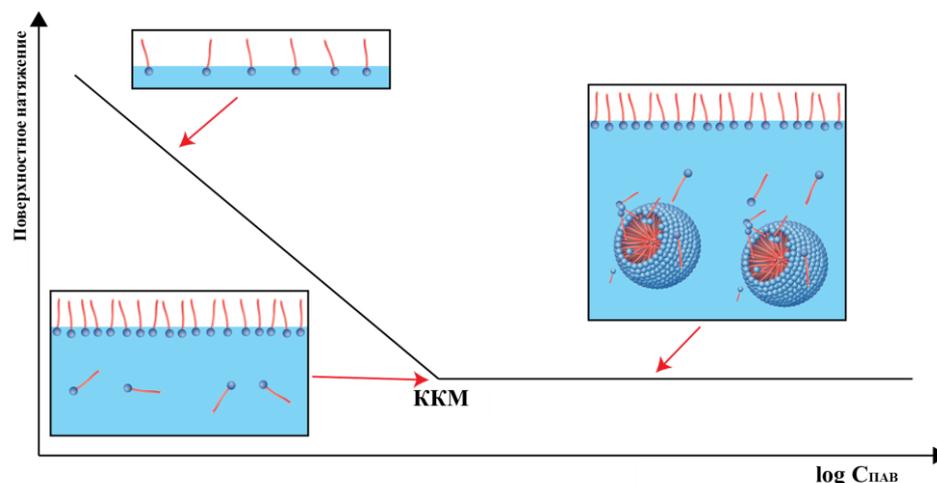
Рисунок 1.3. Схема комбинации неионных и катионных ПАВ [41].

Однако данное разделение отчасти является условным, поскольку на сегодняшний день наблюдается тенденция в использовании сразу нескольких стратегий при поиске оптимальной композиции. Примером является синтез геминальных ПАВ с биоразлагаемыми фрагментами, а именно сложноэфирными, амидными и карбаматными [42,43]. Исследования показывают, что расположение сложноэфирного или амидного фрагментов в спейсере геминальных ПАВ благоприятнее влияет на биodeградацию молекул, чем расположение в алкильных радикалах [44]. Также были синтезированы геминальные амфифилы со стерически загруженными головными группами [33,45]. Другим примером комбинации стратегий является формирование смешанных систем на основе катионных ПАВ с биоразлагаемым карбаматным фрагментом и неионных ПАВ, которые продемонстрировали низкую токсичность и высокую степень солюбилизации противовоспалительного препарата мелоксикама [46]. Таким образом, все вышеописанные стратегии получения ПАВ с оптимальными свойствами являются до сих пор актуальными, а успех в создании функциональных систем на основе ПАВ базируется на комбинации нескольких направлений.

### **1.1.2. Факторы, влияющие на агрегационную и функциональную активность ПАВ**

Такие характеристики, как пороги агрегации, морфология, солюбилизационная активность, параметры упаковки, гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) являются критически важными свойствами амфифильных молекул, определяющими их функциональную активность и границы применимости. На данные параметры могут влиять природа головной группы, длина гидрофобного радикала ПАВ, включение в структуру заместителей или введение в раствор различных добавок, что обуславливает необходимость выявления закономерностей «структура-свойства». Наиболее важным параметром ПАВ, в первую очередь определяемым для всех амфифильных молекул, является концентрация ПАВ, при которой молекулы начинают агрегировать в растворе (рис. 1.4). Мицеллярные структуры являются динамическими системами, в которых постоянно происходит обмен амфифильными молекулами между мицеллами и раствором, а также образование и распад мицелл [47]. Поскольку движущей силой мицеллообразования является гидрофобный эффект, в первую очередь вклад в изменение значений ККМ вносит длина углеводородного радикала ПАВ. Как правило, с увеличением гидрофобности амфифила, пороги агрегации снижаются вне зависимости от природы головной группы. Однако стоит учитывать, что значения ККМ не всегда могут

прямо пропорционально коррелировать с биологической активностью ПАВ, как это было продемонстрировано для катионных ПАВ с амидным фрагментом [48].



**Рисунок 1.4.** Схематическое изображение процессов адсорбции и мицеллообразования [49].

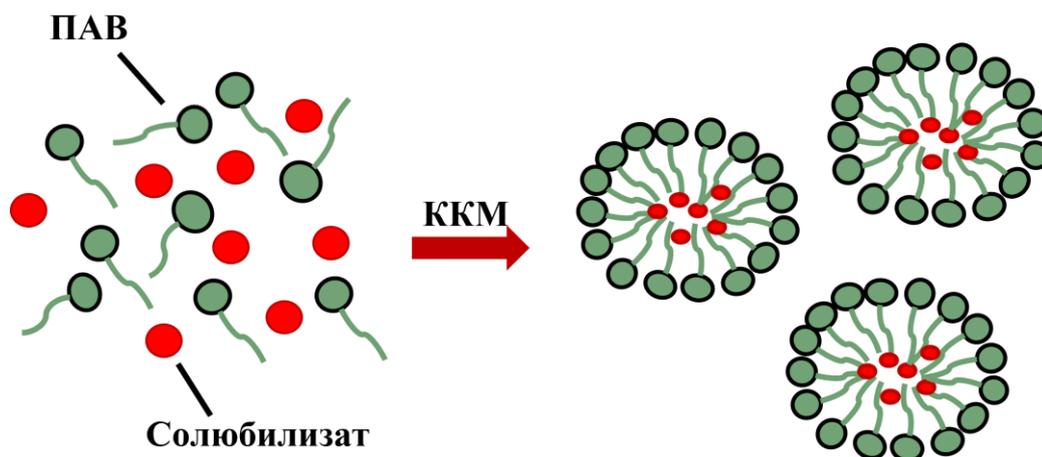
Помимо стандартного влияния длины углеводородного радикала на значения ККМ, введение различных заместителей в головную группу ПАВ также может влиять на пороги агрегации амфифилов. Установлено, что введение карбаматного фрагмента в структуру пирролидиниевых ПАВ позволяет снизить ККМ в два раза по сравнению с незамещенными аналогами, что также сопровождается высокой антибактериальной и противогрибковой активностью [50]. Такой же эффект увеличения поверхностно-активных свойств за счет введения карбаматного фрагмента в структуру ПАВ был показан для монокатионных алкиламмониевых амфифилов. Более того, для исследованных амфифилов было показано снижение токсичности по сравнению с классическим ПАВ ЦТАБ, что было выражено в значениях полулетальной дозы, вызывающей гибель половины группы мышей (для ЦТАБ  $LD_{50} = 27$  мг/кг, для карбаматсодержащих ПАВ  $LD_{50} = 80-100$  мг/кг в зависимости от длины углеводородного радикала) [51]. Влияние гидроксиалкильных заместителей было описано авторами [52,53] для алкиламмониевых моно- и дикатионных ПАВ, для которых продемонстрировано снижение ККМ по сравнению с их нефункционализированными аналогами. Авторами данных работ выдвинуто предположение, что снижение ККМ амфифилов может трактоваться как увеличением объема головных групп ПАВ, обуславливающим экранирующий эффект вокруг заряженной группы, так и вкладом водородных связей,

возникающих при взаимодействии головных групп ПАВ друг с другом. Стоит отметить, что наличие гидроксиалкильных фрагментов в головной группе ПАВ может влиять не только на ККМ, но и на степень связывания противоионов ( $\beta$ ). Для катионных аммониевых ПАВ показано, что величина  $\beta$  уменьшается с возрастанием количества гидроксиэтильных групп [54], что связано с увеличением объема головной группы амфифилов. Меньший объем головной группы приводит к более высокому заряду, следовательно, к большему связыванию противоионов и, наоборот [55]. Аналогичное снижение степени связывания бромидного противоиона было показано при переходе от ЦТАБ к цетилпиридиний бромиду (с 0.89 до 0.86 соответственно), что, вероятно, связано с частичным экранированием положительного заряда циклической головной группой ПАВ [56]. Помимо структурных особенностей головной группы амфифильных молекул степень связывания противоиона зависит от таких параметров, как природа противоиона [57], длина гидрофобных радикалов [58], присутствие в растворе добавок (солей, полимеров, других ПАВ, субстратов) [59], температура [60] и рН раствора [61], что в свою очередь может влиять на концентрационные пороги мицеллообразования, морфологию агрегатов и солюбилизационную активность ПАВ.

Параметр упаковки (ПУ) и значения ГЛБ амфифильных молекул являются одними из часто используемых параметров, тесно связанных друг с другом, для определения связи молекулярной структуры амфифила с ее распределением в водном растворе [62]. Параметр упаковки ПАВ, определяемый как  $V/(A \times l)$ , связан с объемом углеводородной цепи ( $V$ ), эффективной площадью гидрофильной головной группы ( $A$ ) и длиной цепи гидрофобного радикала ПАВ ( $l$ ). С точки зрения значений параметра упаковки было объяснено изменение морфологии агрегатов ПАВ на основе дегидроабиетиновой кислоты в зависимости от рН среды со сферической формы в стержнеобразную, которые при дальнейшем увеличении рН восстанавливали свою форму обратно до сферической. Подобный характер морфологических изменений агрегатов связан с наличием в структуре ПАВ чувствительных к рН групп, таких как гидроксильные и аминогруппы, что позволило авторам контролировать эффективную площадь головной группы ПАВ и параметр упаковки, меняя рН среды, и, соответственно, морфологию агрегатов [24]. Значениями ГЛБ преимущественно оперируют при формировании смешанных мицеллярных систем или эмульсий на основе амфифилов, что позволяет определить наиболее подходящее ПАВ для достижения низких значений ККМ в бинарных системах

или определить области применения эмульсий. Например, в ряду неионных ПАВ Бридж®96 (ГЛБ = 12.4), Тилоксапол (ГЛБ = 13) и Твин®80 (ГЛБ = 15), последний в сочетании с катионным ПАВ обладал более низкими порогами агрегации [63], тогда как для получения наиболее стабильных эмульсий авторы [64] предложили смесь неионных ПАВ Твин®80 и Спан®20, что позволило получить промежуточное значение ГЛБ, равное 12.

Способность ПАВ солюбилизовать в гидрофобном ядре соединения, нерастворимые или слабо растворимые в воде, также является одним из основополагающих свойств амфифильных молекул, которое наблюдается после достижения точки ККМ (рис. 1.5). В литературе сообщается о нескольких наиболее преобладающих факторах, которые влияют на коллоидную растворимость липофильных соединений. Например, в работах [65,66] на способность солюбилизовать флуорен, гексахлорбутадиен и гексахлорэтан влияла природа ПАВ, и неионные амфифилы обладали большей активностью в данном контексте, чем анионные, однако активность последних может быть увеличена при солюбилизации положительно заряженных субстратов за счет электростатического притяжения [67]. В работе [68] проведены комплексные исследования и анализ влияния различных ПАВ на эффективность солюбилизации двух плохо растворимых в воде препаратов фенофибрат и даназол и модельного вещества андростан, что позволило авторам выявить следующие закономерности: 1) солюбилизация даназола была выше в мицеллах ионных ПАВ, что обусловлено ион-дипольными взаимодействиями между полярными молекулами даназола и заряженными головными группами амфифилов; 2) солюбилизация лекарственных средств линейно возрастает с увеличением длины гидрофобной цепи для всех типов ПАВ (неионных, катионных и анионных), что обусловлено увеличением объема гидрофобного ядра мицелл; 3) объемные звенья этиленоксида в головной группе ПАВ способствуют снижению солюбилизации лекарственных препаратов за счет более сложной упаковки амфифильных молекул в мицеллах. Комбинация в одной системе представителей разных классов ПАВ, а именно поверхностно-активных гликолипидов, производимых бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, и коммерчески доступного Тритон®X-100, также демонстрировала синергетическое поведение и повышение солюбилизационной емкости мицелл, которая зависела от рН и ионной силы раствора [69].



**Рисунок 1.5.** Схема процесса солюбилизации гидрофобных субстратов в мицеллах.

Таким образом, показано, что целенаправленные манипуляции со структурой ПАВ, составом мицеллярной системы или условиями эксперимента (рН, температура, введение в раствор различных добавок) могут существенно отразиться на агрегационной и функциональной активности амфифилов, а также на их токсичности. При подборе уже существующих ПАВ или синтезе новых амфифильных соединений для исследования необходимо держать фокус на тенденциях, уже описанных в литературе, что с большей вероятностью позволит добиться высокой эффективности изучаемых систем. Поэтому основное внимание в рамках обзора литературы уделено монокатионным ПАВ с циклическими фрагментами в головной группе и дикатионным геминальным ПАВ ввиду их высокой поверхностной и биологической активности по сравнению с классическими катионными амфифилами.

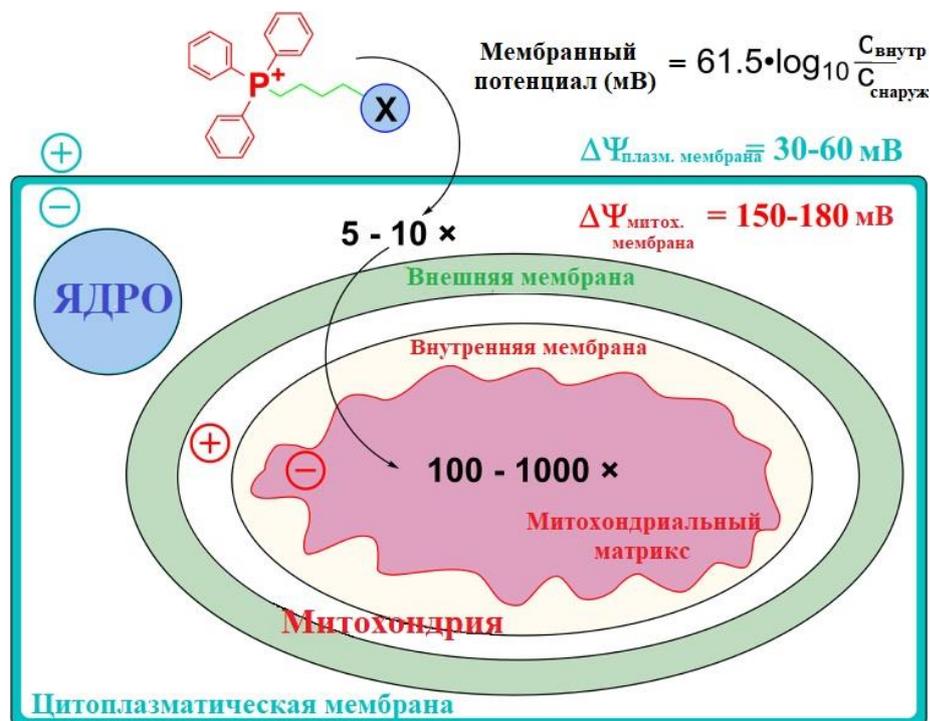
### **1.1.3. Особенности самоорганизации и функциональной активности фосфониевых ПАВ**

Среди монокатионных ПАВ с циклическими фрагментами в головной группе наибольший интерес представляют амфифилы с трифенилфосфониевым (ТФФ) фрагментом, благодаря исключительным агрегационным свойствам и высокой функциональной активности. Фосфониевые соли представляют собой липофильные катионы с делокализованным зарядом, что обуславливает их специфические свойства. ПАВ на основе трифенилфосфония относительно легко получить, а трифенилфосфин, используемый при их синтезе, дешев и стабилен на воздухе, что является несомненным

преимуществом данного типа ПАВ с экономической точки зрения. Несмотря на наличие трех жестких фенильных колец в головной группе, амфифилы хорошо растворимы в воде, что позволяет определять агрегационные свойства ряда соединений с переменными алкильными цепями вплоть до длинноцепочечных аналогов, например, октадецильного гомолога [70]. Самоорганизация бромидов алкилтрифенилфосфония с различной длиной углеводородного радикала была изучена несколькими исследовательскими группами в индивидуальных растворах [21,71–73], а также в бинарных [74,75] и тройных системах [76], включающих как катионные, так и неионные ПАВ. Отмечено, что поведение алкилтрифенилфосфониевых солей в растворе значительно отличается от классических триметиламмониевых амфифилов, что выражается в снижении значений ККМ, чисел агрегации и высокой степени тушения флуоресценции зондов. Немаловажным является то, что по мере увеличения гидрофобности фосфониевых ПАВ наблюдается не только снижение значений ККМ, но и увеличивается эффективность комплексообразования ПАВ с олигонуклеотидами и способность встраиваться в липидный бислой, что является положительным эффектом с точки зрения доставки генетического материала и получения нековалентно модифицированных положительно заряженных липосомальных систем доставки лекарств [77]. Известно, что катионные амфифилы обладают высокой антимикробной активностью, поэтому авторы [78] расширили исследуемый ряд амфифилов и синтезировали ПАВ с мультикатионным каркасом на основе фосфониевых солей, из которых наибольшей активностью обладали ПАВ с двумя фосфониевыми головными группами. Авторы утверждают, что оптимизация соотношения гидрофобной и гидрофильной частей амфифилов является основным фактором, определяющим их антимикробную активность.

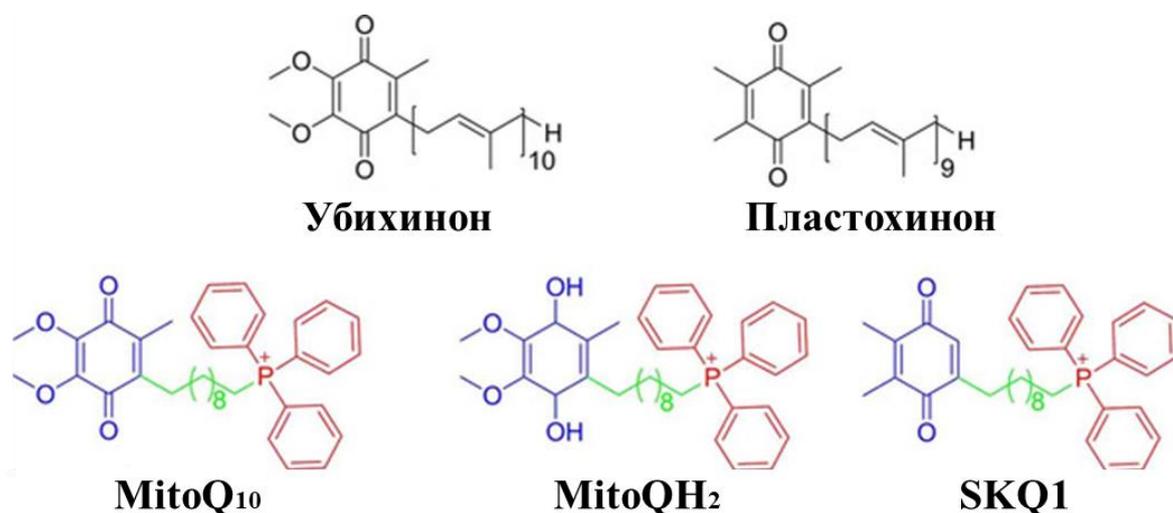
Отличительными свойствами ТФФ-катиона являются липофильность и высокий положительный заряд, что позволяет им проникать через мембраны клеток и органелл за счет электростатического взаимодействия. Мембранный потенциал в клетках и органеллах возникает за счет наличия ионных каналов на плазматической мембране, что обуславливает разную проницаемость клетки для ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Cl}^-$ . Из-за неравномерного распределения этих ионов между цитоплазмой и внеклеточной средой существует разница напряжений, известная как мембранный потенциал. Поглощение ТФФ-катионов в ответ на мембранный потенциал можно описать уравнением Нернста, где клеточное поглощение увеличивается в 10 раз на каждые 61.5 мВ при 37 °С, что

приводит к 5-10-кратному увеличению концентрации ТФФ-катиона в цитоплазме и 100–1000-кратному увеличению их в митохондриях клеток (рис. 1.6) [6,79].



**Рисунок 1.6.** Механизм проникновения ТФФ-конъюгатов в клетки и органеллы [6].

Первоначально катионы трифенилфосфония были использованы в качестве зондов для определения мембранного потенциала митохондрий. Использование ТФФ-катионов стало существенным скачком в области доставки лекарств, когда к ним начали ковалентно пришивать различные биологически активные соединения, включая антиоксиданты (рис. 1.7) [6]. Как известно, митохондрии являются важными органеллами, отвечающими за клеточное дыхание, и обеспечивают 80% энергии, необходимой для жизнедеятельности клеток. Помимо этого, в митохондриях производится более 95% активных форм кислорода, которые инициируют окислительный стресс в клетках, воздействуя непосредственно на белки, липиды и ДНК, вызывая повреждения, приводящие к раку, диабету, сердечно-сосудистым заболеваниям, нейродегенеративным расстройствам и старению [80]. Поэтому передовой линией использования ТФФ-конъюгатов стало их применение для антиоксидантной терапии различных заболеваний, среди которых наиболее известными являются ионы Скулачева [81].

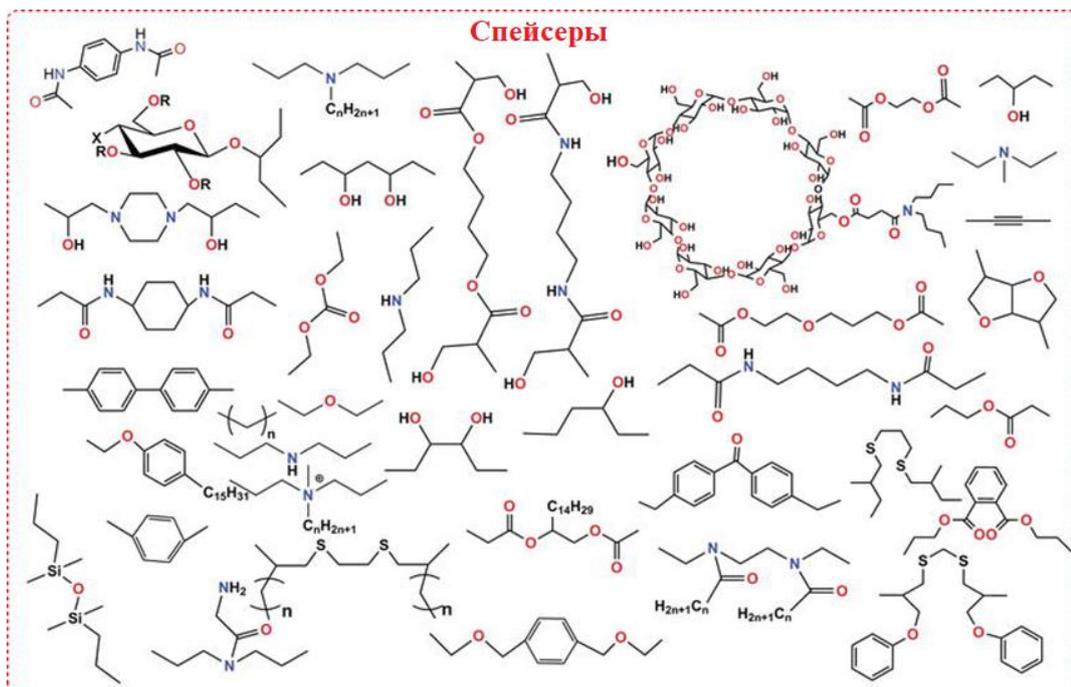


**Рисунок 1.7.** Примеры конъюгированных с катионом трифенилфосфония антиоксидантов [80].

Несмотря на то, что фосфониевые ПАВ достаточно хорошо изучены, их потенциал еще не исчерпан, и в рамках диссертационной работы основной акцент был сделан на дальнейшем изучении гексадецилтрифенилфосфоний бромида в составе смешанных мицеллярных систем, а также на использовании гомологического ряда фосфониевых ПАВ для нековалентной модификации липосом для биомедицинского применения.

#### **1.1.4. Агрегация дикатионных геминальных ПАВ. Влияние длины алкильных радикалов и спейсерного фрагмента**

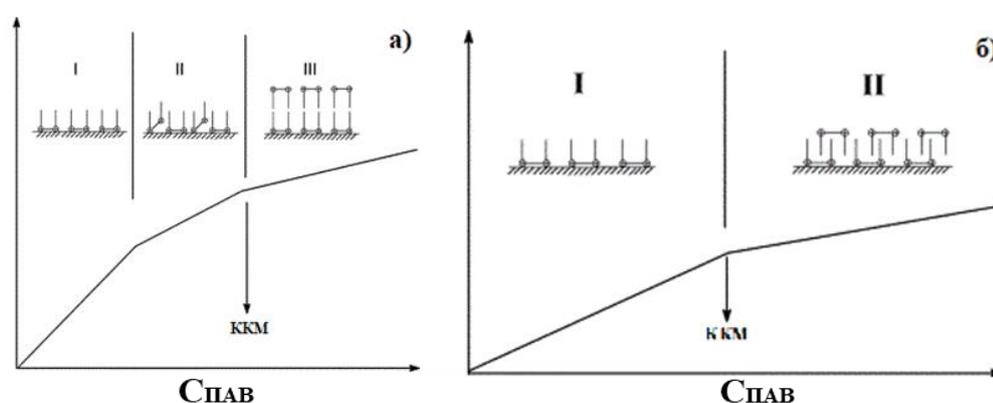
Дикатионные геминальные ПАВ представляют собой соединения, которые состоят из двух гидрофильных головных групп и двух гидрофобных радикалов, соединенных спейсером. Преобладающее большинство дикатионных ПАВ получают из четвертичных аммониевых солей. Они обладают уникальными поверхностными свойствами и агрегируют при более низкой концентрации, чем мономерные ПАВ. Подобная структура геминальных амфифилов обуславливает их многообразие, поскольку становится возможным варьировать не только структуру головной группы или длину алкильных цепей, но и спейсерный фрагмент. Спейсеры могут быть гибкими (метиленовые группы) или жесткими (ароматические структуры), короткими или длинными, гидрофильными или гидрофобными, что, несомненно, будет влиять на физико-химические и практически полезные свойства ПАВ (рис. 1.8) [82].



**Рисунок 1.8.** Примеры строения спейсерного фрагмента геминальных ПАВ [83].

В работе [84] сообщается, что жесткость спейсерного фрагмента с двойной связью практически не влияет на ККМ, но значительно сказывается на характере адсорбции геминальных ПАВ на границе раздела вода-воздух и на размере образуемых агрегатов в зависимости от концентрации. Согласно описанным результатам, геминальные ПАВ со сложноэфирными группами и двойной связью в середине спейсера обладают гораздо более высокими значениями минимальной поверхности, занимаемой одной молекулой ПАВ ( $A_{\min} = 2.24 \text{ nm}^2$ ) на границе раздела фаз, по сравнению с аналогичным геминальным амфифилами с одинарной связью в спейсере ( $A_{\min} = 1.17 \text{ nm}^2$ ). Стоит отметить, что для геминальных ПАВ со сложноэфирными фрагментами характерны конформационные изменения в спейсере при адсорбции, в процессе которых спейсер изгибается и замыкается в воздухе, что сближает две катионные группы и приводит к относительно меньшему значению  $A_{\min}$ . Поэтому авторы полагают, что наличие двойной связи является достаточным для придания спейсеру жесткости, что влияет на адсорбцию геминальных ПАВ, а также на морфологию агрегатов [84]. Другими авторами было показано, что геминальные ПАВ со спейсерами, содержащими атомы азота и кислорода, хорошо растворимы в воде, тогда как амфифилы с жесткими спейсерами, содержащими диэтиленовые и триэтиленовые цепи, обладают низкой растворимостью в воде. Более того жесткий спейсер геминальных ПАВ замедляет процесс адсорбции по сравнению с гибким спейсером [85]. Помимо определения особенности адсорбции геминальных

амфифилов на границе вода-воздух в водных растворах, было также проведено изучение влияния длины спейсерного фрагмента амфифилов на процесс их адсорбции на металлической поверхности в кислых условиях среды, что является актуальной задачей с точки зрения ингибирования коррозии. Показано, что геминальное ПАВ с длинным спейсером (12-6-12) адсорбируется двумя гидрофильными ионными группами на поверхности металла, тогда как ПАВ с коротким спейсером (12-2-12 и 12-3-12) имеют тенденцию адсорбироваться одной гидрофильной группой на поверхности, а другая гидрофильная группа свободно находится в водной фазе, при этом дальнейшее увеличение концентрации ПАВ приводит к образованию многослойных структур на границе раздела фаз (рис. 1.9) [86].



**Рисунок 1.9.** Модель адсорбции геминальных ПАВ: а) 12-2-12 и 12-3-12; б) 12-6-12 при различной концентрации на поверхности металла в кислой среде [86].

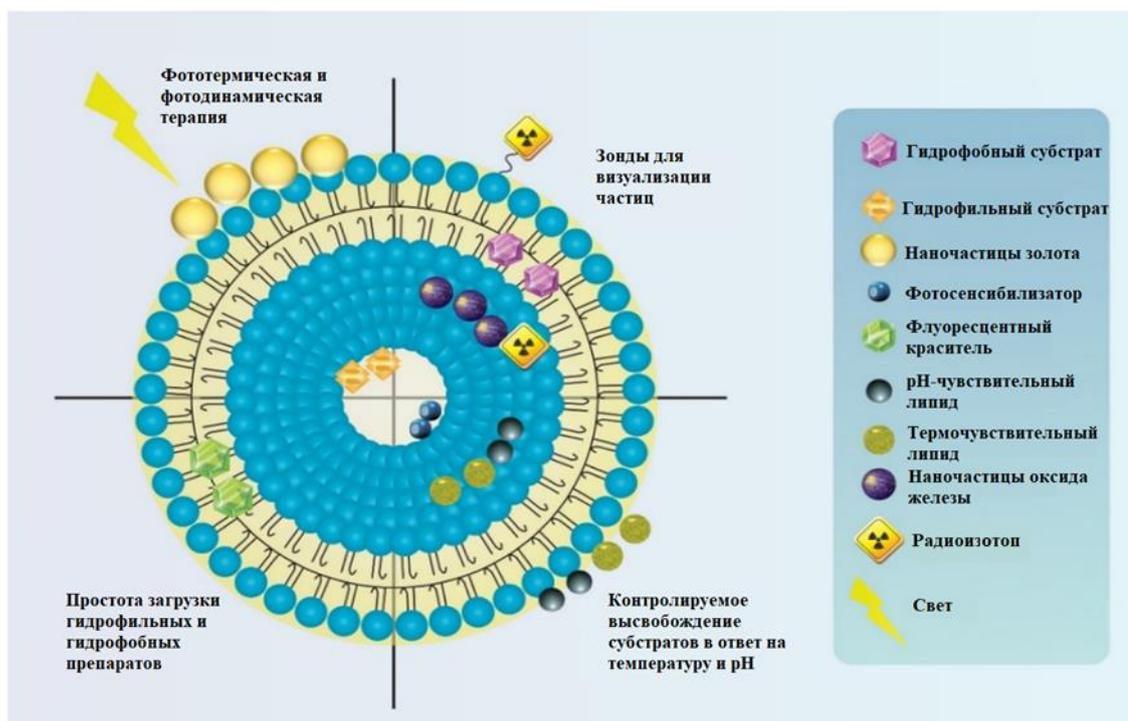
Как и для монокатионных ПАВ, ККМ дикатионных амфифилов уменьшается с увеличением длины гидрофобных радикалов. Например, увеличение длины углеводородной цепи четвертичных алкиламмониевых геминальных ПАВ с 8 до 18 атомов углерода вызывает уменьшение ККМ с 3.46 до 0.06 мМ. Более того, было показано, что для геминальных ПАВ с бромидным противоионом характерны более низкие значения ККМ по сравнению с ПАВ с иодид анионом [87]. Другими авторами выявлен положительный вклад бензольных колец, присутствующих в гидрофобных цепях аммониевых геминальных ПАВ, в процесс мицеллообразования, выражающийся в снижении значений ККМ в 8-10 раз по сравнению с аналогичными геминальными амфифилами, имеющими линейные углеводородные радикалы и аналогичную длину спейсера, за счет, вероятно,  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия между бензольными кольцами [88].

Введение в структуру геминальных ПАВ биоразлагаемых фрагментов представляет интерес для многих исследовательских групп, что в сочетании с высокой поверхностной активностью может вывести данный класс амфифилов на совершенно новый уровень. Большое внимание уделяется внедрению в структуры ПАВ амидных, карбаматных, эфирных и сложноэфирных групп. Биоразлагаемые фрагменты могут быть включены как в спейсерный фрагмент, так и в головную группу или гидрофобные радикалы геминальных ПАВ [44,89,90], которые могут способствовать образованию водородных связей, в результате чего ПАВ проявляют улучшенную поверхностную активность и изменяют морфологию агрегатов по сравнению с нефункционализированными ПАВ. Более того, показано, что амфифилы с амидными и сложноэфирными группами могут подвергаться ферментативному гидролизу с образованием нетоксичных жирных кислот, холина и других веществ [91]. Однако есть примеры и негативного влияния функционализации геминальных ПАВ биоразлагаемыми фрагментами. Введение сложноэфирных фрагментов в алкильные цепи геминальных ПАВ привело к снижению их солюбилизирующей способности, однако авторы утверждают, что в данном случае немаловажную роль играет и природа солюбилизаторов [92]. Введение карбаматных фрагментов в структуру геминальных ПАВ изучено слабо, однако есть работы по изучению карбаматсодержащих мономерных ПАВ, которые показали высокую солюбилизационную активность в отношении модельного красителя Оранж ОТ и противовоспалительных препаратов индометацин и мелоксикам [51,93]. Предполагается, что карбаматные фрагменты в структуре ПАВ смогут увеличить эффективность терапии болезни Альцгеймера, поскольку одним из известных одобренных лекарственных веществ является ривастигмин, который является лекарством карбаматного типа [94,95]. Таким образом, дикатионные геминальные ПАВ без сомнения являются уникальными соединениями, свойства которых можно настроить путем синтетических манипуляций в зависимости от цели.

## **1.2. Липидные формулировки как перспективные системы доставки лекарств**

Наномедицина является относительно новой, но быстро развивающейся областью, в которой наноразмерные формулировки используются в качестве средств диагностики или контролируемой доставки лекарственных веществ в определенные целевые участки. Наноразмерные системы доставки лекарств обладают многочисленными

преимуществами в лечении хронических заболеваний человека за счет способности снижать рабочие концентрации лекарств, преодолевать биологические барьеры, увеличивать биодоступность гидрофобных субстратов, предотвращать преждевременное высвобождение субстратов и осуществлять направленную доставку лекарств к патологическим мишеням [96]. Одними из наиболее перспективных и изученных наноносителей лекарственных соединений являются липосомы благодаря своей биосовместимости, биоразлагаемости и отсутствию токсичности [97]. Липосомы представляют собой универсальную платформу, поскольку могут осуществить доставку как гидрофильных, так и гидрофобных субстратов. Фактически липосомы являются первым примером наноразмерных систем доставки лекарств, которые успешно прошли путь от лабораторных исследований до клинического применения [98], что, как известно, требует огромных временных и финансовых вложений. Несмотря на то, что липосомальные препараты уже применяются в медицине, исследования продолжают расширяться, в частности, в области разработки систем с внутриклеточным нацеливанием. В данном направлении большое внимание уделяется митохондриям как к ключевым мишеням для лечения целого ряда серьезных патологий, лидирующими из которых являются онкологические и нейродегенеративные заболевания. Помимо органелл-специфической доставки лекарств, липосомы представляют собой многообещающую платформу для тераностики, поскольку позволяют инкапсулировать лекарственный препарат в наноконтейнер независимо от его природы и конъюгировать диагностический или нацеливающий лиганд с поверхностью наночастицы [99,100], что дает возможность целенаправленно доставлять терапевтическое средство к пораженной ткани, одновременно обеспечивая визуализацию распределения и накопления лекарства в режиме реального времени (рис. 1.10).

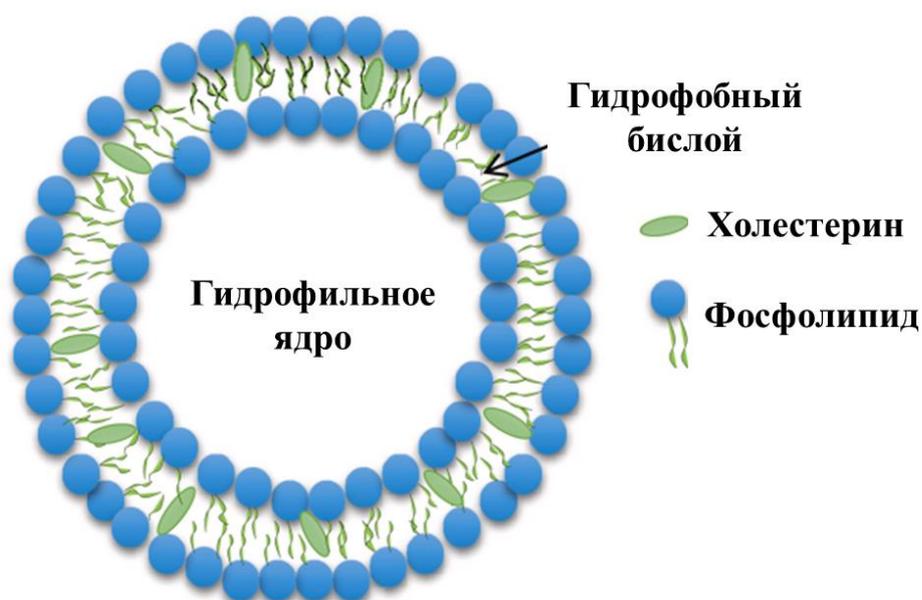


**Рисунок 1.10.** Схематическое представление преимуществ липосомальной платформы для тераностики [100].

В рамках раскрытия потенциала липосом, фокус внимания в следующих главах будет направлен на систематизацию (1) ключевых физико-химических свойств липосом, важных для успешного создания наноконтейнеров, (2) различных стратегий функционализации липосом путем ковалентной и нековалентной модификации их поверхности, а также (3) на выявление роли амфифильных молекул в получении липосомальных систем доставки лекарств с заданными параметрами.

### 1.2.1. Физико-химические свойства липосом, определяющие их эффективность

Структурно липосомы представляют собой сферические однослойные или многослойные везикулы, образующиеся в водных растворах в результате самосборки фосфолипидов с диацильными цепями (липидный бислой), которые за счет наличия гидрофобных радикалов и гидрофильной головной группы обладают амфифильными свойствами (рис. 1.11). Липосомы могут быть изготовлены как из природных, так и из синтетических фосфолипидов, структура которых влияет на физико-химические характеристики наноконтейнеров (диаметр, жесткость, текучесть, стабильность, электрокинетический заряд) [101].



**Рисунок 1.11.** Схематическое изображение липосом [101].

Также стоит отметить, что в состав липосом включают холестерин (Хол) – один из основных компонентов биологических мембран. Это позволяет воздействовать на жесткость и текучесть липидного бислоя везикул, что приводит к повышению их коллоидной стабильности [102]. Поскольку липосомы могут быть получены на основе различных липидов, включая липиды с ненасыщенными связями в углеводородных радикалах, которые могут образовывать перегибы и создавать несовершенства упаковки липидных молекул, добавление холестерина может заполнить образовавшееся свободное пространство и увеличить плотность упаковки липидного бислоя. На сегодняшний день мнения исследователей по поводу оптимального соотношения липид/Хол разнятся. На примере липосом из 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ДПФХ) и гидрофильного красителя сульфородамина Б было показано, что холестерин замедляет скорость высвобождения при содержании от 5 мол.% и более [103], однако увеличение содержания холестерина в составе липосом до 50 мол.% может привести к уменьшению эффективности инкапсулирования субстратов [104]. Таким образом, при правильном подборе соотношения компонентов, холестерин является важной составляющей липосомальных систем доставки лекарств и входит в состав практически всех одобренных липосомальных лекарственных средств (табл. 1.1) [105,106].

**Таблица 1.1.** Примеры липосомальных продуктов, одобренных для клинического применения.

№	Название препарата	Лекарственное средство	Год одобрения	Состав липосом	Область применения
1.	Doxil	Доксорубицина гидрохлорид	1995	HSPC, Хол, DSPE–ПЭГ-2000	Рак яичников, саркома Капоши, рак молочной железы
2.	DaunoXome	Даунорубицин	1996	DSPC, Хол	Саркома Капоши
3.	AmBisome	Амфотерицин В	1997	HSPC, DSPG, Хол	Грибковая и протозойная инфекции
4.	Depocyte	Цитарабин	1999	DOPC, DPPG, Хол, триолеин	Лимфоматозный менингит
5.	Visudyne	Вертепорфин	2000	EPG, DMPC	Глазной гистоплазмоз, мышечная дистрофия
6.	Myocet	Доксорубицина гидрохлорид	2000	ЕРС, Хол	Рак молочной железы
7.	DepoDur	Морфин	2004	DOPC, DPPG, Хол, триолеин	Послеоперационное обезболивание
8.	Marqibo	Винкристина сульфат	2012	Яичный сфингомиелин, Хол	Острый лимфобластный лейкоз
9.	Vuxeos	Даунорубицин, цитарабин	2017	DSPC, DSPG, Хол	Острый миелоидный лейкоз
10.	Onivyde	Иринотекан гидрохлорид тригидрат	2015	DSPC, DSPE-ПЭГ-2000 Carboxylic Acid, Хол	Аденокарцинома поджелудочной железы
11.	Shingrix	Рекомбинантный вирус ветряной оспы, гликопротеин Е	2018	DOPC, Хол	Опоясывающий лишай, постгерпетическая невралгия
12.	Arikayce	Амикацина сульфат	2018	ДФФХ, Хол	Заболевание легких

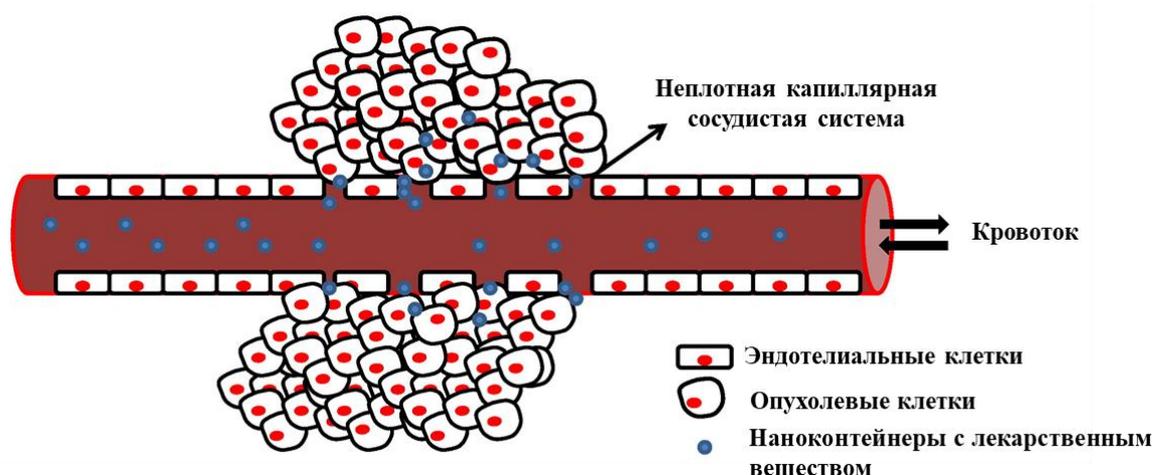
HSPC – гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин; Хол – холестерин; DSPE–ПЭГ-2000 Amine – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000] (аммониевая соль); DSPC – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин; DSPG – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин; DOPC – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин; DPPG – 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин; ЕРС – яичный фосфатидилглицерол; DMPC – 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин; ЕРС – яичный фосфатидилхолин; DSPE-ПЭГ-2000 Carboxylic Acid – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[карбокси(полиэтиленгликоль)-2000] (натриевая соль); ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин.

На стабильность также может влиять поверхностный заряд липосом [107,108]. Авторы [109] провели комплексные исследования по проверке стабильности липосом с нейтральным (+2.4 мВ), положительным (+56 мВ) и отрицательным дзета-потенциалом (-50 мВ) и выявили, что заряженные липосомы в течение 25 часов не проявляли признаков

седиментации, и гидродинамический диаметр липосом оставался стабильным даже для агрегатов микронного размера, тогда как незаряженные липосомы в значительной мере выпадали в осадок. Подобный эффект заряженных частиц объясняется тем, что между частицами с высоким дзета-потенциалом в растворе преобладают силы электростатического отталкивания, что предотвращает агрегацию липосом и увеличивает их коллоидную стабильность. Для долговременной стабильности липосом их дзета-потенциал должен превышать 35 мВ по модулю [110,111]. Стоит отметить, что поверхностный заряд липосом может влиять не только на стабильность липосом, но и на фармакокинетику [112] и биораспределение наноконтейнеров [113], к тому же поглощение клетками положительно заряженных липосом намного выше, чем отрицательно заряженных [114]. Распространённым способом получения катионных липосом является использование катионного липида 1,2-диолеил-3-триметиламмоний пропан (ДОТАП) в сочетании с другими фосфолипидами, однако катионные липиды являются дорогостоящими соединениями, к тому же могут привести к увеличению токсичности наночастиц [115]. Альтернативным способом придания липосомам положительного заряда является модификация их поверхности катионными ПАВ, что позволяет достигать сопоставимых с катионными липидами высоких значений дзета-потенциала при меньшей концентрации [90].

Размер липосом является еще одной важной характеристикой липосом, поскольку напрямую влияет на их клеточное поглощение. Данный феномен хорошо описан в рамках терапии онкологических заболеваний и объясняется эффектом повышенной проницаемости и удержания (the enhanced permeability and retention (EPR) effect) (рис. 1.12). Этот эффект впервые был описан в 1986 году [116] и базируется на пассивном накоплении лекарственных наноносителей с диаметром примерно от 40 до 400 нм в опухолевых тканях за счет неплотной и дефектной сосудистой сети, возникающей из-за быстрой васкуляризации в сочетании с несовершенным лимфодренажем [117]. Следовательно, успех системы доставки лекарств с использованием липосом для нацеливания на опухолевые ткани на основе эффекта EPR в значительной степени зависит от размера и, соответственно, продолжительности пребывания липосом в кровотоке. Стоит также учитывать, что распределение липосом по размерам и полидисперсность могут влиять и на стабильность липосом во время хранения, на что, в свою очередь, влияет способ получения наночастиц, условия хранения и дзета-потенциал. Например,

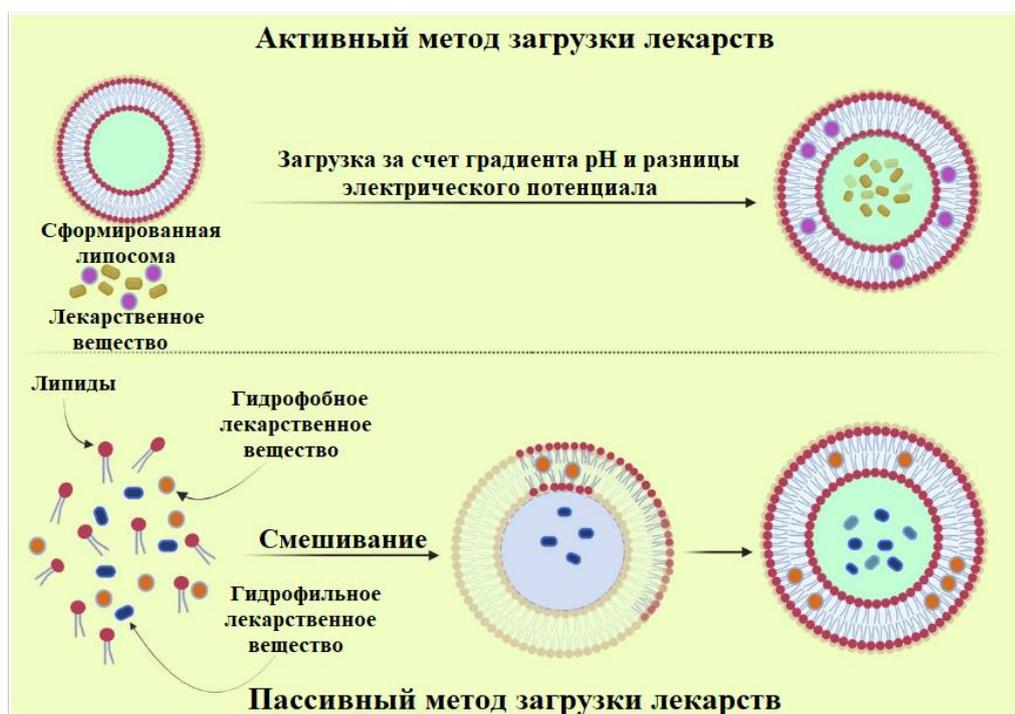
было показано, что липосомы более стабильны при хранении их при 4 °С, чем при 25 °С и 37 °С [118,119]. Выбор метода получения также является важным шагом в создании липидных наноконтейнеров. Например, метод инъекции этанола при неправильном подборе соотношений компонентов может привести к разрушению наночастиц [120]. Методы, основанные на экструзии липосомальной дисперсии, с большей вероятностью позволяют получить монодисперсную систему [121], чем, например, метод ультразвуковой обработки [122].



**Рисунок 1.12.** Схематическое представление эффекта повышенной проницаемости и удержания.

Эффективность инкапсулирования (encapsulation efficiency (EE)) является параметром липосом, выражающим количество инкапсулированного субстрата, который необходимо определять как с точки зрения оценки свойств системы, так и для расчета дозировок в *in vivo* экспериментах. Данный параметр является одним из фундаментальных критериев выбора системы-лидера. Эффективность инкапсулирования зависит как от физико-химических характеристик липосом (диаметр, поверхностный заряд, жесткость бислоя), так и от метода приготовления липосом, характеристик липидов и инкапсулированных субстратов [123]. Как уже упоминалось, липосомы могут инкапсулировать как гидрофильные, так и гидрофобные субстраты, методика определения эффективности инкапсулирования для которых может различаться. Распространенными методами определения эффективности инкапсулирования являются методы диализа и центрифугирования с последующей фильтрацией. Результатом обоих методов является отделение неинкапсулированного субстрата от инкапсулированного,

концентрацию которого можно рассчитать по оптической плотности раствора со свободным субстратом спектрофотометрическим методом. Стоит отметить, что эффективность инкапсулирования может зависеть и от метода загрузки. На сегодняшний день различают два основных метода загрузки лекарств в липосомы: пассивный и активный методы (рис. 1.13) [124].



**Рисунок 1.13.** Методы инкапсулирования лекарственных веществ в липосомы путем пассивной и активной загрузки [120].

Пассивный метод загрузки заключается в гидратации липидной пленки раствором загружаемого гидрофильного лекарственного вещества, а в случае гидрофобных субстратов липидная пленка формируется вместе с субстратом. При активной загрузке инкапсулирование лекарственного средства в предварительно сформированные липосомы обычно обусловлена трансмембранным градиентом pH: pH вне липосом позволяет части лекарства существовать в неионизированной форме, способной мигрировать через липидный бислой. Попав внутрь липосом, лекарственное вещество ионизируется из-за скачка pH и задерживается внутри агрегатов. Как правило, метод активной загрузки позволяет увеличить эффективность инкапсулирования в несколько раз, как это было показано для доцетаксела, и в липосомы с активной загрузкой субстрата было инкапсулировано в три раза больше лекарства по сравнению с методом пассивной

загрузки [125]. Однако высоких значений эффективности инкапсулирования можно добиться и путем пассивной загрузки.

Приоритетной задачей в области доставки лекарств является пролонгирование высвобождения лекарственных веществ для достижения высокой терапевтической эффективности, сведения к минимуму дозировок и частоты приема. На скорость высвобождения лекарств из липосом может влиять несколько факторов, таких как размер агрегатов, природа инкапсулированного вещества и основных компонентов системы, а также их соотношение. Например, скорость высвобождения доксорубина из липосом не зависит от изменения их размера, тогда как винкристин высвобождается медленнее при увеличении размера и структуры липосом, что авторы объясняют образованием нескольких барьеров в крупных агрегатах ( $> 120$  нм), которые представляют собой более эффективный барьер, тем самым замедляя высвобождение лекарства [126]. Покрытие липосом полимерами также может создавать определенное препятствие для быстрого высвобождения терапевтического средства, как это было показано на примере высокомолекулярного хитозана [127]. На скорость высвобождения субстратов влияют условия среды, например, температура или pH [128,129], что привело к появлению стимул-отзывчивых наноконтейнеров, так называемых «умных липосом». Высвобождение, запускаемое внутренними стимулами, основано на специально адаптированных чувствительных молекулах, которые реагируют на различные условия окружающей среды и приводят к разрушению наноконтейнеров и, соответственно, к высвобождению лекарственного средства [130], что особенно важно в контексте воздействия на опухолевые ткани, поскольку в их клетках преобладает кислое значение pH [131].

Несмотря на то, что в литературе имеются данные о ключевых параметрах, воздействующих на скорость высвобождения лекарств из липосом, невозможно без дополнительных инструментов точно охарактеризовать механизм этого процесса. Математическое моделирование является полезным инструментом в данном контексте, что позволяет прогнозировать и оптимизировать процесс контролируемого высвобождения лекарств перед началом дорогостоящего и трудоемкого производства липосомальных составов [132]. Основными математическими моделями, описывающими кинетику высвобождения лекарств из липосом, являются модели Корсмейера-Пеппаса, Хигучи и первого порядка [133,134]. Целью математической обработки результатов по

высвобождению субстратов является определение таких параметров, как константа скорости высвобождения ( $k$ ), коэффициент корреляции, описывающий степень корреляции экспериментальных данных и результатов математической обработки ( $R^2$ ), а также диффузионная экспонента ( $n$ ) в модели Корсмейера–Пеппаса. Полученные характеристики позволяют не только проследить влияние компонентов системы на скорость высвобождения субстратов, но также проливают свет на механизмы, регулирующие данный процесс.

Таким образом, становится очевидным, что процесс получения усовершенствованных липидных наноконтейнеров является непростой задачей и сопряжен с необходимостью проведения глубокого анализа литературных данных и использования инструментов смежных областей науки. Многообразие факторов, влияющих на физико-химические свойства и на биологическую активность липосом, обязывает исследователей проводить комплексные исследования для достижения желаемых результатов. На сегодняшний день усилия исследователей сосредоточены на поиске новых типов наноносителей за счет разнообразной модификации липосомальной платформы.

### **1.2.2. Функционализация липосом различными лигандами для решения задач биомедицинского профиля**

За много лет исследования липосом, произошло несколько значительных скачков в усовершенствовании их свойств, а именно было осуществлено разделение этих наноконтейнеров на поколения. Для липосом первого поколения наблюдается накапливание в опухолевых клетках благодаря эффекту EPR, но их применение было ограничено из-за быстрого выведения из организма и неконтролируемого высвобождения лекарственного средства. Низкая эффективность препаратов, характерная для пассивного транспорта, была в дальнейшем преодолена за счет разработки стелс-технологий с использованием липосом, периферически декорированных гидрофильной полиоксиэтиленовой мантией (так называемые ПЭГилированные липосомы), защищающей их от захвата ретикулоэндотелиальной системой. Как длина, так и плотность покрытия ПЭГ влияют на эффективность липосомального ПЭГилирования. Очень короткие молекулы полимера не могут предотвратить адсорбирование белков и увеличить время циркуляции липосом, в то время как очень длинные цепи приводят к

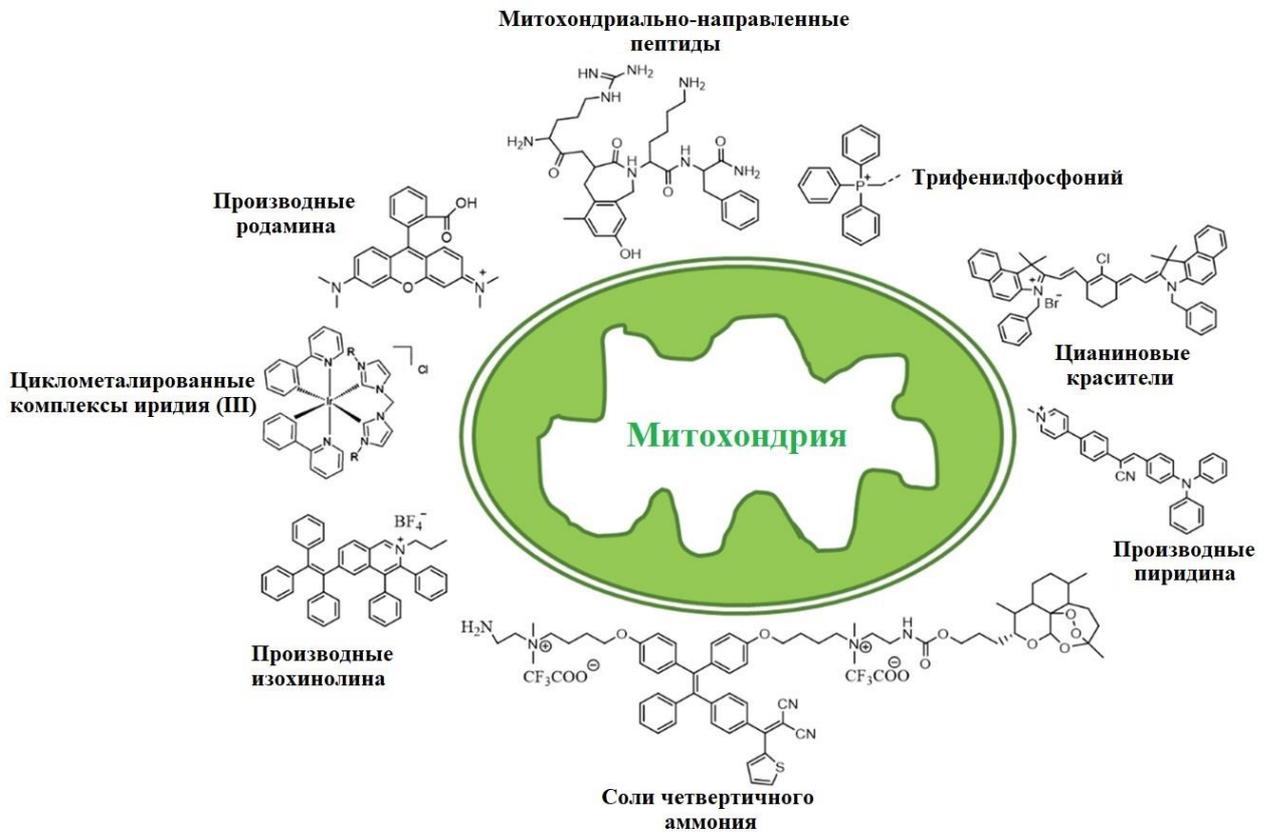
значительному снижению их активности. Было обнаружено, что большее время циркуляции характерно для композиций, содержащих около 5 мол.% ПЭГ-2000 [135,136]. Самым известным примером модификации липосом ПЭГ (ПЭГ-2000) является препарат Dohil®, однако позже было показано, что такая модификация обладает рядом недостатков (ПЭГ-дилемма), выражающихся в затруднении клеточного поглощения и последующего выхода из эндосом клеток [137,138]. Для решения данной проблемы были предложены ПЭГ-липиды, расщепляемые в ответ на изменение условий внутриклеточного микроокружения или имеющие меньшую молекулярную массу, а также добавление других полимеров, не вызывающих иммунного ответа [139], например, новых производных ПЭГ и биосовместимого полимера хитозана [140].

Второе поколение липосом, ориентированных на активный транспорт, было создано путем их конъюгации с различными лигандами, чтобы сделать их специфичными для клеток-мишеней, тем самым позволяя им проникать в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза [141]. Эти лиганды являются относительно небольшими молекулами (фолиевая кислота, пептиды, кластеры углеводов) или белками (моноклональные антитела), которые связываются с антигеном, находящимся на поверхности злокачественной клетки [142]. Среди специфических лигандов можно также выделить пептид аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD), который нацелен на интегрин  $\alpha_v\beta_3$ ; трансферрин, который связывается с рецептором трансферрина с высокой аффинностью и запускает эндоцитоз, используя клатрин-зависимый путь. Однако обеспечение специфичности липосом к определенным мишеням в клетках за счет включения лигандов не в полной мере может обуславливать эффективность наноконтейнеров. При проникновении наноконтейнеров в клетки активируется еще один механизм, препятствующий высвобождению лекарств внутри клеток, а именно деградация наночастиц эндосомами или лизосомами за счет низких значений pH и наличия ферментов. Данная проблема может быть решена путем модификации поверхности липосом специфическими молекулами, индуцирующими выход наноконтейнеров из эндосомы в цитозоль. Данная концепция получила название «побег из эндосом» (endosomal escape) [143]. В качестве таких агентов могут выступать пептиды, белки, полимеры или небольшие химические соединения, такие как холорохин, примахин, хлорид аммония, трибутиламин, метиламин. На сегодняшний день

большинство эндосомолитических агентов являются пептидными по природе и получены из вирусных белков [144].

Третье поколение липосом ориентировано на внутриклеточную доставку лекарств к органеллам клетки [145]. Функционализация наноносителей для органелл-специфического нацеливания терапевтических средств позволяет повысить эффективность лечения, что особенно важно для противоопухолевых, проапоптотических лекарств и терапевтических нуклеиновых кислот, основным сайтом действия которых являются митохондрии и ядра клеток [146]. Благодаря обширному спектру функций, создание митохондриально-направленных соединений является многообещающим подходом в лечении заболеваний, которые либо вызваны, либо связаны с дисфункцией митохондрий, в частности, онкологических заболеваний, резистентных к химиотерапии [147]. В связи с этим возникла специальная область науки, так называемая «митохондриальная медицина», которая сфокусирована на поиске и разработке новых формулировок, способных воздействовать на функциональные центры митохондрий для получения высокого терапевтического отклика [148]. В контексте лечения онкологических заболеваний в митохондриальной медицине большое значение имеет способность терапевтических средств запускать процесс запрограммированной клеточной гибели, которого избегают опухолевые клетки [149]. Например, синтетический ретиноид CD437 способен индуцировать апоптоз в различных клетках карциномы человека *in vitro* и *in vivo* путем активации CD437-зависимой каспазы с дальнейшей индукцией высвобождения цитохрома C (компоненты механизма запуска апоптоза) из митохондрий [150]. Другая стратегия основана на том факте, что у раковых клеток наблюдается резкая активация дыхательной функции митохондрий за счет окислительного фосфорилирования. Поэтому новым подходом в лечении онкологических заболеваний, резистентных к химиотерапии, является использование блокаторов окислительного фосфорилирования (митохондриальных ядов) [151], сочетание которых с наноразмерными системами доставки лекарств, нацеленных на митохондрии, представляет собой многообещающее направление [152,153]. Митохондриально-направленная доставка лекарственных средств может быть достигнута несколькими способами, а именно путем введения митотропных лигандов (1) в состав лекарственных препаратов путем ковалентной пришивки [154] и (2) в состав наноконтейнеров путем ковалентной [155] и нековалентной модификации [156]. Помимо наиболее известного

митотропного лиганда катиона трифенилфосфония, существует ряд других лигандов, используемых для получения митохондриально-нацеленных соединений (рис. 1.14).



**Рисунок 1.14.** Примеры митохондриально-нацеленных лигандов [157].

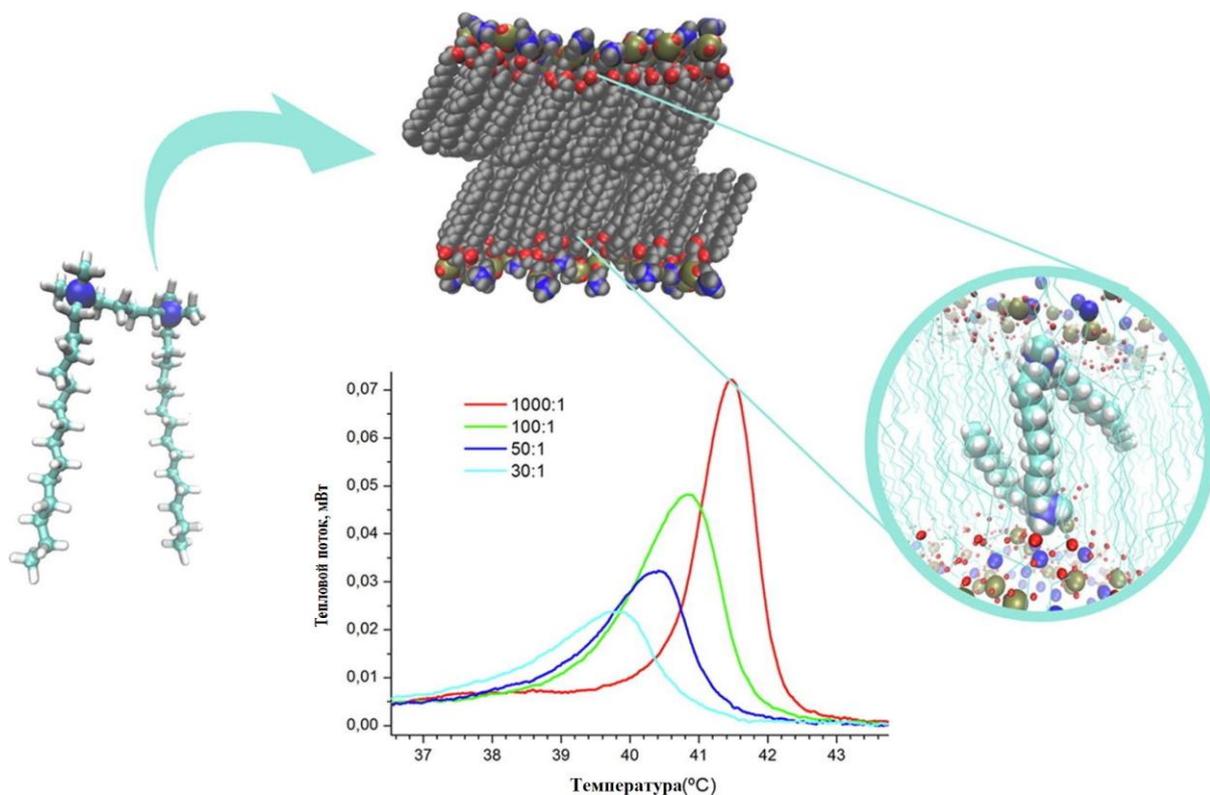
Нековалентная модификация липосом трифенилфосфониевым лигандом представлена лишь несколькими научными группами [158–160], чьи работы в основном сосредоточены на длинноцепном представителе ряда трифенилфосфониевых солей – стеарилтрифенилфосфоний бромиде. Так, получены модифицированные липосомы на основе лецитина, холестерина и стеарилтрифенилфосфоний бромида, которые показали высокую степень сродства к митохондриям. Исследовано влияние паклитаксела, включенного в липосомы, модифицированные стеарилтрифенилфосфоний бромидом, на резистентную к паклитакселу клеточную линию рака яичника Ovar-3 [160]. Такая модификация липосом привела к возрастанию содержания паклитаксела в митохондриях, а также к увеличению цитотоксичности препарата в отношении опухолевой клеточной линии *in vitro*. Интересный подход был использован Biswas с соавторами, которые синтезировали новый конъюгат полиэтиленгликоль-фосфатидилэтаноламина с ТФФ-катионом [161]. Этот конъюгат был включен в липидный бислои, и модифицированные

липосомы, загруженные паклитакселом, продемонстрировали увеличение цитотоксичности и противоопухолевой активности на клеточных культурах и экспериментах на мышах по сравнению с немодифицированными липосомами. Однако недостатком данных работ является необходимость использования сложных синтетических процедур для получения наноконтейнеров, тогда как потенциал применения амфифильных молекул для модификации свойств липосом еще раскрыт не полностью, поскольку сообщений о полномасштабном исследовании по влиянию фосфониевых ПАВ с переменной длиной гидрофобного радикала опубликовано еще не было.

### **1.2.3. Потенциал амфифильных молекул в области модификации свойств липосом**

Как было описано в главе 1.2.1, фосфолипиды – основные компоненты липосом – являются по природе амфифильными соединениями. Поэтому наиболее привлекательной стратегией модификации их свойств является включение в их состав таких же амфифильных молекул – ПАВ. Среди всех типов амфифильных молекул наибольший интерес вызывает включение в липосомы катионных амфифилов, благодаря сродству положительно заряженных частиц к отрицательно заряженным бактериальным и клеточным мембранам. Стоит понимать, что разработка липосомальных составов, модифицированных катионными ПАВ, является сложной задачей, поскольку следует поддерживать тонкий баланс между положительными эффектами и токсичностью, присущей катионным амфифилам [15]. В данном контексте, изучение физико-химических характеристик, включающих в том числе пороги агрегации ПАВ, является обязательным этапом при создании липосомальных наноконтейнеров, поскольку высокая концентрация ПАВ может привести к формированию смешанных мицелл и разрушению структуры липосом [162]. В качестве модифицирующих агентов были опробованы несколько гомологических серий катионных ПАВ для доставки различных лекарственных средств, а именно ПАВ с имидазолиевой и пирролидиниевой головной группой [163,164], фосфониевые ПАВ [156,165] и геминальные аммониевые ПАВ [166,167]. Стоит отметить, что при модификации липосом монокатионными ПАВ, существенные различия наблюдаются при варьировании длины углеводородного радикала, что обуславливает эффективность наноконтейнеров. В случае геминальных ПАВ свой вклад вносит длина спейсерного фрагмента. Геминальные ПАВ с более

коротким спейсером распределяются внутри липидного бислоя, располагая головные группы в одном слое липосом, тогда как геминальные ПАВ с более длинным спейсером встраиваются в липидную мембрану с определенной зигзагообразной конфигурацией, при этом каждая головная группа располагается на разных сторонах бислоя, изменяя параметры фазового перехода мембраны (рис. 1.15) [168].

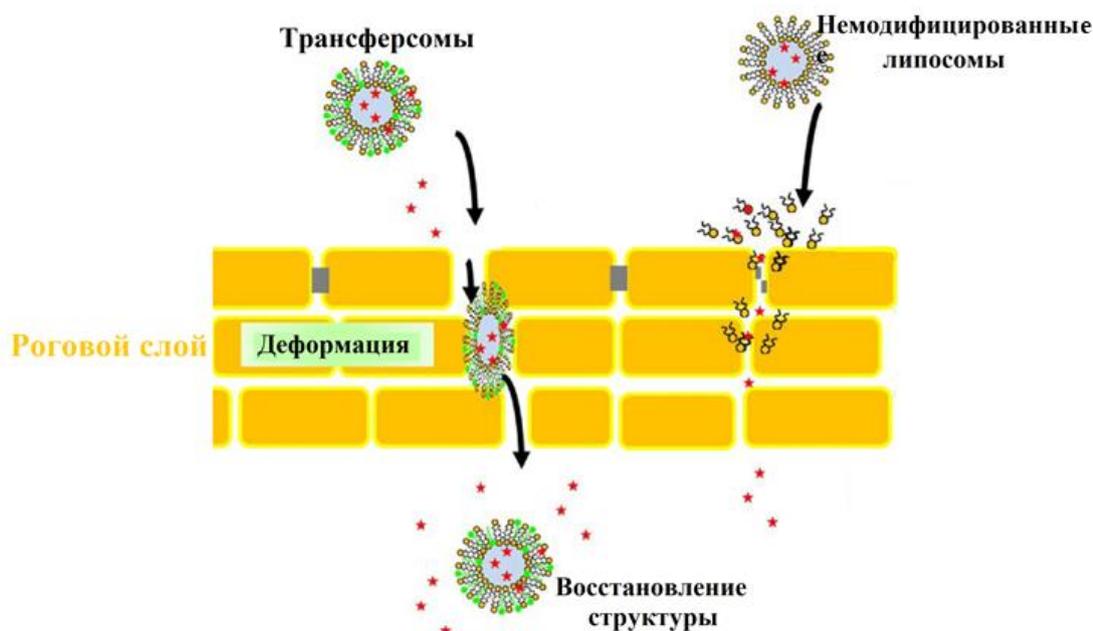


**Рисунок 1.15.** Схематическое изображение встраивания геминальных ПАВ с длинным спейсерным фрагментом в липидный бислой [168].

Модификация липосом амфифильными молекулами ведется в нескольких направлениях, а именно для доставки антимикробных агентов [169], противовоспалительных средств [170] и противоопухолевых препаратов [171]. В литературе есть работы по синтезу гликозилированных ПАВ [172,173] и амфифилов на основе витамина Е [174], конъюгированных с ПЭГ, которые в значительной степени отличны по структуре от традиционных ПАВ. Достаточно широко используемым подходом является модификация липосом амфифильными пептидами, которые имеют высокое сродство к опухолевым клеткам за счет специфического связывания с экспрессируемыми на раковых клетках рецепторами интегрина, факторов роста (GFR) и

рецепторами, связанными с G-белком. Важно то, что липосомы можно функционализировать с помощью нацеливающих пептидов либо путем конъюгации пептида на поверхности предварительно сформированных липосом, либо путем смешивания липидов с амфифильными пептидами, позволяя им агрегировать [175]. Липосомы, модифицированные двумя амфифильными пептидами RGD и GHK, продемонстрировали синергический эффект в отношении клеточного поглощения наноконтейнеров, а загрузка в них доксорубицина и паклитаксела позволила увеличить их цитотоксичность, сопровождающуюся окислительным стрессом и деполяризацией митохондрий в раковых клетках [176].

Еще одним широко известным способом модификации свойств липидных наноконтейнеров амфифильными молекулами является получение ультрадеформируемых липосом – трансферсом – путем включения в липидный бислой краевых активаторов, которые в большинстве своем представлены неионными ПАВ. Они обладают способностью проникать через поры значительно меньшего размера, чем собственные, что обусловлено их чрезвычайно высокой деформируемостью (рис. 1.16) [177]. Трансферсомы впервые были предложены Sevc и Blume в 1992 году как системы доставки лекарств, состоящие из двух компонентов, которые значительно отличаются друг от друга своими стабилизирующими/дестабилизирующими свойствами [178]. Считается, что наличие краевого активатора в составе трансферсом увеличивает их деформируемость за счет уменьшения межфазного натяжения. Наиболее значимые успехи в использовании трансферсом были получены в области дермальной и трансдермальной доставки лекарств, которая является серьезным препятствием для проникновения лекарственных веществ в кровотоки из-за плотно упакованных клеток эпидермиса (роговой слой) и дермы. В 2000 году, через восемь лет после открытия трансферсом, были предложены новые наноконтейнеры, называемые этосомы, которые содержат относительно высокий процент этанола для преодоления кожного барьера [179]. Сочетание двух систем доставки в одной (трансферсом и этосом) с повышенной способностью проникать через кожный барьер привело к созданию трансэтосом, которые впервые были предложены в 2012 году [180].



**Рисунок 1.16.** Схема проникновения ультрадеформируемых и немодифицированных липидных наноконтейнеров через роговой слой кожи [181].

Фосфолипид 90 G [182], яичный фосфатидилхолин [183], соевый фосфатидилхолин [184] и неионные ПАВ Твин® и Спан® чаще всего используют в качестве основных компонентов трансферсом. В зависимости от цели, состав трансферсом и, соответственно, их свойства, могут быть модифицированы путем варьирования компонентов и их соотношения. Например, в работе [185] было изучено 12 систем с различными ПАВ в составе, а также с различным соотношением лекарственное вещество/липид и ПАВ/липид. Добавление в систему лаурилсульфата натрия по сравнению с Твин®80 и цетримидом привело к увеличению эффективности инкапсулирования гидрофильного препарата ивабрадин гидрохлорида. Авторы объясняют это явление различием ГЛБ, длиной углеводородного радикала, а также физико-химическими характеристиками исследованных амфифилов. Варьируя соотношение компонентов, можно добиться необходимого размера, заряда и эффективности инкапсулирования субстратов. В работе [186] варьировали соотношение липид/ПАВ (90/10, 85/15 и 75/25) и, согласно результатам, соотношение компонентов 85/15 является предпочтительным по многим параметрам, тогда как в работе [185] система с соотношением 75/25 обладает наиболее оптимальным размером и зарядом, а также высокими значениями эффективности инкапсулирования и пролонгированным

высвобождением субстрата. В связи со спецификой применения трансферсом водные растворы наночастиц не подходят для трансдермального введения из-за их неспособности удерживаться на поверхности кожи, что ограничивает эффективность доставки лекарств к целевым участкам. Поэтому большинство создаваемых трансдермальных составов изготавливается в форме гелей, что облегчает их применение и сравнение с коммерчески доступными лекарственными препаратами. Для этой цели чаще всего используют Carborol®934 [187], гидроксипропилметилцеллюлозу [188] или смесь полимеров [189]. Как упомянуто выше, трансферсомы проникают через кожу благодаря деформируемости, тогда как липосомы, модифицированные катионными ПАВ, способны проникать через кожный барьер также благодаря, вероятно, дополнительному дестабилизирующему эффекту липидного бислоя [190]. Примером этому являются липосомы, модифицированные катионными ПАВ с пирролидиниевой и имидазолиевой головной группой, которые в значительной степени способствовали проникновению нестероидных противовоспалительных препаратов через кожу и снижению степени отека лапы крыс, вызванного каррагинаном [164]. Существует предположение, что эффективность липидных наноносителей, модифицированных катионными амфифилами, в значительной степени зависит от гидрофобности и способности разрыхлять липидный бислой, тогда как при модификации наноконтейнеров неионными ПАВ, ключевым параметром является радиус их кривизны [191]. Стоит отметить, что мнения исследователей об эффективности катионных носителей в улучшении проникновения лекарств через кожу расходятся, однако эффективность трансферсом в данном направлении не вызывает сомнений. Стоит отметить, что несмотря на то, что трансферсомы являются широко изучаемыми системами доставки лекарств, многие грани их использования все еще не раскрыты и они являются потенциально перспективными.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что исследование свойств новых ПАВ является динамично развивающейся областью, однако работ по нековалентной модификации липидных наноконтейнеров амфифильными молекулами в литературе мало. Наиболее распространенными ПАВ, применяемыми для получения липидных наноконтейнеров, являются неионные амфифилы, однако область применения этих наночастиц во многом ограничивается лечением локальных кожных заболеваний, тогда как в рамках диссертационной работы раскрыты новые грани применения ультрадеформируемых липосом. Недостатком существующих на сегодняшний день

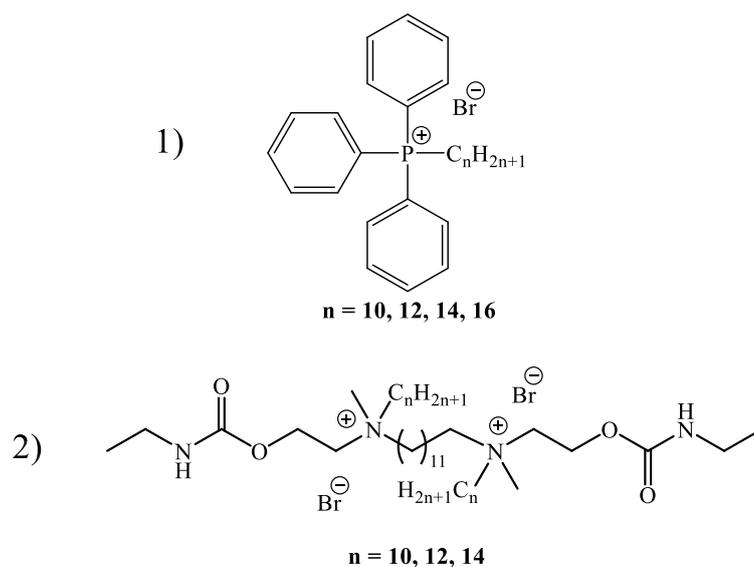
работ по модификации липосом амфифильными молекулами является отсутствие комплексного подхода, включающего синтез ПАВ, изучение закономерностей их агрегации, модификацию наноконтейнеров, определение физико-химических характеристик систем и оценку эффективности модифицированных липосом в биологических экспериментах. Лидирующую нишу в области наномедицины занимает катионизация липидных наноконтейнеров и включение нацеливающих лигандов в их состав, однако в литературе недостаточное внимание уделено систематизации физико-химических характеристик наноконтейнеров, которые напрямую влияют на их эффективность *in vivo*. Стоит отметить, что помимо катионизации липосом за счет включения амфифильных молекул, малоизученным аспектом является синтез ПАВ с фармакофорными группами, которые могут усилить терапевтический эффект лекарственных соединений. Необходимым этапом получения липидных наноформулировок, модифицированных амфифильными соединениями, является оптимизация их состава, включая скрининг по гомологическим рядам и соотношению ПАВ/липид, для достижения лучших показателей стабильности и эффективности загрузки субстрата. В качестве наиболее успешных научных групп в области исследования самоорганизации амфифильных молекул можно выделить научную группу Thomas R.K., Penfold J.B. в сотрудничестве с Petkov J.T. (Великобритания), объектами изучения которой являются ПАВ с природными фрагментами, бинарные системы ПАВ-электролит и смешанные системы амфифилов. Следует также выделить научную группу Mourtas S., Antimisiaris S.G. (Греция) в сотрудничестве с Markoutsas E. (США), исследования которой сосредоточены на создании липосомальных систем для терапии болезни Альцгеймера. В области формирования липосом и гибридных носителей на основе липосомальных формулировок для терапии онкологических заболеваний следует отметить публикационную активность научных групп Чупина В.В. (Россия) и Торчилина В.П. (США).

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Исходные вещества и реагенты

#### *Поверхностно-активные вещества*

В диссертационной работе изучены особенности агрегации индивидуальных и смешанных мицеллярных систем на основе гексадецилтрифенилфосфоний бромида (ТФФБ-16, Alfa Aesar, степень чистоты  $\geq 98\%$ ) и неионного ПАВ Бридж®35 (полиоксиэтилен (23) лауриловый эфир, Acros Organics). Ранее исследованная гомологическая серия ПАВ с трифенилфосфониевой головной группой (ТФФБ- $n$ , где  $n = 10, 12, 14, 16$ ) была изучена в качестве модифицирующего агента для создания липидных наноконтейнеров (рис. 2.1). Катионные ПАВ  $n$ -децилтрифенилфосфоний бромид (ТФФБ-10),  $n$ -додecilтрифенилфосфоний бромид (ТФФБ-12),  $n$ -тетрадецилтрифенилфосфоний бромид (ТФФБ-14) синтезированы исследовательской группой под руководством д.х.н., профессора Галкиной И.В. на кафедре высокомолекулярных и элементоорганических соединений Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета в соответствии с методикой, описанной в работе [21]. Дикационные геминальные ПАВ с карбаматными фрагментами с различной длиной углеводородных радикалов были синтезированы в лаборатории Высокоорганизованных сред к.х.н. Кузнецовым Д.М. в соответствии с методикой, описанной в работе [166] (рис. 2.1).



**Рисунок 2.1.** Структурные формулы исследуемых в диссертационной работе ПАВ: 1)  $n$ -алкилтрифенилфосфоний бромид (ТФФБ- $n$ ); 2)  $N,N'$ -диалкил- $N,N'$ -бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)- $N,N'$ -диметилдодекан-1,12-диаммоний дибромид ( $n$ -12- $n$ (Et)).

Дикатионные геминальные ПАВ с децил-, додецил- и тетрадецильными гидрофобными радикалами и додекановым спейсером были охарактеризованы с помощью элементного анализа, масс-спектрометрии с ионизацией распыления в электрическом поле, а также  $^1\text{H}$  ЯМР- и ИК-спектроскопии.

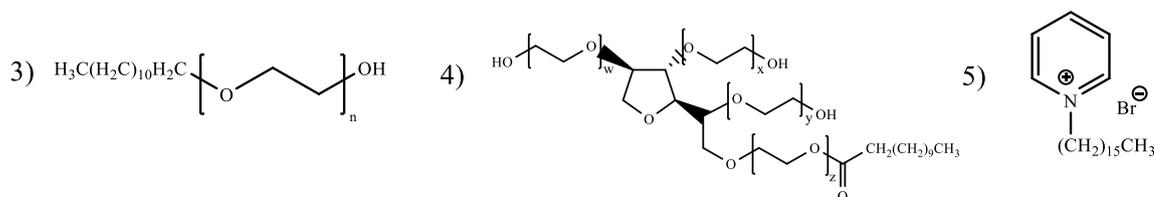
Карбаматсодержащее геминальное ПАВ с децильными гидрофобными заместителями 10-12-10(Et) **N,N'-дидецил-N,N'-бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)-N,N'-диметилдодекан-1,12-диаммоний дибромид**. К 1 mM N,N'-дидецил-N,N'-бис(2-гидроксиэтил)-N,N'-диметилдодекан-1,12-диаммония дибромида добавляли 0.32 мл (4 mM) этилизоцианата и 0.05 г 1,4-диазабцикло[2.2.2]октана (ДАБКО) и перемешивали в течение 16 ч при 60 °C в 30 мл безводного ацетонитрила. Растворитель удаляли в вакууме (20 мм рт. ст.) и продукт перекристаллизовывали из смеси этилацетат/ацетон. Осадок фильтровали и сушили на водяной бане при 40 °C под вакуумом (15 мм рт. ст.). Выход 0.61 г (68%). Белый порошок. Т. пл. 107-110 °C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м. д. (J, Гц): 0.87 т ( $\text{N}^+(\text{CH}_2)_9\text{-CH}_3$ , 6H,  $^3J_{\text{HH}}$  6.8); 1.16 т ( $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_3$ , 6H,  $^3J_{\text{HH}}$  7.2); 1.40-1.26 два м ( $-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}_3$ ,  $\text{N}^+(\text{CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_8\text{-(CH}_2)_2\text{-N}^+$ , 44H); 1.73 м ( $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Алк}$ ,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_8\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+$ , 8H); 3.21 к ( $\text{CO-NH-CH}_2\text{-CH}_3$ , 4H,  $^3J_{\text{HH}}$  7.1); 3.36 ш с ( $\text{N}^+\text{-CH}_3$ , 6H); 3.45 м ( $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Алк}$ , 4H); 3.57 м ( $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_{10}\text{-CH}_2\text{-N}^+$ , 4H); 3.87 м ( $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-}$ , 4H); 4.54 м ( $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-}$ , 4H). ИК-спектр (KBr)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3407, 3227, 2926, 2855, 1721, 0535, 1466, 1378, 1357, 1327, 1250, 1142, 1087, 1043, 992, 602, 844, 776, 722, 652, 585. Элементный анализ  $\text{C}_{44}\text{H}_{92}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_4$  (%): C 58.65; H 10.29; Br 17.74; N 6.22. Найдено (%): C 58.81; H 10.22; Br 17.65; N 6.30. Масс-спектр ИЭР:  $m/z = [(\text{M}-2\text{Br})/2]^{2+} = 370.47$  (рассч. 370.28).

Карбаматсодержащее геминальное ПАВ с додецильными гидрофобными заместителями 12-12-12(Et) **N,N'-дидодецил-N,N'-бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)-N,N'-диметилдодекан-1,12-диаммоний дибромид**. К 1 mM N,N'-дидодецил-N,N'-бис(2-гидроксиэтил)-N,N'-диметилдодекан-1,12-диаммония дибромида добавляли 0.32 мл (4 mM) этилизоцианата и 0.05 г ДАБКО и перемешивали в течение 16 ч при 60 °C в 30 мл безводного ацетонитрила. Растворитель удаляли в вакууме (20 мм рт. ст.) и продукт перекристаллизовывали из смеси этилацетат/ацетон. Осадок фильтровали и сушили на водяной бане при 40 °C под вакуумом (15 мм рт. ст.). Выход 0.55 г (57%). Белый порошок. Т. пл. 124-127 °C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м. д. (J, Гц): 0.88 т ( $\text{N}^+(\text{CH}_2)_{11}\text{-CH}_3$ , 6H,  $^3J_{\text{HH}}$  6.9); 1.16 т ( $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_3$ , 6H,  $^3J_{\text{HH}}$  7.1); 1.40-1.25 два м ( $-(\text{CH}_2)_9\text{-CH}_3$ ,  $\text{N}^+$

(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>, 52H); 1.76-1.72 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Алк, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>, 8H); 3.21 к (CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, 4H, <sup>3</sup>J<sub>НН</sub> 7.1); 3.37 ш с (N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>, 6H); 3.46 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Алк, 4H); 3.58 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>, 4H); 3.90-3.85 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-, 4H); 4.54 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-, 4H). ИК-спектр (KBr) ν, см<sup>-1</sup>: 3218, 3010, 2925, 2855, 1726, 1625, 1535, 1467, 1378, 1357, 1249, 1141, 1088, 1041, 988, 940, 904, 845, 777, 722, 661. Элементный анализ C<sub>48</sub>H<sub>100</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (%): С 60.23; Н 10.53; Br 16.70; N 5.85. Найдено (%): С 60.35; Н 10.58; Br 16.84; N 5.79. Масс-спектр ИЭР: m/z = [(M-2Br)/2]<sup>2+</sup> = 398.56 (расч. 398.31).

Карбаматсодержащее геминальное ПАВ с тетрадецильными гидрофобными заместителями 14-12-14(Et) **N,N'-бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)-N,N'-диметил-N,N'-дитетрадецилдодекан-1,12-диаммоний дибромид**. К 1 мМ N,N'-дитетрадецил-N,N'-бис(2-гидроксиэтил)-N,N'-диметилдодекан-1,12-диаммония дибромида добавляли 0.32 мл (4 мМ) этилизоцианата и 0.05 г ДАБКО и перемешивали в течение 16 ч при 60 °С в 30 мл безводного ацетонитрила. Растворитель удаляли в вакууме (20 мм рт. ст.) и продукт перекристаллизовывали из смеси этилацетат/ацетон. Осадок фильтровали и сушили на водяной бане при 40 °С под вакуумом (15 мм рт. ст.). Выход 0.54 г (53%). Белый порошок. Т. пл. 120-123 °С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ, м. д. (J, Hz): 0.85 т (N<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub>, 6H, <sup>3</sup>J<sub>НН</sub> 6.8); 1.14 т (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, 6H, <sup>3</sup>J<sub>НН</sub> 7.2); 1.36-1.23 два м ((CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-CH<sub>3</sub>, N<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>, 60H); 1.71 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Алк, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>, 8H); 3.18 к (CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, 4H, <sup>3</sup>J<sub>НН</sub> 7.2); 3.35 ш с (N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>, 6H); 3.46 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Алк, 4H); 3.56-3.54 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>, 4H); 3.89 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-, 4H); 4.52 м (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-, 4H). ИК-спектр (KBr) ν, см<sup>-1</sup>: 3414, 3217, 3010, 2926, 2854, 1725, 1625, 1534, 1467, 1378, 1357, 1328, 1249, 1141, 1087, 1041, 992, 940, 903, 845, 776, 722, 663. Элементный анализ C<sub>52</sub>H<sub>108</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (%): С 61.64; Н 10.74; Br 15.77; N 5.53. Найдено (%): С 61.80; Н 10.62; Br 15.71; N 5.65. Масс-спектр ИЭР: m/z = [(M-2Br)/2]<sup>2+</sup> = 426.57 (расч. 426.34).

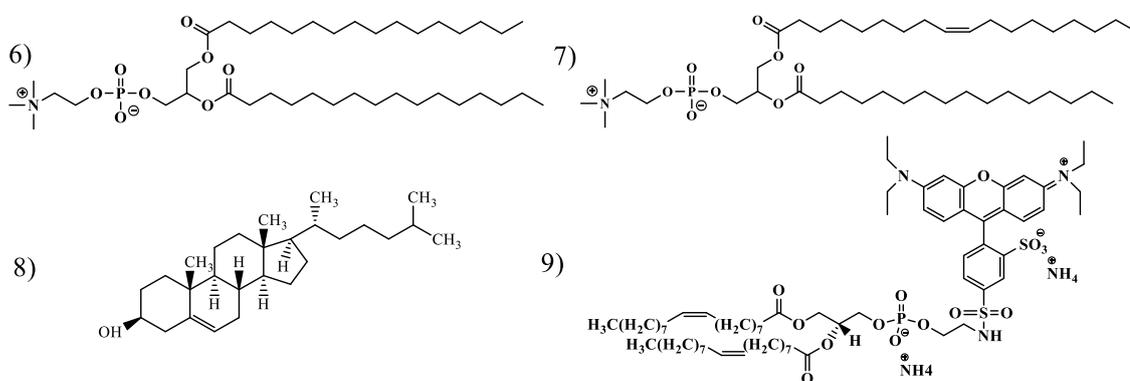
Для формирования смешанных мицеллярных систем с ТФФБ-16 и получения трансферсом были использованы неионные ПАВ Бридж®35 (Acros Organics) и Твин®20 (Ferak Berlin GmbH) соответственно. Числа агрегации мицеллярных систем были получены с использованием цетилпиридиний бромида (ЦПБ, Applichem, степень чистоты 99%) (рис. 2.2).



**Рисунок 2.2.** Классические ПАВ: 3) полиоксиэтилен (23) лауриловый эфир (Бридж®35); (4) полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат (Твин®20); (5) цетилпиридиний бромид (ЦПБ).

### Липиды

Для создания липосом были использованы следующие липиды: 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ, Lipoid, степень чистоты > 99%), соевый L-α-фосфатидилхолин (ФХ, Avanti Polar Lipids, Inc., степень чистоты 95%), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиссамин родамин Б сульфонил) (аммониевая соль) (DOPE-RhB, Avanti Polar Lipids, Inc., степень чистоты > 99%) и холестерин (Хол, Sigma-Aldrich, степень чистоты ≥ 99%) (рис. 2.3). Для получения трансферсом были выбраны яичный фосфатидилхолин (E PC S, Lipoid, степень чистоты ≥ 96%) и соевый фосфатидилхолин (S75, Lipoid, степень чистоты 70%).

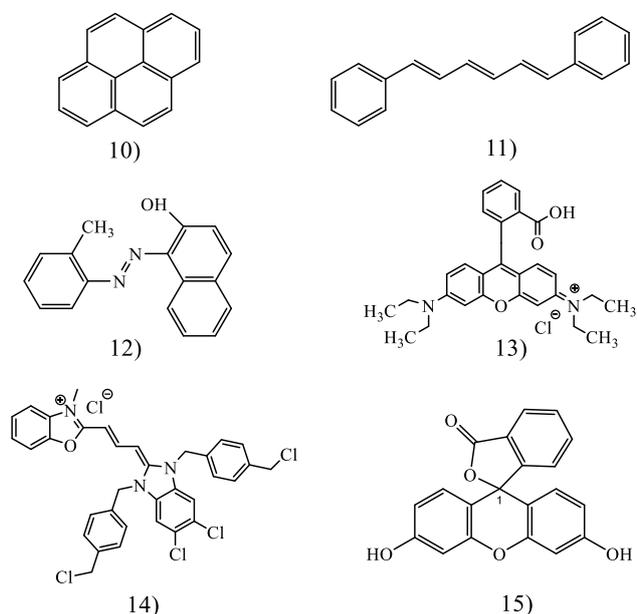


**Рисунок 2.3.** Структурные формулы липидов, использованных для формирования наночастиц: 6) 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ); 7) L-α-фосфатидилхолин (ФХ); 8) холестерин (Хол); 9) 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиссамин родамин Б сульфонил) (аммониевая соль) (DOPE-RhB).

### Спектральные зонды и красители

Для определения физико-химических характеристик исследуемых систем методом флуориметрии (ККМ, числа агрегации и предполагаемая морфология агрегатов) были использованы неполярный флуоресцентный зонд пирен (Sigma-Aldrich, степень чистоты

99%) и 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (ДФГ, Acros Organics, степень чистоты 98%). Значения солубилизационной емкости мицелл и ККМ исследуемых ПАВ определены с использованием гидрофобного азокрасителя Оранж ОТ (Sigma-Aldrich, степени чистоты 75%) (рис. 2.4).



**Рисунок 2.4.** Структурные формулы спектральных зондов и красителей: 10) Пирен; 11) 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (ДФГ); 12) Оранж ОТ (ООТ); 13) Родамин Б (RhB); 14) MitoTracker Green FM; 15) Флуоресцеин (Flu).

Для оценки биологической активности наноконтейнеров, включающей эксперименты по клеточному поглощению и колокализации липидных наночастиц с митохондриями клеток, в липосомы были инкапсулированы флуоресцентные зонды родамин Б (RhB, Acros Organics, степень чистоты > 98%) и флуоресцеин (Flu, Sigma-Aldrich). MitoTracker Green FM (Thermo Fisher Scientific, степень чистоты 98%) был использован для окрашивания митохондрий живых клеток для исследования колокализации липосом с органеллами (рис. 2.4).

#### ***Гидрофильные и гидрофобные субстраты***

Для загрузки в липосомы были использованы коммерчески доступные лекарственные вещества индометацин (IND, Sigma-Aldrich, степень чистоты 99%), доксорубицина гидрохлорид (DOX, Alfa Aesar, степень чистоты  $\geq$  98%), ротенон (ROT, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., степень чистоты > 95%), пиридин-2-альдоксима метохлорид (2-ПАМ, Sigma-Aldrich, степень чистоты > 97%), карбоксин (CBX, АО



растворитель был удален в течение 1 ч на ротационном испарительном приборе RE-52AA (Shanghai Jingke Scientific Instrument Co., Ltd., Китай) под вакуумом при 40-45 °С. Затем полученная липидная пленка была гидратирована очищенной водой или буферным раствором HEPES (Sigma-Aldrich, степень чистоты > 99.5%) с pH = 7.4. Для инкапсулирования гидрофобных субстратов соответствующие навески субстрата были растворены вместе с липидами и ПАВ, а для загрузки гидрофильных субстратов липидная пленка была гидратирована водным или буферным раствором субстрата. Полученные растворы были выдержаны в течение 30 мин (в случае ДПФХ) или в течение 1 ч (для ФХ) на водяной бане при 55 и 60 °С соответственно при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (250 об/мин) (Heidolph Instruments, Германия). Затем растворы были подвержены пятикратному циклу замораживания и размораживания с использованием жидкого азота. На последнем этапе была проведена гомогенизация дисперсий наночастиц путем пропускания их через поликарбонатные мембраны (Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membranes, Великобритания) с размером пор 100 нм с использованием ручного экструдера LiposoFast Basic (Avestin, Канада). Липосомальные дисперсии объемом больше 5 мл были получены с использованием автоматического экструдера LiposoFast LF-50 (Avestin, Канада).

### ***Приготовление гелевой формы наночастиц***

Гелевая форма трансферсом была приготовлена следующим образом: Carbopol® 940 (Acros Organics) был растворен в очищенной воде в концентрации 2 масс.%. Затем полученный раствор перемешивали на магнитной мешалке (Heidolph Instruments, Германия) при 500 об/мин в течение 5 ч. В качестве регулятора pH был использован триэтанолламин (АО «База №1 Химреактивов»).

## **2.3. Методы исследования**

### ***Тензиометрия и кондуктометрия***

Изотермы поверхностного натяжения мицеллярных растворов были определены методом отрыва платинового кольца Дю-Нуи на тензиометре К6 (KRÜSS, Германия) при 25 °С. Для эксперимента были приготовлены растворы ПАВ объемом 10 мл. Измерения были проведены в стеклянных стаканах, диаметр которых превышал диаметр кольца. Измерения поверхностного натяжения проведены до получения стабильных значений. После каждого измерения кольцо было обезжирено в этиловом спирте и тщательно

высушено. ККМ мицеллярных растворов определяли по точке излома на изотерме поверхностного натяжения от концентрации ПАВ.

На основе изотерм поверхностного натяжения были рассчитаны термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования, а именно максимальная адсорбция ( $\Gamma_{\max}$ ), минимальная поверхность, приходящаяся на молекулу ПАВ ( $A_{\min}$ ), и свободная энергия мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ) по следующим формулам:

$$\Gamma_{\max} = (1/2.3 \cdot nRT) \cdot \lim_{C \rightarrow \text{ККМ}} (d\pi/d\log C) \quad (1),$$

где  $R$  – газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура (К),  $n = 2$  для мономерных ПАВ,  $n = 3$  для димерных ПАВ,  $\pi$  – поверхностное натяжение, равное разнице между поверхностным натяжением растворителя и раствора амфифила;

$$A_{\min} = 10^{18}/(N_A \Gamma_{\max}) \quad (2),$$

где  $N_A$  – число Авогадро, для перевода размерности из  $\text{м}^2$  в  $\text{нм}^2$  используется коэффициент  $10^{18}$ ;

$$\Delta G_m = (1 + \beta)RT \ln_{\text{ККМ}} \quad (3),$$

где  $\beta$  – степень связывания противоиона.

Электропроводность мицеллярных растворов была определена на кондуктометре InoLab Cond 7110 (WTW, Германия). Для эксперимента были приготовлены растворы ПАВ объемом 10 мл. Электропроводность всех растворов была зафиксирована при 25 °С, электроды промыты очищенной водой после каждого измерения. ККМ и степень связывания противоиона ( $\beta$ ) определяли по зависимости удельной электропроводности от концентрации исследуемых ПАВ.

### ***Потенциометрия***

Измерения электродного потенциала противоиона  $\text{Br}^-$  проводили с использованием лабораторного иономера И-160МИ (ОАО «Научно-производственное объединение измерительной техники»).  $\text{Br}^-$  селективный электрод (ЭЛИС-131Br) и электрод сравнения (ESr-10101) использовали для измерения электродвижущей силы ( $\Delta E$ ) водных растворов ПАВ. Для калибровки иономера была приготовлена серия растворов  $\text{KBr}$  в диапазоне концентраций от 0.1 до 100 мМ. Степень связывания противоиона ПАВ была рассчитана с использованием уравнения (4) [192]:

$$\beta = 0.5(2C_t - C_{\text{Br}^-})/(C_t - \text{ККМ}) \quad (4),$$

где  $\beta$  – степень связывания бромидного противоиона,  $C_t$  – общая концентрация ПАВ,  $C_{\text{Br}^-}$  – концентрация  $\text{Br}^-$  ионов.

### **Спектрофотометрия**

ККМ и солюбилизационная емкость мицеллярных растворов по отношению к ООТ и индометацину были определены методом спектрофотометрии на приборе Specord 250 Plus (Analytik Jena AG, Германия) с использованием кварцевых кювет с различной длиной оптического пути. Для регистрации спектров поглощения исследуемых солюбилизаторов были приготовлены серии растворов с разной концентрацией ПАВ с добавлением избыточного количества солюбилизатора. Мицеллярные растворы с ООТ были выдержаны в течение 48 ч, а растворы с индометацином – в течение 24 ч при комнатной температуре [93]. Перед измерением несольбуилизованная часть субстратов была отделена с использованием шприцевых фильтрующих насадок Millex®-HV PVDF Membrane (Merck Millipore, США) с размерами пор 450 нм. По мере увеличения концентрации ПАВ в растворе был осуществлен переход к кюветам меньшей толщины, чтобы оптическая плотность растворов не превышала 1. Результаты были приведены в виде зависимостей приведенной оптической плотности при максимуме поглощения ( $D/l$  – отношение оптической плотности к толщине поглощающего слоя) от концентрации ПАВ. Солюбилизационную емкость определяли по следующей формуле:

$$S = V/\varepsilon \quad (5),$$

где  $V$  – наклон зависимости поглощения раствора от концентрации ПАВ (выше ККМ),  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции ( $17400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для ООТ при  $\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ нм}$ , коэффициенты экстинкции индометацина в водных растворах исследуемых ПАВ приведены в Приложении (табл. П1 и П2).

Метод Шотта был использован для расчета чисел агрегации [166,193]. Числа агрегации были рассчитаны для каждой точки на зависимости приведенной оптической площади ООТ от концентрации ПАВ выше ККМ согласно формуле 6. Среднее значение, полученное для 5-6 точек, брали в качестве значений чисел агрегации.

$$N = \frac{\varepsilon(C_{\text{ПАВ}} - \text{ККМ})}{D/l} \quad (6),$$

где  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции ООТ,  $C_{\text{ПАВ}}$  – концентрация ПАВ выше ККМ,  $D/l$  – приведенная оптическая плотность.

### **Флуориметрия**

Методом флуориметрии были определены предполагаемая морфология мицеллярных агрегатов, значения ККМ и чисел агрегации. Для определения ККМ флуоресцентный зонд пирен был внесен при концентрации 1 мкМ в серию растворов ПАВ

за 30-40 мин до анализа. Исходный раствор пирена был приготовлен путем растворения навески в этиловом спирте, чтобы вносимый объем раствора пирена составлял 5 мкл. Анализ проводили на флуориметре F-7100 (Hitachi, Япония) с использованием 10×10 или 10×4 мм кварцевых кювет (Hellma Analytics, Германия). Для определения ККМ были построены зависимости индекса полярности микроокружения пирена от концентрации ПАВ. Индекс полярности зонда был определен отношением интенсивности флуоресценции первого ( $I_1$ ) и третьего ( $I_3$ ) пиков флуоресценции пирена при 373 нм и 383 нм соответственно. ККМ определяли по излому на полученных зависимостях.

Числа агрегации были определены с использованием ЦПБ в качестве тушителя флуоресценции пирена. Растворы ПАВ были приготовлены при постоянной концентрации выше ККМ, а концентрацию ЦПБ варьировали в широком диапазоне. Спектры флуоресцентного излучения пирена были зарегистрированы при длине волны возбуждения 335 нм, спектры испускания – 350-600 нм, ширина щелей возбуждения и испускания – 5 и 2.5 нм соответственно, скорость измерения – 1200 нм/мин. Измерения были проведены при 25 °С. По полученным значениям интенсивности флуоресценции были построены зависимости  $\ln I_0/I_{394}$  от концентрации ЦПБ. Числа агрегации были рассчитаны путем определения тангенса угла наклона ( $\text{tg } \alpha$ ) экстраполируемой прямой зависимостей по следующей формуле:

$$N_{\text{агр}} = \text{tg } \alpha \times (C_{\text{ПАВ}} - C_{\text{ККМ}}) \quad (7).$$

Предполагаемая морфология мицелл была определена по анизотропии флуоресценции ДФГ на флуориметре, оснащенном поляризатором. ДФГ был внесен при концентрации 0.175 мМ в серию растворов ПАВ с различной концентрацией. Значения анизотропии в зависимости от концентрации ПАВ были определены автоматически с помощью встроенного во флуориметр программного обеспечения при длине волны 450 нм.

### *Динамическое и электрофоретическое светорассеяние*

Гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности и дзета потенциал для мицеллярных и липидных систем были определены на приборе Malvern ZetaSizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания) с использованием U-образной дзета-кюветы DTS1070 (Malvern, США). Источником света прибора служит гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм, мощностью 10 кВт и углом рассеяния света 173°. Полученная в ходе анализа корреляционная функция флуктуаций интенсивности рассеянного света

была преобразована в коэффициент диффузии наночастиц, который был использован для расчета гидродинамического диаметра частиц по уравнению Стокса – Эйнштейна:

$$D = kT / 3\pi\eta D_h \quad (8),$$

где  $D$  – коэффициент диффузии,  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $\eta$  – вязкость растворителя,  $D_h$  – гидродинамический диаметр частицы в растворе.

Дзета потенциал исследуемых систем был измерен путем преобразования электрофоретической подвижности частиц с использованием уравнения Смолуховского:

$$\zeta = (\mu \times \eta) / \varepsilon \quad (9),$$

где  $\zeta$  – дзета-потенциал,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость,  $\eta$  – динамическая вязкость жидкости,  $\mu$  – электрофоретическая подвижность частиц.

Для определения диаметра липидных наночастиц дисперсии были разбавлены очищенной водой до концентрации 2 мМ. В случае мицеллярных растворов был произведен подбор нескольких концентраций после ККМ. Перед анализом мицеллярные растворы подвергали фильтрации с использованием стерильных шприцевых фильтрующих насадок Millex®-HV PVDF Membrane (Merck Millipore, США) с размерами пор 450 нм.

### ***Просвечивающая электронная микроскопия***

Визуализация липидных наночастиц была осуществлена с помощью просвечивающей электронной микроскопии на приборе Hitachi HT 7700 Exalens (Hitachi, Япония) в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» Казанского (Приволжского) федерального университета под руководством к.б.н. Евтюгина В.Г. Образцы наночастиц для съемки были разбавлены до 0.005-1 мМ и нанесены на медные подложки (Ted Pella, США) с 15–25 нм углеродной поддерживающей плёнкой и с удаляемой формваровой плёнкой и высушены при комнатной температуре в течение ≈60 мин. Анализ был проведен при ускоряющем напряжении 100 кВ. Диаметр частиц проанализирован соискателем с использованием программного обеспечения ImageJ (номер версии 1.53t) по 15 микрофотографиям.

### ***Определение эффективности инкапсулирования субстратов***

Методом спектрофотометрии были определены эффективность инкапсулирования и скорость высвобождения субстратов *in vitro*. Эффективность инкапсулирования гидрофильных субстратов была определена путем отделения незакапсулированных

субстратов от липосом методом фильтрации/центрифугирования с использованием центрифужных фильтров (Amicon Ultra-0.5, Merck Millipore, США) с размером пор 100 кДа. Эффективность инкапсулирования гидрофобных субстратов была определена путем переноса поликарбонатных мембран после экструзии липосом в органический растворитель. Концентрация незакапсулированного субстрата была рассчитана по их оптической плотности согласно следующей формуле:

$$EE = \frac{\text{Общее количество субстрата} - \text{Количество свободного субстрата}}{\text{Общее количество субстрата}} \times 100 \quad (10).$$

### ***Изучение кинетики высвобождения субстратов из липосом***

Скорость высвобождения субстратов из липосом была определена методом диализа с использованием диализных мешков с размером пор 3 кДа. Для моделирования биологических условий эксперимент по высвобождению субстратов был проведен в 0.025 М натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 7.4) при 37 °С, при скорости перемешивания 200 об/мин. Исследование высвобождения гидрофобных субстратов было проведено в смешанной среде PBS и этанола в различном соотношении. Через определенные промежутки времени были отобраны аликвоты объемом 2 мл из внешней среды для определения оптической плотности субстратов. Концентрация высвободившегося субстрата была рассчитана по формуле Бугера-Ламберта-Бера по оптической плотности в буферной среде:

$$D = \varepsilon \times l \times C \quad (11),$$

где  $D$  – оптическая плотность,  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции,  $l$  – толщина поглощающего слоя,  $C$  – концентрация субстрата.

Эксперимент проводили не менее трех раз для подтверждения достоверности результатов, которые представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Профили высвобождения субстратов были проанализированы с помощью математических моделей Корсмейера-Пеппаса (12), Хигучи (13) и первого порядка (14) с использованием программного обеспечения OriginPro 8.5 в соответствии со следующими уравнениями:

$$Q_t = k_{KP} \cdot t^n \quad (12),$$

где  $Q_t$  – доля субстрата, высвободившаяся за время  $t$ ,  $k_{KP}$  – константа высвобождения с учетом структурных и геометрических характеристик субстрата по модели Корсмейера-Пеппаса,  $\%/мин^n$ ,  $n$  – величина диффузионной экспоненты.

$$Q_t = k_X \cdot t^{1/2} \quad (13),$$

где  $Q_t$  – доля субстрата, высвободившаяся за время  $t$ ,  $k_x$  – константа высвобождения Хигучи, %/мин<sup>1/2</sup>.

$$Q_t = Q_\infty \cdot (1 - e^{-k_1 t}) \quad (14),$$

где  $Q_t$  – доля субстрата, высвободившаяся за время  $t$ ,  $Q_\infty$  – общая доля высвободившегося субстрата,  $k_1$  – константа высвобождения первого порядка, 1/мин.

### ***Проникновение СВХ в клубни картофеля***

Для демонстрации эффективности доставки СВХ, загруженного в трансферсомы, часть картофельного клубня ( $2 \pm 0.001$  г) погружали в дисперсию наночастиц на 24 ч. Эксперименты были проведены в условиях полной защиты от прямых солнечных лучей. Через 24 ч клубни промывали дистиллированной водой и помещали в среду PBS:этанол (7:3) для экстракции СВХ. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоту и регистрировали оптическую плотность. Измерения проводили до тех пор, пока значения не выходили на плато, что соответствовало полному выходу СВХ из клубней картофеля. Регистрацию оптической плотности СВХ осуществляли с использованием 0.2 см кварцевой кюветы. Эксперимент повторяли не менее 3 раз.

### ***Визуализация трансферсом внутри картофельных клубней***

Эксперимент проводили в Лаборатории механизмов роста растительных клеток Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН под руководством и.о. г.н.с., д.б.н. Горшковой Т.А. и н.с., к.б.н. Петровой А.А. Клубни картофеля погружали в дисперсию трансферсом с флуоресцеином. Через 24 ч поперечные срезы (толщиной 100 мкм) клубней картофеля готовили с помощью вибратора Leica VT 1000S (Leica Biosystems, Германия) со скоростью разреза 0.65 мм/с и частотой 70 Гц. Флуоресценцию Flu в срезах картофельных клубней наблюдали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Leica DM1000 (Leica Biosystems, Германия), оснащенного ртутной лампой и соответствующим фильтрующим кубом (фильтр возбуждения – 460-500 нм, барьерный фильтр – 512-542 нм).

### ***Биологические эксперименты in vitro, ex vivo u in vivo***

*In vitro* и *in vivo* биологические эксперименты проведены в Международном научно-инновационном Центре нейробиологии и фармакологии ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН. Координация биологических экспериментов осуществлена руководителем Международного научно-

инновационного Центра нейрoхимии и фармакологии, к.б.н. Петровым К.А. и с.н.с., к.б.н. Волошиной А.Д.

### ***Оценка проникающей способности трансферсом через кожу***

Ячейки Франца (SES GmbH Analysesysteme, Германия) были использованы для оценки проникающей способности трансферсом через кожу крыс линии Вистар и синтетическую мембрану (Strat-M®, Merck KGaA, Германия), имитирующую кожу. Перед экспериментом кожу крыс выдерживали в PBS не менее 30 мин. Дисперсию трансферсом помещали в донорную ячейку площадью 0.785 см<sup>2</sup>. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты для спектрофотометрического определения концентрации субстрата в рецепторной ячейке объемом 5 мл с использованием 0.2 см кюветы. Измерения проводили при 25 °С и 37 °С в зависимости от исследуемой системы при постоянном перемешивании. Эксперимент повторяли не менее 3 раз.

### ***Анализ цитотоксичности***

Жизнеспособность клеток была оценена с помощью колориметрического анализа МТТ. Клетки высевали и инкубировали с исследуемыми соединениями. Оценку токсичности тестируемых соединений проводили с помощью многофункциональной системы Cytell Cell Imaging (GE Health Care Life Science, Швеция) с использованием приложения Cell Viability Bio. Цитотоксичность была выражена в концентрации полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>), расчет которой производили с помощью программы MLA - «Quest Graph™ IC50 Calculator» [194].

### ***Гемолитическая и гемагглютинирующая активность***

Гемолитическая и гемагглютинирующая активность наночастиц была определена с использованием эритроцитарной массы человека. Степень гемолиза была определена путем сравнения оптической плотности гемоглобина, высвободившегося в раствор при 100% гемолизе, и оптической плотности после обработки эритроцитарной массы раствором наночастиц [195]. Адгезию эритроцитов можно было наблюдать как невооруженным глазом, так и под микроскопом Nikon Eclipse Ci-S (Nikon, Япония).

### ***Анализ клеточного поглощения***

Для определения клеточного поглощения опухолевые клетки выдерживали с тестируемыми соединениями в течение 24 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клеточное поглощение было анализировано с использованием проточного цитометра (Guava EasyCyte 8HT,

США) с последующей обработкой результатов с помощью системы Cytell Cell Imaging с использованием приложений Cell Viability BioApp и Apoptosis BioApp.

### ***Колокализация***

Степень колокализации липосом с митохондриями была исследована с помощью конфокального сканирующего микроскопа Leica SP5 TCS (Leica Microsystems, Германия) в Казанском институте биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН под руководством с.н.с., к.б.н. Самигуллина Д.В. и н.с., к.б.н. Сибгатуллиной Г.В. Клеточные линии инкубировали с липосомами с флуоресцентным зондом RhV или флуоресцентным липидом DOPE-RhV. Митохондрии клеток окрашивали флуоресцентным красителем MitoTracker Green FM в течение 20 мин. Возбуждение RhV было зафиксировано при 561 нм, и флуоресцентное излучение было записано в диапазоне от 570 до 700 нм. Длина волны возбуждения MitoTracker была зафиксирована при 488 нм, а флуоресцентное излучение было записано в диапазоне от 500 до 540 нм. Непосредственно микроскопическая съемка культур клеток была осуществлена соискателем, также как и обработка полученных результатов. Статистическая обработка результатов была проведена с использованием программного обеспечения ImageJ (номер версии 1.53t).

### ***Определение пути апоптоза клеток***

Клеточные линии инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 24 ч. Затем методом проточной цитометрии была изучена индукция апоптоза клеток с использованием флуоресцентного красителя JC-10 (Mitochondria Membrane Potential Kit, Sigma-Aldrich) на проточном цитометре Guava EasyCyte 8HT (Luminex, США) [196].

### ***Биологические эксперименты in vivo***

*In vivo* эксперименты были проведены в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества 2010/63/ЕС. Протокол экспериментов одобрен Комитетом по уходу и использованию животных ФИЦ Казанский научный центр РАН (протокол № 2 от 9 июня 2022 г.). Животных содержали в хорошо проветриваемом помещении при температуре 20-22 °С, 12-часовом цикле света/темноты и относительной влажности 60–70%. Крысы линии Вистар приобретены в Лабораторном животноводческом комплексе (филиал Института биоорганической химии им. Шемякина-Овчинникова, Пушкино, Московская область, Россия). Трансгенные мыши с моделью болезни Альцгеймера были приобретены в Институте физиологически активных веществ Федерального

исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН (Черноголовка, Московская область, Россия).

### ***Определение степени реактивации ацетилхолинэстеразы***

Степень реактивации ацетилхолинэстеразы (АХЭ) крови была определена с помощью метода Элмана. Крысам линии Вистар внутрибрюшинно была введена сублетальная концентрация параоксона (РОХ) (0.6 мг/кг). Кровь для исследования (200 мкл) была отобрана через различные промежутки времени терапии. Ферментативная реакция была запущена добавлением 20 мкл 0.1 М ацетилтиохолина, после чего спектрофотометрически при длине волны 436 нм была определена скорость реакции в течение 2 мин.

### ***Фармакокинетика***

Фармакокинетика 2-РАМ в плазме крыс линии Вистар была изучена после трансдермального введения гелевой формы трансферсом. Гель (0.6 г) был нанесен на выбритую спину крыс, затем в определенные промежутки времени (6, 12 и 24 ч) были отобраны образцы крови у 6 животных для выделения плазмы. 2-РАМ из полученных биологических образцов был экстрагирован метанолом в три стадии непосредственно диссертантом [195,197].

### ***Тест на выживаемость крыс***

Для определения выживаемости крыс при трансдермальном введении 2-РАМ, крысам линии Вистар была введена летальная доза параоксона (1 мг/кг). Было протестировано 3 различных стратегии лечения отравления, включающие трансдермальное введение 2-РАМ в концентрации 10 мг/кг [195].

### ***Проникновение в мозг***

Анализ проникновения липосом в мозг крыс линии Вистар при интраназальном введении проводили с помощью флуоресцентной микроскопа Leica TSC SP5 MP (Leica Microsystems, Германия). Срезы головного мозга крыс толщиной 10 мкм были подготовлены с использованием микротомы Tissue-Tek Cryo3 (Sakura Finetek, США). Возбуждение RhB было зафиксировано при 550 нм, и флуоресцентное излучение было записано при 570 нм. В качестве контроля были выбраны необработанные животные и животные, которым был введен свободный RhB.

### ***Тест «Распознавание нового объекта»***

Эксперименты были проведены на трансгенных мышах с моделью болезни Альцгеймера обоего пола, экспрессирующих химерный мышинный/человеческий белок – предшественник  $\beta$ -амилоида и мутантный человеческий пресенелин-1 (линия B6C3-Tg(APP695)85Dbo (APP/PS1). Тест был проведен в течение трех дней, во время которого животным представляли различные объекты с возможностью их изучить. Соотношение времени изучения «старых» и «новых» объектов было выражено в индексе предпочтения [165,198]. Статистический анализ был проведен с помощью теста ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

### ***Гистохимические исследования***

Результат лечения мышей с моделью Альцгеймера липосомальными системами был исследован путем определения скорости образования амилоидных бляшек в энторинальной коре и зонах гиппокампа головного мозга. Количество и площадь  $\beta$ -амилоидных бляшек, окрашенных Тиофлавином S (Sigma-Aldrich), анализировали с помощью конфокального сканирующего микроскопа Leica DM6000 CFS (Leica Microsystems, Германия). Результаты усредняли по 10 срезам мозга каждого животного [165,166].

Таким образом, в диссертации разработан протокол оптимизации состава липидных наноконтейнеров: (1) получение стабильных липосом в водной среде (варьирование соотношения липид/ПАВ, длины углеводородного радикала амфифила); (2) получение гелевой формы наноконтейнеров (подбор концентрации полимера, температурного режима, времени и скорости перемешивания); (3) инкапсулирование субстратов различной природы (загрузка на разных стадиях формирования липидной пленки); (4) выбор метода определения эффективности инкапсулирования для гидрофобных и гидрофильных субстратов; (5) оценка скорости высвобождения субстратов (расчет оптимального объема диализной среды и дисперсии липосом, подбор математической модели обработки результатов); (6) исследование проникающей способности наноконтейнеров через модельные и клеточные мембраны (выбор температурного режима и композиций для экспериментов *in vitro* и *ex vivo*).

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. НАНОНОСИТЕЛИ С ИНТЕГРИРОВАННЫМИ В СОСТАВ КАТИОННЫМИ И НЕИОННЫМИ ПАВ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ БАРЬЕРОВ

В диссертационной работе исследованы индивидуальные и смешанные композиции на основе катионных и неионных амфифилов и липидов, причем ПАВ играют роль основного структурообразующего элемента в мицеллярных системах и выступают в качестве модификатора поверхности в липидных формулировках. Цель работы заключается в создании наноконтейнеров, способных преодолевать биологические барьеры за счет нековалентной модификации катионными и неионными ПАВ, оценке их физико-химических характеристик и установлении закономерностей влияния структурных параметров на функциональную активность *in vitro* и *in vivo*. Обсуждение результатов работы построено путем усложнения композиций, а именно по траектории «мицеллы-липосомы», поскольку выявление закономерностей агрегации ПАВ в водных растворах позволяет получать такие важные характеристики, как ККМ, солюбилизационная активность, токсичность, что является фундаментом в процессе оптимизации состава липосом.

В первом блоке обсуждения результатов обобщены данные и закономерности, полученные при работе с мицеллярными системами, рассмотрение которых начинается со смешанных мицелл на основе гексадецилтрифенилфосфоний бромиды и неионного ПАВ Бридж®35. Для данного ряда катионных амфифилов известна высокая солюбилизирующая способность по отношению к гидрофобным субстратам наряду с низкими значениями ККМ [21,199] и таргетность к митохондриям клеток [161,165], а тестирование их в составе смешанных композиций позволит оценить возможность снижения токсичности системы. Далее осуществлен переход к геминальным дикатионным ПАВ с карбаматными фрагментами и додекановым спейсером, специально синтезированным в рамках развития работы по дизайну наноконтейнеров для лечения болезни Альцгеймера. Известно, что карбаматный фрагмент является фармакофором ингибиторов ацетилхолинэстеразы и потенциально может вносить положительный вклад в общий терапевтический эффект композиции. Геминальные дикатионные ПАВ с карбаматными фрагментами и додекановым спейсером являются новыми представителями катионных амфифилов, поэтому комплексная физико-химическая характеристика их агрегационных свойств в водных растворах и солюбилизирующей

способности по отношению к гидрофобным субстратам методами тензиометрии, кондуктометрии, флуориметрии, спектрофотометрии, динамического светорассеяния, а также антимикробной активности является обязательной стадией исследования.

Во втором блоке обсуждения результатов описаны данные по модифицированным амфифилами липосомальным системам. Стоит отметить, что липосомы, модифицированные неионными ПАВ, так называемые трансферсомы, впервые были предложены еще в 1992 году [178]. Поэтому работа с модифицированными липосомами в рамках диссертации была инициирована именно на примере трансферсом, но для решения не стандартных задач по трансдермальной доставке нестероидных противовоспалительных препаратов, а для доставки фунгицида карбоксин в клубни картофеля и лечения острого отравления ФОС путем трансдермальной доставки реактиватора холинэстеразы 2-РАМ. Успешность работы с трансферсомами вдохновила дальнейший переход к модификации липосом непосредственно ключевыми объектами диссертационной работы – катионными ПАВ. Поэтому второй слот обсуждения результатов представлен липосомами, нековалентно модифицированными гомологической серией алкилтрифенилфосфоний бромидов, которые были протестированы в качестве наноконтейнеров для лекарственных средств в рамках терапии как онкологических, так и нейродегенеративных заболеваний с акцентом на митохондриях как ключевых органеллах, отвечающих за процессы жизнедеятельности и запрограммированной гибели клеток. Финальная часть обсуждения результатов описывает липосомы, модифицированные геминальными дикатионными ПАВ с карбаматными фрагментами и додекановым спейсером. Данная часть диссертационной работы позволила аккумулировать полученный на момент написания диссертации опыт по модификации липосом катионными ПАВ и выстроить цепочку «направленный синтез амфифилов – агрегация ПАВ – нековалентная модификация липосом амфифильными соединениями» с обобщением закономерностей между физико-химическими параметрами липосомальных наноконтейнеров и показателями эффективности на уровне *in vitro* и *in vivo* экспериментов.

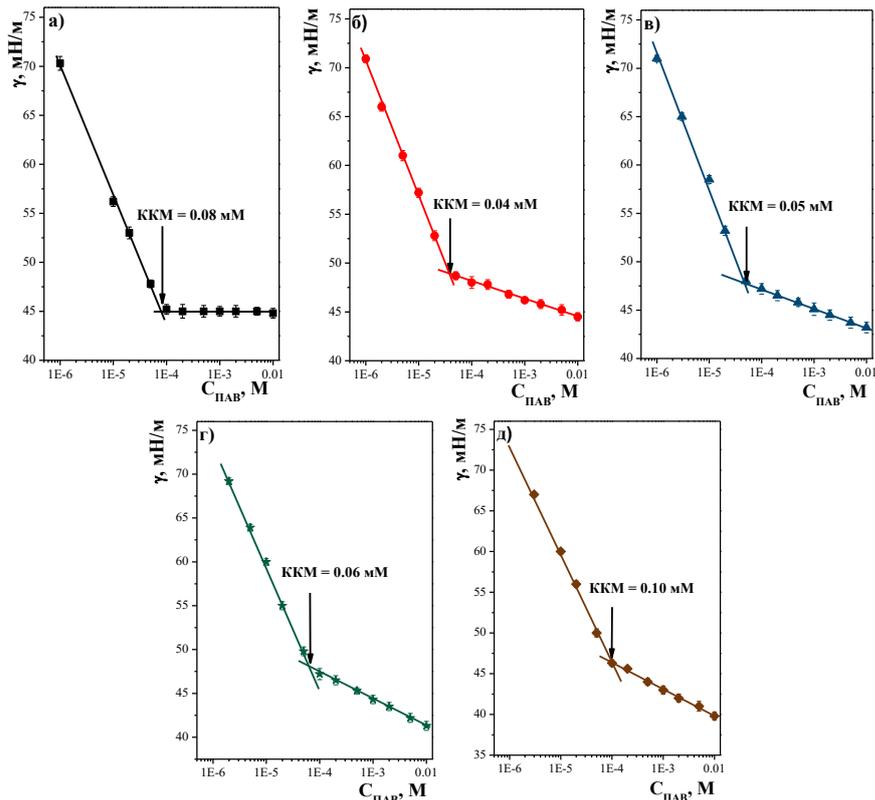
### **3.1. Смешанные мицеллярные системы на основе катионного ПАВ гексадецилтрифенилфосфоний бромида и неионного ПАВ Бридж®35**

Смешанные растворы на основе двух ПАВ могут обладать преимуществами по сравнению с системами на основе индивидуальных амфифилов. Большой интерес представляют смеси неионных и катионных ПАВ, поскольку такая комбинация может привести к улучшению физико-химических и адсорбционных свойств (за счет катионного ПАВ) и к уменьшению токсичности всей системы (за счет неионного ПАВ). В качестве объектов исследования в данном направлении работы были выбраны Бридж®35 и гексадецилтрифенилфосфоний бромид. Бридж®35 является распространённым, хорошо изученным неионным ПАВ и обладает улучшенной биосовместимостью по сравнению с другими представителями неионных амфифилов (Твин®80, Спан®60, Тритон®X-114, Бридж®30, Плуороник®L62 и Тритон®X-100). Фосфониевые ПАВ изучены в меньшей степени, однако известно, что они обладают существенно более низкими значениями ККМ по сравнению с их триметиламмониевыми аналогами [199]. Кроме того, наличие у алкилтрифенилфосфоний бромидов объемной липофильной головной группы с делокализованным положительным зарядом позволяет их использовать для нацеливания на клеточные органеллы, а именно на митохондрии. В основе сбора доказательной базы совместной агрегации смешанных систем лежит использование широкого набора физико-химических методов, а именно, тензиометрии, флуориметрии, спектрофотометрии, динамического светорассеяния. Получение данных о солубилизационной активности смешанных систем по отношению к гидрофобным субстратам, в том числе и лекарственным веществам, является одним из критериев применимости мицеллярных систем и позволит расширить выбор ПАВ в зависимости от области применения.

#### **3.1.1. Пороги агрегации и термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования смешанных систем**

В рамках настоящей работы для определения поверхностного натяжения растворов ПАВ был использован метод отрыва кольца Дью Нуи. 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 ( $\alpha_1$ ) в следующих пределах:  $\alpha_1 = 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1$ . Из графиков видно (рис. 3.1), что увеличение концентрации ПАВ приводит к закономерному и линейному

снижению поверхностного натяжения раствора, что связано с адсорбцией молекул ПАВ на границе раздела фаз «вода-воздух». При достижении максимальной адсорбции ПАВ на границе раздела фаз в системах начинается самопроизвольный процесс мицеллообразования, что в классическом случае сопровождается незначительным изменением поверхностного натяжения раствора и, соответственно, выходом изотермы на плато.



**Рисунок 3.1.** Изотермы поверхностного натяжения мицеллярных растворов ТФФБ-16/Бридж®35 при различной мольной доле катионного ПАВ ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ): а)  $\alpha_1 = 0$ ; б)  $\alpha_1 = 0.3$ ; в)  $\alpha_1 = 0.5$ ; г)  $\alpha_1 = 0.7$ ; д)  $\alpha_1 = 1$ , 25 °С.

Интересно отметить, что подобный характер изменения поверхностного натяжения после ККМ наблюдается только в случае индивидуальной системы на основе Бридж®35 ( $\alpha_1 = 0$ ) (рис. 3.1а). В случае смешанной системы ТФФБ-16/Бридж®35 при  $\alpha_1 = 0.3, 0.5, 0.7$  подобного равновесного состояния между молекулярной и мицеллярной формой ПАВ не наблюдается, и поверхностное натяжение продолжает снижаться даже после точки ККМ (рис. 3.1б, 3.1в, 3.1г). Подобный результат для индивидуальной мицеллярной системы на основе ТФФБ-16 ( $\alpha_1 = 1$ ) уже был показан ранее, и изменения не зависели от

времени или от метода определения поверхностного натяжения (методы Дью Нуи и Вильгельми) [21]. Стоит отметить, что подобный характер изменения поверхностного натяжения наблюдается даже при небольшом содержании катионного ПАВ, что говорит о значительном влиянии ТФФБ-16 на свойства всей системы.

Согласно данным, представленным на рисунке 3.1 и в таблице 3.1, 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. Ранее другими исследовательскими группами были показаны аналогичные результаты для систем неионное/катионное ПАВ [18,200,201]. Добавление неионного ПАВ, вероятно, способствует снижению электростатического отталкивания между головными группами ТФФБ-16, что объясняет снижение ККМ всей системы [202]. Известно, электростатическое отталкивание между молекулами катионных ПАВ преимущественно влияет на то, что катионные ПАВ по сравнению с неионными ПАВ агрегируют при более высоких концентрациях [203].

Взаимодействие разнотипных ПАВ в смеси описывается моделью идеального смешения, предложенной в 1950-х годах [38]. Данная модель успешно применяется и по сей день для прогнозирования поведения ПАВ в смеси. В настоящей работе была использована расширенная модель бинарного смешения Клинга [39,40]:

$$\frac{1}{C^*} = \frac{\alpha_1}{C_1} + \frac{\alpha_2}{C_2} \quad (15),$$

где  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  – мольная доля катионного и неионного ПАВ в растворе;  $C^*$ ,  $C_1$  и  $C_2$  – величины ККМ для смешанной системы, катионного и неионного ПАВ соответственно.

Согласно проведенным расчетам, смешанные системы на основе ТФФБ-16/Бридж®35 при различной мольной доле катионного ПАВ не подчиняются модели идеального смешения. Как видно из таблицы 3.1, расчетные значения ККМ гораздо выше, чем экспериментально полученные, что свидетельствует о наличии синергетического эффекта, который наиболее выражен при мольной доле ТФФБ-16, равной 0.3 и 0.5. Однако стоит отметить, что тенденция в изменении экспериментальных и расчетных величин сохраняется: увеличение доли ТФФБ-16 в системе приводит к небольшому увеличению ККМ.

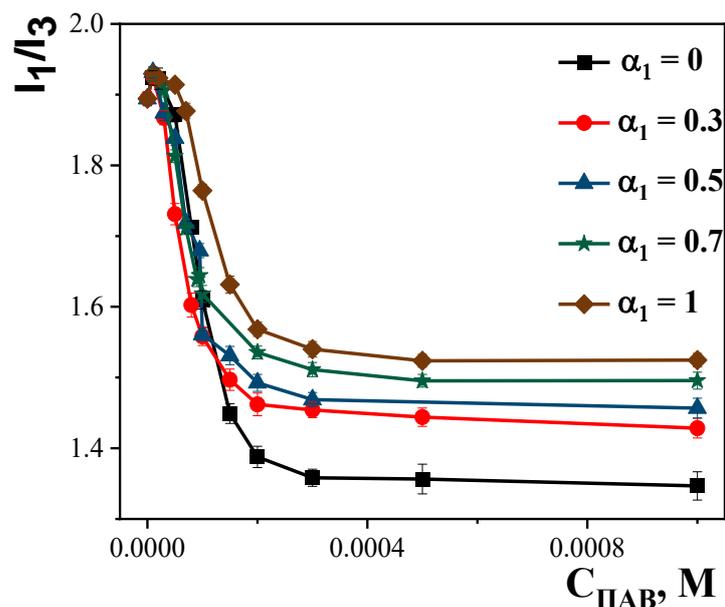
**Таблица 3.1.** Значения ККМ и термодинамических параметров адсорбции и мицеллообразования: максимальная адсорбция ( $\Gamma_{max}$ ), минимальная поверхность в расчете на молекулу ПАВ ( $A_{min}$ ) и свободная энергия мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ) для смешанных систем ТФФБ-16/Бридж®35 в условиях варьирования доли катионного ПАВ ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ), 25 °С.

$\alpha_1$	ККМ, мМ		$\Gamma_{max} \cdot 10^6$ , моль/см <sup>2</sup>	$A_{min}$ , нм <sup>2</sup>	- $\Delta G_m$ , 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

Для более детального понимания процессов адсорбции и мицеллообразования в смешанных системах ТФФБ-16/Бридж®35, по изотермам поверхностного натяжения были рассчитаны термодинамические параметры, а именно максимальная адсорбция ( $\Gamma_{max}$ ), минимальная поверхность в расчете на молекулу ПАВ ( $A_{min}$ ) и свободная энергия мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ). Согласно данным, представленным в таблице 3.1, значения  $\Delta G_m$  имеют отрицательные значения, что свидетельствует о том, что процесс мицеллообразования в смешанной системе термодинамически выгоден и протекает самопроизвольно. Важно отметить, что абсолютные значения  $\Delta G_m$  достигают максимума при  $\alpha_1 = 0.3$  и  $0.5$ , что согласуется со значениями ККМ, которые имеют минимальные значения для указанных  $\alpha_1$ . Для бинарной системы значения максимальной адсорбции ниже, чем для катионного ПАВ ТФФБ-16, и больше, чем для неионного ПАВ Бридж®35. Подобная зависимость характерна для смешанных ионно-неионных систем [204], в том числе для систем с Бридж®35 [205]. Вероятно, увеличение доли катионного ПАВ в системе затрудняет процесс агрегации амфифилов на границе раздела фаз за счет возникновения электростатического отталкивания головных групп ТФФБ-16 [206], что в свою очередь приводит к уплотнению поверхностного слоя и увеличению значений  $\Gamma_{max}$  [207]. Уменьшение значений  $A_{min}$  при увеличении ТФФБ-16 в системе подтверждают описанные выше рассуждения.

Одним из высокочувствительных методов исследования свойств коллоидных систем является флуориметрия. Данный метод предоставляет возможность изучить не только

пороги агрегации ПАВ, но и предполагаемую форму мицелл и числа агрегации. Для количественных измерений применяются флуоресцентные зонды, например, пирен. Известно, что первый ( $I_1$  – интенсивность флуоресценции при 373 нм) и третий ( $I_3$  – интенсивность флуоресценции при 383 нм) пики спектра флуоресценции пирена чувствительны к изменениям полярности микроокружения зонда, которые возникают при образовании мицелл в водном растворе [208]. Пирен сольбилизируется в гидрофобном ядре мицелл, что приводит к уменьшению полярности микроокружения зонда. Флуоресцентные спектры пирена были зафиксированы в условиях варьирования мольной доли катионного ПАВ. По результатам эксперимента были построены графики зависимости индекса полярности пирена ( $I_1/I_3$ ) от концентрации ПАВ (рис. 3.2). Стоит отметить, что значение индекса полярности не опускается ниже 1.3 во всех системах, что позволяет предположить, что пирен неглубоко погружается в гидрофобное ядро мицелл и, вероятно, находится в их палисадной области.



**Рисунок 3.2.** Соотношения интенсивностей флуоресценции первого (373 нм) и третьего пиков (383 нм) пирена от концентрации ПАВ в системе ТФФБ-16/Бридж®35 при варьировании мольной доли катионного ПАВ ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ), 25 °С.

Ранее было показано, что значение ККМ амфифилов по данным флуориметрии можно определить по двум точкам зависимости: по точке в центре сигмоиды или по точке выхода зависимости на плато [209]. Согласно расчетам, проведенным по методике,

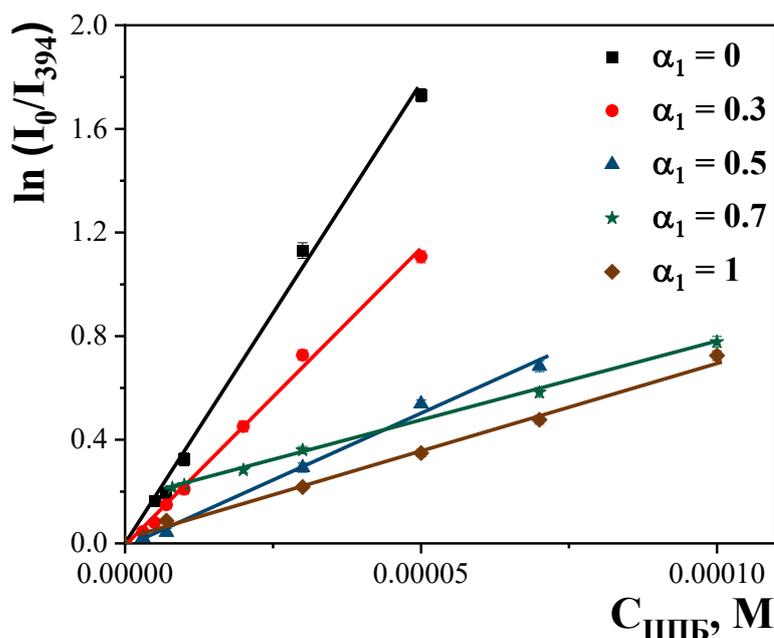
описанной в [209], для представленных на рисунке 3.2 результатов истинным является значение ККМ в центре сигмоиды. Пороги формирования агрегатов в смешанных системах на основе ТФФБ-16/Бридж®35 снижаются по сравнению со значениями ККМ индивидуальных систем катионных и неионных ПАВ с минимальным значением для  $\alpha_1 = 0.5$  (табл. 3.2). Стоит заметить, что данный результат хорошо согласуется с тензиометрическими данными (табл. 3.1).

**Таблица 3.2.** Значения ККМ, чисел агрегации и анизотропии ДФГ, определенные методом флуориметрии, для системы ТФФБ-16/Бридж®35 с различной мольной долей катионного ПАВ ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ), 25 °С.

$\alpha_1$	0	0.3	0.5	0.7	1
ККМ <sub>флуор</sub> , мМ	0.08	0.06	0.05	0.06	0.10
N <sub>агр</sub>	35	14	12	6	9
$\tau$	0.060	-	0.089	-	0.120

Числа агрегации (N<sub>агр</sub>) являются важной характеристикой мицелл, которая выражает количество молекул ПАВ в мицелле. Определение чисел агрегации проводят при фиксированной концентрации ПАВ выше значений ККМ. В данной работе растворы были приготовлены при концентрации, в 10 раз превышающей ККМ, определенную методом флуориметрии (табл. 3.2). В процессе эксперимента были получены спектры тушения флуоресценции пирена в отсутствие и в присутствии тушителя ЦПБ. По значениям интенсивности флуоресценции пирена были построены графики зависимости  $\ln(I_0/I_{394})$  от концентрации ЦПБ для определения чисел агрегации исследуемых систем. Эти зависимости были линеаризованы (рис. 3.3) для расчета тангенса угла наклона ( $\tan \alpha$ ) и вычисления чисел агрегации согласно формуле (7) (табл. 3.2). Стоит отметить, что функциональная связь между точками в кривых возникает при значении коэффициента корреляции ( $R^2$ ), равном 1. Согласно результатам, для всех систем значение  $R^2$  выше 0.99, что говорит о достоверности полученных результатов. Показано, что по мере увеличения мольной доли ТФФБ-16 в системе значения чисел агрегации уменьшаются и для ТФФБ-16 равны 9, что, вероятно, связано с зарядовыми и структурными особенностями головной группы катионного ПАВ. Из-за объемной головной группы ТФФБ-16 в агрегаты может включиться гораздо меньше мономеров по сравнению с неионными ПАВ. Подобный характер уменьшения чисел агрегации по мере увеличения доли катионного

ПАВ был показан другими авторами для системы геминальное ПАВ/Бридж®35 [210]. Свой вклад в снижение чисел агрегации вносит также электростатическое отталкивание положительно заряженных головных групп ТФФБ-16 [211]. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными: для индивидуальной системы ТФФБ-16 при концентрации 0.3 мМ и 1 мМ были получены значения чисел агрегации 2 и 7 соответственно [199], а для Бридж®35 числа агрегации были равны 40 [212].

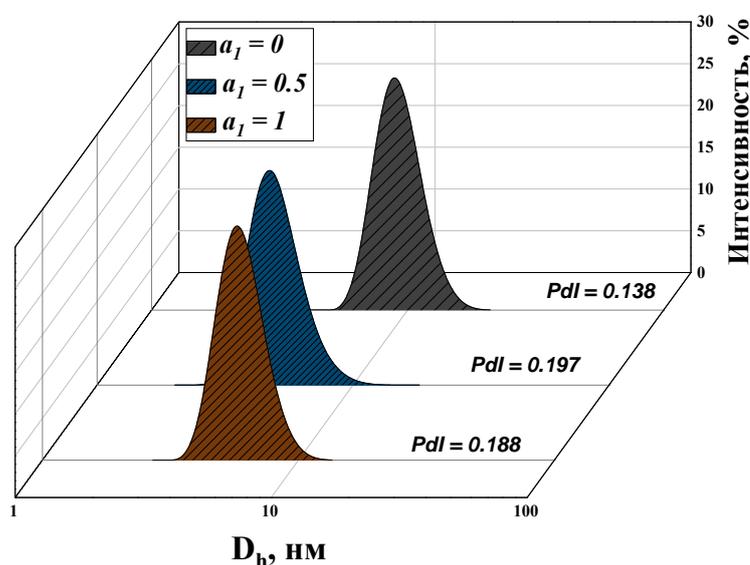


**Рисунок 3.3.** Зависимость  $\ln(I_0/I_{394})$  в водных растворах ТФФБ-16/Бридж®35 от концентрации тушителя ЦПБ ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ), 25 °С.

Таким образом, сформированы смешанные мицеллярные системы на основе катионного ПАВ гексадецилтрифенилфосфоний бромид и неионного ПАВ Бридж®35 при варьировании мольной доли ТФФБ-16 ( $\alpha_1 = 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1$ ). Методом тензиометрии и флуориметрии были определены значения ККМ, которые имели большую сходимость между собой. Также в смешанных системах наблюдается синергетический эффект между компонентами (при  $\alpha_1 = 0.3$  и  $0.5$ ), выражающийся в снижении ККМ смешанных систем по сравнению с индивидуальными. Полученные результаты дают основания для продолжения исследования и оценки солубилизационных свойств бинарных систем по отношению к гидрофобным субстратам.

### 3.1.2. Солюбилизационная активность и гидродинамический диаметр смешанных мицелл

Методом динамического рассеяния света (ДРС) и флуориметрии были определены размер и предполагаемая морфология агрегатов индивидуальных и смешанных мицеллярных систем. Показано, что в индивидуальных растворах неионного ПАВ образуются мицеллы размером 10 нм (0.8 мМ Бридж®35), а в случае ТФФБ-16 диаметр мицелл составляет 6 нм (0.2 мМ ТФФБ-16) (рис. 3.4). Формирование смешанных мицелл приводит к небольшому уменьшению их гидродинамического диаметра до 7 нм (ТФФБ-16/Бридж®35,  $\alpha_1 = 0.5$ , 0.25 мМ). Вероятно, формирование смешанной композиции приводит к компактизации мицелл за счет экранирования положительного заряда ТФФБ-16 неионными амфифилами. Уменьшение размера мицелл может быть объяснено также с точки зрения количества мономеров, участвующих в формировании мицелл. Как было показано ранее, числа агрегации для Бридж®35 практически в три и четыре раза выше, чем для смешанной системы с ТФФБ-16 ( $\alpha_1 = 0.5$ ) и для индивидуального раствора ТФФБ-16 ( $\alpha_1 = 1$ ) (табл. 3.2). Стоит отметить, что представленные на рисунке 3.4 данные хорошо согласуются со значениями размеров, усредненных по числу частиц и объему.

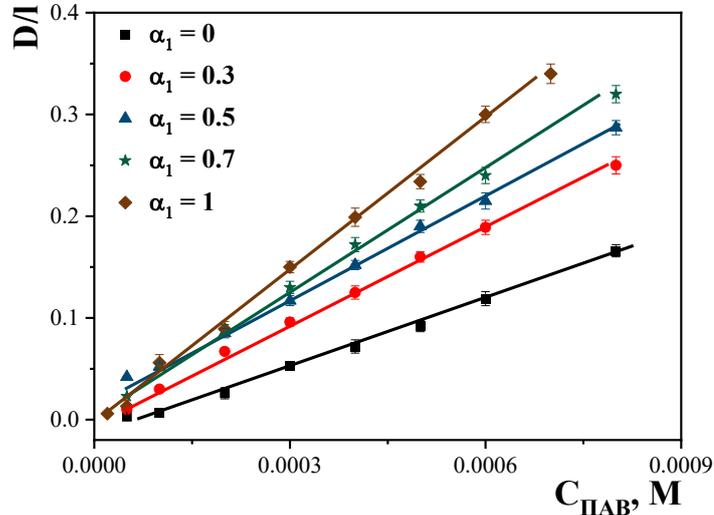


**Рисунок 3.4.** Гидродинамический диаметр индивидуальных и смешанных систем на основе ТФФБ-16/Бридж®35, усредненный по интенсивности ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ), 25 °С.

Для определения предполагаемой формы агрегатов был использован флуоресцентный зонд 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (ДФГ) – один из наиболее часто используемых флуоресцентных зондов для изучения динамических и структурных свойств агрегатов путем измерения анизотропии флуоресценции ( $r$ ) [213]. Изменение значений анизотропии ДФГ обусловлено различной плотностью упаковки углеводородных цепей ПАВ в везикулярных и мицеллярных агрегатах. Известно, что анизотропия флуоресценции ДФГ превышает 0.14 в присутствии двухслойных агрегатов, а для сферических или цилиндрических мицелл  $r$  ниже 0.14 [214]. При постоянной концентрации ПАВ 1 мМ были получены следующие значения анизотропии: 0.06 (Бридж®35), 0.089 (ТФФБ-16/Бридж®35,  $\alpha_1 = 0.5$ ), 0.12 (ТФФБ-16) (табл. 3.2). То есть в исследуемых композициях образуются сферические мицеллы. Данные по анизотропии ДФГ в присутствии исследуемых ПАВ в очередной раз подтверждают достоверность ранее описанных результатов, полученных методом флуориметрии (числа агрегации) и динамического светорассеяния (диаметр частиц), и констатируют факт формирования сферических мицелл.

Способность ПАВ солюбилизовать гидрофобные субстраты, включая лекарственные вещества, является одним из важных свойств амфифильных соединений. Необходимость в солюбилизирующих агентах обусловлена тем, что большая часть биологически активных веществ имеет ограниченную растворимость или нерастворима в воде, что приводит к снижению биодоступности лекарственных соединений и, соответственно, к уменьшению их терапевтического эффекта. В рамках исследования смешанной системы ТФФБ-16/Бридж®35 сначала был выбран Оранжевый OT, который в рамках комплексной физико-химической оценки новых амфифильных соединений используется в качестве модельного субстрата и позволяет проводить сравнительный анализ по значениям солюбилизационной емкости [215]. На примере ООТ спектрофотометрическим методом были определены значения ККМ и солюбилизационной емкости ( $S$ ) смешанных систем. На рисунке 3.5 представлены концентрационные зависимости приведенной оптической плотности насыщенных растворов ООТ в максимуме поглощения при варьировании мольной доли катионного ПАВ. Как видно из зависимостей, для всех систем наблюдается резкий рост солюбилизации ООТ после образования в растворе мицеллярных агрегатов, что позволяет определить значения ККМ и сравнить их с ранее полученными значениями.

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. 3.3), что подтверждает рассуждения о появлении синергизма при смешивании катионных и неионных ПАВ.

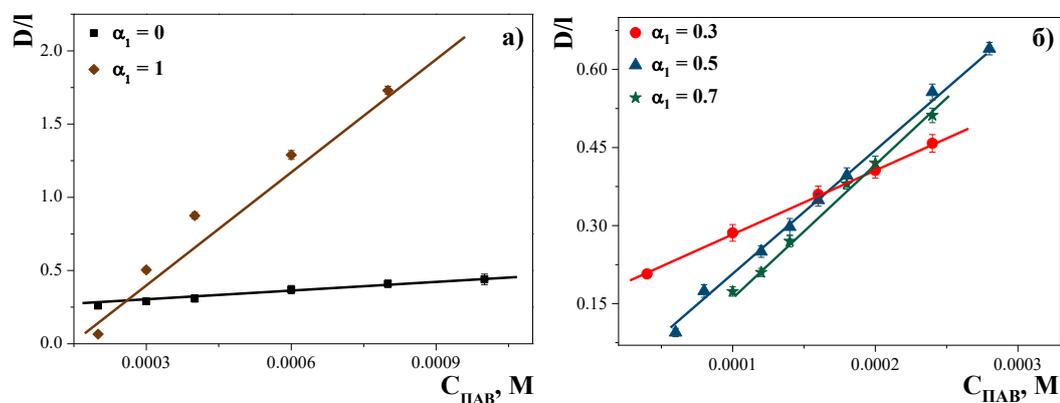


**Рисунок 3.5.** Зависимость приведенной оптической плотности насыщенных растворов Оранж ОТ при максимуме поглощения (495 нм) от общей концентрации ПАВ для системы ТФФБ-16/Бридж®35 ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ), 25 °С.

Количественная характеристика солубилизации – значение солубилизационной емкости, которое является отношением количества солубилизата к количеству ПАВ. Этот показатель был рассчитан по зависимостям, представленным на рисунке 3.5, с использованием формулы (5). Значения солубилизационной емкости систем по отношению к Оранж ОТ представлены в таблице 3.3. Как видно из результатов, наибольшие значения  $S$  получены для индивидуального раствора ТФФБ-16 (0.028 моль<sub>ОТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub>), а наименьшие – для Бридж®35 (0.013 моль<sub>ОТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub>). Оптимальным значением мольной доли катионного ПАВ, при котором солубилизационная емкость смешанных систем равна 0.022 моль<sub>ОТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub>, является  $\alpha_1 = 0.7$ . Стоит отметить, что в этом случае в системе катионного ПАВ на 30% меньше, однако солубилизационная емкость сравнима со значениями для индивидуальной системы на основе катионного ПАВ ТФФБ-16. Данный результат является благоприятным с точки зрения достижения максимальной биодоступности субстрата, исключая токсичность, присущую индивидуальному катионному ПАВ. Данные хорошо согласуются со значениями, полученными ранее. В работе [199] солубилизационная емкость для индивидуального

раствора ТФФБ-16 была равна 0.0277 моль<sub>ООТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub>, а для Бридж®35 – порядка 0.009 моль<sub>ООТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub> [216].

На следующем этапе смешанные мицеллярные системы были протестированы с целью солюбилизации нестероидного противовоспалительного лекарственного препарата индометацин. Этот препарат является также плохо растворимым в полярных средах, что подчеркивает практическую значимость исследования [217]. Стоит отметить, что в присутствии исследуемых в работе ПАВ происходит смещение длины волны максимума поглощения индометацина с  $\lambda_{\max} = 321$  нм для  $\alpha_1 = 0$  до  $\lambda_{\max} = 328$  нм для  $\alpha_1 = 1$  и небольшое изменение значений коэффициента экстинкции (табл. П1). На рисунке 3.6 представлены концентрационные зависимости приведенной оптической плотности насыщенных растворов IND в мицеллярных растворах ТФФБ-16/Бридж®35 при варьировании мольной доли катионного ПАВ. Рисунок поделен на две части, так как концентрационные диапазоны для индивидуальных (рис. 3.6а) и смешанных (рис. 3.6б) композиций сильно отличаются. Как и в случае с ООТ, на зависимостях наблюдается резкий рост приведенной оптической плотности IND по мере роста концентрации ПАВ.



**Рисунок 3.6.** Зависимость приведенной оптической плотности насыщенных растворов индометацина при максимуме поглощения (321-328 нм) от общей концентрации ПАВ для системы ТФФБ-16/Бридж®35 с различной мольной долей катионного ПАВ ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ): а)  $\alpha_1 = 0$  и  $\alpha_1 = 1$ ; б)  $\alpha_1 = 0.3$ ,  $\alpha_1 = 0.5$  и  $\alpha_1 = 0.7$ , 25 °С.

По полученным зависимостям приведенной оптической плотности IND от концентрации ПАВ были рассчитаны значения солюбилизационной емкости, которые представлены в таблице 3.3. Даже при небольшом добавлении катионного ПАВ в систему, солюбилизационная емкость возрастает в 7 раз с дальнейшим увеличением по

мере возрастания доли ТФФБ-16. Присутствие катионного ПАВ улучшает растворимость, вероятно, за счет электростатических взаимодействий с анионными группами лекарственного соединения. Наиболее высокие значения солюбилизационной емкости смешанных систем, сопоставимые со значениями для ТФФБ-16, наблюдаются в случае системы ТФФБ-16/Бридж®35 при  $\alpha = 0.5$  и  $0.7$ , как и в случае с ООТ. Стоит отметить, что солюбилизационная емкость смешанных систем по отношению к IND сопоставима со значениями не только для ТФФБ-16, но и со значениями, полученными для пирролидиниевых ПАВ ( $0.312 \text{ моль}_{\text{IND}}/\text{моль}_{\text{ПАВ}}$  для гексадецильного производного) [218].

**Таблица 3.3.** 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 ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ).

$\alpha_1$	0	0.3	0.5	0.7	1
ККМ <sub>спектр</sub> , мМ*	0.10	0.05	0.05	0.05	0.10
S <sub>ООТ</sub> , моль <sub>ООТ</sub> /моль <sub>ПАВ</sub>	0.013	0.018	0.019	0.022	0.028
S <sub>IND</sub> , моль <sub>IND</sub> /моль <sub>ПАВ</sub>	0.027	0.196	0.385	0.380	0.399

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

Таким образом, были успешно сформированы смешанные мицеллярные системы на основе неионного амфифила Бридж®35 и катионного ПАВ ТФФБ-16 при различном мольном соотношении компонентов. Показана возможность создания смешанных композиций с пониженной токсичностью вследствие введения неионного ПАВ и высокой солюбилизационной активностью по отношению к Оранж ОТ и индометацину за счет присутствия катионного ПАВ. Результаты, полученные комплексом физико-химических методов, позволили выявить не уступающую, а в некоторых случаях и превосходящую индивидуальные системы по свойствам смешанную композицию, а именно системы с  $\alpha_1 = 0.5$  и  $\alpha_1 = 0.7$ . Помимо агрегационных и солюбилизирующих свойств был также определен гидродинамический диаметр и предполагаемая морфология смешанных систем методом ДРС и флуориметрии. Было показано, что переход к смешанным системам приводит к образованию мицеллоподобных агрегатов с небольшой компактизацией по размеру по сравнению с индивидуальными мицеллами.

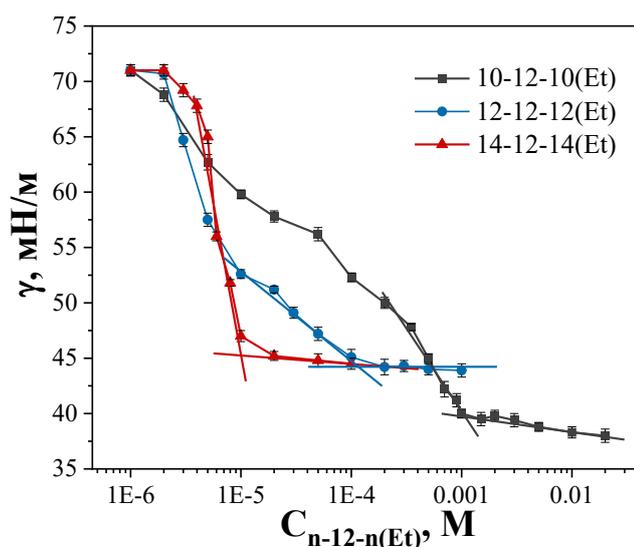
### **3.2. Агрегационные, солюбилизационные и антимикробные свойства дикаатионных геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами**

Направленный синтез новых амфифильных соединений лежит в основе нанотехнологического подхода к разработке новых типов носителей лекарственных средств. Если первая мицеллярная композиция, представленная в диссертационной работе, а именно система ТФФБ-16/Бридж®35, была сформирована на основе уже изученных в индивидуальных растворах компонентов, то на следующем этапе исследования был осуществлен синтез новой гомологической серии дикаатионных ПАВ с додекановым спейсером и карбаматными фрагментами (n-12-n(Et)) для увеличения эффективности терапии болезни Альцгеймера. Ривастигмин является одобренным лекарственным препаратом карбаматного типа для лечения нейродегенеративных заболеваний [95], что обуславливает перспективность использования геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами в качестве модификаторов липосом при дизайне наноконтейнеров для лекарственных препаратов в рамках терапии болезни Альцгеймера. Кроме того, дикаатионные ПАВ характеризуются более низкими значениями ККМ по сравнению с классическими монокатионными ПАВ. Стоит отметить, что изменение структурных характеристик геминальных ПАВ, таких как длина спейсерного фрагмента и алкильных радикалов, присутствие функциональных групп, может вызывать существенные различия в агрегационном поведении и практически полезных свойствах [219,220]. Например, введение биоразлагаемых фрагментов в молекулы катионных ПАВ позволяет решить проблему их токсичности [89]. Исследованы практически важные свойства нового гомологического ряда, а именно поверхностная, солюбилизационная и антимикробная активности, а также способность встраиваться в липидный бислой липосом [166].

#### **3.2.1. Пороги агрегации и термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования карбаматсодержащих геминальных ПАВ**

Методами тензиометрии, кондуктометрии и флуориметрии были определены пороги агрегации гомологической серии геминальных ПАВ. График зависимости поверхностного натяжения от концентрации n-12-n(Et) показан на рисунке 3.7, из которого видно, что поверхностное натяжение уменьшается с увеличением концентрации ПАВ и выходит на плато. Для 10-12-10(Et) и 12-12-12(Et) наблюдается пологий наклон

изотермы поверхностного натяжения, а для 14-12-14(Et) отчетливо видно более резкое снижение поверхностного натяжения. Точки излома на изотермах соответствуют значениям ККМ, которые находятся в микромолярном диапазоне (табл. 3.4). Показано, что увеличение длины алкильных цепей ПАВ приводит к уменьшению значений ККМ, поскольку гидрофобный эффект является движущей силой мицеллообразования в водных растворах. По сравнению со значениями ККМ ранее изученных геминальных карбаматсодержащих ПАВ типа n-6-n(Et) (5.8, 0.5 и 0.03 мМ для 10-6-10(Et), 12-6-12(Et), 14-6-14(Et) соответственно) [90] новые амфифилы с додекановым спейсером n-12-n(Et) имеют более низкие значения ККМ (1, 0.11 и 0.013 мМ для 10-12-10(Et), 12-12-12(Et), 14-12-14(Et) соответственно) (табл. 3.4). Это может быть связано с тем, что гибкий длинный углеводородный спейсер может сворачиваться и способствовать усилению гидрофобного эффекта в процессе мицеллообразования.



**Рисунок 3.7.** Изотермы поверхностного натяжения водных растворов геминальных карбаматсодержащих ПАВ, 25 °С.

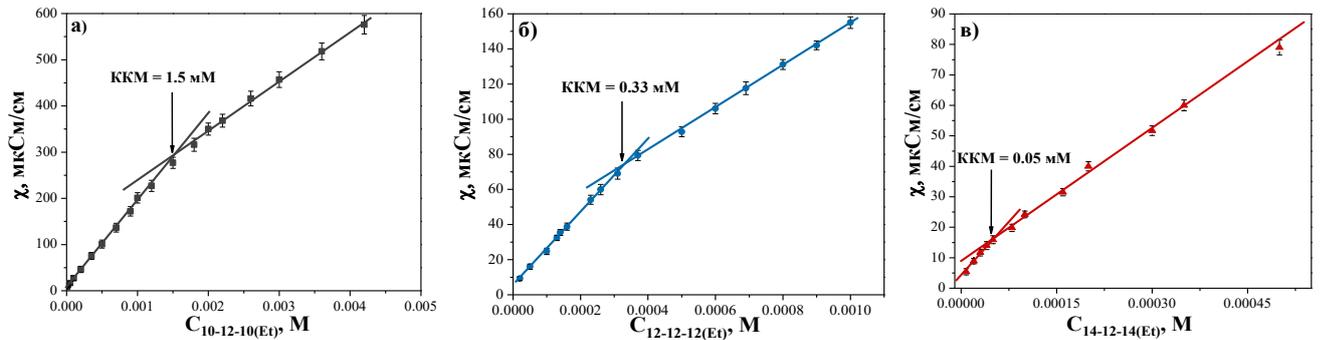
Помимо значений ККМ, по результатам, полученным методом тензиометрии, были определены термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования геминальных ПАВ (табл. 3.4). Согласно представленным результатам, величина  $\Gamma_{\max}$  уменьшается с увеличением длины углеводородного радикала с  $C_{10}$  до  $C_{12}$ , а величина  $A_{\min}$  увеличивается, однако для тетрадецильного гомолога наблюдается резкое изменение этих параметров в противоположную сторону. Подобная немонотонная зависимость

ранее была показана и для дикатионных ПАВ с изопропильным и 2-гидроксиэтильным фрагментами в головной группе [221,222].

**Таблица 3.4.** Значения ККМ геминальных карбаматсодержащих ПАВ, определенные методами тензиометрии и кондуктометрии; термодинамические параметры адсорбции и мицеллообразования: максимальная адсорбция ( $\Gamma_{max}$ ), минимальная поверхность в расчете на молекулу ПАВ ( $A_{min}$ ), свободная энергия мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ); значения степени связывания  $\text{Br}^-$  противоиона, полученные методами кондуктометрии ( $\beta_{конд}$ ) и потенциометрии ( $\beta_{пот}$ ), 25 °С.

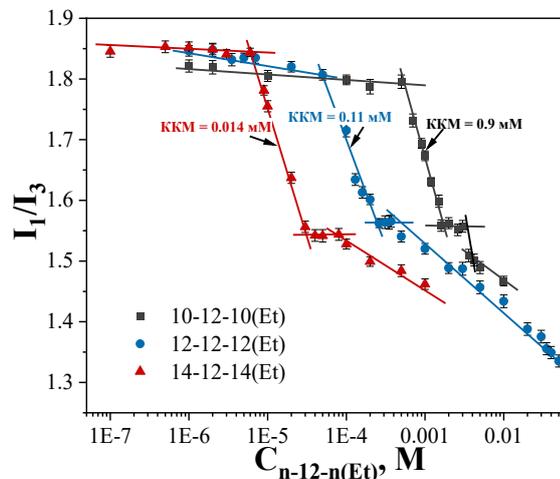
n-12-n(Et)	ККМ <sub>конд</sub> , мМ	ККМ <sub>тенз</sub> , мМ	$\Gamma_{max} \cdot 10^6$ , моль/см <sup>2</sup>	$A_{min}$ , нм <sup>2</sup>	$-\Delta G_m$ , кДж/моль	$\beta_{конд}$	$\beta_{пот}$
10-12-10(Et)	1.5	1	0.71	2.34	25.5	0.41	-
12-12-12(Et)	0.33	0.11	0.41	4.08	29.1	0.41	0.45
14-12-14(Et)	0.05	0.013	3.21	0.52	37.0	0.44	0.30

Пороги агрегации геминальных ПАВ и степень связывания  $\text{Br}^-$  противоиона ( $\beta$ ) получены методом кондуктометрии. Значения ККМ были определены по перегибу на зависимости удельной электропроводности от концентрации ПАВ (рис. 3.8). Значения ККМ, полученные двумя разными методами, имеют хорошую сходимость. Степень связывания противоиона, определенная по кондуктометрическим зависимостям, остается примерно одинаковой для всех гомологов геминальных ПАВ, с несколько более высоким значением для тетрадецильного гомолога ( $\beta_{конд} = 0.44$ ). Степень связывания  $\text{Br}^-$  противоиона для 12-12-12(Et) и 14-12-14(Et) также была определена с использованием бром-селективного электрода. График изменения электродного потенциала ( $\Delta E$ ) от концентрации  $\text{Br}^-$  противоионов представлен на рисунке ПЗ. Для 12-12-12(Et) значение  $\beta_{пот}$  совпало с данными, полученными кондуктометрическим методом. Несмотря на некоторые различия, полученные для 14-12-14(Et), можно заключить, что геминальные ПАВ имеют более низкие значения  $\beta$  по сравнению с монокатионными ПАВ. Сравнительно низкие значения степени связывания  $\text{Br}^-$  противоиона геминальных карбаматсодержащих ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом можно объяснить, во-первых, с точки зрения низкой плотности заряда из-за пространственно разделенных аммониевых групп [223,224], и, во-вторых, экранированием заряда дополнительными заместителями в головной группе [54].



**Рисунок 3.8.** Зависимость удельной электропроводности от концентрации водных растворов а) 10-12-10(Et); б) 12-12-12(Et); в) 14-12-14(Et), 25 °С.

На основании спектров флуоресценции пирена была построена зависимость параметра полярности ( $I_1/I_3$ ) зонда от концентрации геминальных ПАВ (рис. 3.9). Показано, что даже наличие длинного гидрофобного спейсера в молекулах геминальных ПАВ не сильно снижает параметр полярности пирена по сравнению с карбаматсодержащими ПАВ n-6-n(Et) [90]. Следует отметить, что столь высокие значения параметра полярности пирена, солюбилизированного в мицеллы, указывают на относительно полярное микроокружение зонда. После выхода на плато зависимости наблюдается дальнейшее уменьшение параметра полярности, то есть более глубокое проникновение зонда в ядро мицеллы за счет, вероятно, увеличения размера. Значения ККМ для n-12-n(Et) были определены в середине сигмоиды согласно опубликованной методике [209] (табл. 3.5), которые хорошо согласуются с данными кондуктометрии и тензиометрии (табл. 3.4).

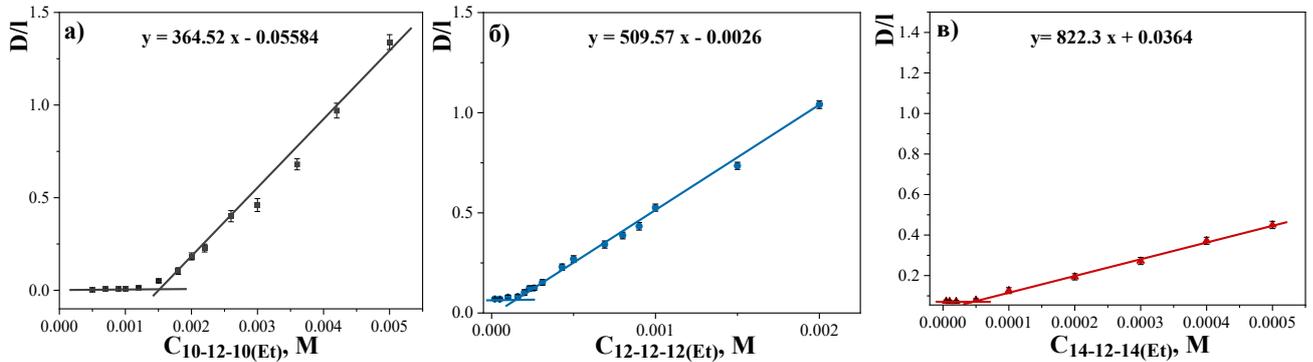


**Рисунок 3.9.** Соотношение интенсивностей флуоресценции первого (373 нм) и третьего (383 нм) пиков пирена в водных растворах n-12-n(Et), 25 °С.

Таким образом, комплексом физико-химических методов были определены пороги агрегации новой гомологической серии дикаатионных карбаматсодержащих ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом, ККМ которых находится в микромолярном диапазоне (1, 0.11 и 0.013 мМ для 10-12-10(Et), 12-12-12(Et), 14-12-14(Et) соответственно). Пороги агрегации геминальных ПАВ с додекановым спейсером были ниже на 17, 22 и 43% для децильного, додецильного и тетрадецильного гомологов соответственно по сравнению с аналогичными по структуре геминальными ПАВ со спейсерным фрагментом, содержащим 6 метиленовых групп. Значения ККМ, определенные методами тензиометрии и кондуктометрии были сходимы, что подтверждает достоверность полученных результатов. Согласно проведенным расчетам термодинамических параметров адсорбции и мицеллообразования, наблюдается немонотонная зависимость изменения основных параметров адсорбции, при этом увеличение длины углеводородных радикалов геминальных ПАВ приводит к закономерному возрастанию значений свободной энергии мицеллообразования. Показано, что все представители исследуемой гомологической серии геминальных карбаматсодержащих ПАВ обладали более низкой степенью связывания  $\text{Vg}^-$  противоиона по сравнению с монокатионными ПАВ.

### **3.2.2. Солюбилизация гидрофобных веществ геминальными карбаматсодержащими ПАВ**

Для определения значений ККМ и солюбилизационной активности был использован модельный гидрофобный краситель Оранж ОТ. На основе спектров поглощения растворов ПАВ, содержащих избыток гидрофобного красителя ООТ, были построены зависимости приведенной оптической плотности ООТ при максимуме поглощения (495 нм) от концентрации ПАВ (рис. 3.10), наклон которых позволяет рассчитать солюбилизационную емкость (табл. 3.5). Стоит отметить, что значения ККМ, определенные методом спектрофотометрии, хорошо согласуются с данными, полученными методами тензиометрии, кондуктометрии и флуориметрии.



**Рисунок 3.10.** Зависимость приведенной оптической плотности насыщенных растворов Оранж ОТ при максимуме поглощения (495 нм) от концентрации ПАВ для а) 10-12-10(Et); б) 12-12-12(Et); в) 14-12-14(Et), 25 °С.

Установлено, что значения  $S$  для ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом выше, чем для геминальных карбаматсодержащих ПАВ  $n$ -6- $n$ (Et): 0.015, 0.024, 0.032 моль<sub>ООТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub> для 10-6-10(Et), 12-6-12(Et), 14-6-14(Et) соответственно [90] и 0.021, 0.029, 0.047 моль<sub>ООТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub> для 10-12-10(Et), 12-12-12(Et), 14-12-14(Et) соответственно (табл. 3.5). Причем это различие наиболее отчетливо наблюдается для 14-12-14(Et), что может указывать на благоприятную ориентацию додеканового спейсера, обеспечивающую увеличение сольubilизационной активности 14-12-14(Et) в 1.5 раза. Полученные значения для ООТ превышают значения для алкиламмониевых аналогов [21], что позволяет повысить функциональную активность геминальных ПАВ в несколько раз при существенно меньшей концентрации амфифилов.

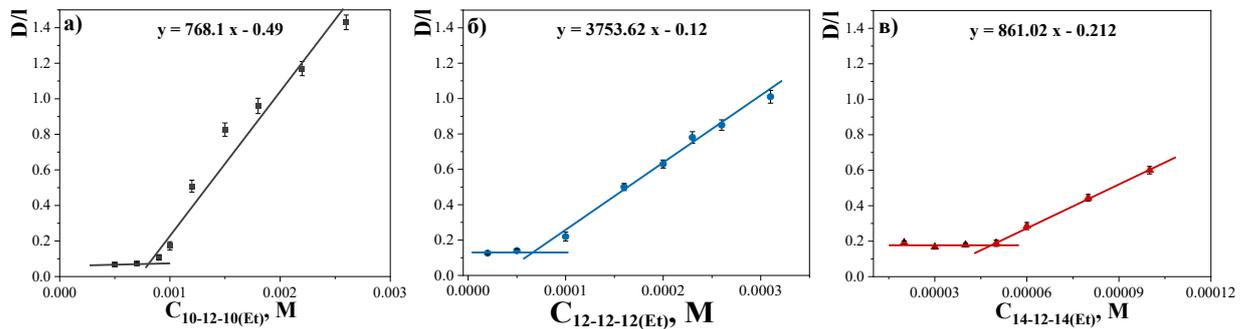
**Таблица 3.5.** Значения ККМ, сольubilизационной емкости ( $S$ ) по отношению к Оранж ОТ и индометацину, числа агрегации геминальных карбаматсодержащих ПАВ, 25 °С.

n-12-n(Et)	ККМ <sub>флуор</sub> , мМ	ККМ <sub>спектр</sub> , мМ	S, моль <sub>субстрат</sub> /моль <sub>ПАВ</sub>		N <sub>агр</sub> *
			ООТ	IND	
10-12-10(Et)	0.9	1.5	0.021	0.13	50
12-12-12(Et)	0.11	0.16	0.029	0.64	28
14-12-14(Et)	0.014	0.045	0.047	1.51	16

\*Числа агрегации n-12-n(Et) рассчитаны с использованием метода Шотта по данным сольubilизации ООТ.

Для проверки установленной тенденции к сольubilизации гидрофобных субстратов аналогичные исследования были проведены для нестероидного противовоспалительного

препарата индометацин. Значения коэффициента экстинкции и длины волны максимума поглощения индометацина в водных растворах геминальных ПАВ приведены в таблице П2. Зависимость приведенной оптической плотности IND при максимуме поглощения (табл. П2) от концентрации ПАВ была линейризована для расчета солюбилизационной емкости (рис. 3.11). Как и в случае с ООТ, увеличение длины углеводородного радикала ПАВ приводит возрастанию значений солюбилизационной емкости (табл. 3.5). Стоит отметить, что значения солюбилизационной емкости геминальных ПАВ по отношению к ООТ и IND превышают значения для ТФФБ-16 (табл. 3.3).



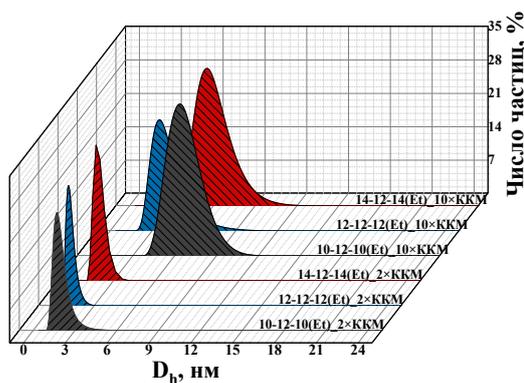
**Рисунок 3.11.** Зависимость приведенной оптической плотности насыщенных растворов индометацина при максимуме поглощения (320-324 нм) от концентрации ПАВ для а) 10-12-10(Et); б) 12-12-12(Et); в) 14-12-14(Et), 25 °С.

Еще одним отличием исследуемого ряда ПАВ от классических амфифилов является тенденция изменения чисел агрегации ПАВ с увеличением длины алкильного радикала. Например, для ряда триметиламмониевых ПАВ значения  $N_{agr}$  составляют 55 ( $C_{12}TAB$ ), 70 ( $C_{14}TAB$ ) и 89 ( $C_{16}TAB$ ) [225]; для пирролидиниевых ПАВ – 42 (L- $C_{12}PB$ ), 48 (L- $C_{14}PB$ ) и 53 (L- $C_{16}PB$ ) [226]. То есть увеличение гидрофобности классических монокатионных ПАВ приводит к увеличению  $N_{agr}$ , тогда как для чисел агрегации n-12-n(Et), определенных с использованием метода Шотта [193], наблюдается обратная тенденция: 50, 28 и 16 для 10-12-10(Et), 12-12-12(Et) и 14-12-14(Et) соответственно (табл. 3.5). Подобная тенденция была показана ранее для геминальных ПАВ с адамантсодержащим спейсерным фрагментом: 15, 11 и 6 для додецильного, тетрадецильного и гексадецильного гомологов соответственно [227]. Известно также, что удлинение спейсерного фрагмента приводит к снижению значений  $N_{agr}$  [228]. Это может быть связано с дополнительной конформационной свободой, которая позволяет алкильным

радикалам упаковываться в более компактные агрегаты. Эта закономерность была подтверждена, поскольку значения  $N_{\text{агр}}$  составляли 29 для 14-6-14(Et) и 16 для 14-12-14(Et).

### 3.2.3. Антимикробная активность и встраивание карбаматсодержащих геминальных ПАВ в липидный бислой

Размер агрегатов n-12-n(Et) был определен с помощью метода ДРС (рис. 3.12) для двух концентраций ПАВ: в 2 и 10 раз выше значений ККМ. Как видно, при концентрациях  $2 \times \text{ККМ}$  образуются небольшие мицеллярные агрегаты с гидродинамическим диаметром 2 нм. Увеличение концентрации ПАВ в 10 раз выше ККМ, приводит к увеличению гидродинамического диаметра агрегатов до 4-6 нм. Предполагаемая морфология агрегатов геминальных ПАВ была определена с использованием метода флуориметрии, а именно путем определения анизотропии флуоресценции ( $r$ ) ДФГ. Для n-12-n(Et) установлены значения  $r$ , не превышающие 0.14 (табл. 3.6), что в совокупности с небольшим гидродинамическим диаметром агрегатов позволило предположить, что в водном растворе образуются мицеллы. Полученные значения анизотропии флуоресценции ДФГ согласуются с полученными ранее значениями для геминальных ПАВ [84].



**Рисунок 3.12.** Распределение гидродинамического диаметра, усредненного по числу частиц, для водных растворов геминальных ПАВ, 25 °С.

**Таблица 3.6.** Значения анизотропии ДФГ ( $r$ ) в зависимости от концентрации n-12-n(Et), 25 °С.

n-12-n(Et)	$C_{\text{ПАВ}}$ , мМ	$r$
10-12-10(Et)	1.2	0.133
	2.2	0.126
	2.6	0.090
12-12-12(Et)	0.31	0.134
	0.37	0.108
	0.5	0.089
	0.8	0.072
14-12-14(Et)	0.06	0.127
	0.1	0.114
	0.5	0.092
	1	0.072

Одним из важных свойств катионных ПАВ, которое может существенно расширить их биомедицинское применение, является антимикробная активность. Поэтому на

следующем этапе была протестирована антимикробная активность геминальных ПАВ в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов (табл. 3.7). Как видно из представленных значений, геминальные карбаматсодержащие ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом проявили высокую антимикробную активность, сравнимую с антибиотиком ципрофлоксацин и противогрибковым препаратом кетоконазол. Выявлено, что значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) карбаматсодержащих ПАВ зависят от длины углеводородного радикала молекул с максимумом для 10-12-10(Et). Подобная тенденция была описана ранее как для дикатионных имидазолиевых ПАВ [229], так и для карбаматсодержащих ПАВ n-6-n(Et) [90]. Стоит отметить, что ципрофлоксацин на два порядка менее эффективен по отношению к метициллин-резистентному штамму MRSA-1, чем 10-12-10(Et).

**Таблица 3.7.** 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*	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)	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*	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		

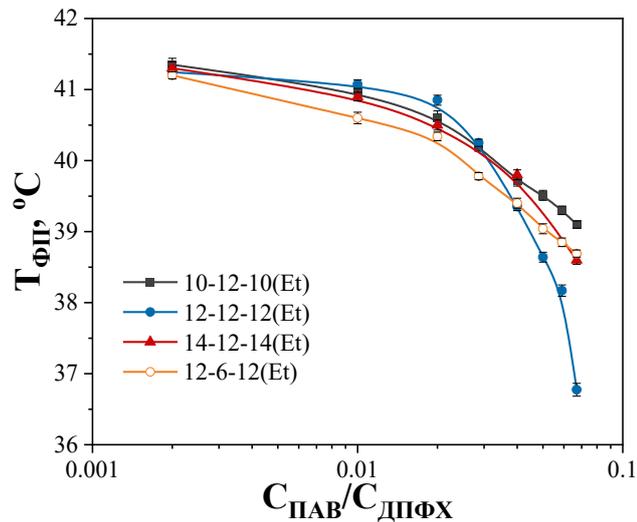
\*данные из [90].

*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*.

Как правило, грамотрицательные бактерии более устойчивы к действию чужеродных мембранотропных соединений, в том числе к ПАВ, что связано с двухслойным строением их мембраны. Существует точка зрения, что антимикробная

активность ПАВ связана с их способностью нарушать целостность клеточной мембраны бактерий [230]. Данные об антимикробной активности позволяют сделать выводы о токсичности изучаемых соединений по отношению к микроорганизмам. Среди изучаемых ПАВ наименее токсичным является 14-12-14(Et), а децильный гомолог перспективен для создания антимикробных препаратов, в особенности для метициллин-резистентных штаммов.

Модельные системы предоставляют возможность оценки фундаментальной характеристики катионных ПАВ, определяющей их антимикробную активность, а именно способность интегрироваться в липидные мембраны. Свойства фосфолипидных мембран во многом определяются температурой фазового перехода ( $T_{ФП}$ ), которая характеризует структурный переход липида из неупорядоченной жидкокристаллической фазы в упорядоченную гелевую фазу. В частности, снижение значения  $T_{ФП}$  свидетельствует о нарушении липидного бислоя, например, вследствие внедрения чужеродных молекул [77]. В рамках диссертационной работы была исследована способность включения n-12-n(Et) в липидный бислой на основе ДПФХ методом турбидиметрии. Для ДПФХ температура фазового перехода равна  $41.4 \pm 0.1$  °C. На рисунке 3.13 представлены зависимости  $T_{ФП}$  от мольного соотношения ПАВ/ДПФХ, полученные путем обработки турбидиметрических кривых (рис. П1). Как можно видеть, все представители гомологического ряда геминальных ПАВ приводят к уменьшению температуры фазового перехода при определенном соотношении, что свидетельствует об интеграции амфифильных молекул в липидный бислой. Интересно отметить, что 12-12-12(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). Полученные результаты согласуются с литературными данными о влиянии длины спейсерного фрагмента на  $T_{ФП}$  [231]. Можно предположить, что молекулы 12-12-12(Et) имеют более протяженную и подвижную конформацию, поэтому способны сильнее дестабилизировать липидный бислой. Стоит отметить, что полученные результаты могут быть полезны при выборе концентрации ПАВ для модификации липосом.



**Рисунок 3.13.** Температура фазового перехода ДПФХ в зависимости от мольного соотношения n-12-n(Et)/ДПФХ.

Таким образом, на первом этапе исследования мицеллярных наноконтейнеров была показана возможность создания смешанных композиций на основе катионного амфифила гексадецилтрифенилфосфоний бромид и неионного ПАВ Бридж®35 с пониженной токсичностью вследствие введения неионного ПАВ и высокой эффективностью солюбилизирующего действия за счет присутствия катионного амфифила. Результаты, полученные комплексом физико-химических методов, позволили выявить наиболее оптимальное соотношение компонентов, а именно  $\alpha_1 = 0.5$  и  $\alpha_1 = 0.7$ , при котором наблюдается снижение порогов агрегации ПАВ практически вдвое по сравнению с индивидуальными амфифилами. Более того, смешанные мицеллярные системы продемонстрировали высокие значения солюбилизирующей емкости по отношению к противовоспалительному лекарственному средству индометацин (0.385 и 0.380 моль<sub>IND</sub>/моль<sub>ПАВ</sub> для  $\alpha_1 = 0.5$  и  $\alpha_1 = 0.7$  соответственно), сопоставимые с индивидуальным катионным ПАВ ТФФБ-16 (0.399 моль<sub>IND</sub>/моль<sub>ПАВ</sub>), но при меньшем его содержании, что позволяет снизить токсичность с сохранением практически полезных свойств. Методами динамического светорассеяния и флуориметрии были зафиксированы гидродинамический диаметр и предполагаемая форма агрегатов смешанного состава. Согласно результатам, гидродинамический диаметр агрегатов находится в пределах 10 нм, а форма мицелл определяется как сферическая.

Далее был осуществлен переход к геминальным дикатионным ПАВ с карбаматными фрагментами и додекановым спейсером, специально синтезированным в рамках развития

работы по дизайну наноконтейнеров для лечения болезни Альцгеймера. Для определения возможности применения новой гомологической серии ПАВ в качестве модификаторов липосомальных наноконтейнеров, было проведено комплексное исследование их агрегационных свойств, антимикробной активности и способности встраиваться в липидный бислои. В ряду 10-12-10(Et), 12-12-12(Et), 14-12-14(Et), тетрадецильный гомолог обладает самыми низкими значениями ККМ (0.013 мМ по методу тензиометрии), самой высокой солюбилизационной активностью по отношению к индометацину (1.51 моль<sub>IND</sub>/моль<sub>ПАВ</sub>) и самой низкой токсичностью. Сравнение всех изученных параметров между двумя сериями ПАВ, а именно n-12-n(Et) и n-6-n(Et), отличающимися длиной спейсерного фрагмента, позволило установить преимущество карбаматсодержащих геминальных ПАВ с додекановым спейсером. Кроме того, была оценена способность геминальных карбаматсодержащих ПАВ снижать температуру фазового перехода липида ДПФХ, что свидетельствует об успешном интегрировании исследуемых амфифилов в липидный бислои при определенном соотношении n-12-n(Et)/ДПФХ с сохранением целостности мембраны. Способность встраиваться в липидные бислои является основополагающим свойством амфифильных молекул, которое обуславливает как их повышенную антимикробную активность, так и возможность применения ПАВ для модификации свойств липидных наноконтейнеров, а информация о порогах агрегации геминальных амфифилов позволит подобрать оптимальное соотношение липид/ПАВ для достижения улучшенных показателей стабильности и эффективности.

### **3.3. Получение трансферсом для доставки фунгицида карбоксина и оксима 2-РАМ**

Трансферсомы представляют собой липидные наноконтейнеры, способные проникать через поры значительно меньшего размера, чем собственные, что обусловлено их высокой деформируемостью. Трансферсомы состоят из двух компонентов (липид и краевой активатор), существенно отличающихся друг от друга своими стабилизирующими и дестабилизирующими свойствами [4]. Благодаря деформируемости 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. На сегодняшний день трансферсомы являются широко изученными наноконтейнерами, однако спектр исследований

трансферсом ограничен в большинстве случаев доставкой лекарственных средств для лечения локальных кожных и подкожных заболеваний, а также для получения косметических продуктов. В рамках диссертационной работы были протестированы трансферсомы классического состава для решения нестандартных задач, а именно для доставки фунгицида карбоксина в клубни картофеля [232] и лечения острого отравления фосфорорганическими соединениями путем трансдермальной доставки реактиватора холинэстеразы прапидоксима хлорида [195]. Состав трансферсом оптимизирован путем подбора липида в качестве строительного блока наноконтейнеров, а также соотношения липид/неионное ПАВ. Кроме того, проведена оценка проникающей способности трансферсом через биологические барьеры – через перидерму картофельного клубня и кожу крыс.

### 3.3.1. Приготовление и оптимизация состава трансферсом. Загрузка фунгицида карбоксина

На первом этапе исследования получены трансферсомы для доставки фунгицида карбоксина. В качестве неионного ПАВ для модификации липосом выбран Твин®20, а в качестве основного компонента – яичный фосфатидилхолин Е РС S и соевый фосфатидилхолин S75 – для выявления наиболее оптимального состава композиций. Мольное соотношение липид/Твин®20 было проварьировано в ряду 95/5, 85/15, 75/25. Состав и концентрации формулировок приведены в таблице 3.8.

**Таблица 3.8.** Состав, концентрации и обозначения трансферсом на основе яичного (Е РС S) и соевого (S75) фосфатидилхолина и неионного ПАВ Твин®20.

Система	Мольное соотношение липид/Твин®20	Обозначение	С <sub>ФХ</sub> , мМ	С <sub>Твин®20</sub> , мМ
S75	-	S-1	10	-
S75/Твин®20	95/5	S-2	10	0.53
	85/15	S-3	10	1.76
	75/25	S-4	10	3.33
Е РС S	-	Е-1	10	-
Е РС S/Твин®20	95/5	Е-2	10	0.53
	85/15	Е-3	10	1.76
	75/25	Е-4	10	3.33

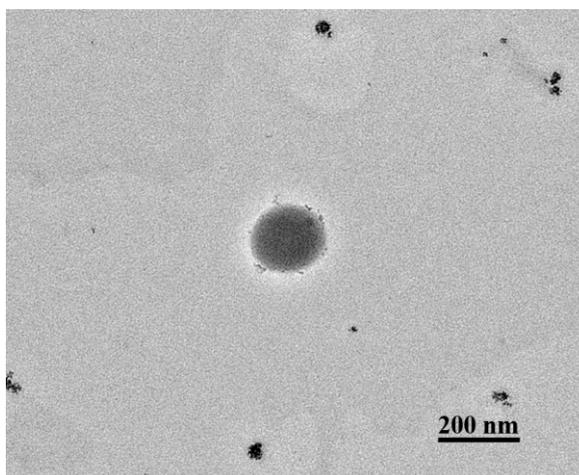
Согласно данным, представленным в таблице 3.9, все полученные системы обладали гидродинамическим диаметром в диапазоне от 70 до 120 нм. Распределение размеров трансферсом было высокомонодисперсным, что подтверждают значения PdI, не превышающие 0.3 даже после 5 месяцев хранения. Такая долговременная стабильность, возможно, обуславливается высокими значениями дзета-потенциала (от  $-42 \pm 2$  мВ до  $-75 \pm 2$  мВ для S-n), однако подобные высокие значения наблюдаются не для всех систем (от  $-10 \pm 1$  мВ до  $-15 \pm 1$  мВ для E-n). Известно, что значения дзета-потенциала ниже 35 мВ по модулю являются недостаточными для коллоидной стабильности наноконтейнеров [110], однако для трансферсом E-n также наблюдается хорошая стабильность во время хранения. Вероятно, на стабильность наноконтейнеров влияет не только их заряд, но и природа фосфатидилхолина, используемого в качестве строительного блока агрегатов. Яичный фосфатидилхолин E PC S в отличие от S75 содержит больше насыщенных углеводородных цепей в радикале, которые могут образовывать плотно упакованные системы [233], что, вероятно, объясняет стабильность E-n трансферсом. Было также показано, что с увеличением концентрации Твин®20 в липидном бислосе полидисперсность системы увеличивается, а размер и абсолютные значения дзета-потенциала уменьшаются. Для моноламеллярных липосом добавление неионного ПАВ может приводить к образованию смешанных мицелл, а это, в свою очередь, приводит к уменьшению содержания фосфолипидов в липосомах и их уплотнению [162]. Аналогичное влияние Твин®80 на физико-химические характеристики трансферсом было показано ранее [234].

**Таблица 3.9.** Физико-химические характеристики и стабильность пустых трансферсом при различном соотношении липид/Твин®20, 25 °С\*.

Система	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ
	1 день			5 месяцев		
S-1	119±1	0.088±0.007	-75±2	130±1	0.148±0.005	-45±1
S-2	114±1	0.092±0.013	-64±2	103±1	0.150±0.023	-38.3±0.1
S-3	108±1	0.182±0.014	-48.1±0.2	142±1	0.282±0.002	-44.2±0.5
S-4	107±1	0.172±0.006	-42±2	94±1	0.167±0.001	-45±1
E-1	111±2	0.089±0.004	-15±1	114±1	0.073±0.022	-17.0±0.2
E-2	101±1	0.098±0.021	-10.5±0.4	107±3	0.169±0.011	-15±2
E-3	85±1	0.129±0.012	-11±1	88±1	0.221±0.005	-13±1
E-4	71±1	0.189±0.002	-10±1	74±1	0.177±0.018	-10±1

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

Частицы были визуализированы с помощью просвечивающего электронного микроскопа (рис. 3.14) на примере системы Е РС S/Твин®20 при мольном соотношении компонентов 95/5 (Е-2). Как видно, размер частиц с четко выраженной сферической формой немного превышает 100 нм. Стоит отметить, что центральная часть частиц имеет более плотную структуру, а окружающий ее ободок, возможно, образован молекулами Твин®20, которые благодаря своей гибкой объемной полиоксиэтиленовой головной группе, вероятно, могут выступать из липидного бислоя.



**Рисунок 3.14.** ПЭМ-изображения трансферсом на основе Е РС S/Твин®20 при мольном соотношении компонентов 95/5 (Е-2), 25 °С.

После того как пустые трансферсомы были получены и оптимизированы, системы были загружены модельным гидрофильным зондом родамин Б и гидрофобным субстратом карбоксин. Установлено, что RhВ сильно влияет на дзета-потенциал трансферсом (табл. 3.10), поскольку является основным красителем, который имеет общий положительный заряд, и, вероятно, способен не только присутствовать в водном ядре липосом, но может и адсорбироваться на поверхности наноконтейнеров, чем, возможно, и объясняется сдвиг дзета-потенциала агрегатов в область положительных значений. Также было показано, что эффективность инкапсулирования трансферсом по отношению к RhВ составляет 74–82% для Е-п и 86–90% для S-п трансферсом, при этом концентрация Твин®20 существенно не влияет на значения.

**Таблица 3.10.** Физико-химические характеристики и стабильность трансферсом, загруженных RhB и CBX, при различном мольном соотношении липид/Твин®20, 25 °С\*.

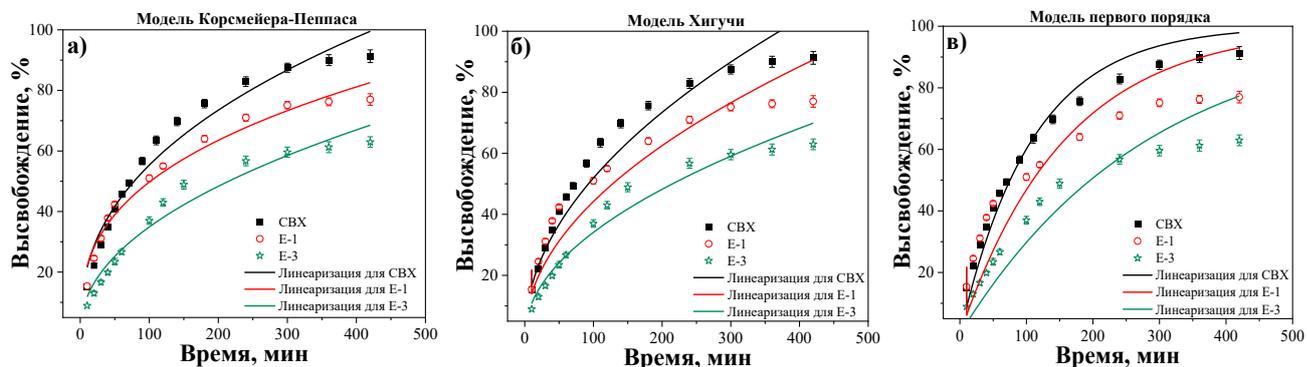
Система	ЕЕ, %	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ
		RhB					
		1 день			4 месяца		
S-1	90±1	106±1	0.091±0.027	-22.5±0.4	118±1	0.117±0.018	-22.7±0.8
S-2	87±2	99±1	0.104±0.028	-19.1±0.5	129±5	0.231±0.007	-22.7±0.1
S-3	86±1	93±2	0.061±0.010	-11.8±0.7	106±3	0.112±0.005	-20±2
S-4	89±6	85±1	0.071±0.016	-9.2±0.4	98±2	0.157±0.027	-12.8±0.7
E-1	82±4	102±2	0.700±0.013	+25.3±0.3	Не стабильны		
E-2	74±7	102±2	0.096±0.015	+24.0±0.7	95 ± 1	0.143±0.001	+22±11
E-3	78±3	94±1	0.088±0.013	+20±1.0	95 ± 1	0.095±0.011	+16.1±0.8
E-4	75±8	96±1	0.167±0.010	+18.3±0.6	106 ± 1	0.065±0.013	+11.9±0.6
Система	ЕЕ, %	CBX					
		1 день			5 месяцев		
		S-1	83±1	110±2	0.096±0.020	-61±1	116±3
S-2	82±2	106±2	0.084±0.023	-58±1	111±1	0.128±0.013	-52±1
S-3	77±2	109±1	0.068±0.012	-43±1	109±1	0.117±0.002	-50±3
S-4	70±1	103±2	0.082±0.002	-42±4	111±2	0.213±0.030	-44±2
E-1	90±2	113±1	0.067±0.016	-17±1	114±1	0.065±0.031	-17±0.4
E-2	87±1	118±2	0.135±0.014	-16.8±0.4	123±1	0.179±0.011	-14±0.2
E-3	86±2	108±1	0.059±0.003	-15±1	147±2	0.233±0.008	-12±0.2
E-4	67±3	101±1	0.066±0.012	-12.2±0.2	100±1	0.131±0.011	-10±1

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

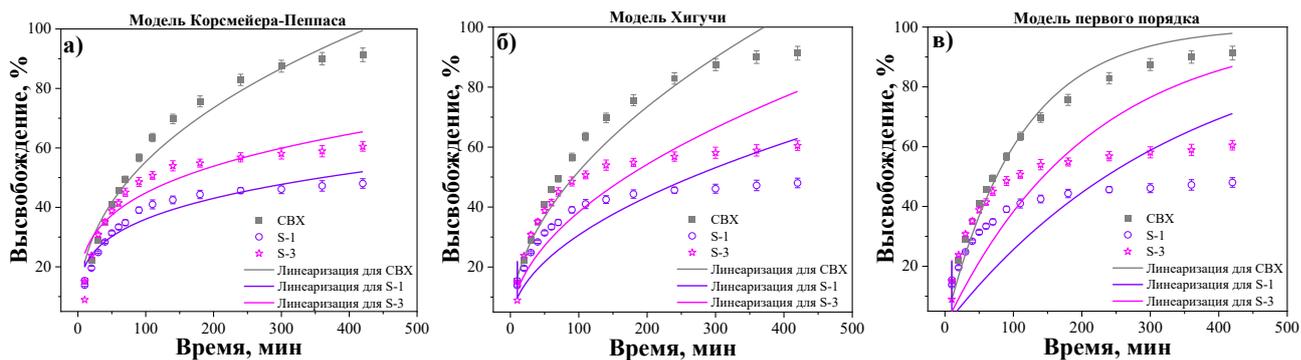
Согласно полученным результатам, гидродинамический диаметр систем с CBX находится в диапазоне 100–118 нм и уменьшается с увеличением концентрации Твин®20, как и в случае с пустыми трансферсомами. За 5 месяцев хранения гидродинамический диаметр трансферсом меняется незначительно, и системы остаются монодисперсными, о чем свидетельствуют низкие значения PdI. Интересно, что инкапсулирование CBX в трансферсомы приводит к небольшому увеличению абсолютных значений дзета-потенциала систем на основе яичного фосфатидилхолина E PC S, тогда как дзета-потенциал систем на основе соевого фосфатидилхолина S75 снижается по сравнению с пустыми трансферсомами. Для систем E-n значения эффективности инкапсулирования CBX выше, чем для систем S-n, которые снижаются с увеличением концентрации Твин®20. Важно отметить, что ЕЕ для немодифицированных липосом (системы S-1 и E-1) несколько выше, что, вероятно, можно объяснить разрыхлением липидного бислоя трансферсом, в котором локализован CBX, что приводит к высвобождению субстрата.

Известно, что модификация липосомальных систем влияет на скорость высвобождения субстратов [235]. Поскольку концентрация CBX в трансферсомах

превышала максимально растворимую в воде концентрацию, диализ был проведен в смешанной среде PBS:этанол (7:3) (рис. 3.15 и 3.16).



**Рисунок 3.15.** Кривые высвобождения СВХ из трансферсом E-n, аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса, б) Хигучи и в) первого порядка, 25 °С.



**Рисунок 3.16.** Кривые высвобождения СВХ из трансферсом S-n, аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса, б) Хигучи и в) первого порядка, 25 °С.

Использование математических моделей для описания и прогнозирования кинетики высвобождения субстратов становится классическим инструментом при разработке лекарственных форм. Основными математическими моделями, описывающими кинетику высвобождения лекарств из липосом, являются модели Корсмейера-Пеппаса, Хигучи и первого порядка [133,134]. В рамках математической обработки результатов были определены и представлены в таблице 3.11 такие параметры кинетики высвобождения, как константа скорости высвобождения ( $k$ ), коэффициент корреляции ( $R^2$ ) и величина диффузионной экспоненты ( $n$ ) (для модели Корсмейера-Пеппаса). Как видно из рисунков 3.15 и 3.16 и значений  $R^2$  (табл. 3.11), модель Корсмейера-Пеппаса лучше подходит для

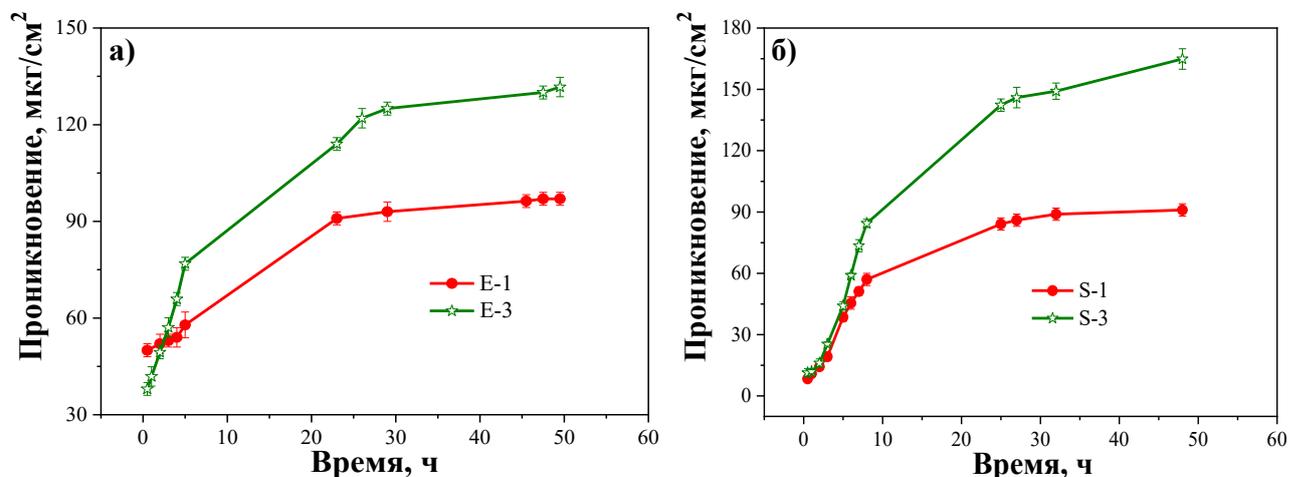
описания высвобождения СВХ из трансферсом. Значения  $n$  ниже 0.45 свидетельствуют о том, что высвобождение фунгицида осуществляется посредством диффузии, подчиняющейся первому закону Фика, для всех систем. Кроме того, значения константы скорости, полученные с помощью математических моделей, подтверждают, что включение Твин®20 в состав липосом на основе E PC S снижает скорость высвобождения СВХ, тогда как в случае трансферсом на основе S75, напротив, скорость высвобождения субстрата увеличивается.

**Таблица 3.11.** Параметры кинетики высвобождения СВХ из липосом и трансферсом, полученные с помощью различных математических моделей.

Система	Математические модели						
	Корсмейера-Пеппаса			Хигучи		Первого порядка	
	$n$	$k_{kp}$ , %/мин <sup><math>n</math></sup>	$R^2$	$k_x$ , %/мин <sup>1/2</sup>	$R^2$	$k_1$ , 1/мин	$R^2$
СВХ	0.41±0.03	8.41±1.14	0.9610	5.19±0.15	0.9290	0.0092±0.0004	0.9630
E-1	0.35±0.02	9.76±1.16	0.9703	4.42±0.18	0.8704	0.0063±0.0008	0.6981
E-3	0.47±0.03	4.00±0.73	0.9605	3.41±0.09	0.9611	0.0035±0.0003	0.8289
S-1	0.25±0.02	11.12±1.40	0.9027	3.07±0.19	0.3150	-	-
S-3	0.26±0.03	13.37±1.85	0.8920	3.83±0.23	0.3787	-	-

На следующем этапе исследования была проведена оценка проникающей способности трансферсом через биологические барьеры *in vitro* с использованием ячеек Франца и синтетической мембраны Strat-M®, которая состоит из двух полимерных слоев. Верхний слой мембраны, изготовленный из полиэфирсульфона, имитирует плотно упакованные клетки рогового слоя кожи, который является серьезным препятствием для диффузии лекарственных веществ. Второй слой мембраны, изготовленный из полиолефина, имеет более рыхлую пористую структуру, как и дерма [236]. Кривые высвобождения СВХ из липосом и трансферсом представлены на рисунке 3.17, из которых видно, что включение Твин®20 значительно увеличивает проникновение СВХ через синтетическую мембрану. Стоит отметить, что мембраны Strat-M® не имитируют покров растительных организмов, тем не менее данный эксперимент позволяет оценить деформируемость наночастиц. Следует отметить, что в случае трансферсом E-3 количество СВХ, прошедшее через синтетическую мембрану Strat-M®, несколько ниже, чем в случае системы S-3:  $131 \pm 3$  мкг/см<sup>2</sup> и  $164 \pm 5$  мкг/см<sup>2</sup> соответственно. Возможно,

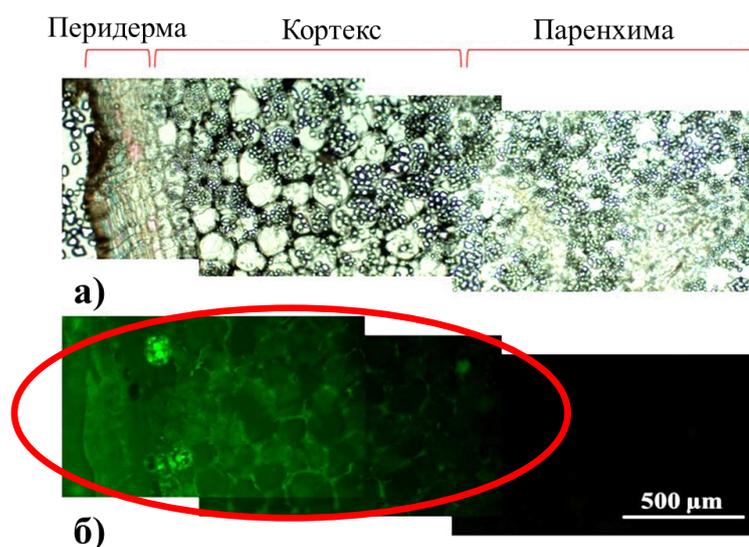
более плотная упаковка липидных молекул в случае трансферсом E-3 ограничивает их деформируемость и затрудняет их прохождение через мембрану Strat-M®.



**Рисунок 3.17.** Проникновение СВХ, загруженного в липосомы и трансферсомы, через мембрану Strat-M® (мкг/см<sup>2</sup>) *in vitro*; а) E-n и б) S-n; PBS:этанол (7:3), 25 °С.

Клубни картофеля имеют защитный слой – перидерму, так называемую «кожицу», состоящую из нескольких слоев (феллемы, феллогена и феллодермы). Основная функция перидермы, которая заменяет эпидермис на ранних этапах развития клубня, заключается в защите организма от потери воды и от различных патогенов [237,238]. Однако такая плотно упакованная структура препятствует прохождению пестицидов в картофельные клубни. Трансферсомы благодаря своей деформируемости являются привлекательными наноконтейнерами, позволяющими повысить не только растворимость гидрофобных веществ, но и облегчить перенос фунгицидов через перидерму. Для подтверждения проникновения трансферсом в клубни картофеля была использована флуоресцентная микроскопия. На рисунке 3.18 показаны срезы клубня картофеля под оптическим и флуоресцентным микроскопом после его обработки дисперсией трансферсом, загруженных флуоресцеином, в течение 24 ч. Видно, что клетки перидермы упакованы очень плотно, тогда как зоны кортекса и паренхимы более рыхлые (рис. 3.18а). Как показано на рисунке 3.18б, в кожице и кортексе клубня картофеля наблюдается флуоресценция загруженного в трансферсомы зонда, что свидетельствует о проникновении в них наноконтейнеров. Флуоресцеин, как и карбоксин, не может находиться в водном растворе в свободной форме ввиду своей гидрофобности, что

подтверждает проникновение зонда в формулированном состоянии, а не в индивидуальном виде.



**Рисунок 3.18.** Микрофотографии поперечного среза клубня картофеля после обработки его дисперсией трансферсом S-3 с флуоресцеином, полученные с помощью а) оптического и б) флуоресцентного микроскопа, 25 °С.

Карбоксин обладает селективностью в отношении базидиомицетов, в том числе головнёвых и ржавчинных грибов, а также почвенного гриба *Rhizoctonia solani* [239,240]. Основная идея данного направления заключается в преодолении плохой растворимости СВХ и в его доставке в клубни семенного картофеля путем включения его в трансферсомы. Поэтому на следующем этапе картофельные клубни были обработаны дисперсией трансферсом с СВХ в течение 24 ч с последующей экстракцией фунгицида. Количество экстрагированного СВХ было пересчитано на 100 г картофельного клубня для удобства сравнения результатов с литературными данными. Согласно расчетам, клубни картофеля массой 100 г содержали  $32.3 \pm 1.8$  мг СВХ после обработки трансферсомами S-3. Следует отметить, что содержание СВХ в клубне массой 100 г при обработке мицеллярными растворами на основе Твин®80 и гексадецилпиперидиний бромида составило 5.9 мг и 8.3 мг соответственно [207], что существенно ниже вышеуказанного значения. Важно отметить, что включение СВХ в трансферсомы позволило повысить максимально растворимую в воде концентрацию СВХ (по литературным данным она составляет 0.57 мМ). В данной работе в трансферсомы было

загружено 2.8–3.8 мМ СВХ в зависимости от соотношения компонентов, что в 5–7 раз превышает его растворимость.

Таким образом, в рамках данного направления работы были получены трансферсомы на основе двух типов фосфатидилхолинов (яичного и соевого) и неионного ПАВ Твин®20 в качестве краевого активатора при различном мольном соотношении компонентов. Полученные трансферсомы были монодисперсными и обладали гидродинамическим диаметром, приблизительно равным 100 нм. Все системы показали хорошую стабильность в течение 5 месяцев. В полученные композиции были успешно загружены родамин Б, флуоресцеин и карбоксин с высокими значениями эффективности инкапсулирования. Включение СВХ в трансферсомы приводит к его более пролонгированному высвобождению *in vitro*, что было продемонстрировано методом диализа. В экспериментах по проникновению формулированного карбоксина в клубни картофеля было установлено, что клубни картофеля массой 100 г содержали примерно 32 мг СВХ. Включение СВХ в трансферсомы позволило повысить его максимально растворимую в воде концентрацию приблизительно в 5–7 раз.

### **3.3.2. Загрузка прапидоксима хлорида в трансферсомы. Оценка физико-химических свойств и биологической активности**

Продолжая работу с известными в литературе липосомами, модифицированными неионными ПАВ, в трансферсомы был загружен 2-РАМ. Ввиду того, что на данном этапе основной целью работы является оценка эффективности трансферсом на живых организмах, соевый фосфатидилхолин S75 со степенью чистоты 70% был заменен на аналогичный фосфатидилхолин с более высокой степенью чистоты 95%. Поскольку на предыдущем этапе состав трансферсом был уже оптимизирован, модификация липосом была осуществлена с включением 20% Твин®20. Согласно данным, представленным в таблице 3.12, трансферсомы обладали высокой монодисперсностью с гидродинамическим диаметром приблизительно 100 нм. Дзета-потенциал липосом при модификации их молекулами Твин®20 менялся незначительно, даже спустя несколько месяцев хранения. Как и в случае загрузки RhB, загрузка 2-РАМ приводила к небольшому сдвигу дзета-потенциала наноконтейнеров в область положительных значений. Стоит отметить, что как пустые, так и загруженные 2-РАМ трансферсомы были менее стабильны во время хранения, о чем свидетельствует увеличение значений PdI по

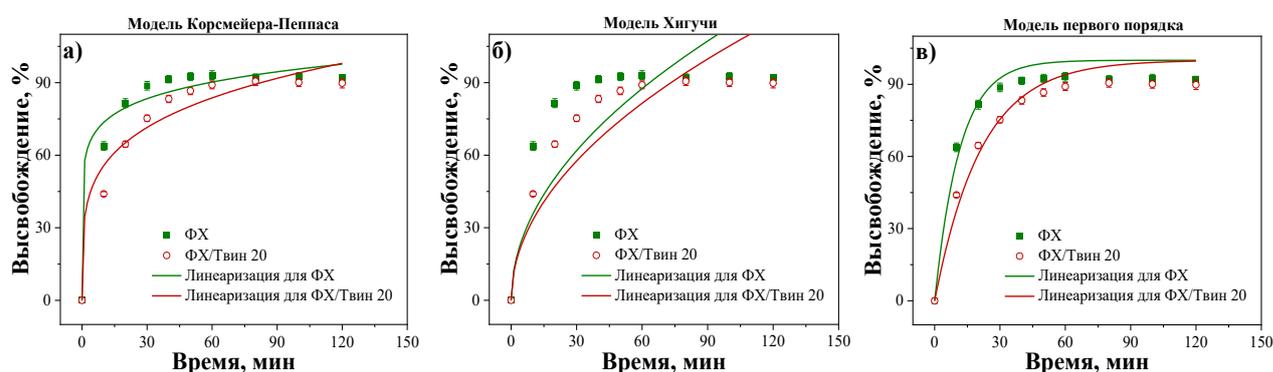
сравнению с липосомами на основе ФХ. Эффективность инкапсулирования трансферсом по отношению к 2-РАМ была выше 50% как в случае обычных липосом, так и в случае трансферсом.

**Таблица 3.12.** Физико-химические свойства и стабильность пустых трансферсом и трансферсом, загруженных 2-РАМ, 25 °С\*.

Система	Мольное соотношение ФХ/Твин®20	ЕЕ, %	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ
			Пустые					
			1 день			2.5 месяца		
ФХ	-	-	113±1	0.086±0.009	-14±1	118±1	0.119±0.043	-11±1
ФХ/Твин 20	80/20	-	107±1	0.057±0.002	-11±1	153±13	0.232±0.003	-1±1
2-РАМ								
Система	Мольное соотношение ФХ/Твин®20	ЕЕ, %	1 день			1 месяц		
			D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ
ФХ	-	60.3±2.8	118±1	0.082±0.012	-2±0.5	116±2	0.115±0.004	-4±1
ФХ/Твин 20	80/20	55.3±0.9	110±1	0.061±0.010	-2±0.2	139±2	0.242±0.006	-3±1

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

Высвобождение 2-РАМ *in vitro* было исследовано с помощью метода диализа. Видно, что добавление ПАВ слегка замедляет процесс высвобождения 2-РАМ (рис. 3.19). 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.



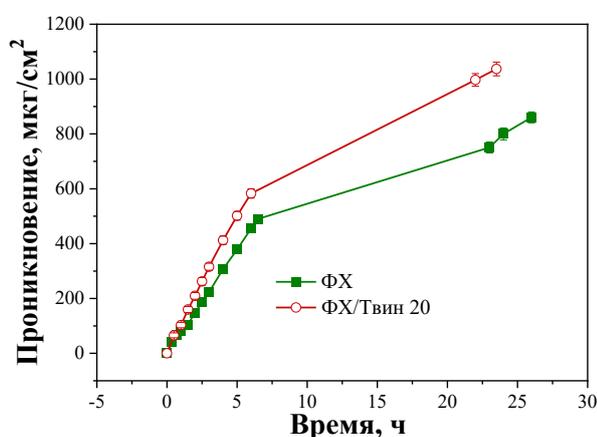
**Рисунок 3.19.** Кривые высвобождения 2-РАМ из липосом и трансферсом *in vitro*, аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса, б) Хигучи и в) первого порядка, PBS (0.025 М), pH = 7.4, 37 °С.

Анализ линеаризованных кривых, представленных на рисунке 3.19, 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 ниже 0.72 (табл. 3.13). Константы скорости, полученные с помощью трех математических моделей, подтверждают, что модификация липосом неионным ПАВ Твин®20 приводит к небольшому замедлению скорости высвобождения 2-РАМ, которое происходит посредством диффузии, подчиняющейся первому закону Фика.

**Таблица 3.13.** Параметры кинетики высвобождения 2-РАМ из липосом и трансферсом, полученные с помощью различных математических моделей.

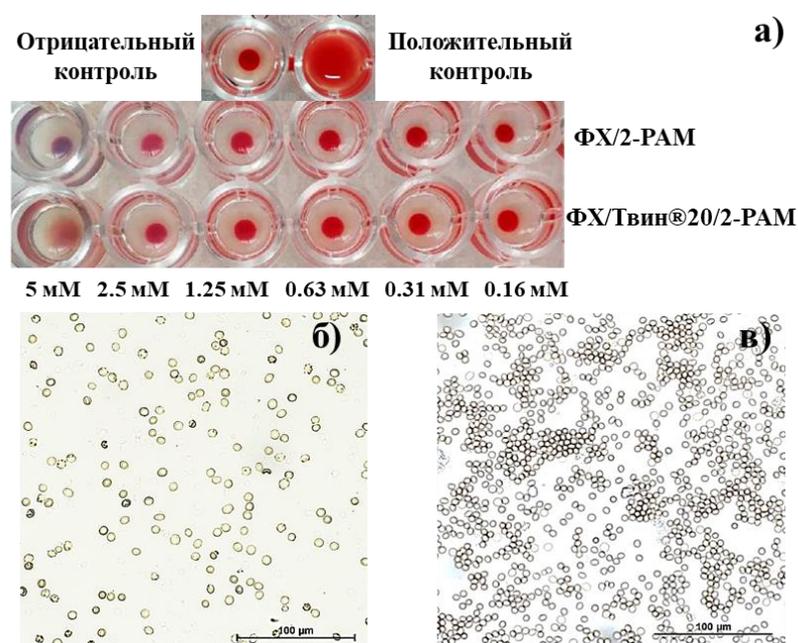
Система	Математические модели						
	Корсмейера-Пеппаса			Хигучи		Первого порядка	
	n	$k_{КП}$ , %/мин <sup>n</sup>	$R^2$	$k_X$ , %/мин <sup>1/2</sup>	$R^2$	$k_1$ , 1/мин	$R^2$
ФХ	0.11±0.03	56.59±6.32	0.9671	11.30±0.10	0.4021	0.09±0.01	0.9556
ФХ/Твин®20	0.23±0.04	32.96±5.53	0.9482	10.51±0.68	0.7245	0.047±0.004	0.9574

Оценка способности проникновения лекарств через кожу с использованием ячеек Франца является ключевым этапом исследования систем для дермальной или трансдермальной доставки лекарств. Известно, что кожа крыс структурно больше похожа на кожу человека и является наиболее часто используемой моделью для *ex vivo* исследований. На рисунке 3.20 представлены кривые высвобождения 2-РАМ, включенного в трансферсомы, через кожу крыс линии Вистар. Согласно результатам, включение в состав везикул ПАВ увеличивает концентрацию 2-РАМ, проникающую через кожу крыс, по сравнению с обычными липосомами.



**Рисунок 3.20.** Проникновение 2-РАМ, загруженного в трансферсомы, через кожу крыс линии Вистар (мкг/см<sup>2</sup>), PBS (0.025 М), pH = 7.4, 34 °С.

Оценка токсичности любых наноразмерных систем доставки лекарств является особенно важным аспектом исследований. Токсичность трансферсом оценивали по двум направлениям: гемолиз и гемагглютинация. Результаты оценки степени гемагглютинации представлены на рисунке 3.21. Полученные результаты показали, что агглютинация наблюдается для системы ФХ/Твин 20/2-РАМ только при самых высоких концентрациях (рис. 3.21а). Обычные липосомы не вызывали агглютинации при всех протестированных концентрациях. Кроме того, все изученные системы проявляли низкую гемолитическую активность во всем концентрационном диапазоне (табл. ПЗ).



**Рисунок 3.21.** Результаты исследования гемагглютинации, вызываемой растворами липосом и трансферсом с 5 мг/мл 2-РАМ: а) фотография лунок с эритроцитарной массой, инкубированной с образцами разной концентрации; б) микрофотография образца эритроцитарной массы, инкубированного с системой ФХ/Твин®20/2-РАМ; в) положительный контроль на гемагглютинацию.

Для дальнейшей оценки эффективности трансферсом *in vivo* была разработана гелевая форма везикул с использованием Carborol®940. Значение рН гелевой формы трансферсом поддерживали на уровне 5–5.5, что связано с тем, что рН кожи находится в пределах от 4.2 до 5.6. Для определения уровня реактивации ацетилхолинэстеразы в крови *in vivo* были протестированы несколько форм 2-РАМ (табл. 3.14). Сначала крысы

были отравлены сублетальной дозой параоксона (0.6 мг/кг). Процент реактивации АХЭ определяли по среднему уровню ингибированной АХЭ через 1 ч после введения РОХ (52.27 ± 2.37%). Согласно результатам, гелевая форма ФХ/Твин 20 показала статистически значимый (23.65 ± 7.23%, p = 0.005) уровень реактивации АХЭ через 6 ч после нанесения формулировки на кожу крыс, тогда как гелевая форма свободного 2-РАМ практически не проявляла активности.

**Таблица 3.14.** Степень реактивации АХЭ после трансдермального введения гелевой формы трансферсом, загруженных 2-РАМ.

Время забора крови после нанесения геля, ч	Группа лечения		
	РОХ, 1 ч, n = 5	РОХ, 1 ч, + свободный 2- РАМ, n = 5	РОХ, 1 ч, + ФХ/Твин®20/2-РАМ, n = 5
	Реактивация АХЭ в эритроцитах крыс, %		
2	1.66±3.79 p = 0.940	1.35±3.40 p = 0.706	1.36±5.57 p = 1.000
4	1.80±3.74 p = 0.571	1.46±5.95 p = 1.000	1.41±5.20 p = 0.821
6	0.62±3.16 p = 0.735	4.46±9.30 p = 0.483	23.65±7.23 p = 0.005*
24	2.85±7.39 p = 0.678	7.25±6.13 p = 0.404	24.2±9.73 p = 0.021*

\*Значительное отличие от группы мышей, отравленных РОХ, без терапии, p < 0.05 (критерий Манна-Уитни).

После того, как было показано, что 2-РАМ в трансферсомах эффективно реактивирует АХЭ в эритроцитах, была проведена оценка выживаемости крыс, отравленных РОХ, 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 (табл. 3.15), тогда как профилактическое введение 2-РАМ, загруженного в трансферсомы, через кожу в сочетании с традиционным методом лечения повышало выживаемость крыс с 55% до 90%.

**Таблица 3.15.** Выживаемость крыс, отравленных РОХ, после различных стратегий лечения.

Группа лечения	n/N *	% выживших крыс
РОХ	0/20	0%
РОХ + 2-РАМ внутривенно через 10 мин после РОХ	11/20	55%
ФХ/Твин®20/2-РАМ трансдермально в течение 24 ч + РОХ	8/20	40%
ФХ/Твин®20/2-РАМ трансдермально в течение 24 ч + РОХ + 2-РАМ внутривенно через 10 мин после РОХ	18/20	90%

\*n – количество выживших животных в группе; N – общее количество животных в группе.

Для более детального понимания судьбы препарата в крови был проведен фармакокинетический анализ плазмы крови после обработки кожи крыс гелевой формой трансферсом с 2-РАМ в течение 24 ч. Калибровочный график концентрации 2-РАМ в плазме крыс, по которому был проведен расчет, представлен в Приложении (рис. П2). Показано, что через 6 ч максимальная концентрация 2-РАМ в крови составила  $35.9 \pm 5.8$  нг/мл. Далее к 12 и 24 ч наблюдается снижение концентрации препарата до  $21.5 \pm 3.3$  и  $20.6 \pm 2.9$  нг/мл соответственно. Это говорит о том, что при трансдермальном введении возможно поддержание определенного уровня препарата в крови до 24 ч, что важно для профилактического применения 2-РАМ при лечении острых отравлений ФОС.

Таким образом, впервые были получены трансферсомы классического состава для доставки фунгицида карбоксин в клубни картофеля, которые могут быть использованы для профилактического протравливания культурных растений от грибковых патогенов. Помимо увеличения растворимости гидрофобного субстрата в 5-7 раз, было показано, что трансферсомы обладают улучшенной способностью проникать через поры гораздо меньшего размера и достигать глубоких слоев картофельного клубня. Оптимизированный состав трансферсом был опробован для трансдермального введения реактиватора ацетилхолинэстеразы пралидоксим хлорида для терапии отравлений фосфорорганическими соединениями. Показано, что трансдермальное введение 2-РАМ, загруженного в трансферсомы, приводит не только к более эффективному проникновению лекарственного вещества через кожу крыс *ex vivo*, но также к высокой степени реактивации АХЭ и увеличению выживаемости крыс *in vivo* при совместном

использовании традиционного метода лечения отравления ФОС – внутривенного введения 2-РАМ. Полученные результаты подтверждают, что несмотря на то, что трансферсомы являются широко изученными системами доставки лекарств, многие грани их использования все еще не раскрыты.

### **3.4. Липосомы, нековалентно модифицированные фосфониевыми ПАВ, для терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний**

Функционализация наноконтейнеров для нацеливания на специфические внутриклеточные компартменты может существенно повысить эффективность лекарственных веществ, что особенно важно для терапии онкологических заболеваний. В настоящее время большое внимание уделяется митохондриям как ключевым мишеням для лечения целого ряда серьезных заболеваний [241]. Интерес связан с тем фактом, что митохондрии ответственны за многочисленные физиологические процессы в клетке, такие как производство энергии, регулирование клеточного метаболизма, запуск процесса апоптоза и т.д. На сегодняшний день известны несколько соединений, способных нацеливаться на митохондрии клеток, включая липофильный катион трифенилфосфония. Присутствие на поверхности носителя или в составе композиции ТФФ-фрагмента позволяет ему перемещаться через двухслойные мембраны клетки без сложного механизма поглощения. Значительный отрицательный потенциал на мембране митохондрий (-180 мВ) существенно облегчает захват наноносителей митохондриями, модифицированных ТФФ-катионами [242,243]. В литературе основной объем исследований сосредоточен на ковалентной пришивке ТФФ-фрагмента к различным наноносителям или биологически активным соединениям [244,245], однако подобная стратегия потенциально может повлиять на активность фармацевтической субстанции. Поэтому в качестве альтернативы в диссертационной работе апробирована методика нековалентной модификации липидных наноносителей гомологической серией ПАВ с трифенилфосфониевой головной группой [156,246,247]. Разработка митохондриально-направленных липосом проведена нами в двух направлениях: (1) для лечения онкологических заболеваний и (2) для терапии болезни Альцгеймера.

### **3.4.1. Липосомы, нековалентно модифицированные ПАВ с трифенилфосфониевой головной группой, для терапии онкологических заболеваний**

Предполагается, что комбинация митотропных агентов с традиционными химиотерапевтическими препаратами (доксорубин, паклитаксел) [161,248] или блокаторами окислительного фосфорилирования (ротенон, антимицин А, олигомицин) [152,153] может стать эффективной стратегией запуска апоптоза опухолевых клеток. Создание новых модифицированных липосомальных формулировок и, в частности, их модификация фосфониевыми ПАВ является актуальным и перспективным направлением. Между тем, разработка липосомальных составов, модифицированных катионными ПАВ, является сложной задачей, поскольку следует поддерживать тонкий баланс между положительными эффектами, такими как увеличение сродства к отрицательно заряженным мембранам, улучшение коллоидной стабильности, и сопутствующим появлением токсичности, присущей катионным амфифилам. Следовательно, необходима оптимизация состава липосомальных систем, включая скрининг по гомологическим рядам и соотношению липид/ПАВ, для достижения лучших физико-химических показателей и высокой биологической активности.

#### **3.4.1.1. Приготовление и характеристика модифицированных фосфониевыми ПАВ липосом. Загрузка доксорубина гидрохлорида и ротенона**

Изучение способности катионных ПАВ модулировать свойства липосом начали с подбора оптимального гомолога ТФФБ-*n* и его концентрации в липидном бислое. Одним из широко апробированных липидов для формирования липосом является 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ), поскольку является наиболее распространенным липидом в составе мембран эукариотических клеток [249]. На первом этапе исследований проведена оценка физико-химических характеристик полученных липосомальных формулировок методами динамического и электрофоретического рассеяния света (табл. 3.16). Усредненный по интенсивности гидродинамический диаметр модифицированных липосом (за редким исключением) находится в пределах 100–130 нм с индексом полидисперсности не более 0.2, что свидетельствует о высокой степени монодисперсности систем. Данные результаты являются благоприятными, поскольку большинство коммерчески доступных липосомальных препаратов обладают однослойной структурой размером около 100 нм, что позволяет им дольше

циркулировать в кровеносном русле и эффективнее достигать мишени [3]. Показано, что увеличение гидрофобности амфифильных производных трифенилфосфония приводит к увеличению положительного дзета-потенциала липосом с +6 мВ (для немодифицированных липосом) до +50-60 мВ в случае ТФФБ-12 и ТФФБ-14. Величина дзета-потенциала изменяется пропорционально длине алкильного радикала ПАВ. Вероятно, это связано с увеличением сродства более гидрофобных гомологов к липидному бислою липосом. Можно предположить, что при одном и том же мольном соотношении в липидный бислой липосом встроится большее количество молекул ТФФБ-14 по сравнению с ТФФБ-12. Данное предположение также подтверждается результатами, ранее полученными методом турбидиметрии [77].

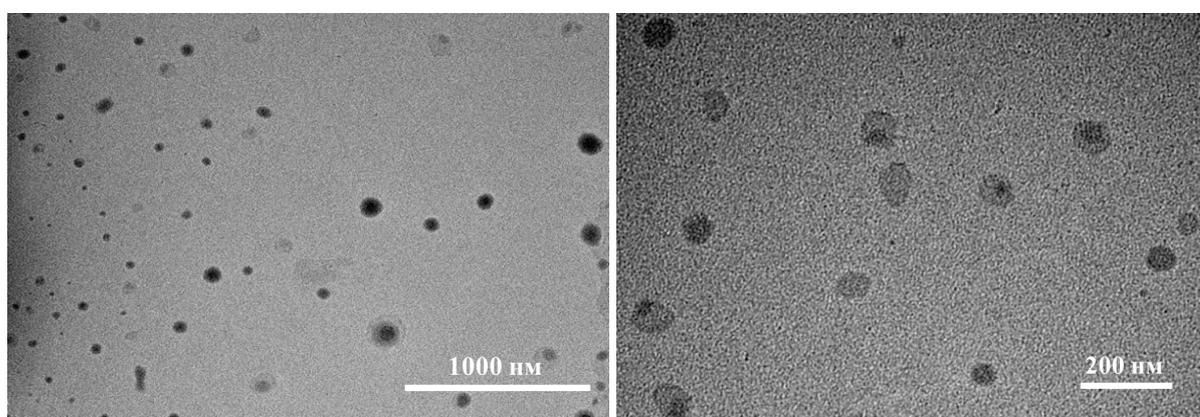
**Таблица 3.16.** Физико-химические характеристики липосом на основе ДПФХ, модифицированных ТФФБ-п, при различных мольных соотношениях липид/ПАВ, 25 °С\*.

Система	Мольное соотношение ДПФХ/ТФФБ-п	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ
		1 день			4 месяца		
ДПФХ	-	134±2	0.254±0.025	+6±1	Не стабильны		
ДПФХ/ТФФБ-12	25/1	127±2	0.216±0.023	+36±1	168±3	0.533±0.013	+28±0.4
ДПФХ/ТФФБ-12	15/1	113±1	0.135±0.008	+52±0.2	114±0.5	0.169±0.018	+37±1
ДПФХ/ТФФБ-12	10/1	149±2	0.239±0.005	+51±1	110±0.3	0.147±0.006	+44±1
ДПФХ/ТФФБ-14	50/1	113±3	0.091±0.010	+30±2	111±0.6	0.070±0.009	+22±3
ДПФХ/ТФФБ-14	35/1	104±2	0.102±0.032	+46±1	105±1	0.250±0.08	+40±2
ДПФХ/ТФФБ-14	25/1	110±2	0.106±0.011	+52±2	106±1	0.079±0.009	+41±1
ДПФХ/ТФФБ-14	15/1	102±2	0.148±0.017	+56±1	110±2	0.204±0.012	+42±0.4
ДПФХ/ТФФБ-14	10/1	192±7	0.197±0.023	+59±2	96±1	0.151±0.012	+48±3

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

Согласно данным, представленным в таблице 3.16, за 4 месяца хранения существенных изменений диаметра и индекса полидисперсности модифицированных липосом (за редким исключением) выявлено не было, и значения были зафиксированы в пределах 115 нм и 0.25 соответственно, тогда как немодифицированные липосомы к этому времени были разрушены. Стоит отметить, что для липосом на основе ДПФХ характерна такая низкая стабильность во времени [250]. Такое положительное влияние ТФФБ-п на стабильность липосом связано с придаваемым ими поверхностным зарядом, который приводит к электростатическому отталкиванию липосом в растворе и предотвращает их агрегацию.

Катионные липосомы ДПФХ/ТФФБ-14 (мольное соотношение компонентов 35/1) визуализировали с помощью ПЭМ (рис. 3.22). Как видно из фотографий, диаметр частиц составляет около 80–90 нм. Стоит отметить, что полученные значения несколько ниже, чем значения, полученные методом ДРС ( $104 \pm 2$  нм для той же системы). Подобное небольшое отклонение в значениях, полученных двумя разными методами, объясняется тем фактом, что ПЭМ фиксирует размер липосом после высушивания, а при измерении диаметра липосом методом ДРС учитывается также сольватная оболочка, окружающая наночастицы [251]. Также стоит отметить, что с помощью ПЭМ была зафиксирована и морфология липосом: за редким исключением липосомы имели сферическую форму.



**Рисунок 3.22.** ПЭМ-изображения липосом ДПФХ/ТФФБ-14 (мольное соотношение 35/1), 25 °С.

Для инкапсулирования доксорубина были выбраны две системы: немодифицированные липосомы на основе ДПФХ и модифицированные липосомы ДПФХ/ТФФБ-14 при мольном соотношении 35/1 (табл. 3.17). DOX является высокоэффективным химиотерапевтическим препаратом широкого спектра действия, который отдельно или в сочетании с другими противораковыми препаратами широко используется в качестве первоочередной терапии при множестве метастатических опухолей [252]. Были получены липосомы с гидродинамическим диаметром около 100 нм и низкими значениями PdI. В случае модифицированных липосом при инкапсулировании DOX происходит снижение дзета-потенциала от +46 мВ (табл. 3.16) до +33-35 мВ (табл. 3.17). Показано, что модифицированные липосомы с DOX стабильны в течение четырех месяцев, в то время как липосомы на основе ДПФХ, загруженные DOX, разрушаются через 2 недели. Введение ТФФБ-14 в липосомы увеличивает эффективность

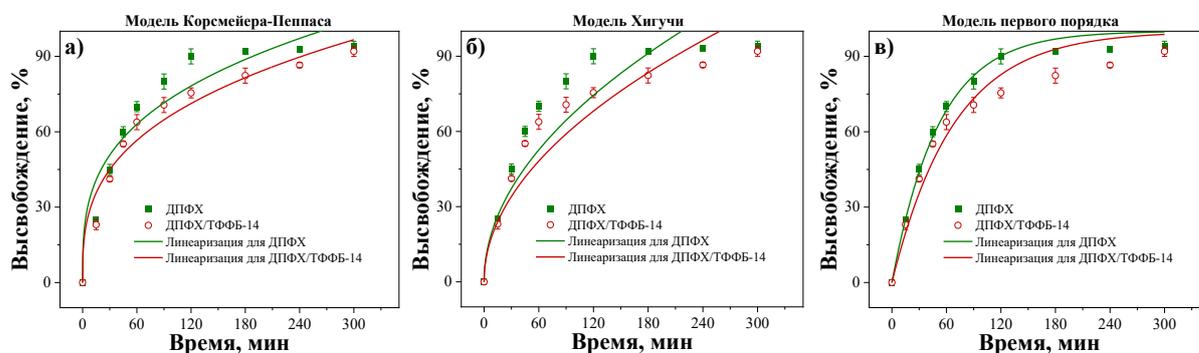
инкапсулирования DOX при одной и той же концентрации субстрата по сравнению с немодифицированной системой, однако дальнейшее увеличение содержания ПАВ в липосомах приводит к снижению этих значений, что, вероятно, объясняется разрыхлением упаковки липидного бислоя (табл. 3.17).

**Таблица 3.17.** Физико-химические характеристики липосом на основе ДПФХ, модифицированных ТФФБ-14 и загруженных DOX, при различных мольных соотношениях липид/ПАВ, 25 °С\*.

Система	Мольное соотношение ДПФХ/ТФФБ-п	ЕЕ, %	$D_h$ , нм	PdI	$\zeta$ , мВ	$D_h$ , нм	PdI	$\zeta$ , мВ
			1 день			4 месяца		
ДПФХ	-	65±1	134±2	0.312±0.050	+5±0.2	Не стабильны		
ДПФХ/ТФФБ-14	50/1	89±1	110±1	0.105±0.063	+33±1	138±2	0.242±0.012	+49±1
ДПФХ/ТФФБ-14	35/1	59±1	111±1	0.087±0.016	+35±1	110±2	0.095±0.017	+42±3

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

На следующем этапе была проведена оценка скорости высвобождения доксорубина из немодифицированных и модифицированных ТФФБ-14 липосом (рис. 3.23). Практически полное высвобождение DOX наблюдается на шестой час эксперимента в обоих случаях, тогда как для катионных липосом наблюдается небольшая пролонгированность высвобождения. Для определения механизма высвобождения DOX из липосом, экспериментально полученные кривые были аппроксимированы с использованием математических моделей Корсмейера-Пеппаса, Хигучи и первого порядка.



**Рисунок 3.23.** Кривые высвобождения DOX из липосом на основе ДПФХ и ДПФХ/ТФФБ-14 (50/1) *in vitro*, аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса, б) Хигучи и в) первого порядка, 37 °С.

Значения константы скорости для всех моделей подтвердили, что модификация липосом катионными ПАВ приводит к замедлению скорости высвобождения, а коэффициенты корреляции указывают на то, что более точно экспериментальные кривые описывают модели Корсмейера-Пеппаса и первого порядка (табл. 3.18). Согласно значениям диффузионной экспоненты ( $n$ ) высвобождение доксорубицина осуществляется посредством диффузии, которая подчиняется первому закону Фика.

**Таблица 3.18.** Параметры кинетики высвобождения DOX из немодифицированных и модифицированных липосом, полученные с помощью различных математических моделей.

Система	Математические модели						
	Корсмейера-Пеппаса			Хигучи		Первого порядка	
	$n$	$k_{kp}$ , %/мин <sup><math>n</math></sup>	$R^2$	$k_x$ , %/мин <sup>1/2</sup>	$R^2$	$k_1$ , 1/мин	$R^2$
ДПФХ	0.31±0.05	17.53±4.46	0.9282	6.79±0.43	0.8135	0.0192±0.0009	0.9889
ДПФХ/ТФФБ-14	0.33±0.04	14.49±2.84	0.9590	6.22±0.33	0.8722	0.0146±0.0013	0.9437

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. Известно, что липосомы на основе липидов с ненасыщенными связями в гидрофобных радикалах (например, соевый ФХ) характеризуются высокой проницаемостью бислоя и низкой стабильностью [120]. Подобные недостатки липосомальных систем можно предотвратить, добавляя в состав липосом холестерин, улучшая упаковку фосфолипидов и воздействуя на жесткость и текучесть липидного бислоя [253], что приводит к повышению стабильности липосом [102]. 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, 35/1 и 25/1), тогда как соотношение ФХ/Хол было неизменно (9/1). Как и в случае с липосомами на основе ДПФХ, гидродинамический диаметр модифицированных липосом составлял примерно 100-120 нм с  $PdI$  не более 0.24 (табл. 3.19). Стоит отметить, что модификация липосом катионными ПАВ приводила к небольшому уплотнению и уменьшению размеров по сравнению с

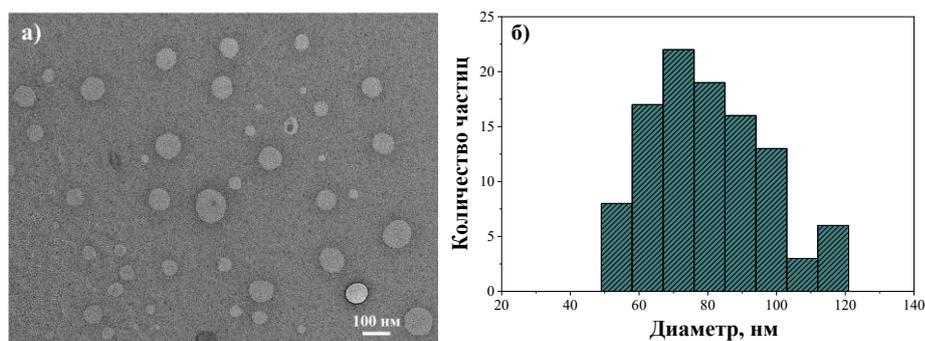
немодифицированными липосомами, что также было показано и для некоторых модифицированных систем на основе ДПФХ (табл. 3.16). Липосомальные составы сохраняли высокую степень монодисперсности ( $PdI$  менее 0.27) и размер не более 134 нм (табл. 3.19) в течение двух месяцев. Стоит отметить, что дзета-потенциал ФХ/Хол/ТФФБ-п липосом к двум месяцам хранения возрос, что является благоприятным фактором с точки зрения стабильности липосом во времени.

**Таблица 3.19.** Физико-химические характеристики липосом на основе ФХ/Хол, модифицированных ТФФБ-п, при различных мольных соотношениях липид/ПАВ, 25 °С\*.

Система	Мольное соотношение липид/ТФФБ-п	$D_n$ , нм	$PdI$	$\zeta$ , мВ	$D_n$ , нм		$\zeta$ , мВ
					1 день	2 месяца	
ФХ	-	131±1	0.214±0.013	+1.8±0.9	115±1	0.105±0.008	-13±1
ФХ/Хол	-	133±5	0.215±0.022	-7.0±0.2	112±1	0.118±0.023	-14±1
ФХ/Хол/ТФФБ-10	50/1	152±1	0.239±0.003	+29±2	114±2	0.102±0.010	+31±3
	35/1	110±1	0.092±0.023	+28.8±0.6	122±1	0.130±0.021	+33±1
	25/1	113±1	0.076±0.019	+39±1	114±1	0.101±0.004	+38±1
ФХ/Хол/ТФФБ-12	50/1	102±1	0.116±0.018	+30±2	100±1	0.145±0.008	+35±2
	35/1	104±1	0.134±0.014	+31±1	103±1	0.137±0.022	+45±3
	25/1	120±1	0.137±0.032	+42±1	103±1	0.114±0.004	+43±3
ФХ/Хол/ТФФБ-14	50/1	120±1	0.085±0.012	+33±2	106±1	0.086±0.012	+37.2±0.5
	35/1	109±1	0.083±0.012	+35±1	108±2	0.138±0.019	+42±1
	25/1	111±1	0.133±0.005	+38.8±0.5	122±1	0.124±0.012	+47±2
ФХ/Хол/ТФФБ-16	50/1	98±1	0.103±0.018	+38±2	120±1	0.124±0.010	+44±1
	35/1	102±1	0.119±0.008	+30.3±0.3	122±1	0.147±0.012	+47±4
	25/1	123±1	0.097±0.009	+40.3±0.4	119±2	0.103±0.006	+53±2

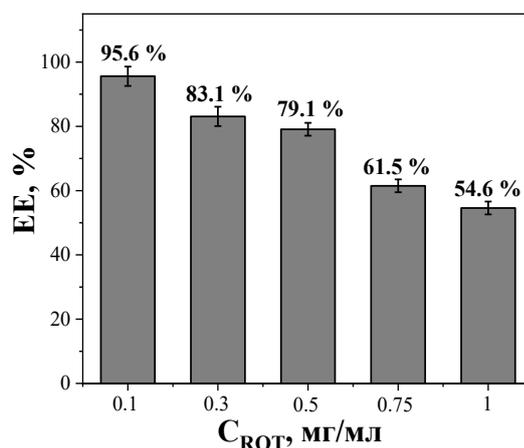
\*Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение ( $n = 5$ ).

Для подтверждения морфологии и размера полученных агрегатов были получены микрофотографии липосом ФХ/Хол/ТФФБ-14 (50/1) с помощью ПЭМ, которые демонстрируют образование везикул сферической формы, преимущественно обладающих диаметром  $80 \pm 17$  нм. Как видно из микрофотографии, в системе наблюдается небольшая полидисперсность (рис. 3.24а), что отражено на диаграмме, полученной при обработке фотографий с помощью программы ImageJ (рис. 3.24б). Однако данный эффект незначителен, и результаты хорошо согласуются со значениями, полученными методом ДРС (табл. 3.19). Стоит заметить, что, как и в случае с липосомами на основе ДПФХ, усредненный диаметр липосом, полученный методом ПЭМ, ниже, чем гидродинамический диаметр липосом, полученный методом ДРС ( $120 \pm 1$  нм для той же системы).



**Рисунок 3.24.** а) Микрофотография липосом, полученная методом ПЭМ; б) распределение липосом по размеру на микрофотографии для ФХ/Хол/ГФФБ-14 при мольном соотношении 50/1, 25 °С.

Один из подходов в лечении онкологических заболеваний, резистентных к химиотерапии, заключается в использовании блокаторов окислительного фосфорилирования (митохондриальных ядов) [151]. Сочетание митотропных наноразмерных систем доставки лекарств с митохондриальными ядами представляет собой многообещающее направление [152,153]. Ротенон является изофлавоноидом и обладает способностью ингибировать митохондриальный комплекс I, что широко используется для моделирования болезни Паркинсона на лабораторных животных [254], а также для изучения роли митохондриальной дыхательной цепи при апоптозе [255]. Однако ROT не используется в качестве лекарственного вещества для лечения онкологических заболеваний, что, вероятно, связано с высокой активностью ROT, его неселективным действием и токсичностью по отношению к нормальным клеткам. В связи с этим его инкапсулирование в липосомальные системы, нацеленные на митохондрии клеток, может позволить существенно снизить его токсичность по отношению к нормальным клеткам. На рисунке 3.25 показаны значения эффективности инкапсулирования для пяти различных концентраций ROT в липосомах на основе ФХ/Хол/ГФФБ-14 при мольном соотношении липид/ПАВ, равном 50/1. Согласно результатам, наиболее оптимальной загружаемой концентрацией ROT является 0.1 мг/мл. Стоит отметить, что при концентрациях выше 0.1 мг/мл липосомы могут вместить большее количество ROT, однако это приводит к неэффективному использованию субстрата, что экономически нецелесообразно и может влиять на стабильность липосом.



**Рисунок 3.25.** Значения эффективности инкапсулирования ROT в липосомах ФХ/Хол/ТФФБ-14 при мольном соотношении компонентов 50/1, 25 °С.

Поскольку включение гидрофобного субстрата в липосомы может напрямую влиять на их свойства, в первую очередь был проведен мониторинг физико-химических характеристик наноносителей, загруженных ROT (табл. 3.20). На этом этапе исследования внимание было сосредоточено на двух мольных соотношениях липид/ПАВ, а именно 50/1 и 35/1. Это связано с тем, что увеличение концентрации ПАВ может отрицательно повлиять на токсичность всей формулировки. Заметного влияния ROT на физико-химические характеристики липосом не было выявлено, диаметр частиц составлял приблизительно 110 нм. Несмотря на то, что липосомы, загруженные гидрофобными субстратами характеризуются меньшей стабильностью [67], липосомы с ROT показали хорошую стабильность в течение 2 месяцев (табл. 3.20).

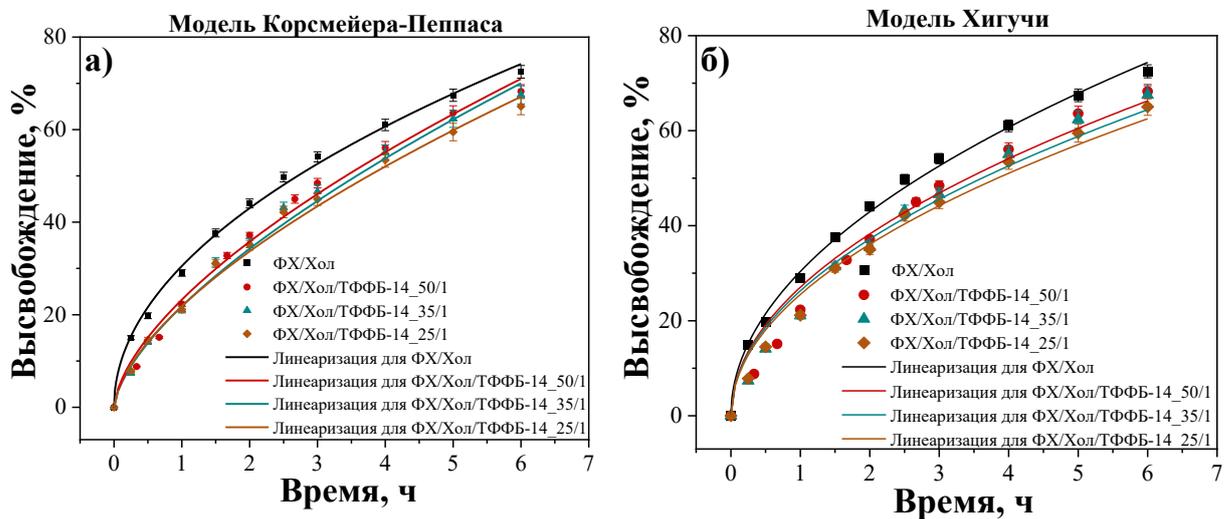
**Таблица 3.20.** Физико-химические характеристики липосом на основе ФХ/Хол, модифицированных ТФФБ-п и загруженных ROT, при различных мольных соотношениях липид/ПАВ, 25 °С\*.

Система	Мольное соотношение липид/ТФФБ-п	EE, %	D <sub>h</sub> , нм					
			PdI			ζ, мВ		
			1 день			2 месяца		
ФХ/Хол/ТФФБ-10	50/1	91±2	110±1	0.103±0.005	+29±1	121±1	0.099±0.017	+29±1
	35/1	91±3	114±2	0.116±0.015	+31±1	110±2	0.096±0.014	+37.2±0.3
ФХ/Хол/ТФФБ-12	50/1	94±1	119±2	0.115±0.011	+31±1	123±2	0.115±0.018	+31±1
	35/1	92±2	138±3	0.250±0.006	+34±2	106±2	0.072±0.008	+44±1
ФХ/Хол/ТФФБ-14	50/1	94±1	114±1	0.109±0.011	+33±1	115±1	0.098±0.027	+31±1
	35/1	94±1	122±1	0.203±0.019	+35±1	114±1	0.082±0.020	+45±3
ФХ/Хол/ТФФБ-16	50/1	95±2	116±2	0.106±0.005	+25.5±0.7	120±2	0.098±0.017	+34±3
	35/1	93±1	117±1	0.172±0.001	+32±1	120±1	0.171±0.013	+48±2

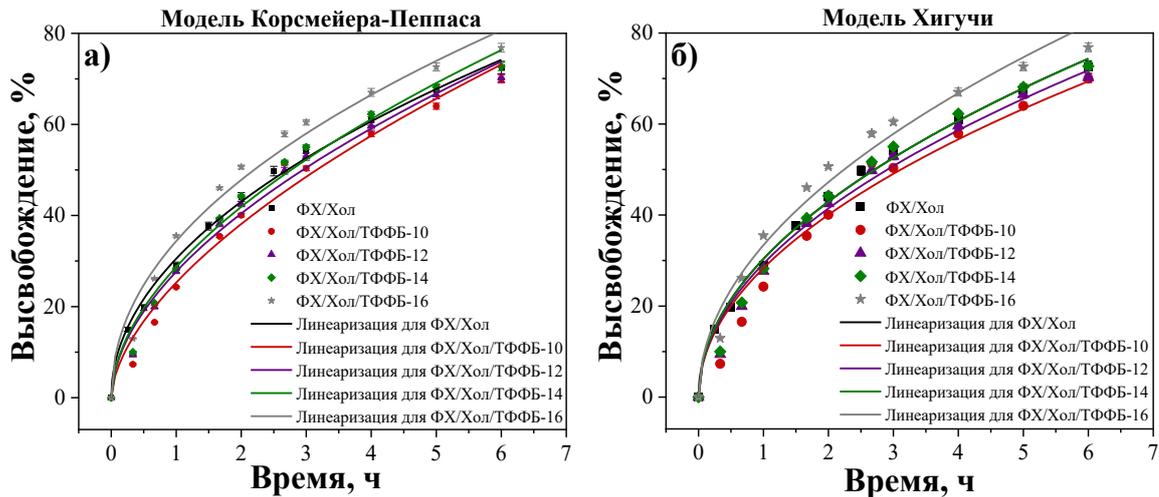
\*Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n = 5).

Помимо данных ДРС, для всех систем была определена эффективность инкапсулирования липосом по отношению к ROT (табл. 3.20). Показано, что длина углеводородного радикала ПАВ и соотношение липид/ПАВ незначительно влияют на эффективность инкапсулирования, и значения превышают 90%.

На следующем этапе была оценена скорость высвобождения ROT из модифицированных липосом методом диализа в среде смешанного состава на основе PBS (рН = 7.4) и этанола в соотношении 1:1. Как показано на рисунках 3.26 и 3.27, в случае липосом на основе ФХ/Хол/ТФФБ-14 статистически значимого влияния концентрации ПАВ на скорость высвобождения ROT выявлено не было. Более заметные различия зафиксированы при варьировании длины углеводородного радикала ПАВ: увеличение длины алкильного радикала ПАВ приводило к возрастанию скорости высвобождения ROT, вероятно, из-за разрыхления липидного бислоя. Ранее было продемонстрировано, что более длинный углеводородный радикал ПАВ усиливает их способность дестабилизировать липидный бислой липосом, что потенциально приводит к ускорению высвобождения ROT из липосом. Однако следует отметить, что различие между ПАВ с гексадецильными и децильными углеводородными радикалами составляет не более 10%.



**Рисунок 3.26.** Кривые высвобождения ROT из модифицированных липосом при варьировании мольного соотношения ФХ/Хол/ТФФБ-14, аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса и б) Хигучи, 37 °С.



**Рисунок 3.27.** 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.

Полученные зависимости были обработаны двумя математическими моделями, а именно моделями Корсмейера-Пеппаса и Хигучи (рис. 3.26 и 3.27). Согласно представленным графикам, 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 (табл. 3.21). Представленные значения константы скорости ( $k$ ) подтверждают высказанные выше рассуждения: увеличение длины углеводородного радикала ТФФБ-*n* приводит к небольшому увеличению кинетики высвобождения ROT, тогда как концентрация ПАВ не влияет на скорость. Интересно, что, судя по значениям диффузионной экспоненты ( $n$ ), высвобождение ROT из липосом на основе ФХ/Хол/ТФФБ-*n* осуществляется по механизму диффузии, не подчиняющемуся первому закону Фика ( $0.45 < n < 0.89$ ) [256,257], то есть при высвобождении наблюдается комбинация механизмов диффузии лекарственного вещества и дестабилизации фосфолипидного бислоя липосом [258].

**Таблица 3.21.** Параметры кинетики высвобождения ROT из липосом ФХ/Хол/ТФФБ-п при различных мольных соотношениях липид/ПАВ, полученные с помощью различных математических моделей.

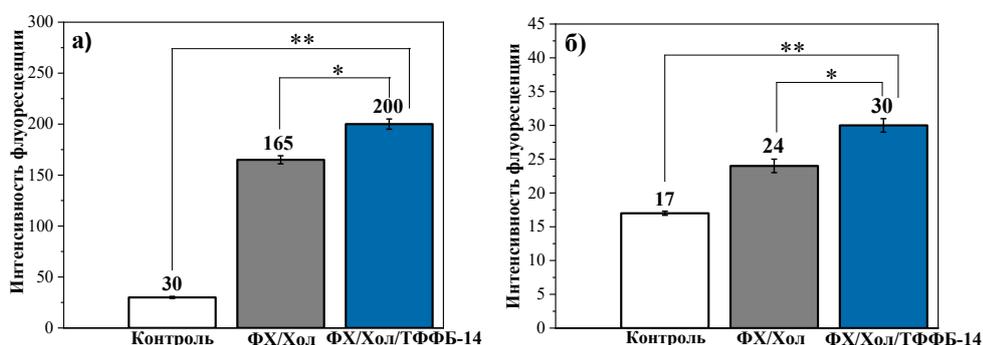
Система	Мольное соотношение липид/ТФФБ-п	Математические модели				
		Корсмейера-Пеппаса			Хигучи	
		n	ккп, %/мин <sup>n</sup>	R <sup>2</sup>	кх, %/мин <sup>1/2</sup>	R <sup>2</sup>
ФХ/Хол/ТФФБ-14	50/1	0.623±0.028	23.24±0.90	0.9914	27.05±0.73	0.9723
	35/1	0.651±0.028	21.82±0.87	0.9919	26.30±0.82	0.9646
	25/1	0.627±0.026	21.82±0.82	0.9923	25.52±0.70	0.9719
ФХ/Хол/ТФФБ-10	50/1	0.593±0.043	25.28±1.50	0.9782	28.32±0.81	0.9682
ФХ/Хол/ТФФБ-12		0.547±0.032	27.66±1.22	0.9855	29.31±0.58	0.9834
ФХ/Хол/ТФФБ-14		0.546±0.032	28.70±1.27	0.9853	30.34±0.60	0.9834
ФХ/Хол/ТФФБ-16		0.476±0.033	34.38±1.51	0.9809	33.39±0.65	0.9817

Таким образом, с помощью метода гидратации липидной пленки были получены липосомы на основе ДПФХ, нековалентно модифицированные ПАВ с трифенилфосфониевой головной группой, которые затем были оптимизированы по составу путем перехода на экономически более выгодный липид – соевый ФХ, стабилизированный холестерином. Как модифицированные липосомы на основе ДПФХ, так и липосомы на основе ФХ/Хол обладают высоким положительным дзета-потенциалом и улучшенной стабильностью во времени по сравнению с немодифицированными липосомами. Также методом ПЭМ и ДРС было показано, что модифицированные липосомы обладали сферической формой с диаметром приблизительно 100 нм. Показано, что включение доксорубина гидрохлорида и ротенона в состав липосом не влияет на физико-химические характеристики липосом. Более того, для всех субстратов получены высокие значения эффективности инкапсулирования. Включение в липидный бислой ТФФБ-п способствует пролонгированному высвобождению субстратов *in vitro*, что является благоприятным с точки зрения корректировки режима дозировки лекарственных веществ и их концентрации в случае исследований *ex vivo* и *in vivo*. Использование в работе математических моделей Корсмейера-Пеппаса и Хигучи позволило более детально изучить механизм высвобождения субстратов. Согласно расчётам, модель Корсмейера-Пеппаса лучше описывает экспериментально полученные данные. Показано, что высвобождение доксорубина из липосом на основе ДПФХ осуществляется посредством диффузии по первому закону Фика, тогда как высвобождение ротенона

опосредуется комбинацией механизмов диффузии и дестабилизации липидного бислоя липосом, то есть не подчиняется закону Фика.

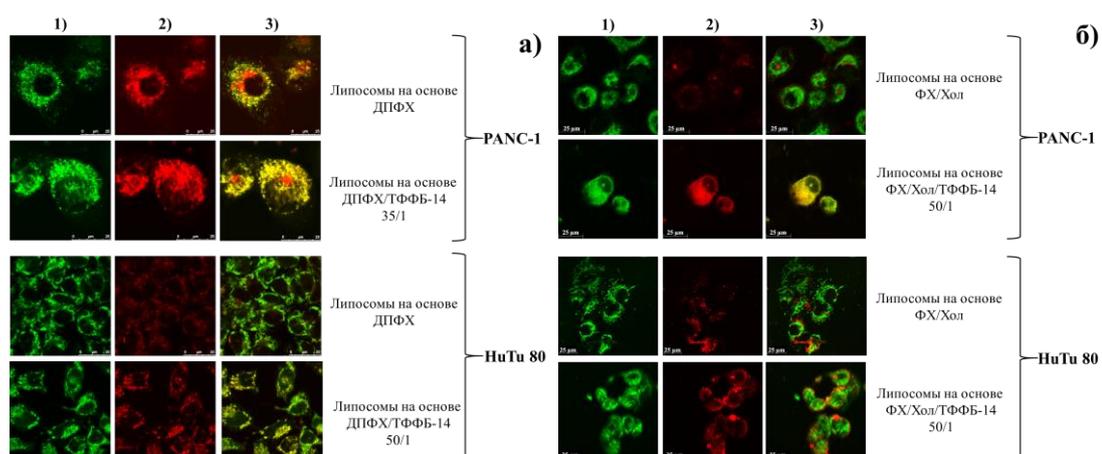
### 3.4.1.2. Определение цитотоксичности и степени колокализации липосом с митохондриями опухолевых клеток

Биологические эксперименты требуют больших временных и финансовых затрат, что накладывает ограничения по количеству испытываемых композиций. Оценку биологической активности липосом *in vitro* и *in vivo* проводили на примере тетрадецильного гомолога фосфониевых ПАВ, выбранного в качестве оптимального для модификации наноконтейнеров, поскольку эффективность модифицированных липосом во многом зависит от величины дзета-потенциала, то есть от способности ПАВ встраиваться в липидный бислой. Немодифицированные липосомы были использованы в качестве системы сравнения. Первым шагом оценки биологической активности наночастиц, нацеленных на митохондрии, является клеточная интернализация. Эксперимент по клеточному поглощению был проведен на примере липосом на основе ФХ/Хол с флуоресцентным липидом DOPE-RhV на опухолевых клеточных линиях PANC-1 и HuTu 80 (рис. 3.28). После обработки клеток липосомами, интенсивность флуоресценции увеличивается по сравнению с контролем, что характеризует процесс поглощения липосом клетками PANC-1 и HuTu 80. Однако в случае липосом ФХ/Хол/ТФФБ-14 этот эффект статистически более значим, что указывает на повышенную проникающую способность модифицированных липосом.



**Рисунок 3.28.** Клеточное поглощение липосом ФХ/Хол и ФХ/Хол/ТФФБ-14 (мольное соотношение компонентов 50/1): а) PANC-1 и б) HuTu 80. Статистический анализ был проведен с использованием теста Манна-Уитни. \* – статистически значимое различие по сравнению с системой ФХ/Хол ( $p < 0.01$ ); \*\* – статистически значимое различие по сравнению с контролем ( $p < 0.01$ ).

Для определения возможности использования липосом, модифицированных фосфониевыми ПАВ, для доставки лекарственных средств были проведены исследования по изучению их способности проникать в клетки и колокализоваться с митохондриями. Для визуализации митохондрий внутри клеток был использован краситель MitoTracker Green FM, который обладает ярко-зеленой флуоресценцией и высокой селективностью взаимодействия с митохондриями клеток. Однако самой важной характеристикой MitoTracker Green FM является его нечувствительность к митохондриальному мембранному потенциалу, что позволяет использовать данный краситель для окрашивания митохондрии как нормальных, так и опухолевых клеток [259]. Качественно степень колокализации липосом с митохондриями опухолевых клеток можно оценить по появлению желтого окрашивания на фотографиях, полученных с помощью конфокального микроскопа. Желтый цвет в данном случае получен путем наложения зеленого и красного каналов, что говорит о совместной локализации RhV и MitoTracker Green FM в клетке, т.е. о колокализации липосом с митохондриями (рис. 3.29).

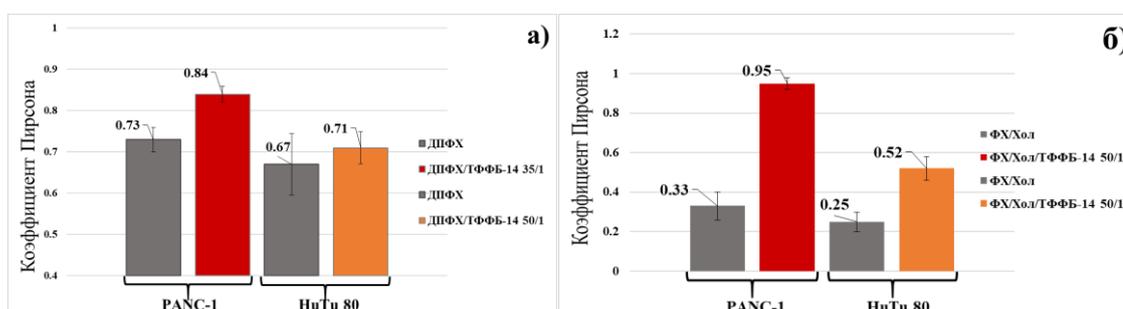


**Рисунок 3.29.** Анализ колокализации немодифицированных и модифицированных липосом на основе а) ДПФХ и б) ФХ/Хол с митохондриями опухолевых клеток линии PANC-1 и HuTu 80: 1) флуоресценция красителя MitoTracker Green FM (митохондрии); 2) флуоресценция RhV (липосомы); 3) объединенное желтое изображение указывает на колокализацию двух зондов.

Невооруженным глазом видно, что степень колокализации выше в случае модифицированных липосом на основе ДПФХ/ТФФБ-14 в случае всех клеточных линий по сравнению с немодифицированными липосомами (рис. 3.29а). Стоит отметить, что высокая степень колокализации модифицированных липосом с митохондриями

наблюдается как при низкой (соотношение 50/1), так при высокой (соотношение 35/1) концентрации ТФФБ-14 в липидном бислое. Для оптимизированной системы ФХ/Хол, модифицированной ТФФБ-14, также была определена способность колокализироваться с митохондриями опухолевых клеток. Как видно из фотографий, представленных на рисунке 3.29б, колокализация модифицированных липосом с митохондриями клеток больше по сравнению с немодифицированными липосомами. Как и в случае с липосомами на основе ДПФХ (рис. 3.29а), визуально степень колокализации липосом с митохондриями клеток линии PANC-1 выше по сравнению с митохондриями клеток линии NuTu 80.

Для количественного определения степени колокализации липосом с митохондриями был проведен расчет коэффициента корреляции Пирсона для всех клеточных линий (рис. 3.30). Коэффициент Пирсона является мерой линейной связи между переменными и принимает значения от -1 до 1, где -1 указывает на отрицательную линейную корреляцию, 0 указывает на отсутствие корреляции, а 1 означает положительную корреляцию [260]. В данном случае переменными являются флуоресценция MitoTracker Green и RhB, а коэффициент Пирсона отражает связь между ними.



**Рисунок 3.30.** Значение коэффициента Пирсона для модифицированных и немодифицированных липосом на основе а) ДПФХ и б) ФХ/Хол на клеточных линиях а) PANC-1 и б) NuTu 80.

Показано, что в случае всех клеточных линий коэффициент Пирсона для модифицированных липосом выше по сравнению с немодифицированными липосомами, и данный эффект более выражен в случае клеточной линии PANC-1. Переход от липосом на основе ДПФХ к липосомам с ФХ/Хол позволил увеличить разницу между степенью колокализации модифицированных и немодифицированных липосом с митохондриями с

13% до 65% и с 5% до 52% в случае клеточных линий PANC-1 и HuTu 80 соответственно. На основе полученных результатов, можно судить о том, что катионизация липосом благоприятно влияет на их способность достигать митохондрий клеток.

Основной проблемой в области лечения рака является недостаточная селективность систем по отношению к опухолевым клеткам. Поэтому следующим этапом исследования биологической активности было определение цитотоксичности липосом, загруженных доксорубицином и ротеноном, по отношению к опухолевым и нормальным клеточным линиям *in vitro*. Для экспериментов были выбраны опухолевые клеточные линии HuTu 80, PANC-1 и линия нормальных клеток печени Chang liver.

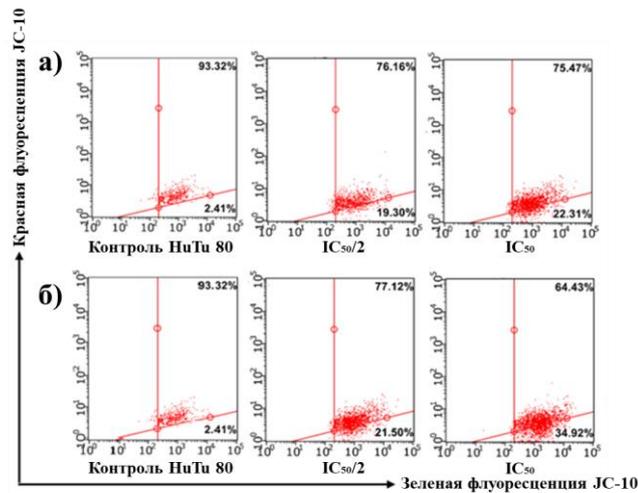
**Таблица 3.22.** Цитотоксичность и индекс селективности ротенона и доксорубицина гидрохлорида в немодифицированных и модифицированных липосомах (мольное соотношение 50/1) по отношению к нормальным и опухолевым клеточным линиям.

Система	IC <sub>50</sub> , мкМ			SI <sub>Chang liver/HuTu 80</sub>
	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

Как видно из данных, представленных в таблице 3.22, свободный ROT проявляет достаточно высокую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам (полулетальная доза, при которой погибает 50% клеток (IC<sub>50</sub>), составляет 2.8 мкМ), сопоставимую с цитотоксичностью DOX. Важно отметить, что свободный ROT обладает достаточно 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.

После подтверждения митохондриальной активности модифицированных липосом, а также высокой селективной цитотоксической активности ROT-загруженных липосом,

исследуемые составы были протестированы для подтверждения их проапоптотической эффективности методом проточной цитометрии на линии клеток NuTu 80 с использованием флуоресцентного красителя JC-10 (рис. 3.31). JC-10 накапливается в митохондриальном матриксе и образует агрегаты (J-агрегаты) с красной флуоресценцией в нормальных клетках с высоким мембранным потенциалом митохондрий. Мембранный потенциал снижается в апоптотических клетках, и JC-10 начинает диффундировать из митохондрий в цитоплазму и превращается в мономерную форму (J-мономер), излучая зеленую флуоресценцию [196]. Согласно результатам, после обработки клеток NuTu 80 липосомальными составами наблюдается дозозависимое снижение мембранного потенциала митохондрий, о чем свидетельствует увеличение интенсивности зеленой флуоресценции JC-10. Процесс индукции апоптоза становится более выраженным при добавлении липосом ФХ/Хол/ТФФБ-14/ROT. Полученные результаты позволяют предположить, что цитотоксический механизм тестируемых систем обусловлен индукцией апоптоза по внутреннему митохондриальному пути.



**Рисунок 3.31.** Анализ индукции апоптоза опухолевых клеток линии NuTu 80, обработанных: а) ФХ/Хол/ROT и б) ФХ/Хол/ТФФБ-14/ROT.

Таким образом, комплексом биологических методов была подтверждена улучшенная способность катионных липосом проникать в опухолевые клетки по сравнению с немодифицированными липосомами. Включение в липосомы ТФФБ-14 позволило им не только эффективно проникать в клетки, но и колокализоваться с митохондриями без разрушения их целостности. Сочетание митотропной активности катионных липосом с химиотерапевтическим препаратом доксорубицин и блокатором

окислительного фосфорилирования ротенон способствовало увеличению цитотоксичности указанных лекарственных веществ с высокой долей селективности по отношению к опухолевым клеткам NuTu 80. Также методом проточной цитометрии было показано, что модифицированные липосомы ФХ/Хол/ТФФБ-14, загруженные ROT, способны индуцировать апоптоз опухолевых клеток по внутреннему митохондриальному пути, подтверждая эффективность предложенной в работе стратегии по комбинации митотропных наноконтейнеров с блокаторами окислительного фосфорилирования.

### **3.4.2. Липосомы, нековалентно модифицированные фосфониевыми ПАВ, для интраназальной терапии трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера**

Болезнь Альцгеймера имеет огромные клинические, социальные и экономические последствия для общества [261]. Лекарств для лечения болезни Альцгеймера не существует, все имеющиеся на рынке препараты оказывают симптоматическое воздействие и способствуют только некоторому улучшению качества жизни пациентов при легкой и средней степени тяжести заболевания. Существует ряд устоявшихся гипотез, объясняющих патогенез болезни Альцгеймера, среди которых в свете основной цели работы перспективной является гипотеза митохондриальной дисфункции [262,263]. Эта гипотеза рассматривается в настоящее время в качестве маркера ранней стадии болезни Альцгеймера, опережающего клинические проявления заболевания на 10-20 лет. Митохондриальная дисфункция приводит к появлению активных форм кислорода, нарушению структуры митохондрий и развитию окислительного стресса, что в конечном итоге может запустить процесс апоптоза [264]. Важно отметить, что митохондриальная дисфункция приводит к дополнительному накоплению бета-амилоида, который, в свою очередь, нарушает функционирование митохондрий, то есть происходит формирование так называемого «порочного круга», который сложно разорвать [265]. Это обуславливает интерес к поиску препаратов, действующих одновременно на несколько молекулярных мишеней, участвующих в патогенезе заболевания («мультифункциональные препараты») [266,267]. В данном контексте использование липосом является перспективным инструментом, поскольку природа липосом позволяет инкапсулировать в них лекарственные вещества как гидрофобной, так и гидрофильной природы. В рамках гипотезы митохондриального каскада развития болезни Альцгеймера разработка митохондриально-направленных липосом, загруженных антиоксидантами и

классическими препаратами для лечения болезни Альцгеймера, для интраназальной доставки может позволить замедлить развитие заболевания за счет воздействия лекарств на несколько мишеней, а именно на митохондрии и фермент ацетилхолинэстеразы. Поскольку на предыдущем этапе исследования было показано, что липосомы, модифицированные ТФФБ-14, обладают улучшенной митотропной активностью, были разработаны катионные липосомы с двойной загрузкой антиоксиданта  $\alpha$ -токоферол и ингибитора ацетилхолинэстеразы донепезила гидрохлорид для интраназальной терапии болезни Альцгеймера. Наноконтейнеры исследованы по классическому пути: оптимизация состава с помощью физико-химических методов и оценка биологической активности, начиная с экспериментов *in vitro* и заканчивая оценкой эффективности липосом *in vivo* [165].

### 3.4.2.1. Приготовление и характеристика модифицированных фосфониевыми ПАВ липосом. Загрузка $\alpha$ -токоферола и донепезила гидрохлорида

Для достижения цели, поставленной в рамках данной части диссертации, были выбраны липосомы классического состава ФХ/Хол, модифицированные тетрадецилтрифенилфосфоний бромидом. Благодаря различной природе выбранных субстратов, а именно  $\alpha$ -токоферола и донепезил гидрохлорида, липосомы хорошо подходят для их совместной доставки. Для минимизации токсичности систем соотношение липид/ПАВ составляло 50/1 (табл. 3.23).

**Таблица 3.23.** Концентрации компонентов немодифицированных и модифицированных липосом, загруженных антиоксидантом  $\alpha$ -токоферол.

Система	ФХ, мМ	Хол, мМ	ТОС, мМ	ТФФБ-14, мМ
15 мМ*				
ФХ/Хол	12	3	-	-
ФХ/Хол/ТФФБ-14	12	3	-	0.24
ФХ/Хол/ТОС	12	1.5	1.5	-
ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14	12	1.5	1.5	0.24
20 мМ*				
ФХ/Хол	16	4	-	-
ФХ/Хол/ТФФБ-14	16	4	-	0.32
ФХ/Хол/ТОС	16	2	2	-
ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14	16	2	2	0.32
30 мМ*				
ФХ/Хол	24	6	-	-
ФХ/Хол/ТФФБ-14	24	6	-	0.48
ФХ/Хол/ТОС	24	3	3	-
ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14	24	3	3	0.48

\*15, 20 и 30 мМ по отношению к ФХ/Хол или ФХ/Хол/ТОС.

Анализ данных, полученных с помощью динамического и электрофоретического светорассеяния (табл. 3.24), позволил выявить, что включение ТОС в липидный бислой снижает дзета-потенциал модифицированных липосом. 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 бислой создает конкуренцию, и ТОС препятствует включению молекул ПАВ в состав липосом. Однако эта разница не является критической, так как дзета-потенциал модифицированных липосом в присутствии ТОС остается высоким, а липосомы стабильны.

**Таблица 3.24.** Физико-химические характеристики и стабильность липосом, модифицированных ТФФБ-14 и загруженных антиоксидантом ТОС, 25 °С.

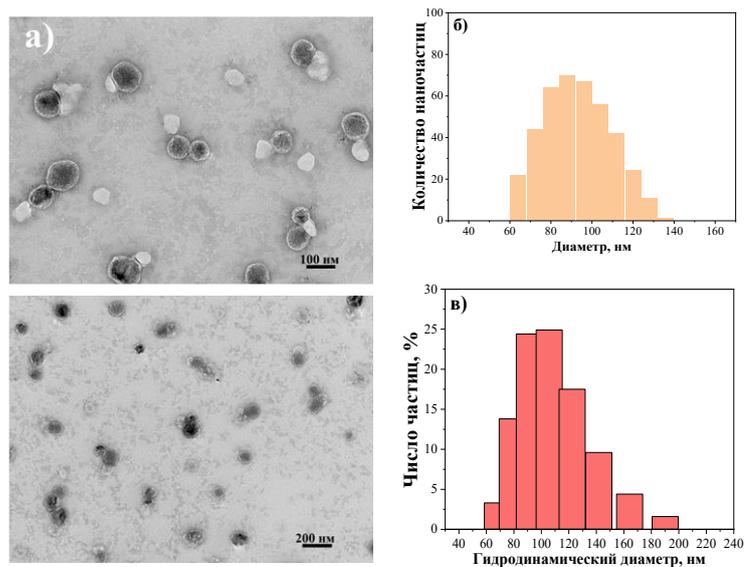
Система	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ
	1 день			5 месяцев		
15 мМ						
ФХ/Хол	107±2	0.071±0.027	-9.2±1.2	116±4	0.116±0.005	-10.6±1.7
ФХ/Хол/ТФФБ-14	105±2	0.109±0.010	+8.2±1.3	115±3	0.114±0.014	+24.3±1.9
ФХ/Хол/ТОС	105±2	0.067±0.012	-1.8±0.8***	114±3	0.115±0.004	-17.0±1.4**
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.

Дзета-потенциал наноконтейнеров определяет эффективность наноносителей при интраназальной доставке лекарственных препаратов в мозг. Известно, что катионные частицы могут дольше удерживаться на слизистой оболочке носа за счет электростатического взаимодействия между положительно заряженными наночастицами и отрицательно заряженными остатками муцина. Показано, что дзета-потенциал модифицированных ТФФБ-14 липосом в первый день приготовления был достаточно низким, что было характерно для всех трех систем с разной концентрацией липидов (табл. 3.24). Однако во время хранения дзета-потенциал липосом увеличивался. Такая же

тенденция отмечена для катионных липосом, загруженных ТОС при различных концентрациях липидов.

Диаметр и морфология липосом были подтверждены с помощью ПЭМ на примере системы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14 (20 мМ). Как видно из микрофотографий на рисунке 3.32а, липосомы имели четко выраженные границы, сферическую форму и диаметр около 90–100 нм. Для сравнения размеров липосом, полученных методами ПЭМ и ДРС, микрофотографии были обработаны программой ImageJ для измерения диаметра всех частиц в поле зрения. Полученные результаты представлены в виде диаграммы распределения количества частиц по размерам на рисунке 3.32б. Установлено, что наибольшее количество частиц было диаметром 80–110 нм, что хорошо согласуется с данными ДРС. На рисунке 3.32в представлена диаграмма распределения гидродинамического диаметра, усредненного по числу частиц, которая соответствует диаграмме, полученной при обработке результатов ПЭМ (рис. 3.32б).

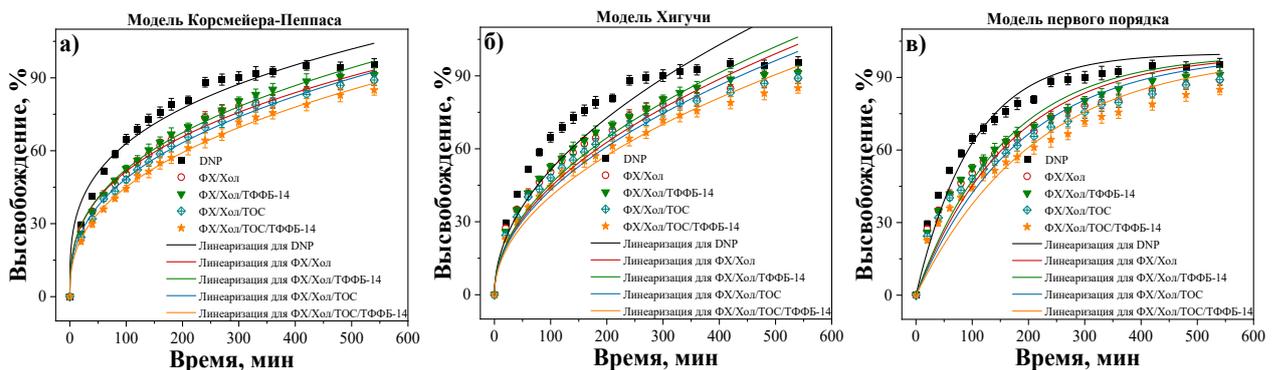


**Рисунок 3.32.** а) ПЭМ-изображения липосом ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14 (20 мМ); б) распределение количества липосом по размеру (ПЭМ); в) распределение гидродинамического диаметра, усредненного по числу частиц (ДРС), 25 °С.

Предложенный подход двойной загрузки лекарств в наноносители в настоящее время активно развивается. Известны несколько примеров комбинированной доставки препаратов для терапии болезни Альцгеймера: (1) DNP (или мемантина гидрохлорид) и инсулиновый сенситизатор в полимерных везикулах на основе поликапролактон-g-декстрана [268]; (2) метформин и ромидепсин в полимерных наночастицах [269] и (3)

миРНК и рапамицин в наноносителях на основе лектина и пептидов [270]. Также имеется пример объединения двух препаратов без наноконтейнеров – DNP и мемантина в препарате Namzagic™ [271]. В рамках данного направления обнаружено, что статистической разницы 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). Такая зависимость вполне объяснима, поскольку чем выше концентрация липидов в системе, тем больше в растворе липосом и, соответственно, «резервуаров» для лекарственного вещества в том же объеме. На основании полученных данных для дальнейших исследований была выбрана система со средним содержанием липидов 20 мМ. Это также связано с меньшим содержанием катионного ПАВ в системе по сравнению с 30 мМ системой, что снижает риск острой токсичности липосом.

Как видно из рисунка 3.33, загрузка DNP в липосомы приводит к снижению скорости его высвобождения. Следует отметить, что наиболее продолжительное высвобождение DNP наблюдается из системы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14. Включение ТОС также замедляет высвобождение субстрата, вероятно, из-за более плотной упаковки липидного бислоя. Математические модели Корсмейера-Пеппаса и Хигучи лучше подходят для описания кинетики высвобождения DNP [272].



**Рисунок 3.33.** Кривые высвобождения DNP из немодифицированных и модифицированных липосом, аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса, б) Хигучи и в) первого порядка, 37 °С.

По результатам, представленным в таблице 3.25, модель Корсмейера-Пеппаса является наиболее подходящей для описания кинетики высвобождения DNP из липосом, поскольку  $R^2$  для липосомальных систем превышает 0.99. Высокие значения  $R^2$  также были получены для модели Хигучи, которая предсказывает, что высвобождение лекарства происходит посредством диффузии. Это подтверждается значениями диффузионной экспоненты ( $n$ ). Значение  $n$  ниже 0.45 указывает на то, что субстрат высвобождается посредством диффузии согласно закону Фика.

**Таблица 3.25.** Параметры кинетики высвобождения DNP из липосом с концентрацией липидной части, равной 20 мМ, полученные с помощью различных математических моделей.

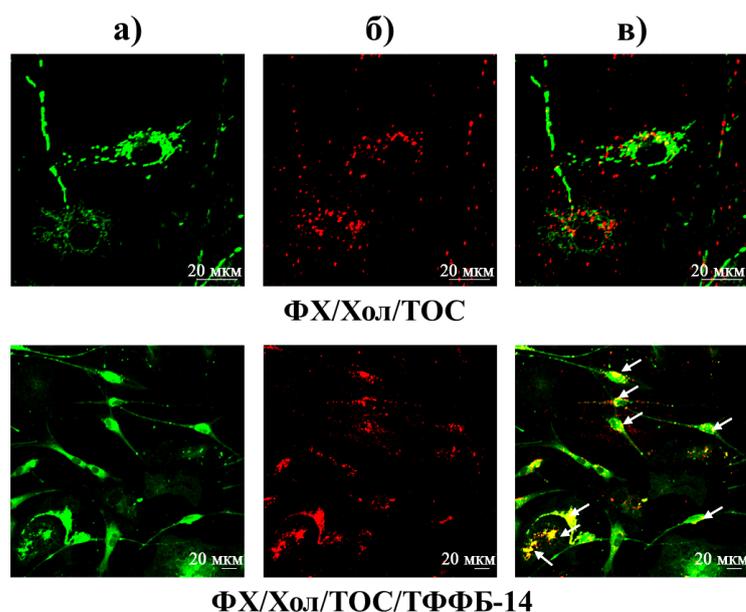
Система	Математические модели						
	Корсмейера-Пеппаса			Хигучи		Первого порядка	
	$n$	$k_{kp}$ , %/мин <sup><math>n</math></sup>	$R^2$	$k_x$ , %/мин <sup>1/2</sup>	$R^2$	$k_1$ , 1/мин	$R^2$
DNP	0.299±0.021	15.89±1.82	0.9680	5.14±0.18	0.8077	0.0099±0.0005	0.9591
ФХ/Хол	0.352±0.011	10.21±0.62	0.9926	4.43±0.10	0.9198	0.0060±0.0004	0.8953
ФХ/Хол/ТФФБ-14	0.364±0.011	9.78±0.63	0.9923	4.56±0.10	0.9342	0.0064±0.0003	0.9291
ФХ/Хол/ТОС	0.381±0.008	8.38±0.40	0.9961	4.30±0.08	0.9542	0.0055±0.0003	0.9120
ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14	0.396±0.007	7.27±0.30	0.9972	4.05±0.06	0.9665	0.0047±0.0003	0.8967

Таким образом, с помощью метода нековалентной модификации были получены липосомы на основе ФХ/Хол/ТФФБ-14, загруженные антиоксидантом  $\alpha$ -токоферол, при различном содержании липидов. Проведен сравнительный анализ размера наночастиц с помощью методов ПЭМ и ДРС, что подтвердило образование сферических агрегатов с диаметром  $\approx 100$  нм. В модифицированные липидные наноносители были загружены два субстрата, а именно  $\alpha$ -токоферол и донепезила гидрохлорид. Показано, что катионные липосомы обладают высокой эффективностью инкапсулирования по отношению к обоим субстратам. На основе модели Корсмейера-Пеппаса было подтверждено, что высвобождение DNP осуществляется по механизму диффузии согласно первому закону Фика.

#### 3.4.2.2. Определение способности липосом колокализоваться с митохондриями и замедлять развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей

Перед переходом к экспериментам *in vivo* митотропная активность липосом была определена на культуре клеток мотонейронов крыс *in vitro*. Как видно на рисунке 3.34,

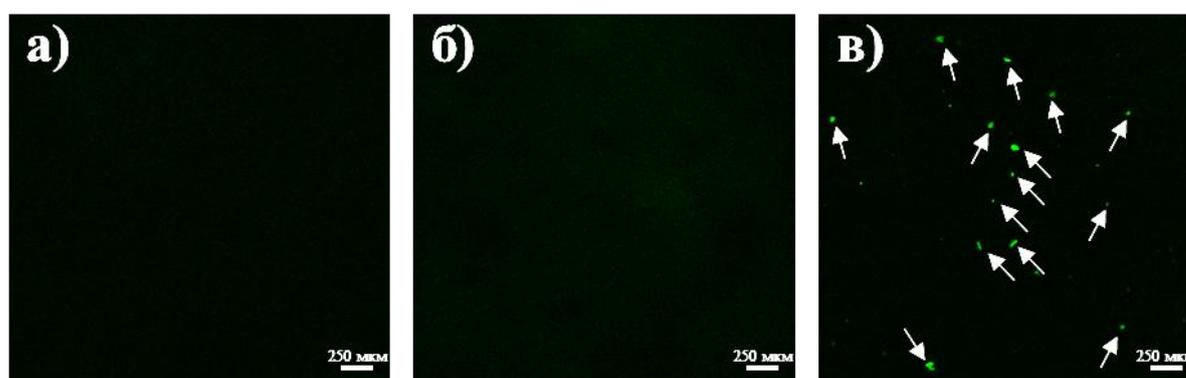
модифицированные липосомы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14 проникают в митохондрии нейрональных клеток лучше, чем немодифицированные, о чем свидетельствует желтая флуоресценция (рис. 3.34в). Рассчитанные значения коэффициента Пирсона составляют  $0.29 \pm 0.01$  и  $0.46 \pm 0.01$  для немодифицированных и модифицированных липосом соответственно, что подтверждает способность ТФФБ-14 улучшать проникающую способность липосом в митохондрии нейрональных клеток.



**Рисунок 3.34.** Анализ колокализации липосом ФХ/Хол/ТОС и ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14 (20 мМ) с митохондриями мотонейронов крыс: а) флуоресценция красителя MitoTracker Green FM (митохондрии); б) флуоресценция DOPE-RhB (липосомы); в) объединенное желтое изображение указывает на колокализацию двух зондов.

Протестирована способность катионных липосом проникать в мозг при интраназальном введении. В качестве визуализирующего агента был выбран RhB, который был инкапсулирован в липосомы методом пассивной загрузки. Свободный и липосомальный RhB был введен крысам интраназально при концентрации 0.5 мг/кг. Показано, что интраназальное введение катионных липосом приводит к их эффективному проникновению в головной мозг крыс (рис. 3.35в) по сравнению со свободной формой зонда (рис. 3.35б). 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

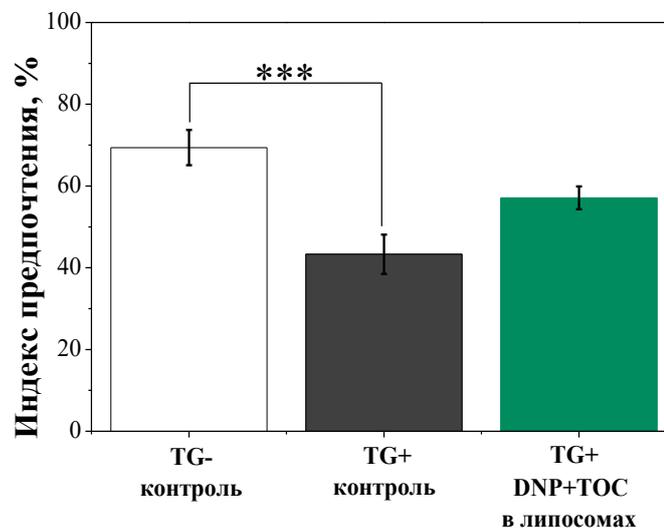
положительному дзета-потенциалу. Размер наночастиц также важен для интраназальной доставки лекарств. В работе [273] экспериментально показано, что наночастицы диаметром  $< 200$  нм более длительное время удерживаются на слизистой оболочке носовой полости крыс, что позволяет повысить эффективность доставки лекарств в мозг.



**Рисунок 3.35.** Срезы головного мозга крыс: а) контроль; б) после введения свободного RhB; в) после интраназального введения RhB, загруженного в липосомы ФХ/Хол/ТФФБ-14 (15 мМ).

В настоящее время большое количество исследовательских групп работает над проблемой повышения эффективности DNP при лечении болезни Альцгеймера. Интраназальный путь введения представляется привлекательным выбором для многих исследователей, которые продемонстрировали эффективность липосом, твердых липидных наночастиц и наноэмульсий, загруженных DNP, по сравнению со свободной формой лекарственного вещества [274–276]. Стоит отметить, что хотя в литературе имеются данные, подтверждающие эффективность интраназального введения DNP, включенного в наночастицы, *in vivo* экспериментов на животных с моделью болезни Альцгеймера крайне мало. Поэтому липосомы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14/DNP (20 мМ), загруженные как ингибитором холинэстеразы DNP, так и антиоксидантом ТОС, были протестированы в качестве системы доставки лекарств для лечения мышей с моделью болезни Альцгеймера. Поскольку целью эксперимента было замедление прогрессирования заболевания, терапию начинали на ранней стадии, когда выявляются только первые признаки патологических изменений, что соответствует возрасту мышей 6 месяцев. Известно, что свободный DNP плохо проникает в мозг при интраназальном

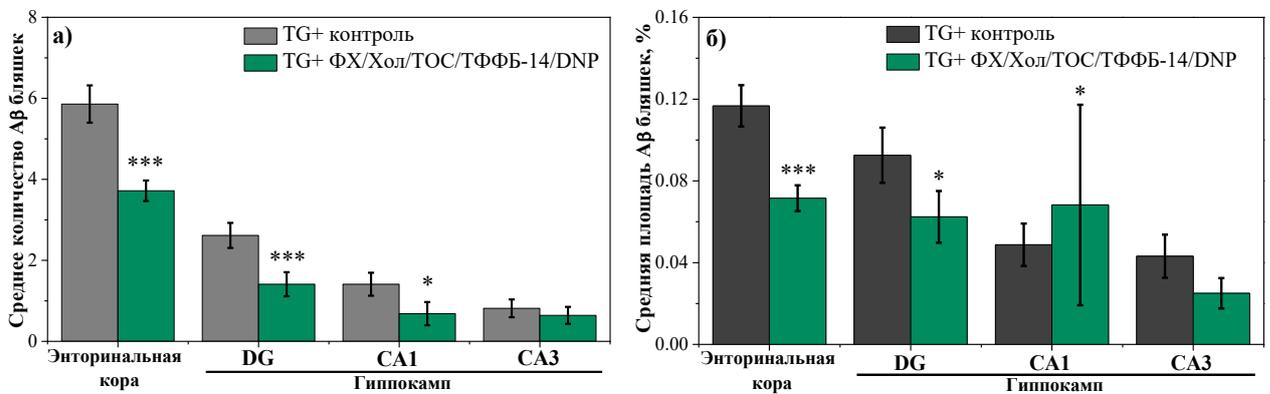
введении. Поэтому на данном этапе была оценена эффективность только катионных липосом. Эксперимент был проведен в два этапа. Первый этап был посвящен поведенческому тесту, позволяющему оценить нарушение памяти (тест «распознавание нового объекта»), который широко используется для выявления нарушений памяти вследствие травм головы, старения или нейродегенеративных заболеваний [198]. За 18 дней до теста и во время теста (за 20 мин до его начала) мышам интраназально вводили липосомальную форму лекарств. Было показано, что в контрольной группе дикого типа (TG-) мыши предпочитали новый объект знакомому с вероятностью  $69.4 \pm 4.3\%$  (рис. 3.36). 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. 3.36). Важно отметить, что при интраназальном введении липосом, загруженных DNP и ТОС, в течение 21 дня побочных эффектов у мышей выявлено не было.



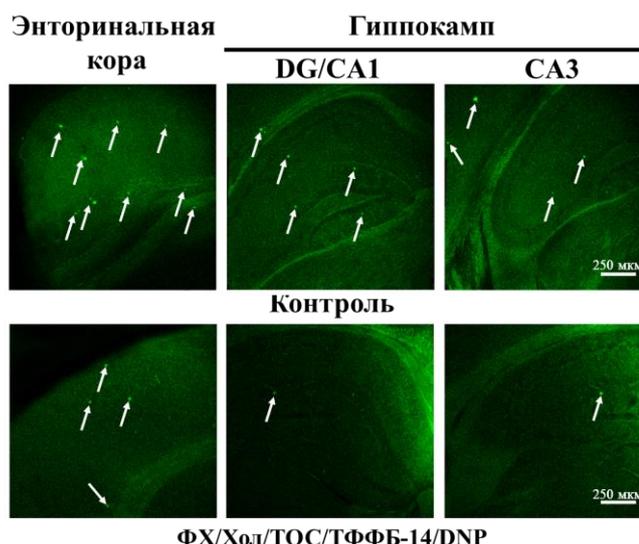
**Рисунок 3.36.** Индекс предпочтения в контрольной группе мышей дикого типа (TG-), в контрольной группе трансгенных мышей (TG+) и в группе трансгенных мышей (TG+), которым интраназально вводили липосомы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14/DNP.

Накопление бета-амилоидных ( $A\beta$ ) бляшек в головном мозге является одним из основных патологических проявлений болезни Альцгеймера, связанное с гибелью нейронов в головном мозге. Поэтому второй этап эксперимента был посвящен

количественной оценке образования Аβ бляшек в головном мозге трансгенных мышей. Анализ был проведен в областях энторинальной коры и гиппокампа (зубчатая извилина (DG), CA1 и CA3), так как именно эти области мозга отвечают за формирование и нарушение памяти. Было показано, что интраназальное введение липосом ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14/DNP в течение 21 дня значительно снижает среднее количество и средний процент площади Аβ бляшек в гиппокампе и энторинальной коре головного мозга трансгенных мышей TG+ (рис. 3.37). Таким образом, при интраназальном введении катионных липосом с двойной загрузкой субстратов среднее количество Аβ бляшек в энторинальной коре было снижено с  $5.86 \pm 0.46$  до  $3.72 \pm 0.25$  ( $p = 0.00013$ ), в зубчатой извилине гиппокампа (DG) – с  $2.61 \pm 0.31$  до  $1.41 \pm 0.30$  ( $p = 0.0008$ ), в области CA1 – с  $1.41 \pm 0.28$  до  $0.68 \pm 0.29$  ( $p = 0.012$ ) (рис. 3.37а). 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. 3.37б). Микрофотографии Аβ бляшек в срезах головного мозга трансгенных мышей в областях энторинальной коры и гиппокампа приведены на рисунке 3.38.



**Рисунок 3.37.** 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.



**Рисунок 3.38.** Визуализация А $\beta$  бляшек в энторинальной коре и гиппокампе головного мозга в контрольной группе трансгенных (TG+) мышей и в группе трансгенных (TG+) мышей, которым интраназально вводили липосомы ФХ/Хол/ТОС/ТФФБ-14/DNP.

Таким образом, комплексом биологических методов была определена функциональная активность липосом, модифицированных ТФФБ-14. Катионные липосомы показали высокую степень колокализации с митохондриями нейрональных клеток по сравнению с немодифицированными. Фотографии срезов мозга крыс подтверждают проникновение модифицированных флуоресцентно-меченных наночастиц в мозг *in vivo*. Кроме того, интраназальное введение катионных липосом с двойной загрузкой лекарственных препаратов позволило купировать нарушение памяти и повлиять на развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей за счет замедления скорости образования А $\beta$  бляшек.

### **3.5. Нековалентная модификация липосом дикатионными карбаматсодержащими ПАВ для интраназальной терапии трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера**

Помимо катионизации наноконтейнеров молекулами ПАВ, перспективным направлением является синтез ПАВ с фармакофорными группами, которые будут способствовать не только нацеливанию наноконтейнеров на желаемые мишени, но также могут сработать как биологически активные соединения и проявить терапевтический эффект. Синтезированная в рамках выполнения диссертационной работы новая

гомологическая серия дикатионных карбаматсодержащих ПАВ является особенно перспективной в контексте модификации липосомальных наноконтейнеров, поскольку они характеризуются более низкими значениями ККМ и высоким положительным зарядом, что позволяет использовать их при минимальных концентрациях, уменьшая тем самым потенциальную токсичность систем и достигая при этом высокой степени катионизации. Предполагается, что карбаматные фрагменты геминальных ПАВ смогут увеличить эффективность терапии болезни Альцгеймера, поскольку одним из известных одобренных лекарственных веществ является ривастигмин – лекарство карбаматного типа [94]. Поэтому в рамках заключительного направления диссертации были получены и оптимизированы по составу липосомы, модифицированные геминальными карбаматсодержащими ПАВ (n-12-n(Et)), с двойной загрузкой антиоксиданта  $\alpha$ -токоферол и ингибитора ацетилхолинэстеразы донепезила гидрохлорид для терапии болезни Альцгеймера [166].

### **3.5.1. Получение и оптимизация состава липосом. Загрузка $\alpha$ -токоферола и донепезила гидрохлорида**

Липосомальная композиция на основе ФХ и Хол с общей концентрацией, равной 15 мМ, была оптимизирована путем подбора наиболее подходящего представителя гомологического ряда геминальных ПАВ и его концентрации. Как видно из данных, представленных в таблице 3.26, все системы обладали значениями PdI, не превышающими 0.1. Однако при хранении полидисперсность и размер систем увеличиваются, достигая максимума для липосом, модифицированных 12-12-12(Et). Для липосом, модифицированных децил- и тетрадецильными гомологами, гидродинамический диаметр и PdI были в пределах 120–130 нм и 0.1–0.15 соответственно, что указывает на высокую коллоидную стабильность липосом в течение 5 месяцев хранения. Увеличение мольной доли ПАВ в бислое приводит к увеличению дзета-потенциала липосом, тогда как длина углеводородного радикала ПАВ оказывает незначительное влияние на данный параметр (табл. 3.26). Стоит отметить, что липосомы, модифицированные 12-12-12(Et), обладают самым высоким дзета-потенциалом, но в то же время эти системы демонстрируют меньшую стабильность согласно значениям PdI.

**Таблица 3.26.** Физико-химические характеристики липосом, модифицированных n-12-n(Et), при различном соотношении липид/ПАВ, 25 °С\*.

n-12-n(Et)	Мольное соотношение липид/ПАВ	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ	D <sub>h</sub> , нм	PdI	ζ, мВ
		1 день			5 месяцев		
ФХ/Хол		131±2	0.069±0.027	+1.3±0.4	103±1	0.236±0.010	-36±6
10-12-10(Et)	100/1	121±1	0.049±0.020	+15±1	131±1	0.157±0.017	+8.1±0.3
	50/1	117±1	0.060±0.010	+28±1	121±1	0.105±0.013	+24±1
	35/1	114±1	0.061±0.018	+37±1	118±2	0.079±0.014	+28±2
	25/1	112±1	0.066±0.010	+45±2	120±1	0.097±0.023	+42±2
12-12-12(Et)	100/1	119±1	0.053±0.035	+17.5±0.3	199±4	0.393±0.012	+20.6±0.6
	50/1	118±1	0.072±0.016	+30±2	185±3	0.402±0.050	+33±1
	35/1	119±1	0.079±0.016	+40.6±0.6	157±1	0.328±0.017	+46±1
	25/1	117±1	0.081±0.024	+49±2	149±2	0.304±0.041	+49.8±0.1
14-12-14(Et)	100/1	113±1	0.055±0.015	+14.5±0.7	134±1	0.101±0.005	+14.7±0.2
	50/1	113±1	0.050±0.023	+26.4±0.4	127±2	0.112±0.004	+21±3
	35/1	113±1	0.062±0.014	+33±1	125±2	0.102±0.024	+32±3
	25/1	108±1	0.045±0.012	43±3	122±2	0.139±0.004	30±1

\*Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n = 5). Концентрация ФХ/Хол составляет 15 мМ.

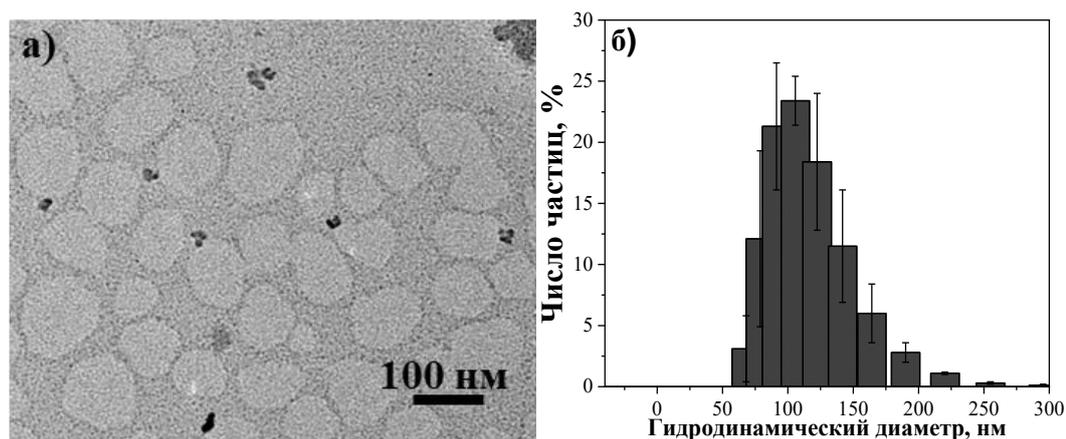
На следующем этапе в липосомы, модифицированные n-12-n(Et) с соотношением липид/ПАВ 35/1, были загружены α-токоферолом и донепезила гидрохлоридом. В случае с ТОС эффективность инкапсулирования для всех систем составила более 90%. Также стоит отметить, что инкапсулирование ТОС способствует увеличению гидродинамического диаметра липосом. Подобный эффект наблюдался только в случае загрузки гидрофобного субстрата ТОС, что также было показано для некоторых систем, модифицированных фосфониевыми ПАВ (рис. 3.24), тогда как при загрузке гидрофильного субстрата DNP размер липосом оставался неизменным. Инкапсулирование субстратов в липосомы оказывает минимальное влияние на их дзета-потенциал.

**Таблица 3.27.** Физико-химические характеристики липосом ФХ/Хол/n-12-n(Et) (35/1), загруженных ТОС и DNP, 25 °С\*.

n-12-n(Et)	EE, %	D <sub>h</sub> , 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

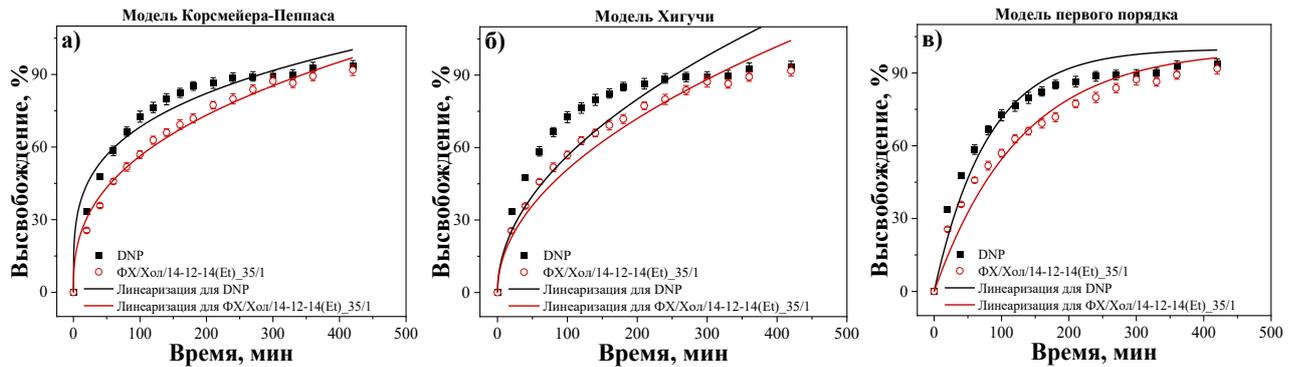
\*Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n = 5).

На примере системы ФХ/Хол/ТОС/14-12-14(Et) липосомы были визуализированы с помощью ПЭМ (рис. 3.39а). На микрофотографиях наблюдаются агрегаты диаметром 100 нм. Следует отметить, что система обладает небольшой полидисперсностью, что также было показано методом ДРС (рис. 3.39б). Из представленной диаграммы видно, что в растворе присутствуют агрегаты размером от 70 до 160 нм с преобладанием липосом с гидродинамическим диаметром около 100 нм.



**Рисунок 3.39.** а) ПЭМ-изображение и б) распределение гидродинамического диаметра, усредненного по числу частиц (ДРС), для липосом ФХ/Хол/ТОС/14-12-14(Et) (15 мМ, 35/1), 25 °С.

Мониторинг скорости высвобождения DNP из липосом *in vitro* был проведен на примере системы ФХ/Хол/14-12-14(Et) (общая концентрация липидов – 15 мМ, соотношение липид/ПАВ – 35/1). В качестве системы сравнения была выбрана свободная форма DNP. Как показано на рисунке 3.40, для формулированного DNP характерно более пролонгированное высвобождение на начальном участке по сравнению с его свободной формой. Экспериментально полученные кривые высвобождения DNP были обработаны с помощью трех математических моделей, а именно Корсмейера-Пеппаса, Хигучи и первого порядка. Модель Корсмейера-Пеппаса лучше описывает кривые высвобождения свободного и липосомального DNP.



**Рисунок 3.40.** Кривые высвобождения DNP из липосом ФХ/Хол/14-12-14(Et), аппроксимированные с помощью математических моделей а) Корсмейера-Пеппаса, б) Хигучи и в) первого порядка. Концентрация липидов составляет 15 мМ, PBS (0.025 М), pH = 7.4, 37 °С.

Показано, что механизм высвобождения DNP подчиняется первому закону Фика, поскольку значения  $n$  ниже 0.45. Согласно рассчитанным константам скорости в рамках каждой модели, включение DNP в липосомы снижает скорость его высвобождения, как упоминается выше.

**Таблица 3.28.** Параметры кинетики высвобождения DNP из липосом (15 мМ), полученные с помощью различных математических моделей.

Система	Математические модели						
	Корсмейера-Пеппаса			Хигучи		Первого порядка	
	$n$	$k_{kp}, \%$ $\text{мин}^{-n}$	$R^2$	$k_h, \%$ $\text{мин}^{1/2}$	$R^2$	$k_1, \%$ $\text{мин}^{-1}$	$R^2$
DNP	0.268±0.023	19.88±2.48	0.9636	5.66±0.22	0.7540	0.0125±0.0008	0.9372
ФХ/Хол/14-12-14(Et) 35/1	0.379±0.016	9.82±0.84	0.9892	5.09±0.10	0.9495	0.0078±0.0004	0.9544

Таким образом, в липосомы, модифицированные дикатионными карбаматсодержащими ПАВ, были успешно загружены субстраты как гидрофильной, так и гидрофобной природы. Для исследуемых субстратов были получены высокие значения эффективности инкапсулирования с максимумом при концентрации ФХ/Хол 15 мМ. Методом диализа *in vitro* было показано, что DNP высвобождается из липосом посредством диффузии, подчиняющейся первому закону Фика, что было определено с использованием математической модели Корсмейера-Пеппаса.

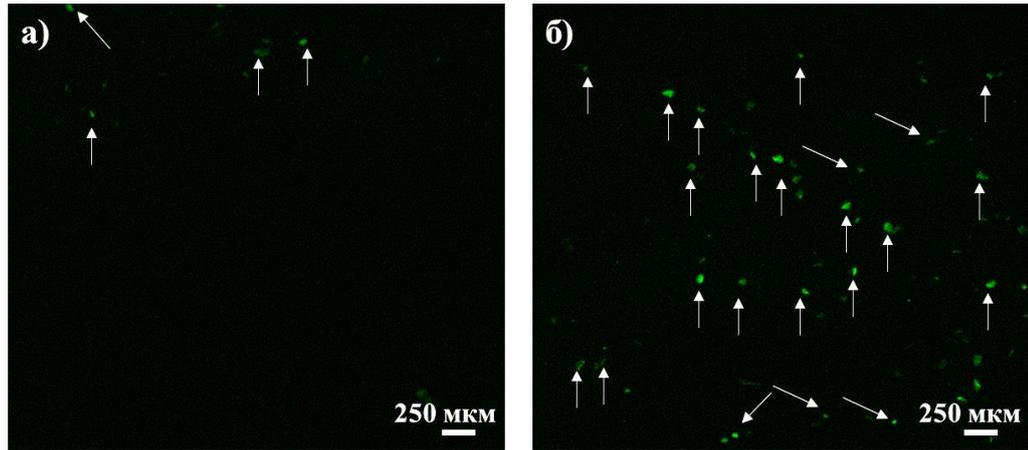
### 3.5.2. Определение способности модифицированных липосом замедлять развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей

Поскольку исследуемые ПАВ содержат в своей структуре карбаматные фрагменты, на следующем этапе были определены концентрационные пороги, при которых происходит ингибирование активности ферментов ацетилхолинэстераза (АХЭ) и бутирилхолинэстераза (БуХЭ) *in vitro*. Предполагается, что совместное действие карбаматсодержащих ПАВ и DNP будет способствовать замедлению прогрессирования болезни Альцгеймера. Как видно из данных, представленных в таблице 3.29, все представители гомологического ряда проявляют ингибирующую активность в наномолярном диапазоне как по отношению к АХЭ, так и к БуХЭ. Наилучшую ингибирующую активность по отношению к АХЭ продемонстрировал 14-12-14(Et) со значением  $IC_{50}$ , равным  $11.0 \pm 0.5$  нМ, что почти в 4 и 7 раз ниже по сравнению со значениями для 10-12-10(Et) ( $43.1 \pm 0.9$  нМ) и 12-12-12(Et) ( $82.1 \pm 13$  нМ). Кроме того, для 14-12-14(Et) была показана значительная селективность по отношению к АХЭ ( $SI = 131$ ), тогда как в случае 10-12-10(Et) ( $SI = 0.44$ ) и 12-12-12(Et) ( $SI = 0.74$ ) высокой степени селективности выявлено не было, что позволяет предположить, что длина алкильного радикала ПАВ играет ключевую роль в ингибировании ферментов [277].

**Таблица 3.29.** Концентрации геминальных карбаматсодержащих ПАВ, ингибирующие активность ферментов ацетилхолинэстераза и бутирилхолинэстераза *in vitro*.

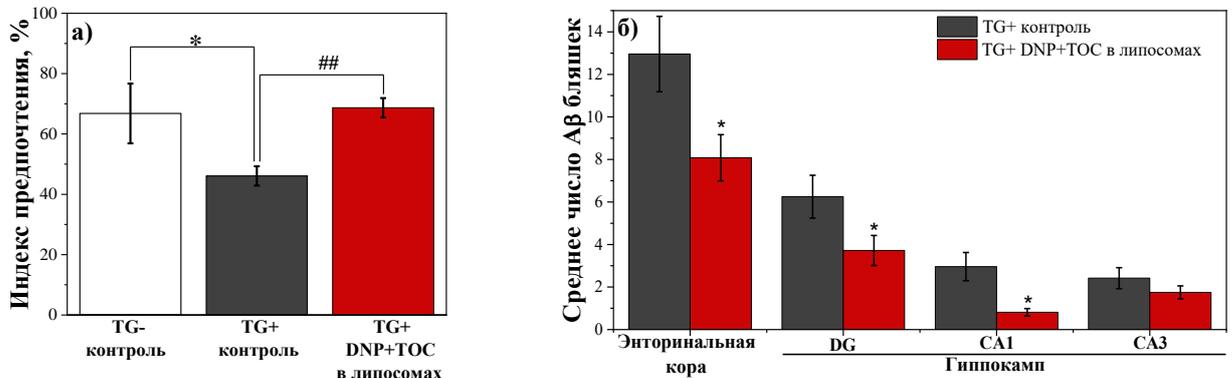
n-12-n(Et)	$IC_{50}$ (АХЭ), нМ	$IC_{50}$ (БуХЭ), нМ	$SI_{БуХЭ/АХЭ}$
10-12-10(Et)	$43.1 \pm 0.9$	$19 \pm 5$	0.44
12-12-12(Et)	$82 \pm 13$	$61 \pm 2$	0.74
14-12-14(Et)	$11.0 \pm 0.5$	$1440 \pm 520$	131

На следующем этапе была оценена способность липосом ФХ/Хол/ТОС/14-12-14(Et), меченых RhB, достигать головного мозга крыс при интраназальном введении. Изображения срезов головного мозга демонстрируют, что интенсивность флуоресценции липосомальной формы RhB значительно выше (рис. 3.41б) по сравнению со свободной формой зонда (рис. 3.41а). Как и в случае с липосомами с ТФФБ-14, полученный результат можно объяснить с точки зрения высокого положительного дзета-потенциала липосом.



**Рисунок 3.41.** Срезы головного мозга крыс: а) после введения свободного RhB; б) после интраназального введения RhB, загруженного в липосомы ФХ/Хол/ТОС/14-12-14(Et).

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. Для подтверждения восстановления когнитивных функций у трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера был проведен поведенческий тест «распознавание нового объекта» (рис. 3.42).



**Рисунок 3.42.** 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.

Согласно полученным результатам, введение липосом приводило к повышению индекса предпочтения трансгенных мышей примерно на 22.6% по сравнению с группой,

не получавшей лечения (рис. 3.42а). Более того, индекс предпочтения мышей, которым вводили липосомальную форму лекарственных веществ ( $68.7 \pm 4.98\%$ ), достиг уровня значений для 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. 3.36) 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 А $\beta$  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 А $\beta$  бляшек на 37.6%, 40.5% и 72.6% в областях энторинальной коры, зубчатой извилины и СА1 гиппокампа соответственно по сравнению с контрольной группой мышей с моделью болезни Альцгеймера, не получавшей лечения (рис. 3.42б).

Таким образом, по представленным результатам можно сделать следующие выводы: (1) дикатионные карбаматсодержащие ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом были успешно включены в липидный бислой липосом ФХ/Хол, тем самым увеличивая дзета-потенциал липосом и повышая их стабильность при хранении до 5 месяцев; (2) среди исследованных ПАВ наиболее оптимальным для модификации липосом является 14-12-14(Et); (3) наиболее благоприятные физико-химические характеристики липосом достигнуты при концентрации ФХ/Хол 15 мМ и соотношении липид/ПАВ 35/1, что позволило инкапсулировать более 90%  $\alpha$ -токоферола и донепезил гидрохлорида; (4) с использованием системы-лидера, а именно ФХ/Хол/ТОС/14-12-14(Et), было показано, что высвобождение DNP из липосом происходит посредством диффузии, подчиняющейся первому закону Фика. Кроме того, было установлено, что модифицированные липосомы успешно проникают в мозг лабораторных животных, приводя к улучшению когнитивных функций и уменьшению количества А $\beta$  бляшек в энторинальной коре и гиппокампе трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера.

## 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 солубилизационной активности по отношению к модельному зонду Оранж ОТ и нестероидному противовоспалительному препарату индометацину.

2. Установлены закономерности самоорганизации новой гомологической серии дикатионных карбаматсодержащих геминальных ПАВ с додекановым спейсерным фрагментом. Показано, что увеличение длины гидрофобного радикала приводит к снижению значений критической концентрации мицеллообразования и увеличению солубилизационной 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 Carbopol®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 доксорубин гидрохлорида и блокатора окислительного фосфорилирования ротенона. Для катионных липосом продемонстрирована улучшенная способность проникать в опухолевые клетки и колокализироваться 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  $\alpha$ -токоферола и ингибитора холинэстеразы донепезила гидрохлорида. Показано, что интраназальное введение катионных липосом приводит к восстановлению когнитивных функций мышей 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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gu N. Introduction to Nanomedicine / N. Gu, J. Sheng // *Nanomedicine*. – Springer Nature, 2023. – P. 3-16. ISBN 9789811689833.
2. Thapa R.K. Nanomedicine-Based Commercial Formulations: Current Developments and Future Prospects / R.K. Thapa, J.O. Kim // *J. Pharm. Investig.* – 2023. – V. 53. – P. 19-33. doi:10.1007/s40005-022-00607-6.
3. Liu P. Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives / P. Liu, G. Chen, J. Zhang // *Molecules*. – 2022. – V. 27. – P. 1372. doi:10.3390/molecules27041372.
4. 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. – V. 26. – № 22. – P. 6786. doi:10.3390/molecules26226786.
5. Yin Y. Common Methods in Mitochondrial Research (Review) / Y. Yin, H. Shen // *Int. J. Mol. Med.* – 2022. – V. 50. – № 4. – P. 1-29. doi:10.3892/ijmm.2022.5182.
6. Zielonka J. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications / J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, M. Hardy, O. Ouari, J. Vasquez-Vivar, G. Cheng, M. Lopez, B. Kalyanaraman // *Chem. Rev.* – 2017. – V. 117. – № 15. – P. 10043-10120. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00042.
7. Lamch Ł. Multiheaded Cationic Surfactants with Dedicated Functionalities: Design, Synthetic Strategies, Self-Assembly and Performance / Ł. Lamch, W. Szczęsna, S.J. Balicki, M. Bartman, L. Szyk-Warszyńska, P. Warszyński, K.A. Wilk // *Molecules*. – 2023. – V. 28. – P. 5806. doi:10.3390/molecules28155806.
8. Tanaka M. Higher-Order Mesoscopic Self-Assembly of Fluorinated Surfactants on Water Surfaces / M. Tanaka, M.P. Krafft, A. Pasc // *NPG Asia Mater.* – 2023. – V. 15. – № 23. – P. 1-14. doi:10.1038/s41427-023-00466-z.
9. Ghosh S. Self-Assembly of Surfactants: An Overview on General Aspects of Amphiphiles / S. Ghosh, A. Ray, N. Pramanik // *Biophys. Chem.* – 2020. – V. 265. – P. 106429. doi:10.1016/j.bpc.2020.106429.
10. Zakharova L.Y. Self-Assembled Quaternary Ammonium Surfactants for Pharmaceuticals and Biotechnology / L.Y. Zakharova, T.N. Pashirova, A.R. Fernandes, S.

Doktorovova, C. Martins-Gomes, A.M. Silva, E.B. Souto // *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery*. – Elsevier, 2018. – P. 601–618. ISBN 978-0-12-813663-8.

11. Wang N. Liposomes Used as a Vaccine Adjuvant-Delivery System: From Basics to Clinical Immunization / N. Wang, M. Chen, T. Wang // *J. Control. Release*. – 2019. – V. 303. – P. 130–150. doi:10.1016/j.jconrel.2019.04.025.

12. Dave N. A Concise Review on Surfactants and Its Significance / N. Dave, T. Joshi // *Int. J. Appl. Chem.* – 2017. – V. 13. – P. 663–672. doi:10.37622/IJAC/13.3.2017.663-672.

13. Kashapov R. Self-Assembly of Amphiphilic Compounds as a Versatile Tool for Construction of Nanoscale Drug Carriers / R. Kashapov, G. Gaynanova, D. Gabdrakhmanov, D. Kuznetsov, R. Pavlov, K. Petrov, L. Zakharova, O. Sinyashin // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 6961. doi:10.3390/ijms21186961.

14. Antipin I.S. Functional Supramolecular Systems: Design and Applications / I.S. Antipin, M.V. Alfimov, V.V. Arslanov, V.A. Burilov, S.Z. Vatsadze, Y.Z. Voloshin, K.P. Volcho, V.V. Gorbachuk, Y.G. Gorbunova, S.P. Gromov, S.V. Dudkin, S.Yu. Zaitsev, L.Ya. Zakharova, M.A. Ziganshin, A.V. Zolotukhina, M.A. Kalinina, E.A. Karakhanov, R.R. Kashapov, O.I. Koifman, A.I. Konovalov, V.S. Korenev, A.L. Maksimov, N.Zh. Mamardashvili, G.M. Mamardashvili, A.G. Martynov, A.R. Mustafina, R.I. Nugmanov, A.S. Ovsyannikov, P.L. Padnya, A.S. Potapov, S.L. Selektor, M.N. Sokolov, S.E. Solovieva, I.I. Stoikov, P.A. Stuzhin, E.V. Suslov, E.N. Ushakov, V.P. Fedin, S.V. Fedorenko, O.A. Fedorova, Y.V. Fedorov, S.N. Chvalun, A.Yu. Tsivadze, S.N. Shtykov, D.N. Shurpik, M.A. Shcherbina, L.S. Yakimova // *Russ. Chem. Rev.* – 2021. – V. 90. – P. 895-1107. doi:10.1070/RCR5011.

15. Gonçalves R.A. Cationic Surfactants: A Review / R.A. Gonçalves, K. Holmberg, B. Lindman // *J. Mol. Liq.* – 2023. – V. 375. – P. 121335. doi:10.1016/j.molliq.2023.121335.

16. Lam H.T. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems and Cationic Surfactants: Do They Potentiate Each Other in Cytotoxicity? / H.T. Lam, B. Le-Vinh, T.N.Q. Phan, A. Bernkop-Schnürch // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2019. – V. 71. – P. 156-166. doi:10.1111/jphp.13021.

17. Wang Z. Anionic-Nonionic and Nonionic Mixed Surfactant Systems for Oil Displacement: Impact of Ethoxylate Chain Lengths on the Synergistic Effect / Z. Wang, C. Dai, J. Liu, Y. Dong, J. Liu, N. Sun, L. Li // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2023. – V. 678. – P. 132436. doi:10.1016/j.colsurfa.2023.132436.

18. Belarbi H. Interfacial and Micellar Synergistic Interactions between a Phosphonium Surface Active Ionic Liquid and TX-100 Nonionic Surfactant: Surface Tension

and <sup>1</sup>H NMR Investigations / H. Belarbi, F. Bouanani // *J. Mol. Liq.* – 2023. – V. 383. – P. 122060. doi:10.1016/j.molliq.2023.122060.

19. Gabdrakhmanov D. Novel Dicationic Pyrimidinic Surfactant: Self-Assembly and DNA Complexation / D. Gabdrakhmanov, D. Samarkina, V. Semenov, V. Syakaev, R. Giniyatullin, N. Gogoleva, V. Reznik, S. Latypov, A. Konovalov, A. Pokrovsky, Y. Zuev, L. Zakharova // *Colloids Surf. A.: Physicochem. Eng. Asp.* – 2015. – V. 480. – P. 113–121. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.10.036.

20. Trendeleva T.A. Role of Charge Screening and Delocalization for Lipophilic Cation Permeability of Model and Mitochondrial Membranes / T.A. Trendeleva, E.I. Sukhanova, A.G. Rogov, R.A. Zvyagilskaya, I.I. Seveina, T.M. Ilyasova, D.A. Cherepanov, V.P. Skulachev // *Mitochondrion.* – 2013. – V. 13. – P. 500-506. doi:10.1016/j.mito.2012.10.006.

21. Gainanova G.A. Self-Assembling Systems Based on Amphiphilic Alkyltriphenylphosphonium Bromides: Elucidation of the Role of Head Group / G.A. Gainanova, G.I. Vagapova, V.V. Syakaev, A.R. Ibragimova, F.G. Valeeva, E.V. Tudriy, I.V. Galkina, O.N. Kataeva, L.Ya. Zakharova, S.K. Latypov, A.I. Konovalov // *J. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 367. – P. 327-336. doi:10.1016/j.jcis.2011.10.074.

22. Nagtode V.S. Green Surfactants (Biosurfactants): A Petroleum-Free Substitute for Sustainability—Comparison, Applications, Market, and Future Prospects / V.S. Nagtode, C. Cardoza, H.K.A. Yasin, S.N. Mali, S.M. Tambe, P. Roy, K. Singh, A. Goel, P.D. Amin, B.R. Thorat, N.C. Jorddy, P.P. Amit // *ACS Omega.* – 2023. – V. 8. – P. 11674-11699. doi:10.1021/acsomega.3c00591.

23. Bhadani A. Current Perspective of Sustainable Surfactants Based on Renewable Building Blocks / A. Bhadani, A. Kafle, T. Ogura, M. Akamatsu, K. Sakai, H. Sakai, M. Abe // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2020. – V. 45. – P. 124-135. doi:10.1016/j.cocis.2020.01.002.

24. Wang M. Design and Properties of Natural Rosin-Based Phosphoester Functional Surfactants / M. Wang, X. Yang, B. Han, S. Zhang, C. Han, C. Xia // *Molecules.* – 2023. – V. 28. – P. 3091. doi:10.3390/molecules28073091.

25. Farias C.B.B. Production of Green Surfactants: Market Prospects / C.B.B Farias, F.C.G. Almeida, I.A. Silva, T.C. Souza, H.M. Meira, R.D.C.F. Soares Da Silva, J.M. Luna, V.A.

Santos, A. Converti, I.M. Banat, L.A. Sarubbo // *Electron. J. Biotechnol.* – 2021. – V. 51. – P. 28-39. doi:10.1016/j.ejbt.2021.02.002.

26. Sharma V. Synthesis, Thermal Stability and Surface Activity of Imidazolium Monomeric Surfactants / V. Sharma, C. Bhatia, M. Singh, C. Singh, S.K. Upadhyaya, K. Kishore // *J. Mol. Liq.* – 2020. – V. 308. – P. 113006. doi:10.1016/j.molliq.2020.113006.

27. Esmaeilian N. Synthesis of an Ionic Sugar-Amino Acid Based Surfactant in Aqueous Media / N. Esmaeilian, B. Dabir, R.M.A. Malek, M. Arami, F.M. Mazaheri // *J. Mol. Liq.* – 2020. – V. 318. – P. 114269. doi:10.1016/j.molliq.2020.114269.

28. Muhammad M.T. Eco-Friendly, Biodegradable Natural Surfactant (Acacia Concinna): An Alternative to the Synthetic Surfactants / M.T. Muhammad, M.N. Khan // *J. Clean. Prod.* – 2018. – V. 188. – P. 678-685. doi:10.1016/j.jclepro.2018.04.016.

29. Gawali I.T. Synthesis, Surface Active Properties and Applications of Cationic Gemini Surfactants from Triethylenetetramine / I.T. Gawali, G.A. Usmani // *J. Dispers. Sci. Technol.* – 2020. – V. 41. – P. 450-460. doi:10.1080/01932691.2019.1584112.

30. Garcia M.T. Biodegradability and Aquatic Toxicity of New Cleavable Betainate Cationic Oligomeric Surfactants / M.T. Garcia, I. Ribosa, I. Kowalczyk, M. Pakiet, B. Brycki // *J. Hazard. Mater.* – 2019. – V. 371. – P. 108-114. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.03.005.

31. Ghosh R. Thermodynamically Stable Vesicle Formation of Biodegradable Double mPEG-Tailed Amphiphiles with Sulfonate Head Group / R. Ghosh, J. Dey, B.V.N.P. Kumar // *RSC Adv.* – 2020. – V. 10. – P. 32522–32531. doi:10.1039/D0RA05613H.

32. Lundberg D. Studies on Dodecyl Betainate in Combination with Its Degradation Products or with Phosphatidyl Choline– Phase Behavior and Hemolytic Activity / D. Lundberg, H. Ljusberg-Wahren, A. Norlin, K. Holmberg // *J. Colloid Interface Sci.* – 2004. – V. 278. – P. 478–487. doi:10.1016/j.jcis.2004.06.031.

33. Ahmady A.R. Cationic Gemini Surfactant Properties, Its Potential as a Promising Bioapplication Candidate, and Strategies for Improving Its Biocompatibility: A Review / A.R. Ahmady, P. Hosseinzadeh, A. Solouk, S. Akbari, A.M. Szulc, B.E. Brycki // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2022. – V. 299. – P. 102581. doi:10.1016/j.cis.2021.102581.

34. Thomas R.K. The Adsorption and Self-Assembly of Surfactant Mixtures: How the Detailed Evaluation of Adsorption Properties Provides Access to the Bulk Behaviour / R.K. Thomas, J. Penfold // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2023. – V. 319. – P. 102984. doi:10.1016/j.cis.2023.102984.

35. Noor S. Comparative Solubilization of Reactive Dyes in Single and Mixed Surfactants / S. Noor, M.B Taj, M. Senthilkumar, I. Naz // *J. Dispers. Sci. Technol.* – 2022. – V. 43. – P. 2058-2068. doi:10.1080/01932691.2021.1956528.
36. Han W. Effect of Nonionic and Anionic Surfactant on Ecotoxicity and Micellization Behaviors of Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide (DTAB) / W. Han, W. Long, L. Peng, W. Zhang, B. Shi // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* – 2023. – V. 671. – P. 131588. doi:10.1016/j.colsurfa.2023.131588.
37. Rehman A. Application of Cationic-Nonionic Surfactant Based Nanostructured Dye Carriers: Mixed Micellar Solubilization / A. Rehman, M.U. Nisa, M. Usman, Z. Ahmad, T.H. Bokhari, H.M.A.U. Rahman, A. Rasheed, L. Kiran // *J. Mol. Liq.* – 2021. – V. 326. – P. 115345. doi:10.1016/j.molliq.2021.115345.
38. Shinoda K. The Critical Micelle Concentration of Soap Mixtures (Two-Component Mixture) / K. Shinoda // *J. Phys. Chem.* – 1954. – V. 58. – № 7. – P.541-544. doi:10.1021/j150517a007.
39. Clint J.H. Micellization of Mixed Nonionic Surface Active Agents / J.H. Clint // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* – 1975. – V. 71. – P. 1327. doi:10.1039/f19757101327.
40. Kumar Shah S. Synergistic and Antagonistic Effects in Micellization of Mixed Surfactants / S. Kumar Shah, G. Chakraborty, A. Bhattarai, R. De // *J. Mol. Liq.* – 2022. – V. 368. – P. 120678. doi:10.1016/j.molliq.2022.120678.
41. 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 // *Russ. Chem. Bull.* – 2022. – V. 71. – P. 1897–1906. doi:10.1007/s11172-022-3607-y.
42. Pisárčik M. Self-Aggregation of Cationic Gemini Surfactants with Amide Groups in the Spacer and Variable Alkyl Chain Length / M. Pisárčik, M. Bajcura, M. Lukáč, F. Devínsky, A. Bilková, F. Bilka, B. Horváth // *Colloid Polym. Sci.* – 2023. – V. 301. – P. 1379–1392. doi:10.1007/s00396-023-05154-6.
43. Zhou Y. Synthesis and Properties of Amide-Based Cationic Gemini Surfactants with Semi-Rigid Spacer / Y. Zhou, H. Gao, H. Xu, Y. Li, H. Zhang, Z. Lu // *Tenside, Surfactants, Deter.* – 2023. – V. 60. – P. 497-506. doi:10.1515/tsd-2022-2463.
44. Tehrani-Bagha A.R. Cationic Gemini Surfactants with Cleavable Spacer: Chemical Hydrolysis, Biodegradation, and Toxicity /A.R. Tehrani-Bagha, K. Holmberg, C.G.

Van Ginkel, M. Kean // *J. Colloid Interface Sci.* – 2015. – V. 449. – P. 72-79. doi:10.1016/j.jcis.2014.09.072.

45. Sharma R. Advances in the Synthesis, Molecular Architectures and Potential Applications of Gemini Surfactants / R. Sharma // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2017. – V. 248. – P. 35-68. doi:10.1016/j.cis.2017.07.032.

46. Mirgorodskaya A.B. Self-Assembly of Mixed Systems Based on Nonionic and Carbamate-Bearing Cationic Surfactants as a Tool for Fabrication of Biocompatible Nanocontainers / A.B. Mirgorodskaya, R.A. Kushnazarova, S.S. Lukashenko, L.Y. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2019. – V. 292. – P. 111407. doi:10.1016/j.molliq.2019.111407.

47. Perinelli D.R. Surfactant Self-Assembling and Critical Micelle Concentration: One Approach Fits All? / D.R. Perinelli, M. Cespi, N. Lorusso, G.F. Palmieri, G. Bonacucina, P. Blasi // *Langmuir.* – 2020. – V. 36. – P. 5745-575. doi:10.1021/acs.langmuir.0c00420.

48. Shaban S.M. Surface Parameters and Biological Activity of N-(3-(Dimethyl Benzyl Ammonio) Propyl) Alkanamide Chloride Cationic Surfactants / S.M. Shaban, I. Aiad, A.R. Ismail // *J. Surfact Deterg.* – 2016. – V. 19. – P. 501-510. doi:10.1007/s11743-016-1795-x.

49. Sharma R. Biosurfactant-Aided Bioprocessing: Industrial Applications and Environmental Impact. In *Recent advances in Applied Microbiology* / R. Sharma, H.S. Oberoi // Springer Singapore, Singapore. – 2017. – P. 55–88. ISBN 978-981-10-5274-3.

50. Kuznetsova D.A. Pyrrolidinium Surfactants with a Biodegradable Carbamate Fragment: Self-Assembling and Biomedical Application / D.A. Kuznetsova, D.M. Kuznetsov, L.A. Vasileva, A.V. Toropchina, D.K. Belova, S.K. Amerhanova, A.P. Lyubina, A.D. Voloshina, L.Ya. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2021. – V. 340. – P. 117229. doi:10.1016/j.molliq.2021.117229.

51. Mirgorodskaya A.B. Carbamate-Bearing Surfactants: Micellization, Solubilization, and Biological Activity / A.B. Mirgorodskaya, R.A. Kushnazarova, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, O.A. Lenina, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *J. Mol. Liq.* – 2018. – V. 269. – P. 203–210. doi:10.1016/j.molliq.2018.08.007.

52. Mirgorodskaya A.B. Solubilization and Catalytic Behavior of Micellar System Based on Gemini Surfactant with Hydroxyalkylated Head Group / A.B. Mirgorodskaya, E.I. Yackevich, S.S. Lukashenko, L.Y. Zakharova, A.I. Konovalov // *J. Mol. Liq.* – 2012. – V. 169. – P. 106-109. doi:10.1016/j.molliq.2012.02.012.

53. Mirgorodskaya A.B. Micellization and Catalytic Properties of Cationic Surfactants with Head Groups Functionalized with a Hydroxyalkyl Fragment / A.B. Mirgorodskaya, E.I. Yackevich, V.V. Syakaev, L.Ya. Zakharova, S.K. Latypov, A.I. Konovalov // *J. Chem. Eng. Data.* – 2012. – V. 57. – P. 3153–3163. doi:10.1021/je300753d.
54. Asadov Z.H. Head-Group Effect of Surfactants of Cationic Type in Interaction with Propoxylated Sodium Salt of Polyacrylic Acid in Aqueous Solution / Z.H. Asadov, S.M. Nasibova, G.A. Ahmadova, F.I. Zubkov, R.A. Rahimov // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2017. – V. 527. – P. 95-100. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.05.024.
55. Kellaway L. The Effect of Head-Group on Selective Counterion Binding to Cationic Surfactants / L. Kellaway, G.G. Warr // *J. Colloid Interface Sci.* – 1997. – V. 193. – P. 312–314. doi:10.1006/jcis.1997.5050.
56. Asakawa T. Convenient Estimation for Counterion Dissociation of Cationic Micelles Using Chloride-Sensitive Fluorescence Probe / T. Asakawa, H. Kitano, A. Ohta, S. Miyagishi // *J. Colloid Interface Sci.* – 2001. – V. 242. – P. 284–287. doi:10.1006/jcis.2001.7875.
57. De Neve L. Quantification of Counterion Binding to and Its Effects on Aqueous Dispersions of Dialkyl Cationic Surfactants / L. De Neve, L. Vermeir, P. Sabatino, P. Saveyn, Q. Denon, J. Martins, P. Van Der Meeren // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2017. – V. 532. – P. 458-463. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.04.031.
58. Zhi L. Synthesis, Adsorption and Aggregation Properties of New Saccharide-Cationic Surfactants / L. Zhi, Q. Li, Y. Li, Y. Song // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2013. – V. 436. – P. 684-692. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.08.009.
59. Rehman N. Interactions of Cationic Surfactant Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide with Ammonium Nitrate: Surface and Thermodynamic Studies / N. Rehman, Z.U. Haq, H. Ullah, I. Mian, X. Li // *Chinese J. Chem. Phys.* – 2021. – V. 34. – P. 480-486. doi:10.1063/1674-0068/cjcp1910172.
60. Zhi L. Adsorption and Aggregation Properties of Novel Star-Shaped Gluconamide-Type Cationic Surfactants in Aqueous Solution / L. Zhi, Q. Li, Y. Li, Y. Song // *Colloid Polym. Sci.* – 2014. – V. 292. – P. 1041-1050. doi:10.1007/s00396-013-3147-y.
61. Kapitanov I.V. Physicochemical Properties and Esterolytic Reactivity of Oxime Functionalized Surfactants in pH-Responsive Mixed Micellar System / I.V. Kapitanov, A.B. Mirgorodskaya, F.G. Valeeva, N. Gathergood, K. Kuca, L.Ya. Zakharova, Y. Karpichev //

Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. – 2017. – V. 524. – P. 143-159. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.04.039.

62. Voggel M. Sweet Surfactants: Packing Parameter-Invariant Amphiphiles as Emulsifiers and Capping Agents for Morphology Control of Inorganic Particles / M. Voggel, R.M. Meinus, V. Siewert, M. Kunkel, V. Wittmann, S. Polarz // *Soft Matter*. – 2018. – V. 14. – P. 7214–7227. doi:10.1039/C8SM01091A.

63. Arun Kumar. Mixed Surfactant (Altering Chain Length and Head Group) Aggregates as an Effective Carrier for Tuberculosis Drug / Arun Kumar, Rekha, S.K. Kansal, A.O. Ibhaddon, S.K. Mehta // *Chem. Phys. Lipids*. – 2018. – V. 215. – P. 11-17. doi:10.1016/j.chemphyslip.2018.07.001.

64. Santos J. Relationship between HLB Number and Predominant Destabilization Process in Microfluidized Nanoemulsions Formulated with Lemon Essential Oil / J. Santos, M-C. Alfaro-Rodríguez, L. Vega, J. Muñoz // *Appl. Sci*. – 2023. – V. 13. – P. 5208. doi:10.3390/app13085208.

65. Rodrigues R. Influence of Temperature and Surfactants on the Solubilization of Hexachlorobutadiene and Hexachloroethane / R. Rodrigues, S. Betelu, S. Colombano, G. Masselot, T. Tzedakis, I. Ignatiadis // *J. Chem. Eng. Data*. – 2017. – V. 62. – P. 3252-3260. doi:10.1021/acs.jced.7b00320.

66. Garon D. Influence of Surfactants on Solubilization and Fungal Degradation of Fluorene / D. Garon, S. Krivobok, D. Wouessidjewe, F. Seigle-Murandi // *Chemosphere*. – 2002. – V. 47. – P. 303-309. doi:10.1016/S0045-6535(01)00299-5.

67. Vinarov Z. Solubilization of Itraconazole by Surfactants and Phospholipid-Surfactant Mixtures: Interplay of Amphiphile Structure, pH and Electrostatic Interactions / Z. Vinarov, G. Gancheva, N. Burdzhiev, S.S. Tcholakova // *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. – 2020. – V. 57. – P. 101688. 10.26434/chemrxiv.12038682.v1.

68. Vinarov Z. Micellar Solubilization of Poorly Water-Soluble Drugs: Effect of Surfactant and Solubilize Molecular Structure / Z. Vinarov, V. Katev, D. Radeva, S. Tcholakova, N.D. Denkov // *Drug Dev. Ind. Pharm*. – 2018. – V. 44. – P. 677-686. doi:10.1080/03639045.2017.1408642.

69. Liu J. Synergistic Solubilization of Phenanthrene by Mixed Micelles Composed of Biosurfactants and a Conventional Non-Ionic Surfactant / J. Liu, Y. Wang, H. Li // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – P. 4327. doi:10.3390/molecules25184327.

70. Lukáč M. Phospholium-Type Cationic Surfactants: Synthesis, Aggregation Properties and Antimicrobial Activity / M. Lukáč, F. Devínsky, M. Pisárčik, A. Papapetropoulou, M. Bukovský, B. Horváth // *J. Surfact Deterg.* – 2017. – V. 20. – P. 159-171. doi:10.1007/s11743-016-1908-6.
71. Ray G.B. Self-Aggregation of Alkyltrimethylammonium Bromides ( $C_{10}$  -,  $C_{12}$  -,  $C_{14}$  -, and  $C_{16}$  TAB) and Their Binary Mixtures in Aqueous Medium: A Critical and Comprehensive Assessment of Interfacial Behavior and Bulk Properties with Reference to Two Types of Micelle Formation / G.B. Ray, I. Chakraborty, S. Ghosh, S.P. Moulik, R. Palepu // *Langmuir.* – 2005. – V. 21. – P. 10958-10967. doi:10.1021/la051509g.
72. Moore S.E. Conductometric and Fluorometric Investigations on the Mixed Micellar Systems of Cationic Surfactants in Aqueous Media / S.E. Moore, M. Mohareb, S.A. Moore, R.M. Palepu // *J. Colloid Interface Sci.* – 2006. – V. 304. – P. 491-496. doi:10.1016/j.jcis.2006.09.019.
73. Owoyomi O. Thermodynamics of Micellization of n-Alkyltriphenylphosphonium Bromides: A Conductometric Study / O. Owoyomi, J. Ige // *Chem. Sci. J.* – 2011. – V. 2. doi:10.4172/2150-3494.1000017.
74. Prasad M. Self-Aggregation of Binary Mixtures of Alkyltriphenylphosphonium Bromides: A Critical Assessment in Favor of More than One Kind of Micelle Formation / M. Prasad, S.P. Moulik, R. Palepu // *J. Colloid Interface Sci.* – 2005. – V. 284. – P. 658-666. doi:10.1016/j.jcis.2004.10.063.
75. Prasad M. Self-Aggregation of Alkyl ( $C_{10}$  -,  $C_{12}$  -,  $C_{14}$  -, and  $C_{16}$  -) Triphenyl Phosphonium Bromides and Their 1:1 Molar Mixtures in Aqueous Medium: A Thermodynamic Study / M. Prasad, S.P. Moulik, A. MacDonald, R. Palepu // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. – V. 108. – P. 355-362. doi:10.1021/jp036358+.
76. Basu Ray G. Ternary Mixtures of Alkyltriphenylphosphonium Bromides ( $C_{12}$ TPB,  $C_{14}$ TPB and  $C_{16}$ TPB) in Aqueous Medium: Their Interfacial, Bulk and Fluorescence Quenching Behaviour / G. Basu Ray, S. Ghosh, S.P. Moulik // *J. Chem. Sci.* – 2010. – V. 122. – P. 109-117. doi:10.1007/s12039-010-0011-1.
77. Zakharova L.Ya. Alkyl Triphenylphosphonium Surfactants as Nucleic Acid Carriers: Complexation Efficacy toward DNA Decamers, Interaction with Lipid Bilayers and Cytotoxicity Studies / L.Ya. 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. – P. 16706-16717. doi:10.1039/C9CP02384D.

78. Sommers K.J. Quaternary Phosphonium Compounds: An Examination of Non-Nitrogenous Cationic Amphiphiles That Evade Disinfectant Resistance / K.J. Sommers, M.E. Michaud, C.E. Hogue, A.M. Scharnow, L.E. Amoo, A.A. Petersen, R.G. Carden, K.P.C. Minbiole, W.M. Wuest // *ACS Infect. Dis.* – 2022. – V. 8. – P. 387–397. doi:10.1021/acsinfecdis.1c00611.

79. Kulkarni C.A. A Novel Triphenylphosphonium Carrier to Target Mitochondria without Uncoupling Oxidative Phosphorylation / C.A. Kulkarni, B.D. Fink, B.E. Gibbs, P.R. Chheda, M. Wu, W.I. Sivitz, R.J. Kerns // *J. Med. Chem.* – 2021. – V. 64. – P. 662–676. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01671.

80. Wang J.Y. Triphenylphosphonium (TPP)-Based Antioxidants: A New Perspective on Antioxidant Design / J.Y. Wang, J.Q. Li, Y.M. Xiao, B. Fu, Z.H. Qin // *ChemMedChem.* – 2020. – V. 15. – P. 404-410. doi:10.1002/cmdc.201900695.

81. Demianenko I.A. Novel Mitochondria-Targeted Antioxidants, “Skulachev-Ion” Derivatives, Accelerate Dermal Wound Healing in Animals / I.A. Demianenko, T.V. Vasilieva, L.V. Domnina, V.B. Dugina, M.V. Egorov, O.Y. Ivanova, O.P. Ilinskaya, O.Y. Pletjushkina, E.N. Popova, I.Y. Sakharov, A.V. Fedorov, B.V. Chernyak // *Biochem. (Mosc.)*. – 2010. – V. 75. – P. 274-280. doi:10.1134/S000629791003003X.

82. Brycki B. Properties and Applications of Quaternary Ammonium Gemini Surfactant 12-6-12: An Overview / B. Brycki, A. Szulc, J. Brycka, I. Kowalczyk // *Molecules.* – 2023. – V. 28. – P. 6336. doi:10.3390/molecules28176336.

83. Brycki B.E. Multifunctional Gemini Surfactants: Structure, Synthesis, Properties and Applications / B.E. Brycki, I.H. Kowalczyk, A. Szulc, O. Kaczerewska, M. Pakiet // *Application and Characterization of Surfactants.* – InTech, 2017. – P. 97-155. ISBN 978-953-51-3325-4.

84. Zhang Z. The Effect of the Spacer Rigidity on the Aggregation Behavior of Two Ester-Containing Gemini Surfactants / Z. Zhang, P. Zheng, Y. Guo, Y. Yang, Z. Chen, X. Wang, X. An, W. Shen // *J. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 379. – P. 64–71. doi:10.1016/j.jcis.2012.04.052.

85. Morita T. Adsorption Dynamics of Quaternary-Ammonium-Salt-Based Gemini and Trimeric Surfactants with Different Spacer Structures at Air/Water Interface / T. Morita, S.

Yada, T. Yoshimura // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2023. – V. 671. – P. 131589. doi:10.1016/j.colsurfa.2023.131589.

86. Qiu L.-G. Understanding the Effect of the Spacer Length on Adsorption of Gemini Surfactants onto Steel Surface in Acid Medium / L.-G. Qiu, A.-J. Xie, Y.-H. Shen // *Appl. Surf. Sci.* – 2005. – V. 246. – P. 1–5. doi:10.1016/j.apsusc.2004.11.016.

87. Kowalczyk I. Antimicrobial Activity of Gemini Surfactants with Azapolymethylene Spacer / I. Kowalczyk, M. Pakiet, A. Szulc, A. Koziróg // *Molecules.* – 2020. – V. 25. – P. 4054. doi:10.3390/molecules25184054.

88. Taleb K. Benzene Ring Containing Cationic Gemini Surfactants: Synthesis, Surface Properties and Antibacterial Activity / K. Taleb, M. Mohamed-Benkada, N. Benhamed, S. Saidi-Besbes, Y. Grohens, A. Derdour // *J. Mol. Liq.* – 2017. – V. 241. – P. 81–90. doi:10.1016/j.molliq.2017.06.008.

89. Pisárčik M. Self-Assembly Properties of Cationic Gemini Surfactants with Biodegradable Groups in the Spacer / M. Pisárčik, M. Polakovičová, M. Markuliak, M. Lukáč, F. Devínsky // *Molecules.* – 2019. – V. 24. – P. 1481. doi:10.3390/molecules24081481.

90. Pavlov R.V. A Study Involving PC-3 Cancer Cells and Novel Carbamate Gemini Surfactants: Is Zeta Potential the Key to Control Adhesion to Cells? / R.V. Pavlov, G.A. Gaynanova, D.M. Kuznetsov, Ya.A. Ivanov, S.K. Amerkhanova, A.P. Lyubina, A.D. Voloshina, L.Ya. Zakharova // *Smart Mater. Med.* – 2023. – V. 4. – P. 123–133. doi:10.1016/j.smaim.2022.09.001.

91. Wang Y. Aggregation of Biodegradable Cationic Gemini Surfactants with Amide or Ester Groups / Y. Wang, M. Deng, Y. Tang, Y. Han, X. Huang, Y. Hou, Y. Wang // *Acta Phys. Chim. Sin.* – 2020. – V. 36. – P. 112248. doi:10.3866/PKU.WHXB201909046.

92. Tehrani-Bagha A.R. Solubilization of Two Organic Dyes by Cationic Ester-Containing Gemini Surfactants / A.R. Tehrani-Bagha, R.G. Singh, K. Holmberg // *J. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 376. – P. 112–118. doi:10.1016/j.jcis.2012.02.016.

93. Kushnazarova R.A. Novel Cationic Surfactants with Cleavable Carbamate Fragment: Tunable Morphological Behavior, Solubilization of Hydrophobic Drugs and Cellular Uptake Study / R.A. Kushnazarova, A.B. Mirgorodskaya, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, A.S. Sapunova, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Ya. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2020. – V. 318. – P. 113894. doi:10.1016/j.molliq.2020.113894.

94. Colovic M.B. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology / M.B. Colovic, D.Z. Krstic, T.D. Lazarevic-Pasti, A.M. Bondzic, V.M. Vasic // *Curr. Neuropharmacol.* – 2013. – V. 11. – P. 315–335. doi:10.2174/1570159X11311030006.
95. Darvesh S. Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Toward Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase / S. Darvesh, K.V. Darvesh, R.S. McDonald, D. Mataija, R. Walsh, S. Mothana, O. Lockridge, E. Martin // *J. Med. Chem.* – 2008. – V. 51. – P. 4200–4212. doi:10.1021/jm8002075.
96. Patra J.K. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects / J.K. Patra, G. Das, L.F. Fraceto, E.V.R. Campos, M.D.P. Rodriguez-Torres, L.S. Acosta-Torres, L.A. Diaz-Torres, R. Grillo, M.K. Swamy, S. Sharma, S. Habtemariam, H.-S. Shin // *J. Nanobiotechnol.* – 2018. – V. 16. – P. 71. doi:10.1186/s12951-018-0392-8.
97. Kraft J.C. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems / J.C. Kraft, J.P. Freeling, Z. Wang, R.J.Y. Ho // *J. Pharm. Sci.* – 2014. – V. 103. – P. 29–52. doi:10.1002/jps.23773.
98. Tenchov R. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement / R. Tenchov, R. Bird, A.E. Curtze Q. Zhou // *ACS Nano.* – 2021. – V. 15. – P. 16982–17015. doi:10.1021/acsnano.1c04996.
99. Mehta S. Liposomes as Versatile Platform for Cancer Theranostics: Therapy, Bio-Imaging, and Toxicological Aspects / S. Mehta, S. Kulkarni, A.N. Nikam, B.S. Padya, A. Pandey, S. Mutalik // *Curr. Pharm. Des.* – 2021. – V. 27. – P. 1977–1991. doi:10.2174/1381612827666210311142100.
100. Bukhari S.I. Recent Progress in Lipid Nanoparticles for Cancer Theranostics: Opportunity and Challenges / S.I. Bukhari, S.S. Imam, M.Z. Ahmad, P.R. Vuddanda, S. Alshehri, W.A. Mahdi, J. Ahmad // *Pharm.* – 2021. – V. 13. – P. 840. doi:10.3390/Pharm.13060840.
101. Nsairat H. Liposomes: Structure, Composition, Types, and Clinical Applications / H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Al Bawab, W. Alshaer // *Heliyon.* – 2022. – V. 8. – №5. – P. e09394. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
102. Mutlu-Ağardan N.B. Cholesterol Included Self-Assembled Electrospun Proliposomes as a Feasible Approach for Drug Delivery / N.B. Mutlu-Ağardan, S. Tort // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2023. – V. 86. – P. 104749. doi:10.1016/j.jddst.2023.104749.
103. Kaddah S. Cholesterol Modulates the Liposome Membrane Fluidity and Permeability for a Hydrophilic Molecule / S. Kaddah, N. Khreich, F. Kaddah, C. Charcosset, H.

Greige-Gerges // Food Chem. Toxicol. – 2018. – V. 113. – P. 40–48. doi:10.1016/j.fct.2018.01.017.

104. Hudiyanti D. Assessing Encapsulation of Curcumin in Cocoliposome: *In Vitro* Study / D. Hudiyanti, M.F. Al Khafiz, K. Anam, P. Siahaan, L. Suyati // Open Chem. – 2021. – V. 19. – P. 358–366. doi:10.1515/chem-2021-0036.

105. Thapa Magar K. Liposome-Based Delivery of Biological Drugs / G.F. Boafo, X. Li, Z. Chen, W. He // Chin. Chem. Lett. – 2022. – V. 33. – P. 587–596. doi:10.1016/j.ccllet.2021.08.020.

106. Apolinário A.C. Lipid Nanovesicles for Biomedical Applications: ‘What Is in a Name’? / A.C. Apolinário, L. Hauschke, J.R. Nunes, L.B. Lopes // Prog. Lipid Res. – 2021. – V. 82. – P. 101096. doi:10.1016/j.plipres.2021.101096.

107. Chang H.-I. Clinical Development of Liposome-Based Drugs: Formulation, Characterization, and Therapeutic Efficacy / H.I. Chang, M.-K. Yeh // Int. J. Nanomed. – 2011. – V. 49. – P. 49-60. doi:10.2147/IJN.S26766.

108. Carrión F.J. The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes / F.J. Carrión, A. De La Maza, J.L. Parra // J. Colloid Interface Sci. – 1994. – V. 164. – P. 78–87. doi:10.1006/jcis.1994.1145.

109. Narenji M. Effect of Charge on Separation of Liposomes upon Stagnation / M. Narenji, M.R. Talaei, H.R. Moghimi // Iran J. Pharm. Res. – 2017. – V. 16. – P. 423–431.

110. Li J. Ascorbyl Palmitate Effects on the Stability of Curcumin-Loaded Soybean Phosphatidylcholine Liposomes / J. Li, C. Chang, J. Zhai, Y. Yang, H. Yu // Food Biosci. – 2021. – V. 41. – P. 100923. doi:10.1016/j.fbio.2021.100923.

111. Khongkow M. Cationic Liposome of Hen Egg White Lysozyme for Enhanced Its Stability, Activity and Accessibility in Gastro-Intestinal Tract / M. Khongkow, N. Rimsueb, A. Jantimaporn, T. Janyaphisan, W. Woraprayote, W. Visessanguan, U.R. Ruktanonchai // Food Biosci. – 2023. – V. 53. – P. 102470. doi:10.1016/j.fbio.2023.102470.

112. Li S.-D. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles / S.-D. Li, L. Huang // Mol. Pharm. – 2008. – V. 5. – P. 496–504. doi:10.1021/mp800049w.

113. Alinaghi A. The Influence of Lipid Composition and Surface Charge on Biodistribution of Intact Liposomes Releasing from Hydrogel-Embedded Vesicles / A. Alinaghi, M.R. Rouini, F. Johari Daha, H.R. Moghimi // Int. J. Pharm. – 2014. – V. 459. – P. 30–39. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.11.011.

114. Olusanya T. Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs / T. Olusanya, R. Haj Ahmad, D. Ibegbu, J. Smith, A. Elkordy // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – P. 907. doi:10.3390/molecules23040907.
115. Caritá A.C. Elastic Cationic Liposomes for Vitamin C Delivery: Development, Characterization and Skin Absorption Study / A.C. Caritá, J. Resende De Azevedo, Y. Chevalier, D. Arquier, M.V. Buri, K.A. Riske, G. Ricci Leonardi, M.-A. Bolzinger // *Int. J. Pharm.* – 2023. – V. 638. – P. 122897. doi:10.1016/j.ijpharm.2023.122897.
116. Matsumura Y. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs / Y. Matsumura, H. Maeda // *Cancer Res.* – 1986. – V. 46. – P. 6387–6392.
117. Subhan M.A. Recent Advances in Tumor Targeting *via* EPR Effect for Cancer Treatment / M.A. Subhan, S.S.K. Yalamarty, N. Filipczak, F. Parveen, V.P. Torchilin // *J. Pers. Med.* – 2021. – V. 11. – P. 571. – doi:10.3390/jpm11060571.
118. Jaradat E. Microfluidic Paclitaxel-Loaded Lipid Nanoparticle Formulations for Chemotherapy / E. Jaradat, E. Weaver, A. Meziane, D.A. Lamprou // *Int. J. Pharm.* – 2022. – V. 628. – P. 122320. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122320.
119. Cauzzo J. Following the Fate of Dye-Containing Liposomes *In Vitro* / J. Cauzzo, M. Nystad, A.M. Holsæter, P. Basnet, N. Škalko-Basnet // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 4847. doi:10.3390/ijms21144847.
120. Nakhaei P. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol / P. Nakhaei, R. Margiana, D.O. Bokov, W.K. Abdelbasset, M.A. Jadidi Kouhbanani, R.S. Varma, F. Marofi, M. Jarahian, N. Beheshtkhoo // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – V. 9. – P. 705886. doi:10.3389/fbioe.2021.705886.
121. Piwowarczyk L. Natural Compounds in Liposomal Nanoformulations of Potential Clinical Application in Glioblastoma / L. Piwowarczyk, D.T. Mlynarczyk, V. Krajka-Kuźniak, A. Majchrzak-Celińska, A. Budzianowska, S. Tomczak, J. Budzianowski, A. Woźniak-Braszak, R. Pietrzyk, M. Baranowski, T. Goslinski, A. Jelinska // *Cancers*. – 2022. – V. 14. – P. 6222. doi:10.3390/cancers14246222.
122. Long P. Monascus Red Pigment Liposomes: Microstructural Characteristics, Stability, and Anticancer Activity / P. Long, L. Zhu, H. Lai, S. Xu, X. Dong, Y. Shao, L. Wang, S. Cheng, G. Liu, J. He, Y. He // *Foods*. – 2023. – V. 12. – P. 447. doi:10.3390/foods12030447.

123. Kulkarni S.B. Factors Affecting Microencapsulation of Drugs in Liposomes / S.B. Kulkarni, G.V. Betageri, M. Singh // *J. Microencapsul.* – 1995. – V. 12. – P. 229–246. doi:10.3109/02652049509010292.
124. Pauli G. Development and Characterization of the Solvent-Assisted Active Loading Technology (SALT) for Liposomal Loading of Poorly Water-Soluble Compounds / G. Pauli, W.-L. Tang, S.-D. Li // *Pharmaceutics.* – 2019. – V. 11. – P. 465. doi:10.3390/pharmaceutics11090465.
125. Vakili-Ghartavol R. Optimization of Docetaxel Loading Conditions in Liposomes: Proposing Potential Products for Metastatic Breast Carcinoma Chemotherapy / R. Vakili-Ghartavol, S.M. Rezayat, R. Faridi-Majidi, K. Sadri, M.R. Jaafari // *Sci. Rep.* – 2020. – V. 10. – P. 5569. doi:10.1038/s41598-020-62501-1.
126. Yamauchi M. Release of Drugs from Liposomes Varies with Particle Size / M. Yamauchi, K. Tsutsumi, M. Abe, Y. Uosaki, M. Nakakura, N. Aoki // *Biol. Pharm. Bull.* – 2007. – V. 30. – P. 963–966. doi:10.1248/bpb.30.963.
127. Zhang G. Enhancing Stability of Liposomes Using High Molecular Weight Chitosan to Promote Antioxidative Stress Effects and Lipid-Lowering Activity of Encapsulated Lutein *In Vivo* and *In Vitro* / G. Zhang, M. Zhang, Y. Pei, K. Qian, J. Xie, Q. Huang, S. Liu, N. Xue, Y. Zu, H. Wang // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – V. 253. – P. 126564. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126564.
128. Uma Maheswari R.T. CD44 Tagged Hyaluronic Acid - Chitosan Liposome Carrier for the Delivery of Berberine and Doxorubicin into Lung Cancer Cells / R.T. Uma Maheswari, V. Ajithkumar, P. Varalakshmi, M. Rajan // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – V. 253. – P. 126599. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126599.
129. Fu S. Temperature Sensitive Liposome Based Cancer Nanomedicine Enables Tumour Lymph Node Immune Microenvironment Remodelling / S. Fu, L. Chang, S. Liu, T. Gao, X. Sang, Z. Zhang, W. Mu, X. Liu, S. Liang, H. Yang, M. Qingping, L. Yongjun, Z. Na // *Nat. Commun.* – 2023. – V. 14. – P. 2248. doi:10.1038/s41467-023-38014-6.
130. Antoniou A.I. Stimulus-Responsive Liposomes for Biomedical Applications / A.I. Antoniou, S. Giofrè, P. Seneci, D. Passarella, S. Pellegrino // *Drug Discov. Today.* – 2021. – V. 26. – P. 1794–1824. doi:10.1016/j.drudis.2021.05.010.

131. Lee S.-H. How and Why Are Cancers Acidic? Carbonic Anhydrase IX and the Homeostatic Control of Tumour Extracellular pH / S.-H. Lee, J.R. Griffiths // *Cancers*. – 2020. – V. 12. – P. 1616. doi:10.3390/cancers12061616.
132. Haghirsadat F.A. Comprehensive Mathematical Model of Drug Release Kinetics from Nano-Liposomes, Derived from Optimization Studies of Cationic PEGylated Liposomal Doxorubicin Formulations for Drug-Gene Delivery / F. Haghirsadat, G. Amoabediny, M.N. Helder, S. Naderinezhad, M.H. Sheikhha, T. Forouzanfar, B. Zandieh-doulabi // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* – 2018. – V. 46. – P. 169–177. doi:10.1080/21691401.2017.1304403.
133. Alruwaili N.K. Development of Surface Modified Bilosomes for the Oral Delivery of Quercetin: Optimization, Characterization in-Vitro Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxicity Study / N.K. Alruwaili, A. Zafar, O.A. Alsaidan, M. Yasir, E.M. Mostafa, S.F. Alnomasy, A. Rawaf, A. Alquraini, F.A. Alomar // *Drug Deliv.* – 2022. – V. 29. – P. 3035–3050. doi:10.1080/10717544.2022.2122634.
134. Sumathi R. Formulation and Characterization of Soya Lecithin-Based Liposomes for Encapsulating a Weakly Soluble Naringenin / R. Sumathi / *J. Med. Pharm. Allied Sci.* – 2021. – V. 10. – P. 2018–4023. doi:10.22270/jmpas.V10I6.2560.
135. Nosova A.S. Diversity of PEGylation Methods of Liposomes and Their Influence on RNA Delivery / A.S. Nosova, O.O. Koloskova, A.A. Nikonova, V.A. Simonova, V.V. Smirnov, D. Kudlay, M.R. Khaitov // *Med. Chem. Commun.* – 2019. – V. 10. – P. 369–377. doi:10.1039/C8MD00515J.
136. Abu Lila A.S. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications / A.S. Abu Lila, T. Ishida // *Biol. Pharm. Bull.* – 2017. – V. 40. – P. 1–10. doi:10.1248/bpb.b16-00624.
137. Zalba S. Stealth Nanoparticles in Oncology: Facing the PEG Dilemma / S. Zalba, T.L.M. Ten Hagen, C. Burgui, M.J. Garrido // *J. Control. Release.* – 2022. – V. 351. – P. 22–36. doi:10.1016/j.jconrel.2022.09.002.
138. Klein M.E. Towards the Development of Long Circulating Phosphatidylserine (PS)- and Phosphatidylglycerol (PG)-Enriched Anti-Inflammatory Liposomes: Is PEGylation Effective? / M.E. Klein, M. Rieckmann, D. Sedding, G. Hause, A. Meister, K. Mäder, H. Lucas // *Pharmaceutics*. – 2021. – V. 13. – P. 282. doi:10.3390/Pharm.13020282.

139. Yao X. Poly(Ethylene Glycol) Alternatives in Biomedical Applications / X. Yao, C. Qi, C. Sun, F. Huo, X. Jiang // *Nano Today*. – 2023. – V. 48. – P. 101738. doi:10.1016/j.nantod.2022.101738.
140. Dalmoro A. Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles as Enhanced Indomethacin Delivery Systems / A. Dalmoro, S. Bochicchio, S.F. Nasibullin, P. Bertocin, G. Lamberti, A.A. Barba, R.I. Moustafine // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2018. – V. 121. – P. 16–28. doi:10.1016/j.ejps.2018.05.014.
141. Merino M. Immunoliposomes in Clinical Oncology: State of the Art and Future Perspectives / M. Merino, S. Zalba, M.J. Garrido // *J. Control. Release*. – 2018. – V. 275. – P. 162-176. doi:10.1016/j.jconrel.2018.02.015.
142. Frisch B. Conjugation of Ligands to the Surface of Preformed Liposomes by Click Chemistry / B. Frisch, F.S. Hassane, F. Schuber // *Liposomes*. – Humana Press, 2010. – V. 605. – P. 267–277. ISBN 978-1-60327-359-6.
143. Patel S. Brief Update on Endocytosis of Nanomedicines / S. Patel, J. Kim, M. Herrera, A. Mukherjee, A.V. Kabanov, G. Sahay // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2019. – V. 144. – P. 90-111. doi:10.1016/j.addr.2019.08.004.
144. Malfanti A. Control of Cell Penetration Enhancer Shielding and Endosomal Escape-Kinetics Crucial for Efficient and Biocompatible siRNA Delivery / A. Malfanti, H. Sami, A. Balasso, G. Marostica, B. Arpac, F. Mastrotto, G. Mantovani, E. Cola, M. Anton, P. Caliceti, O. Manfred, S. Salmaso // *J. Control. Release*. – 2023. – V. 363. – P. 101-113. doi:10.1016/j.jconrel.2023.09.022.
145. Azevedo C. Strategies for the Enhanced Intracellular Delivery of Nanomaterials / C. Azevedo, M.H. Macedo, B. Sarmiento // *Drug Discov. Today*. – 2018. – V. 23. – P. 944-959. doi:10.1016/j.drudis.2017.08.011.
146. Biswas S. Nanopreparations for Organelle-Specific Delivery in Cancer / S. Biswas, V.P. Torchilin // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2014. – V. 66. – P. 26-41. doi:10.1016/j.addr.2013.11.004.
147. Xu J. Recent Advancements in Mitochondria-Targeted Nanoparticle Drug Delivery for Cancer Therapy / J. Xu, J.G. Shamul, E.A. Kwizera, X. He // *Nanomaterials*. – 2022. – V. 12. – P. 743. doi:10.3390/nano12050743.
148. Weissig V. Probing Mitochondrial Function / V. Weissig, M. Edeas, M. Eds // *Mitochondrial Medicine*. – Springer, 2015. – V.1. – P. 1264. ISBN 978-1-4939-2256-7.

149. Vyas S. Mitochondria and Cancer / S. Vyas, E. Zaganjor, M.C. Haigis // *Cell*. – 2016. – V. 166. – P. 555-566. doi:10.1016/j.cell.2016.07.002.
150. Costantini P. Mitochondrion as a Novel Target of Anticancer Chemotherapy / P. Costantini, M. Merino, S. Zalba, M.J. Garrido // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2000. – V. 92. – P. 1042-1053. doi:10.1093/jnci/92.13.1042.
151. Viale A. Oncogene Ablation-Resistant Pancreatic Cancer Cells Depend on Mitochondrial Function / A. Viale, P. Pettazzoni, C.A. Lyssiotis, H. Ying, N. Sánchez, M. Marchesini, A. Carugo, T. Green, S. Seth, V. Giuliani, M. Kost-Alimova, F. Muller, S. Colla, L. Nezi, G. Genovese, A.K. Deem, A. Kapoor, W. Yao, E. Brunetto, Y. Kang, M. Yuan, J.M. Asara, Y.A. Wang, T.P. Heffernan, A.C. Kimmelman, H. Wang, J.B. Fleming, L.C. Cantley, R.A. DePinho, G.F. Draetta // *Nature*. – 2014. – V. 514. – P. 628-632. doi:10.1038/nature13611.
152. Pathak R.K. Mito-DCA: A Mitochondria Targeted Molecular Scaffold for Efficacious Delivery of Metabolic Modulator Dichloroacetate / R.K. Pathak, S. Marrache, D.A. Harn, S. Dhar // *ACS Chem. Biol.* – 2014. – V. 9. – P. 1178-1187. doi:10.1021/cb400944y.
153. Mallick S. Liposomes Containing Cholesterol and Mitochondria-Penetrating Peptide (MPP) for Targeted Delivery of Antimycin A to A549 Cells / S. Mallick, L.T. Thuy, S. Lee, J.-I. Park, J.S. Choi // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. – 2018. – V. 161. – P. 356-364. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.10.052.
154. Shi X. Amphiphilic Copolymer and TPGS Mixed Magnetic Hybrid Micelles for Stepwise Targeted Co-Delivery of DOX/TPP-DOX and Image-Guided Chemotherapy with Enhanced Antitumor Activity in Liver Cancer / X. Shi, G. Lv, X. Sun, D. Cao, G. Wang, Y. Chang // *RSC Adv.* – 2017. – V. 7. – P. 25694-25701. doi:10.1039/C7RA00597K.
155. Xu Y. Triphenylphosphonium-Modified Poly(Ethylene Glycol)-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Micelles for Mitochondria - Targeted Gambogic Acid Delivery / Y. Xu, S. Wang, H.F. Chan, Y. Liu, H. Li, C. He, Z. Li, M. Chen // *Int. J. Pharm.* – 2017. – V. 522. – P. 21-33. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.01.064.
156. 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 // *J. Mater. Chem. B*. – 2019. – V. 7. – P. 7351-7362. doi:10.1039/C9TB01853K.

157. Li X. Mitochondria-Specific Agents for Photodynamic Cancer Therapy: A Key Determinant to Boost the Efficacy / X. Li, Y. Zhao, T. Zhang, D. Xing // *Adv. Healthcare Mater.* – 2021. – V. 10. – P. 2001240. doi:10.1002/adhm.202001240.
158. Boddapati S.V. Organelle-Targeted Nanocarriers: Specific Delivery of Liposomal Ceramide to Mitochondria Enhances Its Cytotoxicity *In Vitro* and *In Vivo* / S.V. Boddapati, G.G.M. D'Souza, S. Erdogan, V.P. Torchilin, V. Weissig // *Nano Lett.* – 2008. – V. 8. – P. 2559-2563. doi:10.1021/nl801908y.
159. Boddapati S.V. Mitochondriotropic Liposomes / S.V. Boddapati, P. Tongcharoensirikul, R.N. Hanson, G.G.M. D'Souza, V.P. Torchilin, V. Weissig // *J. Liposome Res.* – 2005. – V. 15. – P. 49-58. doi:10.1081/LPR-64958.
160. Solomon M.A. *In Vitro* Assessment of the Utility of Stearyl Triphenyl Phosphonium Modified Liposomes in Overcoming the Resistance of Ovarian Carcinoma Ovar-3 Cells to Paclitaxel / M.A. Solomon, A.A. Shah, G.G.M. D'Souza // *Mitochondrion.* – 2013. – V. 13. – P. 464-472. doi:10.1016/j.mito.2012.10.013.
161. Biswas S. Liposomes Loaded with Paclitaxel and Modified with Novel Triphenylphosphonium-PEG-PE Conjugate Possess Low Toxicity, Target Mitochondria and Demonstrate Enhanced Antitumor Effects *In Vitro* and *In Vivo* / S. Biswas, N.S. Dodwadkar, P.P. Deshpande, V.P. Torchilin // *J. Control. Release.* – 2012. – V. 159. – P. 393-402. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.009.
162. Lichtenberg D. The Mechanism of Detergent Solubilization of Lipid Bilayers / D. Lichtenberg, H. Ahyayauch, F.M. Goñi // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105. – P. 289-299. doi:10.1016/j.bpj.2013.06.007.
163. Kuznetsova D.A. Novel Biocompatible Liposomal Formulations for Encapsulation of Hydrophilic Drugs – Chloramphenicol and Cisplatin / D.A. Kuznetsova, D.R. Gabdrakhmanov, G.A. Gaynanova, L.A. Vasileva, D.M. Kuznetsov, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, A.S. Sapunova, I.R. Nizameev, G.V. Sibgatullina, D.V. Samigullin, M.K. Kadirov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2021. – V. 610. doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125673.
164. Kuznetsova D.A. Cationic Liposomes Mediated Transdermal Delivery of Meloxicam and Ketoprofen: Optimization of the Composition, *In Vitro* and *In Vivo* Assessment of Efficiency / D.A. Kuznetsova, L.A. Vasileva, G.A. Gaynanova, E.A. Vasilieva, O.A. Lenina,

I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *Int. J. Pharm.* – 2021. – V. 605. – P. 120803. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120803.

165. 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 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24. – P. 10494. doi:10.3390/ijms241310494.

166. 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 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24. – P. 12312. doi:10.3390/ijms241512312.

167. Pavlov R. The Formation of Morphologically Stable Lipid Nanocarriers for Glioma Therapy / R. Pavlov, E. Romanova, D. Kuznetsov, A. Lyubina, S. Amerhanova, A. Voloshina, D. Buzyurova, V. Babaev, I. Zueva, K. Petrov, S. Lukashenko, G. Gaynanova, L. Zakharova // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24. – P. 3632. doi:10.3390/ijms24043632.

168. Domínguez-Arca V. On the Structure and Stability of Novel Cationic DPPC Liposomes Doped with Gemini Surfactants / V. Domínguez-Arca, J. Sabín, L. García-Río, M. Bastos, P. Taboada, S. Barbosa, G. Prieto // *J. Mol. Liq.* – 2022. – V. 366. – P. 120230. doi:10.1016/j.molliq.2022.120230.

169. Cho J. Amine-based Cationic Surfactants: Synthesis and Utilization of Their Physical Properties to Prepare Liposomes / J. Cho, H. Shin, N. Jeong // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2019. – V. 94. – P. 2318-2326. doi:10.1002/jctb.6024.

170. Koirala S. Effect of Double Tailed Cationic Surfactants on the Physicochemical Behavior of Hybrid Vesicles / S. Koirala, B. Roy, P. Guha, R. Bhattarai, M. Sapkota, P. Nahak, G. Karmakar, A.K. Mandal, A. Kumar, A.K. Panda // *RSC Adv.* – 2016. – V. 6. – P. 13786-13796. doi:10.1039/C5RA17774J.

171. Gao L. Surfactant Assisted Rapid-Release Liposomal Strategies Enhance the Antitumor Efficiency of Bufalin Derivative and Reduce Cardiotoxicity / L. Gao, L. Zhang, F. He, J. Chen, M. Zhao, S. Li, H. Wu, Y. Liu, Y. Zhang, Q. Ping, L. Hu, H. Qiao // *Int. J. Nanomedicine.* – 2021. – V. 16. – P. 3581-3598. doi:10.2147/IJN.S313153.

172. Pagano L. Resveratrol Loaded in Cationic Glucosylated Liposomes to Treat Staphylococcus Epidermidis Infections / L. Pagano, F. Gkartziou, S. Aiello, B. Simonis, F.

Ceccacci, S. Sennato, A. Ciogli, S. Mourtas, I. Spiliopoulou, S.G. Antimisiaris, C. Bombelli, G. Mancini // Chem. Phys. Lipids. – 2022. – V. 243. – P. 105174. doi:10.1016/j.chemphyslip.2022.105174.

173. Mauceri A. Role of the Hydrophilic Spacer of Glucosylated Amphiphiles Included in Liposome Formulations in the Recognition of Concanavalin A / A. Mauceri, A. Fracassi, M. D’Abramo, S. Borocci, L. Giansanti, A. Piozzi, L. Galantini, A. Martino, V. D’Aiuto, G. Mancini // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2015. – V. 136. – P. 232-239. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.09.016.

174. Farooq M.A. TPGS Decorated Liposomes as Multifunctional Nano-Delivery Systems / M.A. Farooq, N.L. Trevaskis // Pharm. Res. – 2023. – V. 40. – P. 245-263. doi:10.1007/s11095-022-03424-6.

175. Kuang H. The Design of Peptide-Amphiphiles as Functional Ligands for Liposomal Anticancer Drug and Gene Delivery / H. Kuang, S. H. Ku, E. Kokkoli // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2017. – V. 110-111. – P. 80-101. doi:10.1016/j.addr.2016.08.005.

176. Zoughaib M. Amphiphilic RGD and GHK Peptides Synergistically Enhance Liposomal Delivery into Cancer and Endothelial Cells / M. Zoughaib, R.V. Pavlov, G.A. Gaynanova, R. Garifullin, V.G. Evtugyn, T.I. Abdullin // Mater. Adv. – 2021. – V. 2. – P. 7715-7730. doi:10.1039/D1MA00498K.

177. Cevc G. The Skin: A Pathway for Systemic Treatment with Patches and Lipid-Based Agent Carriers / G. Cevc, G. Blume, A. Schätzlein, D. Gebauer, A. Paul // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1996. – V. 18. – P. 349-378. doi:10.1016/0169-409X(95)00091-K.

178. Cevc G. Lipid Vesicles Penetrate into Intact Skin Owing to the Transdermal Osmotic Gradients and Hydration Force / G. Cevc, G. Blume // Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. – 1992. – V. 1104. – P. 226-232. doi:10.1016/0005-2736(92)90154-E.

179. Touitou E. Ethosomes — Novel Vesicular Carriers for Enhanced Delivery: Characterization and Skin Penetration Properties / E. Touitou, N. Dayan, L. Bergelson, B. Godin, M. Eliaz // J. Control. Release. – 2000. – V. 65. – P. 403-418. doi:10.1016/S0168-3659(99)00222-9.

180. Song C.K. A Novel Vesicular Carrier, Transethosome, for Enhanced Skin Delivery of Voriconazole: Characterization and *In Vitro/In Vivo* Evaluation / C.K. Song, P. Balakrishnan, C.-K. Shim, S.-J. Chung, S. Chong, D.D. Kim // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2012. – V. 92. – P. 299-304. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.004.

181. Sala M. Lipid Nanocarriers as Skin Drug Delivery Systems: Properties, Mechanisms of Skin Interactions and Medical Applications / M. Sala, R. Diab, A. Elaissari, H. Fessi // *Int. J. Pharm.* – 2018. – V. 535. – P. 1-17. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.10.046.
182. Nangare S. Development of a Novel Freeze-Dried Mulberry Leaf Extract-Based Transfersome Gel / S. Nangare, D. Bhatane, R. Mali, M. Shitole // *Turk. J. Pharm. Sci.* – 2021. – V. 18. – P. 44-55. doi:10.4274/tjps.galenos.2019.98624.
183. Gupta N. Designing and Optimization of Naproxen Sodium Deformable Vesicular Systems Through Factorial Design: Box Behenken Model / N. Gupta, S. Jain // *Int. J. App. Pharm.* – 2021. – V. 13. – P. 190-197. doi:10.22159/ijap.2021v13i2.40398.
184. El-Gizawy S.A. Deferoxamine-Loaded Transfersomes Accelerates Healing of Pressure Ulcers in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats / S.A. El-Gizawy, A. Nouh, S. Saber, A.Y. Kira // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2020. – V. 58. – P. 101732. doi:10.1016/j.jddst.2020.101732.
185. Balata G.F. Preparation and Characterization of Ivabradine HCl Transfersomes for Enhanced Transdermal Delivery / G.F. Balata, M.M. Faisal, H.A. Elghamry, S.A. Sabry // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2020. – V. 60. – P. 101921. doi:10.1016/j.jddst.2020.101921.
186. Iskandarsyah. Formulation, Characterization, Evaluation and *In Vitro* Study of Transfersomal Gel Medroxyprogesterone Acetate for Transdermal Drug Delivery / Iskandarsyah, C. Masrijal, Harmita // *Int. J. Pharm. Sci.* – 2020. – V. 11. – P. 5373-5381. doi:10.26452/ijrps.v11i4.3159.
187. Dudhipala N. Effect of Lipid and Edge Activator Concentration on Development of Aceclofenac-Loaded Transfersomes Gel for Transdermal Application: *In Vitro* and *Ex Vivo* Skin Permeation / N. Dudhipala, R. Phasha Mohammed, A. Adel Ali Youssef, N. Banala // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 2020. – V. 46. – P. 1334-1344. doi:10.1080/03639045.2020.1788069.
188. Nurfitriyana N. *In Vitro* Study of a Transfersomal Gel Preparation Containing Lynestrenol as a Transdermal Drug Delivery System / N. Nurfitriyana, H. Harmita, I. Iskandarsyah // *Int. J. App. Pharm.* – 2020. – V. 242-244. doi:10.22159/ijap.2020.v12s1.FF052.
189. Nnamani P.O. Formulation and Evaluation of Transdermal Nanogel for Delivery of Artemether / P.O. Nnamani, A.A. Ugwu, O.H. Nnadi, F.C. Kenekwukwu, K.C. Ofokansi, A.A. Attama, C.-M. Lehr // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2021. – V. 11. – P. 1655-1674. doi:10.1007/s13346-021-00951-4

190. Mohd Y. Status of Surfactants as Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery / Y. Mohd, I. Som, K. Bhatia // *J. Pharm. Biol. Sci.* – 2012. – V. 4. – P. 2. doi:10.4103/0975-7406.92724.
191. Kuznetsova D.A. Enhancement of the Transdermal Delivery of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Using Liposomes Containing Cationic Surfactants / D.A. Kuznetsova, E.A. Vasilieva, D.M. Kuznetsov, O.A. Lenina, S.K. Filippov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *ACS Omega.* – 2022. – V. 7. – P. 25741-25750. doi:10.1021/acsomega.2c03039.
192. Matsuoka K. Molecular Aggregates of Partially Fluorinated Quaternary Ammonium Salt Gemini Surfactants / K. Matsuoka, T. Yoshimura, T. Shikimoto, J. Hamada, M. Yamawaki, C. Honda, K. Endo // *Langmuir.* – 2007. – V. 23. – P. 10990-10994. doi:10.1021/la701525c.
193. Schott H. Solubilization of a Water-Insoluble Dye as a Method for Determining Micellar Molecular Weights / H. Schott // *J. Phys. Chem.* – 1966. – V. 70. – P. 2966-2973. doi:10.1021/j100881a041.
194. AAT Bioquest. Inc. (2022. November 10). Quest Graph™ IC50 Calculator. AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>.
195. 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 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – P. 14992. doi:10.3390/ijms232314992.
196. Yin Q. Agonist-Induced Piezo1 Activation Promote Mitochondrial-Dependent Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells / Q. Yin, G. Zang, N. Li, C. Sun, R. Du // *BMC Cardiovasc. Disord.* – 2022. – V. 22. – P. 287. doi:10.1186/s12872-022-02726-2.
197. Pavlov R.V. Biomedical Potentialities of Cationic Geminis as Modulating Agents of Liposome in Drug Delivery across Biological Barriers and Cellular Uptake / R.V. Pavlov, G.A. Gaynanova, D.A. Kuznetsova, L.A. Vasileva, I.V. Zueva, A.S. Sapunova, D.N. Buzyurova, V.M. Babaev, A.D. Voloshina, S.S. Lukashenko, I. Kh. Rizvanov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *Int. J. Pharm.* – 2020. – V. 587. – P. 119640. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119640.
198. Leger M. Object Recognition Test in Mice / M. Leger, A. Quiedeville, V. Bouet, B. Haelewyn, M. Boulouard, P. Schumann-Bard, T. Freret // *Nat. Protoc.* – 2013. – V. 8. – P. 2531-2537. doi:10.1038/nprot.2013.155.

199. Gaynanova G.A. A Novel Supramolecular Catalytic System Based on Amphiphilic Triphenylphosphonium Bromide for the Hydrolysis of Phosphorus Acid Esters / G.A. Gaynanova, G.I. Vagapova, F.G. Valeeva, E.A. Vasilieva, I.V. Galkina, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2016. – V. 489. – P. 95-102. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.10.032.
200. Berriche L. Mixed Micellization and Surface Properties of Non-Ionic/Cationic Surfactants / L. Berriche, L. Badache, S. Habib BenHariz, A. Gharbi, W. Talhi // *J. Dispers. Sci. Technol.* – 2019. – V. 40. – P. 378-389. doi:10.1080/01932691.2018.1470010.
201. Irshad S. Solubilization of Direct Black 2 in Mixed Micellar Media: Insights from Spectroscopic and Conductometric Measurements / S. Irshad, H. Sultana, M. Usman, N. Akram, Z.H. Farooqi, A. Yusaf, M.F. Nazar // *J. Dispers. Sci. Technol.* – 2023. – V. 44. – P. 1044-1053. doi:10.1080/01932691.2021.1993890.
202. Rehman A. The Application of Cationic-Nonionic Mixed Micellar Media for Enhanced Solubilization of Direct Brown 2 Dye / A. Rehman, M. Usman, T.H. Bokhari, A.U. Haq, M. Saeed, H.M.A.U. Rahman, M. Siddiq, A. Rasheed, M.U. Nisa // *J. Mol. Liq.* – 2020. – V. 301. – P. 112408. doi:10.1016/j.molliq.2019.112408.
203. Brown J.R. Revealing Foam Stability for Cationic and Zwitterionic Triethylsilyl-Containing Surfactants / J.R. Brown, M.D. Madsen, A. Ateş, R. Islam, B. Agbo, K.K. Nikoo, B.Y. Lattimer, T.E. Long // *Phys. Fluids.* – 2023. – V. 35. – P. 073102. doi:10.1063/5.0152198.
204. Taj M.B. Effect of Nonionic Surfactant on Micellization Thermodynamics and Spectroscopic Profile of Dye-Surfactant Aggregation / M.B. Taj, S. Noor, T. Javed, A. Ihsan, G. Sarwari, S. Jabeen, T. Sharif, Z. Naseem, I. Naz, H. Iqbal, H., N. Ghani // *J. Dispers. Sci. Technol.* – 2023. – V. 44. – P. 669-678. doi:10.1080/01932691.2021.1960169.
205. Zakharova L.Ya. Factors Determining the Catalytic Activity of the Mixed Micellar System Cetyltrimethylammonium Bromide-Brij-35 in the Hydrolysis of a Phosphonic Acid Ester / L.Ya. Zakharova, F.G. Valeeva, A.R. Ibragimova, A.V. Zakharov, S.N. Shtykov, I.V. Bogomolova, A.I. Konovalov // *Kinet. Catal.* – 2012. – V. 53. – P. 344-352. doi:10.1134/S0023158412030147.
206. Zakharova L.Ya. Properties of a Sodium Dodecyl Sulfate-Brij 35 Binary Micellar System and Their Effect on the Alkaline Hydrolysis of O-Ethyl-O-p-Nitrophenylchloromethylphosphonate / L.Ya. Zakharova, F.G. Valeeva, A.R. Ibragimova, V.M. Zakharov, L.A. Kudryavtseva, Yu.G. Elistratova, A.R. Mustafina, A.I. Konovalov, S.N.

Shtykov, I.V. Bogomolova // *Colloid J.* – 2007. – V. 69. – P. 718. doi:10.1134/S1061933X07060075.

207. Mirgorodskaya A.B. Mixed Micellar Solutions of Hexadecylpiperidinium Surfactants and Tween 80: Aggregation Behavior and Solubilizing Properties / A.B. Mirgorodskaya, R.A. Kushnazarova, S.S. Lukashenko, L.Ya. Zakharova // *Russ. J. Phys. Chem.* – 2020. – V. 94. – P. 1902-1907. doi:10.1134/S0036024420090198.

208. Piñeiro L. Fluorescence Emission of Pyrene in Surfactant Solutions / L. Piñeiro, M. Novo, W. Al-Soufi // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2015. – V. 215. – P. 1-12. doi:10.1016/j.cis.2014.10.010.

209. Aguiar J. On the Determination of the Critical Micelle Concentration by the Pyrene 1:3 Ratio Method / J. Aguiar, P. Carpena, J.A. Molina-Bolívar, C. Carnero Ruiz // *J. Colloid Interface Sci.* – 2003. – V. 258. – P. 116-122. doi:10.1016/S0021-9797(02)00082-6.

210. Akbaş H. Aggregation Behavior and Intermolecular Interaction of Binary Surfactant Mixtures Based on Cationic Geminis and Nonionic Surfactants / H. Akbaş, S. Kasapoğlu, M. Boz // *Colloid Polym. Sci.* – 2015. – V. 293. – P. 3429-3437. doi:10.1007/s00396-015-3702-9.

211. Arun Kumar (Cationic + Nonionic) Mixed Surfactant Aggregates for Solubilisation of Curcumin / Arun Kumar, G. Kaur, S.K. Kansal, G.R. Chaudhary, S.K. Mehta // *J. Chem. Thermodyn.* – 2016. – V. 93. – P. 115-122. doi:10.1016/j.jct.2015.09.027.

212. Becher P. Nonionic Surface-Active Compounds IV. Micelle Formation by Polyoxyethylene Alkanols and Alkyl Phenols in Aqueous Solution / P. Becher // *J. Colloid Sci.* – 1961. – V. 16. – P. 49-56. doi:10.1016/0095-8522(61)90061-7.

213. Khatua D. Fluorescence, Circular Dichroism, Light Scattering, and Microscopic Characterization of Vesicles of Sodium Salts of Three N -Acyl Peptides / D. Khatua, J. Dey // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – V. 111. – P. 124-130. doi:10.1021/jp065225w.

214. Ghosh S. Interaction Between Zwitterionic and Anionic Surfactants: Spontaneous Formation of Zwitterionic Vesicles / S. Ghosh, D. Khatua, J. Dey // *Langmuir.* – 2011. – V. 27. – P. 5184-5192. doi:10.1021/la1040147.

215. Mirgorodskaya A.B. Aggregation Behavior and Solubilization Properties of 3-Hydroxypiperidinium Surfactants / A.B. Mirgorodskaya, R.A. Kushnazarova, S.S. Lukashenko, L.Ya. Zakharova // *Russ. Chem. Bull.* – 2019. – V. 68. – P. 328-333. doi:10.1007/s11172-019-2388-4.

216. Kutyreva M.P. Self-Organization and Solubilization in Binary Systems Based on Hyperbranched Polyesters Polyols / M.P. Kutyreva, A.A. Khannanov, L.Ya. Zakharova, N.A. Ulakhovich, G.A. Kutyrev, D.R. Gabdrakhmanov // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2015. – V. 468. – P. 40-48. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.11.058.
217. Overby H. Indomethacin Promotes Browning and Brown Adipogenesis in Both Murine and Human Fat Cells / H. Overby, Y. Yang, X. Xu, S. Wang, L. Zhao // *Pharmacol. Res. Perspect.* – 2020. – V. 8. – P. e00592. doi:10.1002/prp2.592.
218. Vasileva L.A. Micellar Nanocontainers Based on Cationic Surfactants with a Pyrrolidinium Head Group for Increasing Drug Bioavailability / L.A. Vasileva, D.A. Kuznetsova, F.G. Valeeva, E.A. Vasilieva, S.S. Lukashenko, G.A. Gaynanova, L.Ya. Zakharova // *Russ. Chem. Bull.* – 2021. – V. 70. – P. 1341-1348. doi:10.1007/s11172-021-3221-4.
219. Chauhan V. Synthesis, Physical Properties and Cytotoxic Assessment of Ester-Terminated Gemini Imidazolium Surfactants / V. Chauhan, M. Kumar, I. Soni, P. Shandilya, S. Singh // *J. Mol. Liq.* – 2023. – V. 387. – P. 122645. doi:10.1016/j.molliq.2023.122645.
220. Choi Y.J. New Gemini Surfactants with Two Azobenzene Groups Controlled by Light Irradiation / Y.J. Choi, N.-K. Kim, Y.-W. Kim, J.-H. Kim, H.-C. Kang // *J. Ind. Eng. Chem.* – 2023. – V. 125. – P. 303-316. doi:10.1016/j.jiec.2023.05.040.
221. Asadov Z.H. Surface Properties and Premicellar Aggregation Behavior of Cationic Gemini Surfactants with Mono- and Di-(2-Hydroxypropyl)Ammonium Head Groups / Z.H. Asadov, G.A. Ahmadova, R.A. Rahimov, S.-Z.F. Hashimzade, S.M. Nasibova, E.H. Ismailov, S.A. Suleymanova, S.A. Muradova, N.Z. Asadova, F.I. Zubkov // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2019. – V. 575. – P. 212-221. doi:10.1016/j.colsurfa.2019.05.019.
222. Borse M.S. Dependence of Aggregation Behavior and Physicochemical Properties of Bis-Cationic Surfactants on the Polarity of Surfactant Head Group / M.S. Borse, S. Devi // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2004. – V. 245. – P. 1-8. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.06.019.
223. Lu T. Surface Properties, Aggregation Behavior and Micellization Thermodynamics of a Class of Gemini Surfactants with Ethyl Ammonium Headgroups / T. Lu, Y. Lan, C. Liu, J. Huang, Y. Wang // *J. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 377. – P. 222-230. doi:10.1016/j.jcis.2012.03.044.

224. Ao M. Synthesis and Properties of Ionic Liquid-Type Gemini Imidazolium Surfactants / M. Ao, G. Xu, Y. Zhu, Y. Bai // *J. Colloid Interface Sci.* – 2008. – V. 326. – P. 490-495. doi:10.1016/j.jcis.2008.06.048.
225. Lianos P. Fluorescence Probe Studies of the Effect of Concentration on the State of Aggregation of Surfactants in Aqueous Solution / P. Lianos, R. Zana // *J. Colloid Interface Sci.* – 1981. – V. 84. – P. 100-107. doi:10.1016/0021-9797(81)90263-0.
226. Liang Y. Synthesis and Physicochemical Characterization of Chiral Pyrrolidinium-Based Surfactants / Y. Liang, D. Liang, Z. Hu, D. Cao // *J. Dispersion Sci. Technol.* – 2015. – V. 36. – P. 831-837. doi:10.1080/01932691.2014.926252.
227. Zhong X. Cationic Gemini Surfactants Based on Adamantane: Synthesis, Surface Activity and Aggregation Properties / X. Zhong, J. Guo, L. Feng, X. Xu, D. Zhu // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2014. – V. 441. – P. 572-580. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.10.016.
228. Tehrani-Bagha A.R. Cationic Ester-Containing Gemini Surfactants: Determination of Aggregation Numbers by Time-Resolved Fluorescence Quenching / A.R. Tehrani-Bagha, J. Kärnbratt, J.-E. Löfroth, K. Holmberg // *J. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 376. – P. 126-132. doi:10.1016/j.jcis.2012.02.053.
229. Amerkhanova S.K. Antimicrobial Properties and Cytotoxic Effect of Imidazolium Geminis with Tunable Hydrophobicity / S.K. Amerkhanova, A.D. Voloshina, A.B. Mirgorodskaya, A.P. Lyubina, D.A. Kuznetsova, R.A. Kushnazarova, V.A. Mikhailov, L.Ya. Zakharova // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – P. 13148. doi:10.3390/ijms222313148.
230. Fatma N. Ester-Bonded Cationic Gemini Surfactants: Assessment of Their Cytotoxicity and Antimicrobial Activity / N. Fatma, M. Panda, Kabir-ud-Din, M. Beg // *J. Mol. Liq.* – 2016. – V. 222. – P. 390-394. doi:10.1016/j.molliq.2016.07.044.
231. Zakharova L.Ya. Structural, Biocomplexation and Gene Delivery Properties of Hydroxyethylated Gemini Surfactants with Varied Spacer Length / L.Ya. Zakharova, D.R. Gabdrakhmanov, A.R. Ibragimova, E.A. Vasilieva, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, E.A. Ermakova, N.E. Gogoleva, D.A. Faizullin, A.G. Pokrovsky, V.A. Korobeynikov, S.V. Cheresiz, Y.F. Zuev // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* – 2016. – V. 140. – P. 269-277. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.12.045.
232. 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 Biosci.* – 2022. – V. 50. – P. 102003. doi:10.1016/j.fbio.2022.102003.

233. Dong W. Preparation and Characterization of Egg Yolk Immunoglobulin Loaded Chitosan-Liposome Assisted by Supercritical Carbon Dioxide / W. Dong, C. Tang, M. Xia, L. Sheng, Z. Cai // *Food Chem.* – 2022. – V. 369. – P. 130934. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130934.

234. Mahmoud D.B. Photodynamic Therapy Fortified with Topical Oleyl Alcohol-Based Transethosomal 8-Methoxypsoralen for Ameliorating Vitiligo: Optimization and Clinical Study / D.B. Mahmoud, A.N. ElMeshad, M. Fadel, A. Tawfik, S.A. Ramez // *Int. J. Pharm.* – 2022. – V. 614. – P. 121459. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121459.

235. Lim E.-B. Sphingomyelin-Based Liposomes with Different Cholesterol Contents and Polydopamine Coating as a Controlled Delivery System / E.-B. Lim, S. Haam, S.-W. Lee // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.* – 2021. – V. 618. – P. 126447. doi:10.1016/j.colsurfa.2021.126447.

236. Kovács A. Comparison of Synthetic Membranes to Heat-Separated Human Epidermis in Skin Permeation Studies *In Vitro* / A. Kovács, S. Zsikó, F. Falusi, E. Csányi, M. Budai-Szűcs, I. Csóka, S. Berkó // *Pharmaceutics.* – 2021. – V. 13. – P. 2106. doi:10.3390/pharmaceutics13122106.

237. Barel G. Potato Skin Proteome Is Enriched with Plant Defence Components / G. Barel, I. Ginzberg // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 3347-3357. doi:10.1093/jxb/ern184.

238. Keren-Keiserman A. Effects of Polyhalite Fertilization on Skin Quality of Potato Tuber / A. Keren-Keiserman, R.S. Baghel, E. Fogelman, I. Faingold, U. Zig, U. Yermiyahu, I. Ginzberg // *Front. Plant Sci.* – 2019. – V. 10. – P. 1379. doi:10.3389/fpls.2019.01379.

239. Buchenauer H. Differences in Light Stability of Some Carboxylic Acid Anilide Fungicides in Relation to Their Applicability for Seed and Foliar Treatment / H. Buchenauer // *Pestic. Sci.* – 1975. – V. 6. – P. 525-535. doi:10.1002/ps.2780060513.

240. Iesce M.R. Photochemical Behaviour of the Systemic Fungicide Carboxin. / M.R. Iesce, F. Cermola, F. De Lorenzo, M.L. Graziano, B. Caliendo // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2002. – V. 9. – P. 107–109. doi:10.1007/BF02987455.

241. Wang Z. Nanopreparations for Mitochondria Targeting Drug Delivery System: Current Strategies and Future Prospective / Z. Wang, W. Guo, X. Kuang, S. Hou, H. Liu // *Asian J. Pharm. Sci.* – 2017. – V. 12. – P. 498-508. doi:10.1016/j.ajps.2017.05.006.

242. Finichiu P.G. Mitochondrial Accumulation of a Lipophilic Cation Conjugated to an Ionisable Group Depends on Membrane Potential, pH Gradient and pK<sub>a</sub>: Implications for the Design of Mitochondrial Probes and Therapies / P.G. Finichiu, A.M. James, L. Larsen, R.A.J. Smith, M.P. Murphy // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2013. – V. 45. – P. 165-173. doi:10.1007/s10863-012-9493-5.

243. Porteous C.M. Rapid Uptake of Lipophilic Triphenylphosphonium Cations by Mitochondria *In Vivo* Following Intravenous Injection: Implications for Mitochondria-Specific Therapies and Probes / C.M. Porteous, A. Logan, C. Evans, E.C. Ledgerwood, D.K. Menon, F. Aigbirhio, R.A.J. Smith, M.P. Murphy // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* – 2010. – V. 1800. – P. 1009-1017. doi:10.1016/j.bbagen.2010.06.001.

244. Jin L. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium Conjugated Glycyrrhetic Acid Derivatives as Potent Anticancer Drugs / L. Jin, L. Dai, M. Ji, H. Wang // *Bioorg. Chem.* – 2019. – V. 85. – P. 179-190. doi:10.1016/j.bioorg.2018.12.036.

245. Ma L. Rational Design, Synthesis and Biological Evaluation of Triphenylphosphonium-Ginsenoside Conjugates as Mitochondria-Targeting Anti-Cancer Agents / L. Ma, X. Wang, W. Li, T. Li, S. Xiao, J. Lu, J. Xu, Y. Zhao // *Bioorg. Chem.* – 2020. – V. 103. – P. 104150. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104150.

246. 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.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *J. Mol. Liq.* – 2021. – V. 330. – P. 115703. doi:10.1016/j.molliq.2021.115703.

247. Vasileva L. Mitochondria-Targeted Lipid Nanoparticles Loaded with Rotenone as a New Approach for the Treatment of Oncological Diseases / L. Vasileva, G. Gaynanova, D. Kuznetsova, F. Valeeva, A. Lyubina, S. Amerhanova, A. Voloshina, G. Sibgatullina, D. Samigullin, K. Petrov, L. Zakharova // *Molecules.* – 2023. – V. 28. – P. 7229. doi:10.3390/molecules28207229.

248. Han M. Mitochondrial Delivery of Doxorubicin *via* Triphenylphosphine Modification for Overcoming Drug Resistance in MDA-MB-435/DOX Cells / M. Han, M.R. Vakili, H. Soleymani Abyaneh, O. Molavi, R. Lai, A. Lavasanifar // *Mol. Pharmaceutics.* – 2014. – V. 11. – P. 2640-2649. doi:10.1021/mp500038g.

249. Kumar V. Liposome Based Near-Infrared Sensors for the Selective Detection of Hydrogen Sulfide / V. Kumar, R. Sakla, N. Sharma, Kanika, R. Khan, D.A. Jose // *ChemPlusChem*. – 2023. – V. 88. – P. 202300243. doi:10.1002/cplu.202300243.
250. Kuznetsova D.A. Novel Hybrid Liposomal Formulations Based on Imidazolium-Containing Amphiphiles for Drug Encapsulation / D.A. Kuznetsova, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, L.R. Ahtamyanova, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Ya. Zakharova // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. – 2019. – V. 178. – P. 352-357. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.03.025.
251. Jia Z. Dynamic Light Scattering: A Powerful Tool for In Situ Nanoparticle Sizing / Z. Jia, J. Li, L. Gao, D. Yang, A. Kanaev // *Colloids Interfaces*. – 2023. – V. 7. – P. 15. doi:10.3390/colloids7010015.
252. Sritharan S. A Comprehensive Review on Time-Tested Anticancer Drug Doxorubicin / S. Sritharan, N. Sivalingam // *Life Sci*. – 2021. – V. 278. – P. 119527. doi:10.1016/j.lfs.2021.119527.
253. Briuglia M.-L. Influence of Cholesterol on Liposome Stability and on *In Vitro* Drug Release / M.-L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou // *Drug Deliv. Transl. Res*. – 2015. – V. 5. – P. 231-242. doi:10.1007/s13346-015-0220-8.
254. Ibarra-Gutiérrez M.T. Rotenone-Induced Model of Parkinson's Disease: Beyond Mitochondrial Complex I Inhibition / M.T. Ibarra-Gutiérrez, N. Serrano-García, M. Orozco-Ibarra // *Mol. Neurobiol*. – 2023. – V. 60. – P. 1929-1948. doi:10.1007/s12035-022-03193-8.
255. Shi G. AZD5438 a GSK-3a/b and CDK Inhibitor Is Antiapoptotic Modulates Mitochondrial Activity and Protects Human Neurons from Mitochondrial Toxins / G. Shi, H. Scott, N.I.F.M. Azhar, A. Gialeli, B. Clennell, K.S. Lee, J. Hurcombe, D. Whitcomb, R. Coward, L.-F. Wong, O. Cordero-Llana, J. B. Uney // *Sci. Rep*. – 2023. – V. 13. – P. 8334. doi:10.1038/s41598-023-35480-2.
256. Jain A. *In Vitro* Release Kinetics Model Fitting of Liposomes: An Insight // A. Jain, S.K. Jain // *Chem. Phys. Lipids*. – 2016. – V. 201. – P. 28–40. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.10.005.
257. Dash S. Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems / S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury // *Acta Pol. Pharm*. – 2010. – V. 67. – № 3. – P. 217–223.

258. Ang S.-S. Encapsulation of Hydrophobic Apigenin into Small Unilamellar Liposomes Coated with Chitosan Through Ethanol Injection and Spray Drying / S.-S. Ang, Y.Y. Thoo, L.F. Siow // *Food Bioproc. Tech.* – 2023. – P. 1–16. doi:10.1007/s11947-023-03140-y.
259. Gautam N. A High Content Imaging Flow Cytometry Approach to Study Mitochondria in T Cells: MitoTracker Green FM Dye Concentration Optimization / N. Gautam, S. Sankaran, J.A. Yason, K.S.W. Tan, N.R.J. Gascoigne // *Methods.* – 2018. – V. 134–135. – P. 11–19. doi:10.1016/j.ymeth.2017.11.015.
260. Profillidis V.A. Statistical Methods for Transport Demand Modeling / V.A. Profillidis, G.N. Botzoris // *Modeling of Transport Demand.* – Elsevier, 2019. – P. 163–224. ISBN 978-0-12-811513-8.
261. Zakharova L. Recent Nanoscale Carriers for Therapy of Alzheimer's Disease: Current Strategies and Perspectives / L. Zakharova, G. Gaynanova, E. Vasilieva, L. Vasileva, R. Pavlov, R. Kashapov, K. Petrov, O. Sinyashin // *Curr. Med. Chem.* – 2023. – V. 30. – P. 3743–3774. doi:10.2174/0929867330666221115103513.
262. Burns S. Therapeutics of Alzheimer's Disease: Recent Developments / S. Burn, A. Selman, U. Sehar, P. Rawat, A.P. Reddy, P.H. Reddy // *Antioxidants.* – 2022. – V. 11. – P. 2402. doi:10.3390/antiox11122402.
263. Atlante A. Therapeutic Potential of Targeting Mitochondria for Alzheimer's Disease Treatment / A. Atlante, G. Amadoro, V. Latina, D. Valenti // *J. Clin. Med.* – 2022. – V. 11. – P. 6742. doi:10.3390/jcm11226742.
264. Rehman M.U. Mitochondrial Dysfunctions, Oxidative Stress and Neuroinflammation as Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases: An Update on Current Advances and Impediments / M.U. Rehman, N. Sehar, N.J. Dar, A. Khan, A. Arafah, S. Rashid, S.M. Rashid, M.A. Ganaie // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2023. – V. 144. – P. 104961. doi:10.1016/j.neubiorev.2022.104961.
265. Friedland-Leuner K. Mitochondrial Dysfunction: Cause and Consequence of Alzheimer's Disease / K. Friedland-Leuner, C. Stockburger, I. Denzer, G.P. Eckert, W.E. Müller // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2014. – V. 127. – P. 183–210. doi: 10.1016/B978-0-12-394625-6.00007-6.
266. Carreiras M. The Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease for Developing Potential Therapeutics / M. Carreiras, E. Mendes, M. Perry, A. Francisco, J. Marco-Contelles // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2013. – V. 13. – P. 1745–1770. doi:10.2174/15680266113139990135.

267. Cummings J.L. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options / J.L. Cummings, G. Tong, C. Ballard // *J. Alzheimer's Dis.* – 2019. – V. 67. – P. 779–794. doi:10.3233/JAD-180766.
268. Ren J. Hydrophilic Hindering and Hydrophobic Growing: A Vesicle Glycometabolism Multi-Drug Combination Therapeutic against Alzheimer's Disease / J. Ren, F. Jiang, S. Wang, H. Hu, B. Zhang, Y.P. Zhao, L. Chen, Z. Lv, F. Dai // *Biomater. Sci.* – 2021. – V. 9. – P. 6444–6460. doi:10.1039/D1BM00696G.
269. Zeng H. Romidepsin and Metformin Nanomaterials Delivery on Streptozocin for the Treatment of Alzheimer's Disease in Animal Model / H. Zeng, L. Xu, Y. Zou, S. Wang // *Biomed. Pharmacother.* – 2021. – V. 141. – P. 111864. doi:10.1016/j.biopha.2021.111864.
270. Yang X. Intranasal Delivery of BACE1 siRNA and Rapamycin by Dual Targets Modified Nanoparticles for Alzheimer's Disease Therapy / X. Yang, W. Yang, X. Xia, T. Lei, Z. Yang, W. Jia, Y. Zhou, G. Cheng, H. Gao // *Small.* – 2022. – V. 18. – P. 2203182. doi:10.1002/sml.202203182.
271. Deardorff W.J. A Fixed-Dose Combination of Memantine Extended-Release and Donepezil in the Treatment of Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease / W.J. Deardorff, G. Grossberg // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2016. – V. 10. – P. 3267–3279. doi:10.2147/DDDT.S86463.
272. Jayachandran P. Green Synthesized Silver Nanoparticle-Loaded Liposome-Based Nanoarchitectonics for Cancer Management: *In Vitro* Drug Release Analysis / P. Jayachandran, S. Ilango, V. Suseela, R. Nirmaladevi, M.R. Shaik, M. Khan, M. Khan, B. Shaik // *Biomedicines.* – 2023. – V. 11. – P. 217. doi:10.3390/biomedicines11010217.
273. Ahmad E. Evidence of Nose-to-Brain Delivery of Nanoemulsions: Cargoes but Not Vehicles / E. Ahmad, Y. Feng, J. Qi, W. Fan, Y. Ma, H. He, F. Xia, X. Dong, W. Zhao, Y. Lu // *Nanoscale.* – 2017. – V. 9. – P. 1174–1183. doi:10.1039/C6NR07581A.
274. Al Asmari A.K. Preparation, Characterization, and *In Vivo* Evaluation of Intranasally Administered Liposomal Formulation of Donepezil / A.K. Al Asmari, Z. Ullah, M. Tariq, A. Fatani // *Drug Des. Dev. Ther.* – 2016. – V. 10. – P. 205–215. doi:10.2147/DDDT.S93937.
275. Khunt D. Role of Omega-3 Fatty Acids and Butter Oil in Targeting Delivery of Donepezil Hydrochloride Microemulsion to Brain *via* the Intranasal Route: A Comparative

Study / D. Khunt, M. Shrivastava, S. Polaka, P. Gondaliya, M. Misra // AAPS PharmSciTech. – 2020. – V. 21. – P. 45. doi:10.1208/s12249-019-1585-7.

276. Yasir M. Solid Lipid Nanoparticles for Nose to Brain Delivery of Donepezil: Formulation, Optimization by Box–Behnken Design, *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation / M. Yasir, U.V.S. Sara, I. Chauhan, P.K. Gaur, A.P. Singh, D. Puri, Aameeduzzafar // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. – 2017. – P. 1–14. doi:10.1080/21691401.2017.1394872.

277. Burilova E.A. Bi-Functional Sterically Hindered Phenol Lipid-Based Delivery Systems as Potential Multi-Target Agents against Alzheimer's Disease *via* an Intranasal Route / E.A. Burilova, T.N. Pashirova, I.V. Zueva, E.M. Gibadullina S.V. Lushchekina, A.S. Sapunova, R.M. Kayumova, A.M. Rogov, V.G. Evtjugin, I.A. Sudakov, A.B. Vyshtakalyuk, A.D. Voloshina, S.V. Bukharov, A.R. Burilov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // Nanoscale. – 2020. – V. 12. – P. 13757–13770. doi:10.1039/D0NR04037A.

**СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ**

- 2-РАМ – пиридин-2-альдоксима метохлорид, пралидоксима хлорид
- A $\beta$  – бета-амилоид
- СВХ – карбоксин
- Chang liver – клетки здоровой печени человека
- DNP – донепезила гидрохлорид
- DOPE-RhB – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиссамин родамин Б сульфонил) (аммониевая соль)
- DOX – доксорубицина гидрохлорид
- E PC S – яичный фосфатидилхолин
- EE – эффективность инкапсулирования
- Flu – флуоресцеин
- HuTu 80 – клетки опухоли двенадцатиперстной кишки
- IND – индометацин
- n-12-n(Et) – N,N'-диалкил-N,N'-бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)-N,N'-диметилдодекан-1,12-диаммоний дибромид
- PANC-1 – клетки карциномы поджелудочной железы
- PBS – натрий-фосфатный буфер
- POX – параоксон
- RhB – родамин Б
- ROT – ротенон
- S75 – яичный фосфатидилхолин
- ТОС –  $\alpha$ -токоферол
- АХЭ – ацетилхолинэстераза
- Бридж®35 – полиоксиэтилен (23) лауриловый эфир
- БуХЭ – бутирилхолинэстераза
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ДАБКО – 1,4-диазабцикло[2.2.2]октан
- ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин
- ДРС – динамическое рассеяние света
- ДФГ – 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

МБК – минимальная бактерицидная концентрация

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МФК – минимальная фунгицидная концентрация

ООТ – Оранжевый ОТ

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

Твин®20 – полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат

ТФФ – трифенилфосфоний

ТФФБ-п – п-алкилтрифенилфосфоний бромид

ФОС – фосфорорганические соединения

ФХ – фосфатидилхолин

Хол – холестерин

ЦПБ – цетилпиридиний бромид

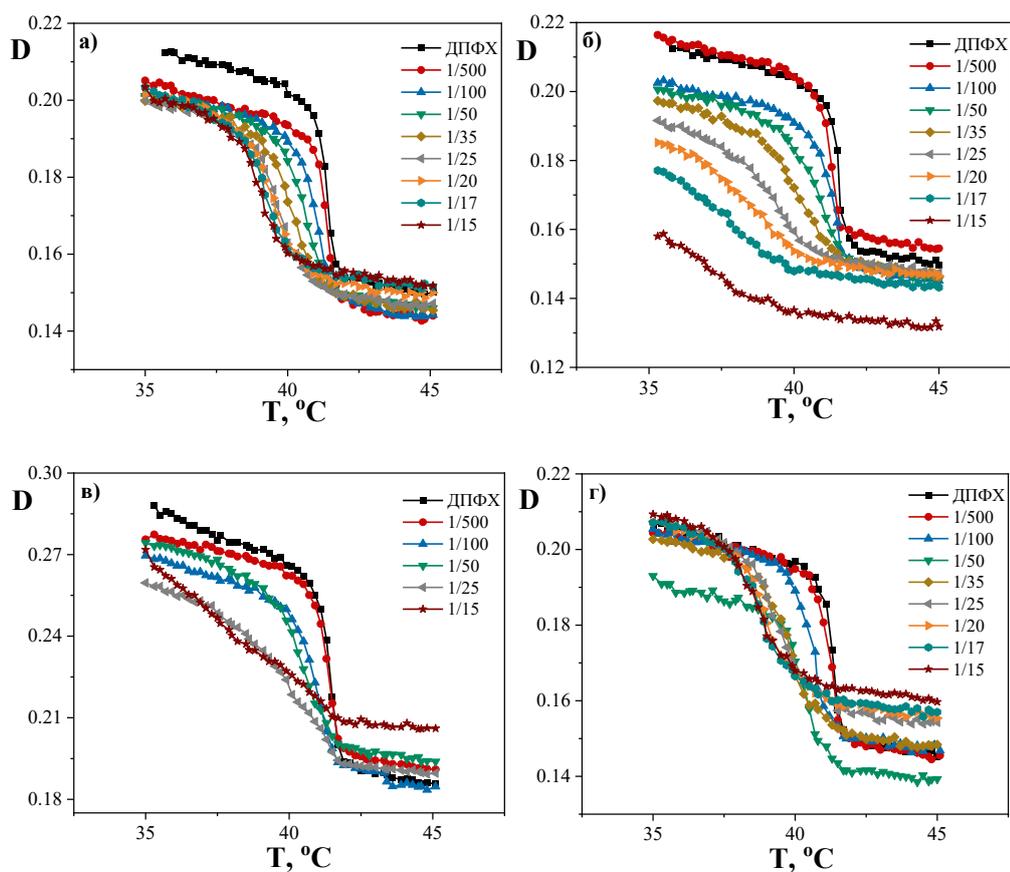
## ПРИЛОЖЕНИЕ

**Таблица П1.** Значения коэффициента экстинкции ( $\varepsilon$ ) и длин волн максимума поглощения ( $\lambda_{\max}$ ) индометацина для смешанных систем ТФФБ-16/Бридж®35 в условиях варьирования доли катионного ПАВ ( $\alpha_1$  – доля катионного ПАВ).

$\alpha_1$	0	0.3	0.5	0.7	1
$\lambda_{\max}$ , нм	321	326	326	326	328
$\varepsilon$ , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	6800	6350	6350	6540	6420

**Таблица П2.** Значения коэффициента экстинкции ( $\varepsilon$ ) и длин волн максимума поглощения ( $\lambda_{\max}$ ) индометацина для дикатионных карбаматсодержащих ПАВ с додекановым спейсером.

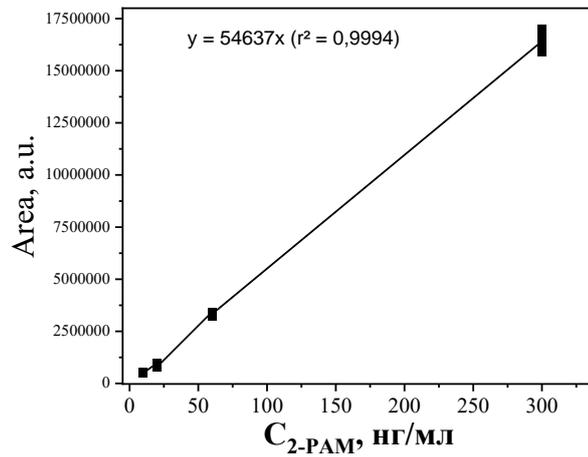
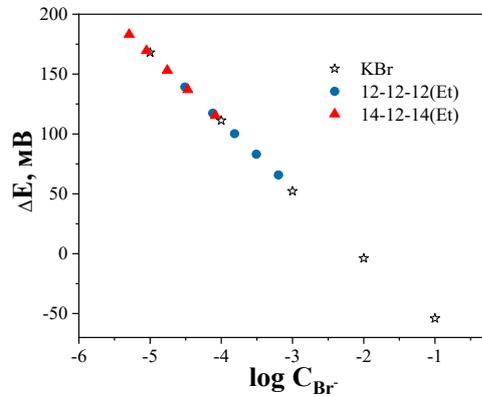
n-12-n(Et)	10-12-10(Et)	12-12-12(Et)	14-12-14(Et)
$\lambda_{\max}$ , нм	324	322	320
$\varepsilon$ , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	5931	5829	5419



**Рисунок П1.** Турбидиметрические графики для а) 10-12-10(Et)/ДПФХ; б) 12-12-12(Et)/ДПФХ; в) 14-12-14(Et)/ДПФХ; г) 12-6-12(Et)/ДПФХ при различных мольных соотношениях ПАВ/ДПФХ.

**Таблица ПЗ.** Гемолитическая активность трансферсом, загруженных 2-РАМ.

Система	Гемолиз, %				
	С <sub>ФХ</sub> , мМ				
	5.0	2.5	1.25	0.63	0.31
ФХ/2-РАМ	16.6	9.9	4.6	2.2	0.0
ФХ/Твин®20/2-РАМ	15.8	8.2	3.7	1.7	0.0

**Рисунок П2.** Калибровочный график для 2-РАМ в плазме крыс.**Рисунок ПЗ.** Изменение электродного потенциала ( $\Delta E$ ) от концентрации  $Br^-$  противоионов для растворов KBr, 12-12-12(Et) и 14-12-14(Et) при 25 °С.