

ISSN 0023-2912

Том 85, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



КОЛЛОИДНЫЙ ЖУРНАЛ

www.sciencejourn.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, номер 5, 2023

Коллоидные объекты в биомедицине: современные тенденции и перспективы <i>Е. В. Кузнецова, Н. М. Кузнецов</i>	551
Динамические свойства монослоев легочных липидов на поверхности растворов полистиролсульфоната натрия и полидиаллилдиметиламмония хлорида <i>А. Г. Быков, М. А. Панаева</i>	556
Стимул-чувствительные системы для доставки лекарств на основе бислойных липидных везикул: новые тенденции <i>А. А. Ефимова, А. В. Сыбачин</i>	566
Влияние старения ультрамалых наночастиц золота на их взаимодействие с холестерическими микрочастицами ДНК <i>М. А. Климович, М. А. Колыванова, О. В. Дементьева, О. Н. Климович, В. М. Рудой, В. А. Кузьмин, В. Н. Морозов</i>	583
Коллоидные системы доставки этопозида на основе биodeградируемых полимерных носителей (обзор литературы) <i>М. А. Меркулова, Н. С. Осипова, А. В. Калистратова, Ю. В. Ермоленко, С. Э. Гельперина</i>	593
Наноэмульсии и твердые липидные наночастицы с инкапсулированным доксорубицином и тимохиноном <i>Е. В. Мищенко, А. М. Гилёва, Е. А. Марквичева, М. Ю. Королева</i>	619
Микроэмульсии лецитина как носители лекарственных веществ <i>Н. М. Мурашова</i>	629
Влияние биологической загрязненности медных поверхностей с экстремальным смачиванием на их антибактериальные свойства <i>Ф. Ш. Омран, В. В. Каминский, К. А. Емельяненко, А. М. Емельяненко, Л. Б. Бойнович</i>	641
Концентрация наночастиц как важный параметр для характеристики дисперсий и ее применение в биомедицине <i>Т. Н. Паширова, З. М. Шайхутдинова, Э. Б. Соуто, П. Массон, В. Ф. Миронов</i>	655
Ферментоподобная активность коллоидных растворов диоксида церия, стабилизированных L-яблочной кислотой <i>А. Д. Филиппова, А. Е. Баранчиков, В. К. Иванов</i>	668
Биосовместимые гидрогели на основе биоразлагаемых полиэфиров и их сополимеров <i>Ю. С. Фомина, А. С. Семкина, Ю. Д. Загоскин, М. М. Алексанян, С. Н. Чвалун, Т. Е. Григорьев</i>	682
Липидные наночастицы для инкапсулирования и доставки лютеина <i>А. Д. Широких, Ю. А. Гурулева, Е. А. Маринец, М. Ю. Королева</i>	705

УДК 541.18:544.77

КОЛЛОИДНЫЕ ОБЪЕКТЫ В БИОМЕДИЦИНЕ: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2023 г. Е. В. Кузнецова¹, *, Н. М. Кузнецов¹, **

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
пл. Академика Курчатова, д. 1, Москва, 123128 Россия

*e-mail: kuznetsova.kate992@gmail.com

**e-mail: kyz993@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.08.2023 г.

После доработки 13.08.2023 г.

Принята к публикации 13.08.2023 г.

Обзор содержит историческую справку о становлении биомедицины как науки и роли коллоидных объектов в ней, а также включает в себя краткое содержание обзорных и исследовательских статей, вошедших в специальный выпуск.

DOI: 10.31857/S0023291223600748, EDN: DHOVNA

Биомедицина — молодая и быстро развивающаяся наука. Термин “биомедицина” возник лишь в начале XX века: согласно 12-му изданию медицинского словаря Дорланда (1923 год), биомедицина — это клиническая медицина, основанная на принципах физиологии и биохимии [1]. Бурное развитие биомедицинской науки началось в 1950-х годах, когда она становится тесно связанной с исследованиями влияния патологических сред на организм человека: например, космоса (запуск космической программы СССР и США), радиоактивных осадков от ядерных экспериментов (первые испытания ядерного оружия) [2]. Сегодня биомедицина — это базирующаяся на фундаментальных достижениях естественных наук (физиологии, молекулярной биологии, генетики, эмбриологии, биохимии, биомеханики, бионики и пр.) направление медицины, объектом исследования которого является организм человека, его строение и функции в норме и патологии, различные патологические состояния, а также методы их диагностики и лечения.

Развитие биомедицины всегда тесным образом было связано с коллоидной химией. Особый интерес к различным коллоидным системам как материалам для биомедицины вызван тем, что коллоиды присутствуют повсеместно в теле человека (клетки, межклеточная жидкость, кровь). Рассмотрение человеческого организма с точки зрения коллоидной химии отражает известный афоризм чл.-корр. АН СССР Ивана Ивановича Жукова: “Человек — ходячий коллоид”. Коллоиды, состоящие из распределенных в дисперсионной среде дискретных частиц, капель или пузырь-

ков дисперсной фазы, размер которых в одном из измерений составляет от 1 до 1000 нм, могут оказывать на человека как положительное, так и неблагоприятное воздействие. Поэтому исследование поведения различных коллоидных систем в организме является принципиально важной научной задачей. Имеющиеся на данный момент теоретические основы образования, разрушения и устойчивости дисперсных систем позволяют регулировать структуру и физико-химические свойства коллоидных объектов в зависимости от поставленных биомедицинских задач. Так, например, активное применение находят гели и губчатые полимерные материалы для замещения мягких тканей. Металлические наночастицы и комплексы тяжелых металлов используют в качестве контрастирующих агентов для магнитно-резонансной томографии. Однако, более всего фокус исследователей смещен в область нано- и микро- размерных систем адресной доставки лекарств — капсул, мицелл, липосом и др. Объединение подходов визуализации и терапии при создании носителей привело к активному развитию тераностики.

Применение коллоидных объектов в качестве средств доставки различных биологически-активных веществ (БАВ), в том числе лекарственных препаратов, открыло новые перспективы в повышении биодоступности последних. Многочисленные исследовательские работы, проводимые как зарубежными, так и российскими научными группами, показали, что наноразмерные частицы быстро захватываются фагоцитирующими клетками и аккумулируются в легких, печени, селезенке, лимфоузлах и прочих органах с высоким содержа-

нием макрофагальных элементов, что объясняет высокую эффективность наночастиц с химиотерапевтическими средствами при лечении различных заболеваний [3].

Коллоидный журнал регулярно знакомит широкую аудиторию читателей с работами по применению дисперсных систем в различных областях, в том числе и биомедицине [4–14]. Специальный выпуск “Коллоидные объекты в биомедицине”, подготовленный редакционной коллегией журнала, объединил в себе как обзорные, так и исследовательские работы, в которых авторы уделили внимание разнообразным коллоидным системам, в том числе бислойным липидным везикулам (липосомам), липидным наночастицам, полимерным наночастицам, мицеллам, наноэмульсиям, липидным монослоям на границе жидкость/воздух, металлическим и неорганическим наночастицам, гидрогелям, а также поверхностям с иерархической шероховатостью и экстремальным смачиванием. Ниже представлен краткий обзор каждой из работ, вошедших в выпуск.

В работе [15] Быков с соавт. исследовали динамические поверхностные свойства модельных систем на основе цвиттер-ионного фосфолипида дипальмитоил фосфатидилхолина (ДПФХ) на поверхности растворов полиэлектролитов, имитирующих свойства легочных поверхностно-активных веществ (ПАВ). Легочные ПАВ, состоящие из многокомпонентной смеси липидов и белков, играют важную роль при дыхании, так как препятствуют слипанию стенок альвеол за счет снижения поверхностного натяжения на границе жидкость/воздух. Известно, что уменьшение поверхностного натяжения на границе жидкость/воздух происходит за счет образования липидно-белковых комплексов, однако механизм их образования, а также природа взаимодействий липидов и белков до сих пор до конца не изучена. Проведенные авторами исследования позволили установить, что электростатических взаимодействий между липидом и полиэлектролитом недостаточно для образования комплексов липид/полиэлектролит, способных поддерживать низкие значения поверхностного натяжения при деформациях. Кроме того, поверхностной активности полиэлектролита и гидрофобных взаимодействий между поли(стиролсульфонатом) и ДПФХ также оказалось недостаточно для образования комплексов.

Обзорная статья Ефимовой и Сыбачина [16] посвящена обсуждению современных тенденций в создании стимул-чувствительных коллоидных систем на основе липидных бислойных везикул (липосом) для адресной доставки различных БАВ с регулируемой скоростью их высвобождения. Отметим, что разработка носителей БАВ, способных контролируемо высвобождать загруженное вещество под воздействием определенного внеш-

него стимула (изменения температуры и/или pH, приложения электромагнитного поля, облучения и пр.), является актуальной задачей в биомедицине на протяжении уже нескольких десятилетий. Липосомы, способные под внешним воздействием изменять структуру, размер, поверхностный заряд, фазовое состояние и др., успели зарекомендовать себя как перспективные средства доставки БАВ для лечения онкологических и инфекционных заболеваний. Обзор включает в себя несколько разделов, которые посвящены термо-, фото-, редокс-, pH- и магниточувствительным липосомам, а также применению последних в терапии.

Работа Климович и соавт. [17] посвящена исследованию влияния “возраста” ультрамалых наночастиц золота (2.5–3.5 нм), синтезированных методом Даффа, на их взаимодействие с частицами холестерической жидкокристаллической дисперсии (ХЖКД) ДНК. Известно, что введение металлических наночастиц в ХЖКД ДНК может приводить как к расширению функциональных возможностей последних, так и оказывать негативное влияние на упорядочение молекул ДНК. Авторы показали, что ультрамалые наночастицы золота, хранившиеся 6 и 12 месяцев, способствуют большей деструкции структуры частиц ХЖКД ДНК по сравнению с золотыми наночастицами, срок хранения которых составлял 1 месяц. Наблюдаемый эффект может быть связан не только с постепенным переходом кристаллической структуры исследуемых металлических наночастиц из квазиметаллического состояния в металлическое, но и с изменением в течение времени химии их поверхности.

В обзоре Меркуловой и соавт. [18] рассмотрены различные коллоидные системы на основе биodeградируемых полимерных носителей, применяемые для адресной доставки этопозида — противоопухолевого препарата широкого спектра действия. Использование наносомальных форм этопозида позволяет повысить его растворимость в физиологической среде, биодоступность, а также снизить нежелательные побочные эффекты, к которым относятся миелосупрессия (лейкопения и тромбоцитопения). В обзоре обсуждаются такие коллоидные носители для доставки этопозида как твердотельные наночастицы на основе синтетических (поли(лактид-*co*-гликолид), поли(ε-капролактон) и др.) и природных (сывороточный альбумин, хитозан и пр.) полимеров, а также различные полимерные мицеллы, обладающие значительным потенциалом для повышения противоопухолевой активности препарата. Особое внимание в представленном обзоре авторы уделяют взаимосвязи физико-химических свойств наносомальных форм этопозида и их поведения в организме, а также технологическим подходам, позволяющим регулировать параметры носителей.

В работе [19] Мищенко и соавт. получили наноэмульсии (НЭ) на основе парафинового масла, а также твердые липидные наночастицы (ТЛН) на основе стеариновой кислоты, стабилизированные ПАВ (а именно, Tween 60 и Span 60), характеризующиеся высокой агрегативной устойчивостью (более 90 сут) и низкой цитотоксичностью на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека (MCF7) и рака толстой кишки человека (HTC116). В свою очередь, широко известные противоопухолевые препараты доксорубин и тимохинон, загруженные в полученные НЭ и ТЛН, обладали большим цитотоксическим эффектом по сравнению со свободными лекарственными агентами. Кроме того, авторы показали, что синтезированные в работе НЭ и ТЛН с размером порядка 30 и 50 нм соответственно, успешно накапливаются в ядрах раковых клеток линии глиомы головного мозга крысы (C6) и MCF7 уже через час после инкубирования, что является преимуществом подобных систем в рамках доставки противоопухолевых препаратов.

Обзорная статья Мурашовой [20] посвящена одному из типов лиофильных коллоидных систем — микроэмульсиям (МЭ) на основе биосовместимого ПАВ лецитина. Благодаря самопроизвольному образованию (при определенных условиях) и высокой термодинамической стабильности подобные системы могут выступать в качестве перспективных средств доставки различных БАВ. Однако их применение в биомедицинской области часто ограничено вследствие использования на этапе формирования МЭ токсичных со-ПАВ в высокой концентрации (как правило, массовое соотношение лецитин : со-ПАВ составляет 1 : 1) и/или не биосовместимых масел. В обзоре подробно рассмотрены различные стратегии, направленные на снятие ограничений по применению МЭ на основе лецитина в медицине, в том числе использование природных (рапсового, подсолнечного, оливкового и пр.) и синтетических (коммерческих “МСТ”, “Pescol” и др.) биосовместимых масел, применение менее токсичных со-ПАВ (например, коммерчески доступных Brij 96V, Tween 80, Тритон X-100 и пр.) вместо короткоцепочечных алифатических спиртов, кислот и аминов. Показаны возможные применения МЭ лецитина для местной анестезии и трансдермальной доставки различных лекарственных веществ.

Статья Омрана и соавт. [21] посвящена исследованию влияния биологической загрязненности медных поверхностей с экстремальным смачиванием на их антибактериальные свойства. Работа направлена на решение одной из актуальных проблем современной медицины, а именно, поиск и разработку материалов, обладающих бактерицидным действием по отношению к бактериальным инфекциям или препятствующих передаче бактерий, попадающих на их поверхность, при со-

прикосновении с ними. Авторы показали, что синергизм антибактериальных свойств меди и особенностей поверхностей с иерархической шероховатостью является перспективным решением в рамках борьбы с внутрибольничными инфекциями. Так, бактерицидная эффективность контрольных медных и супергидрофильных медных пластин, а также напыленных медных пленок по отношению к штамму *Staphylococcus aureus* оказалась близка к 100% и не менялась после их загрязнения пептонным раствором (имитация белкового загрязнения) и потожировыми выделениями. В свою очередь, супергидрофобные медные поверхности (угол смачивания равен $170.7 \pm 0.25^\circ$) обладали меньшей бактерицидной эффективностью, однако вследствие эффекта несмачиваемости и низкой адгезии клеток к поверхности дольше оставались не контаминированными, что также делает их перспективными материалами в рамках борьбы с внутрибольничными инфекциями.

Обзор Пашировой и соавт. [22] посвящен обсуждению такого важного параметра коллоидных дисперсий как концентрация наночастиц и его значения для биомедицинского применения подобных систем. Поскольку концентрация вводимых в организм наночастиц влияет на различные биологические эффекты, в том числе образование белковой короны, поглощение и интернализацию с клетками и пр., прецизионное определение концентрации наночастиц крайне важно при их использовании в рамках диагностики и/или терапии *in vivo*. В работе подробно описаны преимущества и недостатки различных методов определения концентрации наночастиц, таких как микроскопия, оптические методы, в том числе УФ-видимая спектроскопия, турбидиметрия, динамическое рассеяние света и анализ траектории частиц, гравиметрия, а также их комбинаций.

Работа Филипповой с соавт. [23] направлена на получение агрегативно устойчивых водных коллоидных растворов диоксида церия. Нанокристаллический CeO_2 и материалы на его основе находят свое применение в различных биомедицинских областях (в качестве контрастирующих агентов, компонентов противораковых препаратов и пр.) благодаря прекрасной биосовместимости CeO_2 , его избирательной цитотоксичности, а также ферментоподобной активности. Однако, стабилизация водных золей нанокристаллического CeO_2 по-прежнему остается актуальной задачей, для решения которой авторы предлагают использовать биосовместимый лиганд L-яблочную кислоту, обладающую антиоксидантной активностью. В работе успешно получены устойчивые водные золи CeO_2 , стабилизированные L-яблочной кислотой в различных мольных соотношениях лиганд : CeO_2 (соотношение варьировали от 0.2 до 2), обладающие ферментоподобной активностью

по отношению к пероксиду водорода. Кроме того, показано, что наночастицы CeO_2 , модифицированные L-яблочной кислотой, обладают большей энзимоподобной активностью (до 4.5 раз в зависимости от соотношения лиганд : CeO_2) по сравнению с немодифицированными наночастицами CeO_2 .

Работа Широких с соавт. [24] посвящена получению и изучению агрегативной устойчивости биосовместимых НЭ на основе углеводородного масла, ТЛН на основе стеариновой кислоты, а также наноструктурированных липидных наночастиц, содержащих углеводородное масло и стеариновую кислоту (массовое соотношение компонентов смеси 1 : 1). Авторы показали, что исследуемые системы, стабилизированные ПАВ Tween 60 и Span 60, устойчивы к агрегации более 30 сут, кроме того, инкапсулирование липофильного лекарственного агента лютеина в полученные частицы не приводит к снижению их агрегативной устойчивости. Важным результатом с практической точки зрения является рост биодоступности инкапсулированного в наночастицы лютеина по сравнению со свободным препаратом, которую оценивали по их влиянию на восстановление скорости кровотока девятидневных куриных эмбрионов при моделировании гемической гипоксии. После нанесения НЭ, ТЛН, а также наноструктурированных липидных наночастиц, нагруженных лютеином, в течение 5–10 мин наблюдали тенденцию к восстановлению скорости кровотока, что показывает перспективность исследуемых систем для доставки липофильных лекарственных агентов.

Обзорная статья Фоминой и соавт. [25] посвящена гидрогелям на основе амфифильных блочных сополимеров поли(этиленгликоля) (ПЭГ) и поли(лактида), а также ПЭГ и поли(лактида-со-гликолида), которые являются перспективными материалами для различных биомедицинских применений. В обзоре подробно освещены вопросы синтеза биосовместимых сополимеров — основы гидрогелей, способов получения гидрогелей, взаимосвязи их физико-химических, механических свойств и молекулярного состава сополимеров, а также рассмотрены конкретные применения гидрогелевых материалов на практике в качестве имплантатов мягких тканей, средств адресной доставки лекарств, материалов для трехмерной печати.

В заключение хотелось бы отметить, что, к сожалению, в рамках одного специального выпуска невозможно охватить все тематики, связывающие коллоидную химию и биомедицину. Число отечественных научных групп, активно работающих в области применения коллоидных систем как материалов для биомедицины, существенно больше количества статей, вошедших в выпуск.

Тем не менее, представленные здесь обзоры и оригинальные работы позволяют оценить широту и междисциплинарность обсуждаемого направления, а также обозначить канву современных тенденций и перспективных направлений исследования. Надеемся, что публикация данного выпуска будет способствовать тесному сотрудничеству ученых физико-химиков, работающих по коллоидной тематике, и исследователей в области биомедицины, а также дальнейшему обсуждению коллоидных систем как современных материалов для биомедицины на страницах Коллоидного журнала.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dorland W.A.N. The American Illustrated Medical Dictionary (12th ed.). Philadelphia and London: W.B. Saunders, 1924.
2. Cambrosio A., Keating P. Biomedical sciences and technology: History and sociology // International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences, 2001. P. 1222–1226.
<https://doi.org/10.1016/B0-08-043076-7/03143-0>
3. Каркищенко Н.Н. Становление и развитие биомедицины // Биомедицина. 2006. Т. 2. С. 5–17.
4. Задымова Н.М., Куруленко В.В. Наноземульсии с инкорпорированным липофильным лекарственным веществом фелодипином и микрогетерогенные полимерные адгезивные матрицы на их основе // Коллоид. журн. 2022. Т. 84. № 1. С. 23–33.
<https://doi.org/10.31857/S0023291222010141>
5. Иванова Я.О., Костромичева М.М., Офицеров Е.Н., Королева М.Ю. Наноземульсии с амарантовым и облепиховым маслами // Коллоид. журн. 2022. Т. 84. № 1. С. 34–41.
<https://doi.org/10.31857/S0023291222010049>
6. Миляева О.Ю., Рафикова А.Р. Влияние малых концентраций тромбина на динамические поверхностные свойства растворов фибриногена // Коллоид. журн. 2022. Т. 84. № 1. С. 58–66.
<https://doi.org/10.31857/S0023291222010074>
7. Салаватов Н.А., Большакова А.В., Морозов В.Н., Колыванова М.А., Исагулиева А.К., Дементьева О.В. Золотые наностержни с функционализированной органокремнеземной оболочкой: синтез и перспективы применения в тераностике опухолей // Коллоид. журн. 2022. Т. 84. № 1. С. 97–104.
<https://doi.org/10.31857/S0023291222010104>
8. Исаков Н.А., Носков Б.А. Динамические свойства смешанных пленок фуллеренола и бычьего сычужного альбумина на водной поверхности // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 1. С. 28–37.
<https://doi.org/10.31857/S0023291222600572>
9. Якупова Л.Р., Копнова Т.Ю., Скуреева А.А., Ле-Дейген И.М., Шустров П.Н., Новоселов А.М., Кудряшова Е.В. Образование комплексов β -циклодек-

- трина с левофлоксацином и цефтриаксоном как подход к регуляции фармакокинетических свойств лекарственных препаратов // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 1. С. 122–136.
<https://doi.org/10.31857/S0023291222600183>
10. *Sadeq H.J., Ghareeb M.M., Fadhil, A.A.* Application of hydrophilic lipophilic difference theory for fenofibrate formulation as a self-emulsifying drug delivery system // Colloid J. 2023. V. 85. № 1. P. 140–150.
<https://doi.org/10.1134/S1061933X22600075>
11. *Мурашова Н.М., Нгуен Х.Т.* Микроэмульсии лецитина с маслом гака и эфирным маслом куркумы // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 2. С. 191–199.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600049>
12. *Задымова Н.М., Малашихина А.А.* Наноэмульсии полиоксиэтилен (4) лаурилового эфира с солюбилизированным основанием хлоргексидина // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 3. С. 296–306.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600074>
13. *Кузнецов А.О., Власичева Ю.Н., Ленгерт Е.В., Ермаков А.В.* Формирование структур ядро–оболочка с возможностью рН-чувствительного высвобождения инкапсулированных соединений // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 3. С. 328–338.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600207>
14. *Пигарева В.А., Большакова А.В., Марина В.И., Сыбачин А.В.* Водорастворимый интерполиэлектrolитный комплекс на основе полидиаллилдиметиламмоний хлорида и полиакрилата натрия как компонент для создания устойчивых биоцидных покрытий // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 3. С. 366–375.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600190>
15. *Быков А.Г., Панаева М.А.* Динамические свойства монослоев легочных липидов на поверхности растворов полистиролсульфоната натрия и полидиаллилдиметиламмония хлорида // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 556–565.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600505>
16. *Ефимова А.А., Сыбачин А.В.* Стимул-чувствительные системы для доставки лекарств на основе бислойных липидных везикул: новые тенденции // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 566–582.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600608>
17. *Климович М.А., Колыванова М.А., Дементьева О.В., Климович О.Н., Рудой В.М., Кузьмин В.А., Морозов В.Н.* Влияние старения ультрамалых наночастиц золота на их взаимодействие с холестериновыми микрочастицами ДНК // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 583–592.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600542>
18. *Меркулова М.А., Осипова Н.С., Калистратова А.В., Ермоленко Ю.В., Гельперина С.Э.* Коллоидные системы доставки этопозида на основе биodeградируемых полимерных носителей (обзор литературы) // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 593–618.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600463>
19. *Мищенко Е.В., Гилёва А.М., Марквичева Е.А., Королева М.Ю.* Наноэмульсии и твердые липидные наночастицы с инкапсулированным доксорубицином и тимохиноном // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 619–628.
<https://doi.org/10.31857/S002329122360058X>
20. *Мурашова Н.М.* Микроэмульсии лецитина как носители лекарственных веществ // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 629–640.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600517>
21. *Омран Ф.Ш., Каминский В.В., Емельяненко К.А., Емельяненко А.М., Бойнович Л.Б.* Влияние биологической загрязненности медных поверхностей с экстремальным смачиванием на их антибактериальные свойства // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 641–654.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600499>
22. *Паширова Т.Н., Шайхутдинова З.М., Соуто Э.Б., Массон П., Миронов В.Ф.* Концентрация наночастиц как важный параметр для характеристики дисперсий и ее применение в биомедицине // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 655–667.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600487>
23. *Филиппова А.Д., Баранчиков А.Е., Иванов В.К.* Ферментоподобная активность коллоидных растворов диоксида церия, стабилизированных L-яблочной кислотой // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 668–681.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600529>
24. *Широких А.Д., Гурулева Ю.А., Маринец Е.А., Королева М.Ю.* Липидные наночастицы для инкапсулирования и доставки лютеина // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 705–714.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600530>
25. *Фомина Ю.С., Семкина А.С., Загоскин Ю.Д., Алексанян М.М., Чвалун С.Н., Григорьев Т.Е.* Биосовместимые гидрогели на основе биоразлагаемых полиэфилов и их сополимеров // Коллоид. журн. 2023. Т. 85. № 5. С. 682–704.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600554>

УДК 544.72.023.2

ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОНОСЛОЕВ ЛЕГОЧНЫХ ЛИПИДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ РАСТВОРОВ ПОЛИСТИРОЛСУЛЬФОНАТА НАТРИЯ И ПОЛИДИАЛЛИЛДИМЕТИЛАММОНИЯ ХЛОРИДА

© 2023 г. А. Г. Быков¹, *, М. А. Панаева¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии,
Университетский просп., 26, Санкт-Петербург, 198504 Россия

*e-mail: ag-bikov@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 26.07.2023 г.

Легочный сурфактант, состоящий из сложной смеси липидов и белков, играет ключевую роль в обеспечении функциональных свойств органов дыхания. Для поддержания низких значений поверхностного натяжения при постоянных деформациях растяжения/сжатия липиды образуют комплексы с белками. Однако, до сих пор неизвестно за счет каких взаимодействий происходит образование комплексов, что значительно затрудняет разработку синтетических аналогов природного легочного сурфактанта. В данной работе с помощью методов поверхностной реологии и эллипсометрии были исследованы динамические свойства нанесенных модельных монослоев фосфолипидов на поверхности растворов синтетических полиэлектролитов. Было показано, что для эффективного образования комплексов и поддержания низких значений поверхностного натяжения одних электростатических или гидрофобных взаимодействий между липидами и макромолекулами оказывается недостаточно.

Ключевые слова: легочный сурфактант, липиды, полиэлектролиты, поверхностная упругость

DOI: 10.31857/S0023291223600505, **EDN:** DGYIFV

ВВЕДЕНИЕ

Легочный сурфактант состоит из липидов и белков [1, 2]. Раствор легочного сурфактанта покрывает поверхность альвеол легких, обеспечивая их функциональность за счет поддержания низких значений поверхностного натяжения при растяжении и практически нулевых значений после сжатия [2, 3]. Недостаточное количество легочного сурфактанта приводит к различным заболеваниям легких, в частности, к появлению респираторного дистресс-синдрома новорожденных [4, 5]. В процессе лечения данного заболевания, вызванного недостатком собственного сурфактанта, применяются природные препараты легочного сурфактанта, полученные из легких домашних животных (быка, теленка, свиньи) [6]. Кроме того, эти препараты применялись для лечения пациентов при тяжелом течении коронавирусной инфекции COVID-19 [7, 8]. Так как природные препараты имеют ряд недостатков (высокая стоимость, производственные ограничения, риск наличия в составе иммуногенов и про-воспалительных медиаторов), на разработку синтетического аналога направлено большое количество исследований [9, 10]. Основная сложность на пути создания синте-

тического аналога заключается в отсутствии понимания механизма действия легочного сурфактанта [11]. Дополнительная информация о механизме может быть получена при исследовании динамических поверхностных свойств модельных систем.

Известно, что главным компонентом сурфактанта является насыщенный цвиттер-ионный фосфолипид дипальмитоил фосфатидилхолин (ДПФХ), который формирует на поверхности раздела фаз жидкость/газ высоко упорядоченный монослой и позволяет достигать крайне низких значений поверхностного натяжения при сжатии [12]. Поэтому ДПФХ используется в качестве главного компонента модельной системы легочного сурфактанта [1, 3]. При периодических деформациях растяжения-сжатия монослой ДПФХ может терять способность к снижению поверхностного натяжения из-за необратимого коллапса и медленной адсорбции дополнительных молекул из объема [13, 14]. В составе сурфактанта также присутствуют другие фосфолипиды, которые способствуют перестройке структуры монослоя при деформациях за счет образования многофазной структуры: нано- и микродоменов жидко-конденсированной фазы (ЖК), распределенных по жидко-растянутой фазе

(ЖР) [15]. Важной функциональной особенностью отрицательно заряженных фосфолипидов (например, дипальмитоил глицерофосфоглицерина (ДПФГ)) является способность к формированию комплексов с поверхностно-активными белками (“surfactant proteins” SP-B и SP-C), входящими в состав легочного сурфактанта [1–3, 14–16]. Данные комплексы фосфолипидов и белков препятствуют необратимому коллапсу монослоя при деформациях, однако механизм их образования и действия слабо изучен [17].

Белки являются природными полиэлектролитами, несущими на себе положительный и отрицательный заряды, поэтому изучение взаимодействий между монослоем липидов и синтетическими полиэлектролитами с различными знаками зарядов и поверхностной активностью помогает понять какие взаимодействия между компонентами играют ключевую роль при образовании комплексов [18–21]. Ранее было обнаружено значительное влияние электростатических и гидрофобных взаимодействий на поверхностные свойства нанесенных монослоев липидов со знаком заряда противоположным, чем у находящихся в объеме раствора синтетических полиэлектролитов (полистиролсульфоната натрия (ПСС) и полидиаллилдиметиламмоний хлорида (ПДАДМАХ)) [22–24]. Однако большая часть исследований была направлена на изучение равновесных поверхностных свойств в области высоких поверхностных натяжений, в то время как внутренняя поверхность легких характеризуется низкими значениями поверхностного натяжения, а поверхностный слой находится вдали от равновесного состояния. Рассматривать полиэлектролиты ПСС и ПДАДМАХ в качестве синтетических аналогов не представляется возможным из-за простой структуры макромолекул по сравнению с белками SP-B и SP-C. В то же время целью данной работы было определение влияния макромолекул, характеризующихся разным знаком зарядов функциональных групп и степенью гидрофобности, на свойства модельного монослоя легочных липидов в условиях, близких к физиологическим. В настоящей работе проведены исследования динамических поверхностных свойств в области высоких и низких значений поверхностного натяжения нанесенных модельных монослоев фосфолипидов на поверхности растворов полиэлектролитов. В процессе исследования рассмотрено влияние гидрофобных и электростатических взаимодействий между макромолекулами полиэлектролита и молекулами фосфолипидов на поведение модельной системы при периодических деформациях растяжения и сжатия поверхностного слоя, имитирующих процесс дыхания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали: ДПФХ, димиристоил-фосфатидилэтаноламин (ДМЭА), ДПФГ, ПСС и ПДАДМАХ (Sigma-Aldrich, Германия) без дополнительной очистки (рис. 1). Для создания растворов липидов с концентрацией 1 мг/мл был взят хлороформ (Sigma-Aldrich, Германия), очищенный методом перегонки. Из растворов липидов в хлороформе готовили смеси ДПФХ/ДПФГ, ДПФХ/ДМЭА в объемном соотношении 3/1 путем смешения ранее приготовленных растворов. В качестве водной фазы выступал фосфатный буфер с pH 7 и добавлением NaCl, прокаленного при температуре 750°C в муфельной печи. Добавление NaCl необходимо для достижения условий изотонического раствора (0.9 мас. %). Монослой липидов формировали на поверхности водной фазы методом прикапывания фиксированных объемов растворов липидов в органическом растворителе. Под нанесенный монослой липида впрыскивали концентрированный раствор полиэлектролита для достижения необходимого содержания в подложке (для ПДАДМАХ 0.2 мас. %, а для ПСС от 0.02 до 0.2 мас. %). Затем, после часа ожидания значения поверхностного натяжения достигали равновесных значений, и проводили измерения динамических поверхностных свойств монослоя липидов на поверхности раствора полиэлектролита. Для изучения поверхностных свойств в области высоких поверхностных натяжений впрыскивание полиэлектролита осуществляли под монослой фосфолипидов с нулевым поверхностным давлением. Для исследования области низких поверхностных натяжений полиэлектролит впрыскивали под монослой с поверхностным натяжением монослоя липидов около 30 мН/м. Все измерения проводили при 25°C.

Поверхностное натяжение измеряли методом пластинки Вильгельми с использованием пластинки из фильтровальной бумаги шириной 10 мм. Величина поверхностного давления связана с поверхностным натяжением и определяется выражением (1):

$$\pi = \gamma_w - \gamma, \quad (1)$$

где γ_w — поверхностное натяжение на межфазной границе водный раствор буфера–воздух, γ — поверхностное натяжение раствора полиэлектролита или нанесенного монослоя.

Динамическую поверхностную упругость измеряли с помощью метода осциллирующего барьера на реометре межфазного сдвига (KSV NIMA, Финляндия). Метод основан на регистрации периодических изменений поверхностного натяжения в результате изменения площади межфазного слоя, вызываемого периодическими колебаниями двух барьеров. Ванна Ленгмюра была оснащена барьерами с дополнительной гибкой тефлоно-

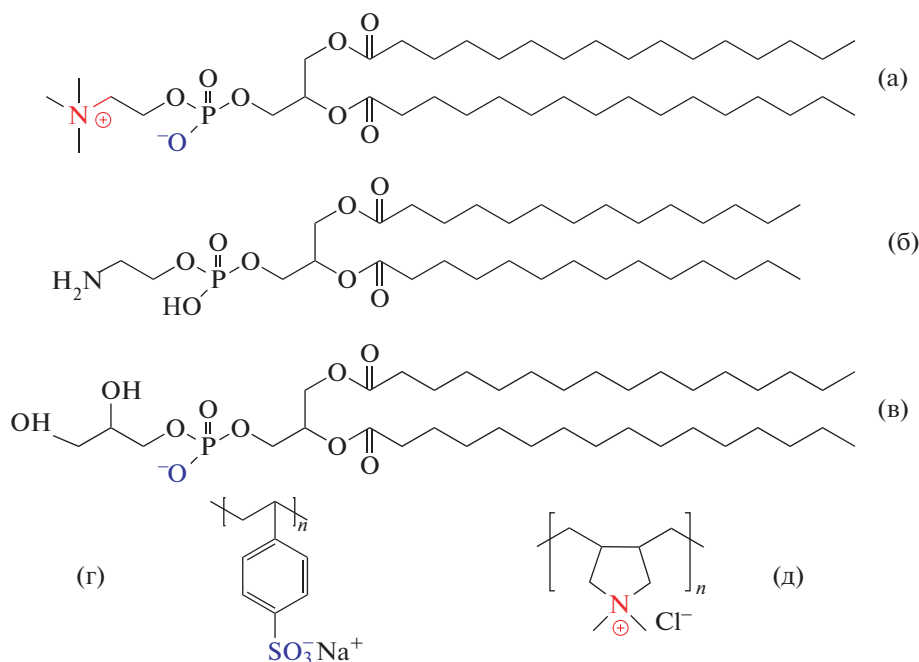


Рис. 1. Структурные формулы фосфолипидов ДПФХ (а), ДМЭА (б), ДПФГ (в); полиэлектролитов ПСС (г), ПДАДМАХ (д).

вой лентой, чтобы исключить нежелательное перетекание монослоя под барьерами при высоких поверхностных давлениях (низких поверхностных натяжениях) [25]. Частота колебаний площади поверхности составляла 30 МГц. Амплитуда гармонических колебаний площади поверхности варьировалась от 4 до 32%. Измерения поверхностного натяжения производили с использованием пластинок Вильгельми, которая была подвешена в центре над ванной Ленгмюра, параллельно барьерам с целью уменьшения влияния поверхностных сдвиговых деформаций. При малой амплитуде гармонических колебаний площади модуль динамической поверхностной упругости определяется соотношением (2):

$$\varepsilon = \varepsilon_{\text{Re}} + i\varepsilon_{\text{Im}} = \varepsilon \cos \delta + i\varepsilon \sin \delta = \frac{\Delta\gamma}{\Delta A/A_0}, \quad (2)$$

где ε_{Re} , ε_{Im} — действительная и мнимая части поверхностной упругости соответственно, δ — разность фаз между колебаниями поверхностного натяжения и площади поверхности, $\Delta\gamma$ — изменение поверхностного натяжения, $\Delta A/A_0$ — изменения площади поверхности относительно начальной площади A_0 . В области малых поверхностных давлений мнимая часть динамической поверхностной упругости оказывалась мала, и на графиках представлены результаты измерений модуля поверхностной упругости.

В случае больших деформаций ($\Delta A/A_0 > 5\%$) поведение системы оказывается нелинейным, и

использование соотношения (2) в таких условиях для определения динамической упругости становится невозможным. Однако существует подход, который позволяет в этих условиях определять эффективную динамическую упругость в области крайне высоких поверхностных давлений [26–28]. Для получения поверхностной упругости в широкой области поверхностных давлений применяется подход разложения напряжений [26]: строятся графики Лиссажу (зависимости поверхностного натяжения от относительной деформации площади) для различных периодических деформаций с разными амплитудами колебаний, из них определяются максимумы и минимумы для каждой фигуры Лиссажу. По формуле (3) рассчитываются значения эффективной динамической поверхностной упругости:

$$\varepsilon_{\text{ef}} = (\gamma_{n+1} - \gamma_n) \frac{(A_0 \pm A_1)}{(A_{n+1} - A_n)}, \quad (3)$$

где γ_{n+1} и γ_n — значения поверхностного натяжения в максимуме (минимуме) для различных деформаций A_{n+1} и A_n соответственно.

В работе был использован нуль-эллипсометр Multiskop (Optrel GBR, Германия) для эллипсометрических измерений поверхности исследуемых систем. Длина волны составляла 632.8 нм при постоянном значении угла падения 49° , близком к углу Брюстера. Известно, что разность (Δ_{surf}) между эллипсометрическим углом Δ для исследуемого раствора и чистой воды зависит от показателя

преломления поверхностного слоя и пропорциональна количеству вещества на поверхности [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования однокомпонентных монослоев ДПФХ, ДПФГ и ДМЭА на растворе фосфатного буфера с помощью эллипсометрии показали, что даже небольшое увеличение поверхностного давления после нанесения липида приводит к значительному росту значений Δ_{surf} для всех трех липидов (рис. 2а). Это связано с изменением показателя преломления при переходе нанесенного монослоя от газообразного к ЖР состоянию, который происходит при поверхностных давлениях меньше 1 мН/м. Дальнейшее увеличение поверхностной концентрации и давления приводит к постепенному увеличению значений Δ_{surf} . Затем в области перехода от ЖР к ЖК состоянию монослоя вновь наблюдаются резкие изменения значений. Эти результаты хорошо согласуются с данными поверхностной упругости. При малых амплитудах колебания поверхностной площади были получены величины динамической поверхностной упругости монослоя ДПФХ в области низких значений поверхностного давления (рис. 2б, черные закрашенные квадраты). На рис. 2 показано, что с возрастанием поверхностной концентрации молекул липида поверхностное давление и упругость увеличиваются. Затем в диапазоне поверхностных давлений около 10 мН/м для монослоя ДПФХ наблюдается минимум поверхностной упругости. Это связано с двумерным фазовым переходом от ЖР к ЖК состоянию поверхностного слоя. Образование доменов ЖК фазы приводит к появлению релаксационного процесса, причиной которого является обмен молекулами между ЖР и ЖК фазами. Так как обмен молекулами между разными фазами происходит с меньшим характеристическим временем, чем период колебаний площади поверхности, то поверхностная упругость снижается при появлении неоднородностей. При последующем увеличении поверхностного давления до 50 мН/м монослой находится в ЖК состоянии с плотной упаковкой, что приводит к увеличению упругости до 250–300 мН/м. Сравнение динамической поверхностной упругости в области низких значений поверхностного давления чистых монослоев ДМЭА с результатами для ДПФХ показало, что в диапазоне давлений от 0 до 17 мН/м поведение монослоев ДПФХ и ДМЭА не имеет различий: для обоих монослоев в области 10 мН/м наблюдается минимум, связанный с фазовым переходом ЖР–ЖК (рис. 2б). При более высоких значениях давления упругость ДМЭА становится значительно выше, чем упругость ДПФХ. Это может быть связано с фазовым переходом из ЖК в твердообразную фазу [30]. Молекулы ДПФХ не образуют твердой фазы в этой области поверхностных давле-

ний. При сравнении поведения монослоев ДПФХ и ДПФГ (рис. 2б) наблюдается смещение минимума в области низких давлений для монослоя ДПФГ (15 мН/м) относительно ДПФХ (10 мН/м), это объясняется меньшей упорядоченностью и электростатическим отталкиванием между отрицательно заряженными молекулами ДПФГ в монослое. При повышенном давлении (30 мН/м) поверхностная упругость монослоя ДПФГ снижается относительно значений ДПФХ, что также подтверждает предположение о меньшей плотности упаковки молекул ДПФГ по сравнению с монослоем ДПФХ.

Для исследования упругости монослоя ДПФХ в области высоких поверхностных давлений (от 50 до 72 мН/м) были проведены измерения эффективной поверхностной упругости с помощью подхода, основанного на больших деформациях площади поверхности (рис. 3). Для этого на поверхности буфера формировали монослой с поверхностным давлением около 32 мН/м и подвергали серии деформаций с большими амплитудами колебания барьеров. В области низких поверхностных давлений значения эффективной упругости хорошо согласуются с данными поверхностной упругости, полученными с помощью стандартного метода (рис. 2б). При поверхностных давлениях 40–50 мН/м эффективная поверхностная упругость достигает максимума 250–300 мН/м. Дальнейшее возрастание поверхностного давления до 60 мН/м ведет за собой снижение упругости, что является следствием изменения структуры поверхностного слоя. Это может быть вызвано образованием многослойной структуры за счет вытеснения молекул липида в подслой. В области крайне низких поверхностных натяжений или высоких поверхностных давлений (60–70 мН/м) поверхностная упругость остается выше 50–100 мН/м вплоть до коллапса монослоя, который происходит при нулевом поверхностном натяжении. Эти результаты хорошо согласуются с данными предыдущих исследований [31].

Результаты измерений поверхностной упругости для смешанных монослоев ДПФХ и ДПФГ, в котором около 25% молекул липида ДПФХ в составе монослоя заменены на липид ДПФГ, несущий на себе отрицательный заряд, оказывались близки к данным для чистого монослоя ДПФХ в области малых поверхностных давлений до 40 мН/м (рис. 3). Вероятно, из-за близкой молекулярной структуры и поверхностных свойств этих двух липидов, присутствие дополнительного липида не препятствует двумерным фазовым переходам в поверхностном слое. Однако в диапазоне низких поверхностных давлений заметно слабое смещение минимума в область более высоких давлений (от 10 к 12 мН/м), что можно связать с нарушением упорядоченности в упаковке смешанного монослоя (рис. 3). Кроме того, при добавлении ДПФГ снижение по-

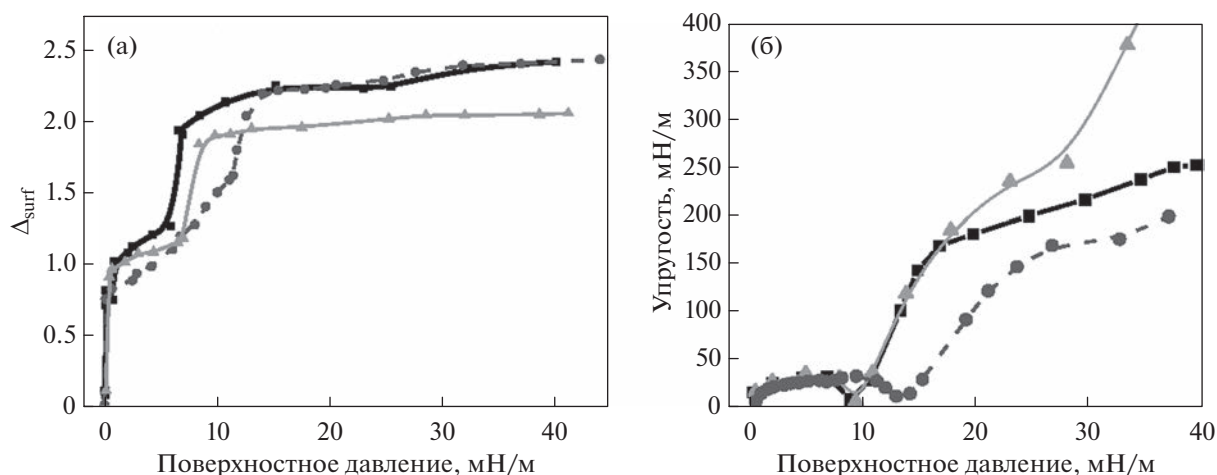


Рис. 2. Зависимости Δ_{surf} (а) и динамической поверхностной упругости (б) от поверхностного давления для нанесенных монослоев ДПФХ (черные квадраты), ДМЭА (светло-серые треугольники), ДПФГ (серые круги) на буфере при $T = 25^\circ\text{C}$.

верхностной упругости происходит при больших поверхностных давлениях и высоких поверхностных концентрациях. В результате при поверхностных давлениях около 60 мН/м эффективная поверхностная упругость монослоя ДПФХ/ДПФГ оказалась больше, чем для ДПФХ. Можно предположить, что молекулы ДПФГ затрудняют структурные превращения в поверхностном слое и замедляют релаксационные процессы. Таким образом, введение дополнительного липида может приводить к увеличению поверхностной упругости при высоких поверхностных давлениях. Аналогичные результаты были получены для двухкомпонентного монослоя ДПФХ и ДМЭА (рис. 3, серые треугольники). Различие заключалось только в более резком снижении поверхностной упругости при достижении высоких значений поверхностного давления. Следует отметить, что ДМЭА является цвиттер-ионным липидом, однако имеет меньшую плотность положительного заряда по сравнению с молекулой ДПФХ (рис. 1а, 1б).

Дополнительно были проведены исследования поверхностных свойств полиэлектролитов PSS и ПДАДМАХ. В результате были получены зависимости поверхностного натяжения от десятичного логарифма концентраций полиэлектролита (мас. %). При увеличении концентрации растворов PSS (0.02–0.2 мас. %) поверхностное натяжение снижалось до 60 мН/м (рис. 4, треугольники). Полиэлектролит ПДАДМАХ, в отличие от PSS, не обладает поверхностной активностью в исследуемой области концентраций: поверхностное натяжение было постоянным при варьировании концентрации ПДАДМАХ и близким к поверхностному натяжению воды (рис. 4, круги). Эллипсометрические измерения также согласуются со сделанными выводами о поверхностной активности поли-

электролитов ПДАДМАХ и PSS. Для растворов ПДМДАХ значения Δ_{surf} были близки к нулю. При этом для раствора PSS (0.2 мас. %) Δ_{surf} растет со временем и достигает 0.85° в состоянии равновесия, что свидетельствует об адсорбции макромолекул PSS на поверхность.

Далее были проведены исследования динамической и эффективной поверхностной упругости для монослоев ДПФХ на поверхности ПДАДМАХ с концентрацией (0.2 мас. %). Было показано, что результаты практически совпадают с данными для монослоя на чистом буфере во всей области поверхностных давлений (рис. 5, 6а). Это

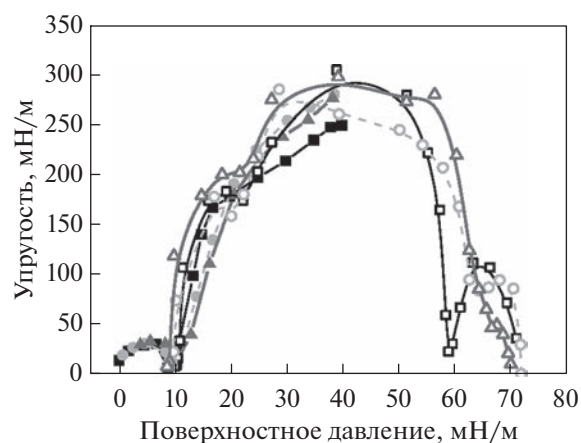


Рис. 3. Зависимости динамической и эффективной поверхностных упругостей для нанесенных монослоев ДПФХ (черные закрашенные и пустые квадраты соответственно), ДПФХ/ДПФГ 3/1 (светло-серые закрашенные и пустые круги соответственно), ДПФХ/ДМЭА 3/1 (серые закрашенные и пустые треугольники соответственно) от поверхностного давления на буфере при $T = 25^\circ\text{C}$.

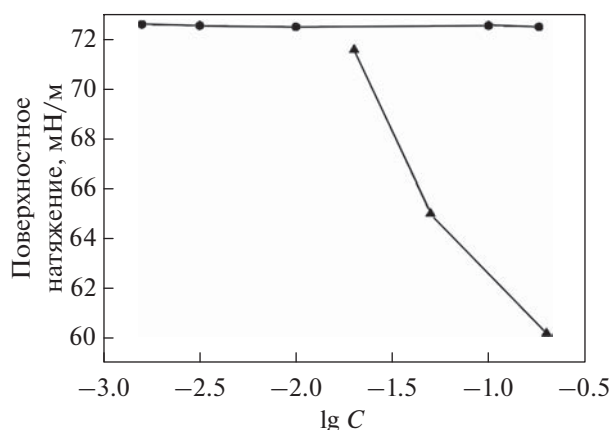


Рис. 4. Зависимости поверхностного натяжения от десятичного логарифма концентраций полиэлектролита (мас. %) ПСС (треугольники), ПДАДМАХ (кружки) при $T = 25^\circ\text{C}$.

указывает на отсутствие влияния полиэлектролита на поверхностные свойства. Кроме того, отсутствие взаимодействия между полиэлектролитом и липидом также подтверждается при рассмотрении фигур Лиссажу (рис. 6б), которые практически совпадают для монослоя ДПФХ на чистом буфере и растворе полиэлектролита. Дополнительно была измерена разность эллипсометрических углов Δ_{surf} для монослоя ДПФХ в присутствии ПДАДМАХ в условиях периодических деформаций растяжения-сжатия. Было показано, что величина Δ_{surf} для монослоя на поверхности раствора полиэлектролита не отличается в пределах погрешности от значений, полученных для монослоя ДПФХ на буфере в аналогичных условиях (рис. 7). Следовательно, ПДАДМАХ, не обладающий собственной поверхностной активностью, не оказывает большого влияния на свойства монослоя ДПФХ.

Затем для усиления взаимодействия между макромолекулами полиэлектролита и поверхностным слоем к монослою ДПФХ был добавлен липид, который будет иметь знак заряда, противоположный полиэлектролиту ПДАДМАХ. Ранее было показано, что ПДАДМАХ адсорбируется на монослое отрицательно заряженного липида [22]. В данной работе были проведены исследования смешанных монослоев ДПФХ и ДПФГ на поверхности раствора ПДАДМАХ. Результаты измерений для монослоев ДПФХ/ДПФГ (3/1) на поверхности раствора ПДАДМАХ (0.2 мас. %) указывают на отсутствие влияния полиэлектролита, несмотря на присутствие противоположно-заряженного липида в поверхностном слое. Зависимости эффективной поверхностной упругости и отклика поверхностного слоя на деформации (рис. 6а, 6б) для смешанного монослоя на буфере и растворе полиэлектролита практически совпадают. Следо-

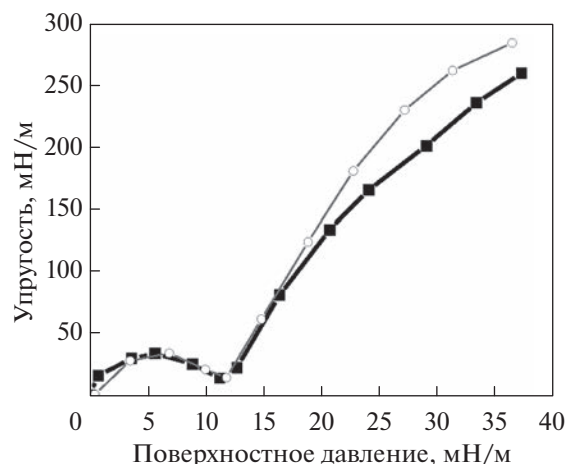


Рис. 5. Зависимости динамической упругости от поверхностного давления для монослоя ДПФХ на растворе ПДАДМАХ 0.2 мас. % (пустые кружки), на буфере (закрашенные квадраты) при $T = 25^\circ\text{C}$.

вательно, одних электростатических взаимодействий между модельным монослоем липидов и макромолекулами оказывается недостаточно для образования комплексов, которые бы препятствовали снижению поверхностного давления (увеличению поверхностного натяжения) при растяжении.

На следующем этапе было проведено исследование влияния поверхностно активного полиэлектролита ПСС на поведение монослоя ДПФХ. При малых деформациях были получены значения динамической поверхностной упругости в области малых поверхностных давлений для монослоя ДПФХ на растворах ПСС разной концентрации (рис. 8). Для самого разбавленного раствора ПСС с концентрацией 0.02 мас. %, при которой он практически не проявляет собственной поверхностной активности, зависимость поверхностной упругости монослоя ДПФХ близка к соответствующей зависимости на поверхности чистого буфера. Однако соответствующий двумерному фазовому переходу минимум на зависимости поверхностной упругости в присутствии полиэлектролита становился менее выраженным и был смещен в область более высоких поверхностных давлений. Это связано с встраиванием макромолекул в структуру липидного монослоя, когда концентрация молекул липида на поверхности мала. С увеличением концентрации полиэлектролита его влияние на свойства монослоя ДПФХ увеличиваются. При $C = 0.05$ мас. % минимум поверхностной упругости возникает в области давлений около 30 мН/м, а при концентрации 0.2 мас. % минимум поверхностной упругости отсутствует. Таким образом, в области малых поверхностных давлений происходит адсорбция полиэлектролита ПСС на поверхности раздела фаз. После адсорбции ПСС гидрофобные сегменты макромолекул оказыва-

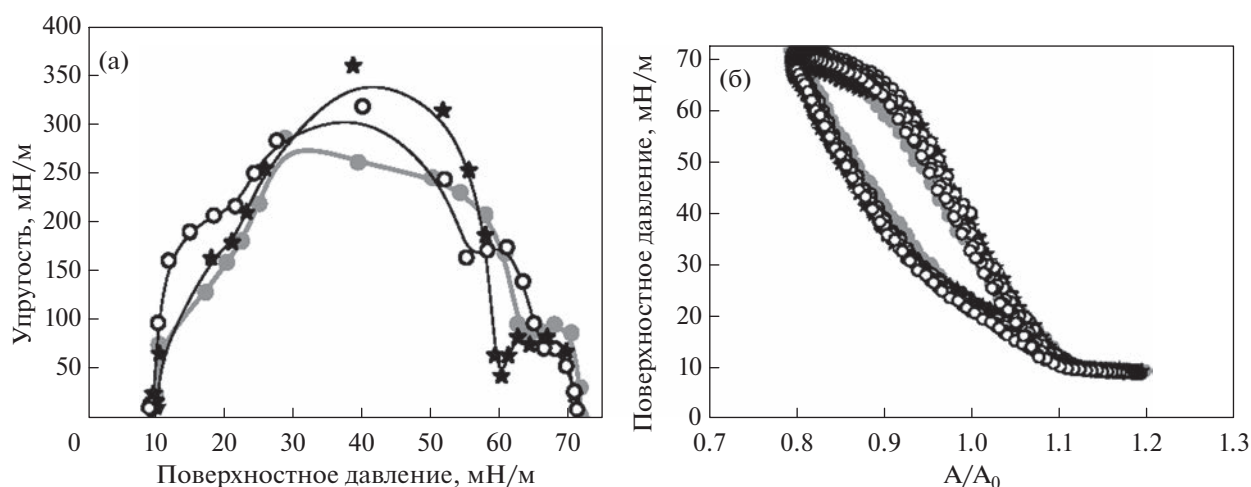


Рис. 6. (а) Зависимости эффективной поверхностной упругости от поверхностного давления для нанесенных монослоев ДПФХ (черные закрашенные звезды), ДПФХ/ДПФГ 3/1 (черные пустые круги) на растворе ПДАДМАХ 0.2 мас. % и ДПФХ/ДПФГ 3/1 на растворе буфера (серые закрашенные круги). (б) Фигуры Лиссажу для монослоев ДПФХ (черные закрашенные звезды), ДПФХ/ДПФГ 3/1 (черные пустые круги) на растворе ПДАДМАХ 0.2 мас. % и ДПФХ/ДПФГ 3/1 на растворе буфера (серые закрашенные круги) при деформации площади 20%. Исследования проведены при $T = 25^\circ\text{C}$.

ются близки к углеводородным хвостам липида, между которыми могут происходить гидрофобные взаимодействия, что может препятствовать формированию упорядоченных структур молекулами ДПФХ. Отсутствие высоко упорядоченных доменов в структуре монослоев подтверждает не только исчезновение минимума поверхностной упругости, но и более низкие значения упругости по отношению к значениям, полученным для мо-

нослоя ДПФХ в отсутствии ПСС, в области средних поверхностных давлений 30–35 мН/м.

Присутствие ПСС в поверхностном слое при низких давлениях подтверждается изменением формы фигур Лиссажу при больших деформациях (рис. 9б). При рассмотрении фигур Лиссажу видно, что в растянутом состоянии с относительной деформацией 20% поверхностное давление монослоя ДПФХ на ПСС поднимается до 20 мН/м, в то время как давление монослоя на чистом буфере составляет 10 мН/м. Дело в том, что при концентрации ПСС 0.2 мас. % полиэлектролит имеет

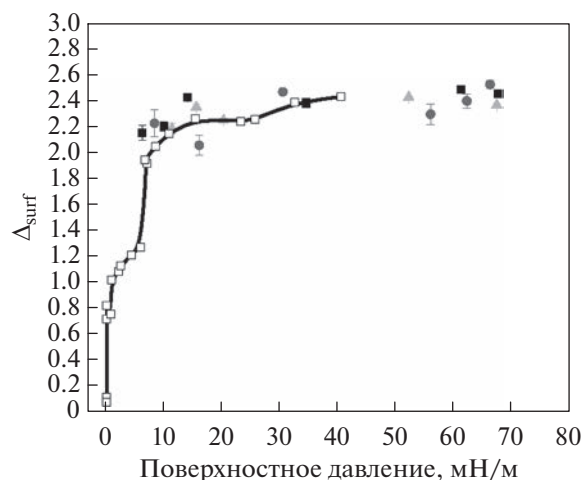


Рис. 7. Зависимости Δ_{surf} от поверхностного давления, измеренные в статических условиях для ДПФХ на буфере (пустые черные квадраты) и при колебаниях площади поверхности для ДПФХ на буфере (закрашенные черные квадраты), ПДАДМАХ 0.2 мас. % (серые круги), ПСС 0.2 мас. % (светло-серые треугольники).

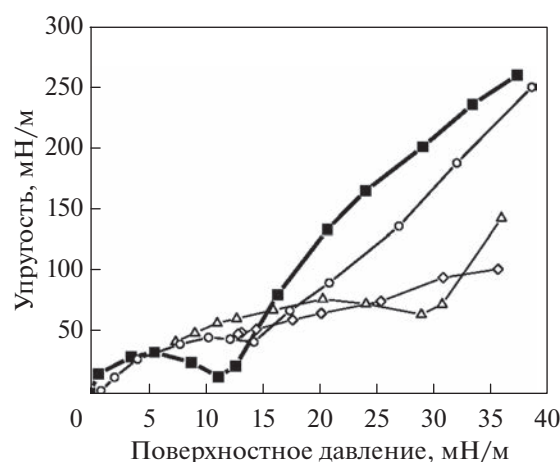


Рис. 8. Зависимости поверхностной динамической упругости от поверхностного давления для нанесенного монослоя ДПФХ на растворах ПСС с концентрацией 0 (закрашенные квадраты), 0.02 (круги), 0.05 (треугольники), 0.2 мас. % (ромбы) при $T = 25^\circ\text{C}$.

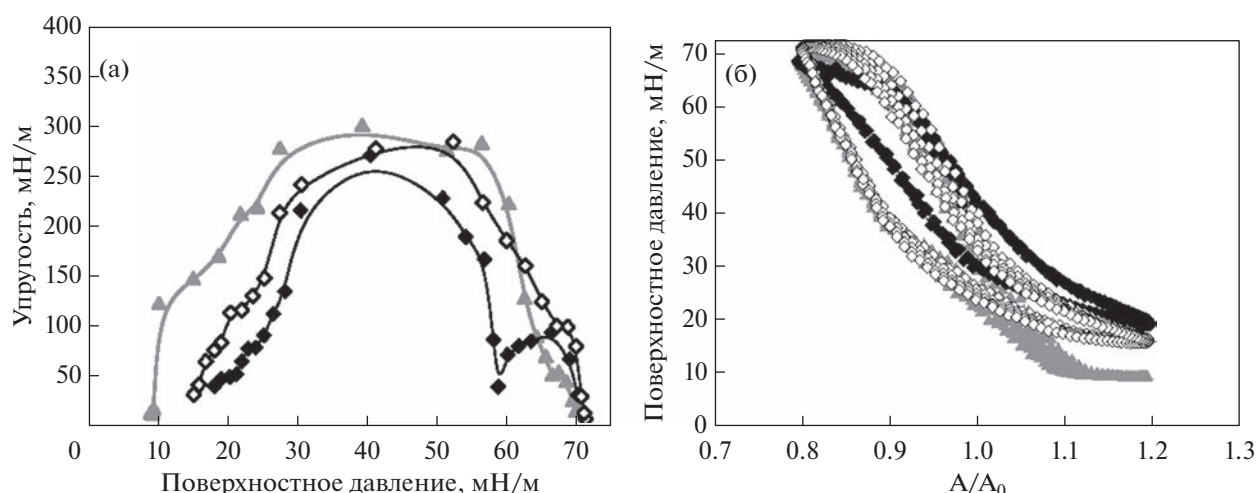


Рис. 9. (а) Зависимости эффективной поверхностной упругости от поверхностного давления для нанесенных монослоев ДПФХ (черные закрашенные ромбы), ДПФХ/ДМЭА 3/1 (черные пустые ромбы) на растворе ПСС 0.2 мас. % и ДПФХ/ДМЭА 3/1 на растворе буфера (серые треугольники). (б) Фигуры Лиссажу для монослоев ДПФХ (черные закрашенные ромбы), ДПФХ/ДМЭА 3/1 (черные пустые ромбы) на растворе ПСС 0.2 мас. %, ДПФХ/ДМЭА 3/1 на растворе буфера (серые треугольники) при деформации площади 20%. Исследования проведены при $T = 25^\circ\text{C}$.

возможность снижать поверхностное натяжение (увеличивать давление) на 20 мН/м за счет собственной поверхностной активности. Таким образом, при растяжении и уменьшении поверхностного давления макромолекулы полиэлектролита адсорбируются на поверхности, а при сжатии, вероятно, вытесняются с нее. При высоких поверхностных давлениях результаты измерений эффективной поверхностной упругости на растворе полиэлектролита с высокой концентрацией ПСС (0.2 мас. %) и на растворе буфера оказываются близки друг к другу (рис. 9а). Это хорошо согласуется с результатами измерений отклика поверхностного слоя на периодические сжатия/растяжения, которые представлены в виде фигур Лиссажу (рис. 9б). В максимально сжатом состоянии значения поверхностного давления для монослоя достигают 72 мН/м как в присутствии полиэлектролита, так и без него. Значения Δ_{surf} для ДПФХ на ПСС в области высоких поверхностных давлений в пределах погрешности совпадают с Δ_{surf} для монослоя ДПФХ на буфере (рис. 7). Это подтверждает наши предположения о том, что макромолекулы ПСС вытесняются с поверхности при сжатии монослоя ДПФХ до высоких давлений, а затем адсорбируются при растяжении благодаря собственной гидрофобности, когда поверхностное давление приближается к 20 мН/м. Можно предположить, что одной поверхностной активности полиэлектролита недостаточно для образования комплексов между ДПФХ и макромолекулой полимера.

Следующим шагом стало исследование влияния дополнительного липида совместно с ДПФХ, которое может привести к усилению взаимодей-

ствия макромолекул полиэлектролита с поверхностным слоем из-за менее упорядоченной структуры липидного монослоя. Были проведены исследования поверхностных свойств смешанного монослоя ДПФХ/ДМЭА на поверхности раствора ПСС. Результаты измерений эффективной поверхностной упругости (рис. 9а) и форма отклика поверхностного слоя на деформации (рис. 9б) указывают на отсутствие образования комплексов между смешанным монослоем липидов и макромолекулами ПСС. Как и в случае однокомпонентного монослоя ДПФХ, присутствие ПСС в подложке (0.2 мас. %) препятствует снижению поверхностного давления ниже 15 мН/м при растяжении поверхностного слоя. В результате этого наблюдаются более низкие значения эффективной поверхностной упругости по сравнению с результатами, полученными для смешанного монослоя на буфере в этой области поверхностных давлений. В области высоких поверхностных давлений кривые (рис. 9а) для смешанного монослоя на буфере и на растворе ПСС оказываются близки друг к другу. Можно предположить, что при сжатии с поверхности вытесняются только макромолекулы полиэлектролита, а молекулы дополнительного липида ДМЭА остаются на поверхности.

ВЫВОДЫ

В данной работе были изучены динамические поверхностные свойства липидов, входящих в состав легочного сурфактанта, на поверхности растворов полиэлектролитов ПСС и ПДАДМАХ. Было показано, что цвиттер-ионный ДПФХ, составляющий основу легочного сурфактанта, не образует

комплексы как с положительно, так и с отрицательно заряженными макромолекулами полиэлектролитов. Кроме того, присутствие в поверхностном слое липида с зарядом противоположным знаку заряда полиэлектролита, не обладающего собственной поверхностной активностью, не приводило к изменению поверхностных свойств. Можно предположить, что для образования комплексов полиэлектролит/липид, способствующих поддержанию низких значений поверхностного натяжения при деформациях, одних электростатических взаимодействий между молекулами липида и макромолекулами полиэлектролита оказывается недостаточно. Дополнительно было показано, что одной только поверхностной активности полиэлектролита и гидрофобных взаимодействий между сегментами макромолекул и молекулами липида также недостаточно для образования комплексов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование было проведено в ознаменование 300-летия основания Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы также признательны ресурсным центрам СПбГУ (Центр оптических и лазерных исследований, Междисциплинарный ресурсный центр по направлению “Нанотехнологии”, Центр методов анализа состава вещества, Центр термогравиметрических и калориметрических методов исследования, Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники) за использование их оборудования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-23-00235).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Echaide M., Autilio C., Arroyo R., Perez-Gil J. Restoring pulmonary surfactant membranes and films at the respiratory surface // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes*. 2017. V. 1859. № 9. P. 1725–1739. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.015>
2. Zuo Y.Y., Veldhuizen R.A.W., Neumann A.W. et al. Current perspectives in pulmonary surfactant — Inhibition, enhancement and evaluation // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes*. 2008. V. 1778. № 10. P. 1947–1977. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.03.021>
3. Autilio C., Perez-Gil J. Understanding the principle biophysics concepts of pulmonary surfactant in health and disease // *Arch. Dis. Child Fetal. Neonatal Ed.* 2018. V. 104. № 4. P. 343. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-315413>
4. Raghavendran K., Willson D., Notter R.H. Surfactant therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome // *Crit. Care Clin.* 2011. V. 27. № 3. P. 525–559. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2011.04.005>
5. Martin J.A., Hamilton B.E., Sutton P.D. et al. Births: Final data for 2002 // *Natl. Vital Stat. Rep.* 2003. V. 52. № 10. P. 1–113.
6. Engle W.A., the Committee on Fetus and Newborn. Surfactant-replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate // *Pediatrics*. 2008. V. 121. № 2. P. 419–432. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3283>
7. Veldhuizen R.A.W., Zuo Y.Y., Petersen N.O. et al. The COVID-19 pandemic: A target for surfactant therapy? // *Expert Rev. Respir. Med.* 2021. V. 15. № 5. P. 597–608. <https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1865809>
8. Herman L., De Smedt S.C., Raemdonck K. Pulmonary surfactant as a versatile biomaterial to fight COVID-19 // *Journal of Controlled Release*. 2022. V. 342. P. 170–188. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.11.023>
9. Jeon G.W. Surfactant preparations for preterm infants with respiratory distress syndrome: Past, present, and future // *Korean Journal of Pediatrics*. 2019. V. 62. № 5. P. 155–161. <https://doi.org/10.3345/kjp.2018.07185>
10. Bae C., Chung S., Choi Y. Development of a synthetic surfactant using a surfactant protein-C peptide analog: *In vitro* studies of surface physical properties // *Yonsei Med. J.* 2016. V. 57. № 1. P. 203–208. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.203>
11. Castillo-Sánchez J.C., Cruz A., Pérez-Gil J. Structural hallmarks of lung surfactant: Lipid–protein interactions, membrane structure and future challenges // *Arch. Biochem. Biophys.* 2021. V. 703. P. 108850. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2021.108850>
12. Goerke J. Pulmonary surfactant: Functions and molecular composition // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 1998. V. 1408. № 2–3. P. 79–89. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(98\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00060-X)
13. Lee K.Y.C. Collapse mechanisms of Langmuir monolayers // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2008. V. 59. P. 771–791. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104619>
14. Schurch D., Ospina O.L., Cruz A.C., Perez-Gil J. Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films // *Biophys. J.* 2010. V. 99. № 10. P. 3290–3299. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.039>
15. Casals C., Cañadas O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes*. 2012. V. 1818. № 11. P. 2550–2562. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2012.05.024>
16. Hobi N., Giolai M., Olmeda B. et al. A Small key unlocks a heavy door: The essential function of the small hydrophobic proteins SP-B and SP-C to trigger adsorption of pulmonary surfactant lamellar bodies // *Biochim. Bio-*

- phys. Acta (BBA) — Molecular Cell Research. 2016. V. 1863. № 8. P. 2124–2134.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.04.028>
17. Liekkinen J., Enkavi G., Javanainen M. et al. Surfactant lipid reorganization induced by the adsorption of the oligomeric surfactant protein B complex // J. Mol. Biol. 2020. V. 432. № 10. P. 3251–3268.
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2020.02.028>
18. Lu K.W., Goerke J., Clements J.A., Taeusch H.W. Hyaluronan decreases surfactant inactivation *in vitro* // Pediatr. Res. 2005. V. 57. № 2. P. 237–241.
<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000150726.75308.22>
19. Kundu S. Lipid–polyelectrolyte complexes at the air–water interface for different lipid packing // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 2010. V. 368. № 1–3. P. 31–36.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2010.07.012>
20. Chieng Y.Y., Chen S.B. Interaction between poly(acrylic acid) and phospholipid vesicles: Effect of pH, concentration, and molecular weight // J. Phys. Chem. B. 2010. V. 114. № 14. P. 4828–4835.
<https://doi.org/10.1021/jp1002403>
21. Bordi F., Cametti C., De Luca F. et al. Charged lipid monolayers at the air–solution interface: Coupling to polyelectrolytes // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2003. V. 29. № 2–3. P. 149–157.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00185-6)
22. de Meijere K., Brezesinski G., Möhwald H. Polyelectrolyte coupling to a charged lipid monolayer // Macromolecules. 1997. V. 30. № 8. P. 2337–2342.
<https://doi.org/10.1021/ma961490b>
23. Brezesinski G., Kjaer K., Möhwald H. Structure studies in coupled lipid–polyelectrolyte monolayers with diluted charge densities // Langmuir. 1998. V. 14. № 15. P. 4204–4209.
<https://doi.org/10.1021/la9709397>
24. Ortmann T., Ahrens H., Milewski S. et al. Lipid monolayers with adsorbed oppositely charged polyelectrolytes: Influence of reduced charge densities // Polymers. 2014. V. 6. № 7. P. 1999–2017.
<https://doi.org/10.3390/polym6071999>
25. Быков А.Г., Носков Б.А. Дилатационная поверхностная упругость растворов легочного сурфактанта в широкой области значений поверхностного натяжения // Коллоид. журн. 2021. Т. 80. № 5. С. 490–497.
<https://doi.org/10.1134/S0023291218050038>
26. Bykov A.G., Loglio G., Miller R., Noskov B.A. Dilational surface elasticity of monolayers of charged polystyrene nano- and microparticles at liquid/fluid interfaces // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 2015. V. 485. P. 42–48.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.09.004>
27. Bykov A.G., Milyaeva O.Y., Isakov N.A. et al. Dynamic properties of adsorption layers of pulmonary surfactants. Influence of matter exchange with bulk phase // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 2021. V. 611. P. 125851.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125851>
28. Ravera F., Miller R., Zuo Y.Y. et al. Methods and models to investigate the physicochemical functionality of pulmonary surfactant // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2021. V. 55. P. 101467.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101467>
29. Motschmann H., Teppner R. Ellipsometry in interface science // Studies in Interface Science. 2001. V. 11. P. 1–42.
[https://doi.org/10.1016/S1383-7303\(01\)80014-4](https://doi.org/10.1016/S1383-7303(01)80014-4)
30. Ghazvini S., Ricke B., Zasadzinski J.A., Dhar P. Monitoring phases and phase transitions in phosphatidylethanolamine monolayers using active interfacial microrheology // Soft. Matter. 2015. V. 11. № 17. P. 3313–3321.
<https://doi.org/10.1039/C4SM02900C>
31. Bykov A.G., Guzmán E., Rubio R.G. et al. Influence of temperature on dynamic surface properties of spread DPPC monolayers in a broad range of surface pressures // Chem. Phys. Lipids. 2019. V. 225. P. 104812.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104812>

УДК 541(49+64):547.963.32

СТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ: НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ

© 2023 г. А. А. Ефимова¹, *, А. В. Сыбачин¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ephimova@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 07.07.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

Разработка новых эффективных способов борьбы с тяжелыми заболеваниями, среди которых особое место занимают онкологические и инфекционные, остается актуальной задачей биомедицины и биотехнологии. В настоящее время усилия ученых сосредоточены на поисках лекарственных систем, обеспечивающих высокую эффективность лечения при минимальном воздействии на организм. Развитие этого направления привело к созданию стимул-чувствительных липосом, которые могут высвобождать инкапсулированное лекарство в ответ на определенный стимул: температуру, pH, электромагнитное поле, свет и др. Под воздействием стимула липидные бислойные везикулы изменяют структуру, размер, поверхностный заряд или фазовое состояние, что приводит к контролируемому высвобождению лекарственного препарата в определенном месте в организме, что позволяет добиться более точной и эффективной доставки. В данном обзоре обсуждаются современные тенденции в разработке стимул-чувствительных систем на основе липосом для контролируемой доставки биологически активных веществ.

Ключевые слова: липосома, стимул-чувствительные, доставка лекарств, биомедицина, биотехнология, инкапсулированное вещество, тераностика

DOI: 10.31857/S0023291223600608, **EDN:** ZAJLIN

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых эффективных способов борьбы с тяжелыми заболеваниями, среди которых особое место занимают онкологические и инфекционные, остается актуальной задачей биомедицины и биотехнологии. В настоящее время усилия ученых сосредоточены на поисках лекарственных систем, обеспечивающих высокую эффективность лечения при минимальном воздействии на организм. Среди проблем, ограничивающих применение многих препаратов, — малая биодоступность и низкая растворимость, риски развития побочных эффектов, а также резистентности и множественной лекарственной устойчивости, возникающих при длительной терапии [1]. Преодолеть эти трудности (хотя бы частично) можно, помещая лекарство в нано- или микрогабаритный контейнер [2–4]. Такой прием позволяет заметно повысить биодоступность малорастворимых лекарств, увеличить время циркулирования в кровотоке и предотвратить их преждевременное разложение компонентами крови [5].

Благодаря впечатляющему прогрессу в материаловедении и фармацевтике за последние десятилетия был разработан широкий спектр наносистем для лекарственных средств [6–8]. На сегодняшний день описаны десятки систем различного состава, архитектуры и морфологии для инкапсулирования и доставки биоактивных веществ: неорганические частицы [9, 10], мицеллы [11–13], дендримеры и полимерные микросферы [14–16], (био)коллоиды [17, 18], везикулы и т.д. Размер таких носителей обычно изменяется в интервале от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров, что позволяет осуществлять системное (внутривенное) или местное (через слизистую оболочку) введение и способствует их диффузии внутри клетки. Среди перечисленных наноконтейнеров для доставки и контролируемого высвобождения биологически активных веществ наиболее широкое использование получили липосомы — сферические бислойные липидные везикулы [19, 20]. В настоящее время на фармацевтическом рынке представлено большое количество липосомальных препаратов для про-

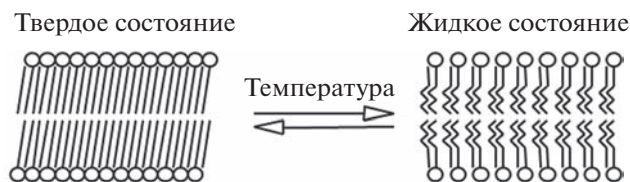


Рис. 1. Изменение структуры липидного бислоя при фазовом переходе.

тивоопухолевой, противовирусной и противомикробной терапии [21–24].

Развитие этого направления привело к созданию стимул-чувствительных липосом, которые могут высвобождать инкапсулированное водорастворимое лекарство в ответ на определенный (часто внешний) стимул, например температуру, ультразвук, электромагнитное поле, свет и др. [25–27]. Под воздействием стимула липидные бислоиные везикулы изменяют структуру, размер, поверхностный заряд или фазовое состояние, что приводит к контролируемому высвобождению лекарственного препарата в определенном месте в организме, что позволяет добиться более точной и эффективной доставки лекарственных веществ/субстанций/агентов. Стимул-чувствительные системы для доставки лекарств на основе липидных бислоиных везикул обладают рядом преимуществ над системами, использующими другие виды наночастиц. Это связано с тем, что липосомы сходны с клеточными природными мембранами по составу, биосовместимы и биodeградируемы, не токсичны и более устойчивы к разрушению в кровотоке. Кроме того, липосомы могут быть легко получены, а также функционализированы для улучшения специфичности и эффективности доставки биологически активных веществ [28].

В данном обзоре обсуждаются современные тенденции в разработке стимул-чувствительных систем на основе липосом для контролируемой доставки биологически активных веществ. Особое внимание уделено методам, приводящим к получению pH-чувствительных липосом, способных быстро высвобождать инкапсулированное вещество после попадания контейнера в области с пониженным значением pH, например, в опухоли, места воспалений или внутриклеточное пространство. Подробно рассмотрены представляющие большой интерес для исследователей магнито-чувствительные липосомы, содержащие магнитные наночастицы.

Одной из важнейших задач современной науки, возникающей при создании систем для доставки лекарств, является возможность контролируемого высвобождения препарата. Часто при попадании контейнера в целевые ткани не наблюдается высвобождения лекарственного веще-

ства в достаточной концентрации. Поэтому в настоящее время активно разрабатываются системы, чувствительные к патологическим изменениям, например, в микроокружении опухоли или очагах воспалений. Среди подобных физиологических отличий чаще всего используют более низкие значения pH, повышенную температуру, измененный редокс-потенциал [29]. Стимул-чувствительные липосомы сохраняют свою структуру и свойства во время циркуляции в организме, но способны образовывать большое количество дефектов в бислое или полностью разрушаться при попадании в специфические условия раковой опухоли или места сильных/обширных/существенных воспалений. При этом кинетика высвобождения заключенного в контейнер биоактивного препарата определяется многими факторами, в частности, концентрацией и природой инкапсулированного вещества, зарядом и составом липидного комплекса, размером и структурой липосом, а также внешними факторами, такими как температура, pH и др.

Термочувствительные липосомы

Термочувствительные липосомы способны удерживать лекарство в течение определенного периода времени, высвобождая содержимое в условиях локальной гипертермии: 41–45°C [30, 31]. Для получения подобных липосом используют липиды, температура фазового перехода которых лежит в пределах 38–42°C. При температуре фазового перехода липиды переходят из гелевого (твердого) в жидкокристаллическое (жидкое) состояние. Жидкое и твердое состояния мембран различаются набором параметров, одним из которых является подвижность липидов. В твердом состоянии подвижность липидных молекул как целого резко ограничена: углеводородные цепи имеют максимально вытянутую *транс*-конформацию и находятся в состоянии плотнейшей упаковки. При фазовом переходе плавление углеводородных цепей сопровождается резким увеличением их вращательной и колебательной подвижности за счет *гош-транс*-изомеризации, что приводит к разупорядочению упаковки липидов, что, как правило, сопровождается образованием дефектов в бислое и изменением проницаемости мембраны (рис. 1) [32–34].

Размер сквозных ионных каналов достаточен для прохождения большинства гидратированных ионов и гидрофильных органических веществ, составляющих основу множества лекарственных препаратов: радиус трансмембранных пор в липосомах достигает 1–3 нм [35].

В табл. 1. приведены значения температуры фазового перехода $T_{пл}$ некоторых фосфолипидов, наиболее часто применяемых для получения термочувствительных липосом [36, 37].

Использование смеси липидов с отличающимися температурами плавления в различных соотношениях позволяет создавать системы с необходимыми температурами фазовых переходов. Например, для липосом, содержащих дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) и дистеароилфосфатидилхолин (ДСФХ) в соотношении ДПФХ/ДСФХ = 3/1, температура плавления составляет 42–44°C [30]. Состав липидной мембраны обычно подбирают таким образом, чтобы температура фазового перехода не превышала 42°C, не вызывая значительного повреждения клеток тканей в результате гипертермии.

Одновременное использование термочувствительных липосом с локальным нагревом может увеличивать избирательность действия препарата [38].

Введение в мембрану на основе ДПФХ лизоформ липидов, имеющих отличающуюся от цилиндрической форму молекулы, увеличивает скорость высвобождения препарата, так как такие молекулы вызывают более эффективное деформирование в бислой при фазовом переходе. Одним из примеров подобных систем, прошедших все стадии клинических испытаний и рекомендованных для использования в медицинской практике, является препарат для лечения рака печени ThermoDox [39]. В состав ThermoDox входят лизолецитин и противоопухолевый агент доксорубин. ThermoDox способен всего лишь за 20 с высвободить до 50% активного вещества при температуре 39–42°C, что более чем на порядок превышает эффективность классического липосомального доксорубина Doxil. Несмотря на активные исследования в данной области, термочувствительные липосомы до сих пор не нашли широкого применения, так как гипертермия может приводить к значительному повреждению тканей.

Создание термочувствительных липосомальных систем возможно также и с помощью формирования комплексов традиционных липосом полимером, обладающим термочувствительностью. Обычно в роли такого полимера используется поли-*N*-изопропилакриламид (ПНИПАМ) или его сополимеры [40, 41]. Гели на основе ПНИПАМ могут адсорбировать липосомы на своей “поверхности” за счет гидрофобных или электростатических взаимодействий, формируя мультлипосомальные коллоидно стабильные системы [42, 43]. Увеличение температуры выше нижней критической температуры растворения полимера приводит к коллапсу микрогеля и, как результат, механическому разрушению контактирующих мембран липосом в адсорбированном слое. В этом случае происходит высвобождение инкапсулированного в липосомы лекарства.

Таблица 1. Температуры фазового перехода ($T_{пл}$) некоторых фосфолипидов

Фосфолипид	$T_{пл}$, °C
Дипальмитоилфосфатидилхолин	41
Дистеароилфосфатидилхолин	53
Димиритоилфосфатидилэтаноламин	48

Фоточувствительные липосомы

Фоточувствительные липосомы высвобождают терапевтические средства при воздействии излучения разной длины волны: ультрафиолетового (УФ), видимого и ближнего инфракрасного (ИК). Среди других внешних стимулов воздействие светом является одним из наиболее привлекательных методов получения отклика. Это воздействие не инвазивно, может быть удаленным и точечным, что позволяет эффективно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства путем изменения длины волны, времени и интенсивности воздействия. Другое преимущество фоточувствительных липосом заключается в том, что фотохимические процессы не требуют использования дополнительных реагентов или катализаторов, а большинство побочных продуктов, если таковые имеются, безвредны и не являются токсичными [44]. Фотодинамическая терапия является относительно новым терапевтическим методом, который хорошо зарекомендовал себя для лечения различных видов рака кожи, таких как базальноклеточная карцинома и др. [45]. При контроле проникновения света внутрь человеческого тела учитываются такие параметры как диаметр луча, длина волны, продолжительность воздействия, измеряемая интенсивность и т. д. Одним из примеров фоточувствительных липосомальных препаратов является Visudyne®, разработанный Novartis Ophthalmics, для лечения влажной формы возрастной макулодистрофии, характеризующейся образованием хориоидальной неоваскуляризации [46].

Существует несколько подходов к созданию фоточувствительных липосом [47, 48]. Запускаемое светом высвобождение лекарственного средства вызывается обратимыми или необратимыми структурными модификациями фоточувствительных носителей. Одним из способов является встраивание в мембрану липосом синтетических фототриггеров, например, производных азобензола. Другой метод основан на использовании фотохимически модифицированного липида в качестве одного из компонентов бислоя. Воздействие УФ-излучения на двойные связи таких липидов способствует изменению конформации углеводородных цепей, что приводит к нарушению в упаковке липидов в мембране и увеличивает ее проницаемость. Примером одного из фотоизомеризуемых липи-

дов является (1,2-(4'-*n*-бутилфенил)азо-4'-(γ -фенилбутироил))-глицеро-3-фосфохолин, который встраивают в мембрану в низких концентрациях. В термодинамически выгодной *транс*-форме данный липид представляет собой компактную молекулу, легко встраивающуюся в липидный бислой. При УФ-воздействии фотохромный липид переходит в состояние, в котором доминирует *цис*-изомер, способствующий быстрому высвобождению инкапсулированного вещества [49].

Другим способом получения фоточувствительных систем на основе липосом является их нековалентное связывание с полиэлектролитами, модифицированными фоточувствительными группами [50]. Действие УФ-излучения приводит к фотоизомеризации таких групп, изменению сродства молекул к липидному бислою, а следовательно — нарушению его структуры и высвобождению инкапсулированного препарата. Облучение фоточувствительного источника протонов может вызывать значительное изменение pH среды, сопровождающееся резким изменением конформации макромолекул полиэлектролита, что также приводит к разрушению липосом.

Хотя фоточувствительные липосомы могут контролируемо высвобождать содержимое в соответствующих условиях, их применение в клинической практике ограничено низкой стабильностью в плазме, поэтому в настоящее время исследователи сфокусированы на разработке фотолипосом с длительной циркуляцией в кровотоке. Другим ограничивающим фактором является потенциальная токсичность и/или канцерогенность производных азобензола, используемых в качестве фототриггеров. Большинство фоточувствительных липосом откликается лишь на воздействие УФ-излучения, что также является серьезным ограничивающим фактором. Наиболее эффективно использование фоточувствительных липосом при лечении кожных и глазных заболеваний, когда ближе к УФ-излучению имеет достаточную проникающую способность. В тех случаях, когда требуется большая глубина проникновения, используют инициирование ближним ИК-светом, способным проникать глубоко в мягкие ткани. Следует учитывать, что длительное облучение УФ может быть опасным для человеческого организма. Другим недостатком является отсутствие возможности промышленного масштабирования фоточувствительных систем доставки, что также препятствует их клиническому применению.

Редокс-чувствительные липосомы

Принцип работы редокс-чувствительных липосом основан на разнице в окислительно-восстановительных потенциалах, которая существует между окислительной средой снаружи клетки и восстановительной внутри нее. Глутатион явля-

ется восстановителем, в котором тиоловые группы нейтрализуют накопление активных форм кислорода в раковых тканях. Он защищает биологические системы, окисляясь до дисульфида глутатиона, который восстанавливается обратно с помощью глутатионредуктазы. Соотношение восстановленной (ВФГ) и окисленной форм (ОФГ) глутатиона в клетке является одним из важнейших параметров, который показывает уровень окислительного стресса. Было обнаружено, что концентрация ВФГ в раковой ткани примерно в 100 раз превышает таковую в здоровой ткани и в 100–1000 раз в крови [51]. Повышенные уровни ВФГ в раковых клетках по сравнению со здоровыми тканями представляют собой существенный стимул для стимул-чувствительной доставки лекарств. В липосомы внедряют редокс-чувствительные связи или линкеры, например, дисульфидные связи. При их восстановлении до тиольных групп целостность нарушается, и липосомы высвобождают заключенное в них вещество [52].

Нойхаузер и соавт. (Noyhouzer et al.) использовали модифицированные ферроценом однослойные фосфолипидные липосомы в качестве стимул-чувствительной системы для контролируемого высвобождения лекарства с помощью окислительно-восстановительного механизма внутри раковых клеток HeLa [53]. Поскольку ферроценовые группы на поверхности запускали окислительно-восстановительные реакции, оценка высвобождения лекарственного средства проводилась методом проточной цитометрии. При этом полученные результаты показали высокую специфичность метода.

Вэнг и соавт. (Wang et al.) разработали липосомы, характеризующиеся высокой емкостью, на основе дисульфидфосфатидилхолина, полиэтиленгликоля (ПЭГ-2000) и холестерина для доставки иринотекана [54], которые продемонстрировали превосходную фармакокинетику по сравнению с обычными липосомами, содержащими иринотекан, а также со свободным препаратом.

В работе [55] описаны редокс-чувствительные липосомы, построенные из диолеилфосфатидилэтаноламина, к полярной голове которого ковалентно присоединен фрагмент, содержащий хинон. Больные клетки производят хиноновые редуктазы, которые восстанавливают хинон, что способствует разрыву ковалентных связей и индуцирует высвобождение лекарственного вещества из внутренней полости липосом.

Мирхади (Mirhadi et al.) с соавт. использовали чувствительное к окислительно-восстановительному потенциалу соединение (10,10'-диселенди-либисдекановую кислоту) для повышения терапевтической эффективности липосом, нагруженных доксорубином [56]. Оптимальные составы показали быстрое высвобождение 30% препарата в присутствии 0.1% перекиси водорода при pH

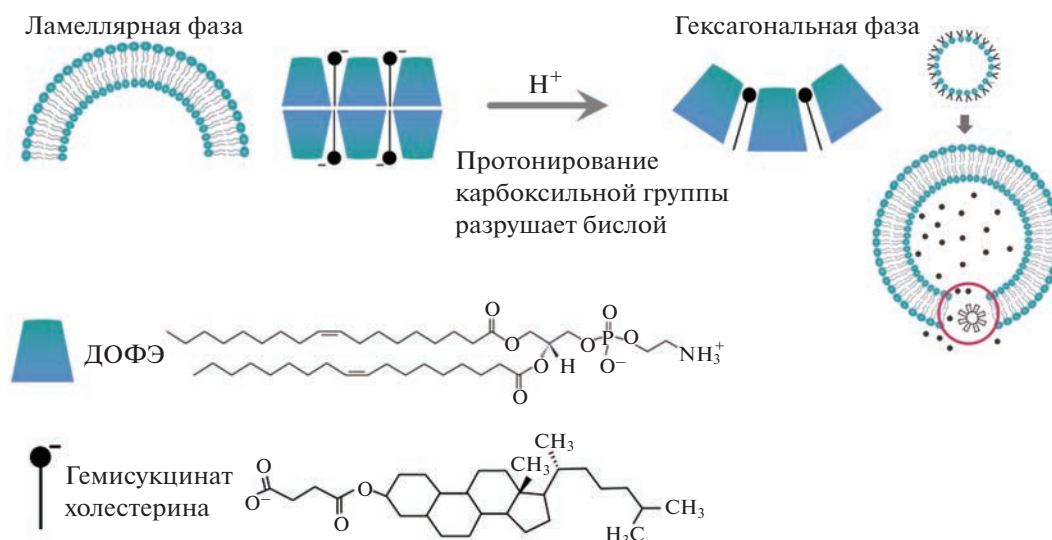


Рис. 2. Образование дефектов в липидном бислое при протонировании гемисукцината холестерина.

6.5. Был также разработан многокомпонентный состав (с гиалуроновой кислотой) для усиленного синергетического противоопухолевого воздействия [57].

Использование окислительно-восстановительных стимулов высвобождения лекарственных препаратов является перспективным направлением нанофармакологии. Однако существует ряд сложностей, связанных с гетерогенной природой опухолевых клеток, что не позволяет установить специфические окислительно-восстановительные реакции для всех типов опухолевых тканей. Кроме того, поиск окислительно-восстановительных триггеров для доставки нескольких лекарственных веществ, которые высвобождались бы в разное время и с разной скоростью, для таких систем представляет собой сложную задачу.

pH-чувствительные липосомы

Особый интерес исследователей вызывает разработка pH-чувствительных липосом, которые для своего раскрытия не требуют внешнего воздействия: инкапсулированное вещество спонтанно высвобождается из липосом после попадания их в области с пониженным значением pH — опухоли и места воспалений [58]. Известно, что во многих опухолях и местах воспалений внеклеточные значения pH существенно отличаются от физиологических (7.4) и изменяются в интервале от 6 до 7.2, а в некоторых случаях демонстрируют значения менее 6 [59].

Существует несколько основных подходов для придания липосомам pH-чувствительности: изменение состава липидной мембраны, встраива-

ние в бислой pH-чувствительных соединений, модификация поверхности липосом.

Некоторые липиды, у которых объем полярной “головы” существенно меньше объема, занимаемого “хвостами”, склонны образовывать обращенную гексагональную фазу вместо упаковки в бислойные структуры [60]. Устойчивый бислой не может образоваться только из одного такого липида, поэтому дополнительно вводят стабилизатор, содержащий кислотную группу (как правило, карбоксильную). При подкислении среды эта группа протонируется с погашением отрицательного заряда, наличие которого ранее стабилизировало липидный бислой (рис. 2). В результате молекулы липида стремятся образовать отдельную фазу, разрывая участки мембраны липосомы, и через образовавшиеся дефекты лекарство высвобождается [61].

Часто для синтеза pH-чувствительных липосом используют “вставки” — сайт-специфические лиганды, олигопептиды. В работе [62] описано использование для этой цели олигопептида из 30 звеньев с повторяющимся фрагментом глутамилаланиллейцилаланина (ГАЛА). При физиологических значениях pH эта молекула располагается на поверхности липосомальной мембраны, а при более кислых значениях pH слои ГАЛА протонируются, принимают форму спиралей и внедряются в липосому с образованием пор, через которые содержимое липосом высвобождается во внешнюю среду.

Такие лиганды, как гиалуроновая и фолиевая кислоты, трансферрин и др., распознают и связываются со специфическим рецептором, сверхэкспрессированным на клетках-мишенях, запуская эндоцитоз и обеспечивая эндосомальную лока-

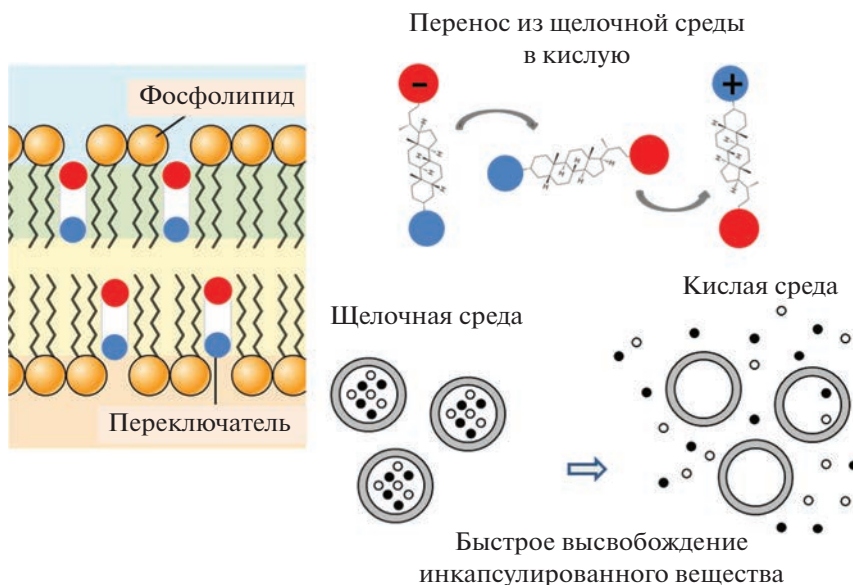


Рис. 3. Схематичное представление работы pH-чувствительного переключателя- амфифильного производного литто-холевой кислоты.

лизацию [63, 64]. Например, Миязаки и соавт. (Miyazaki et al.) разработали модифицированные гиалуроновой кислотой pH-чувствительные липосомы с целевыми свойствами в отношении клеток, экспрессирующих CD44 [65]. Было продемонстрировано более эффективное высвобождение доксорубина, чем в случае немодифицированных липосом.

Оригинальный подход к созданию pH-чувствительных липосом был предложен авторами работы, в которой в мембрану липосом встраивали специально синтезированные липидоподобные соединения, способные изменять конформацию своих алкильных радикалов при понижении pH внешнего раствора [66–69]. Такие перестройки в молекуле “конформационного переключателя” вызывали нарушение упаковки гидрофобной части липидного бислоя и высвобождение инкапсулированных в липосомы водорастворимых веществ. Однако быстрое высвобождение было возможно только в том случае, если мембрана содержала значительные количества переключателя (30 вес. % и более), что приводило к нежелательному повышению (cito)токсичности липосом.

Еще одним типом конформационных переключателей, реагирующих на изменение pH, являются производные 3,7-дiazобиккло[3.3.1]нонан-9-она (биспидинона). Эти вещества изменяют конформацию при добавлении солей двухвалентной меди. Эффект обусловлен комплексообразованием с ионами меди, что в итоге приводит к ослаблению упаковки алкильных цепей в мембране и повышению проницаемости липидного

бислоя, сопровождающееся высвобождением инкапсулированного вещества [70].

Недавно был описан новый тип pH-чувствительного переключателя, представляющий собой производное литохолевой кислоты со стероидным ядром и двумя ионными группами, катионной и анионной [71]. При изменении кислотности внешнего раствора молекулы переключателя меняют свою ориентацию в липидном бислое, что приводит к нарушению упаковки липидов в бислое и формированию в нем дефектов, через которые происходит высвобождение водорастворимого инкапсулированного вещества (рис. 3). Вращение переключателя в мембране развивается очень быстро и сопровождается количественным вытеканием инкапсулированного в липосомах водорастворимого биологически активного вещества [72]. Принципиально, что для выхода лекарства достаточно встроить в мембрану 3 вес. % переключателя. Показано, что эффективность работы переключателя определяется природой ионных групп, присоединенных к стероидному ядру [73], а скорость высвобождения инкапсулированного вещества в первые минуты после подкисления максимальна для производного литохолевой кислоты, содержащего амино- и карбоксильные группы [72]. Для повышения эффективности доставки и увеличения терапевтического эффекта липосомы концентрируют на поверхности биodeградируемых носителей [74, 75]. В настоящее время усилия исследователей сосредоточены на поиске наиболее оптимального носителя для pH-чувствительных липосом.

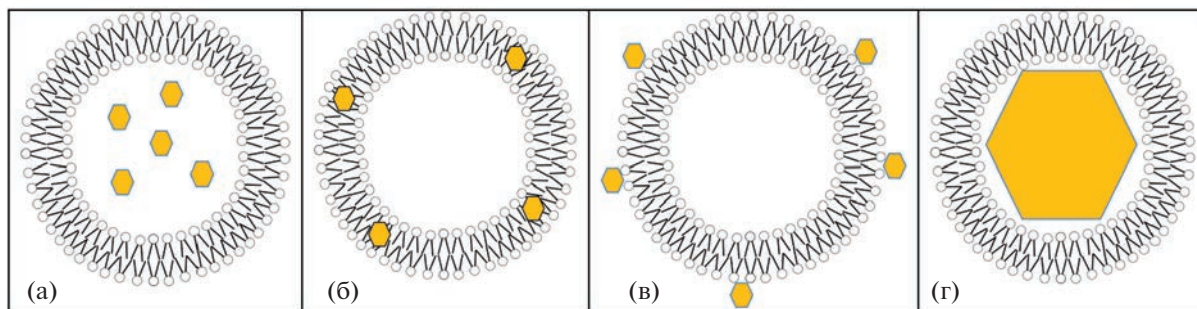


Рис. 4. Схема возможного распределения магнитных наночастиц в липосомах: гидрофильные наночастицы внутри водной полости (а); гидрофобные наночастицы внутри липидного бислоя (б); гидрофильные наночастицы на поверхности липосом (в); крупная наночастица, поверхность которой модифицирована липидным бислоем (г).

Часто поверхность рН-чувствительных липосом модифицируют полимерами, содержащими чувствительные к рН среды группы, способные к диссоциации в ответ на изменение этого параметра. Диссоциация групп приводит к высвобождению терапевтического средства рядом с опухолью, при этом полимерная оболочка защищает здоровые клетки от токсического воздействия препарата. Некоторые полимеры могут дестабилизировать фосфолипидный бислой, другие — индуцировать слияние липосомы с мембраной клеток [76, 77].

Липосомальные контейнеры, как правило, модифицируют производными ПЭГ для увеличения продолжительности циркуляции в кровеносном русле. Таким образом получают так называемые липосомы-невидимки (“stealth” липосомы), время жизни которых в кровотоке составляет несколько дней [78, 79]. Введение функциональных сшивок между цепями ПЭГ и липидами, формирующими бислой, позволяет получить рН-чувствительные контейнеры. В работе [80] описано связывание ПЭГ и фосфатидилэтаноламина гидразоновым мостиком. При пониженных значениях рН происходит гидролиз гидразона, оболочка отщепляется от мембраны, что индуцирует высвобождение биоактивного вещества.

Еще одно направление связано с использованием новых материалов для модификации поверхности липосом. Например, модификация малеимидом позволяет избежать полной деградации после эндцитоза при доставке в лизосомы раковых клеток. В работе [81] установлено, что использование рН-чувствительных липосом, покрытых полидофамином, существенно улучшает эффективность инкапсулированного 5-фторурацила по сравнению со свободным лекарством.

рН-чувствительные липосомы являются перспективными системами для контролируемой доставки лекарственных средств в целевые области организма. Кроме того, использование подобных липосом позволяет уменьшить эффективную дозу

препарата, снизить токсичность и побочные эффекты от лечения. В настоящее время разработано большое количество рН-чувствительных липосом, поэтому требуется проведение клинических испытаний с наиболее оптимальными системами.

Магниточувствительные липосомы

Одним из наиболее широко используемых внешних воздействий на липосомальные наноконтейнеры является магнитное поле. Сами липосомы не обладают магниточувствительностью, поэтому для получения отклика на внешнее магнитное поле требуется дополнительная модификация липосом магнитными наночастицами. Наиболее подходящими объектами для такой модификации являются суперпарамагнитные частицы, для которых магнетизм проявляется только при воздействии магнитного поля. Обычно это наночастицы состоят из железа, кобальта, никеля и пр. металлов и их оксидов [82]. Размер наночастиц, при котором проявляется суперпарамагнетизм обычно не превышает 50 нм. Эта предельная величина превышает размер липидного бислоя и соизмерима со средним размером малых моноламельярных липосом. Можно выделить три основных типа липосомальных контейнеров, модифицированных магнитными наночастицами: 1) гидрофильные наночастицы распределены внутри водной полости липосом; 2) гидрофобные наночастицы распределены в липидном бислое; 3) поверхность липосом модифицирована магнитными наночастицами (рис. 4а–4в). Отдельно можно выделить системы, в которых достаточно крупные суперпарамагнитные наночастицы с диаметром от 14–20 нм модифицированы липидным бислоем. В этом случае наночастица занимает практически весь внутренний объем липосом (рис. 4г). Обычно в таких частицах железо самостоятельно выполняет роль лекарственного препарата в дополнение к приданию системе магнитоуправляемости [83], например, для повышения доли железа в организме при анемии, вызванной

его недостатком [84]. Таким образом, для модификации липосом магнитными наночастицами их желательный размер не должен превышать 14 нм.

Магнитные наночастицы смешанного оксида $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (SPIONs — super paramagnetic iron oxide nanoparticles) наиболее часто применяют для модификации наноконтейнеров [85]. Данные наночастицы получают методами лазерного пиролиза, золь-гель синтеза, соосаждением солей железа в щелочи, термическим разложением карбониллов железа — последние два метода являются наиболее массовыми [86–90]. Другим распространенным оксидом железа, используемым для придания магниточувствительных свойств наноконтейнерам, является маггемит — гамма оксид железа. Структурно маггемит сходен с магнетитом, но обладает менее выраженными магнитными свойствами. При этом маггемит более термодинамически стабилен и не подвержен реакциям окисления и реакциям с участием радикалов, которые могут проходить в биологических средах при применении магнетита [91]. Маггемит может быть получен как путем окисления магнетита, так и прямым синтезом высокотемпературного разложения, так и синтезом в присутствии циклодекстринов в качестве стабилизаторов при комнатной температуре [92, 93].

Формирующиеся частицы в отсутствие стабилизатора склонны к агрегации. В качестве стабилизаторов обычно применяют декстран, хитозан, ПЭГ, поливиниловый спирт и низкомолекулярные поверхностно-активные вещества (ПАВ) [94–97]. Обычно синтезированные наночастицы измельчают воздействием ультразвука в присутствии стабилизатора [93, 98, 99].

С момента представления магнитных наночастиц как контрастирующих агентов в магнитно-резонансной томографии (МРТ) было зарегистрировано множество коммерческих продуктов на основе суперпарамагнитных оксидов железа — Venofer®, Ferrlecit®, INFeD®, Dextrum®, Fera-heme™, Feridex®, Resovist®, GastroMARK™, NanoTherm®, Combidex®, Clariscan®, Ferinject® и др., которые получили разрешение для клинического применения. Однако в течение небольшого промежутка времени были обнаружены побочные действия, а также низкая клиническая эффективность этих продуктов, что привело к запрету на их использование. На сегодняшний день только две формуляции присутствуют на рынке — Feraheme™ and NanoTherm® [100]. Причинами такого результата стали слишком маленькие размеры наночастиц, вследствие чего наблюдалось их накопление в различных (не целевых) органах, нарушение их нормального функционирования, нарушение работы нейронов и вызываемые действием этих наночастиц мутации. Применение

же более крупных наночастиц приводило к их агрегации, выпадению в осадок и, как следствие, закупорке сосудов. Включение наночастиц в липосомы позволяет избавиться от таких негативных последствий внедрения в организм магнитных наночастиц.

Включение магнитных наночастиц в липосомы может осуществляться следующим путем: добавление наночастиц на стадии приготовления липосом к раствору липидов в органическом растворителе в случае гидрофобных наночастиц и добавление водной дисперсии гидрофильных наночастиц к пленке липидов с последующим удалением несвязанных наночастиц с помощью хроматографии [91, 101, 102]. Прямая модификация поверхности липосом за счет конъюгирования с магнитными наночастицами применяется довольно редко [101, 102], но бывает и эффективное решение модификации, например, за счет электростатической адсорбции положительно заряженных наночастиц, стабилизированных маннозой, на отрицательно заряженную поверхность липосом путем смешения водных дисперсий липосом и наночастиц с последующим удалением несвязанных наночастиц центрифугированием [98].

В случае использования гидрофобных наночастиц для создания магнитных липосом возникает проблема соответствия размеров наночастиц и бислоя. Уменьшение размера наночастиц ведет к ухудшению магнитных свойств, с другой стороны, размер включаемых в бислой наночастиц не должен превышать его толщину — 3–4 нм. Теоретические расчеты показывают, что максимальный размер наночастиц, которые можно включить в бислой составляет 5 нм [103]. При этом в ряде статей сообщается об успешном включении в липидный бислой магнитных наночастиц размером от 6 до 15 нм [104, 105]. Для этого использовали наночастицы оксида железа, стабилизированные олеиновой кислотой. Попытка смешать липиды и магнитные наночастицы в органическом растворителе с его последующим удалением и диспергированием пленки в водно-солевом буфере не привела к успешному включению крупных наночастиц. Поэтому авторами [104] было предложено использовать хлороформ в качестве растворителя липидов и наночастиц, при этом процедура приготовления липосом включала получение эмульсии в смеси водного буфера и хлороформа с соотношением органической фазы к водной 9 : 1. Далее методом ультразвуковой обработки была получена стабильная эмульсия по типу масло в воде. При нагревании этой эмульсии при 45°C в течение получаса хлороформ испарялся, а образующиеся структуры представляли собой магнитные липосомы с относительно невысокой полидисперсностью. Структурно в таких липосомах наночастицы представляют собой обернутые липидной мембраной включения, что вызывает значитель-

ное деформирование последней. Поэтому в таких системах наночастицы склонны не к симметричному распределению в мембране, а к агрегации внутри бислоя с целью понижения поверхностной энергии [105]. Таким образом, включенные в липосомы крупные магнитные наночастицы формируют янусоподобные структуры.

Основное применение магниточувствительных липосомы нашли в целевой доставке лекарств. Воздействие внешнего магнитного поля, вызываемого постоянным магнитом, источником переменного магнитного поля или микроволновым излучением, позволяет аккумулировать липосомальные наноконтейнеры в пораженных органах и тканях [106]. При этом использование магнитных липосом позволяет преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). ГЭБ образуется эндотелиальными клетками капилляров головного мозга, удерживаемыми близко друг к другу плотными соединениями, что ограничивает парацеллюлярный транспорт терапевтических средств. Таким образом, лекарственные препараты могут быть доставлены через ГЭБ только либо потому, что они обладают высокой липофильностью, либо потому, что они способны использовать естественные транспортеры организма, ведущие к внутриклеточному транспорту в мозге. При приложении внешней магнитной силы для доставки магнитных наночастиц в мозг частицы будут проникать через ГЭБ и далее в мозговую ткань. Исследования безопасности такого перемещения частиц через ГЭБ или нейроны не показали никаких цитотоксических эффектов, разрушения нервных волокон или влияния на функцию нейронных цепей [107].

Наличие пары $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ в магнетите делает возможным создание липосомальных наноконтейнеров, способных помимо целевой доставки осуществлять дополнительное воздействие на опухолевые клетки за счет взаимодействия с перекисью водорода и генерации радикалов $\text{OH}\cdot$. Авторами [108] была предложена комплексная липосомальная система, содержащая компоненты для химиотерапии, химиодинамической терапии, терапии голоданием и синергетической терапии магнитным наведением. В состав липосом были включены: а) партенолид, способный индуцировать апоптоз опухолевых клеток и потреблять избыточный глутатион, тем самым повышая эффективность химиодинамической терапии; б) глюкозооксидаза, которая может потреблять внутриопухолевую глюкозу, снижать pH и повышать уровень H_2O_2 в опухолевой ткани. Интегрированные в липосомы магнитные наночастицы выполняют две функции – эффективно катализируют превращение H_2O_2 в высокотоксичный гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) и обеспечивают магнитное наведение.

Усиление эффективности целевой доставки магнитных липосомальных наноконтейнеров может быть достигнуто дополнительной векторизацией – модификацией поверхности липосом белками или антигенами, обеспечивающими специфическое связывание липосом с клетками-мишенями [109].

Также важным свойством модифицированных магнитными наночастицами липосом является возможность выступать в роли контрастирующих агентов в МРТ [86, 110]. Сами липосомы не обладают контрастом, который можно увидеть на МРТ-снимках. Использование данного метода позволяет неинвазивно оценить распределение липосомальных наноконтейнеров в различных органах. Также данный метод позволяет оценивать кинетику накопления липосомальных наноконтейнеров. С помощью модифицированных магнитными наночастицами липосом оценивают эффективность активного нацеливания наноконтейнеров путем модификации поверхности липидного бислоя специфическими лигандами, например, производными фолиевой кислоты, содержание рецепторов на которую у опухолевых клеток повышена. В комбинации с другими методами анализа, например, флуоресцентной микроскопией, можно оценить локализацию как наноконтейнера, так и доставляемого лекарства. Так оценивают локализацию противоопухолевого антибиотика доксорубина, обладающего флуоресценцией [111].

Отдельно стоит выделить способность магнитных наночастиц разогреваться при действии переменного магнитного поля, что позволяет создавать очаги локального нагрева в области нахождения подвергаемых воздействию наночастиц-гипертермии [112].

Магнитожидкостная гипертермия была впервые предложена Гилкристом и его коллегами. Суть процедуры заключается во введении магнитных наночастиц непосредственно в определенную ткань или орган с последующим воздействием на эту область переменного магнитного поля, что, в свою очередь, приводит к ее разогреванию до температуры 45–47°C и, как следствие, гибели клеток. Скорость и предельные температуры нагрева, как правило, зависят от состава наночастиц, их формы, размера и концентрации. При этом сам нагрев происходит за счет релаксационных процессов. А скорость этих процессов симбатно регулируется амплитудой и частотой переменного магнитного поля [101, 113–115]. При фиксированной частоте в 310 кГц липосомальные наноконтейнеры, содержащие во внутренней полости наночастицы магнетита со средним размером 12 нм, оказались способны к разогреванию окружающего раствора от 20 до 27°C при напряженности магнитного поля 200 Э; до 40°C при напряженности магнитного поля 400 Э и до 50°C при напря-

женности магнитного поля 800 Э. При этом использование дисперсии магнитных наночастиц, не включенных в липосомы, также приводило к повышению температуры, но в значительно меньшей степени [115]. По-видимому, это связано с локальной концентрацией наночастиц во внутренней полости липосом.

В то же время было показано, что сильное воздействие переменного магнитного поля может привести к неспецифическому нагреву областей без наночастиц вследствие вихревых токов. С целью исключить негативное воздействие на здоровые ткани были установлены ограничения параметров магнитного воздействия при терапии с помощью гипотермии, вызываемой магнитными наночастицами. Обычно рекомендуемые частоты магнитного поля составляют 100–200 кГц при магнитной индукции 20 мТл.

Способность магнитных наночастиц локально повышать температуру при действии внешнего магнитного поля используется для создания липосомальных наноконтейнеров с контролируемым высвобождением инкапсулированных препаратов. В основе данного подхода лежит формирование липосомальной мембраны из липидов, претерпевающих фазовый переход при температуре 38°C и выше. При этом включение наночастиц в мембрану приводит к снижению температуры фазового перехода липидов вследствие локального разупорядочивания мембраны [116]. Авторами [117] было продемонстрировано, что анизотропия магниточувствительных наночастиц, включенных в липосомы, в значительной мере усиливает эффект нагревания липидного бислоя.

Авторами [113] было продемонстрировано, что использование липосом с магнитными наночастицами, сформированными двухфазной системой Fe_3O_4 $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$, загруженными антибиотиком — паклитакселом, значительно усиливает терапевтический противоопухолевый эффект при гипертермии, индуцированной внешним переменным магнитным полем, по сравнению с индивидуальными магнитными липосомами и магнитными липосомами, заполненными паклитакселом, но без воздействия внешнего магнитного поля. При этом стоит отметить, что противоопухолевое действие гипертермии не такое эффективное по сравнению с действием паклитаксела — при равных концентрациях липосом выживаемость опухолевых клеток линии L929 *in vitro* составила 70% для магнитолипосом при действии переменного магнитного поля, 50% для магнитолипосом, заполненных паклитакселом, без действия поля. Кумулятивное применение магнитолипосом, заполненных паклитакселом, при воздействии магнитного поля привело к тому, что выжило лишь 30% клеток. Отдельно стоит отметить данные по экспериментам *in vivo*. Однократное введение до-

зы магнитолипосом с лекарством и использованием гипертермии привело к 2.5-кратному подавлению роста опухоли у мышей, а двукратное введение липосомального препарата привело к 3.6-кратному подавлению роста опухоли. При этом магнитные липосомальные наноконтейнеры успешно были локализованы в области опухоли и не были обнаружены в других органах мышей.

В работе [118] исследовали влияние воздействия переменного магнитного поля на липосомы из ДПФХ, заполненные доксорубицином, содержащие магнитные частицы оксида железа на внешней поверхности бислоя. Авторами отмечено, что наблюдалось частичное заглубление наночастиц в бислой, однако, целостность липидной мембраны не нарушалась. Воздействие внешнего магнитного поля (202 кГц и 30 мТ) не привело к гибели клеток при использовании незагруженных антибиотиком липосом, в то время как для системы, содержащей доксорубин, наблюдался значительный эффект гибели опухолевых клеток. Следует отметить, что цитотоксичность таких липосом (при воздействии магнитного поля) все равно оказалась меньше, чем цитотоксичность неинкапсулированного доксорубина. Таким образом, главное преимущество данной системы — это магнитоуправляемая локализация антибиотика и его контролируемое высвобождение.

Контролируемое высвобождение лекарственного препарата из липосом, содержащих магнитные наночастицы, можно осуществлять без индуцируемых фазовых переходов в липидной мембране, а за счет механического нарушения целостности липидного бислоя или полного механического разрушения липосом. Хомутовым с коллегами было продемонстрировано, что модификация поверхности липосом, сформированных из стеароилспермина и фосфатидилхолина наночастицами магнетита, приводит к формированию коллоидно стабильных липосом. Комплексы формируются за счет взаимодействия фрагмента спермина с поверхностью наночастиц, не содержащих лигандов (рис. 5). Такие липосомы способны инкапсулировать доксорубин и контролируемого высвободить его при воздействии на суспензию короткочастотных импульсов [119, 120].

Структурная организация липосомальной мембраны существенно сказывается на эффективности высвобождения инкапсулированных лекарств под действием магнитного поля на наночастицы, включенные в липидный бислой, и чем более упорядочена исходная липидная мембрана: жидкокристаллическая разупорядоченная, жидкокристаллическая упорядоченная и гелеобразная, тем больше высвобождается гидрофильного содержимого из внутренней полости во внешний раствор [121]. По-видимому, это связано с релаксационными процесса-

ми и подвижностью липидов в мембране, иными словами способностью липидов быстро залечивать формирующиеся в бислое дефекты.

Повышение эффективности действия магнито-чувствительных липосомальных наноконтейнеров может быть достигнуто за счет их дополнительного концентрирования на коллоидном носителе, чувствительном к воздействию ультразвука [122]. Таким образом, при двойном воздействии магнита и ультразвука повышается эффективность действия инкапсулированного противоопухолевого антибиотика — доксорубина, однако такое повышение эффективности может быть связано не столько с двойным воздействием, сколько с аккумулярованием липосом на носителе, что было ранее продемонстрировано авторами [123] — липосомы, заполненные цисплатином, проявляли цитотоксичность при аккумуляровании на полилактидных мицеллах, в то время как свободные липосомы при той же концентрации липидов цитотоксичности не проявляли.

Применение магнито-чувствительных липосом в тераностике

Уникальным свойством липосомальных наноконтейнеров, модифицированных магнитными наночастицами, является возможность их использования в тераностике — направлении медицины, использующем лекарственные препараты, обеспечивающие одновременную диагностику (обнаружение пораженных областей) и терапию (доставка лекарства) [124]. Так, включение в липосомы, несущие различные лекарственные молекулы и их комбинации, наночастиц оксида марганца позволило отследить с помощью МРТ распределение наноконтейнеров в различных органах во времени, эффективность накопления в опухолях, а также зарегистрировать времена, через которые наблюдались уменьшения опухолевых областей.

Применение комбинации лекарственного препарата и контрастирующего агента в липосомальном носителе может сказаться на эффективности действия индивидуальных компонентов. Так, применение фталоцианина цинка в качестве фотосенсибилизатора способно увеличить эффективность контрастирования в МРТ ионов гадолиния [125]. Однако природа этого эффекта авторами не исследована. Включение наночастиц магнетита в термочувствительные липосомы, в которых для высвобождения инкапсулированного доксорубина использовали фототермическое возбуждение лазером при 808 нм, позволило снизить время, при котором наблюдалось взрывное высвобождение антибиотика по сравнению с классическим нагреванием термочувствительных липосом [111]. Для липосомальных тераностических систем на основе оксида марганца и паклитаксела как действующих веществ также было продемон-

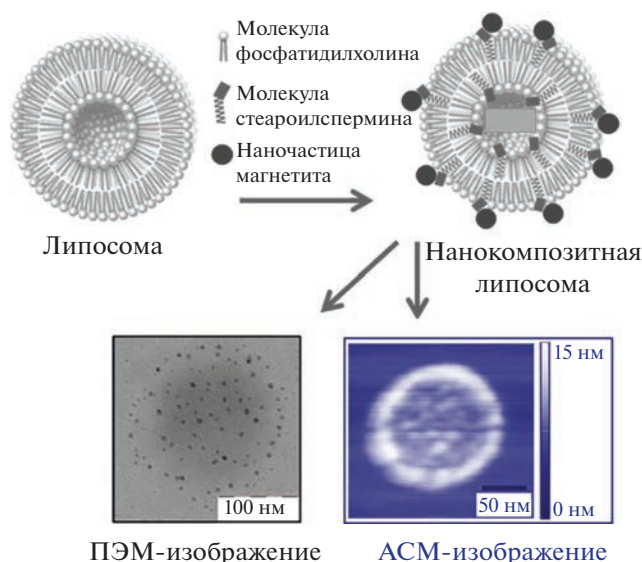


Рис. 5. Липосома, модифицированная наночастицами магнетита. Схематическое изображение и микрофотографии атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии.

стрировано кумулятивное повышение эффективности действия антибиотика [126]. Тераностическая система обеспечивала более пролонгированное действие и большую степень высвобождения антибиотика, чем простая липосомальная форма паклитаксела. При этом накопление липосомального тераностического препарата в опухоли происходило дольше, чем для контрастирующего агента, стабилизированного ПАВ, однако времена удержания контрастирующего агента в опухоли отличались практически в три раза (12 ч для стабилизированного ПАВ MnO против 36 ч для липосомальной формы).

Для создания липосом для тераностики могут быть применены не только магнитные наночастицы, но и ионы Gd^{3+} . Сами ионы гадолиния являются достаточно цитотоксичными, формирование хелатных комплексов с фосфолипидами, встраиваемыми в мембрану липосом, например, дистеароилглицерофосфоэтаноламин-*N*-диэтилтриаминпентауксусной кислотой, нивелирует эту токсичность [127].

Для тераностики возможна комбинация методов детектирования, например, сочетание МРТ и флуоресценции, для этого в магнито-чувствительные липосомы вводят флуоресцентный краситель, однако визуализация распределения липосомальных наноконтейнеров *in vivo* уже не может проводиться только неинвазивным методом и требует хирургического вмешательства [128].

Повышение эффективности терапевтического действия тераностических липосом может быть достигнуто при дополнительном воздействии на

липосомы, напрямую не затрагивающим включенные магнитные наночастицы, например, сфокусированное ультразвуковое воздействие, также используемое для локальной гипертермии и обеспечивающее более эффективное накопление наноконтейнеров в опухолях за счет пассивного транспорта через сосуды, расширенные в результате воздействия ультразвука [129]. При этом особенно ярко эффект кумулятивного действия проявляется при наблюдении за действием лекарства в течение длительного времени после одновременного воздействия переменного магнитного поля и ультразвука. Также возможно придание тераностическим липосомам на основе магнитных наночастиц чувствительности к pH с целью увеличения эффективности высвобождения лекарств в опухолевых областях с закисленной окружающей средой [130]. Но для этого требуется еще одна стадия модификации липосом pH-чувствительными компонентами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липосомы представляются одними из самых безопасных и наиболее эффективных биоразлагаемых и биосовместимых наноконтейнеров, которые могут быть легко метаболизированы в организме. Подобные носители лекарственных средств показали свою эффективность при лечении серьезных заболеваний, в том числе онкологических. Терапевтические преимущества противоопухолевых препаратов, инкапсулированных в липосомы, включают снижение токсичности и повышение эффективности лечения. Однако только липосомального лекарственного средства-носителя, нацеливающегося на опухолевые клетки с помощью специфических лигандов, не всегда достаточно для достижения успешного лечения. Липосомы способны реагировать на стимулы, что делает их незаменимыми в терапии, ориентированной на лечение конкретного заболевания. Использование стимул-чувствительных липосом позволяет достичь локализованного высвобождения лекарственного препарата с минимальным системным воздействием. Актуальной современной задачей представляется получение липосом, которые быстро реагируют на изменение стимула и высвобождают большую часть заключенного во внутреннюю полость соединения за короткое время. При разработке подобных систем следует учитывать ограничения, связанные с возможной цитотоксичностью модифицирующих липосому компонентов. Не менее важно, чтобы липосомы, обеспечив целевую доставку биоактивного вещества, безопасно метаболизировались и/или выводились из организма. При этом размер, поверхностный заряд и функциональные группы, модифицирующие липосому, должны поддерживать пролонгированную циркуляцию контейнера в кровотоке. Более

того, для липосомальных носителей, содержащих несколько лекарственных носителей, крайне важно управлять соотношением препаратов.

В настоящее время активно разрабатываются комбинированные многофункциональные липосомы, одновременно реагирующие на несколько разных стимулов, такие как свет, pH, магнитное поле, температура, окислительно-восстановительный потенциал и др. Такие контейнеры могут быть в перспективе использованы в персонализированной медицине, что приведет к существенному улучшению качества жизни пациентов с серьезными заболеваниями.

Липосомы являются одними из лучших средств доставки биоактивных веществ, обладая рядом преимуществ перед другими наноконтейнерами. Несмотря на это, остается много вопросов, связанных с внедрением подобных конструкций в клиническую практику. Для перехода на крупномасштабное производство требуется проведение серьезных исследований, включающих выбор методики синтеза и оценки стоимости производства. Необходимо оценить специфичность и чувствительность предложенного метода, детально исследовать потенциальную безопасность и токсичность продуктов биodeградации контейнера.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта: “Современные проблемы химии и физико-химии высокомолекулярных соединений” (госбюджет, номер АААА-А21-121011990022-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li Y.-J., Lei Y.-H., Yao N. *et al.* Autophagy and multi-drug resistance in cancer // *Chinese Journal of Cancer*. 2017. V. 36. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0219-2>
2. Migliore R., D'Antona N., Sgarlata C. *et al.* Co-loading of temozolomide and curcumin into a calix [4] arene-based nanocontainer for potential combined chemotherapy: Binding features, enhanced drug solubility and stability in aqueous medium // *Nanomaterials*. 2021. V. 11. № 11. P. 2930. <https://doi.org/10.3390/nano11112930>
3. Petrov R.A., Mefedova S.R., Yamansarov E.Y. *et al.* New small-molecule glycoconjugates of docetaxel and GalNAc for targeted delivery to hepatocellular carcinoma // *Molecular Pharmaceutics*. 2020. V. 18. № 1. P. 461–468. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00980>
4. Vaneev A.N., Kost O.A., Ereemeev N.L. *et al.* Superoxide dismutase 1 nanoparticles (nano-SOD1) as a potential drug for the treatment of inflammatory eye diseases //

- Biomedicines. 2021. V. 9. № 4. P. 396.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9040396>
5. *Pottanam Chali S., Ravoo B. J.* Polymer Nanocontainers for Intracellular Delivery. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* // 2020. V. 9 № 8. P. 2962–2972.
<https://doi.org/10.1002/anie.201907484>
6. *Zhang J., Lin Y., Lin Z. et al.* Stimuli-responsive nanoparticles for controlled drug delivery in synergistic cancer immunotherapy // *Advanced Science*. 2022. V. 9. № 5. P. 2103444.
<https://doi.org/10.1002/advs.202103444>
7. *Barba A.A., Bochicchio S., Dalmoro A. et al.* Engineering approaches for drug delivery systems production and characterization // *Pharmaceutics*. 2019. V. 581. P. 119267.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119267>
8. *Hou X., Zaks T., Langer R. et al.* Lipid nanoparticles for mRNA delivery // *Nat. Rev. Mater.* 2021. V. 6. P. 1078–1094.
<https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
9. *Wahlich J., Desai A., Greco F. et al.* Nanomedicines for the delivery of biologics // *Pharmaceutics*. 2019. V. 11. № 5. P. 210.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050210>
10. *Karim M.E., Shetty J., Islam R.A. et al.* Strontium sulfate: A new pH-responsive inorganic nanocarrier to deliver therapeutic siRNAs to cancer cells. *Pharmaceutics* // 2019. V. 11. № 2. P. 89.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020089>
11. *Cui Y., Yang Y., Ma M. et al.* Reductive responsive micelle overcoming multidrug resistance of breast cancer by co-delivery of DOX and specific antibiotic // *Journal of Materials Chemistry B*. 2019. V. 7. № 40. P. 6075–6086.
<https://doi.org/10.1039/C9TB01093A>
12. *Zhang L., Wu C., Mu S. et al.* A chemotherapeutic self-sensitized drug carrier delivering paclitaxel for the enhanced chemotherapy to human breast MDA-MB-231 cells // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2019. V. 181. P. 902–909.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.052>
13. *Madhmanchi S., Suedee R., Nakpheng T. et al.* Binding interactions of bacterial lipopolysaccharides to polymyxin B in an amphiphilic carrier ‘sodium deoxycholate sulfate’ // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2019. V. 182. P. 110374.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110374>
14. *Wells C.M., Harris M., Choi L. et al.* Stimuli-responsive drug release from smart polymers // *J. Funct. Biomater.* 2019. V. 10. № 3. P. 34.
<https://doi.org/10.3390/jfb10030034>
15. *Dhamecha D., Movsas R., Sano U. et al.* Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. V. 569. P. 118627.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118627>
16. *Efimova A.A., Sorokina S.A., Troshcheva, K.S. et al.* Complexes of cationic pyridylphenylene dendrimers with anionic liposomes: The role of dendrimer composition in membrane structural changes // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 3. P. 2225.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032225>
17. *Angelova A., Garamus V.M., Angelov B. et al.* Advances in structural design of lipid-based nanoparticle carriers for delivery of macromolecular drugs, phytochemicals and antitumor agents // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017. V. 249. P. 331–345.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.006>
18. *Carmona-Ribeiro A.M., de Melo Carrasco L.D.* Novel Formulations for antimicrobial peptides // *International Journal of Molecular Sciences*. 2014. V. 15. № 10. P. 18040–18083.
<https://doi.org/10.3390/ijms151018040>
19. *Li M., Du C., Guo N. et al.* Composition design and medical application of liposomes // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. V. 164. P. 640–653.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>
20. *Tretiakova D., Le-Deigen I., Onishchenko N.* Phosphatidylinositol stabilizes fluid-phase liposomes loaded with a melphalan lipophilic prodrug // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 4. P. 473.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040473>
21. *Sheoran R., Khokra S.L., Chawla V. et al.* Recent patents, formulation techniques, classification and characterization of liposomes // *Recent patents on nanotechnology*. 2019. V. 13. № 1. P. 17–27.
<https://doi.org/10.2174/1872210513666181127110413>
22. *Amarandi R.-M., Ibanescu A., Carasevici E. et al.* Liposomal-based formulations: A path from basic research to temozolomide delivery inside glioblastoma tissue // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. P. 308.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020308>
23. *Park H., Otte A., Park K.* Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond // *Journal of Controlled Release*. 2022. V. 342. P. 53–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>
24. *Barba A.A., Bochicchio S., Dalmoro A. et al.* Lipid delivery systems for nucleic-acid-based-drugs: From production to clinical applications // *Pharmaceutics*. 2019. V. 11. № 8. P. 360.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080360>
25. *Monteiro L.F., Malachias Â., Poundlana G. et al.* Paclitaxel-loaded pH-sensitive liposome: New insights on structural and physicochemical characterization // *Langmuir*. 2018. V. 34. P. 5728–5737.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00411>
26. *Tokudome Y., Nakamura K., Itaya Y. et al.* Enhancement of skin penetration of hydrophilic and lipophilic compounds by pH-sensitive liposomes // *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015. V. 18. P. 249–257.
<https://doi.org/10.18433/J3H89S>
27. *Awad N.S., Paul V., AlSawafah N.M. et al.* Ultrasound-responsive nanocarriers in cancer treatment: A review // *ACS Pharmacology & Translational Science*. 2021. V. 4. № 2. P. 589–612.
<https://doi.org/10.1021/acspstsci.0c00212>
28. *Yan W., Leung S.S., To K.K.W.* Updates on the use of liposomes for active tumor targeting in cancer therapy // *Nanomedicine*. 2020. V. 15. P. 303–318.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0308>
29. *Nikolova M.P., Kumar E.M., Chavali M.S.* Updates on responsive drug delivery based on liposome vehicles for cancer treatment // *Pharmaceutics*. 2020. V. 14. P. 2195.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102195>
30. *Yatvin M.B., Weinstein J.N., Dennis W.H.* Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia // *Science, New Series*. 1978. V. 202. № 4374.

- P. 1290–1293.
<https://doi.org/10.1126/science.364652>
31. Kong G., Dewhirst M.W. Review hyperthermia and liposomes // International Journal of Hyperthermia. 1999. V. 15. № 5. P. 345–370.
<https://doi.org/10.1080/026567399285558>
 32. Evans E., Needham D. Physical properties of surfactant bilayer membranes: Thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions // J. Phys. Chem. 1987. V. 91. P. 4219–4228.
 33. Trosheva K.S., Sorokina S.A., Efimova A.A. et al. Interaction of multicomponent anionic liposomes with cationic pyridylphenylene dendrimer: Does the complex behavior depend on the liposome composition? // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 2021. V. 1863. № 12. P. 183761.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183761>
 34. Efimova A.A., Abramova T.A., Popov A.S., Grokhovskaya T.E. Interaction of chitosan with anionic liquid liposomes: Reversibility of structural rearrangements in lipid bilayer // Russian Journal of General Chemistry. 2022. V. 92. № 11. P. 2429–2435.
<https://doi.org/10.1134/S1070363222110275>
 35. Антонов В.Ф. Эволюция липидных пор в бислое при фазовом переходе мембранных липидов // Регулярная и хаотическая динамика / Под ред. А.Б. Рубина. М., 2006.
 36. Dluhy R.A., Chowdhry B.Z., Cameron D.G. Infrared characterization of conformational differences in the lamellar phases of 1,3-dipalmitoyl-*sn*-glycero-2-phosphocholine // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 1985. V. 821. № 3. P. 437–444.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90048-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90048-3)
 37. Watts A., Spooner P.J.R. Phospholipid phase transitions as revealed by NMR // Chem. Phys. Lipids. 1991. V. 57. № 2–3. P. 195–211.
[https://doi.org/10.1016/0009-3084\(91\)90076-n](https://doi.org/10.1016/0009-3084(91)90076-n)
 38. Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices // International Journal of Nanomedicine. 2015. V. 10. P. 975–999.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
 39. Needham D., Anyarambhatla G., Kong G., Dewhirst M.W. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: Characterization and testing in a human tumor xenograft model // Cancer Res. 2000. V. 60. № 5. P. 1197–1201.
 40. Schmaljohann D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2006. V. 58. № 15. P. 1655–1670.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.020>
 41. Chernikova E.V., Plutalova A.V., Mineeva K.O. et al. Ternary copolymers of acrylic acid, n-isopropylacrylamide, and butyl acrylate: Synthesis and aggregative behavior in dilute solutions // Polymer Science, Series B. 2016. V. 58. № 5. P. 564–573.
<https://doi.org/10.1134/S1566090416050031>
 42. MacKinnon N., Guérin G., Liu B., Gradinaru C.C., Rubinstein L., Macdonald P.M. Triggered instability of liposomes bound to hydrophobically modified core-shell PNIPAM hydrogel beads // Langmuir. 2010. V. 26. № 2. P. 1081–1089.
<https://doi.org/10.1021/la902423v>
 43. Yaroslavov A., Panova I., Sybachin A. et al. Payload release by liposome burst: Thermal collapse of microgels induces satellite destruction // Nanomedicine. 2017. V. 13. № 4. P. 1491–1494.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.02.001>
 44. Alvarez-Lorenzo C., Bromberg L., Concheiro A. Light-sensitive intelligent drug delivery systems // Photochemistry and Photobiology. 2009. V. 85. № 4. P. 848–860.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00530.x>
 45. Ericson M.B., Wennberg A.M., Larko O. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma // Ther. Clin. Risk Manag. 2008. V. 4. P. 1–9.
<https://doi.org/10.2147/TCRM.S1769>
 46. Konan Y.N., Gurny R., Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy // J. Photochem. Photobiol. B. 2002. V. 66. P. 89–106.
[https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00267-6](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00267-6)
 47. Wang J.-Y., Wu Q.-F., Li J.-P. et al. Photo-sensitive liposomes: Chemistry and application in drug delivery // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2010. V. 10. № 2. P. 172–181.
<https://doi.org/10.2174/138955710791185091>
 48. Pan P., Svirskis D., Rees S.W.P. et al. Photosensitive drug delivery systems for cancer therapy: Mechanisms and applications // Journal of Controlled Release. 2021. V. 338. P. 446–461.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.053>
 49. Bisby R.H., Mead C., Morgan C.G. Active uptake of drugs into photosensitive liposomes and rapid release on UV photolysis. Photochemistry and Photobiology. 2000. V. 72. № 1. P. 57–61.
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)0720049mscpob2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0720049mscpob2.0.co2)
 50. Ghosh S., Carter K.A., Lovell J.F. Liposomal formulations of photosensitizers // Biomaterials. 2019. V. 218. P. 119341.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119341>
 51. Torchilin V.P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery // Nat. Rev. Drug Discov. 2014. V. 13. P. 813–827.
<https://doi.org/10.1038/nrd4333>
 52. Liu M., Du H., Zhang W., Zhai G. Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: Design strategies and applications // Mater. Sci. Eng. C. 2017. V. 71. P. 1267–1280.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.030>
 53. Noyhouzer T., L'Homme C., Beaulieu I. et al. Ferrocene-modified phospholipid: An innovative precursor for redox-triggered drug delivery vesicles selective to cancer cells // Langmuir. 2016. V. 32. P. 4169–4178.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00511>
 54. Wang T., He W., Du Y., Wang J., Li X. Redox-sensitive irinotecan liposomes with active ultra-high loading and enhanced intracellular drug release // Colloids Surf. B. Biointerfaces. 2021. V. 206. P. 111967.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111967>
 55. Ong W., Yang Y., Cruciano A.C., McCarley R.L. Redox-triggered contents release from liposomes // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 14739–14744.
<https://doi.org/10.1021/ja8050469>
 56. Mirhadi E., Mashreghi M., Askarizadeh A. et al. Redox-sensitive doxorubicin liposome: A formulation approach for targeted tumor therapy // Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 11310.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-15239-x>

57. Yin T., Liu Y., Yang M. et al. Novel chitosan derivatives with reversible cationization and hydrophobicization for tumor cytoplasm-specific burst co-delivery of siRNA and chemotherapeutics // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2020. V. 12. P. 14770–14783. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19373>
58. Mahmoudzadeh M., Magarkar A., Koivuniemi A., Róg T., Bunker A. Mechanistic insight into how PEGylation reduces the efficacy of pH-sensitive liposomes from molecular dynamics simulations // *Molecular pharmaceutics*. 2021. V. 18. № 7. P. 2612–2621. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00122>
59. Lee E.S., Oh K.T., Kim D., Youn Y.S., Bae Y.H. Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-histidine) // *J. Control. Release* 2007. V. 123. P. 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.08.006>
60. Efimova A.A., Sybachin A.V., Yaroslavov A.A. Effect of anionic-lipid-molecule geometry on the structure and properties of liposome-polycation complexes // *Polymer Science Series C*. 2011. V. 53. № 1. P. 18. <https://doi.org/10.1134/S1811238211040011>
61. Ferreira D.S., Lopes S.C. de A., Franco M.S., Oliveira M.C. pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment // *Therapeutic Delivery*. 2013. V. 4. № 9. P. 1099–1123. <https://doi.org/10.4155/tde.13.80>
62. Li W., Nicol F., Szoka F.C. A designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004. V. 56. № 7. P. 967–985. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.041>
63. Zhao Y., Ren W., Zhong T. et al., Tumor-specific pH-responsive peptide-modified pH-sensitive liposomes containing doxorubicin for enhancing glioma targeting and anti-tumor activity // *J. Control. Release*. 2016. V. 222. P. 56. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.006>
64. Miyazaki M., Yuba E., Hayashi H. et al. Hyaluronic acid-based pH-sensitive polymer-modified liposomes for cell-specific intracellular drug delivery systems // *Bioconjug. Chem.* 2018. V. 29. P. 44. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00551>
65. Samoshina N.M., Liu X., Brazdova B. et al. Fliposomes: pH-sensitive liposomes containing a *trans*-2-morpholinocyclohexanol-based lipid that performs a conformational flip and triggers an instant cargo release in acidic medium // *Pharmaceutics*. 2011. V. 3. № 3. P. 379–405. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3030379>
66. Liu X., Zheng Y., Samoshina N.M. et al. Fliposomes: pH-triggered conformational flip of new *trans*-2-aminocyclohexanol-based amphiphiles causes instant cargo release in liposomes // *J. Liposome Res.* 2012. V. 22. № 4. P. 319–328. <https://doi.org/10.3109/08982104.2012.698420>
67. Zheng Y., Liu X., Samoshina N.M. et al. Fliposomes: *trans*-2-aminocyclohexanol-based amphiphiles as pH-sensitive conformational switches of liposome membrane – a structure-activity relationship study // *Chem. Phys. Lipids*. 2018. V. 210. P. 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.10.004>
68. Zaborova O.V., Timoshenko V.A., Nardin C. et al. New insights on the release and self-healing model of stimuli-sensitive liposomes // *J. Colloid Interface Sci.* 2023. V. 640. P. 558–567. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.02.099>
69. Veremeeva P.N., Grishina I.V., Lapteva V.L. et al. pH-Sensitive liposomes with embedded 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane derivative // *Mendel. Commun.* 2014. V. 3. № 24. P. 152–153. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2014.04.008>
70. Veremeeva P.N., Lapteva V.L., Palyulin V.A. et al. Bispidinone-based molecular switches for construction of stimulus-sensitive liposomal containers // *Tetrahedron*. 2014. V. 70. № 7. P. 1408–1411. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.01.012>
71. Yaroslavov A., Efimova A., Smirnova N. et al. A novel approach to a controlled opening of liposomes // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2020. V. 190. P. 110906. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110906>
72. Efimova A.A., Popov A.S., Kazantsev A.V. et al pH-Sensitive liposomes with embedded 3-(isobutylamino)cholan-24-oic acid: What is the possible mechanism of fast cargo release? // *Membranes*. 2023. V. 13. № 4. P. 407. <https://doi.org/10.3390/membranes13040407>
73. Popov A.S., Efimova A.A., Kazantsev A.V. et al. pH-Sensitive liposomes with embedded ampholytic derivatives of cholan-24-oic acid // *Mendel. Commun.* 2021. V. 31. № 6. P. 827–829. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2021.11.019>
74. Yaroslavov A.A., Efimova A.A., Abramova T.A. et al. Multi-compartment containers from a mixture of natural and synthetic lipids // *Mend. Commun.* 2023. V. 33. № 2. P. 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2023.02.023>
75. Grozdova I., Melik-Nubarov N., Efimova A. et al. Intracellular delivery of drugs by chitosan-based multi-liposomal complexes // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2020. V. 193. P. 11062. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111062>
76. Abri Aghdam M., Bagheri R., Mosafer J. et al. Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release // *J. Control Release*. 2019. V. 315. P. 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.018>
77. Paliwal S.R., Paliwal R., Vyas S.P. A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery // *Drug Deliv.* 2015. V. 22. № 3. P. 231–242. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.882469>
78. Nandi U., Onyesom I., Douroumis D. An *in vitro* evaluation of antitumor activity of sirolimus-encapsulated liposomes in breast cancer cells // *J. Pharm. Pharmacol.* 2021. V. 73. № 3. P. 300–309. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa061>
79. El Knidri H., Dahmani J., Addaou A. et al. Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019 V. 139. P. 1092–1102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.079>
80. Sawant R.M., Hurley J.P., Salmaso S., et al. “SMART” drug delivery systems: Double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers // *Bioconjug. Chem.* 2006. V. 17. № 4. P. 943–949. <https://doi.org/10.1021/bc060080h>
81. Zong W., Hu Y., Su Y. et al. Polydopamine-coated liposomes as pH-sensitive anticancer drug carriers //

- J. Microencapsul. 2016. V. 33. № 3. P. 257–262.
<https://doi.org/10.3109/02652048.2016.1156176>
82. Sandler S.E., Fellows B., Mefford O.T. Best practices for characterization of magnetic nanoparticles for biomedical applications // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 22. P. 14159–14169.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03518>
83. Hadinoto K., Sundaresan, Cheow W.S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. V. 85. № 23. P. 427–443.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002>
84. Fathy M.M., Fahmy H.M., Balah A.M.M. et al. Magnetic nanoparticles-loaded liposomes as a novel treatment agent for iron deficiency anemia: *In vivo* study // *Life Sci.* 2019. V. 234. P. 116787.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116787>
85. Dormer K., Seeney C., Lewelling K. et al. Epithelial internalization of superparamagnetic nanoparticles and response to external magnetic field // *Biomaterials.* 2005. V. 26. № 14. P. 2061–2072.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.040>
86. Li X., Li W., Wang M., Liao Z. Magnetic nanoparticles for cancer theranostics: Advances and prospects // *J. Control. Release.* 2021. V. 335. P. 437–448.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.042>
87. Ansari M.J., Kadhim M.M., Hussein B.A. et al. Synthesis and stability of magnetic nanoparticles // *BioNanoSci.* 2022. V. 12. № 2. P. 627–638.
<https://doi.org/10.1007/s12668-022-00947-5>
88. Lyer S., Singh R., Tietze R. et al. Magnetic nanoparticles for magnetic drug targeting // *Biomed. Tech.* 2015. V. 60. № 5. P. 465–475.
<https://doi.org/10.1515/bmt-2015-0049>
89. Mireles L.K., Sacher E., Yahia L. et al. A comparative physicochemical, morphological and magnetic study of silane-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles prepared by alkaline coprecipitation // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2016. V. 75. P. 203–211.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.002>
90. Lassenberger A., Grünewald T.A., van Oostrum P.D.J., et al. Monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition: elucidating particle formation by second-resolved *in situ* small-angle X-ray scattering // *Chem. Mater.* 2017. V. 29. № 10. P. 4511–4522.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b01207>
91. Israel L.L., Galstyan A., Holler E., Ljubimova J.Y. Magnetic iron oxide nanoparticles for imaging, targeting and treatment of primary and metastatic tumors of the brain // *J. Control. Release.* 2020. V. 320. P. 45–62.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.009>
92. Vernaya O.I., Shumilkin A.S., Shabatin V.P. et al. The synthesis of maghemite nanoparticles by thermal decomposition of cryochemically modified iron (III) acetylacetonate // *Mos. Univ. Chem. Bull.* 2020. V. 75. P. 265–268.
<https://doi.org/10.3103/S0027131420050089>
93. Pigareva V.A., Alekhina Y.A., Grozdova I.D. et al. Magneto-sensitive and enzymatic hydrolysis-resistant systems for the targeted delivery of paclitaxel based on polylactide micelles with an external polyethylene oxide corona // *Polym. Int.* 2021. V. 71. № 4. P. 456–463.
<https://doi.org/10.1002/pi.6306>
94. Abdollah M.R., Kalber T., Tölner B. et al. Prolonging the circulatory retention of SPIONs using dextran sulfate: *In vivo* tracking achieved by functionalisation with near-infrared dyes // *Faraday Discuss.* V. 2014. V. 175. P. 41–58.
<https://doi.org/10.1039/c4fd00114a>
95. Saravanakumar K., Sathiyaseelan A., Manivasagan P. et al. Photothermally responsive chitosan-coated iron oxide nanoparticles for enhanced eradication of bacterial biofilms // *Biomater. Adv.* 2022. V. 141. P. 213129.
<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213129>
96. Ramnandan D., Mokhosi S., Daniels A. et al. Chitosan, polyethylene glycol and polyvinyl alcohol modified MgFe₂O₄ ferrite magnetic nanoparticles in doxorubicin delivery: A comparative study *in vitro* // *Molecules.* 2021. V. 26. № 13. P. 3893.
<https://doi.org/10.3390/molecules26133893>
97. Rajan A., Sharma M., Sahu N.K. Assessing magnetic and inductive thermal properties of various surfactants functionalised Fe₃O₄ nanoparticles for hyperthermia // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 15045.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71703-6>
98. Wang X., Wang Y., Xue Z. et al. Magnetic liposome as a dual-targeting delivery system for idiopathic pulmonary fibrosis treatment // *J. Colloid Interface Sci.* 2023. V. 636. P. 388–400.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.01.007>
99. Halevas E., Mavroidi B., Swanson C.H. et al. Magnetic cationic liposomal nanocarriers for the efficient drug delivery of a curcumin-based vanadium complex with anticancer potential // *J. Inorg. Biochem.* 2019. V. 199. P. 110778.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110778>
100. Soares F.A., Costa P., Sousa C.T. et al. Rational design of magnetoliposomes for enhanced interaction with bacterial membrane models // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2023. V. 1865. P. 184115.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184115>
101. Monnier C.A., Burnand D., Rothen-Rutishauser B. et al. Magnetoliposomes: Opportunities and challenges // *Eur. J. Nanomed.* 2014. V. 6. № 4. P. 201–215.
<https://doi.org/10.1515/ejnm-2014-0042>
102. Floris A., Ardu A., Musinu A., et al. SPION@ liposomes hybrid nanoarchitectures with high density SPION association // *Soft Matter.* 2011. V. 7. № 13. P. 6239–6247.
<https://doi.org/10.1039/C1SM05059A>
103. Amstad E., Kohlbrecher J., Muller E. et al. Triggered release from liposomes through magnetic actuation of iron oxide nanoparticle containing membranes // *Nano Lett.* 2011. V. 11. № 4. P. 1664–1670.
<https://doi.org/10.1021/nl2001499>
104. Choi W.I., Sahu A., Wurm F.R. et al. Magnetoliposomes with size controllable insertion of magnetic nanoparticles for efficient targeting of cancer cells // *RSC Adv.* 2019. V. 9. № 26. P. 15053–15060.
<https://doi.org/10.1039/c9ra02529d>
105. Hermann C.A., Hofmann C., Duerkop A. et al. Magnetosomes for bioassays by merging fluorescent liposomes and magnetic nanoparticles: Encapsulation and bilayer insertion strategies // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 6295–6305.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02503-0>
106. Pradhan P., Banerjee R., Bahadur D., Koch C., Mykhaylyk, O., Plank C. Targeted magnetic liposomes loaded with doxorubicin. In: D'Souza, G. (eds) *Lipo-*

- somes. *Methods in Molecular Biology*. V. 1522. Humana Press. New York. NY. 2017.
107. *Thomsen L.B., Linemann T., Birkelund S. et al.* Evaluation of targeted delivery to the brain using magnetic immunoliposomes and magnetic force // *Materials*. 2019. V. 31. № 21. P. 3576. <https://doi.org/10.3390/ma12213576>
 108. *Gao W., Wei S., Li Z. et al.* Nano magnetic liposomes-encapsulated parthenolide and glucose oxidase for ultra-efficient synergistic antitumor therapy // *Nanotechnology*. 2020. V. 31. P. 355104. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab92c8>
 109. *Yang R., An L.Y., Miao Q.F. et al.* Effective elimination of liver cancer stem-like cells by CD90 antibody targeted thermosensitive magnetoliposomes // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 24. P. 35894. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9116>
 110. *Thébault C.J., Ramniceanu G., Michel A. et al.* In vivo evaluation of magnetic targeting in mice colon tumors with ultra-magnetic liposomes monitored by MRI // *Mol. Imaging. Biol.* 2019. V. 21. P. 269–278. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1238-3>
 111. *Ma G., Kostevšek N., Monaco I. et al.* PD1 blockade potentiates the therapeutic efficacy of photothermally-activated and MRI-guided low temperature-sensitive magnetoliposomes // *J. Control Release*. 2021. V. 332. P. 419–433. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.002>
 112. *Luiz M.T., Dutra J.A.P., Viegas J.S.R. et al.* Hybrid magnetic lipid-based nanoparticles for cancer therapy // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 23. P. 751. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030751>
 113. *Gogoi M., Jaiswal M.K., Sarma H.D. et al.* Biocompatibility and therapeutic evaluation of magnetic liposomes designed for self-controlled cancer hyperthermia and chemotherapy // *Integr. Biol.* 2017. V. 9. № 6. P. 555–565. <https://doi.org/10.1039/c6ib00234j>
 114. *Farzin A., Etesami S.A., Quint J. et al.* Magnetic nanoparticles in cancer therapy and diagnosis // *Adv. Healthc. Mater.* 2020. V. 9. № 9. P. 1901058. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901058>
 115. *Alonso J., Khurshid H., Devkota J. et al.* Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in lipid vesicles for advanced magnetic hyperthermia and biodetection // *J. Appl. Phys.* 2016. V. 119. P. 083904. <https://doi.org/10.1063/1.4942618>
 116. *Oliveira R.R., Carrião M.S., Pacheco M.T. et al.* Triggered release of paclitaxel from magnetic solid lipid nanoparticles by magnetic hyperthermia // *Mater. Sci. Eng. C*. 2018. V. 92. P. 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.011>
 117. *Cardoso B.D., Rodrigues A.R.O., Bañobre-López M. et al.* Magnetoliposomes based on shape anisotropic calcium/magnesium ferrite nanoparticles as nanocarriers for doxorubicin // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 8. P. 1248. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081248>
 118. *Fortes Brollo M.E., Domínguez-Bajo A., Tabero A. et al.* Combined magnetoliposome formation and drug loading in one step for efficient alternating current-magnetic field remote-controlled drug release // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2020. V. 12. № 4. P. 4295–4307. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b20603>
 119. *Khomutov G.B., Kim V.P., Koksharov Y.A. et al.* Nanocomposite biomimetic vesicles based on interfacial complexes of polyelectrolytes and colloid magnetic nanoparticles // *Colloid. Surf. A*. 2017. V. 532. P. 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.035>
 120. *Gulyaev Y.V., Cherepenin V.A., Taranov I.V. et al.* Activation of nanocomposite liposomal capsules in a conductive water medium by ultra-short electric exposure // *J. Commun. Technol. Electr.* 2021. V. 66. P. 88–95. <https://doi.org/10.1134/S1064226921010022>
 121. *Trilli J., Caramazza L., Paolicelli P. et al.* The impact of bilayer rigidity on the release from magnetoliposomes vesicles controlled by PEMFs // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 10. P. 1712. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101712>
 122. *Dwivedi P., kiran S., Han S. et al.* Magnetic targeting and ultrasound activation of liposome-microbubble conjugate for enhanced delivery of anticancer therapies // *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020. V. 12. № 21. P. 23737–23751. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05308>
 123. *Sybachin A.V., Khlynina P.O., Spiridonov V.V. et al.* Amino-terminated polylactide micelles with an external poly(ethylene oxide) corona as carriers of drug-loaded anionic liposomes // *Polym. Int.* 2018. V. 67. № 10. P. 1352–1358. <https://doi.org/10.1002/pi.5629>
 124. *Shete M.B., Patil T.S., Deshpande A. et al.* Current trends in theranostic nanomedicines // *J. Drug Delivery Sci. Tech.* 2022. V. 71. P. 103280. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103280>
 125. *Skupin-Mrugalska P., Sobotta L., Warowicka A. et al.* Theranostic liposomes as a bimodal carrier for magnetic resonance imaging contrast agent and photosensitizer // *J. Inorg. Biochem.* 2018. V. 180. P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.11.025>
 126. *Li J., Li Q., He M. et al.* AS1411 aptamer-modified theranostic liposomes co-encapsulating manganese oxide nano-contrast agent and paclitaxel for MRI and therapy of cancer // *RSC Adv.* 2019. V. 9. № 60. P. 34837–34846. <https://doi.org/10.1039/c9ra06878c>
 127. *Šimečková P., Hubatka F., Kotouček J. et al.* Gadolinium labelled nanoliposomes as the platform for MRI theranostics: *In vitro* safety study in liver cells and macrophages // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 4780. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60284-z>
 128. *Chen Q., Shang W., Zeng C., et al.* Theranostic imaging of liver cancer using targeted optical/MRI dual-modal probes // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 20. P. 32741. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15642>
 129. *Thébault C.J., Ramniceanu G., Boumati S. et al.* Theranostic MRI liposomes for magnetic targeting and ultrasound triggered release of the antivascular CA4P // *J. Control. Release*. 2020. V. 322. P. 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.03.003>
 130. *Guo H., Chen W., Sun X. et al.* Theranostic magnetoliposomes coated by carboxymethyl dextran with controlled release by low-frequency alternating magnetic field // *Carbohydr. Polym.* 2015. V. 118. P. 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.076>

УДК 541.18;544.52

ВЛИЯНИЕ СТАРЕНИЯ УЛЬТРАМАЛЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ХОЛЕСТЕРИЧЕСКИМИ МИКРОЧАСТИЦАМИ ДНК

© 2023 г. М. А. Климович^{1, 2}, М. А. Колыванова^{1, 2},
О. В. Дементьева³, О. Н. Климович¹, В. М. Рудой³, В. А. Кузьмин¹, В. Н. Морозов^{1, *}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия

²Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России, ул. Живописная, 46, Москва, 123098 Россия

³Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Ленинский просп., 31, корп. 4, Москва, 119071 Россия

*e-mail: morozov.v.n@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

Исследована корреляция между временем предварительной выдержки синтезированных по методу Даффа ультрамалых наночастиц золота (НЧЗ) и структурными аспектами их взаимодействия с частицами холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) ДНК. Установлено, что “возраст” НЧЗ в значительной мере определяет величину их деструктивного действия по отношению к упорядоченной организации частиц ХЖКД ДНК. Наблюдаемый эффект может быть связан как с постепенным совершенствованием кристаллической решетки (металлизацией) исследуемых НЧЗ, так и с изменением во времени химии их поверхности.

Ключевые слова: жидкие кристаллы ДНК, круговой дихроизм, наночастицы золота, старение наночастиц, металлизация наночастиц

DOI: 10.31857/S0023291223600542, **EDN:** DIAVWZ

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря своим свойствам холестерические жидкокристаллические дисперсии ДНК, получаемые методом *psi*-конденсации (также ψ ; акроним слов “*Polymer and Salt Induced*” [1]), имеют большой потенциал для решения фундаментальных и практических задач биологии и медицины. С одной стороны, они являются удобными модельными системами, поскольку плотная упаковка молекул ДНК в частицах ХЖКД в определенной степени воспроизводит ее организацию *in vivo* [2–4]. С другой стороны, *psi*-ДНК обладает выдающимся по интенсивности сигналом кругового дихроизма (КД), который может как выступать маркером тех или иных физических воздействий [5–8], так и использоваться для обнаружения биологически активных соединений [9]. Более того, различные низкомолекулярные соединения, а также наночастицы (НЧ) металлов можно целенаправленно интегрировать в частицы ХЖКД ДНК [10–14], что позволяет значительно расширить функциональные возможности последних. Впрочем, введение таких агентов может оказывать негатив-

ное влияние на упорядоченную организацию молекул ДНК. Так, например, в работах Евдокимова и соавт. [15–17] продемонстрировано и подробно исследовано деструктивное действие на частицы ХЖКД ДНК ультрамалых НЧ золота, полученных восстановлением ионов Au^{3+} хлоридом тетракис(гидроксиметил)фосфония (ТГФХ) — так называемым методом Даффа [18, 19]. Изучению этого явления посвящены и наши недавние работы [20, 21].

Сопоставляя полученные нами результаты с данными Евдокимова и соавт., можно заметить, что несмотря на качественное сходство наблюдаемых эффектов в их количественном выражении наблюдаются расхождения. Так, например, мы регистрировали весьма небольшое различие в величинах деструктивного действия НЧЗ в случае их предварительной инкубации в заданной концентрации с раствором ДНК и при введении в такой же концентрации в готовую ХЖКД [21]. В то же время Евдокимов и соавт. отмечали, что значения концентрации НЧЗ, при которых для этих двух путей их введения в систему наблюдались

близкие по величине эффекты, различались более чем на порядок [17]. Мы полагаем, что такие расхождения отчасти могут быть обусловлены состоянием НЧЗ. Действительно, при анализе опубликованных работ видны существенные различия в “возрасте” использованных НЧЗ. Например, в работе Евдокимова и соавт. [16] использовался гидрозоль НЧЗ, хранившийся после синтеза около 2.5 мес, в то время как мы изучали либо свежеприготовленные НЧЗ [21], либо их гидрозоли возрастом более 6 мес [20]. При этом хорошо известно, что свойства НЧ могут заметно изменяться в процессе их “старения” [22–24]. Этот факт отмечали и для ультрамалых НЧЗ, синтезированных по методу Даффа [25, 26]. Поэтому целью настоящей работы являлось исследование влияния возраста таких НЧЗ на их взаимодействие с молекулами ДНК в частицах ее ХЖКД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления ХЖКД использовали коммерческие препараты выделенной из молок осетровых или лососевых рыб и деполимеризованной ультразвуком ДНК (Деринат®; $(0.25–0.5) \times 10^6$ Да; Техномедсервис, Россия) и полиэтиленгликоля (ПЭГ, 4000 Да; Sigma, США). Их растворы готовили на основе водно-солевого буфера, содержащего 10^{-2} М NaH_2PO_4 и 0.3 М NaCl ($\text{pH} \approx 7.4$), а полученные после смешения этих растворов образцы интенсивно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре до окончательного формирования оптически активной дисперсии. Содержание ПЭГ в конечной системе было фиксированным и составляло 170 мг/мл (17%), тогда как концентрацию ДНК варьировали от 1.27×10^{-5} до 2.03×10^{-4} М (для определения ее концентрации использовали значение коэффициента экстинкции $\epsilon_{260} \approx 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Индикатором образования ХЖКД ДНК являлось появление на спектре КД интенсивной отрицательной полосы (также называемой аномальной [27]) в области длин волн $\lambda = 260–280 \text{ nm}$.

Процедура синтеза исходных сферических НЧЗ, средний размер которых непосредственно после получения составлял $\approx 2.5 \text{ nm}$, а также методы анализа их характеристик детально описаны в наших предыдущих работах [13, 14]. Были приготовлены три гидрозоля НЧЗ, которые после определения их исходных характеристик выдерживали в холодильнике при температуре 4°C в течение 1, 6 и 12 мес (далее они обозначаются как золи I, II и III соответственно). Затем эти золи были повторно охарактеризованы и сразу же использованы в эксперименте. Были рассмотрены два различных способа введения НЧЗ в систему: 1) раствор ДНК в течение 20–30 мин инкубировали с НЧЗ при комнатной температуре, после чего до-

бавляли в систему 34%-ный раствор ПЭГ в пропорции 1 : 1, индуцируя образование ХЖКД, 2) НЧЗ вносили в предварительно приготовленную ХЖКД ДНК дробно (с шагом 20 мкл) с соблюдением тех же условий инкубации, что и в первом способе.

Регистрацию спектров поглощения НЧЗ, а также определение концентрации ДНК проводили с помощью спектрофотометра UV-3101 PC (Shimadzu, Япония) в прямоугольных кварцевых кюветах сечением $1.0 \text{ cm} \times 0.4 \text{ cm}$. Спектры динамического рассеяния света (ДРС) гидрозолями I–III регистрировали с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Спектры КД измеряли, используя дихрограф СКД-2, разработанный и произведенный в лаборатории лазерно-спектрального приборостроения Института спектроскопии РАН [28], и кварцевые кюветы сечением $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$. Спектры КД представляли в виде зависимости разницы поглощения лево- и правополяризованного света $\Delta A = A_L - A_R$ от длины волны λ . Для измерения кинетики формирования аномального КД-сигнала ХЖКД ДНК растворы ДНК и ПЭГ смешивали вручную непосредственно в кюветном отделении дихрографа (“мертвое время”, затраченное на перемешивание полученной смеси, составляло 3–7 с). Экспериментальные данные обрабатывали с помощью уравнения

$$\Delta A(t) = \sum_{i=1}^n \Delta A_i e^{-k_i t}. \quad (1)$$

Погрешность определения констант скорости k_i не превышала 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе исследованы синтезированные методом восстановления ионов AuCl_4^- хлоридом ТГФХ по Даффу гидрозоли ультрамалых сферических НЧЗ разного возраста: 1, 6 и 12 мес (золи I, II и III соответственно). На рис. 1 представлены результаты их анализа методом спектроскопии поглощения в УФ и видимой областях. Известно, что спектр поглощения таких НЧЗ сразу после приготовления обычно представляет собой плавную спадающую в диапазоне от 190 до 1100 нм кривую, а их старение сопровождается появлением широкой полосы с максимумом вблизи 500 нм, свидетельствующей о возникновении у частиц локализованного поверхностного плазмонного резонанса [18, 25]. В полном соответствии с этими данными, в спектре золя I в данной области наблюдается лишь незначительное увеличение поглощения (кривая 1), в то время как для золя II, возраст которого составляет 6 мес, интенсивность этой полосы существенно возрастает (кривая 2), а в случае золя III, хранившегося 12 мес, спектр ха-

рактируется ярко выраженным плазмонным пиком (кривая 3). Такое поведение спектра поглощения свидетельствует о постепенном совершенствовании кристаллической решетки ультрамалых НЧЗ, т.е. об их переходе из квазиметаллического состояния в металлическое [18, 29]. Отметим, что размеры НЧЗ (по данным ДРС – примерно от 2.5 до 3.5 нм в золях разного возраста) позволяют предположить возможность их встраивания между холестерическими слоями ДНК в соответствии с существующей теорией [16], поскольку расстояния между этими слоями, согласно имеющимся представлениям [30], должны составлять от ≈ 4.9 до ≈ 3.2 нм.

Как было сказано выше, возможны два принципиально различающихся способа инкорпорирования НЧЗ в частицы ХЖКД ДНК: внесение золя золота в готовую холестерическую дисперсию или предварительная инкубация раствора ДНК с частицами золя с последующей *psi*-конденсацией молекул нуклеиновой кислоты при добавлении ПЭГ [17, 21]. На рис. 2 на примере НЧЗ возрастом 6 мес (золь II) сопоставлены данные об их деструктивном действии на упорядоченную структуру частиц ХЖКД ДНК при двух этих вариантах введения в систему (концентрация ДНК в обоих случаях составляла 1.35×10^{-4} М)¹. Видно (рис. 2а), что при обработке золем золота готовой дисперсии характерный для холестерической упаковки ДНК аномальный сигнал КД частично сохраняется даже в случае максимальной исследованной концентрации НЧЗ, равной 19.33×10^{-8} М (хотя его амплитуда и уменьшается при этом более чем в четыре раза). В случае же предварительной инкубации ДНК с НЧЗ наблюдается значительно более сильное падение амплитуды КД-сигнала формируемой затем ХЖКД. Так, уже при концентрации НЧЗ, равной 12.42×10^{-8} М, его интенсивность составляет только около 5% от исходного значения, а при концентрации НЧЗ 14.25×10^{-8} М спектр КД очень похож на характерную для изотропного раствора ДНК кривую с разнонаправленными полосами с максимумами вблизи 240 и 270 нм (рис. 2б). Зависимости интенсивности сигнала КД, нормированной на ее исходное значение, от концентрации НЧЗ золя II для обоих вариантов их введения в ХЖКД показаны на рис. 2в. Видно, что ход кривых отклоняется от линейного, который в аналогичных координатах $\Delta A/\Delta A_0 - [H_2O]$ или $\Delta A/\Delta A_0 - [(CH_3)_2SO]$ (ΔA_0 и ΔA – значения амплитуды сигнала КД до и после

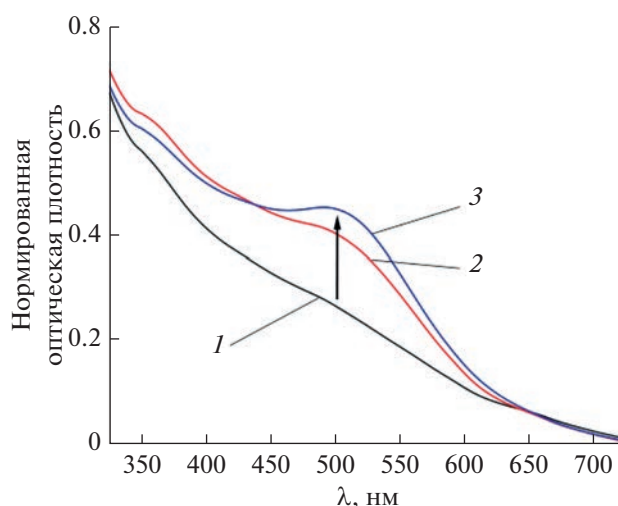


Рис. 1. Спектры поглощения использованных гидрозолей золота разного возраста: 1 (I), 6 (2) и 12 мес (3). Концентрация НЧЗ во всех случаях составляла 10.45×10^{-8} М. Спектры нормированы на величину оптической плотности на длине волны $\lambda = 300$ нм.

обработки системы) характерен для случая разрушения холестерической упаковки ДНК за счет уменьшения осмотического давления раствора ПЭГ, стабилизирующего частицы дисперсии, при разбавлении системы водой или диметилсульфоксидом соответственно.

На рис. 3 сопоставлены результаты изучения разрушения ХЖКД ДНК под действием НЧЗ всех трех исследуемых золей при двух разных способах их введения в систему. Эти данные представлены в виде зависимостей от концентрации НЧЗ ($[HЧЗ]$) отношения $\Delta A_0/\Delta A$, а также отношения $(\Delta A_0/\Delta A)_{до}/(\Delta A_0/\Delta A)_{после}$, где нижние индексы “до” и “после” указывают на введение НЧЗ в систему до и после формирования ХЖКД.

Обратим внимание на вид кривых на рис. 3а, демонстрирующем уменьшение интенсивности аномального КД-сигнала относительно ее исходного значения при обработке НЧЗ готовой ХЖКД ДНК. Для НЧЗ золей II и III результаты близки: различия между кривыми 2 и 3 составляют менее 10%. Ход обеих зависимостей почти линейен, что хорошо согласуется с результатами нашей недавней работы, где были исследованы НЧЗ схожего возраста [20]. Довольно хорошо согласуются и соответствующие численные значения степени разрушения упорядоченной упаковки ДНК. В случае золя I начальный участок зависимости $\Delta A_0/\Delta A$ от $[HЧЗ]$ тоже близок к линейному, однако, начиная с концентрации НЧЗ, равной примерно 10.45×10^{-8} М, рост значений $\Delta A_0/\Delta A$ становится более интенсивным (см. кривую 1 на рис. 3а). Такой ход этой зависимости аналогичен наблюдаемому нами при изучении взаимодействия с

¹ В случае предварительного контакта раствора ДНК с НЧЗ, очевидно, корректнее говорить о той или иной степени их препятствования образованию ХЖКД, а не о ее разрушении. Однако использование термина “разрушение” позволяет компактнее представлять и сопоставлять данные, полученные при двух рассматриваемых способах включения НЧЗ в частицы дисперсии ДНК.

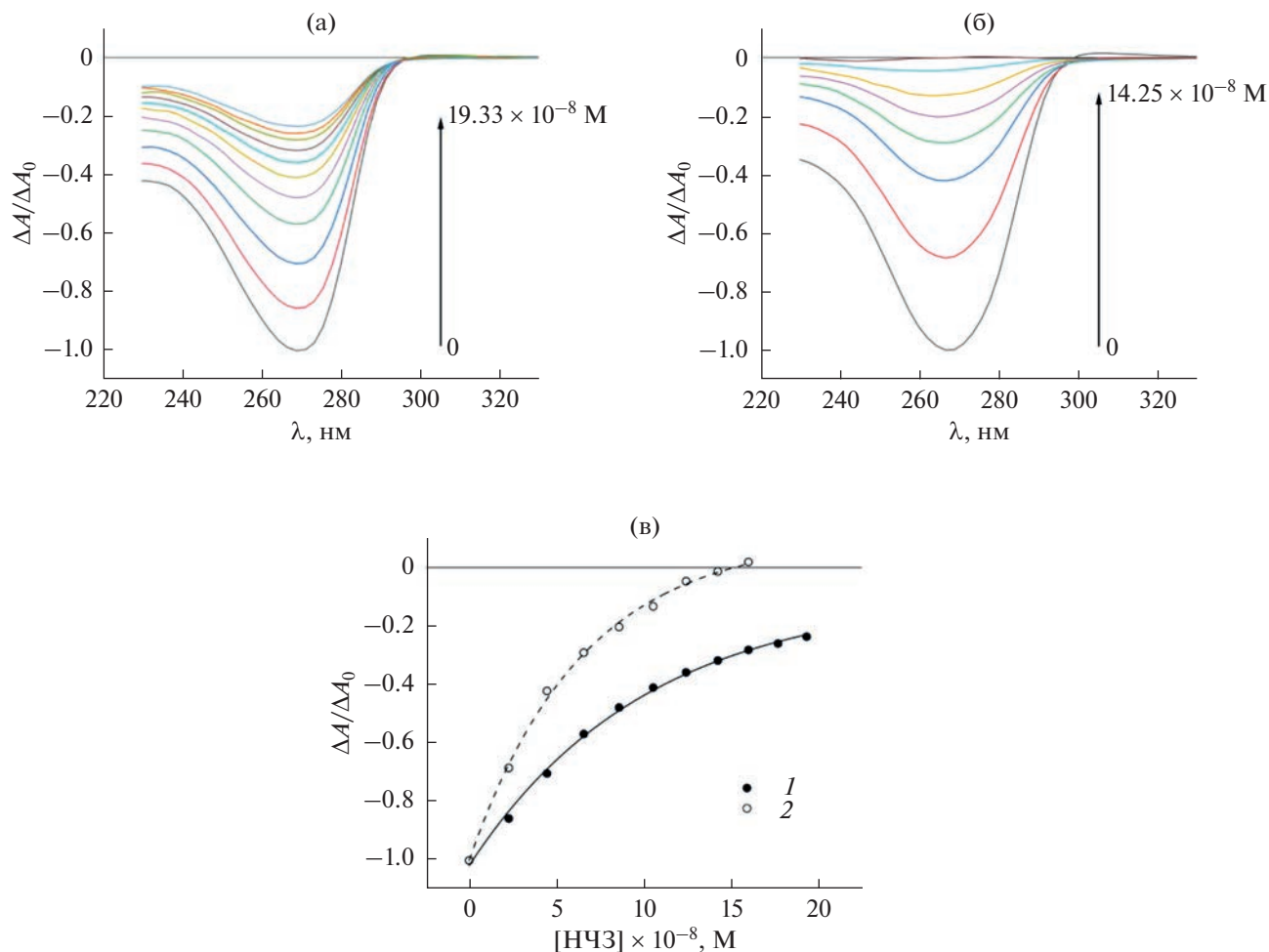


Рис. 2. КД-спектры ХЖКД ($[ДНК] = 1.35 \times 10^{-4}$ М), измеренные в присутствии разных количеств НЧЗ возрастом 6 мес (золя II): (а) введение НЧЗ в готовую ХЖКД, (б) предварительная инкубация ДНК с НЧЗ. (в) Зависимости пиковой интенсивности КД-полосы от концентрации НЧЗ при обработке ими готовой ХЖКД (1) и в случае их предварительной инкубации с ДНК (2). Все значения ΔA нормированы на абсолютное значение амплитуды КД-сигнала для соответствующего контрольного образца ХЖКД, не содержащего НЧЗ. Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7%.

ХЖКД ДНК свежесинтезированных ультрамалых НЧЗ [21].

Отметим, что в исследованном диапазоне концентраций НЧЗ при данном способе их введения в ХЖКД ДНК значения степени ее разрушения частицами золя I отличаются от соответствующих значений для частиц золь II и III не более чем на 25%.

В случае предварительной инкубации ДНК с НЧЗ золь II и III результаты также оказались близки между собой. Различия в значениях $\Delta A_0 / \Delta A$ составляют не более 20% (сравните кривые 2 и 3 на рис. 3б), однако обе зависимости имеют выраженный экспоненциальный характер. При этом значения степени разрушения ХЖКД ДНК для максимальной исследованной концентрации этих НЧЗ более чем на порядок превосходят величины, полученные при обработке готовой дисперсии (кривые 2 и 3 на рис. 3в). В то же время из-

менения в степени разрушения ХЖКД после предварительного контакта ДНК с НЧЗ “свежего” золя I по сравнению с регистрируемыми после обработки ими готовой ХЖКД весьма незначительны (различия не превышают 15%, кривая 1 на рис. 3в). Как и в нашей недавней работе [21], в этом случае зависимость $\Delta A_0 / \Delta A$ от $[NЧЗ]$ имеет более продолжительный линейный участок (вплоть до $[NЧЗ] = 16.00 \times 10^{-8}$ М, см. кривую 1 на рис. 3б), чем при обработке готовой ХЖКД ДНК.

Таким образом, предварительная инкубация ДНК с ультрамалыми НЧЗ достаточно большого возраста способствует более сильной последующей деструкции структуры частиц ее ХЖКД (точнее, сильнее препятствует образованию соответствующей холестерической дисперсии). Кроме того, полученные результаты позволяют предположить, что свойства ультрамалых НЧЗ, получен-

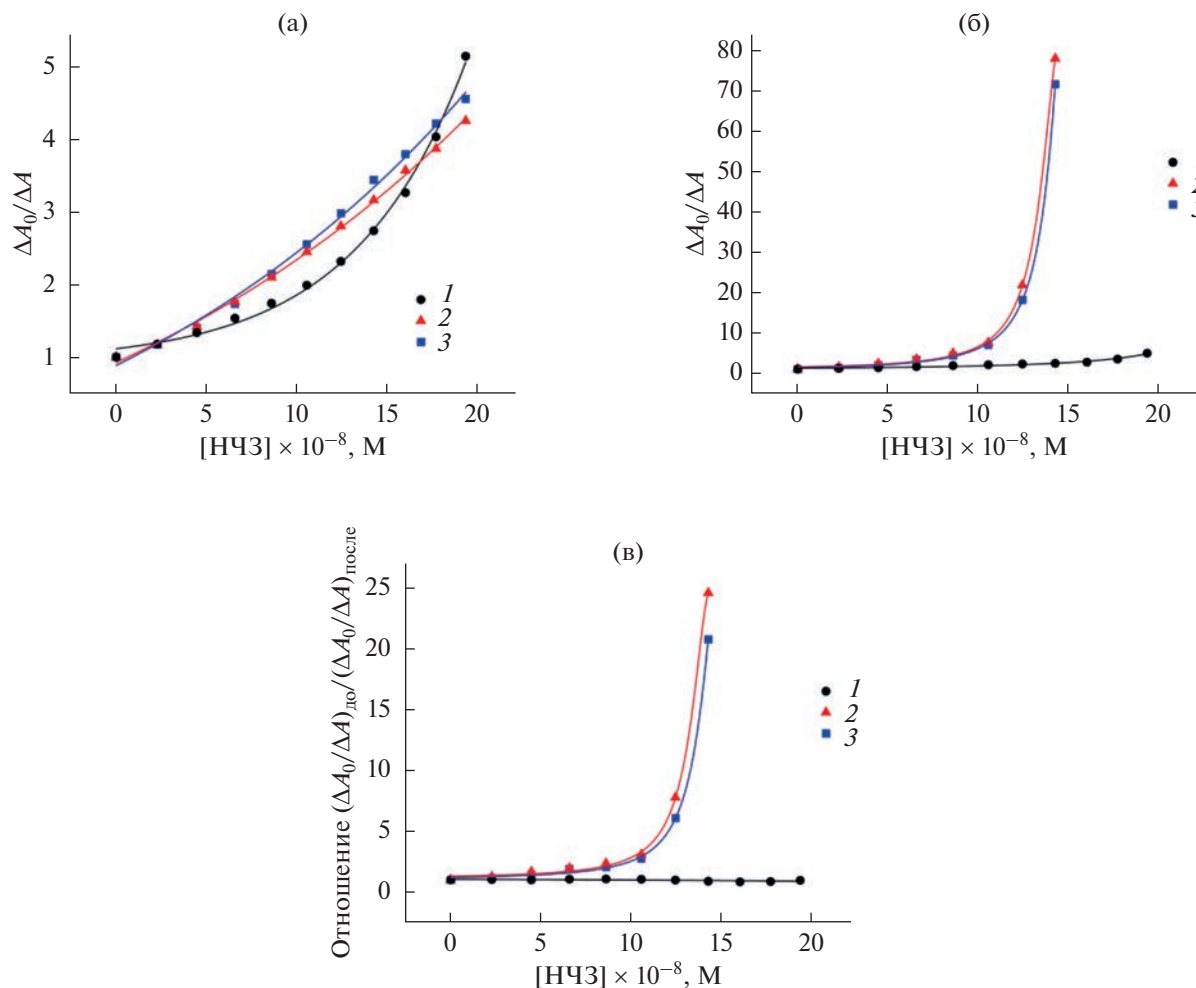


Рис. 3. Сопоставление зависимостей степени разрушения ХЖКД ДНК ($[ДНК] = 1.35 \times 10^{-4} M$) от концентрации НЧЗ исследуемых золей золота при их введении в готовую дисперсию (а) и в случае предварительной инкубации с ДНК (б). (в) Отношение степеней разрушения холестерической микрофазы ДНК при этих двух способах введения НЧЗ в ХЖКД. Номера кривых соответствуют НЧЗ разного возраста: 1 – золь I, 2 – золь II, 3 – золь III. Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7% (а, б) и 10% (в).

ных по методу Даффа, весьма существенно трансформируются в первые 6 мес после синтеза (по крайней мере, в части их взаимодействия с ДНК). При этом помимо уже отмеченной металлизации НЧЗ, обусловленной совершенствованием их кристаллической структуры, может, очевидно, изменяться и химия их поверхности. Более подробный анализ этих изменений, которые должны сказываться на взаимодействии НЧЗ с ДНК, явится целью наших дальнейших исследований. А пока можно сделать следующие предварительные выводы. Во-первых, поскольку НЧЗ всех трех использованных золей по данным ДРС весьма близки по размеру, они должны обладать примерно одинаковой способностью проникать в микрочастицы заранее сформированной ХЖКД ДНК и возмущать/разрушать их упорядоченную структуру. Это в целом и демонстрирует рис. 3а. Во-вторых, судя по рис. 3б, химия поверхности НЧЗ

возрастом 1 мес. еще заметно отличается от таковой у НЧЗ большего возраста, причем таким образом, что эти НЧЗ взаимодействуют с молекулами ДНК существенно слабее, чем НЧЗ возрастом 6 и 12 мес, и, в отличие от них, значительно меньше влияют на образование частиц ХЖКД. В то же время поверхностные свойства НЧЗ золей II и III, по-видимому, уже достаточно близки, что и обуславливает практически одинаковое их воздействие на формирование ХЖКД ДНК.

Еще одним фактором, который, по нашему мнению, может обуславливать различия в величине деструктивного действия НЧЗ на ХЖКД ДНК при двух разных способах их инкорпорирования в эту систему, является концентрация самой нуклеиновой кислоты. Известно, что размер агрегатов ДНК, формируемых методом *psi*-конденсации, зависит от ее молекулярной массы и

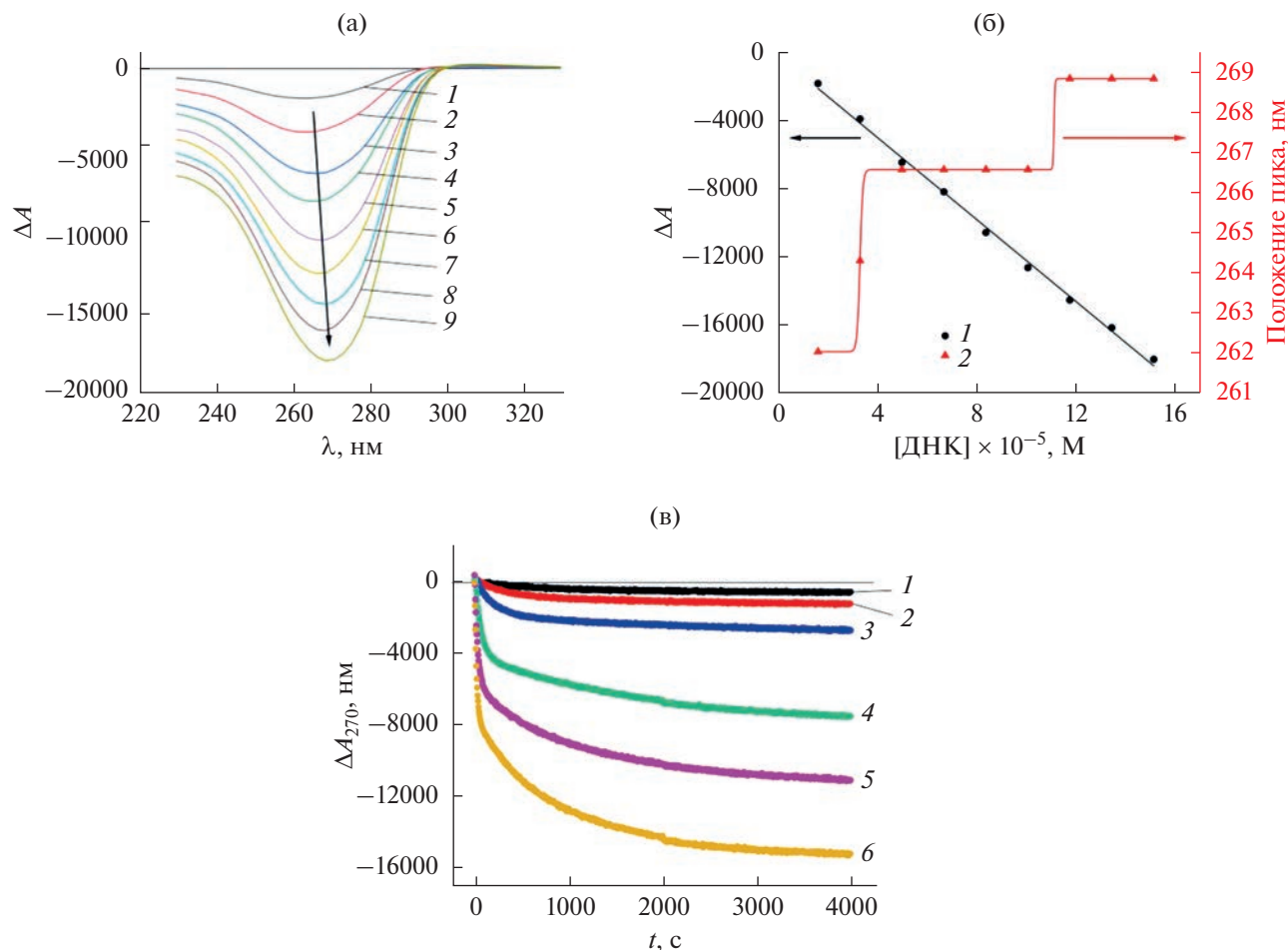


Рис. 4. (а) КД-спектры образцов ХЖКД с различным содержанием ДНК: 1 – 1.69×10^{-5} , 2 – 3.38×10^{-5} , 3 – 5.06×10^{-5} , 4 – 6.75×10^{-5} , 5 – 8.44×10^{-5} , 6 – 1.01×10^{-4} , 7 – 1.18×10^{-4} , 8 – 1.35×10^{-4} , 9 – 1.52×10^{-4} М. (б) Зависимости амплитуды сигнала КД (1) и положения его пика (2) от концентрации ДНК. Стандартные отклонения при определении амплитуды сигнала, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 5%. (в) Зарегистрированные на длине волны $\lambda = 270$ нм кинетические кривые формирования аномальной полосы КД при разной концентрации ДНК: 1 – 1.27×10^{-5} , 2 – 2.53×10^{-5} , 3 – 5.06×10^{-5} , 4 – 1.01×10^{-4} , 5 – 1.52×10^{-4} , 6 – 2.03×10^{-4} М.

концентрации в широких диапазонах значений этих параметров [31]. В свою очередь, как показывает теоретический анализ [32], с увеличением размера частиц ХЖКД интенсивность КД-сигнала должна возрастать практически линейно, если их структура (в частности, шаг холестерической спирали) не изменяется. На рис. 4а представлены КД-спектры образцов ХЖКД, приготовленных при варьировании концентрации ДНК от 1.69×10^{-5} до 1.52×10^{-4} М. Видно, что увеличение содержания нуклеиновой кислоты в системе приводит к возрастанию амплитуды аномальной полосы КД (этот рост сопровождается bathochromным смещением полосы: при наименьшей исследованной концентрации ДНК ее максимум наблюдается на длине волны $\lambda \approx 262$ нм, а при наибольшей – на $\lambda \approx 269$ нм). Представленные в наглядной графической форме на рис. 4б эти спектральные данные свидетельствуют, в частности, о том, что амплитуда

аномальной полосы КД является именно линейной функцией содержания ДНК в системе. Поэтому с учетом сказанного выше можно полагать, что в исследованном концентрационном диапазоне, действительно, изменяется количество нуклеиновой кислоты в составе микрочастиц ХЖКД за счет изменения их размера (и, возможно, числа, см. ниже), но не структура самих микрочастиц.

От концентрации ДНК зависит и кинетика формирования ее ХЖКД. На рис. 4в приведены зависимости амплитуды аномального сигнала КД от времени, записанные на длине волны $\lambda = 270$ нм сразу после смешения растворов нуклеиновой кислоты различной концентрации и раствора ПЭГ. Кривые 1–4 хорошо описываются в рамках двухэкспоненциальной модели, в то время как кривые 5 и 6 имеют трехэкспоненциальный характер. Соответствующие значения рассчитанных по формуле (1) констант скорости k_1 , k_2 и k_3

Таблица 1. Значения констант скорости, рассчитанные по экспериментальным кинетическим кривым, представленным на рис. 4в

Номер кривой на рис. 4в	[ДНК], М	$k_1, \text{с}^{-1}$	$k_2, \text{с}^{-1}$	$k_3, \text{с}^{-1}$
1	1.27×10^{-5}	2.00×10^{-3}	4.72×10^{-4}	—
2	2.53×10^{-5}	3.61×10^{-3}	5.32×10^{-4}	—
3	5.06×10^{-5}	6.02×10^{-3}	5.85×10^{-4}	—
4	1.01×10^{-4}	1.76×10^{-2}	7.01×10^{-4}	—
5	1.52×10^{-4}	3.28×10^{-2}	7.74×10^{-4}	6.67×10^{-3}
6	2.03×10^{-4}	4.88×10^{-2}	8.93×10^{-4}	4.69×10^{-3}

суммированы в табл. 1. Отметим, что величина k_1 изменяется по мере увеличения концентрации ДНК по экспоненциальному закону, а k_2 — по линейному. Исходя из полученных данных, а также из существующих представлений о процессе формирования ХЖКД ДНК [33, 34], мы полагаем, что с помощью спектроскопии КД удастся наблюдать две его стадии: активный рост частиц за счет присоединения молекул ДНК к зародышу (с константой скорости k_1) и упорядочение/перестройку холестерических слоев в сформированных частицах (с константой k_2) [34]. Третья стадия, имеющая место только при весьма высоких концентрациях ДНК, представляет собой, по-видимому, агрегацию частиц дисперсии и может приводить к упомянутому выше одновременному изменению числа и размера микрочастиц нуклеиновой кислоты.

На рис. 5 в качестве примера сопоставлены зависимости нормированной интенсивности сигнала КД для ХЖКД с различным содержанием

ДНК от концентрации НЧЗ (использовался золь II возрастом 6 мес), полученные при двух различных способах их введения в систему. Видно, что при обработке НЧЗ готовой жидкокристаллической дисперсии степень разрушения холестерической организации ее частиц практически не зависит от концентрации ДНК: кривые 1–4 на рис. 5а совпадают в пределах 15%. В то же время в случае предварительной инкубации раствора ДНК с НЧЗ их деструктивное действие на формируемую затем ХЖКД заметно ослабевает с ростом концентрации нуклеиновой кислоты в том же диапазоне (рис. 5б), хотя в целом, как следует из сопоставления рис. 5а и 5б, подавление НЧЗ аномального КД-сигнала ХЖКД гораздо эффективнее именно при их предварительном контакте с ДНК.

Согласно существующим представлениям, нарушение внутренней упаковки частиц ХЖКД ДНК, наблюдающееся при введении НЧЗ в готовую дисперсную систему, состоит в раздвижении и изменении угла закрутки холестерических слоев, фор-

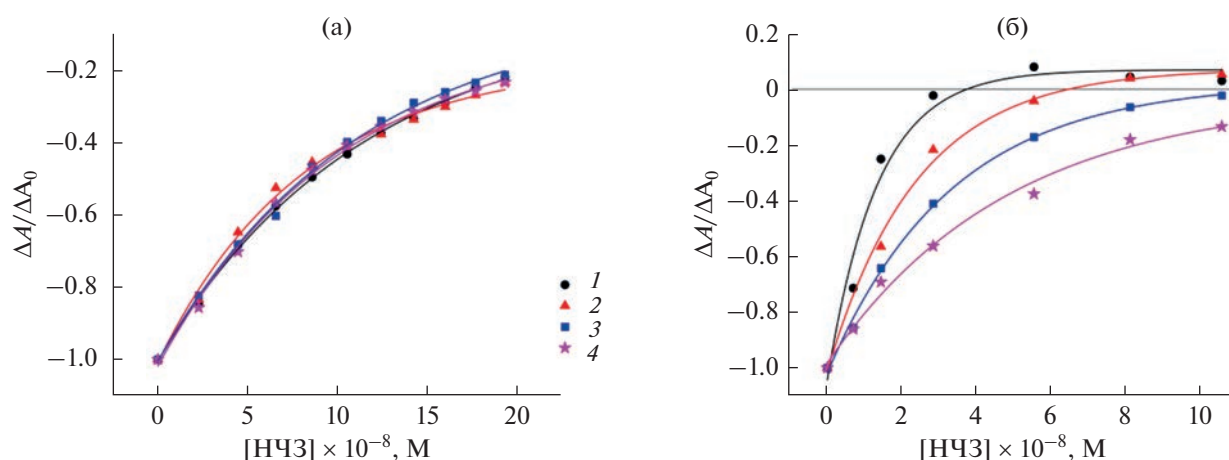


Рис. 5. Зависимости интенсивности сигнала КД от концентрации НЧЗ золя II при обработке ими готовых ХЖКД (а) и при их предварительном контакте с растворами ДНК (б). Концентрация нуклеиновой кислоты в обоих случаях составляла: 1 – 3.38×10^{-5} , 2 – 6.75×10^{-5} , 3 – 1.01×10^{-4} , 4 – 1.35×10^{-4} М. Все значения ΔA нормированы на абсолютные значения амплитуды КД-сигнала для соответствующих исходных ХЖКД, не содержащих НЧЗ. Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7%.

мируемых молекулами ДНК [35]. В работе [36] для обозначения этого механизма был предложен термин “нематизация”. В случае же предварительной инкубации НЧЗ с ДНК происходит исключение отдельных молекул или их групп из процесса формирования ХЖКД при последующем добавлении ПЭГ. В работе [37] этот механизм был описан как предотвращение взаимного “узнавания” молекул ДНК. Очевидно, что в последнем случае увеличение соотношения [НЧЗ] : [ДНК] должно сопровождаться усилением деструктивного эффекта, как наглядно демонстрирует рис. 5б. Вместе с тем, инвариантность степени разрушения упорядоченной структуры частиц дисперсии относительно соотношения [НЧЗ] : [ДНК] при обработке готовой системы, показанная на рис. 5а, является весьма нетривиальной. Отметим здесь, что вкупе с непосредственным воздействием НЧЗ на упаковку ДНК в частицах ее ХЖКД при введении в эту систему золя золота также имеет место разбавление, а, следовательно, и уменьшение осмотического давления раствора ПЭГ. Вместе с тем известно, что при помощи НЧЗ можно стабилизировать структуру жидкокристаллических систем на основе ДНК [38]. В частности, эффект стабилизации внутренней организации в присутствии НЧЗ был ранее обнаружен и в случае разбавления ХЖКД ДНК [39]. Таким образом, действие НЧЗ на упорядоченную упаковку молекул ДНК в частицах ее ХЖКД представляется весьма многофакторным, и понимание многих его аспектов требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе исследовано влияние времени предварительной выдержки (от 1 до 12 мес) ультрамалых НЧЗ, синтезированных по методу Даффа, на структурные аспекты их взаимодействия с частицами ХЖКД ДНК. Полученные результаты весьма убедительно свидетельствуют о том, что “возраст” таких НЧЗ является существенным фактором, определяющим степень разрушения упорядоченной упаковки молекул ДНК в частицах ее ХЖКД. На основании полученных данных можно сделать следующие выводы.

1. При обработке готовой дисперсной системы различия в степени разрушения для НЧЗ разного “возраста” выражены довольно слабо. При этом для “выдержанных” НЧЗ эффект усиления степени разрушения ХЖКД в случае их предварительной инкубации с ДНК реализуется значительно сильнее. Вместе с тем, существенных различий в величине деструктивного эффекта для НЧЗ, выдержанных в течение 6 и 12 мес, в условиях проведенного эксперимента обнаружено не было.

2. Степень разрушения холестерической упаковки ДНК при обработке НЧЗ готовой дисперсной системы не зависит от концентрации нуклеи-

новой кислоты, в то время как в случае предварительной инкубации ДНК с НЧЗ эффект, напротив, сильно зависит от ее содержания в системе.

3. В части взаимодействия с ДНК свойства ультрамалых НЧЗ, полученных по методу Даффа, весьма существенно трансформируются в первые 6 мес после синтеза. Это может быть обусловлено как металлизацией НЧЗ вследствие совершенствования их кристаллической структуры, так и изменением химии их поверхности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jordan C.F., Lerman L.S., Venable J.H. Structure and circular dichroism of DNA in concentrated polymer solutions // *Nature: New Biology*. 1972. V. 236. № 64. P. 67–70.
<https://doi.org/10.1038/newbio236067a0>
2. Earnshaw W.C., Casjens S.R. DNA packaging by the double-stranded DNA bacteriophages // *Cell*. 1980. V. 21. № 2. P. 319–331.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90468-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90468-7)
3. Yevdokimov Y.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I. The liquid-crystalline phases of double-stranded nucleic acids *in vitro* and *in vivo* // *Liquid Crystals*. 1988. V. 3. № 11. P. 1443–1459.
<https://doi.org/10.1080/02678298808086687>
4. Livolant F. Ordered phases of DNA *in vivo* and *in vitro* // *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. 1991. V. 176. № 1. P. 117–137.
[https://doi.org/10.1016/0378-4371\(91\)90436-G](https://doi.org/10.1016/0378-4371(91)90436-G)
5. Cheng S.-M., Mohr S.C. The thermal transition of ‘PSI’ DNA monitored by circular dichroism // *FEBS Letters*. 1974. V. 49. № 1. P. 37–42.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80626-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80626-5)
6. Nikogosyan D.N., Repeyev Y.A., Yakovlev D.Y. et al. Photochemical alterations in DNA revealed by DNA-based liquid crystals // *Photochemistry and Photobiology*. 1994. V. 59. № 3. P. 269–276.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05033.x>
7. Kolyvanova M.A., Klimovich M.A., Shibaeva A.V. et al. Cholesteric liquid-crystalline DNA – a new type of chemical detector of ionizing radiation // *Liquid Crystals*. 2022. V. 49. № 10. P. 1359–1366.
<https://doi.org/10.1080/02678292.2022.2032854>
8. Кольванова М.А., Белоусов А.В., Кузьмин В.А. и др. Модификация радиочувствительности холестерической дисперсии ДНК с помощью диметилсульфоксида // *Химия высоких энергий*. 2022. Т. 56. № 5. С. 416–418.
<https://doi.org/10.31857/S0023119322050072>
9. Yevdokimov Y.M., Salyanov V.I., Lortkipanidze G.B. et al. Sensing biological effectors through the response of bridged nucleic acids and polynucleotides fixed in liquid-crystalline dispersions // *Biosensors and Bioelectronics*. 1998. V. 13. № 3–4. P. 279–291.
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)00133-4)
10. Евдокимов Ю.М., Салыанов В.И., Кондрашина О.В. и др. Жидкокристаллические дисперсии комплексов

- ДНК с гадолинием — потенциальная платформа для нейтронозахватывающей терапии // Доклады Академии наук. 2005. Т. 402. № 5. С. 693–696. <https://doi.org/10.1007/s10628-005-0081-z>
11. Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.I. et al. DNA sequence-specific ligands. XVII. Synthesis, spectral properties, virological and biochemical studies of fluorescent dimeric bisbenzimidazoles DBA(n) // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2018. V. 26. № 9. P. 2302–2309. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.03.018>
12. Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.I. et al. DNA sequence-specific ligands. XVIII. Synthesis, physicochemical properties; genetic, virological, and biochemical studies of fluorescent dimeric bisbenzimidazoles DBPA(n) // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2020. V. 28. № 7. P. 115378. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115378>
13. Morozov V.N., Kolyvanova M.A., Dement'eva O.V. et al. Fluorescence superquenching of SYBR Green I in crowded DNA by gold nanoparticles // Journal of Luminescence. 2020. V. 219. P. 116898. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2019.116898>
14. Morozov V.N., Kolyvanova M.A., Dement'eva O.V. et al. Comparison of quenching efficacy of SYBR Green I and PicoGreen fluorescence by ultrasmall gold nanoparticles in isotropic and liquid-crystalline DNA systems // Journal of Molecular Liquids. 2021. V. 321. P. 114751. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114751>
15. Скуридин С.Г., Дубинская В.А., Рудой В.М. и др. Действие наночастиц золота на упаковку молекул ДНК в модельных системах // Доклады Академии наук. 2010. Т. 432. № 6. С. 838–841.
16. Евдокимов Ю.М., Салаянов В.И., Кац Е.И. и др. Кластеры из наночастиц золота в квазинематических слоях частиц жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот // Acta Naturae. 2012. Т. 4. № 4 (15). С. 80–93.
17. Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салаянов В.И. и др. Наночастицы золота влияют на “узнавание” двухцепочечных молекул ДНК и запрещают формирование их холестерической структуры // Жидкие кристаллы и их практическое использование. 2014. Т. 14. № 4. С. 5–21.
18. Duff D.G., Baiker A., Edwards P.P. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation // Langmuir. 1993. V. 9. № 9. P. 2301–2309. <https://doi.org/10.1021/la00033a010>
19. Duff D.G., Baiker A., Gameson I., Edwards P.P. A new hydrosol of gold clusters. 2. A comparison of some different measurement techniques // Langmuir. 1993. V. 9. № 9. P. 2310–2317. <https://doi.org/10.1021/la00033a011>
20. Морозов В.Н., Климович М.А., Колыванова М.А. и др. Взаимодействие наночастиц золота с цианиновыми красителями в холестерических субмикрочастицах ДНК // Химия высоких энергий. 2021. Т. 55. № 5. С. 339–346.
21. Колыванова М.А., Климович М.А., Дементьева О.В. и др. Взаимодействие наночастиц золота с цианиновыми красителями в холестерических субмикрочастицах ДНК. Влияние способа их введения в систему // Химическая физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 64–72. <https://doi.org/10.31857/S0207401X23010065>
22. Swarnkar R.K., Singh S.C., Gopal R. Effect of aging on copper nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in water: Structural and optical characterizations // Bulletin of Materials Science. 2011. V. 34. № 7. P. 1363–1369. <https://doi.org/10.1007/s12034-011-0329-4>
23. Ma Y., Chechik V. Aging of gold nanoparticles: Ligand exchange with disulfides // Langmuir. 2011. V. 27. № 23. P. 14432–14437. <https://doi.org/10.1021/la202035x>
24. Gubicza J., Lábár J.L., Quynh L.M. et al. Evolution of size and shape of gold nanoparticles during long-time aging // Materials Chemistry and Physics. 2013. V. 138. № 2–3. P. 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.01.012>
25. Дементьева О.В., Карцева М.Е., Сухов В.М. и др. Температурно-временная эволюция ультрамалых затравочных наночастиц золота и синтез плазмонных нанооболочек // Коллоидный журнал. 2017. Т. 79. № 5. С. 562–568. <https://doi.org/10.7868/S0023291217050056>
26. Карцева М.Е., Шишмакова Е.М., Дементьева О.В. и др. Рост фосфониевых наночастиц золота в щелочной среде: кинетика и механизм процесса // Коллоидный журнал. 2021. Т. 83. № 6. С. 644–650. <https://doi.org/10.31857/S0023291221060057>
27. Keller D., Bustamante C. Theory of the interaction of light with large inhomogeneous molecular aggregates. II. Psi-type circular dichroism // The Journal of Chemical Physics. 1986. V. 84. № 6. P. 2972–2980. <https://doi.org/10.1063/1.450278>
28. Компанец О.Н. Портативные оптические биосенсоры для определения биологически активных и токсичных соединений // Успехи физических наук. 2004. Т. 174. № 6. С. 686–690.
29. Ершов Б.Г. Короткоживущие малые кластеры металлов в водных растворах: получение, идентификация и свойства // Известия Академии наук. Серия химическая. 1999. № 1. С. 1–15.
30. Livolant F., Leforestier A. Condensed phases of DNA: Structures and phase transitions // Progress in Polymer Science. 1996. V. 21. № 6. P. 1115–1164. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(96\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(96)00016-0)
31. Muzzopappa F., Hertzog M., Erdel F. DNA length tunes the fluidity of DNA-based condensates // Biophysical Journal. 2021. V. 120. № 7. P. 1288–1300. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.02.027>
32. Семенов С.В., Евдокимов Ю.М. Круговой дихроизм частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК // Биофизика. 2015. Т. 60. № 2. С. 242–252.
33. Скуридин С.Г., Лорткипанидзе Г.Б., Мусаев О.Р. и др. Формирование жидкокристаллических микрофаз двухцепочечных нуклеиновых кислот и синтетических полинуклеотидов низкой молекулярной массы // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 1985. Т. 27. № 11. С. 2261–2265.

34. *Morozov V.N., Klimovich M.A., Kostyukov A.A. et al.* Förster resonance energy transfer from Hoechst 33258 to SYBR Green I in cholesteric liquid-crystalline DNA // *Journal of Luminescence*. 2022. V. 252. P. 119381. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2022.119381>
35. *Скуридин С.Г., Дубинская В.А., Штыкова Э.В. и др.* Фиксация наночастиц золота в структуре квазинематических слоев, образованных молекулами ДНК // *Биологические мембраны*. 2011. Т. 28. № 3. С. 191–198.
36. *Евдокимов Ю.М.* Наночастицы золота и жидкие кристаллы ДНК // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2015. Т. 56. № 3. С. 147–157.
37. *Евдокимов Ю.М., Саяннов В.И., Скуридин С.Г. и др.* Физико-химический и нанотехнологический подходы к созданию “твердых” пространственных структур ДНК // *Успехи химии*. 2015. Т. 84. № 1. С. 27–42.
38. *Brach K., Matczyszyn K., Olesiak-Banska J. et al.* Stabilization of DNA liquid crystals on doping with gold nanorods // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2016. V. 18. P. 7278–7283. <https://doi.org/10.1039/C5CP07026K>
39. *Скуридин С.Г., Саяннов В.И., Попенко В.И. и др.* Структурные эффекты, вызываемые наночастицами золота, в частицах холестерических жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот // *Химико-фармацевтический журнал*. 2013. Т. 47. № 2. С. 3–11. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2013-47-2-3-11>

УДК 544.77:615.2

КОЛЛОИДНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЭТОПОЗИДА НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

© 2023 г. М. А. Меркулова¹, *, Н. С. Осипова¹,
А. В. Калистратова¹, Ю. В. Ермоленко¹, С. Э. Гельперина¹
¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Миусская площадь, 9, Москва, 125047 Россия

*e-mail: ma.merk@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 03.08.2023 г.

Принята к публикации 03.08.2023 г.

В обзоре рассмотрены системы доставки этопозиды на основе коллоидных носителей — полимерных наночастиц и мицелл из синтетических и природных полимеров. Этопозид, ингибитор топоизомеразы II, занимает важное место в химиотерапии ряда опухолей, однако его применение часто ограничено ввиду выраженных побочных эффектов. Использование коллоидных систем доставки позволяет изменить фармакокинетические параметры этопозиды и повысить его накопление в опухолях, что приводит к усилению противоопухолевого эффекта. Особый интерес представляют стимул-чувствительные системы, реагирующие на специфические условия в микроокружении опухоли, что позволяет значительно повысить селективность действия препарата.

Ключевые слова: этопозид, системы доставки, полимерные наночастицы

DOI: 10.31857/S0023291223600463, **EDN:** DPYRBT

1. ВВЕДЕНИЕ

Этопозид (ЕТР, рис. 1а), противоопухолевый препарат широкого спектра действия, представляет собой производное 4'-деметилэпиподофиллотоксина (рис. 1б), растительного токсина, получаемого экстракцией из корней подофилла. Этопозид был синтезирован в 60-е годы прошлого века швейцарской компанией Sandoz Pharmaceuticals и в 1983 году вошел в клиническую практику под торговым названием Вепезид® (Bristol-Myers Squibb) [1]. В настоящее время этопозид входит в перечень ВОЗ основных лекарственных средств [2]. Основным его назначением является химиотерапия (преимущественно в комбинации с другими цитостатиками) герминогенных опухолей яичка и яичников и мелкоклеточного рака легких (МРЛ). Препарат применяют также при лечении других видов рака, в том числе лимфогранулематоз, острого монобластного и миелобластного лейкоза и пр. [3, 4].

Основной мишенью цитотоксического действия этопозиды является топоизомераза II — фермент, необходимый для транскрипции, репликации и сегрегации хромосом при делении клетки. Формирование тройного комплекса этопозид-ДНК и топоизомеразой II в фазе активного клеточного

деления S и G2 приводит к торможению репликации ДНК, задержке пролиферации клеток и, как следствие, к их апоптозу [5, 6].

Этопозид отличается низкой растворимостью и относительно низкой кишечной проницаемостью, то есть принадлежит к IV классу по системе биофармацевтической классификации. Его биодоступность при пероральном введении составляет 40–75% в зависимости от дозы; при этом фармакокинетические показатели отличаются высокой интер- и интраиндивидуальной вариабельностью, которая по некоторым данным достигает 35% [1, 7] и затрудняет выбор оптимального режима лечения. Внутривенное введение препарата позволяет несколько снизить вариабельность (до 25% [7]); однако из-за низкой растворимости этопозид в воде (150–170 мкг/мл [8]) в состав внутривенной формы Вепезид® (Вепезид®, концентрат для инфузий, 20 мг/мл, Bristol-Myers Squibb) введены растворители и солюбилизаторы, в том числе полисорбат 80, вызывающий аллергические реакции. Позднее была разработана водорастворимая форма этопозид-фосфата (рис. 1в) — этопозид-фосфат (рис. 1в) — представляет собой про-лекарство и при внутривенном введении уже через 15 мин превращается в этопозид. Хотя высокая растворимость Этопозид-фосфата в

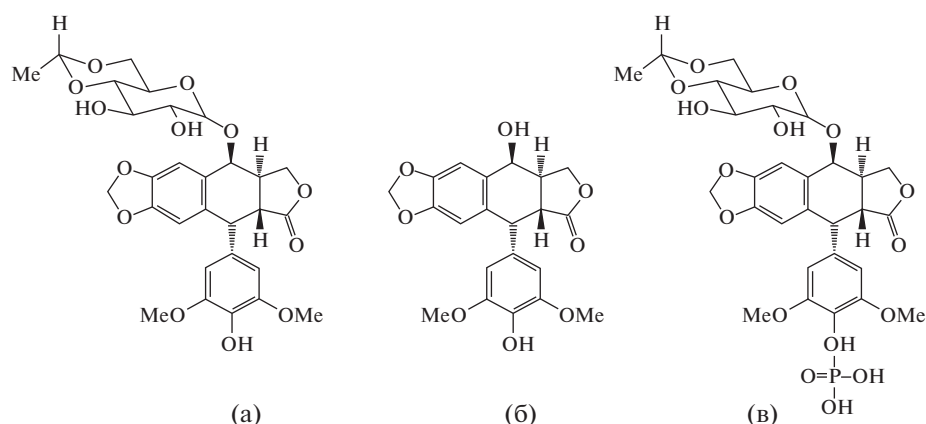


Рис. 1. Структурные формулы этопозид (а), 4'-деметилэтопозид (б) и этопозид фосфата (в).

воде (20 мг/мл) позволила отказаться от солюбилизаторов и таким образом несколько снизить побочные эффекты препарата и уменьшить объемы инфузии [9–11], фармакокинетические параметры и профиль токсичности Этопозифоса и этопозид практически одинаковы.

Как отмечено выше, этопозид занимает важное место в химиотерапии ряда опухолей, однако его применение часто ограничено ввиду выраженных побочных эффектов, наиболее серьезным из которых является миелосупрессия (нейтропения и тромбоцитопения) [6, 12]. Кроме того, применение высоких доз этопозид связывают с повышенным риском вторичных миелоидных лейкозов [13, 14].

Очевидно, что для снижения дозы лекарственного вещества (ЛВ) при сохранении эффективности лечения необходимо повышение его концентрации в опухоли (то есть повышение селективности действия). Как показывают результаты многочисленных исследований, повысить эффективность доставки ЛВ в опухоль и снизить побочные эффекты позволяет использование коллоидных наноразмерных носителей. Первым и наиболее известным представителем наноносителей стали липосомы. Длительный опыт применения липосомальной формы противоопухолевого антибиотика доксорубин свидетельствует о его повышенной безопасности и переносимости по сравнению с традиционными лекарственными формами [15]. Среди альтернативных наноносителей особый интерес представляют наночастицы из синтетических и природных полимеров. Эти технологии отличает гибкость, обусловленная разнообразием полимеров, применяемых для получения наноносителей. К достоинствам полимерных наночастиц следует отнести стабильность и высокую емкость, а также возможность получения препаратов с контролируемой скоростью высвобождения ЛВ, возможность функционализации поверхности и пригодность для различных путей

введения в организм, в том числе для перорального и ингаляционного. Преимуществом полимерных мицелл является легкость их получения. При получении наночастиц и мицелл, предназначенных для парентеральных путей введения, используют только биodeградируемые полимеры. Здесь следует отметить, что с точки зрения фармацевтической технологии системы доставки ЛВ на основе наночастиц и других коллоидных наноносителей являются лекарственными формами, представляющими собой ЛВ, включенное в состав субмикронных частиц (сформированных в данном случае из полимеров), и для введения их в клиническую практику необходимо соответствие требованиям фармакопей [16, 17].

Способность наноносителей доставлять ЛВ в опухоль обусловлена различными механизмами. Прежде всего, это патофизиологические особенности некоторых опухолей, способствующие проникновению и накоплению частиц (эффект EPR, от англ. Enhanced Permeation and Retention). Кроме того, важную роль играет захват наночастиц циркулирующими в крови иммунными клетками, которые затем проникают в окружение опухоли (клеточно-опосредованный транспорт). В частности, клеточно-опосредованный транспорт в опухоль показан для липосом [18], полилактидных и альбуминовых наночастиц [19]. Доставке в опухоль способствует также повышение времени циркуляции инкапсулированных ЛВ в кровотоке; для этого наночастицы покрывают гидрофильной оболочкой, которая снижает их распознавание и захват макрофагами, локализованными в органах ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) (так называемый “стелс-эффект”). Следует отметить также доставку ЛВ в опухоль с помощью наноносителей, конъюгированных с биологическим-вектором, способствующим их взаимодействию с рецепторами на поверхности опухолевых клеток и последующей интернализации (так называемый “активный транспорт” ЛВ). В литературе описаны вектора раз-

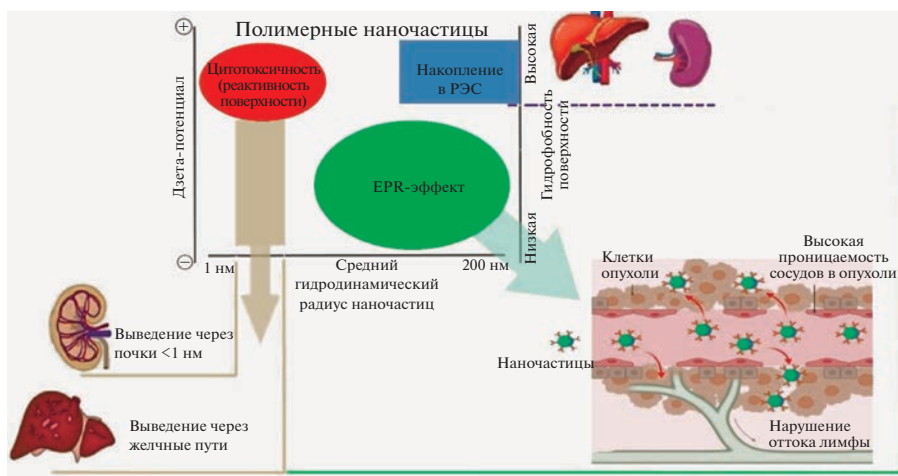


Рис. 2. Корреляции между физико-химическими параметрами наночастиц, их биораспределением и биосовместимостью. Основные независимые параметры: гидрофобность, диаметр наночастиц и дзета-потенциал. Зоны: красная — риск повышенной токсичности, зеленая — вероятно хорошая биосовместимость. Мелкие положительно заряженные наночастицы (красная зона), вероятно, будут токсичнее, чем более крупные гидрофобные наночастицы, которые быстро выводятся из организма через органы РЭС (синяя зона). Для доставки в опухоль посредством эффекта EPR наиболее пригодны отрицательно заряженные или нейтральные наночастицы размером 100–200 нм (зеленая зона) (адаптировано по данным [31] с помощью Biorender.com).

личных типов, в том числе, пептиды (например, проникающие в клетку RGD-пептиды [20, 21] или аналог соматостатина октреотид [22]), лектины [23], молекулы витаминов — D3 [24] или фолат [23] и др. Механизмы, контролирующие биораспределение различных наночастиц в организме и транспорт в опухоль, подробно освещены в обзорах [18, 25–27].

Эффективность системы доставки/наносомальной лекарственной формы, профиль ее распределения в организме и биосовместимость во многом зависят от физико-химических параметров носителя, в том числе от размера и заряда (дзета-потенциала) наночастиц и свойств поверхности (прежде всего, от гидрофобности), а также от содержания ЛВ и скорости его высвобождения. Все эти параметры в значительной степени можно контролировать, выбирая подходящий тип наночастиц и оптимальную технологию их получения [28–30]. Закономерности взаимосвязей между основными параметрами наночастиц и их поведением в организме иллюстрирует 3-D диаграмма (рис. 2) [31].

Несмотря на важную роль этопозида в химиотерапии рака, исследования систем его доставки относительно немногочисленны в сравнении, например, с доксорубицином: так, в базе данных Medline поиск по ключевым словам “etoposide, delivery systems” выявляет около 200 статей, а по словам “doxorubicin, delivery systems” — более 8 тыс. Тем не менее в литературе представлен широкий спектр коллоидных систем доставки этопозида, в том числе липосомы [32–34], различные типы мицелл [22, 35], твердые наночастицы, включая неорганические [36, 37], полимерные [38–41] и

липидные [42–45], а также более сложные системы “второго поколения”, такие как наночастицы типа “ядро-оболочка” [46], системы со-доставки этопозида в комбинации с другими противоопухолевыми агентами [47–52] и векторизованные системы [20]. Схематические изображения строения основных типов коллоидных носителей, использованных для доставки этопозида, приведены на рис. 3.

Данный обзор посвящен системам доставки этопозида на основе синтетических и природных полимеров, в том числе твердых наночастиц и мицелл. Основное внимание уделено исследованиям, направленным на установление взаимосвязи между

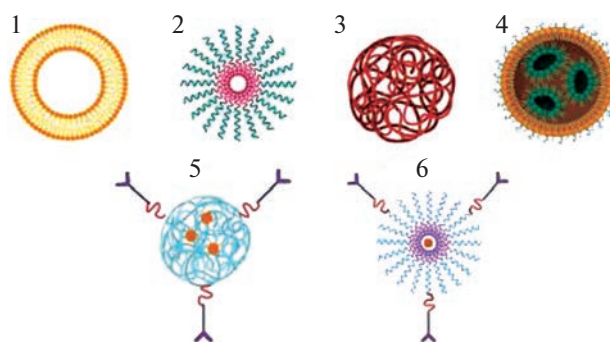


Рис. 3. Основные типы коллоидных носителей этопозида: 1 — липосомы, 2 — полимерные мицеллы, 3 — полимерные твердотельные наночастицы, 4 — наночастицы из твердых липидов, 5 — векторизованные полимерные наночастицы с включенным ЛВ, 6 — векторизованные полимерные мицеллы с включенным ЛВ (рисунок создан с помощью Biorender.com).

физико-химическими параметрами наночастиц и их поведением в организме, а также технологическим подходам, позволяющим контролировать эти параметры.

2. НАНОЧАСТИЦЫ ИЗ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

2.1. Наночастицы из полилактидов

Большинство описанных в литературе наночастиц (наночастиц) этопозида получены на основе полилактидов, в частности, из сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA, от *англ.* Poly(Lactide-co-Glycolide) Acid). Благодаря способности к биodeградации, биосовместимости и низкой токсичности PLGA, наночастицы на его основе широко используются как носители ЛВ [53, 54]. В организме полилактиды подвергаются гидролизу с образованием нетоксичных метаболитов — молочной и гликолевой кислот. Для получения лекарственных форм, как правило, используют полилактиды фармацевтического качества, наиболее известными из которых являются полимеры марки Resomer® (Evonik Industries AG, Германия) и Purasorb® (Corbion, Нидерланды). Данные производители предлагают широкий ряд полимеров с варьируемым молекулярным составом, в том числе, с различными молярными соотношениями лактида и гликолида (состав PLGA обычно 85/15, 75/25 или 50/50 мол/мол, соответственно), молекулярными массами и типом концевых групп (—COOH или —OCH₃). Варьируя эти параметры, можно контролировать эффективность включения ЛВ, профиль его высвобождения из наночастиц и скорость деградации полимера. Основные способы получения наночастиц PLGA — наноосаждение и гомогенизация (эмульгирование) с последующим удалением растворителя — подробно рассмотрены в обзорах [55, 56]. Размер получаемых частиц и эффективность включения ЛВ зависят от параметров процесса, в том числе от метода получения, молекулярной массы PLGA и его строения, а также от соотношения ЛВ: полимер, концентрации и типа стабилизатора и др. Подобные тенденции характерны для большинства полимерных наночастиц [28–30]. Для получения наночастиц этопозида (ETP-PLGA) чаще используют PLGA 50/50 и блок-сополимеры PLGA с полиэтиленгликолем (PLGA-PEG').

В методе эмульгирования органическая фаза представляет собой раствор этопозида и PLGA в дихлорметане, хлороформе или этилацетате, а водная фаза содержит стабилизатор эмульсии (поверхностно-активное вещество, ПАВ). Обычно используют фармацевтические неионогенные полимерные ПАВ, например, полксамер 188 (блок-сополимер полиэтиленоксида и полипропиленоксида, PEO₈₀-PPO₂₇-PEO₈₀) [38, 57], поливиниловый

спирт (ПВС) [58, 59] или TPGS (D-α-токоферил полиэтиленгликоль 1000 сукцинат) [58] и др. Однако наночастицы можно получать и в присутствии анионного ПАВ, такого как холат натрия [58]. Вначале путем ультразвуковой или механической гомогенизации получают первичную эмульсию (типа масло/вода), которую затем гомогенизируют под давлением для уменьшения размеров капель. В систематическом исследовании Yadav и соавт. [59] увеличение количества циклов гомогенизации от 1 до 4 и повышение давления от 5000 до 10000 пси привело к весьма значительному уменьшению размеров наночастиц ETP-PLGA от 600 до 100 нм. При этом рост массового соотношения ETP : PLGA от 1 : 10 до 1 : 4 приводил к снижению эффективности включения этопозида от ~80 до ~50%. Все частицы имели отрицательный дзета-потенциал в диапазоне от –15 до –30 мВ.

В лабораторных условиях наноосаждение (соосаждение) — простой и удобный метод получения наночастиц. Ограничением этой технологии является сложность ее масштабирования [60]. Для получения наночастиц методом наноосаждения раствор этопозида и PLGA в смешивающемся с водой растворителе медленно прибавляют в водную фазу, содержащую стабилизатор суспензии. Так, соосаждение этопозида и PLGA из раствора в ацетоне в водный раствор полксамера 188 приводило к образованию узкодисперсных наночастиц ETP : PLGA размером 90–100 нм и дзета-потенциалом порядка –30 мВ [46]. Авторы использовали PLGA с различными молярными соотношениями мономерных звеньев лактид/гликолид (50/50, 75/25 и 85/15); массовое соотношение ETP : PLGA составляло 1 : 10. Эффективность включения этопозида возрастала по мере увеличения доли лактида (то есть по мере увеличения гидрофобности полимера) от 58 до 78% соответственно. Содержание этопозида в наночастице при этом также возрастало, однако оставалось низким (<1.5% в/в). В работе Calewart и соавт. [57] содержание этопозида в полученных наноосаждением наночастицах PLGA (50/50) удалось повысить до 7.3% в/в. Такой результат получен путем увеличения соотношения ETP : PLGA в реакционной смеси до 6 : 10 в/в. Однако эффективность включения этопозида при этом составила всего 13%.

Интересные результаты получили Saadati и соавт. [58]. Эти авторы сравнили влияние различных стабилизаторов (в том числе, ПВС, полксамера 188, холата натрия и TPGS) в концентрациях от 0.1 до 1% на эффективность включения этопозида в наночастицы из PEG-PLGA, полученные путем наноосаждения и эмульгирования. В случае эмульгирования наиболее эффективными (включение >50%) оказались 0.3% ПВС и 0.1% TPGS, а для наночастиц, полученных осаждением — 0.5% ПВС. Однако в целом эмульгирование обеспечи-

вало более эффективное включение этопозидов. Наилучший результат получен при одновременном использовании TPGS и ПВС: для обоих методов эффективность включения превысила 80%, а размеры наночастиц составляли 150–200 нм.

Как отмечалось выше, одним из основных параметров наносомальной лекарственной формы/системы доставки, определяющих ее эффективность, является кинетика высвобождения ЛВ из наночастиц. Именно от этого параметра зависит, какое количество ЛВ будет доставлено в орган- или клетку-мишень [62]. Помимо перечисленных выше технологических параметров, эффективность включения ЛВ в наночастицу и скорость его высвобождения зависят от сродства молекулы ЛВ к полимеру [63]. При разбавлении наносuspension высвобождение ЛВ вначале происходит путем его десорбции и диффузии из полимерного ядра и лишь на поздних этапах этот процесс зависит от скорости деградации полимера [64]. Кинетику высвобождения ЛВ *in vitro* определяют путем инкубации наночастиц при 37°C в модельных средах, имитирующих физиологические условия. Если наночастицы предназначены для внутривенного введения, то такими условиями являются предельное разбавление (sink condition) наносuspension в среде, имитирующей плазму крови (обычно 0.9% раствор NaCl или фосфатный буфер с pH 7.4) [65]. Поскольку этопозид трудно растворим, в среду иногда добавляют органические растворители или ПАВ, в том числе метанол [39], альбумин [66] или полисорбат 80 [51]. Для определения количеств высвободившегося и инкапсулированного этопозидов наночастицы отделяют методом диализа [39, 57–59, 66] или центрифугированием [51]. В большинстве исследований использовали метод диализа, при этом данные о профиле высвобождения этопозидов из наночастиц PLGA (50/50) несколько противоречивы. Так, в работах [66, 69, 70] наблюдали длительное высвобождение этопозидов: 40–50% высвобождалось в течение 24 ч, при этом для полного высвобождения требовалось от 12 [69] до 40 сут [70]. В других исследованиях высвобождение этопозидов из аналогичных наночастиц в основном завершалось в течение 48 ч [38, 39, 51]. Высвобождение этопозидов замедлялось при повышении содержания лактида в полимере: если наночастицы из PLGA (50/50) высвобождали 50% этопозидов за 1 час, то наночастицы из PLGA (75/25) и PLGA (85/15) удерживали 50% этопозидов уже в течение 5 и 15 ч соответственно [38]. Этот феномен, вероятно, объясняется повышением сродства этопозидов к полимеру с увеличением его гидрофобности. Упомянутое выше сочетание ПВС и TPGS не только повысило эффективность включения этопозидов в наночастицы PEG-PLGA, но и значительно замедлило время его высвобождения (с 48 ч до 3 и 8 сут для наночастиц, полученных осаждением

и эмульгированием соответственно) [58]. Авторы предположили, что роль TPGS заключается не только в стабилизации эмульсии, но и в повышении сродства этопозидов к полимеру. Добавление липидного компонента трикаприна (глицерин *трис*(деканоат)), напротив, ускорило высвобождение этопозидов из микросфер PLGA [71].

Известно, что фармакокинетические параметры наночастиц зависят от их геометрических параметров и свойств поверхности. Покрытие поверхности наночастиц нейтральными ПАВ, которые создают гидрофильную оболочку и препятствуют адсорбции белков-опсонинов, опосредующих захват наночастиц макрофагами (так называемая “стерическая стабилизация” или “стелс-эффект”), снижает клиренс (скорость элиминации из плазмы крови) и накопление в органах ретикулоэндотелиальной системы [72]. Повышению времени циркуляции наночастиц способствует также уменьшение их размеров.

Действительно, по данным Yadav и соавт. даже незначительное уменьшение размеров наночастиц PLGA, нагруженных радиоактивно меченным этопозидом (^{99m}Tc -ETP), от 160 до 105 нм приводит к снижению его накопления в печени, селезенке и легких и увеличению времени циркуляции (через 24 ч в плазме крови мышей найдено 1.08 и 3.98% введенной дозы соответственно) [73]. Стерическая стабилизация поверхности с помощью ковалентно связанного с наночастицами PEG (ETP-PLGA-mPEG) или путем покрытия наночастиц поллоксамером 188 (ETP-PLGA-P188) еще более эффективна: при внутривенном введении концентрации ^{99m}Tc -ETP в крови мышей через 24 ч достигали ~20% введенной дозы, при этом накопление в органах РЭС снизилось в 2–3 раза по сравнению с немодифицированными наночастицами [73]. Наночастицы из PLGA (85/15) размером 105 нм не только повысили время циркуляции этопозидов (^{99m}Tc -ETP: $\text{AUC}_{0-\infty} = 57.76\% \text{ А ч/г}$, $\text{Cl} = 1.73 \text{ г/ч}$; ^{99m}Tc -ETP-PLGA: $\text{AUC}_{0-\infty} = 136.97\% \text{ А ч/г}$, $\text{Cl} = 0.73 \text{ г/ч}$), но и, подчиняясь эффекту EPR, обеспечили значительное — почти четырехкратное по сравнению со свободным ЛВ — увеличение его концентрации в подкожно имплантированной мышам лимфоме Далтона (~9% дозы) [74].

Противоопухолевый эффект наночастиц ETP-PLGA, к сожалению, остается малоизученным. В исследовании [69] противоопухолевый эффект наночастиц ETP-PLGA лишь незначительно превышал эффект свободного этопозидов: индекс торможения роста опухоли, индуцированной подкожной имплантацией клеток лимфолейкоза P388 у мышей, составлял 88 и 75% соответственно. Препараты вводили внутривенно, что, по-видимому, и является причиной низкой эффективности наночастиц, поскольку такой способ, в отличие от

внутривенного, не позволяет обеспечить их накопление в периферической опухоли за счет эффекта EPR [75, 76].

В то же время результаты многих исследований *in vitro* свидетельствуют о том, что включение этопозида в наночастицы не только не снижает его цитотоксичность в отношении различных опухолевых клеток, но в ряде случаев позволяет ее повысить [57, 59, 66, 70]. Так, значения IC_{50} (концентрация, при которой погибает 50% клеток) для ETP-PLGA, ETP-PLGA-mPEG и ETP-PLGA-P188 в отношении клеток мышинного лейкоза L1210 составляли 6,2, 4,8 и 5,4 мкМ соответственно; при этом IC_{50} свободного этопозида была значительно выше — 18 мкМ. Клетки рака простаты человека DU145 менее чувствительны к этопозиду, однако и в этом случае наноформы проявили большую активность: значения IC_{50} для ETP-PLGA, ETP-PLGA-mPEG и ETP-PLGA-P188 составляли 75,1, 60,1 и 71,3 мкМ соответственно, против 98,4 мкМ для свободного ETP [59]. Аналогичная тенденция отмечена в работе [58]: включение этопозида в наночастицы PLGA значительно повышало его цитотоксичность в отношении клеток глиом крысы C6 и F98. Цитотоксичность ненагруженных наночастиц PLGA (плацебо) была низкой.

Можно полагать, что усиление цитотоксического действия при включении этопозида в наночастицы объясняется повышением его внутриклеточной концентрации в результате эффективного захвата наночастиц PLGA клетками путем эндоцитоза [59, 77]. Интересно, что в условиях *in vivo* модификация поверхности наночастиц PLGA полоксамером 188 и PEG позволила существенно оптимизировать фармакокинетику этопозида за счет снижения их захвата макрофагами РЭС; однако в опытах *in vitro* такая модификация не приводит к снижению цитотоксичности этих наночастиц по сравнению с немодифицированными частицами, то есть, по-видимому, не влияет на захват наночастиц опухолевыми клетками.

Исследования наночастиц этопозида на основе PLGA не остались в стороне от актуальных тенденций фармацевтической нанотехнологии, таких как использование систем для одновременной доставки двух ЛВ (со-доставка) и носителей, конъюгированных с молекулами-векторами.

2.2. Векторизованные наночастицы PLGA

Куо и соавт. [78] синтезировали наносистему, снабженную двумя векторами, для доставки этопозида в мозг. Следует отметить, что этопозид ограниченно проникает в мозг, поскольку является субстратом АТФ-зависимых трансмембранных белков-транспортеров (в том числе Р-гликопротеина и белков множественной лекарственной устойчиво-

сти MRP1 и MRP3), которые препятствуют его проникновению через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [79]. Векторы — лактоферрин (молочный белок из семейства трансферринов) и фолат — обеспечивают рецептор-опосредованный эндоцитоз наночастиц эндотелиальными клетками, формирующими ГЭБ [80], и таким образом способствуют проникновению этопозида в мозг, минуя АТФ-зависимые транспортеры. Оба вектора, кроме того, способствуют проникновению наночастиц в клетки глиомы, гиперэкспрессирующие рецепторы к фолату и лактоферрину. Гибридные липид-полимерные наночастицы, состоящие из PLGA (85/15) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[карбокси-PEG-2000] (DSPE-PEG (2000)-COOH), получали эмульгированием в присутствии этопозида; эмульсию стабилизировали катионным ПАВ — дидодецилдиметиламмоний бромидом (DMAB). Размер наночастиц составлял ~180 нм, дзета-потенциал — ~70 мВ. Фолат и лактоферрин конъюгировали с наночастицами карбодиимидным методом. Двойная векторизация позволила в два раза увеличить коэффициент проницаемости наночастиц через монослой эндотелиальных клеток капилляров мозга человека HBMECs (*in vitro* модель ГЭБ) по сравнению с обычными PLGA-PEG наночастицами и повысила их цитотоксичность в отношении клеток глиомы U87MG (снижение жизнеспособности на 80%) вследствие более эффективного захвата наночастиц клетками.

Godse и соавт. [81] изучали действие наночастиц ETP-PLGA, модифицированных галактозилированным хитозаном, на клетки злокачественной опухоли сетчатки глаза (ретинобластомы) человека Y-79, которые экспрессируют рецепторы к сахарам, в том числе к маннозе и галактозе. После адсорбции галактозилированного хитозана размер наночастиц составлял 150–160 нм, дзета-потенциал — ~25 мВ, эффективность включения — ~70%. Модификация наночастиц позволила повысить их накопление в клетках Y-79 (до 70% против 40% для немодифицированных частиц), однако не привела к увеличению их цитотоксичности.

2.3. Наночастицы для доставки двух ЛВ (системы со-доставки)

Концепция систем со-доставки ЛВ основана на гипотезе о возможности повысить эффективность химиотерапии путем одновременной доставки в опухолевую клетку двух активных веществ с различными механизмами действия; при этом наибольшая эффективность будет достигаться в случае их синергетического действия [82].

Maleki и соавт. [50] разработали метод получения наночастиц из mPEG-PLGA 50/50, содержащих этопозид и паклитаксел (ETP-PTX-PLGA). Если основной механизм цитотоксического действия этопозида — это ингибирование топоизомер-

разы II, то паклитаксел стимулирует сборку микро-трубочек и ингибирует их динамическую реорганизацию, нарушая митотическую функцию клетки. Наночастицы, полученные наноосаждением в присутствии полисорбата 80, имели размер ~150 нм и отрицательный дзета-потенциал (–22 мВ); суммарное содержание ЛВ составляло ~8% в/в. Скорость высвобождения паклитаксела и этопозиды была примерно одинаковой (48 и 40% через 24 ч и 92 и 85% через 144 ч соответственно). Цитотоксичность наночастиц ЕТР-РТХ-PLGA в отношении клеток глиом человека (U87) и крысы (C6) *in vitro* лишь незначительно превышала показатели свободных ЛВ и их моноформ. В то же время *in vivo* эта комбинированная наноформа проявила значимый противоопухолевый эффект: средняя продолжительность жизни животных, получавших ЕТР-РТХ-PLGA, была выше, чем в группах, получавших комбинации свободных ЛВ и их наноформ (46, 69 и 76 дней соответственно). Более того 40% (2/5) животных, получавших внутривенно наночастицы ЕТР-РТХ-PLGA, прожили более 100 дней, тогда как животные, получавшие комбинации свободных ЛВ и их моноформ, прожили не более 65 дней [50].

В исследовании [51] наночастицы из PLGA 50/50, содержащие этопозид, а также комбинированные наночастицы, содержащие этопозид и паклитаксел, были получены методом эмульгирования под давлением в присутствии ПВС. Для повышения эффективности включения этопозиды в наночастицы PLGA авторы использовали его гидрофобное производное (4'-*O*-бензилоксикарбонил-этопозид, ЕТР-cbz), которое расщепляется под действием эстераз и таким образом является про-лекарством. Размер наночастиц, содержащих оба ЛВ, составлял 95 нм, дзета-потенциал – –26 мВ, суммарное содержание ЛВ – ~8% в/в. Цитотоксичность наночастиц оценивали на панели клеток опухолей мозга мыши и человека. Наиболее чувствительными оказались клетки опухолей мыши – нейробластомы Neuro 2A и глиомы GL261 (IC₅₀ 0.053 и 7.1 мкМ соответственно); для клеток GL261 был отмечен синергетический эффект этопозиды и паклитаксела (индекс синергизма 0.9).

Противоопухолевую активность наночастиц из mPEG-PLGA, нагруженных этопозидом и цисплатином (размер ~70–80 нм, дзета-потенциал ~–2 мВ), изучали на моделях немелкоклеточного рака легких человека H460 и метастазирующей карциномы легких мыши 344SQ в сочетании с лучевой терапией [14]. Торможение роста опухоли было наиболее выраженным у животных, получавших комбинированную наноформу. Одновременное введение этопозиды и цисплатина в свободном виде или в виде наночастиц, нагруженных одним из ЛВ, было менее эффективным.

Наноформа может также улучшить биодоступность этопозиды при пероральном введении. Возможной причиной низкой биодоступности может быть высокая экспрессия Р-гликопротеина в микроворсинках тонкого кишечника, которая препятствует абсорбции этопозиды из энтероцитов. Действительно, включение этопозиды в наночастицы PLGA совместно с ингибитором Р-гликопротеина кверцетином (EQNP) существенно улучшило фармакокинетические показатели этопозиды при пероральном введении мышам [83]. Наночастицы EQNP размером 280 нм (дзета-потенциал –22 мВ) содержали этопозид и кверцетин в соотношении 1 : 10 в/в. По сравнению с препаратом Этозид (этопозид в мягких желатиновых капсулах) эти наночастицы обеспечили четырехкратное увеличение интегрального показателя АUC и более чем в два раза повысили максимальную концентрацию этопозиды в плазме C_{max}. Наночастицы, нагруженные этопозидом без кверцетина, показали промежуточные значения.

Более сложную систему доставки для химиотерапии лекарственно-резистентного мелкоклеточного рака легких (МРЛ), сочетающую оба подхода, разработали Huang и соавт. [21]. В качестве противоопухолевых агентов использовали этопозид и малую интерферирующую РНК (siPIK3CA), которая селективно ингибирует экспрессию гена PIK3CA и таким образом блокирует пролиферацию клеток МРЛ. Ввиду лабильности siRNA, наночастицы из PLGA-PEG нагружали по отдельности siPIK3CA и этопозидом. Для нацеливания в клетки опухоли использовали два лиганда-вектора: антагонист G (A) – синтетический антагонист нейропептидов, который блокирует гастрин-высвобождающий пептид и таким образом ингибирует рост клеток МРЛ, и проникающий в клетку пептид ТАТ (T). Лиганды конъюгировали с PLGA-PEG карбодиимидным методом.

Ненагруженные наночастицы всех типов имели сферическую форму и размер ~170 нм (рис. 4) и положительный дзета-потенциал (24–35 мВ). Наночастицы с двумя векторами ЕТР-PLGA-A/T и siRNA-PLGA-A/T, полученные методом эмульгирования (м/в и в/м/в соответственно), имели размер ~200 нм и положительный дзета-потенциал 35–40 мВ.

Цитотоксичность этих наночастиц в отношении клеток МРЛ человека H69, экспрессирующих белок CD133 (маркер опухолевых клеток), была заметно выше по сравнению с наночастицами, модифицированными одним вектором, или свободными ЛВ (этопозидом и комплексом siRNA с полиэтиленгликолем). При совместном воздействии ЕТР-PLGA-A/T и siRNA-PLGA-A/T на клетки H69 (CD133+) наблюдался синергетический эффект (индекс синергизма <1).

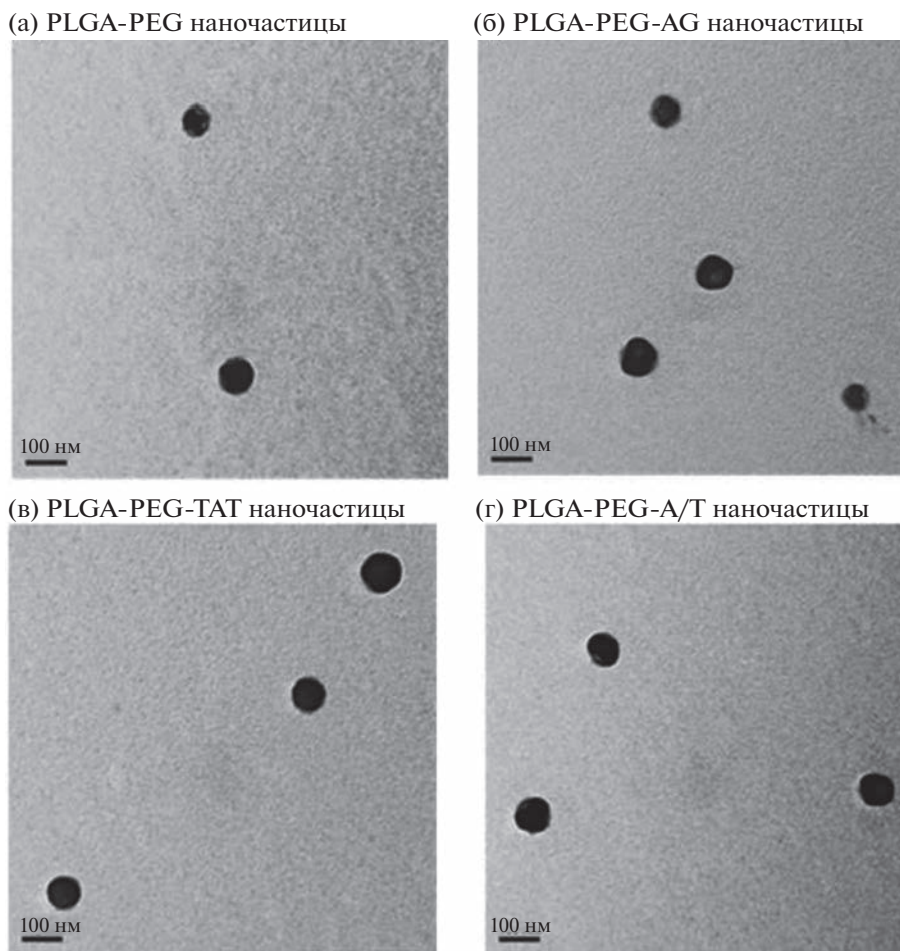


Рис. 4. Микрофотографии наночастиц: (а) PLGA-PEG, (б) PLGA-PEG-AG, (в) PLGA-PEG-TAT и (г) PLGA-PEG-A/T (просвечивающая электронная микроскопия, масштаб: 100 нм) (перепечатано из [21] с разрешения MDPI, Copyright © (2020) by the authors (CC BY 4.0 open access).

2.4. Наночастицы из поли-ε-капролактона

Поли-ε-капролактон (PCL) — синтетический алифатический полиэфир, который широко используют в медицине и биомедицинских исследованиях, в том числе для получения нано- и микро-размерных систем доставки [84]. По сравнению с полилактидами, PCL отличается более высокой гидрофобностью и значительно меньшей скоростью биodeградации [80]. В работе [38] наночастицы из PCL, нагруженные этопозидом (ETP-PCL), получали методом эмульгирования в присутствии полуксамера 188; размер частиц составлял ~250 нм, дзета-потенциал около –28 мВ. Как отмечалось выше, эффективность включения и скорость высвобождения этопозидов из наночастиц PLGA возрастает с увеличением гидрофобности полимерного носителя. Параметры более гидрофобных наночастиц из PCL логично дополняют последовательность ETP-PCL > ETP-PLGA (85/15) > ETP-PLGA (75/25) > ETP-PLGA (50/50), где эффективность включения снижается от 80 до 58%, а время

высвобождения 50% включенного этопозидов — от 25 до 5 ч [38]. Аналогичная тенденция наблюдалась и для нагруженных этопозидом микросфер из PCL, PLGA (75/25) и PLGA (50/50) [86].

Высокая гидрофобность наночастиц ETP-PCL оказала влияние и на их фармакокинетику у мышей: по сравнению с наночастицами ETP-PLGA (85/15) более гидрофобные наночастицы ETP-PCL быстрее выводились из кровотока ($AUC_{0-\infty}$, % ч: 34.57 и 25.68; Cl , мл/мин: 2.89 и 3.90 соответственно) [38]. Эта разница может объясняться более активной опсонизацией наночастиц ETP-PCL, опосредующей их быстрый захват макрофагами органов РЭС. Быстрому захвату наночастиц ETP-PCL макрофагами может способствовать и их больший по сравнению с ETP-PLGA (85/15) размер (257 нм и 105 нм соответственно). Интересно, что наночастицы ETP-PLGA (85/15) в большей степени накапливались в печени, а ETP-PCL — в селезенке. Оба типа наночастиц значительно продлили время циркуляции этопозидов.

Куо и соавт. [87] синтезировали сложную векторизованную систему для доставки этопозидов в мозг на основе PCL, используя стратегию, разработанную ими ранее для наночастиц на основе PLGA [42] и твердых липидов [43]. В качестве векторов в данном случае были выбраны лектин пшеницы (wheat germ agglutinin, WGA) и фолиевая кислота (F); оба вектора способствуют проникновению наночастиц в эндотелиальные клетки и клетки глиомы. Гибридные наночастицы, состоящие из амфифильных diblock-сополимеров PEG-PCL с молекулярной массой 9.5 кДа (MPEG₁₁₄-PCL₄₀) или 14.5 кДа (MPEG₁₁₄-PCL₈₄) и липидного компонента DSPE-PEG (2000)-COOH, получали эмульгированием в присутствии неионогенного ПАВ — поллоксамера 407 (Pluronic® F127). Наночастицы конъюгировали с векторами карбодиимидным методом с участием —COOH группы DSPE-PEG (2000)-COOH. Этопозид включали в наночастицы в процессе их формирования. Аналогично получали наночастицы, нагруженные доксорубицином и кармустином (BCNU). Размер наночастиц, модифицированных лектином и фолиевой кислотой (наночастицы WFNP) составлял 150–240 нм, дзета-потенциал был близок к нейтральному (~5 мВ). В соответствии с отмеченными выше корреляциями, в этом исследовании рост гидрофобности наночастиц (то есть увеличение молекулярной массы PCL) также сопровождался повышением эффективности включения этопозидов и снижением скорости его высвобождения. Сочетание двух векторов обеспечило наночастицам WFNP преимущество по цитотоксичности в отношении клеток глиобластомы человека U87MG и скорости проникновения через ГЭБ (модель *in vitro*, образованная совместной культурой клеток церебрального эндотелия, астроцитов и перicyтов человека) по сравнению с не векторизованными и моно-векторизованными наночастицами. Взаимодействие наночастиц с рецепторами было подтверждено иммунофлуоресцентным методом. Такие же корреляции наблюдались и для наночастиц, нагруженных доксорубицином и кармустином.

2.5. Другие полимеры

Среди наночастиц из других полимеров заслуживает упоминания векторизованная система на основе гибридных полимер-липидных наночастиц типа “ядро–оболочка” для доставки этопозидов в клетки гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 *in vitro* и *in vivo* [88]. Наночастицы из биodeградируемого полимера полибутилцитратоакрилата, нагруженные этопозидом (ETP-PBCA), получали эмульгированием в присутствии поливинилпирролидона, лецитина и холата натрия с последующим удалением растворителя. Оболочка наночастиц состояла из конъюгата бычьего сывороточного альбумина (BSA) с этилендиамином (E) и

гиалуроновой кислотой (HA). Гиалуроновая кислота выполняла роль вектора к рецептору CD44, экспрессируемому клетками HepG2 [89], а этилендиамин обеспечивал положительный заряд конъюгатов. Формирование системы происходило путем самосборки в результате электростатического взаимодействия между положительно заряженным конъюгатом BSA-E-HA (PI 7.3–9.0) и отрицательно заряженными полимерными наночастицами (дзета-потенциал ~–24 мВ); при этом система сохраняла отрицательный дзета-потенциал около –14 мВ; размер частиц составлял 123 нм. Полученные таким образом наночастицы, состоящие из ядра ETP-PBCA и оболочки из конъюгата BSA-E-HA, высвобождали этопозид *in vitro* в течение 10 ч. У мышей с подкожно имплантированной карциномой HepG2 такие наночастицы не только значительно пролонгировали время циркуляции этопозидов по сравнению с наночастицами без оболочки и свободным этопозидом (AUC_{0–∞} в плазме, ч мкг/мл: ~10.8; ~4.8; ~2.1 соответственно), но и повысили его концентрацию и время удерживания в опухоли. Наночастицы ETP-PBCA с оболочкой BSA-E-HA также проявили более высокую противоопухолевую активность по сравнению с другими группами, снизив темпы роста опухоли и повысив уровень апоптоза. Этот результат коррелировал с их более высокой цитотоксичностью в отношении клеток HepG2 *in vitro*.

3. НАНОЧАСТИЦЫ ИЗ БИОПОЛИМЕРОВ

3.1. Сывороточные альбумины

Среди природных полимеров, используемых для создания систем доставки ЛВ, важное место занимает человеческий сывороточный альбумин (HSA). Действительно, альбумин обладает многими свойствами идеального носителя: является универсальным переносчиком многих молекул, в том числе и ЛВ, нетоксичен и не иммуногенен, кроме того, обладает высокой сольбилизирующей способностью [90]. Этопозид хорошо связывается с белками плазмы: в крови присутствует всего около 4% несвязанного этопозидов, что является хорошей предпосылкой для получения его наносомальных форм на основе альбумина.

3.1.1. Наночастицы из альбумина, полученные без применения сшивающих агентов

Успешным примером применения наночастиц из “несшитого” альбумина в качестве носителя труднорастворимого ЛВ является препарат Абраксан® (Celgene), представляющий собой наночастицы паклитаксела и альбумина, которые получают методом эмульгирования под давлением без применения сшивающих агентов (nab®-технология, от *англ.* nanoparticle albumin bound). Этот процесс позволяет получить устойчивую наносус-

пензию с размером частиц ~130 нм, однако при разбавлении агрегаты быстро диссоциируют до частиц размером ~10 нм (размер молекулы HSA). Тем не менее роль альбумина в этом случае не ограничивается поддержанием коллоидной стабильности системы; несмотря на быструю диссоциацию pab®-наночастиц, он также играет роль вектора, способствуя кавеолин-зависимому трансцитозу ЛВ через эндотелий в периваскулярное пространство путем взаимодействия с рецептором gp60 (альбондин) на поверхности эндотелиальных клеток. Кроме того, данные о преимущественном, по сравнению со свободным паклитакселом, накоплении pab®-паклитаксела в опухолях предполагают, что в перитуморальном пространстве альбумин может связываться с гликопротеиновым рецептором SPARC (secreted protein acid and rich in cysteine), гиперэкспрессия которого наблюдается в экстрацеллюлярном матриксе многих опухолей.

Сведений о доставке этопозиды в опухоль в составе “pab-наночастиц” в литературе не имеется, однако принцип pab-технологии применяли в ряде исследований для получения наноагрегатов этопозиды и сывороточных альбуминов - человеческого (HSA) или бычьего (BSA).

Wang и соавт. [41] использовали принцип pab-технологии для получения наноагрегатов этопозиды и BSA. Для получения наночастиц раствор этопозиды в смеси хлороформ-этанол гомогенизировали под давлением с водным раствором BSA; органический растворитель удаляли под вакуумом. Размер частиц, дзета-потенциал, эффективность включения этопозиды и его содержание в лиофилизате составляли 182.3 нм, 22.18 мВ, 86.44 и 8.49% соответственно. Сравнение профилей биораспределения свободного этопозиды и наноформы ETP-BSA при внутривенном введении показали, что наноформа увеличивает поступление этопозиды в селезенку и легкие ($AUC_{\text{нано}}/AUC_{\text{ETP}}$ 4.61 и 2.92 соответственно), в то время как его поступление в сердце и почки снижается. Примечательным также было снижение миелосупрессии в группе, получавшей ETP-BSA: уровни лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов были ближе к контрольным значениям по сравнению со свободным этопозидом.

Плазменные альбумины HSA и BSA во многом схожи, однако в случае HSA применение pab-технологии привело лишь к солюбилизации этопозиды; наноагрегаты при этом не образовывались [51]. Методами спектроскопии и молекулярного докинга установлено, что комплекс этопозиды с HSA образуется в результате его связывания с субдоменом HSA III (IB) [91]. В то же время известно, что конформации BSA и HSA в водных растворах различны (BSA имеет более жесткую конформацию), что может отражаться на способности субдоменов IB и IIIA этих белков

связываться с гидрофобными молекулами [92]. Действительно, использование про-лекарства этопозиды (4'-O-бензилоксикарбонил-этопозид, ETP-cbz, см. выше), отличающегося более высокой гидрофобностью (растворимость ETP-cbz и этопозиды в воде 0.003 и 0.2 мг/мл соответственно), позволило получить не только наноагрегаты ETP-cbz-HSA, но и комбинированную наноформу, содержащую ETP-cbz и паклитаксел (ETP-cbz-PTX-HSA) в соотношении 1 : 1 (в/в). Полученные наносuspensions лиофилизировали без добавления криопротекторов. Размер всех наночастиц составлял 100–150 нм, дзета-потенциал –22 мВ. Суммарное содержание ЛВ в суспензии комбинированных наночастиц составляло 2 мг/мл. Цитотоксичность наноформ изучали на панели клеток глиомы мыши и человека. Значения IC_{50} однокомпонентных наноформ ETP-cbz-HSA и PTX-HSA и свободных ЛВ совпадали. Для системы со-доставки ETP-cbz-PTX-HSA показан синергетический эффект ЛВ на клетках глиомы GL261 и нейробластомы Neuro2A (индексы синергизма SI 0.9 и 0.56 соответственно). Цитотоксичность однокомпонентных и комбинированных наноформ ETP-cbz и паклитаксела на основе HSA и PLGA (см. выше) в этом исследовании была примерно одинаковой. Этот феномен интересен с точки зрения выявления параметров, влияющих на поведение наночастиц в биологических средах. Действительно, несмотря на схожесть таких важных параметров, как размер и дзета-потенциал (размер всех частиц 95–150 нм, дзета-потенциал – от –22 до –27 мВ), наноформы на основе HSA и PLGA при разбавлении в модельных средах ведут себя по-разному: первая сразу высвобождает все количество ЛВ, а вторая удерживает 95–85% в течение первых двух часов и не менее 50% ЛВ в течение 30 ч. Таким образом, хотя, как известно, при введении в организм разница в скорости высвобождения ЛВ из наночастиц существенно влияет на фармакокинетику и профиль биораспределения наноформ [62, 93], в условиях эксперимента по определению цитотоксичности значимого различия между наноформами на основе HSA и PLGA не обнаружено: оба типа наночастиц в равной степени обеспечили поступление этопозиды в клетки и воздействие на внутриклеточные мишени.

3.1.2. Наночастицы из альбумина, полученные с помощью сшивающих агентов

Нагруженные этопозидом наночастицы на основе HSA (ETP-HSA) получают также путем десольватации (коацервации) белка с последующей сшивкой бифункциональными агентами. На характеристики получаемых частиц влияют такие параметры, как pH среды, концентрация HSA и степень его сшивки. При разработке систем до-

ставки этопозид на основе “сшитых” наночастиц HSA использовали те же подходы, что и для наночастиц на основе синтетических полимеров, то есть векторизацию наночастиц и разработку систем, содержащих два ЛВ, для со-доставки.

Интересная система со-доставки этопозид на основе изохинолинового алкалоида берберина на основе нанокристаллов этопозид и “сшитых” наночастиц HSA описана в работе [94]. Роль берберина, ингибитора топоизомераз I и II и протеинкиназы C и индуктора активных форм кислорода, заключалась в усилении цитотоксического действия этопозид. Гибридную систему BER/ETP-HSA (“2 в 1”) получали путем включения нанокристаллов этопозид в альбуминовую наночастицу, сформированную путем десольватации (коацервации) альбумина этанолом в присутствии берберина. Для повышения стабильности наночастиц альбумин “сшивали” бифункциональным агентом — генипином или глутаровым альдегидом (в том числе, в присутствии нитрата цинка). Для направленной доставки в опухоль альбумин конъюгировали с двумя векторами-лигандами к рецепторам на поверхности опухолевых клеток — аминоксифенил-бороновой кислотой (лектиномиметик, APBA) и маннозой (Mann) — для связывания с сиаловой кислотой и D-манноза-связывающим лектином соответственно. Размеры векторизованных (APBA—Mann—ETP-HSA) и не векторизованных (BER/ETP-HSA) наночастиц составили 173 и 216 нм соответственно, содержание этопозид в обоих случаях — около 14% в/в. Скорость высвобождения этопозид из наночастиц зависела от типа сшивающего агента. В случае наночастиц с двумя векторами, сшитых глутаровым альдегидом, 20 и 50% этопозид высвобождалось за 10 и 70 ч соответственно; берберин высвобождался быстрее. Противоопухолевую активность наночастиц изучали на модели карциномы легких мышей, индуцированной внутрибрюшинным введением уретана. Преимущество векторизованных наночастиц по сравнению со свободными ЛВ выражалось в значительном снижении числа и размеров очагов в легких, а также в изменении уровня экспрессии маркеров ангиогенеза (VEGF↓), пролиферации (Ki67↓) и апоптоза (caspase-3↑), свидетельствующих о торможении роста опухоли. Противоопухолевый эффект был выше в случае наночастиц APBA—Mann—ETP-HSA, конъюгированных с двумя векторами. Наблюдалась также тенденция к росту цитотоксичности в отношении клеток аденокарциномы легких человека A549 в ряду APBA—Mann—ETP-HSA > Mann-BER/ETP-HSA > APBA-BER/ETP-HSA > BER/ETP-HSA (через 24 ч инкубации снижение IC₅₀ по сравнению с этопозидом в 3.6, 3.0, 2.34 и 1.38 раза соответственно).

3.2. Другие биополимеры

Особый интерес представляют технологии создания векторизованных стимул-чувствительных наночастиц, высвобождающих ЛВ только при воздействии определенного внешнего фактора (стимула). Такая технология позволяет значительно повысить селективность действия системы доставки. Факторами, влияющими на скорость высвобождения ЛВ, могут быть присутствие во внешней среде восстановителя или изменение pH. Так, pH-чувствительные наночастицы сохраняют целостность и хорошо удерживают ЛВ в кровотоке (pH 7.4), но разрыхляются, попав в микроокружение опухоли, для которого характерен ацидоз, и/или в лизосомы (клеточные органеллы с кислой внутренней средой, pH 4.4–5.5).

Сложную гибридную pH/редокс-чувствительную наносистему для со-доставки siRNA-EZH2 и этопозид в немелкоклеточную карциному легких A549 синтезировали Yuan и соавт. [20]. Полимер-носитель получали взаимодействием окисленного периодата хитозана с полиэтиленгликолем; затем к полученному графт-сополимеру (CP) через дисульфидный мостик присоединяли липовую кислоту и активированные производные PEG и циклического RGD-пептида (cRGDyC-PEG). В такой системе хитозан-полиимин (CP) служил основой и обеспечивал положительный заряд для электростатического связывания siRNA. Липовая кислота выполняла функцию гидрофобного и редокс-чувствительного блока; конъюгированный через спейсер RGD-пептид (cRGDyC-PEG) служил вектором и пролонгировал время циркуляции наночастиц. Наночастицы cPCPL/ETP получали методом упаривания растворителя, прибавляя раствор этопозид в дихлорметане к водному раствору полимера-носителя; затем растворитель удаляли и добавляли siRNA. Полученные таким образом наночастицы cPCPL/siRNA/ETP имели размер 111 нм, узкое распределение по размерам и дзета-потенциал ~7 мВ. В присутствии восстановителя дисульфидных связей глутатиона (GSH) или при понижении pH структура редокс-чувствительных наночастиц разрыхлялась, что приводило к ускоренному высвобождению ЛВ (рис. 5).

Система со-доставки эффективно ингибировала рост и метастазирование ортотопической (то есть локализованной в легких) карциномы легких A549. siRNA вызывала снижение экспрессии EZH2, которое, в свою очередь, не только приводило к снижению миграционной активности и инвазивности опухолевых клеток, но и усиливало цитотоксический эффект этопозид путем регуляции клеточного цикла. Вектор cRGDyC заметно усиливал противоопухолевый эффект (рис. 6).

Известны также примеры получения нагруженных этопозидом наночастиц с использованием дру-

гих биополимеров, в том числе, лактоферрина [95] и поли-3-гидроксibuтирата [96], полимера бактериального происхождения из ряда полигидроксиканоатов.

4. СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИЦЕЛЛ

Полимерные мицеллы представляют собой самоорганизующиеся в водной среде структуры типа ядро-оболочка из амфифильных полимеров. Ядро мицеллы, образованное гидрофобными блоками полимера, служит наноконтейнером для липофильных соединений, а оболочка из гидрофильных блоков (корона) стабилизирует границу раздела фаз между гидрофобным ядром и окружающей водной средой и обеспечивает защиту мицеллы от опсонизации в кровотоке, повышая вероятность достижения мишени (опухоли) в результате эффекта EPR. Свойства мицелл можно регулировать, выбирая полимер с подходящим гидрофильно-гидрофобным балансом, молекулярно-массовыми характеристиками, солюбилизирующими и связывающими свойствами. Как показывают многочисленные экспериментальные и теоретические исследования, солюбилизация соединения тем эффективнее, чем ближе соответствие между его полярностью и гидрофобностью ядра мицеллы. Как и в случае наночастиц, основными параметрами, определяющими эффективность мицелл как систем доставки, являются содержание ЛВ, скорость его высвобождения, размер мицелл и особенно их стабильность. Эти параметры напрямую связаны с фармакокинетикой и профилем биораспределения включенного в мицеллы ЛВ. Примером успешного практического применения этой технологии является препарат Genexol®-PM (Samyang Co., Сеул, Корея) — мицеллярная форма паклитаксела на основе низкомолекулярного сополимера mPEG-PLA (размер мицелл 24 нм, дзета-потенциал -8.1 мВ). Современное состояние исследований в области систем доставки на основе мицелл представлено в обзорах [44, 97, 98].

4.1. Мицеллы из синтетических полимеров

Для получения мицеллярных форм этопозид (как и в случае других гидрофобных ЛВ) используют амфифильные блок-сополимеры с разнообразными гидрофобными блоками, однако гидрофильным блоком в большинстве случаев является PEG или его метиловый эфир (mPEG): например, PCL-mPEG (PCL-PEG) и PLA-PEG [99–103], D- α -токоферил полиэтиленгликоль сукцинат (TPGS) [104, 105] или конъюгаты PEG с жирными кислотами (C_{14} – C_{22}) [106]. Описаны также мицеллы для со-доставки этопозид в комбинации с другими ЛВ на основе триблок-сополимера поли-

пропиленгликоля и PEG (полоксамер P84, PEG₁₉PPG₄₃PEG₁₉) [107], блок-сополимера поли- γ -бензил-L-глутамата и PEG [108], а также триблок-сополимеров поли-2-алкил-2-оксазолинов, не содержащих PEG [109, 110].

Мицеллы получают методом диализа или методом упаривания растворителя (его иногда называют “методом получения пленки”). В зависимости от природы полимера его растворяют вместе с этопозидом в органическом растворителе или в воде. При использовании метода диализа этопозид растворяют в высококипящих растворителях, смешивающихся с водой (например, ДМСО или ДМФА). Формирование мицелл и загрузка в них этопозид происходит при смешивании органического и водного растворов и длительном перемешивании при комнатной температуре. После формирования мицелл органический растворитель удаляют диализом. Напротив, для получения пленки этопозид растворяют в легколетучих растворителях, таких как ацетон, ацетонитрил или абсолютный этанол. Органический растворитель удаляют в вакууме на ротационном испарителе; образующуюся пленку восстанавливают водой, полученный мицеллярный раствор гомогенизируют с помощью ультразвука и лиофилизируют. Для изучения профиля высвобождения этопозид из мицелл используют метод диализа.

Как отмечено выше, свойства мицелл зависят от полимера-носителя. Так, в работе [100] сравнивали способность мицелл из сополимеров mPEG-*b*-PCL разного состава солюбилизовать гидрофобные ЛВ, в том числе этопозид, паклитаксел, плюмбагин, куркумин и индометацин. Мицеллы получали методом упаривания растворителя с последующей гидратацией образовавшейся пленки. Солюбилизирующая способность мицелл зависела от соотношения молекулярных масс гидрофобных и гидрофильных блоков (в целом, увеличение массы гидрофобного блока приводило к росту растворимости), при этом для каждого из сополимеров количества инкапсулированных ЛВ возрастали в следующем порядке: этопозид, паклитаксел, плюмбагин, куркумин и индометацин. Интересно, что эффективность солюбилизации этих веществ была весьма разной: при использовании мицелл из mPEG₁₁₄-*b*-PCL₁₉ растворимость этопозид возросла в 2.62 раза, паклитаксела — в 1068 раз, а куркумина — в 130100 раз. Эти результаты хорошо совпадали с расчетными значениями совместимости ЛВ с гидрофобным ядром мицеллы. Таким образом, в данном исследовании совместимость этопозид с PCL и, соответственно, эффективность его солюбилизации оказались невысокими.

Как известно, важной проблемой, связанной с применением мицелл как носителей ЛВ, может быть их недостаточная стабильность. Мицеллы ста-

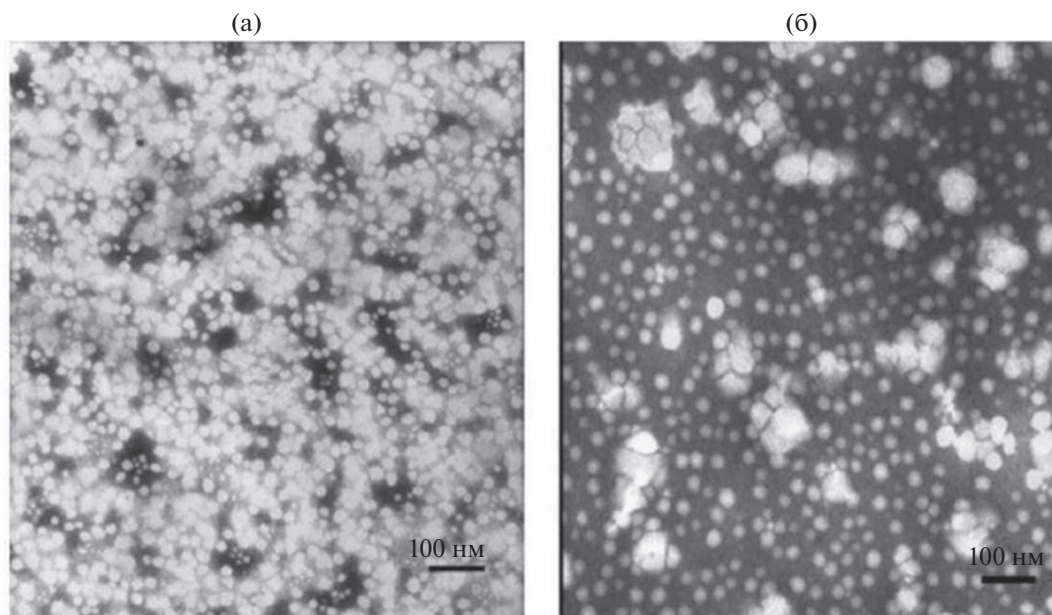


Рис. 7. Морфология нагруженных этопозидом мицелл ETP-mPEG-PLA (а) и ETP-mPEG-PCL (б) (просвечивающая электронная микроскопия, масштаб 100 нм) (перепечатано из [101] с разрешения Elsevier, Copyright© 2015).

бильны только при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), а при концентрациях ниже ККМ они распадаются. Между тем, при введении в кровоток мицеллы подвергаются весьма значительному разбавлению и попадают в среду, содержащую природные солюбилизаторы — белки, что может приводить к их разрушению и несвоевременному высвобождению ЛВ. Удачное решение этой проблемы предложили Kataoka и соавт., синтезировавшие мицеллы из полимера, гидрофобные фрагменты которого в процессе мицеллообразования вступали в реакцию полимеризации, образуя стабильное ядро [111]. Wang и соавт. [112] использовали ту же идеологию для мицеллярной формы этопозид, но предложили альтернативный путь: они получили мицеллы из сополимера PEG и PCL звездообразной структуры (star-PEG-PCL₁₆), синтезированного путем использования дендримера РАМАН-ОН с 16 ветвлениями в качестве инициатора полимеризации. В этом случае вначале методом диализа получали мицеллы star-PEG-PCL₁₆, а потом нагружали их этопозидом, доксорубицином и индометацином. Солюбилизация этопозид оказалась наиболее эффективной (его содержание достигало 22% в/в), видимо, в силу его более высокой гидрофобности. По цитотоксичности мицеллярная форма не уступала свободному этопозиду. Недостатком мицелл star-PEG-PCL₁₆ была склонность к агрегации: по-видимому, 16 ветвлений дендримера оказалось недостаточно для создания плотной гидрофильной оболочки и мономолекулярные мицеллы в водной среде образывы-

вали ассоциаты размером >70 нм. Действительно, мицеллы, полученные с использованием дендримера с 32 ветвлениями (star-PEG-PCL₃₂), были более стабильны и высвобождали 60% этопозид в течение 24 ч; однако содержание этопозид в них было ниже, чем в мицеллах star-PEG-PCL₁₆ — всего 7.8% в/в, что может быть связано с более плотной упаковкой ядра в этих мицеллах [113]. Аналогичные мицеллы, синтезированные на основе PLA (star-PEG-PLA₃₂), содержали 4.3% в/в этопозид. Более низкое содержание в этом случае объяснялось меньшей гидрофобностью ядра из PLA по сравнению с PCL.

Влияние полимера-носителя прослеживается и в работе Chen и соавт. [101]. Нагруженные этопозидом мицеллы ETP-mPEG-PLA и ETP-mPEG-PCL получали методом упаривания растворителя. Физико-химические свойства мицелл были схожи, хотя мицеллы ETP-mPEG-PCL были несколько крупнее и эффективнее включали этопозид (ETP-mPEG-PLA: 15–20 нм и 85%, ETP-mPEG-PCL: 45–50 нм и 98%) (рис. 7).

Схожими были и профили высвобождения этопозид (70–80% за 5 ч). В опыте *in vitro* мицеллы ETP-mPEG-PLA лучше захватывались клетками карциномы легких человека H460 и проявили более высокую цитотоксичность (значения IC₅₀ 2.81 и 7.46 мкг/мл соответственно); при этом обе мицеллярные формы были менее активны, чем свободный этопозид (IC₅₀ 1.67 мкг/мл). Однако в опыте *in vivo* свободный этопозид и мицеллярная форма ETP-mPEG-PLA в равной степени тормозили рост опухоли H460 у мышей (форма ETP-

mPEG-PCL была гораздо менее активной), при этом форма ЕТР-mPEG-PLA проявляла значительно меньшую токсичность, чем свободный этопозид. Обе мицеллярные формы в 4–6 раз повысили интегральный показатель AUC и значительно снизили клиренс этопозидов по сравнению со свободным ЛВ.

4.2. Векторизованные мицеллы из синтетических полимеров

В ряду мицелл на основе PCL следует отметить две векторизованные системы доставки этопозидов. Мицеллы, полученные из смеси $\text{HOOC-PEG-}b\text{-PCL}$ и $\text{CH}_3\text{O-PEG-}b\text{-PCL}$, конъюгировали с пентапептидом Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV) [114]. Связываясь с рецептором $\alpha 4\beta 1$ интегрина, EILDV способствует интернализации мицелл в клетки метастатических опухолей, которым свойственна гиперэкспрессия этого рецептора. Размер мицелл, полученных методом упаривания растворителя, увеличивался с ростом молекулярной массы полимера от 46 до 80 нм для 5.5 или 12 кДа соответственно; заряд составлял ~ -9 мВ, содержание этопозидов — 3.4–3.8% в/в. По сравнению с мицеллами без вектора или свободным этопозидом, векторизованные мицеллы эффективнее ингибировали метастазирование меланомы B16F10 в легкие мышей. Такая же тенденция наблюдалась в клеточных экспериментах: векторизованные мицеллы активнее подавляли миграционную активность клеток B16F10 и их способность к адгезии.

Аналогичные результаты были получены для нагруженных этопозидом мицелл из PEG-PCL, конъюгированных с пептидом YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) — фрагментом ламинина, опосредующим его связывание с высокоафинным рецептором 67 LR на поверхности опухолевых клеток [102]. Гликопротеин ламинин — компонент экстраклеточного матрикса, участвующий в процессах роста, ангиогенеза и метастазирования опухолей. В экспериментах *in vitro* мицеллярный этопозид медленнее проникал в клетки B16F10, и его цитотоксический эффект достиг максимума лишь через 72 ч инкубации, тогда как свободный этопозид активно подавлял пролиферацию клеток уже через 24 ч. Авторы связывают этот феномен с медленным высвобождением этопозидов из мицелл (16% за 24 ч инкубации). Однако *in vivo* векторизованные мицеллы активнее подавляли рост опухолей B16F10 в легких мышей по сравнению с мицеллами без вектора и свободным этопозидом.

О преимуществе векторизованных мицеллярных форм этопозидов свидетельствуют и результаты исследований мицелл из TPGS, конъюгированного с глициретиновой кислотой (ЕТР-TPGS-GA) [100] или лактобионовой кислотой (ЕТР-TPGS-LA) [104]. Хотя TPGS, представляющий собой сложный эфир сукцината D- α -токо-

фериловой кислоты и PEG 1000, является скорее олигомером, мицеллярные формы на его основе заслуживают упоминания благодаря их высокой активности в отношении экспериментальной гепатоцеллюлярной карциномы (НСС, фатальный рак печени человека) HepG2, перевитой мышам. Выбор этих векторов обусловлен наличием соответствующих рецепторов на гепатоцитах и клетках HepG2. Мицеллы, полученные методом упаривания растворителя, имели разные размеры и дзета-потенциалы (ЕТР-TPGS-GA: 70–90 нм, -16 мВ, ЕТР-TPGS-LA: 140 нм, $+14$ мВ). Мицеллы ЕТР-TPGS-LA высвобождали $\sim 25\%$ этопозидов в течение 120 ч, ЕТР-TPGS-GA — 30% за 24 ч. Несмотря на различные параметры, оба типа мицелл накапливались преимущественно в печени и ингибировали рост НСС значительно более эффективно, чем свободный этопозид или мицеллы без вектора. Интересно, что в обоих исследованиях было отмечено снижение экспрессии Р-гликопротеина в опухолях. Этот феномен, по-видимому, обусловлен ингибированием активности этого транспортера под действием TPGS [115].

4.3. Мицеллы из синтетических полимеров для со-доставки двух ЛВ

Амфифильный триблок-сополимер поли-2-метил-2-оксазолина и поли-2-бутил-2-оксазолина (POX , $\text{P}(\text{MeO}_x\text{-}b\text{-BuO}_x\text{-}b\text{-MeO}_x)$) — редкий пример неПЕГирированного мицеллообразующего полимера. Использование этого сополимера позволило не только получить бинарные мицеллы с высоким содержанием этопозидов в комбинации с цисплатином или паклитакселом, но и установить влияние этих ЛВ на форму мицелл — еще один важный параметр, влияющий на поведение наноносителей в организме. Мицеллы, нагруженные этопозидом (ЕТР POX) и его комбинациями с паклитакселом (ЕТР/РТХ POX) [52] и цисплатином (ЕТР/С6СР POX) [110], получали методом пленки. Учитывая гидрофильный характер цисплатина, для загрузки в мицеллы использовали его гидрофобное про-лекарство (бис-гексаноат цисплатина, C_6CP). В мицеллах ЕТР POX его содержание было весьма высоким и составляло 43% в/в; в бинарных мицеллах (ЕТР/С6СР POX) общее содержание ЛВ достигало 52% в/в. Мицеллы ЕТР/С6СР POX сохраняли устойчивость в водной среде в течение 2 недель, их размер составлял 75–100 нм в зависимости от нагрузки. Интересно, что по мере увеличения нагрузки этопозидов мицеллы ЕТР POX и ЕТР/С6СР POX вытягивались и приобретали продолговатую (червеобразную) форму. Бинарные мицеллы ЕТР/РТХ POX , напротив, стремились сохранять сферическую форму даже при значительных нагрузках этопозидов.

Изучение этого феномена методом молекулярного моделирования показало, что, хотя и

этопозид, и паклитаксел имеют гидрофобный характер, в ядре мицеллы они распределяются по-разному: если молекулы этопозиды в основном локализованы в центре ядра, то молекулы паклитаксела тяготеют к периферическим зонам мицеллы [52]. Такой характер распределения может указывать на снижение поверхностной энергии мицелл в присутствии паклитаксела, что предполагает повышение их устойчивости. Это предположение подтверждает и снижение ККМ полиоксазолиновых мицелл в присутствии паклитаксела. Этопозид также снижает ККМ, но в значительно меньшей степени. Авторы полагают, что механизм стабилизирующего действия паклитаксела не ограничивается его гидрофобным взаимодействием с полимером, роль играют и другие факторы, такие как водородные связи и диполь-дипольные взаимодействия. Как отмечено выше, форма мицелл (как и других полимерных наноносителей) оказывает значительное, хотя и часто неоднозначное влияние на их фармакокинетические параметры и накопление в опухоли [116]. Так, например, известно, что по сравнению со сферическими мицеллами червеобразные мицеллы дольше циркулируют в крови. Вероятно, зная характер взаимодействия ЛВ с полимером, можно контролировать форму мицелл и в некоторой степени и их биораспределение. Так, в данном случае форму бинарных мицелл с этопозидом определял выбор “партнера” — паклитаксела или цисплатина.

Мицеллы РОХ, нагруженные этопозидом в сочетании с цисплатином (алкилатор) [110] или палбоциклибом (ингибитор циклин-зависимой киназы 4/6, CDK4/6) [109], эффективно доставляли эти ЛВ в опухоли и проявляли синергетический противоопухолевый эффект. Синергизм этопозиды с цисплатином и палбоциклибом обусловлен тем, что в первом случае он, ингибируя ДНК-топоизомеразу II, предотвращает репарацию повреждений ДНК, вызванную цисплатином, а во втором — убивает опухолевые клетки, которые находятся в S-фазе и не чувствительны к ингибированию циклин-зависимой киназы CDK4/6.

Оба типа полиоксазолиновых мицелл — и ЕТР/С6СР РОХ, и ЕТР РОХ — обеспечили эффективную доставку этопозиды в опухоль (мелкоклеточную карциному легких человека H69AR, перевитую иммунодефицитным мышам), причем в случае бинарных мицелл доставка этопозиды была более эффективной: соотношения $AUC_{\text{опухоль}}/AUC_{\text{плазма}}$ составляли 3.34 и 2.58 соответственно [110]. Данные биораспределения коррелировали с противоопухолевым эффектом: в группе, получавшей мицеллы ЕТР/С6СР РОХ, средняя продолжительность жизни увеличилась на 50% по сравнению с контролем (45 и 69 дней соответственно), при этом 2/3 животных прожили >90 дней. В группе ЕТР РОХ эффективность была несколько ниже. Противоопухолевый эф-

фект, в свою очередь, коррелировал с данными эксперимента *in vitro*: мицеллы ЕТР/С6СР РОХ показали высокую цитотоксичность и синергетический эффект в отношении клеток H69AR и 344SQ/Luc (немелкоклеточная аденокарцинома легких мышей). Мицеллярная форма ЕТР/С6СР РМ оказалась также значительно менее токсичной, чем свободные этопозид и цисплатин: максимально переносимые дозы ЛВ в составе мицеллярной формы превышали дозы свободных ЛВ приблизительно в 7 раз. Аналогичные результаты получены для бинарных мицелл РОХ, нагруженных этопозидом и палбоциклибом. Мицеллы способствовали доставке этих ЛВ в мозг и значительно повысили продолжительность жизни мышей с интракраниальной медуллобластомой [109].

4.4. Стимул-чувствительные мицеллы из синтетических полимеров

Высвобождение ЛВ из мицелл обычно происходит при разбавлении коллоидной системы (например, сразу после введения мицелл в кровоток, что не всегда желательно). Однако возможно получение и стимул-чувствительных мицелл, устойчивость которых зависит от внешних факторов. Как и в случае наночастиц, одним из таких факторов является изменение pH внешней среды. Получить такие мицеллы можно, включив в состав образующего их сополимера pH-чувствительный блок.

Vai и соавт. [22] синтезировали нагруженные этопозидом многофункциональные мицеллы на основе PEG-*b*-поли- γ -бензил-L-глутамата (PEG-*b*-PBLG). Благодаря содержанию дисульфидных и боратных сложноэфирных связей, мицеллы были чувствительны как к изменениям pH, так и к присутствию восстановителя глутатиона, повышенный уровень которого в опухолях связывают с их прогрессированием [117]. Кроме того, мицеллы содержали в качестве флуоресцентной метки тетрафенилэтилен (ТРЕ, хромофор, для которого свойственна агрегационно-индуцированная эмиссия) и конъюгированный пептид октреотид (ОСТ) — в качестве вектора к опухолевым клеткам с гиперэкспрессией рецепторов соматостатина. Для конъюгации хромофора ТРЕ с сополимером PEG-*b*-PBLG использовали дисульфидное производное ТРЕ-SS-NH₂; затем проводили дальнейшую модификацию полимера 3-аминобензилбороновой кислотой в присутствии дигидроксифенетиламина. Мицеллы получали методом диализа. В процессе формирования мицелл происходила сшивка ядра в результате образования сложноэфирных боратных связей. Стабилизированные таким образом мицеллы (CCLMs, core-cross-linked micelles) были устойчивы в нейтральной среде без глутатиона (рис. 8). Повышение кислотности среды (pH 5) и присутствие глу-

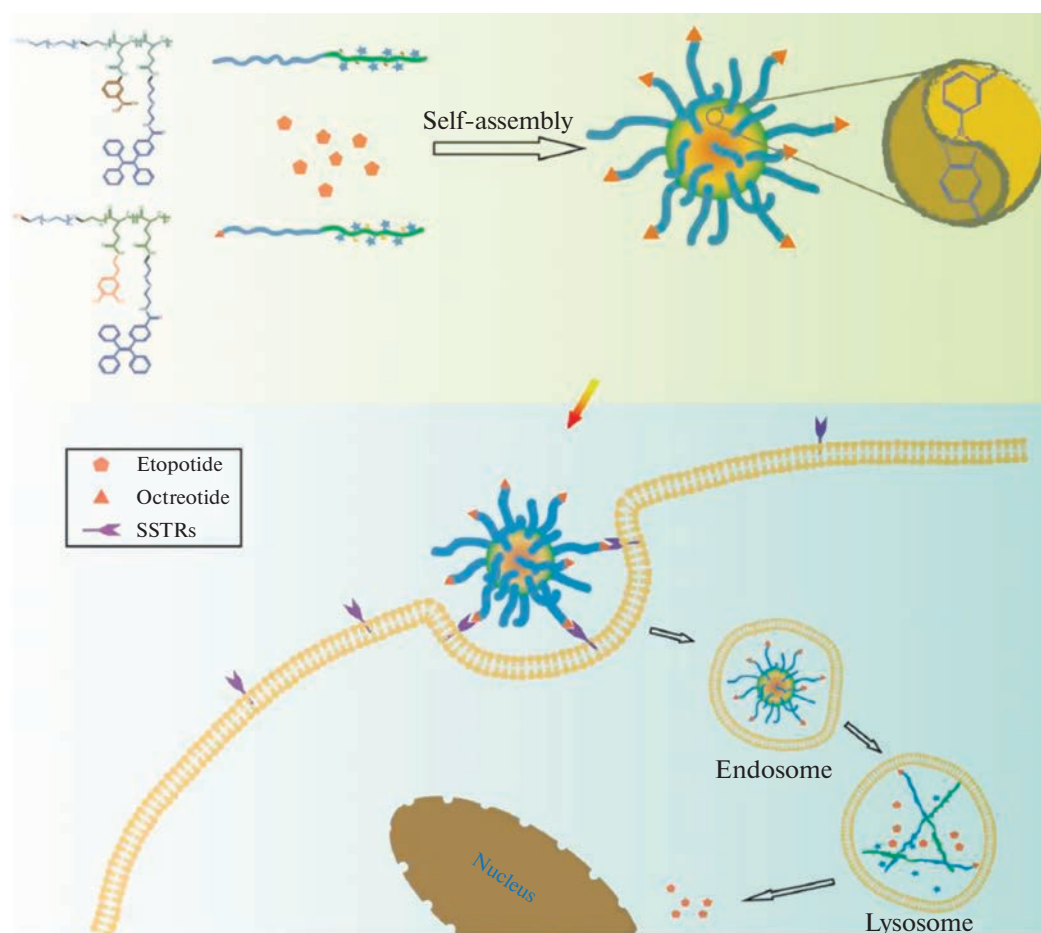


Рис. 8. Схема, иллюстрирующая эндоцитоз стабилизированных мицелл CCLMs, нагруженных этопозидом, в клетки, экспрессирующие рецептор к соматостатину (SSTR), и высвобождение этопозида в ответ на изменение условий окружающей среды (кислая среда в лизосомах, присутствие глутатиона) (перепечатано из [22] с разрешения American Chemical Society, Copyright© 2019).

глатиона приводило к их дестабилизации и повышению скорости высвобождения этопозида.

Для оценки эффективности доставки этопозида в опухоль и противоопухолевой активности использовали перевитую мышам нейроэндокринную опухоль Wn-1, экспрессирующую рецепторы к соматостатину. По сравнению со свободным этопозидом, мицеллярная форма значительно повысила его накопление в опухоли и замедлила ее рост (через 20 дней объемы опухолей составляли 480 и 374 мм³ соответственно).

Jo и соавт. [118] использовали для получения pH-чувствительных мицелл сополимер mPEG-PCL с цитраконовым ангидридом (mPEG-pH-PCL), содержащий сложноэфирные связи, которые гидролизуются при кислых значениях pH, и нагрузили их ЛВ с разными механизмами противоопухолевого действия — этопозидом (ETP, ингибитор топоизомеразы II), паклитаксолом (PTX, стабилизатор микротрубочек) и рапамицином (RAPA, ингибитор протеинкиназы mTOR) (рис. 9). Мицеллы

PTX/ETP/RAPA, полученные методом гидратирования пленки, имели размер 35 нм (рис. 10) и дзета-потенциал -22 мВ и содержали ЛВ в соотношении 2 : 2 : 1 (2.49, 2.59, и 1.38%) соответственно. Оценка цитотоксичности свободных ЛВ в отношении модифицированных клеток аденокарциномы желудка человека AGS-Luc2 выявила их синергетическое действие. Однако цитотоксичность мицелл была ниже по сравнению со свободными ЛВ, что, как полагают авторы, объясняется медленным высвобождением ЛВ из мицелл (50, 52 и 59% за 48 ч для PTX, ETP и RAPA соответственно).

При изучении фармакокинетики у мышей интегральный показатель в плазме для мицелл PTX/ETP/RAPA был в 1.6–3.0 раза выше, чем для свободных ЛВ. Отмечено также снижение накопления в печени паклитаксела при введении его в составе мицелл. Однако дизайн эксперимента (отсутствовали мицеллы без pH-чувствительного фрагмента в качестве контрольной группы) не позволил

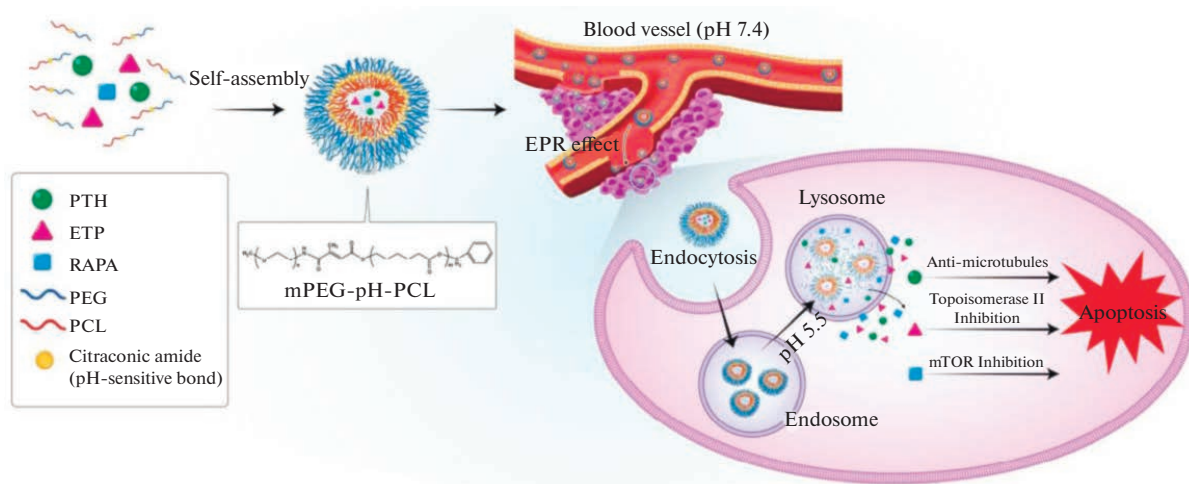


Рис. 9. Схема высвобождения этопозида (ETP), паклитаксела (PTX) и рапамицина (RAPA) из pH-чувствительных мицелл mPEG-pH-PCL в условиях *in vivo* (перепечатано из [118] с разрешения MDPI, Copyright © (2023) by the authors (CC BY 4.0 open access)).

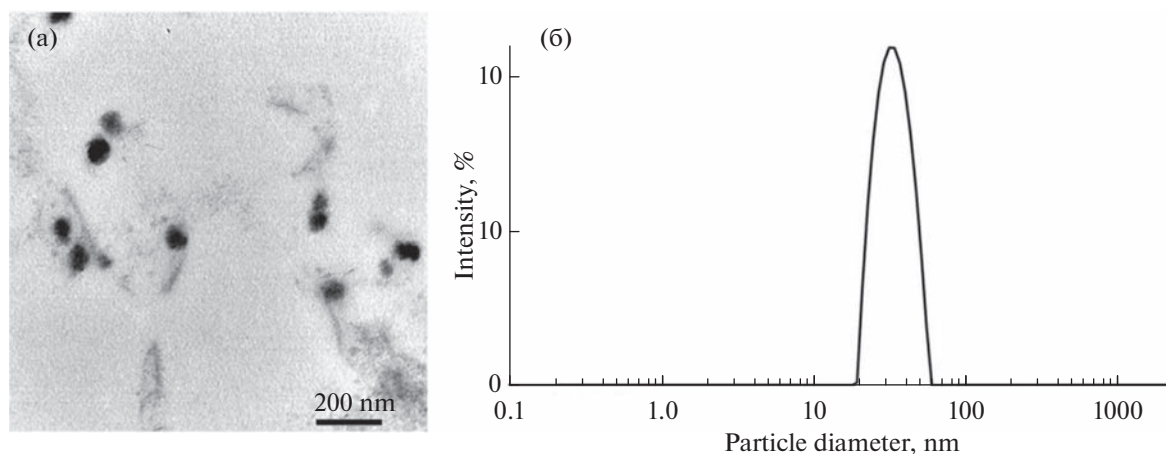


Рис. 10. (а) Микрофотография pH-чувствительных мицелл PTX/ETP/RAPA-mPEG-pH-PCL (просвечивающая электронная микроскопия, масштаб 200 нм); (б) распределение мицелл по размерам (метод динамического светорассеяния, репрезентативный график, $n = 3$) (перепечатано из [118] с разрешения MDPI, Copyright © (2023) by the authors (CC BY 4.0 open access)).

оценить вклад pH-чувствительных связей во взаимодействие мицелл с живыми объектами.

4.5. Мицеллы из биополимеров

Для получения мицелл из биополимеров используют либо их гидрофобные производные, либо полиэлектролитные комплексы.

Мицеллы из ацилированного стеариновой кислотой декстрана получали методом диализа [106, 119]. Параметры мицелл зависели от состава полимера: мольного соотношения стеарат/декстран ($S = 7.5$ или 10) и молекулярной массы декстрана ($D = 6$ или 10 кДа). Так, размеры мицелл составляли ~ 130 нм для мицелл $D_{10}S_{7.5}$ и $D_6S_{7.5}$ и 200 –

300 нм для мицелл $D_{10}S_{10}$ и D_6S_{10} соответственно. Значения ККМ также зависели от состава полимера и возрастали с ростом молекулярной массы декстрана и увеличением доли стеарата от 7.44 мг/л для $D_6S_{7.5}$ до 22.08 мг/л для $D_{10}S_{10}$. Аналогичную корреляцию наблюдали для скорости высвобождения этопозида: мицеллы $D_6S_{7.5}$ высвобождали $\sim 50\%$ этопозида в течение 10 ч, а мицеллы $D_{10}S_{10}$ — более 48 ч. Нагруженные этопозидом мицеллы $D_6S_{7.5}$ и $D_{10}S_{7.5}$ (содержание этопозида 31.7 и 18.5 , дзета-потенциал -19 и -7 мВ) проявили более высокую, чем свободный этопозид, цитотоксичность на клетках колоректальной аденокарциномы мыши СТ-26 [106]. Этот результат, объясняется, по-видимому, эффективной интернализацией

мицеллярного этопозиды в клетки путем эндоцитоза.

Интересный метод получения гибридных липид-полимерных мицелл, нагруженных этопозидом, предложили Agwa и соавт. [120]. Мицеллы получали методом упаривания растворителя, добавляя раствор этопозиды и витамина D3 в этаноле к водному раствору казеината натрия. Этанол упаривали и к образовавшемуся мицеллярному раствору добавляли другой мицеллярный раствор, полученный путем гидратирования пленки, состоящий из комплекса витамина D3 и фосфатидилхолина (2 : 1 моль/моль). Полученные таким образом мицеллы, содержащие этопозид и витамин D3, имели размер ~230 нм и отрицательный дзета-потенциал (–30 мВ). Высвобождение обоих компонентов было медленным (12.5 и 5.7% за 48 ч соответственно), что, возможно, объясняется стабилизацией мицелл в результате взаимодействия витамина D3 с казеином [24]. Витамин D3 в этой системе выполнял также роль вектора к рецепторам VDR (vitamin D3 receptor), который экспрессируется клетками рака молочной железы и клетками иммунной системы, а также ингредиента с собственной противоопухолевой активностью, опосредованной активацией рецептора VDR и изменениями, который VDR вносит в транскриптом иммунных и опухолевых клеток, регулируя их пролиферацию и дифференциацию [121]. Мицеллы D3/ETP, меченные родамином В, лучше накапливались в подкожно имплантированной карциноме Эрлиха и обеспечили более выраженный противоопухолевый эффект, чем комбинация свободных D3 и этопозиды. Торможение роста опухоли сопровождалось повышением активности апоптоза, а также снижением активности аутофагии и ангиогенеза. Исследования на клетках опухолей молочной железы MCF-7 и MDA-MB 231 показали синергетический цитотоксический эффект комбинации D3 с этопозидом, как для свободных ЛВ, так и для мицеллярной формы.

Повышенную эффективность в отношении опухоли Эрлиха показала и еще одна интересная мицеллярная система со-доставки этопозиды и транс-ретиноевой кислоты (активный метаболит витамина А, АТРА) [122]. Нагруженные обоими ЛВ мицеллы (ETP/ATRA UPM) получали из конъюгата растительного белка зеина и хондроитина сульфата методом упаривания растворителя. Для повышения стабильности мицеллы дополнительно сшивали хлоридом кальция (ETP/ATRA CPM). Действительно, сшивка мицелл значительно замедлила скорость высвобождения обоих ЛВ. Оба типа мицелл показали более выраженный противоопухолевый эффект (торможение роста опухоли) по сравнению со свободными ЛВ. Хотя показатели торможения роста опухоли для обоих типов мицелл были близкими, в группе ETP/ATRA CPM

уровень пролиферации был ниже, а площадь некрозов – больше, что указывает на более высокую активность этой системы. Хондроитин сульфат в этом исследовании мог играть роль вектора к рецепторам CD44, экспрессируемым клетками опухоли. Синергетический цитотоксический эффект ЛВ в отношении клеток MCF-7 был показан и в этом исследовании.

В завершение следует упомянуть о возможности получения мицеллярной формы ЛВ путем синтеза его амфифильного производного. Хотя, насколько нам известно, такой подход для этопозиды изучен не был, в литературе описаны мицеллы из производных его близкого аналога – эпиподофиллотоксина, который также является ингибитором топоизомеразы II. В первом случае, эпиподофиллотоксин конъюгировали со стеариновой кислотой и PEG (C18-ePT-PEG) [123], во втором – со стеариновой кислотой и спермином (C18-ePT-Sper) [124]. Примечательно, что оба типа мицелл были монодисперсными и имели очень маленькие размеры – 5–8 нм; дзета-потенциал мицелл C18-ePT-PEG был почти нейтральным (+0.3 мВ), а мицелл C18-ePT-Sper – положительным (+32 мВ). Образованию мицелл могли способствовать как гидрофобные взаимодействия между липофильными фрагментами молекул, так и π - π взаимодействия между ароматическими фрагментами. По сравнению с мицеллами C18-ePT-PEG, мицеллы C18-ePT-Sper проявили значительно более высокую цитотоксичность в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека A-431, что, по-видимому, объясняется их более активным проникновением в клетку. Авторы также полагают, что присутствие фрагмента спермина в молекуле могло усилить ее связывание с ДНК, что, в свою очередь, привело к более эффективному ингибированию топоизомеразы II. Интересно, что, несмотря на маленький размер, мицеллы C18-ePT-PEG эффективно накапливались в опухоли MDA-MB-231. С технологической точки зрения, очевидными преимуществами мицелл, образованных амфифильными производными ЛВ (по сравнению с полимерными мицеллами), являются отсутствие вспомогательных веществ и монодисперсность.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всей немногочисленности исследований в области наночастиц этопозиды на основе полимерных мицелл и наночастиц, рассматривая их, можно проследить основные тенденции, характерные и для систем доставки других противоопухолевых веществ: размер большинства носителей (твердотельных полимерных наночастиц и мицелл), использованных для доставки этопозиды, не превышает 200 нм, при этом их поверхность имеет отрицательный дзета-потенциал (если по-

верхность не модифицирована катионными агентами). Такие носители потенциально обладают относительно низкой токсичностью и способны доставлять ЛВ в опухоль, используя эффект EPR, что мы и наблюдаем в различных исследованиях. Снижению клиренса и накопления в органах РЭС способствует также защита наночастиц от опсонизации с помощью гидрофильной оболочки (“стелс-эффект”).

Общие тенденции можно отметить и при сравнении систем доставки этопозидов на основе твердотельных наночастиц и мицелл: для получения обоих типов носителей используют только биodeградируемые полимеры синтетического или природного происхождения; для повышения селективности действия и мицеллы, и наночастицы конъюгируют с векторами; кроме того, конструируют стимул-чувствительные системы, способные реагировать на специфические условия в опухоли или ее микроокружении.

Результаты большинства исследований позволяют заключить, что коллоидные системы доставки на основе полимерных мицелл и наночастиц обладают значительным потенциалом для повышения противоопухолевого эффекта этопозидов. Следует особо отметить интерес разработчиков систем доставки этопозидов к опухолям мозга и, в частности, к глиомам. Хотя нейроонкологи отмечают высокий антиглиомный потенциал ингибиторов топоизомеразы II и, в частности, этопозидов [125, 126], в настоящее время этопозид лишь ограниченно применяется для химиотерапии глиом, поскольку его транспорту в мозг препятствует ГЭБ [127]. Этот потенциал мог бы реализоваться с помощью наноносителей, которые преодолеют ГЭБ и позволят повысить концентрации этопозидов в интракраниальной опухоли, не повышая его дозу и тем самым избегая усиления неспецифической токсичности. Хотя в литературе отсутствуют данные о применении систем доставки этопозидов при опухолях яичка, способность наночастиц переносить ЛВ через гистогематические барьеры может быть актуальна и для таких опухолей, поскольку в этом случае доступ ЛВ ограничивает гематотестикулярный барьер, во многом схожий с ГЭБ [128].

При всей их сложности системы доставки этопозидов (как и других ЛВ) представляют собой лекарственные формы, и потому их продвижение в практику требует тщательной оценки многих свойств, которые пока остаются недостаточно изученными, в том числе токсикологические характеристики и стабильность. Решение этих задач позволит полностью реализовать потенциал этопозидов и повысить эффективность химиотерапии опухолей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC	площадь под фармакокинетической кривой концентрация—время (<i>англ. Area-Under-Curve</i>)
BSA	бычий сывороточный альбумин
эффект EPR	эффект, способствующий проникновению и накоплению наночастиц и макромолекул в опухоли (<i>англ. Enhanced Permeation and Retention эффект</i>)
ETP	этопозид
ETP-cbz	4'-O-бензилоксикарбонил-этопозид
HSA	человеческий сывороточный альбумин
mPEG	метиловый эфир полиэтиленгликоля
PCL	поли-ε-капролактон
PEG	полиэтиленгликоль
PLA	полимолочная кислота
PLGA	сополимер молочной и гликолевой кислот
siRNA	малая интерферирующая РНК
TPGS	D-α-токоферил полиэтиленгликоль 1000 сукцинат
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМФА	диметилформамид
ЛВ	лекарственное вещество
МРЛ	мелкоклеточный рак легких
ПВС	поливиниловый спирт
ПАВ	поверхностно-активное вещество

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ, грант № 23-25-00194).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hande K.R.* Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor // *European Journal of Cancer*. 1998. V. 34. № 10. P. 1514–1521. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00228-7)
2. Примерный перечень основных лекарственных средств, 21-й перечень, 2019 г. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ; 2020. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331990/WHO-EURO-2020-476-40211-53802-rus.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
3. *Agrawal K.* Etoposide // *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007. P. 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61729-5>

4. *Slevin M.L.* The clinical pharmacology of etoposide // *Cancer*. 1991. V. 67. № S1. P. 319–329.
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910101\)67:1+<319::AID-CNCR2820671319>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910101)67:1+<319::AID-CNCR2820671319>3.0.CO;2-D)
5. *Montecucco A., Zanetta F., Biamonti G.* Molecular mechanisms of etoposide // *EXCLI Journal*. Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors. 2015. V. 14. P. 95–108.
<https://doi.org/10.17179/excli2014-561>
6. *Baldwin E.L., Osheroff N.* Etoposide, topoisomerase II and cancer // *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2005. V. 5. № 4. P. 363–372.
<https://doi.org/10.2174/1568011054222364>
7. *Kroschinsky F.P., Friedrichsen K., Mueller J. et al.* Pharmacokinetic comparison of oral and intravenous etoposide in patients treated with the CHOEP-regimen for malignant lymphomas // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008. V. 61. P. 785–790.
<https://doi.org/10.1007/s00280-007-0535-3>
8. *Shah J.C., Chen J.R., Chow D.* Preformulation study of etoposide: Identification of physicochemical characteristics responsible for the low and erratic oral bioavailability of etoposide // *Pharmaceutical Research*. 1989. V. 6. P. 408–412.
<https://doi.org/10.1023/A:1015935532725>
9. *Siderov J., Prasad P., De Boer R., Desai J.* Safe administration of etoposide phosphate after hypersensitivity reaction to intravenous etoposide // *British Journal of Cancer*. 2002. V. 86. № 1. P. 12–13.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600003>
10. *Hoetelmans R.M.W., Schornagel J.H., ten Bokkel Huinink W.W., Beijnen J.H.* Hypersensitivity reactions to etoposide // *Annals of Pharmacotherapy*. 1996. V. 30. № 4. P. 367–371.
<https://doi.org/10.1177/106002809603000409>
11. *Bernstein B.J., Troner M.B.* Successful rechallenge with etoposide phosphate after an acute hypersensitivity reaction to etoposide // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1999. V. 19. № 8. P. 989–991.
<https://doi.org/10.1592/phco.19.11.989.31566>
12. *Zhao W.* Challenges and potential for improving the druggability of podophyllotoxin-derived drugs in cancer chemotherapy // *Nat. Prod. Rep.* 2021. V. 38. № 3. P. 470–488.
<https://doi.org/10.1039/d0np00041h>
13. *Махачева Ф.А., Валиев Т.Т.* Особенности вторичного острого миелоидного лейкоза у детей // *Онкогематология*. 2020. Т. 15. № 4. С. 12–17.
<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2020-15-4-12-17>
14. *Zhang M., Hagan C.T., Foley H. et al.* Co-delivery of etoposide and cisplatin in dual-drug loaded nanoparticles synergistically improves chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer models // *Acta Biomaterialia*. 2021. V. 124. P. 327–335.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.02.001>
15. *Rafiyath S. M., Rasul M., Lee B., Wei G., Lamba G., Liu D.* Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: A meta-analysis // *Exp. Hematol. Oncol.* 2012. V. 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-10>
16. *Фармакопоя РФ.* Требования к показателям качества и исследованию лекарственных средств на основе липосом, мицелл и лекарственных средств, содержащих покрытия из наночастиц. https://pharmacopoeia.ru/trebovaniya-k-pokazatelyam-kachestva-i-issledovaniyu-lekarstvennyh-sredstv-na-osnove-liposom-mitsell-ilekarsvtennyh-sredstv-soderzhashhih-pokrytiya-iz-nanochas-tits/#%D0%A0%D0%90%D0%97%D0%94%D0%95%D0%9B_2_%D0%A0%D0%B0%D0%B7%D1%80%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%BA%D0%B0_%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D1%85_%D0%BF%D1%80%D0%B5%D0%BF%D0%B0%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B2_%D0%BD%D0%B0_%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B5_%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B5%D0%BB%D0%BB_%D0%B1%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%B2 (обращение 20 июля 2022).
17. US FDA. Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials. Guidance for Industry, April 2022. <https://www.fda.gov/media/157812>.
18. *Sindhvani S., Syed, A. M., Ngai J. et al.* The entry of nanoparticles into solid tumours // *Nature Materials*. 2020. V. 19. № 5. P. 566–575.
<https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>
19. *Malinovskaya J., Salami R., Valikhov M. et al.* Supermagnetic human serum albumin (HSA) nanoparticles and PLGA-based doxorubicin nanoformulation: A duet for selective nanotherapy // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 627.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010627>
20. *Yuan Z.Q., Chen W.L., You B.G. et al.* Multifunctional nanoparticles co-delivering EZH2 siRNA and etoposide for synergistic therapy of orthotopic non-small-cell lung tumor // *JCR*. 2017. V. 268. P. 198–211.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.10.025>
21. *Huang H.L., Lin W.J.* Dual peptide-modified nanoparticles improve combination chemotherapy of etoposide and siPIK3CA against drug-resistant small cell lung carcinoma // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. № 3. P. 254.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030254>
22. *Bai J., Tian Y., Liu F. et al.* Octreotide-conjugated core-cross-linked micelles with pH/redox responsivity loaded with etoposide for neuroendocrine neoplasms therapy and bioimaging with photoquenching resistance // *ACS Appl Mater Interface*. 2019. V. 11. № 20. P. 18111–18122.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b01827>
23. *Kuo Y.C., Chang Y.H., Rajesh R.* Targeted delivery of etoposide, carmustine and doxorubicin to human glioblastoma cells using methoxy poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin and folic acid // *Mater. Sci. Eng. C*. 2019. V. 96. P. 114–128.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.094>
24. *Cohen Y., Levi M., Lesmes U., Margier M., Reboul E., Livney Y.D.* Re-assembled casein micelles improve *in vitro* bioavailability of vitamin D in a Caco-2 cell mod-

- el // Food & Function. 2017. V. 8. № 6. P. 2133–2141. <https://doi.org/10.1039/c7fo00323d>
25. Naumenko V.A., Vlasova K.Y., Garanina A.S. et al. Extravasating neutrophils open vascular barrier and improve liposomes delivery to tumors // ACS Nano. 2019. V. 13. № 11. P. 12599–12612. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b03848>
26. Lin Q., Fathi P., Chen X. Nanoparticle delivery *in vivo*: A fresh look from intravital imaging // EBioMedicine. 2020. V. 59. P. 102958. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102958>
27. Golombek S.K. et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses // Advanced Drug Delivery Reviews. 2018. V. 130. P. 17–38. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007>
28. Kakkar A., Traverso G., Farokhzad O.C., Weissleder R., Langer R. Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems // Nat. Rev. Chem. 2017. V. 1. № 8. P. 0063. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0063>
29. Mitchell M.J., Billingsley M.M., Haley R.M. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery // Nat. Rev. Drug Discov. 2021. V. 20. № 2. P. 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
30. Takechi-Haraya Y., Ohgita T., Demizu Y., Saito H., Izutsu K.I., Sakai-Kato K. Current status and challenges of analytical methods for evaluation of size and surface modification of nanoparticle-based drug formulations // AAPS PharmSciTech. 2022. V. 23. № 5. P. 150. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02303-y>
31. Nel A.E., Mädler L., Velegol D. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface // Nature Materials. 2009. V. 8. № 7. P. 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
32. Skalickova S., Nejdl L., Kudr J. et al. Fluorescence characterization of gold modified liposomes with anti-sense N-myc DNA bound to the magnetisable particles with encapsulated anticancer drugs (doxorubicin, ellipticine and etoposide) // Sensors. 2016. V. 16. № 3. P. 290. <https://doi.org/10.3390/s16030290>
33. Mehrabi M., Esmaeilpour P., Akbarzadeh A. et al. Efficacy of pegylated liposomal etoposide nanoparticles on breast cancer cell lines // Turk. J. Med. Sci. 2016. V. 46. № 2. P. 567–571. <https://doi.org/10.3906/sag-1412-67>
34. Deng W., Chen W., Clement S. et al. Controlled gene and drug release from a liposomal delivery platform triggered by X-ray radiation // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 1. P. 2713. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05118-3>
35. Varshosaz J., Hassanzadeh F., Sadeghi-Aliabadi H., Firozian F. Uptake of etoposide in CT-26 cells of colorectal cancer using folate targeted dextran stearate polymeric micelles // Biomed. Res. Int. 2014. V. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/708593>
36. Qian W.Y., Sun D. M., Zhu R.R. et al. pH-sensitive strontium carbonate nanoparticles as new anticancer vehicles for controlled etoposide release // Int. J. Nanomedicine. 2012. P. 5781–5792. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34773>
37. Zhu R., Wang Q., Zhu Y. et al. pH sensitive nano layered double hydroxides reduce the hematotoxicity and enhance the anticancer efficacy of etoposide on non-small cell lung cancer // Acta Biomaterialia. 2016. V. 29. P. 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.029>
38. Snehalatha M., Venugopal K., Saha R.N. Etoposide-loaded PLGA and PCL nanoparticles I: Preparation and effect of formulation variables // Drug Delivery. 2008. V. 15. № 5. P. 267–275. <https://doi.org/10.1080/10717540802174662>
39. Yadav K.S., Chuttani K., Mishra A.K. et al. Long circulating nanoparticles of etoposide using PLGA-MPEG and PLGA-pluronic block copolymers: Characterization, drug-release, blood-clearance, and biodistribution studies // Drug Dev. Res. 2010. V. 71. № 4. P. 228–239. <https://doi.org/10.1002/ddr.20365>
40. Yadav K.S., Sawant K.K. Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation // Curr. Drug Deliv. 2010. V. 7. № 1. P. 51–64. <https://doi.org/10.2174/156720110790396517>
41. Wang Z., Li Z., Zhang D. et al. Development of etoposide-loaded bovine serum albumin nanosuspensions for parenteral delivery // Drug Delivery. 2015. V. 22. № 1. P. 79–85. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.871600>
42. Kuo Y.C., Lee C.H. Inhibition against growth of glioblastoma multiforme *in vitro* using etoposide-loaded solid lipid nanoparticles with p-aminophenyl- α -D-manno-pyranoside and folic acid // J. Pharm. Sci. 2015. V. 104. № 5. P. 1804–1814. <https://doi.org/10.1002/jps.24388>
43. Kuo Y.C., Wang I.H. Enhanced delivery of etoposide across the blood–brain barrier to restrain brain tumor growth using melanotransferrin antibody- and tamoxifen-conjugated solid lipid nanoparticles // J. Drug Target. 2016. V. 24. № 7. P. 645–654. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1132223>
44. Jin G.W., Rejinold N.S., Choy J.H. Multifunctional polymeric micelles for cancer therapy // Polymers. 2022. V. 14. № 22. P. 4839. <https://doi.org/10.3390/polym14224839>
45. Ahmad I., Pandit J., Sultana Y. et al. Optimization by design of etoposide loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Characterization, pharmacokinetic and deposition study // Mater. Sci. Eng. C. 2019. V. 100. P. 959–970. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.060>
46. Zhu Y., Zhu R., Wang M. et al. Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of core–shell SiO₂@LDH loaded with etoposide in non-small cell lung cancer // Advanced Science. 2016. V. 3. № 11. P. 1600229. <https://doi.org/10.1002/advs.201600229>
47. Jo M.J., Shin H.J., Yoon M.S. et al. Evaluation of pH-sensitive polymeric micelles using citraconic amide bonds for the co-delivery of paclitaxel, etoposide, and rapamycin // Pharmaceutics. 2023. V. 15. № 1. P. 154. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010154>
48. Abdel-Bar H.M., Walters A.A., Wang J.T.W., Al-Jamal K.T. Combinatory delivery of etoposide and siCD47 in a lipid polymer hybrid delays lung tumor growth in an experimental melanoma lung metastatic model // Adv.

- Healthc. Mater. 2021. V. 10. № 7. P. 2001853.
https://doi.org/10.1002/adhm.202001853
49. Maleki H., Naghibzadeh M., Amani A. et al. Preparation of paclitaxel and etoposide co-loaded MPEG-PLGA nanoparticles: An investigation with artificial neural network // J. Pharm. Innov. 2021. V. 16. P. 11–25.
https://doi.org/10.1007/s12247-019-09419-y
 50. Maleki H., Najafabadi M.R.H., Webster T.J. et al. Effect of Paclitaxel/etoposide co-loaded polymeric nanoparticles on tumor size and survival rate in a rat model of glioblastoma // Int. J. Pharm. 2021. V. 604. P. 120722.
https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120722
 51. Kovshova T., Mantrov S., Boiko S. et al. Co-delivery of paclitaxel and etoposide prodrug by human serum albumin and PLGA nanoparticles: Synergistic cytotoxicity in brain tumour cells // J. Microencapsul. 2023. V. 40. № 4. P. 246–262.
https://doi.org/10.1080/02652048.2023.2188943
 52. Lim C., Ramsey J.D., Hwang D. et al. Drug-dependent morphological transitions in spherical and worm-like polymeric micelles define stability and pharmacological performance of micellar drugs // Small. 2022. V. 18. № 4. P. 2103552.
https://doi.org/10.1002/smll.202103552
 53. Rezvantab S., Drude N.I., Moraveji M.K. et al. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1260.
https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01260
 54. Casalini T., Rossi F., Castrovinci A., Perale G. A Perspective on polylactic acid-based polymers use for nanoparticles synthesis and applications // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. V. 7. P. 259.
https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00259
 55. Operti M.C., Bernhardt A., Grimm S. et al. PLGA-based nanomedicines manufacturing: Technologies overview and challenges in industrial scale-up // Int. J. Pharm. 2021. V. 605. P. 120807.
https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120807
 56. Park K., Otte A., Sharifi F. et al. Formulation composition, manufacturing process, and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles // Journal of Controlled Release. 2021. V. 329. P. 1150–1161.
https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.044
 57. Callewaert M., Dukic S., Van Gulick L. et al. Etoposide encapsulation in surface-modified poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles strongly enhances glioma antitumor efficiency // J. Biomed. Mater. Res. A. 2013. V. 101 A. № 5. P. 1319–1327.
https://doi.org/10.1002/jbm.a.34442
 58. Saadati R., Dadashzadeh S. Marked effects of combined TPGS and PVA emulsifiers in the fabrication of etoposide-loaded PLGA-PEG nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* evaluation // Int. J. Pharm. 2014. V. 464. № 1–2. P. 135–144.
https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.014
 59. Yadav K.S., Jacob S., Sachdeva G., Sawant K.K. Intracellular delivery of etoposide loaded biodegradable nanoparticles: Cytotoxicity and cellular uptake studies // J. Nanosci. Nanotechnol. 2011. V. 11. № 8. P. 6657–6667.
https://doi.org/10.1166/jnn.2011.4225
 60. Rivas C.J.M., Tarhini M., Badri W. et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery // Int. J. Pharm. 2017. V. 532. № 1. P. 66–81.
https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064
 61. Callewaert M., Dukic S., Van Gulick L. et al. Etoposide encapsulation in surface-modified poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles strongly enhances glioma antitumor efficiency // J. Biomed. Mater. Res. A. 2013. V. 101. № 5. P. 1319–1327.
https://doi.org/10.1002/jbm.a.34442
 62. Kovshova T., Osipova N., Alekseeva A. et al. Exploring the interplay between drug release and targeting of lipid-like polymer nanoparticles loaded with doxorubicin // Molecules. 2021. V. 26. № 4. P. 831.
https://doi.org/10.3390/molecules26040831
 63. Stipa P., Marano S., Galeazzi R. et al. Prediction of drug-carrier interactions of PLA and PLGA drug-loaded nanoparticles by molecular dynamics simulations // Eur. Polym. J. 2021. V. 147. P. 110292.
https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110292
 64. Ермоленко Ю.В., Семёнкин А.С., Ульянова Ю.В., Ковишова Т.С., Максименко О.О., Гельперина С.Э. Роль гидролитической деградации полилактидных носителей при разработке нано- и микроразмерных лекарственных форм на их основе // Известия Академии наук. Серия химическая. 2020. Т. 8. С. 1416–1427.
 65. D'Souza S.A. Review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms // Advances in pharmaceuticals. 2014. V. 2014. P. 1–12.
https://doi.org/10.1155/2014/304757
 66. Pimple S., Manjappa A.S., Ukawala M., Murthy R.S.R. PLGA nanoparticles loaded with etoposide and quercetin dihydrate individually: *In vitro* cell line study to ensure advantage of combination therapy // Cancer Nanotechnol. 2012. V. 3. P. 25–36.
https://doi.org/10.1007/s12645-012-0027-y
 67. Yadav R., Kumar D., Kumari A. et al. Encapsulation of podophyllotoxin and etoposide in biodegradable poly-D,L-lactide nanoparticles improved their anticancer activity // J. Microencapsul. 2014. V. 31. № 3. P. 211–219.
https://doi.org/10.3109/02652048.2013.834988
 68. Singh V., Sahebkar A., Kesharwani P. Poly (propylene imine) dendrimer as an emerging polymeric nanocarrier for anticancer drug and gene delivery // Eur. Polym. J. 2021. V. 158. P. 110683.
https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110683
 69. Посыпанова Г.А., Горшкова Л.Б., Родина А.В. и др. Характеристика противоопухолевой активности полимерной формы этопозиды в составе биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот // Химико-фармацевтический журнал. 2016. P. 45–49.
 70. Mitra M., Dilhawaz F., Misra R. et al. Toxicogenomics of nanoparticulate delivery of etoposide: Potential impact on nanotechnology in retinoblastoma therapy // Cancer Nanotechnol. 2011. V. 2. № 1–6. P. 21–36.
https://doi.org/10.1007/s12645-010-0010-4
 71. Schaefer M.J., Singh J. Effect of tricaprins on the physical characteristics and *in vitro* release of etoposide from PLGA microspheres // Biomaterials. 2002. V. 23. № 16. P. 3465–3471.
https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00053-4

72. Moghimi S.M., Hunter A.C., Andresen T.L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective // *Annu. Rev. Pharmacol.* 2012. V. 52. P. 481–503.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623>
73. Yadav K.S., Chuttani K., Mishra A.K., Sawant K.K. Effect of size on the biodistribution and blood clearance of etoposide-loaded PLGA nanoparticles // *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2011. V. 65. № 2. P. 131–139.
74. Snehalatha M., Kolachina V., Saha R.N. et al. Enhanced tumor uptake, biodistribution and pharmacokinetics of etoposide loaded nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice // *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2013. V. 5. № 4. P. 290–297.
<https://doi.org/10.4103/0975-7406.120081>
75. Sarfarazi A., Lee G., Mirjalili S.A. et al. Therapeutic delivery to the peritoneal lymphatics: Treatment benefits and future prospects // *Int. J. Pharm.* 2019. V. 567. P. 118456.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118456>
76. Lee G., Han S., Inocencio I., Cao E. et al. Lymphatic uptake of liposomes after intraperitoneal administration primarily occurs via the diaphragmatic lymphatics and is dependent on liposome surface properties // *Mol. Pharm.* 2019. V. 16. № 12. P. 4987–4999.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00855>
77. Malinovskaya Y., Melnikov P., Baklaushev V. et al. Delivery of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles into U87 human glioblastoma cells // *Int. J. Pharm.* 2017. V. 524. № 1–2. P. 77–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.049>
78. Kuo Y.C., Chen Y.C. Targeting delivery of etoposide to inhibit the growth of human glioblastoma multiforme using lactoferrin- and folic acid-grafted poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles // *Int. J. Pharm.* 2015. V. 479. № 1. P. 138–149.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.070>
79. Lagas J.S., Fan L., Wagenaar E. et al. P-Glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. № 1. P. 130–140.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1321>
80. Kuplennik N., Lang K., Steinfeld R., Sosnik A. Folate receptor α -modified nanoparticles for targeting of the central nervous system // *ACS Appl. Mater. Interface.* 2019. V. 11. № 43. P. 39633–39647.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b14659>
81. Godse R., Rathod M., De A., Shinde U. Intravitreal galactose conjugated polymeric nanoparticles of etoposide for retinoblastoma // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2021. V. 61. P. 102259.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102259>
82. Pan J., Rostamizadeh K., Filipczak N., Torchilin V.P. Polymeric co-delivery systems in cancer treatment: An overview on component drugs' dosage ratio effect // *Molecules.* 2019. V. 24. № 6. P. 1035.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061035>
83. Fatma S., Talegaonkar S., Iqbal Z. et al. Novel flavonoid-based biodegradable nanoparticles for effective oral delivery of etoposide by P-glycoprotein modulation: An *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* investigations // *Drug Delivery.* 2016. V. 23. № 2. P. 500–511.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2014.923956>
84. Espinoza S.M., Patil H.I., San Martin Martinez E., Casañas Pimentel R., Ige P.P. Poly- ϵ -caprolactone (PCL), a promising polymer for pharmaceutical and biomedical applications: Focus on nanomedicine in cancer // *Int. J. Polym. Mater.* 2020. V. 69. № 2. P. 85–126.
<https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1539990>
85. Kalita N.K., Bhasney S.M., Mudenur C. et al. End-of-life evaluation and biodegradation of poly(lactic acid)(PLA)/polycaprolactone (PCL)/microcrystalline cellulose (MCC) polyblends under composting conditions // *Chemosphere.* 2020. V. 247. P. 125875.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125875>
86. Vivek K., Harivardhan Reddy L., Murthy R.S.R. Comparative study of some biodegradable polymers on the entrapment efficiency and release behavior of etoposide from microspheres // *Pharm. Dev. Technol.* 2007. V. 12. № 1. P. 79–88.
<https://doi.org/10.1080/10837450601168581>
87. Kuo Y.C., Wang I.H. Using cationic solid lipid nanoparticles with wheat germ agglutinin and lactoferrin for targeted delivery of etoposide to glioblastoma multiforme // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2017. V. 77. P. 73–82.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.05.003>
88. Xu Y., Tang L., Liu Y. et al. Dual-modified albumin-polymer nanocomplexes with enhanced *in vivo* stability for hepatocellular carcinoma therapy // *Colloids Surf. B.* 2021. V. 201. P. 111642.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111642>
89. Xie P., Yan J., Wu M. et al. CD44 potentiates hepatocellular carcinoma migration and extrahepatic metastases via the AKT/ERK signaling CXCR4 axis // *Annals of Translational Medicine.* 2022. V. 10. № 12. P. 689.
<https://doi.org/10.21037/atm-22-2482>
90. Spada A., Emami J., Tuszyński J.A., Lavasanifar A. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery // *Mol. Pharm.* 2021. V. 18. № 5. P. 1862–1894.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00046>
91. Manjushree M., Revanasiddappa H.D. Evaluation of binding mode between anticancer drug etoposide and human serum albumin by numerous spectrometric techniques and molecular docking // *Chemical Physics.* 2020. V. 530. P. 110593.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110593>
92. Akdogan Y., Reichenwallner J., Hinderberger D. Evidence for water-tuned structural differences in proteins: An approach emphasizing variations in local hydrophilicity // *PLOS One.* 2012. V. 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045681>
93. Osipova N., Budko A., Maksimenko O. et al. Comparison of compartmental and non-compartmental analysis to detect biopharmaceutical similarity of intravenous nanomaterial-based rifabutin formulations // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. № 4. P. 1258.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041258>
94. Elgohary M.M., Helmy M.W., Mortada S.M., Elzoghby A.O. Dual-targeted nano-in-nano albumin carriers enhance the efficacy of combined chemo/herbal therapy of lung cancer // *Nanomedicine.* 2018. V. 13.

- № 17. P. 2221–2224.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0097>
95. Narayana R.V.L., Jana P., Tomar N. et al. Carboplatin- and etoposide-loaded lactoferrin protein nanoparticles for targeting cancer stem cells in retinoblastoma *in vitro* // IOVS. 2021. V. 62. № 14. P. 13.
<https://doi.org/10.1167/iovs.62.14.13>
 96. Akbal Ö., Erdal E., Vural T. et al. Comparison of protein- and polysaccharide-based nanoparticles for cancer therapy: Synthesis, characterization, drug release, and interaction with a breast cancer cell line // Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2017. V. 45. № 2. P. 193–203.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1170694>
 97. Raval N., Maheshwari R., Shukla H. et al. Multifunctional polymeric micellar nanomedicine in the diagnosis and treatment of cancer // Mater. Sci. Eng. C. 2021. V. 126. P. 112186.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112186>
 98. Hwang D., Ramsey J.D., Kabanov A.V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval // Adv. Drug Deliv. Rev. 2020. V. 156. P. 80–118.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.09.009>
 99. Mohanty A.K., Dilnawaz F., Mohanty C., Sahoo S.K. Etoposide-loaded biodegradable amphiphilic methoxy (poly ethylene glycol) and poly (epsilon caprolactone) copolymeric micelles as drug delivery vehicle for cancer therapy // Drug Delivery. 2010. V. 17. № 5. P. 330–342.
<https://doi.org/10.3109/10717541003720688>
 100. Letchford K., Liggins R., Burt H. Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: Theoretical and experimental data and correlations // J. Pharm. Sci. 2008. V. 97. № 3. P. 1179–1190.
<https://doi.org/10.1002/jps.21037>
 101. Chen L., Tan L., Zhang X. et al. Which polymer is more suitable for etoposide: A comparison between two kinds of drug loaded polymeric micelles *in vitro* and *in vivo*? // Int. J. Pharm. 2015. V. 495. № 1. P. 265–275.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.043>
 102. Ukawala M., Rajyaguru T., Chaudhari K. et al. Investigation on design of stable etoposide-loaded PEG-PCL micelles: Effect of molecular weight of PEG-PCL diblock copolymer on the *in vitro* and *in vivo* performance of micelles // Drug Delivery. 2012. V. 19 № 3. P. 155–167.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2012.657721>
 103. Shin H.C., Alani A.W., Rao D.A., Rockich N.C., Kwon G.S. Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs // J. Control Release. 2009. V. 140. № 3. P. 294–300.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa66ba>
 104. Tsend-Ayush A., Zhu X., Ding Y., Yao J., Yin L., Zhou J., Yao J. Lactobionic acid-conjugated TPGS nanoparticles for enhancing therapeutic efficacy of etoposide against hepatocellular carcinoma // Nanotechnology. 2017. V. 28. № 19. P. 195602.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa66ba>
 105. Zhu X., Tsend-Ayush A., Yuan Z. et al. Glycyrhethinic acid-modified TPGS polymeric micelles for hepatocellular carcinoma-targeted therapy // Int. J. Pharm. 2017. V. 529. № 1–2. P. 451–464.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.011>
 106. Varshosaz J., Hassanzadeh F., Sadeghi H., Firozian F., Mirian M. Optimization of self-assembling properties of fatty acids grafted to methoxy poly(ethylene glycol) as nanocarriers for etoposide // Acta Pharm. 2012. V. 62. № 1. P. 31–44.
<https://doi.org/10.2478/v10007-012-0006-1>
 107. Mudhakhir D., Sukmadjaja S.A., Yeyet C.S. Packaging the alkaloids of cinchona bark in combination with etoposide in polymeric micelles nanoparticles // Int. J. Pharm. Sci. 2012. V. 6. № 12. P. 685–689.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1327853>
 108. Na H.S., Lim Y.K., Jeong Y.I., Lee H.S., Lim Y.J., Kang M.S., Cho C.S., Lee H.C. Combination antitumor effects of micelle-loaded anticancer drugs in a CT-26 murine colorectal carcinoma model // Int. J. Pharm. 2010. V. 383. № 1–2. P. 192–200.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.041>
 109. Lim C., Dismuke T., Malawsky D. et al. Enhancing CDK4/6 inhibitor therapy for medulloblastoma using nanoparticle delivery and scRNA-seq-guided combination with sapanisertib // Sci. Adv. 2022. V. 8. № 4. P. eabl5838.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abl5838>
 110. Wan X., Min Y., Bludau H., Keith A., Sheiko S.S., Jordan R., Wang A.Z., Sokolsky-Papkov M., Kabanov A.V. Drug combination synergy in worm-like polymeric micelles improves treatment outcome for small cell and non-small cell lung cancer // ACS Nano. 2018. V. 12. № 3. P. 2426–2439.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07878>
 111. Kim J.-H., Emoto K., Iijima M., Nagasaki Y., Aoyagi T., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: Increased solubilization of taxol // Polym. Adv. Technol. 1999. V. 10. № 11. P. 647–654.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1581\(199911\)10:11<647::AID-PAT918>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1581(199911)10:11<647::AID-PAT918>3.0.CO;2-Y)
 112. Wang F., Bronich T.K., Kabanov A.V., Rauh R.D., Roovers J. Synthesis and evaluation of a star amphiphilic block copolymer from poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) as a potential drug delivery carrier // Bioconjug. Chem. 2005. V. 16. № 2. P. 397–405.
<https://doi.org/10.1021/bc049784m>
 113. Wang F., Bronich T.K., Kabanov A.V., Rauh R.D., Roovers J. Synthesis and characterization of star poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) and poly(L-lactide)-b-poly(ethylene glycol) copolymers: Evaluation as drug delivery carriers // Bioconjug. Chem. 2008. V. 19. № 7. P. 1423–1429.
<https://doi.org/10.1021/bc7004285>
 114. Ukawala M., Rajyaguru T., Chaudhari K., Manjappa A.S., Murthy R.S.R., Gude R. EILDV-conjugated, etoposide-loaded biodegradable polymeric micelles directing to tumor metastatic cells overexpressing $\alpha 4 \beta 1$ integrin // Cancer Nanotechnology. 2011. V. 2. P. 133–145.
<https://doi.org/10.1007/s12645-011-0023-7>
 115. Luiz M.T., Di Filippo L.D., Alves R.C. et al. The use of TPGS in drug delivery systems to overcome biological

- barriers // *Eur. Polym. J.* 2021. V. 142. P. 110129. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110129>
116. *Lagarigue P., Moncalvo F., Cellesi F.* Non-spherical polymeric nanocarriers for therapeutics: The effect of shape on biological systems and drug delivery properties // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 1. P. 32. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010032>
 117. *Kennedy L., Sandhu J.K., Harper M.E., Cuperlovic-Culf M.* Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 10. P. 1429. <https://doi.org/10.3390/biom10101429>
 118. *Jo M.J., Shin H.J., Yoon M.S. et al.* Evaluation of pH-sensitive polymeric micelles using citraconic amide bonds for the co-delivery of paclitaxel, etoposide, and rapamycin // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 1. P. 154. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010154>
 119. *Varshosaz J., Hassanzadeh F., Sadeghi H., Firozian F., Mirian M.* Effect of molecular weight and molar ratio of dextran on self-assembly of dextran stearate polymeric micelles as nanocarriers for etoposide // *J. Nanomater.* 2012. V. 2012. P. 120. <https://doi.org/10.1155/2012/265657>
 120. *Agwa M.M., Abu-Serie M.M., Abdelmonsif D.A., Mousa N., Elsayed H., Khattab S.N., Sabra S.* Vitamin D3/phospholipid complex decorated caseinate nanomicelles for targeted delivery of synergistic combination therapy in breast cancer // *Int. J. Pharm.* 2021. V. 607. P. 120965. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120965>
 121. *Carlberg C., Muñoz A.* An update on vitamin D signaling and cancer // *Seminars in Cancer Biology*. 2022. V. 79. P. 217–230. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.018>
 122. *Gaber M., Elhasany K.A. et al.* Co-administration of tretinoin enhances the anti-cancer efficacy of etoposide via tumor-targeted green nano-micelles // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2020. V. 192. P. 110997. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110997>
 123. *Alliot J., Theodorou I., Nguyen D.V., Forier C., Ducongé F., Grave E., Doris E.* Tumor targeted micellar nanocarriers assembled from epipodophyllotoxin-based amphiphiles // *Nanoscale*. 2019. V. 11. № 19. P. 9756–9759. <https://doi.org/10.1039/C9NR01068H>
 124. *Alliot J., Theodorou I., Ducongé F., Gravel E., Doris E.* Polyamine transport system-targeted nanometric micelles assembled from epipodophyllotoxinamphiphiles // *Chemical Communications*. 2019. V. 55. № 99. P. 14968–14971. <https://doi.org/10.1039/c9cc07883e>
 125. *Leonard A., Wolff J.E.* Etoposide improves survival in high-grade glioma: A meta-analysis // *Anticancer Research*. 2013. V. 33. № 8. P. 3307–3315.
 126. *Mehta A., Awah C.U., Sonabend A.M.* Topoisomerase II poisons for glioblastoma; Existing challenges and opportunities to personalize therapy // *Frontiers in Neurology*. 2018. V. 9. P. 459. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00459>
 127. *Lagas J.S., Fan L., Wagenaar E., Vlaming M.L., van Telligen O., Beijnen J.H., Schinkel A.H.* P-Glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16 № 1. P. 130–140. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1321>
 128. *Bart J., Groen H.J., van der Graaf W.T., Hollema H., Hendrikse N.H., Vaalburg W., Sleijfer D.T., de Vries E.G.* An oncological view on the blood–testis barrier // *The Lancet Oncology*. 2002. V. 3. № 6. P. 357–363. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(02\)00776-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(02)00776-3)

УДК 57.085.23;544.774.3

НАНОЭМУЛЬСИИ И ТВЕРДЫЕ ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ ДОКСОРУБИЦИНОМ И ТИМОХИНОНОМ

© 2023 г. Е. В. Мищенко¹, *, А. М. Гилёва², Е. А. Марквичева², М. Ю. Королева¹, **

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Миусская пл., д. 9, Москва, 125047 Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997 Россия

*e-mail: mishchenkoek@list.ru,

**e-mail: m.yu.kor@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После доработки 30.07.2023 г.

Принята к публикации 04.08.2023 г.

Наноэмульсии (НЭ) и твердые липидные наночастицы (ТЛН) являются перспективными системами доставки лекарственных соединений. В данной работе были исследованы НЭ из парафинового масла и ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированные Tween 60 и Span 60. НЭ со средним диаметром капель ~50 нм и суспензии ТЛН со средним размером ~30 нм были устойчивы к агрегации более 90 сут. Скорость проникновения липидных частиц в раковые клетки (С6 и MCF-7) зависела от их размера. Липидные наночастицы размером ~50 нм через 1 ч инкубирования проникали внутрь клеток, распределялись в их внутреннем пространстве и концентрировались в ядрах. Цитотоксичность нагруженных доксорубицином или тимохиноном НЭ и ТЛН была выше, чем у данных лекарственных соединений в индивидуальном виде в отношении клеточных линий MCF-7 и НТС 116. При этом ненагруженные НЭ и ТЛН проявляли низкую цитотоксичность. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования НЭ с парафиновым маслом и ТЛН из стеариновой кислоты в качестве носителей липофильных и амфифильных лекарственных соединений, в том числе доксорубина и тимохина. Накопление липидных наночастиц размером менее 100 нм в ядрах клеток является преимуществом таких систем при доставке противораковых лекарственных соединений, т.к. это будет приводить к остановке репликации ДНК и последующему апоптозу клеток.

Ключевые слова: твердые липидные наночастицы, наноэмульсии, доставка лекарственных соединений, тимохин, доксорубин

DOI: 10.31857/S002329122360058X, **EDN:** DHRIGE

1. ВВЕДЕНИЕ

Липофильные лекарственные соединения характеризуются низкой биодоступностью. Поэтому для их доставки требуются носители, в качестве которых могут выступать липидные наночастицы [1]. Липидные наночастицы являются биосовместимыми и биоразлагаемыми наноразмерными системами доставки, которые обладают повышенной проницаемостью и способностью долговременного удерживания лекарственных соединений. Кроме того, инкапсулирование лекарственных соединений в липидных наночастицах экранирует их от внешнего воздействия, защищает от разложения [2].

Для применения в качестве систем доставки лекарственных соединений липидные наночастицы должны обладать долговременной устойчивостью к агрегации и седиментации. НЭ и ТЛН являются термодинамически нестабильными си-

стемами, для которых характерно укрупнение капель дисперсной фазы и частиц с течением времени. При эффективной стабилизации НЭ и ТЛН могут сохранять кинетическую стабильность в течение длительного времени [3]. Липидные наночастицы для биомедицинского применения, как правило, стабилизируют низкотоксичными неионогенными поверхностно-активными веществами (ПАВ). Из-за отсутствия высокого поверхностного заряда в суспензиях ТЛН протекает их агрегация. Основными механизмами деградации НЭ являются агрегация, коалесценция и оствальдово созревание [4, 5]. Устойчивость липидных наночастиц в существенной степени зависит от фазового состояния поверхностного слоя. В работах [6–8] показано, что при образовании твердообразной оболочки из адсорбированных молекул ПАВ на поверхности липидных на-

ночастиц их устойчивость к агрегации существенно повышается.

Использование липидных наночастиц в качестве наноносителей способно решить проблему доставки липофильных лекарственных веществ, снизить побочные эффекты, особенно при доставке противораковых соединений.

В данной работе основное внимание было уделено инкапсулированию в липидные наночастицы таких соединений, как тимохинон и доксорубин. Доксорубин известен достаточно давно и используется в составе различных липосомальных фармацевтических препаратов [9–11]. Однако, несмотря на инкапсулирование доксорубина во внутренней полости липосом, при использовании таких носителей проявляются побочные эффекты [12]. Противоопухолевые свойства тимохинона активно исследуются в последнее время [12–15], в том числе было показано, что тимохинон повышает противоопухолевую активность доксорубина [16].

Инкапсулирование доксорубина проводили в твердые липидные частицы, состоящие из глицерил моностеарата с диаметром (d), равным 96 [17], 84–163 [18] и 240 нм [19]; глицерил капрата ($d = 199$ нм) [20]; глицерил бегената ($d = 74$ –80 нм) [21], пальмитиновой ($d = 278$ нм), стеариновой ($d = 289$ нм), арахидиновой ($d = 303$ нм) и бегеновой кислоты ($d = 305$ нм) [22], масла какао и пальмитиновой кислоты ($d = 141$ –174 нм) [23]; масла какао и стеариновой кислоты ($d = 200$ –250 нм) [24]; стеариновой кислоты ($d = 80$ нм) [25].

Количество исследований по инкапсулированию тимохинона в липидные наночастицы значительно меньше. Описано получение твердых липидных частиц с инкапсулированным тимохиноном из стеариновой кислоты ($d = 172$ нм) [26], Gelucire 44/14 и Capmul MCM ($d = 84$ нм) [27], глицерил моностеарата ($d = 84$ нм) [28], а также наноструктурированных липидных носителей, содержащих масляный раствор тимохинона ($d = 84$ –87 нм) [29], и НЭ с миндальным маслом, стабилизированных Tween 80 ($d = 65$ –320 нм) [30].

Практически во всех публикациях подчеркивается, что цитотоксичность липидных носителей с доксорубином или тимохиноном выше по сравнению с лекарственной формой в виде раствора доксорубина или суспензии тимохинона. По-видимому, основным механизмом проникновения липидных наночастиц в клетки является эндоцитоз [31–34]. При этом в некоторых исследованиях показано, что липидные частицы способны проникать в ядра клеток. Так, в статье [33] обнаружено, что твердые липидные частицы из цетил пальмитата размером 230 нм, стабилизированные Tween 80, через 4 ч инкубирования с клетками MCF-7 проникали в ядра. Эффект на-

копления в ядрах был особенно заметен для липидных частиц с привитой к поверхности фолиевой кислотой. Твердые липидные частицы из стеариновой кислоты, также имевшие размер 230 нм, стабилизированные Pluronic F68 и содержащие протамин, проникали в ядра фибробластов клеточной линии COS через 12 ч инкубирования [35]. Липидные частицы глицерил моностеарата размером 160–245 нм, стабилизированные Tween 80 и Span 20, проникали в ядра келоидных фибробластов через 1 ч инкубирования [36]. Капли НЭ диаметром 20–50 нм, содержащие *Nigella sativa* эфирное масло и стабилизированные Tween 80, не только проникали в клетки MCF-7, но и приводили к фрагментации ядер [37].

Однако липидные наночастицы не всегда проникают в клеточные ядра. Например, капли НЭ, содержащие пальмитат ретинола и α -токоферол, стабилизированные оксиэтилированными ПАВ, с диаметром капель 26–73 нм проникали в эпителиальные клетки и концентрировались вокруг ядер [38]. Капли НЭ диаметром 190 нм, состоящие из Miglyol 812N и стабилизированные фосфолипидами Epikuron 170, Span 80 и Poloxamer 188, не проникали в ядра клеток *Candida albicans* и *Candida tropicalis* [39].

Следует отметить, что факт накопления липидных носителей в ядрах клеток является положительным при доставке противораковых соединений, однако время проникновения не должно быть слишком большим.

В данной работе была исследована дисперсность и агрегативная устойчивость НЭ с дисперсной фазой из парафинового масла и ТЛН из стеариновой кислоты. Были исследованы скорости проникновения и локализация липидных наночастиц в раковых клетках, цитотоксичность НЭ и ТЛН, ненагруженных и нагруженных доксорубином или тимохиноном.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Реактивы и материалы

Для получения НЭ и ТЛН использовали следующие реактивы: парафиновое масло (Britol 20 USP, puriss), стеариновую кислоту (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$) полиоксиэтиленсорбитан моностеарат Tween 60, (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$) сорбитанмоностеарат Span 60 (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$), NaCl (Merck, extra pure). В качестве лекарственных соединений использовали доксорубин (Pharmachemie B.V.) и тимохинон (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$). В качестве флуоресцентных красителей применяли NileRed (Sigma-Aldrich), Neuro-DiO (Biotium), Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific).

Все реактивы дополнительной очистке не подвергали. Для получения НЭ и ТЛН использовали бидистиллированную воду.

2.2. Получение НЭ и ТЛН

НЭ и ТЛН получали методом температурной инверсии фаз [40]. Доля органической фазы составляла 25 об. %. Для стабилизации использовали смесь ПАВ Tween 60 и Span 60 в мольном соотношении 0.76 [8]. Концентрация ПАВ в НЭ была равной 12.5 об. %, в ТЛН – 15 об. %.

Стеклянный сосуд, содержащий парафиновое масло или стеариновую кислоту, смесь ПАВ Tween 60/Span 60 и водный раствор NaCl с концентрацией 0.15 М, нагревали до температуры, превышающей температуру инверсии фаз. Затем смесь охлаждали в ледяной бане с температурой 0°C при интенсивном перемешивании.

При получении нагруженных НЭ и ТЛН лекарственное вещество предварительно растворяли в парафиновом масле или расплаве стеариновой кислоты при 80°C. Далее НЭ и ТЛН получали по описанной выше методике. Концентрация доксорубина или тимохина в НЭ и суспензии ТЛН составляла 15 мас. %.

2.3. Определение размеров капель НЭ и ТЛН

Для определения размера липидных частиц использовали лазерный анализатор Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Анализатор оснащен He-Ne лазером, работающим при длине волны 633 нм, с регистрацией рассеянного света под углом 173°. Распределения по размерам были получены с использованием алгоритма Multiple Narrow Modes. Измерения проводили при 25°C. По результатам не менее трех измерений каждого образца рассчитывали средние значения диаметров наночастиц.

2.4. Исследование проникновения и локализации НЭ и ТЛН в раковых клетках

Изучение проникновения НЭ и ТЛН в раковые клетки проводили на клеточных линиях глиомы головного мозга крысы (C6) и аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7). Для визуализации НЭ и ТЛН окрашивали NileRed (0.1 мг/мл). Для окрашивания мембран и цитоплазмы раковых клеток использовали Neuro-DiO (5 мкг/мл, фосфатный буферный раствор), ядер клеток – Hoechst 33258 (5 мкг/мл, фосфатный буферный раствор).

Проникновение НЭ и ТЛН в клетки детектировали с помощью конфокального инвертированного микроскопа Nikon TE-2000, снабженного конфокальной лазерной системой C1, лазерами Kr (408 нм), Ar (488 нм), G-NeHe (543 нм).

2.5. Исследование цитотоксичности НЭ и ТЛН in vitro

Исследование цитотоксичности НЭ и ТЛН проводили с использованием МТТ-теста на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) и рака толстой кишки человека (HCT-116).

В 96-луночный планшет вносили по 100 мкл раковых клеток (~7500 клеток на лунку), затем планшет помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 ч среду в лунках заменяли средой, содержащей разбавленные НЭ или суспензии ТЛН (разбавление в 40, 50, 80, 100, 160, 320 и 640 раз). Разведение образцов осуществляли средой DMEM с добавлением 10% фосфатного буферного раствора. Клетки, находящиеся в среде с НЭ или ТЛН, инкубировали в течение 24 и 48 ч. Затем из каждой лунки удаляли питательную среду и добавляли 100 мкл среды DMEM без сыворотки, содержащий раствор МТТ (0.5 мг/мл, фосфатный буферный раствор), и оставляли в CO₂-инкубаторе на 3 ч. Затем удаляли раствор МТТ, в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида и помещали на шейкер (S-4 Elmi) на 10 мин. Поглощение измеряли на многоканальном спектрофотометре (Flow Laboratories) на длинах волн 540/690 нм.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Дисперсность и устойчивость НЭ и суспензий ТЛН

Применение маслорастворимых лекарственных соединений ограничено из-за их низкой растворимости в водных средах. Для увеличения биодоступности таких соединений целесообразно использовать в качестве носителей липидные наночастицы, такие как НЭ и ТЛН.

В данной работе были исследованы НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла, и ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60. На рис. 1 приведены распределения по размерам капель дисперсной фазы в НЭ и ТЛН. Распределения по размерам являются мономодальными. Средний диаметр капель дисперсной фазы в НЭ с парафиновым маслом составляет 50 ± 2 нм ($PDI = 0.18$), размер ТЛН из стеариновой кислоты – 30 ± 1 нм ($PDI = 0.11$). При этом размер липидных наночастиц практически не изменялся в течение 90 сут. Это свидетельствует о высокой устойчивости полученных липидных наночастиц к агрегации. Кинетическая стабильность НЭ и суспензий ТЛН обусловлена тем, что оболочка из адсорбированных молекул ПАВ Tween 60 и Span 60 на поверхности липидных наночастиц была твердообразной [6] и препятствовала их агрегации.

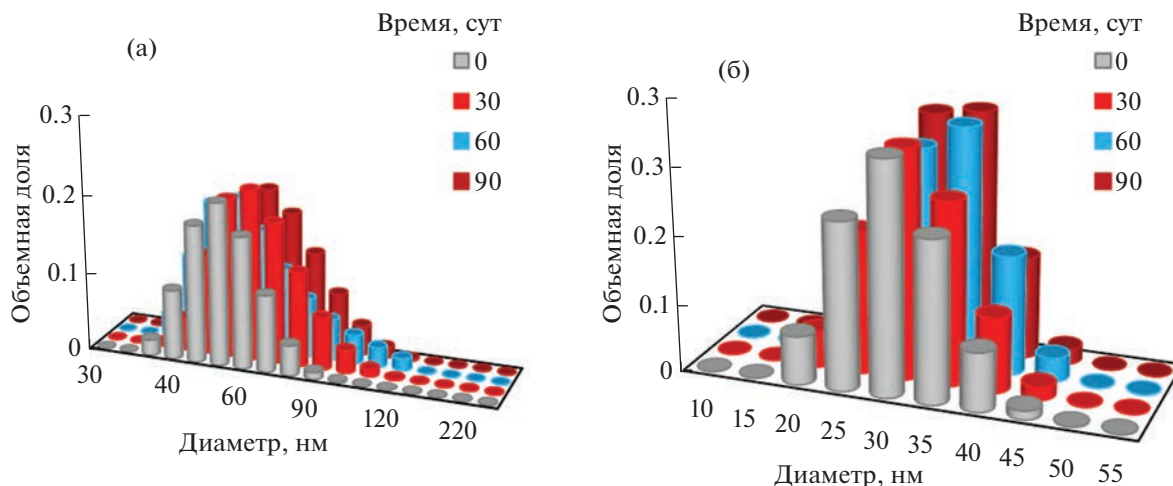


Рис. 1. Распределения по размерам капель дисперсной фазы в НЭ (а) и ТЛН (б) в зависимости от времени.

3.2. Скорость проникновения и локализация НЭ и твердых липидных частиц в раковых клетках

Оценку скорости проникновения и эффективности накопления липидных наночастиц в раковых клетках исследовали *in vitro* методом конфокальной микроскопии. Как известно, скорость проникновения носителей лекарственных соединений в клетки зависит от их размера и состава [41], а также от структуры поверхностного слоя частиц. Поэтому в данной работе была проведена сравнительная оценка скорости проникновения в раковые клетки липидных частиц разного размера, но с одинаковой структурой поверхности [6]. Исследовали НЭ со средним диаметром капель парафинового масла 50 нм, аналогичные рассмотренным в разделе 3.1. Твердые липидные частицы из стеариновой кислоты были существенно крупнее, их средний размер составлял ~200 нм. И капли масла в НЭ, и твердые липидные частицы были стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, т.е. были покрыты оболочкой с одинаковой структурой.

Инкубирование НЭ и твердых липидных частиц с клетками С6 проводили в течение 15 мин и 1 ч. На рис. 2 в качестве примера представлены микрофотографии клеток С6 после 15 мин инкубирования с НЭ и твердыми липидными частицами. За это время капли НЭ диаметром 50 нм проникали в клетки и накапливались в цитоплазме и внутриклеточных органоидах, предположительно в эндосомах и лизосомах, за исключением ядра. При этом более крупные липидные частицы стеариновой кислоты за это время распределялись во внеклеточном матриксе и адсорбировались на клеточной мембране.

Через 1 ч инкубирования капли НЭ распределялись внутри клеток С6 и накапливались в ядрах. Твердые липидные частицы к этому времени

проникали в раковые клетки и распределялись во внутриклеточном матриксе. Различие в скорости проникновения в данном случае было обусловлено разницей в размерах липидных частиц. Так как размер капель НЭ был меньше, чем размер твердых липидных частиц, то скорость их проникновения в клетки оказалась выше.

Аналогичные результаты были получены при контактировании НЭ и твердых липидных частиц с клетками MCF-7. Через 1 ч после начала инкубирования капли НЭ и твердые липидные частицы проникали в клетки (рис. 3). При этом капли НЭ распределялись внутри клеток и накапливались в ядрах. В то время как твердые липидные частицы находились в органеллах, но отсутствовали в ядрах клеток.

Следует отметить, что накопление липидных наночастиц в ядрах клеток является достоинством при доставке противораковых лекарственных соединений, т.к. это будет приводить к остановке репликации ДНК и последующему апоптозу клеток.

3.3. Цитотоксичность НЭ и ТЛН

Как показали исследования по проникновению в раковые клетки, липидные частицы нанометрового размера через 1 ч не только проникают в клетки, но и накапливаются в ядрах. Поэтому была проведена оценка цитотоксичности НЭ со средним диаметром капель парафинового масла 50 нм и ТЛН из стеариновой кислоты со средним размером 30 нм, аналогичных описанным в разделе 3.1. Оценку цитотоксичности проводили на клеточных линиях MCF-7 и HТС 116. Ненагруженные НЭ и ТЛН инкубировали с клетками MCF-7 и HТС 116 в течение 24 и 48 ч. На рис. 4 представлены дозозависимые кривые для

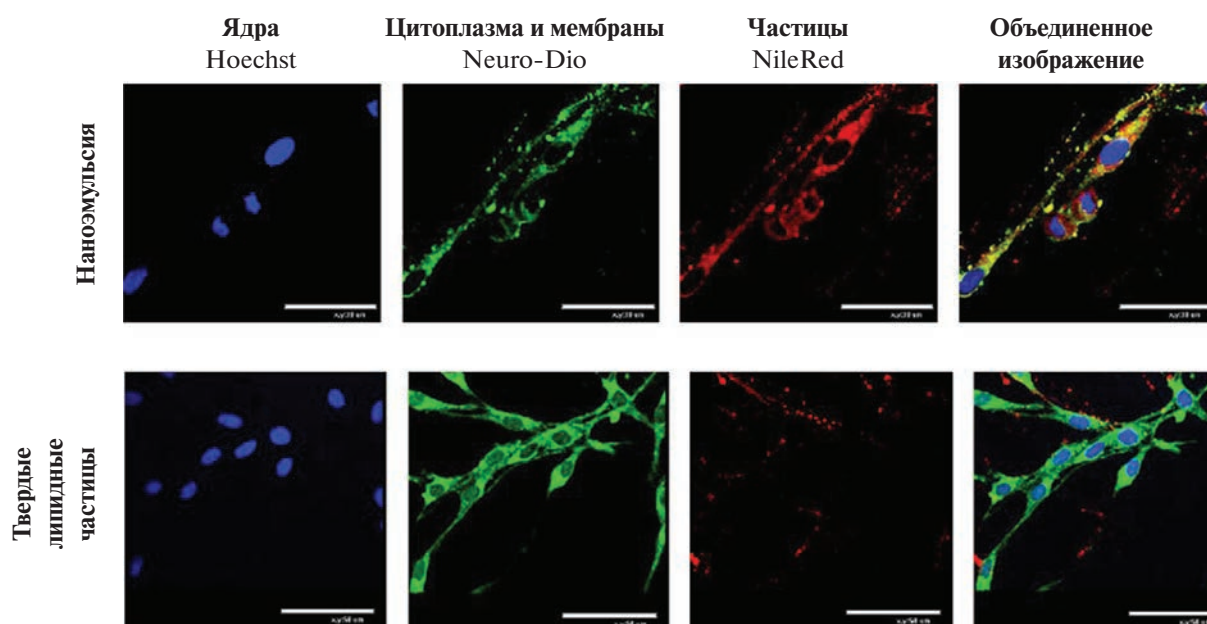


Рис. 2. Клетки C6 после 15 мин инкубирования с НЭ (верхний ряд) и твердыми липидными частицами (нижний ряд). Диаметр капель в НЭ – 50 нм, размер твердых липидных частиц – 200 нм. НЭ и твердые липидные частицы окрашены в красный цвет NileRed, цитоплазма и внутриклеточные мембраны окрашены в зеленый цвет Neuro-DiO, ядра окрашены в синий цвет Hoechst 33258.

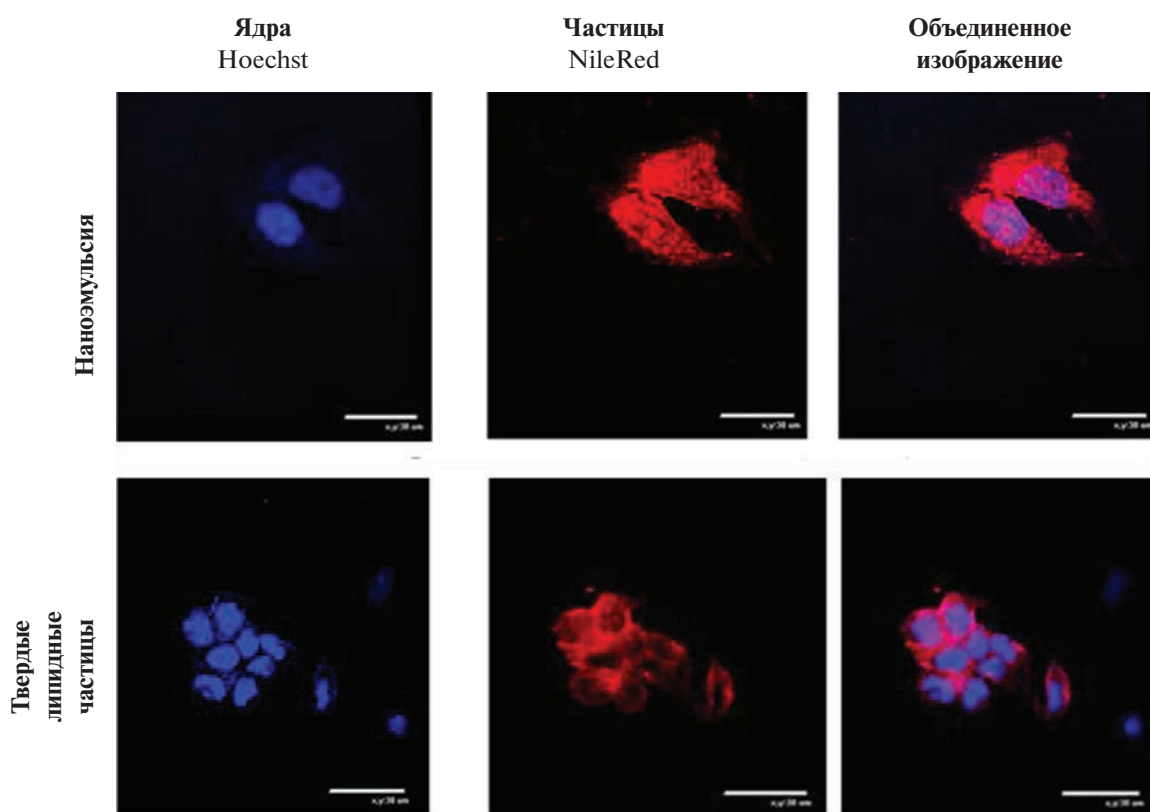


Рис. 3. Клетки MCF-7 после 1 ч инкубирования с НЭ и твердыми липидными частицами. Диаметр капель в НЭ – 50 нм, размер твердых липидных частиц – 200 нм. НЭ и твердые липидные частицы окрашены NileRed, ядра окрашены Hoechst 33258.

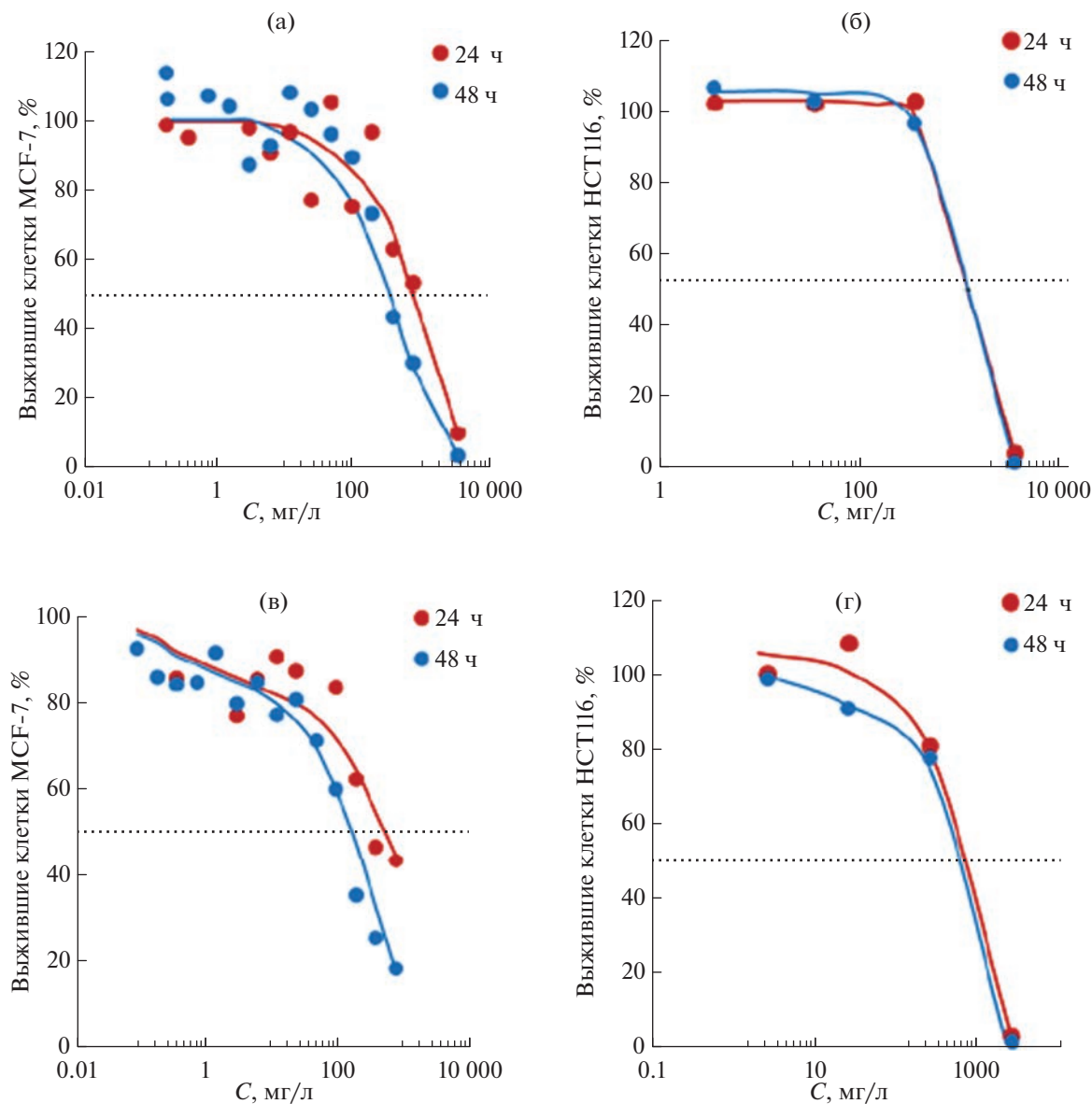


Рис. 4. Зависимости доли выживших клеток MCF-7 (а, в) и НТС 116 (б, г) от концентрации НЭ (а, б) и ТЛН (в, г). Диаметр капель в НЭ – 50 нм, ТЛН – 30 нм.

НЭ и ТЛН, по которым были определены IC_{50} (табл. 1). Из представленных результатов видно, что ТЛН с размером частиц 30 нм проявляли большую цитотоксичность по сравнению с НЭ с размером капель 50 нм. При этом цитотоксичность и НЭ, и ТЛН была низкой, что делает возможным их использование в качестве систем доставки лекарственных соединений.

Также в данной работе была исследована цитотоксичность НЭ и ТЛН, нагруженных противоопухолевыми соединениями доксорубицином и тимохиноном. При инкапсулировании данных лекарственных соединений размер липидных на-

ночастиц практически не изменялся и различался в пределах погрешности измерений.

Тимохинон является липофильным лекарственным соединением и может быть доставлен в клетки только с помощью липидных носителей. Поскольку у него чрезвычайно низкая растворимость в водных средах, определить его цитотоксичность затруднительно. При этом в литературе имеются данные об IC_{50} тимохинона для клеточной линии MCF-7, которая составляет 16.43 мг/л при инкубировании в течение 24 ч и 6.77 мг/л для 48 ч [42, 43].

Октанольное число доксорубицина по литературным данным составляет от 0.04 до 1.85 [44–47], это свидетельствует о том, что данное соединение,

Таблица 1. IC₅₀ при инкубировании раковых клеток с лекарственными соединениями, НЭ и ТЛН

Тип липидных наночастиц и лекарственного соединения	Время инкубирования, ч	Тип раковых клеток	IC ₅₀ , мг/л
НЭ	24	MCF-7	760 ± 38
		HTC 116	~1200
	48	MCF-7	380 ± 19
		HTC 116	~1200
ТЛН	24	MCF-7	525 ± 21
		HTC 116	655 ± 33
	48	MCF-7	157 ± 7
		HTC 116	590 ± 37
Доксорубицин	24	MCF-7	1.30 ± 0.06
		HTC 116	0.60 ± 0.03
	48	MCF-7	0.17 ± 0.01
		HTC 116	0.14 ± 0.01
НЭ + доксорубицин	24	MCF-7	0.52 ± 0.03
		HTC 116	0.39 ± 0.02
	48	MCF-7	0.16 ± 0.01
		HTC 116	0.10 ± 0.01
НЭ + тимохинон	24	MCF-7	7.00 ± 0.50
		HTC 116	7.00 ± 0.50
	48	MCF-7	6.00 ± 0.50
		HTC 116	5.00 ± 0.40
ТЛН + доксорубицин	24	MCF-7	0.35 ± 0.02
		HTC 116	0.34 ± 0.02
	48	MCF-7	0.14 ± 0.01
		HTC 116	0.08 ± 0.01
ТЛН + тимохинон	24	MCF-7	5.00 ± 0.40
		HTC 116	5.00 ± 0.40
	48	MCF-7	6.00 ± 0.50
		HTC 116	5.00 ± 0.40

вероятнее всего, распределяется между органической и водной фазами в дисперсиях липидных наночастиц. При этом доксорубицин является амфифильным и адсорбируется на межфазной поверхности липидных наночастиц.

Для определения цитотоксичности доксорубицина были получены дозозависимые кривые для препарата, растворенного в 0.15 М растворе NaCl. При инкубировании в течение 24 ч IC₅₀ доксорубицина составила 1.30 ± 0.06 и 0.60 ± 0.03 мг/л в отношении клеточных линий MCF-7 и HTC 116 соответственно. При инкубировании в течение 48 ч IC₅₀ была равной 0.17 ± 0.01 и 0.14 ± 0.01 мг/л для кле-

точных линий MCF-7 и HTC 116 соответственно (табл. 1).

Цитотоксичность НЭ и ТЛН, нагруженных доксорубицином, была выше, чем у растворенного в физиологическом растворе лекарственного агента. IC₅₀ для НЭ составляла 0.52 ± 0.03 и 0.39 ± 0.02 мг/л при инкубировании 24 ч в отношении клеточных линий MCF-7 и HTC 116 соответственно. IC₅₀ для ТЛН была равной 0.35 ± 0.02 и 0.34 ± 0.02 мг/л при инкубировании 24 ч в отношении клеточных линий MCF-7 и HTC 116 соответственно. Так как при использовании НЭ и ТЛН для гибели раковых клеток требовались бо-

лее низкие концентрации действующего вещества по сравнению со свободным доксорубицином, растворенным в водной среде, это косвенно подтверждает то, что данное лекарственное соединение доставлялось в клетки в том числе и в составе липидных наночастиц. Таким образом, для достижения необходимого терапевтического эффекта будет требоваться меньшее количество доксорубицина, что будет способствовать уменьшению побочных эффектов.

Цитотоксичность НЭ и ТЛН, нагруженных тимохиноном, была ниже по сравнению с цитотоксичностью липидных наночастиц с доксорубицином. Это соответствует литературным данным о разной цитотоксичности данных соединений. IC_{50} для НЭ составляла 7.0 ± 0.5 мг/л при инкубировании 24 ч в отношении клеточных линий MCF-7 и HTS 116 (табл. 1). IC_{50} для ТЛН составляла 5.0 ± 0.4 при инкубировании в течение 24 ч в отношении клеточных линий MCF-7 и HTS 116.

Следует отметить, что цитотоксичность ТЛН, нагруженных лекарственными соединениями, была немного выше, чем цитотоксичность нагруженных НЭ. Это обусловлено тем, что размер ТЛН из стеариновой кислоты был немного меньше, чем размер капель парафинового масла в НЭ.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доставка липофильных лекарственных соединений, в том числе и тимохинона, возможна только при инкапсулировании их в липидных наночастицах. Применение амфифильного доксорубицина, растворенного в водной среде, сопровождается большим количеством побочных эффектов. Использование НЭ и ТЛН в качестве систем доставки позволяет не только увеличить биодоступность лекарственных соединений, но и снизить их отрицательное воздействие на здоровые ткани.

Исследования показали, что НЭ с размером капель масла ~50 нм и суспензии ТЛН размером ~30 нм, стабилизированные Tween 60 и Span 60, являются устойчивыми к агрегации в течение длительного времени.

Скорость проникновения таких липидных частиц с одинаковой структурой поверхностного слоя в раковые клетки зависит от их размера. Более крупные липидные частицы со средним размером ~200 нм через 1 ч инкубирования проникают внутрь клеток и распределяются во внутриклеточной цитоплазме, более мелкие со средним размером ~50 нм за тот же интервал времени концентрируются в ядрах раковых клеток. Установленный факт накопления липидных наночастиц размером менее 100 нм в ядрах клеток является преимуществом таких систем при доставке противораковых лекарственных соединений, т.к. это

будет приводить к остановке репликации ДНК и последующему апоптозу клеток.

Исследования показали, что ненагруженные липидные наночастицы проявляют низкую цитотоксичность. В то время как цитотоксичность нагруженных доксорубицином или тимохиноном НЭ и ТЛН выше, чем у неинкапсулированных лекарственных соединений. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования НЭ с парафиновым маслом и ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированных Tween 60 и Span 60, в качестве носителей липофильных и амфифильных лекарственных соединений, в том числе доксорубицина и тимохинона.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McClements D.J., Decker E.A., Weiss J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components // J. Food Sci. 2007. V. 72. № 8. P. 109–124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
2. Salah E., Abouelfetouh M.M., Pan Y., Chen D., Xie S. Solid lipid nanoparticles for enhanced oral absorption: A review // Colloids Surf. B. 2020. V. 196. 111305. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111305>
3. Koroleva M.Y., Yurtov E.V. Nanoemulsions: The properties, methods of preparation and promising applications // Russ. Chem. Rev. 2012. V. 81. № 1. P. 21–43. <https://doi.org/10.1070/RC2012v081n01ABEH004219>
4. Koroleva M., Nagovitsina T., Yurtov E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: Stability and degradation mechanisms // PCCP. 2018. V. 20. P. 10369–10377. <https://doi.org/10.1039/C7CP07626F>
5. Mirgorodskaya A.B., Koroleva M.Y., Kushnazarova R.A., Mishchenko E.V., Petrov K.A., Lenina O.A., Vyshtakalyuk A.B., Voloshina A.D., Zakharova L.Y. Microemulsions and nanoemulsions modified with cationic surfactants for improving the solubility and therapeutic efficacy of loaded drug indomethacin // Nanotechnology. 2022. V. 33. 155103. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac467d>
6. Koroleva M., Portnaya I., Mischenko E., Abutbul-Ionita I., Kolik-Shmuel L., Danino D. Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability // J. Colloid Interface Sci. 2022. V. 610. № 3. P. 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.12.010>
7. Мищенко Е.В., Тимофеева Е.Е., Артамонов А.С., Портная И.Б., Королева М.Ю. Наноэмульсии и нанокапсулы с олеиновой кислотой // Коллоид. журн. 2022. Т. 81. № 1. С. 67–73. <https://doi.org/10.31857/S0023291222010086>
8. Koroleva M.Yu., Tokarev A.M., Yurtov E.V. Simulations of emulsion stabilization by silica nanoparticles // Mendeleev Communications. 2017. V. 27. № 5. P. 518–520. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.09.030>

9. O'Shaughnessy J.A. Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer // Clin. Breast Cancer. 2003. V. 4. P. 318–328.
<https://doi.org/10.3816/cbc.2003.n.037>
10. Perez A.T., Domenech G.H., Frankel C., Vogel C.L. Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for metastatic breast cancer: the Cancer Research Network, Inc., experience // Cancer Invest. 2002. V. 20. P. 22–29.
<https://doi.org/10.1081/cnv-120014883>
11. Symon Z., Peyser A., Tzemach D., Lyass O., Sucher E., Shezen E., Gabizon A. Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes // Cancer. 1999. V. 86. P. 72–78.
12. Ballout F., Habli Z., Rahal O.N., Fatfat M., Gali-Muhtasib H. Thymoquinone-based nanotechnology for cancer therapy // Drug Discov. Today. 2018. V. 23. № 5. P. 1089–1098.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.043>
13. Salem A.A., El Haty I.A., Abdou I.M., Mu Y. Interaction of human telomeric G-quadruplex DNA with thymoquinone: A possible mechanism for thymoquinone anticancer effect // Biochimica Biophysica Acta. 2015. V. 1850. № 2. P. 329–342.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.018>
14. Alaaeldin E., Mostafa M., Mansour H.F., Soliman G.M. Spanlastics as an efficient delivery system for the enhancement of thymoquinone anticancer efficacy: Fabrication and cytotoxic studies against breast cancer cell lines // J. Drug Delivery Sci. Technol. 2021. V. 65. 102725.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102725>
15. Afrose S.S., Junaid M., Akter Y., Tania M., Zheng M., Khan M. A. Targeting kinases with thymoquinone: a molecular approach to cancer therapeutics // Drug Discovery Today. 2020. V. 25. № 12. P. 2294–2306.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.019>
16. Fatfat M., Fakhoury I., Habli Z., Mismar R., Gali-Muhtasib, H. Thymoquinone enhances the anticancer activity of doxorubicin against adult T-cell leukemia *in vitro* and *in vivo* through ROS-dependent mechanisms // Life Sci. 2019. V. 232. P. 116628.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116628>
17. Zheng G., Zheng M., Yang B., Fu H., Li Y. Improving breast cancer therapy using doxorubicin loaded solid lipid nanoparticles: Synthesis of a novel arginine-glycine-aspartic tripeptide conjugated, pH sensitive lipid and evaluation of the nanomedicine *in vitro* and *in vivo* // Biomed. Pharmacotherapy. 2019. V. 116. P. 109006.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109006>
18. Ying X.Y., Cui D., Yu L., Du Y.Z. Solid lipid nanoparticles modified with chitosan oligosaccharides for the controlled release of doxorubicin // Carbohydrate Polym. 2011. V. 84. P. 1357–1364.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.037>
19. Jain A., Kesharwani P., Garg N.K., Jain A., Jain S.A., Jain A.K., Jain A.K., Nirbhavane P., Ghanghoria R., Tyagi R.K., Katore O.P. Galactose engineered solid lipid nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin // Colloids Surf. B. 2015. V. 134. P. 47–58.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.06.027>
20. Subedi R.K., Kang K.W., Choi H.K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin // Eur. J. Pharm. Sci. 2009. V. 37. № 3. P. 508–513.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.04.008>
21. Oliveira M.S., Aryasomayajula B., Pattni B., Mussi S.V., Ferreira L.A.M., Torchilin V.P. Solid lipid nanoparticles co-loaded with doxorubicin and α -tocopherol succinate are effective against drug-resistant cancer cells in monolayer and 3-D spheroid cancer cell models // Int. J. Pharm. 2016. V. 512. № 1. P. 202–300.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.049>
22. Battaglia L., Gallarate M., Peira E., Chirio D., Muntoni E., Biasibetti E., Capucchio M.T., Valazza A., Panciani P.P., Lanotte M., Schiffer D., Annovazzi L., Caldera V., Mellai M., Riganti C. Solid lipid nanoparticles for potential doxorubicin delivery in glioblastoma treatment: Preliminary *in vitro* studies // J. Pharm. Sci. 2014. V. 103. № 7. P. 2157–2165.
<https://doi.org/10.1002/jps.24002>
23. Kuo Y.C., Lee I.H. Delivery of doxorubicin to glioblastoma multiforme *in vitro* using solid lipid nanoparticles with surface aprotinin and melanotransferrin antibody for enhanced chemotherapy // J. Taiwan Institute Chem. Eng. 2016. V. 61. P. 32–45.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.012>
24. Kuo Y.C., Liang C.T. Catanionic solid lipid nanoparticles carrying doxorubicin for inhibiting the growth of U87MG cells // Colloids Surf. B. V. 85. № 2. P. 131–137.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.011>
25. Miglietta A., Cavalli R., Bocca C., Gabriel L., Gasco R.M. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel // Int. J. Pharm. 2000. V. 210. № 1–2. P. 61–67.
[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(00\)00562-7](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(00)00562-7)
26. Ramachandran S., Thangarajan S. A novel therapeutic application of solid lipid nanoparticles encapsulated thymoquinone (TQ-SLNs) on 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease-like symptoms in wistar rats // Chem. Biol. Interact. 2016. V. 256. P. 25–36.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.020>
27. Ali A., Ali S., Aqil M., Imam S.S., Ahad A., Qadir A. Thymoquinone loaded dermal lipid nano particles: Box Behnken design optimization to preclinical psoriasis assessment // J. Drug Delivery Sci. Technol. 2019. V. 52. P. 713–721.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.041>
28. Alam M., Zameer S., Najmi A.K., Ahmad F.J., Imam S.S., Akhtar M. Thymoquinone loaded solid lipid nanoparticles demonstrated antidepressant-like activity in rats via indoleamine 2,3-dioxygenase pathway // Drug Research. 2020. V. 70. № 5. P. 1131–7793.
<https://doi.org/10.1055/a-1131-7793>
29. Qizilbash F.F., Ashhar M.U., Zafar A., Qamar Z., Annu A.J., Baboota S., Ghoneim M.M., Alshehri S., Ali A. Thymoquinone-enriched naringenin-loaded nanostructured lipid carrier for brain delivery via nasal route: *In vitro* prospect and *in vivo* therapeutic efficacy for the treatment of depression // Pharm. 2022. V. 14. № 3. P. 656.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030656>
30. Radwan M.F., El-Moselhy M.A., Alarif W.M., Orif M., Alruwaili N.K., Alhakamy N.A. Optimization of thymoquinone-loaded self-nanoemulsion for management of indomethacin-induced ulcer // Dose-Response. 2021. V. 19. № 1. 15593258211013655.
<https://doi.org/10.1177/15593258211013655>

31. Desai J., Thakkar H. Enhanced oral bioavailability and brain uptake of Darunavir using lipid nanoemulsion formulation // Colloids Surf. B. 2018. V. 175. P. 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.057>
32. Chawla J.S., Amiji M.M. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen // Int. J. Pharm. 2002. V. 249. № 1–2. P. 127–138. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00483-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00483-0)
33. Granja A., Nunes C., Sousa C.T., Reis S. Folate receptor-mediated delivery of mitoxantrone-loaded solid lipid nanoparticles to breast cancer cells // Biomed. Pharmacotherapy. 2022. V. 154. P. 113525. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113525>
34. Parvez S., Karole A., Mudavath S.L. Transport mechanism of hydroxy-propyl-beta-cyclodextrin modified solid lipid nanoparticles across human epithelial cells for the oral absorption of antileishmanial drugs // BBA. 2022. V. 1866. № 8. P. 130157. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130157>
35. Vighi E., Montanari M., Ruozzi B., Tosi G., Magli A., Leo E. Nuclear localization of cationic solid lipid nanoparticles containing Protamine as transfection promoter // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2010. V. 76. № 3. P. 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.07.012>
36. Gao Y., Cheng X., Wang Z., Wang J., Gao T., Li P., Kong M., Chen X. Transdermal delivery of 10,11-methylenedioxycompotohecin by hyaluronic acid based nanoemulsion for inhibition of keloid fibroblast // Carbohydr. Polym. 2014. V. 112. P. 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.026>
37. Periasamy V.S., Athinarayanan J., Alshatwi, A.A. Anti-cancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa* L. essential oil on human breast cancer cells // Ultrason. Sonochem. 2016. V. 31. P. 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.035>
38. Miyake M., Kakizawa Y., Tobori N., Kurioka M., Tabuchi N., Kon R., Shimokawa N., Tsujino, Y., Takagi M. Membrane permeation of giant unilamellar vesicles and corneal epithelial cells with lipophilic vitamin nanoemulsions // Colloids Surf. B. 2018. V. 169. P. 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.052>
39. Rodrigues G.B., Brancini G.T.P., Pinto M.R., Primo F.L., Wainwright M., Tedesco A.C., Braga G.Ú.L. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* with aluminum phthalocyanine chloride nanoemulsion // Fungal Biology. 2020. V. 124. № 5. P. 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.08.004>
40. Izquierdo P., Feng J., Esquena J., Tadros T.F., Dederen J.C., Garcia M.J., Azemar N., Solans C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method // J. Colloid Interface Sci. 2005. V. 285. № 1. P. 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.047>
41. Joshi M.D., Muller R.H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009. V. 71. № 2. P. 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.003>
42. Salmani J.M., Asghar S., Lv H., Zhou J. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; Probing the effects of solvents, pH and light // Molecules. 2014. V. 19. № 5. P. 5925–5939. <https://doi.org/10.3390/molecules19055925>
43. Motaghd M., Al-Hassan F.M., Hamid, S.S. Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF-7 // Pharmacognosy Res. 2012. V. 5. № 3. P. 200–206. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.112428>
44. Parisi C., Moret F., Fraix A., Menilli L., Failla M., Sodano F., Conte C., Quaglia F., Reddi E., Sortino S. Doxorubicin–NO releaser molecular hybrid activatable by green light to overcome resistance in breast cancer cells // ACS Omega. 2022. V. 7. № 9. P. 7452–7459. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03988>
45. Tian Y., Tam M.K., Hatton, T.A., Bromberg, L. Titration microcalorimetry study: Interaction of drug and ionic microgel system // Chemistry. 2004. P. 1–5. <http://hdl.handle.net/1721.1/3953>
46. Akter H., Rashid Md.M., Islam Md.S., Hossen Md.A., Rahman Md.A., Algheshairy R.M., Almujaaydil M.S., Alharbi H.F., Alnajeebi A.M. Biometabolites of *Tamarindus indica* play a remarkable cardioprotective role as a functional food in doxorubicin-induced cardiotoxicity models // J. Func. Foods. 2022. V. 96. P. 105212. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105212>
47. Hansch C., Leo A., Hoekman D. Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington: American Chemical Society, 1995.

УДК 544.77

МИКРОЭМУЛЬСИИ ЛЕЦИТИНА КАК НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2023 г. Н. М. Мурашова*

*Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
Миусская пл., 9, Москва, 125047 Россия*

**e-mail: namur_home@mail.ru*

Поступила в редакцию 29.06.2023 г.

После доработки 29.07.2023 г.

Принята к публикации 03.08.2023 г.

В работе описаны примеры микроэмульсий на основе широко известного биосовместимого поверхностно-активного вещества (ПАВ) лецитина и возможности их применения в качестве носителей лекарственных веществ. Основной проблемой при разработке микроэмульсий лецитина является поиск подходящих соПАВ. Для получения микроэмульсий лецитина в качестве соПАВ лучше всего подходят молекулы с короткой алкильной цепью (4–5 атомов С) и относительно большой полярной “головой”, например короткоцепочечные алифатические спирты, кислоты и амины; при этом требуются высокие концентрации соПАВ (массовое соотношение соПАВ : лецитин обычно составляет 1 : 1). Чаще всего для получения микроэмульсий лецитина в различных природных и синтетических маслах в качестве соПАВ используют этанол, *n*-пропанол или *n*-бутанол. Чтобы заменить токсичные спирты на менее токсичные компоненты, в микроэмульсии лецитина можно ввести другие известные ПАВ, такие как Brij 96V (полиэтиленгликольолеат), Tween 80 (полиоксиэтилен-20-сорбитанмоноолеат), Tween 20 (полиоксиэтилен-20-сорбитанмонолаурат), Тритон X-100 (трет-октилфениловый эфир полиэтиленгликоля) или олеиновую кислоту. Описаны композиции на основе микроэмульсий лецитина для местной анестезии, для доставки витаминов, с противовоспалительным, противогрибковым, противораковым и ранозаживляющим действием. Рассмотренные примеры показывают перспективность исследования и разработки микроэмульсий лецитина как носителей лекарственных веществ.

Ключевые слова: лецитин, микроэмульсии, подбор соПАВ, доставка лекарственных веществ

DOI: 10.31857/S0023291223600517, **EDN:** DMFLDC

ВВЕДЕНИЕ

Перспективными носителями лекарственных веществ являются лиофильные коллоидные системы, образованные молекулами поверхностно-активных веществ (ПАВ), такие как микроэмульсии (МЭ). Для них характерно самопроизвольное образование при смешивании нужных компонентов в заданных условиях; теоретически, при неизменном составе и условиях, МЭ способны существовать бесконечно долго. Следствием термодинамической устойчивости МЭ являются их преимущества с точки зрения фармацевтической технологии — зависимость свойств МЭ только от их состава, а не от условий смешивания компонентов, простота методов получения, высокая воспроизводимость свойств, длительные сроки хранения.

В качестве достоинств МЭ как носителей лекарственных веществ можно указать возможность включения в их состав биологически активных веществ с различными физико-химическими свойствами. Для МЭ, имеющих капли размером в

единицы и десятки нанометров, характерна высокая удельная поверхность на границе “масло-вода”, что приводит к более высокой скорости диффузии биологически-активных веществ из капель МЭ по сравнению с обычными эмульсиями. Внутренний объем капель МЭ существенно больше, чем у мицелл, что обеспечивает их более высокую солюбилизационную емкость. Таким образом, в МЭ сочетается ряд достоинств эмульсионных и мицеллярных систем. Чаще всего МЭ предлагаются для нанесения на кожу (для местного действия и для трансдермального введения лекарственных веществ) и на слизистые оболочки носа и глаз, известны примеры МЭ для перорального введения. В последние годы опубликован ряд обзорных работ, посвященных применению МЭ, образованных различными синтетическими и природными ПАВ, для адресной доставки лекарственных веществ [1–6].

Основной недостаток МЭ — наличие ПАВ и соПАВ в высоких концентрациях. МЭ, предназначен-

ные для фармацевтики, должны содержать нетоксичные биосовместимые компоненты. В качестве нетоксичного ПАВ для получения МЭ перспективно использовать лецитин, который является основным липидным компонентом клеточных мембран.

Нужно отметить, что в биохимии слово “лецитин” часто является синонимом *sn*-3-фосфатидилхолина (или L- α -фосфатидилхолина). В пищевой промышленности термин “лецитин” часто используют для обозначения смеси фосфолипидов с преобладанием фосфатидилхолина. В основном лецитин и другие фосфолипиды применяют в качестве эмульгаторов в пищевой и косметической промышленности, фармацевтике, а также как пищевые и биологически активные добавки. В США лецитин относится к категории пищевых добавок GRAS (Generally recognized as safe — общепризнанных как безопасных) и не имеет максимальной суточной дозы [7].

В отсутствие соПАВ, в трехкомпонентных системах, содержащих лецитин, масло и воду, в области высоких концентраций лецитина существуют жидкокристаллические мезофазы [8–11], а при более низких его концентрациях — обратные мицеллы различной формы: сферические, как в системе лецитин–бензол–вода [11, 12], либо цилиндрические, которые в алифатических углеводородах могут формировать структуру лецитиновых органодел [11, 13, 14]. Полагают, что лецитин — это излишне липофильный ПАВ, неспособный образовывать на межфазной границе гибкий монослой с нулевой спонтанной кривизной, который необходим для формирования сбалансированной (т.е. способной включать сравнимые количества воды и масла) МЭ. Поэтому для получения МЭ необходимо введение соПАВ, которое повысит гибкость монослоя и изменит его спонтанную кривизну [15]. Для разработки МЭ лецитина, предназначенных для медицины или косметики, необходимо подбирать одно или несколько биосовместимых соПАВ и применять биосовместимые масла, что, с учетом склонности лецитина к формированию жидкокристаллических фаз, является сложной, нетривиальной задачей и требует значительных усилий для ее решения.

В работе рассмотрены известные МЭ лецитина в различных четырех- и многокомпонентных системах и примеры их применения в качестве носителей лекарственных веществ.

МИКРОЭМУЛЬСИИ ЛЕЦИТИНА В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ

Микроэмульсии в четырехкомпонентных системах лецитин–соПАВ–масло–вода

Первой статьей, посвященной микроэмульсиям лецитина, считают работу Shinoda с соавт., опубликованную в 1991 году [16], в которой опи-

сана МЭ в системе соевый лецитин–гексадекан–*n*-пропанол–вода при концентрации пропанола в воде 10–15 мас. %. При низкой концентрации лецитина, равной 1 мас. %, микроэмульсионная фаза существует в равновесии с водной и органической фазами (система типа Винзор III), а при содержании лецитина выше 2.3 мас. % образуется только микроэмульсионная фаза (система типа Винзор IV). При уменьшении концентрации *n*-пропанола происходит постепенное изменение структуры МЭ от прямой к бинепрерывной и обратной [16].

Aboofazeli с соавт. в 1993–1994 годах опубликовали ряд статей по исследованию МЭ лецитина в четырехкомпонентных системах лецитин–соПАВ–органический растворитель–вода [17–20]. Было показано, что для систем лецитин–спирт–изопропилмиристат–вода тип использованного лецитина — соевый или яичный, практически не влияет на размер и форму области существования МЭ. Авторами были использованы такие спирты, как *n*-пропанол, *n*-бутанол, *n*-пентанол, изопропанол, изобутанол, *втор*-бутанол, *трет*-бутанол [17]. Для систем лецитин–короткоцепочечные спирты–изопропилмиристат–вода, содержащих лецитин с различной концентрацией основного вещества (92 и 68–72 мас. % фосфатидилхолина), было установлено, что везде образуется обратная МЭ. Вид фазовых диаграмм был сходным, но при концентрациях масла ниже 50 мас. % наблюдалось существенное различие в ширине области существования МЭ [18].

На фазовых диаграммах систем лецитин–изопропилмиристат–соПАВ–вода были показаны области существования МЭ при соотношении ПАВ : соПАВ = 1 : 1 [19], в качестве соПАВ были рассмотрены алифатические кислоты — *n*-гексановая и *n*-пентановая; амины и диолы различного строения — 2-аминопентан, 3-аминопентан, *втор*-бутиламин и *трет*-бутиламин, 1,2-гександиол, 1,2-пентандиол, 1,2-бутандиол; моногексильный, монопентильный и монобутиловый эфиры диэтиленгликоля; алифатические спирты с различным количеством углеродных атомов и расположением ОН-группы — *n*-бутанол, *втор*-бутанол, *трет*-бутанол, *n*-пентанол, 2-пентанол и 3-пентанол, а также *n*-гексанол. Области существования сбалансированной МЭ, способной включать примерно одинаковые количества масла и воды, были показаны для *втор*- и *трет*-бутиламина, 2- и 3-аминопентана и для 1,2-пентандиола. Для других рассмотренных соПАВ показаны области существования только обратных МЭ. Можно полагать, что для формирования МЭ лецитина в изопропилмиристате лучше всего подходит соПАВ с короткой алкильной цепью и относительно большой полярной “головой”. На рис. 1 представлены примеры областей существования МЭ в системах лецитин–изопропилмиристат–соПАВ–вода при

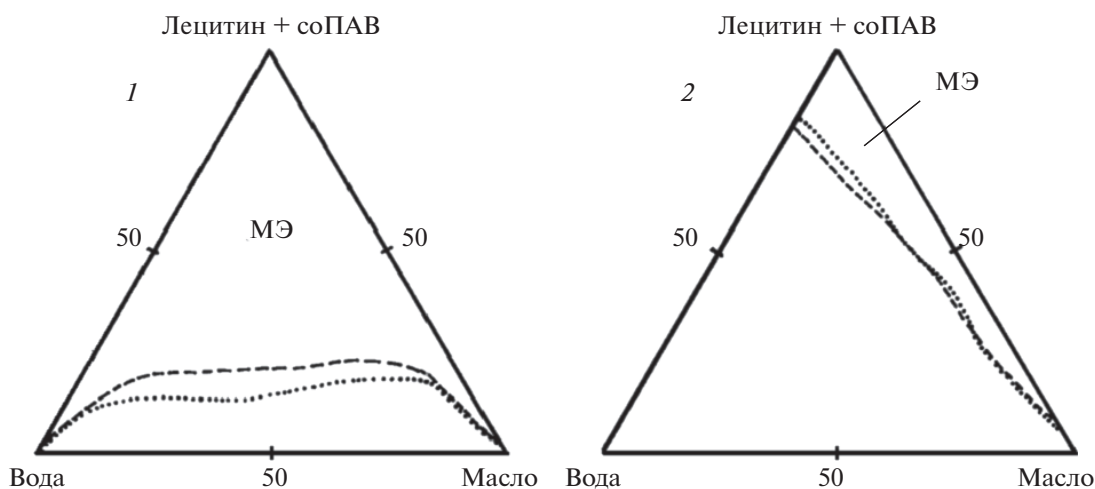


Рис. 1. Примеры областей существования сбалансированной (1) и обратной (2) МЭ лецитина в системах лецитин—изо-пропилмирицилат—соПЛАВ—вода при массовом соотношении лецитин : соПЛАВ, равном 1 : 1. СоПЛАВ: 1 — 2-аминопентан (пунктир) и 3-аминопентан (точки); 2 — *n*-пентановая кислота (пунктир) и *n*-гексановая кислота (точки) [19].

массовом соотношении лецитин : соПЛАВ, равном 1 : 1; при использовании в качестве соПЛАВ 2-аминопентана и 3-аминопентана образуется сбалансированная МЭ (диаграмма 1), а при использовании *n*-пентановой и *n*-гексановой кислоты — обратная МЭ с относительно узкой областью существования (диаграмма 2) [19].

Области существования обратных МЭ были показаны для систем лецитин—масло—*n*-пропанол или *n*-бутанол—вода, содержащих ряд масел со снижающейся полярностью: октановая и олеиновая кислоты, этилоктаноат, этилолеат, Migliol 812 (синтетические триглицериды), соевое масло. МЭ с наиболее широкой областью существования наблюдались в системах, содержащих этилоктаноат и этилолеат, в присутствии как бутанола, так и пропанола при различных их соотношениях с лецитином, а также в системе, содержащей соевое масло, при массовом соотношении лецитин : пропанол, равном 1 : 1 [20].

На примере синтетических лецитинов с углеводородными “хвостами” одинаковой длины C_8 — C_{16} и *n*-алканов C_8 — C_{16} были выявлены следующие закономерности: для получения МЭ на основе короткоцепочечных лецитинов лучше подходит *n*-бутанол, требуемое для получения МЭ количество бутанола возрастает с уменьшением числа атомов С в молекулах лецитина; для получения МЭ на основе длинноцепочечных лецитинов в системах с короткоцепочечными алканами в качестве соПЛАВ лучше подходит *n*-пропанол; при этом для МЭ в одинаковых растворителях нужно количество спирта увеличивается с ростом числа углеродных атомов в молекулах лецитина. Увеличение количества атомов С в молекуле алкана действует аналогично укорочению цепей в молекуле лецитина: приводит к уменьшению количе-

ства пропанола и к увеличению количества бутанола, необходимого для образования МЭ. Получается, что для формирования МЭ на основе соевого лецитина, содержащего длинные углеводородные “хвосты”, в алканах с длинной цепью лучше всего подходит *n*-бутанол, а в алканах с короткой цепью — пропанол [21]. Формирование МЭ в системах с циклогексаном и синтетическими короткоцепочечными лецитинами также изучено в работе [22].

Были описаны обратные МЭ в системах, содержащих лецитин, *n*-пропанол или *n*-бутанол, изеооктан и воду. Для системы с пропанолом был продемонстрирован переход от МЭ с изолированными каплями к перколированной обратной МЭ при мольном соотношении воды и лецитина $W > 30$ [23]. Методом микрокалориметрии было исследовано образование МЭ при титровании водой раствора лецитина в смеси *n*-бутанола и изеооктана; показано взаимодействие воды с молекулами лецитина и бутанола, что приводит к образованию обратных мицелл или капель обратной МЭ [24].

Таким образом, можно отметить, что формированию МЭ лецитина лучше всего способствует использование в качестве соПЛАВ молекул с короткой алкильной цепью (4–5 атомов С) и относительно большой полярной “головой”, которые должны эффективно встроиться в монослой молекул лецитина и повысить его гибкость; при этом требуется высокая концентрация соПЛАВ (массовое соотношение лецитин : соПЛАВ обычно составляет 1 : 1). Эффективность соПЛАВ зависит от длины цепей в молекуле лецитина и углеводородного растворителя, а также от полярности масла. Чаще всего для получения МЭ лецитина в различных

растворителях в качестве соПАВ использовали *n*-пропанол и *n*-бутанол.

Микроэмульсии лецитина в четырехкомпонентных системах с биосовместимыми маслами

Кроме упомянутого выше изопропилмиристиата [17], в качестве компонентов МЭ лецитина были рассмотрены другие природные и синтетические масла. Например, в работе [25] для создания МЭ лецитина было предложено использовать лимонен — вещество из класса терпенов, обладающее приятным запахом и используемое в парфюмерии и косметике. Была показана широкая область существования МЭ типа “вода в масле” для соПАВ *n*-пропанола и узкая область существования обратной МЭ (не более 10 мас. % воды) для соПАВ 1,2-пропандиола; исследование проводили при массовом соотношении лецитин : спирт, равном 1 : 1, и $T = 30^\circ\text{C}$. С помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса было установлено, что в случае *n*-пропанола монослой ПАВ обладает большей гибкостью, чем в случае 1,2-пропандиола; этим фактом авторы объясняют большую ширину области существования МЭ при применении в качестве соПАВ *n*-пропанола [25].

Для создания МЭ лецитина были успешно использованы синтетические масла, применяемые в косметических композициях, такие как МСТ (смесь триацилглицеридов $\text{C}_8\text{—C}_{10}$) и Ресеол (смесь моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот, в основном олеиновой). Для систем соевый лецитин—масло МСТ—соПАВ—вода были показаны области существования МЭ и фазовые равновесия с участием прямых, обратных и бинепрерывных МЭ и лиотропных жидких кристаллов. В качестве соПАВ были рассмотрены алифатические спирты *n*-пропанол, *n*-бутанол, *трет*-бутанол и *n*-пентанол. Структура МЭ зависела от использованного соПАВ: например, для МЭ с содержанием 20 мас. % спирта, 25–30 мас. % лецитина и равных количеств масла и воды в присутствии *n*-пропанола наблюдалось образование прямой МЭ, *n*-пентанола — обратной, *n*-бутанола — бинепрерывной или обратной [26]. Было исследовано образование МЭ в системе, содержащей соевый лецитин, этанол, масло Ресеол и воду при варьировании соотношения лецитин : этанол. Наилучшее для получения МЭ массовое соотношение лецитин : этанол составило 60 : 40, при нем достигалась максимальная площадь области существования обратной МЭ [27]. Этанол как биосовместимое соПАВ предлагался также для получения МЭ в изопропилмиристате — была показана область существования обратных МЭ при массовом соотношении лецитин : этанол, равном 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1 и 3 : 1 [28].

Известны МЭ лецитина в природных растительных маслах, которые являются смесью триацилглицеридов, содержащих в основном остатки

жирных кислот с 16 и 18 атомами углерода. Определена область существования МЭ в системе с рапсовым маслом, соевым лецитином (с содержанием фосфатидилхолина 63.6 мас. %), *n*-пропанолом и водой. МЭ существует при высоком содержании лецитина и спирта, при этом соотношение лецитин : пропанол (мас.) составляло: 67 : 33, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60. [29]. В аналогичной системе с подсолнечным маслом определена область существования МЭ при соотношении лецитин : пропанол (мас.), равном 2 : 1. МЭ также образуется при высоких концентрациях лецитина и пропанола [30]. Была определена область существования МЭ в системе лецитин (63.6 мас. % фосфатидилхолина)—оливковое масло—*n*-пропиловый спирт—вода [31] и в системе лецитин—соевое масло—*n*-пропиловый спирт—вода при массовом соотношении лецитин : пропанол, равном 1 : 1 [32].

Таким образом, показана возможность получения МЭ лецитина в природных маслах, таких как рапсовое, подсолнечное, оливковое и соевое, а также в синтетических биосовместимых растворителях, применяемых в косметике, таких как изопропилмиристат, МСТ (смесь триацилглицеридов $\text{C}_8\text{—C}_{10}$) и Ресеол (смесь моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот, в основном олеиновой). Но в качестве соПАВ при этом в основном использовались короткоцепочечные алифатические спирты *n*-пропанол или этанол в высоких концентрациях (как правило, при массовом соотношении лецитин : спирт, равном 1 : 1), что имеет ограничения подходит для медицинского применения.

Для разработки МЭ лецитина, пригодных для применения в фармацевтике и пищевой промышленности, недостаточно только подобрать биосовместимые масла, необходимо еще решить более сложную задачу: заменить токсичные соПАВ (короткоцепочечные спирты, амины, диолы, кислоты) на нетоксичные. Для решения этой задачи многие авторы пошли путем усложнения состава разрабатываемых МЭ, вводя дополнительные биосовместимые ПАВ.

Микроэмульсии в четырех- и пятикомпонентных системах, содержащих лецитин и другие ПАВ

Для применения в фармацевтике были предложены МЭ, содержащие, кроме лецитина, еще одно биосовместимое ПАВ и алифатические спирты с короткой цепью, такие как этанол, *n*-пропанол и *n*-бутанол. Например, показана область существования сбалансированной МЭ в системе лецитин—лизолецитин—*n*-бутанол—изопропилмиристат—вода при соотношениях (мас.) лизолецитин : лецитин 0.7 : 1; 1.4 : 1 и 2.1 : 1, при этом массовое соотношение (лецитин + лизолецитин) : бутанол составляло 1 : 1. МЭ с более узкой областью существования получались при использовании в

качестве соПАВ *n*-пропанола или этанола и при изменении массового соотношения (лецитин + лизолецитин) : спирт с 1 : 1 на 2 : 1 [32]. Были получены МЭ и определены их области существования в системах лецитин–синтетические *n*-алканолфосфохолины C₆–C₁₂–этанол, *n*-пропанол или *n*-бутанол–изопропилмиристант–вода [33]. МЭ с относительно узкой областью существования образуются также в системах, содержащих лецитин, децилгликозид или каприл-каприлилгликозид, изопропилмиристант, этанол и воду [34].

Описаны МЭ, содержащие лецитин и еще одно известное ПАВ, и не содержащие спирты. Было исследовано образование МЭ в системах лецитин–Brij 96V (полиэтиленгликольолеат)–изопропилмиристант–вода [35] и лецитин–Tween 80 (полиоксиэтилен-20-сорбитанмоноолеат)–изопропилмиристант–вода [36]. В системе лецитин + Tween 20 (полиоксиэтилен-20-сорбитанмонолаурат) в соотношении 1 : 1 (мас.) – Captex 200 (пропиленгликоль дикаприлат/дикапрат) – вода наблюдалось формирование как обратной, так и прямой МЭ [37]. Образование прямой МЭ наблюдалось также в системах соевый лецитин–Tween 80–этилолеат или соевое масло–вода, массовое соотношение лецитин : Tween 80 составляло 0.3 [38], но поскольку в рассмотренных системах количество лецитина меньше, чем Tween 80, т.е. это уже МЭ Tween 80, а не лецитина.

Описаны МЭ в пятикомпонентных системах, содержащих лецитин, другие биосовместимые ПАВ и не содержащих спирты. Например, показаны равновесия микроэмульсионной фазы с водной и органической фазами (равновесия типа Винзор I, II и III) и существование МЭ как одной фазы (Винзор IV) в системах лецитин–смесь рамнолипида и софоролипида (ПАВ микробного происхождения)–масло–вода; в качестве масел использовали декан, гексадекан, лимонен и изопропилмиристант [39]. Изучена область существования МЭ в системе лецитин–Тритон X-100 (*трет*-октилфениловый эфир полиэтиленгликоля)–изопропилмиристант–бутиллактат–вода при соотношении (мас.) лецитин : Тритон X-100 : бутиллактат = 1 : 1 : 4 [40]. Отметим, что в описанных системах доля лецитина в смеси ПАВ и соПАВ составляла не более 25 мас. %, то есть лецитин не являлся основным ПАВ, образующим МЭ.

Acosta с соавт. [41–43] предложил заменить традиционные соПАВ в составе МЭ лецитина комбинацией липофильного и гидрофильного линкеров – молекул–“связок”, которые располагаются вблизи границы “масло–вода” со стороны органической и водной фаз соответственно. Молекулы линкеров можно рассматривать как “асимметричные ПАВ”, которые “связывают” межфазную границу (монослой ПАВ) с водной или органической фазой; при этом в отсутствие

лецитина (основного ПАВ) введение комбинации липофильного и гидрофильного линкеров не приводит к формированию МЭ. Таким образом, для создания МЭ лецитина вместо токсичных спиртов можно использовать сочетание биосовместимых ПАВ-линкеров. Этот подход был успешно применен для получения сбалансированной МЭ в системе, содержащей лецитин, липофильный линкер Span 80 (сорбитанмоноолеат), гидрофильный линкер смесь каприловой кислоты и каприлата натрия, изопропилмиристант и воду [41, 42]. Образование МЭ показано также в системе лецитин–липофильный линкер глицеролмоноолеат–гидрофильный линкер полиглицерол каприлат–этилкаприлат–модельное содержимое тонкого кишечника [43].

Таким образом, был предложен ряд составов МЭ лецитина, где в качестве соПАВ в основном рассматривались короткоцепочечные алифатические спирты – *n*-пропанол, *n*-бутанол, этанол. Попытки отказаться от использования спиртов приводили к усложнению состава МЭ: предлагалось введение еще одного или двух ПАВ в количествах, сопоставимых с содержанием лецитина, или комбинации гидрофильного и липофильного линкеров. При таком подходе количество лецитина в смеси ПАВ и соПАВ становится значительно меньше 50 мас. %, т.е. лецитин перестает быть основным ПАВ, образующим МЭ. Поэтому необходим поиск других биосовместимых соПАВ, которые будут присутствовать в системе в относительно небольших количествах и при этом способствовать образованию МЭ лецитина.

Для создания МЭ лецитина, предназначенных для медицинского применения, было предложено использовать в качестве соПАВ олеиновую кислоту [44, 45]. Наличие относительно небольшой полярной “головы” (карбоксильной группы) и изогнутого углеводородного “хвоста” (олеиновая кислота – это *цис*-изомер) дает олеиновой кислоте возможность повышать гибкость монослоя ПАВ на границе “масло–вода” и изменять спонтанную кривизну монослоя в сторону отрицательных значений, что должно способствовать формированию обратной МЭ.

Было показано [44, 45], что в системе лецитин–олеиновая кислота–додекан–вода при соотношении молярных концентраций олеиновой кислоты и лецитина $C_{ол}/C_{лец} > 0.6$ наблюдается образование обратной МЭ, имеющей размер капель в несколько нанометров. Область существования МЭ в указанной системе при $C_{ол}/C_{лец} = 0.8$ и, для сравнения, лецитиновых органогелей при $C_{ол}/C_{лец} = 0.1$ приведена на рис. 2. Область существования МЭ относительно узкая, максимальное содержание воды не превышает 16.8 мас. %. Удельная электропроводность образцов МЭ была от 0.1 до 1.1 мкСм/см при значениях W , равных 28–32,

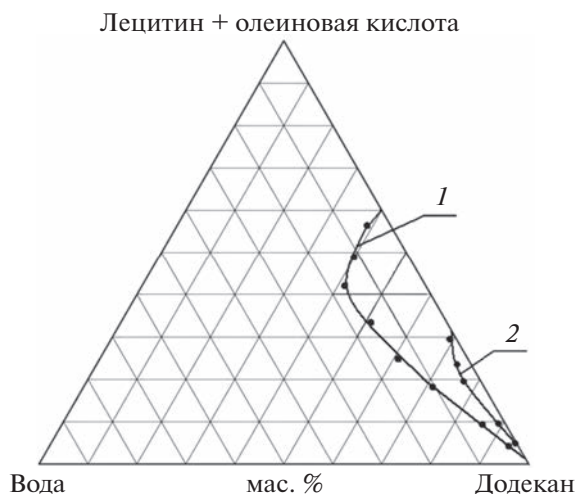


Рис. 2. Области существования в системе лецитин–олеиновая кислота – додекан–вода: 1 – МЭ при $C_{ол}/C_{лец} = 0.8$; 2 – органогеля при $C_{ол}/C_{лец} = 0.1$. $T = 25^\circ\text{C}$. Лецитин Lipoid S100 (96.3 мас. % основного вещества) [44].

что характерно для обратных МЭ. При содержании лецитина в органической фазе 10 мас. %, $C_{ол}/C_{лец} = 0.8$ и $W = 5$ гидродинамический диаметр капель МЭ составлял 6.5 ± 0.1 нм [45].

Обратные МЭ в системах с олеиновой кислотой можно получать на основе коммерческих образцов соевого лецитина, в том числе фосфолипидных концентратов. Была предложена композиция для трансдермальной доставки биологически активных веществ в форме МЭ лецитина [45, 46], содержащая (мас. %): лецитин (фосфолипидный концентрат с содержанием фосфолипидов 97 мас. %, в том числе фосфатидилхолина 22 мас. %) – 14.3–23.3; вазелиновое масло – 29.6–34.7; олеиновая кислота – 5.0–7.1; жирное растительное масло, например масло авокадо – 29.6–34.7; эфирное масло, например масло чайного дерева – 1.4–5.7; вода – остальное. Мольное отношение олеиновой кислоты и лецитина составляло 0.6–0.8, что соответствует величине соотношения соПАВ: лецитин (мас.) от 0.22 до 0.29. Таким образом, МЭ можно получить при относительно низком содержании соПАВ. Поскольку в разработанных обратных МЭ количество масляной фазы существенно выше, чем водной, такие МЭ могут включать маслорастворимые биологически активные вещества в концентрациях единицы процентов, а водо-

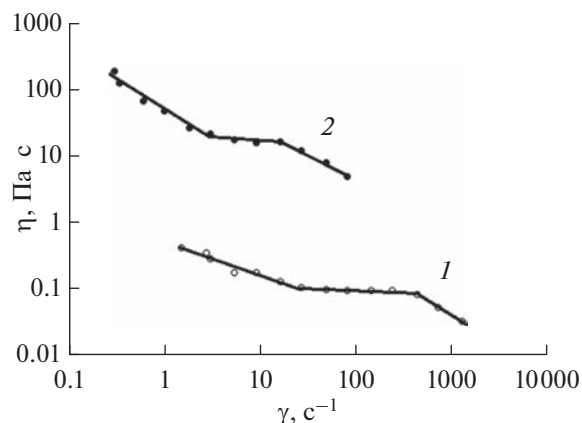


Рис. 3. Зависимость динамической вязкости (η) от скорости сдвига ($\dot{\gamma}$) для образцов МЭ (1) и жидких кристаллов (2). Состав МЭ, мас. %: лецитин – 19.1; вазелиновое масло – 32.6; масло авокадо – 32.6; олеиновая кислота – 6.7; эфирное масло чайного дерева – 4.2; вода – 4.8. Состав жидких кристаллов, мас. %: лецитин – 70.0; масло авокадо – 10.0; эфирное масло чайного дерева – 5.0; вода – 15.0. $T = 25^\circ\text{C}$ [46].

растворимые – в концентрациях в десятки доли процента (табл. 1).

Вязкость МЭ обычно невысокая, по порядку величин она сопоставима с вязкостью дисперсионной среды. Относительно низкие значения вязкости позволяют создавать на основе МЭ композиции, которые можно вводить с помощью шприца, например подкожно. В качестве примера на рис. 3 приведена зависимость вязкости от скорости сдвига для обратной МЭ, содержащей 19.1 мас. % лецитина (линия 1) в сравнении с такой же зависимостью для ламеллярных жидких кристаллов, содержащих 70.0 мас. % лецитина (линия 2). Рассмотренные носители имеют аналогичный качественный состав, они включают лецитин, смесь масел и воду, но отличаются, главным образом, концентрацией лецитина и наличием в МЭ соПАВ олеиновой кислоты. Хорошо заметна разница в величинах вязкости образцов: для МЭ она примерно на два порядка ниже и при высоких скоростях сдвига сопоставима с вязкостью вазелинового и растительных масел (десять доли Па·с) [46].

На модельной системе с красителем Родамином С показано, что скорость переноса водорастворимых веществ через диализную мембрану из обратной МЭ лецитина в физиологический раствор была 14.3×10^{-3} г/(м²·ч), что примерно в 2.5 раза вы-

Таблица 1. Включение масло- и водорастворимых биологически активных веществ в МЭ, содержащую, мас. %: лецитин (фосфолипидный концентрат с содержанием фосфолипидов 97 мас. %) – 19.1; олеиновая кислота – 6.7; масло авокадо – 32.6; вазелиновое масло – 32.6; эфирное масло чайного дерева – 4.2; вода – 4.8 [46]

Вещество	α-Токоферола ацетат	Глюкоза	Аскорбиновая кислота
C_{max} в МЭ, мас. %	9.9	0.50	0.21

ше, чем из ламеллярных жидких кристаллов в системе лецитин—растительное масло—эфирное масло—вода. Более высокая скорость высвобождения веществ из МЭ по сравнению с жидкокристаллическим носителем объясняется существенно большей вязкостью жидких кристаллов. За 7 ч диализа из МЭ выделилось 3.6% Родамина С, что позволяет разрабатывать на ее основе медицинские и косметические средства с замедленным высвобождением биологически активных веществ [46]. В состав органической фазы МЭ лецитина можно вводить растительные масла, обладающие собственной биологической активностью, например масло из тропического растения гака (*Momordica cochinchinensis*) и эфирное масло куркумы (*Curcuma longa*). Показано, что в МЭ можно ввести не менее 6.5 мас. % воды при концентрации лецитина в органической фазе 20 мас. %, массовом соотношении вазелинового масла и масла гака 1 : 1 и при мольном соотношении олеиновой кислоты и лецитина от 0.2 до 0.8. Гидродинамический диаметр капель предложенных обратных МЭ составлял от 3 до 21 нм в зависимости от содержания воды и лецитина. Наблюдалась линейная зависимость гидродинамического диаметра от параметра W , характерная для обратных МЭ: наклон линий менялся при варьировании соотношения лецитина с олеиновой кислотой и эфирным маслом (рис. 4) [47].

МИКРОЭМУЛЬСИИ ЛЕЦИТИНА КАК НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

МЭ лецитина можно использовать для трансдермальной доставки лекарственных веществ, а также при разработке препаратов для местного применения, которые могут наноситься на кожу или слизистые оболочки.

Для трансдермальной доставки тетракаина, используемого для местной анестезии, были предложены МЭ различных типов в системе лецитин—изопропилмиристан—*n*-пропанол—вода; тип МЭ определялся массовым соотношением лецитин : пропанол [48, 49]. В экспериментах с использованием диффузионной ячейки Франца было показано, что повышение концентрации воды как в прямой, так и в обратной МЭ приводит к возрастанию скорости транспорта тетракаина через образцы кожи мышей (рис. 5); значения скоростей переноса были в интервале от 7.66 до 18.28 мг/(см² ч). Тип МЭ влияет на скорость переноса лекарственного вещества: на рис. 5. представлены данные по кинетике переноса тетракаина через кожу при использовании прямой (рис. 5а) и обратной (рис. 5б) МЭ. При одинаковом содержании воды скорость переноса была выше для прямой МЭ, но эта разница не очень значительная [48].

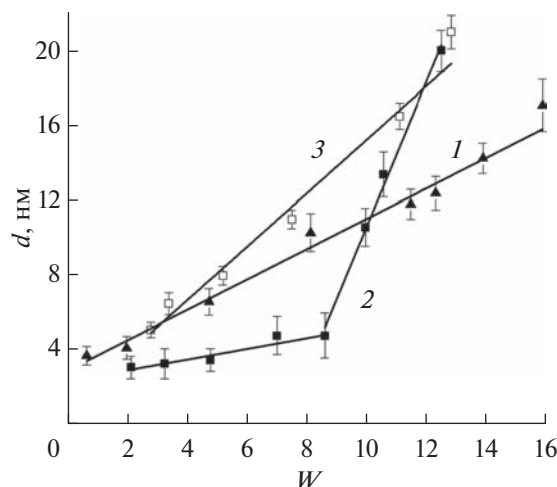


Рис. 4. Зависимость гидродинамического диаметра капель микроэмульсий от W . Состав органической фазы МЭ, мас. %: 1 — лецитин — 20.0, олеиновая кислота — 4.5, вазелиновое масло — 35.5, масло гака — 35.5, эфирное масло куркумы — 4.5; 2 — лецитин — 10.0, олеиновая кислота — 2.25, вазелиновое масло — 41.62, масло гака — 41.63, эфирное масло куркумы — 4.5; 3 — лецитин — 10.0, олеиновая кислота — 2.25, вазелиновое масло — 42.75, масло гака — 42.75, эфирное масло куркумы — 2.25; $T = 25^\circ\text{C}$ [47].

С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было продемонстрировано [48], что при времени эксперимента 0.5–2 ч водорастворимый флуоресцентный краситель постепенно проникал в эпидермис и верхние слои дермы при нанесении на кожу как прямой, так и обратной МЭ, в то время как при нанесении раствора в пропанол за 6 ч флуоресцеин-5-изотиоцианат проникал только в верхний слой эпидермиса. На рис. 6 представлены примеры микрофотографий срезов кожи мышей при проникновении красителя из раствора, прямой и обратной МЭ. В качестве основного механизма увеличения проницаемости кожи при нанесении на нее МЭ считают увеличение промежутков между клетками, образующими роговой слой эпидермиса, за счет взаимодействия лецитина с межклеточными липидами, и формирование при этом каналов, по которым идет проникновение компонентов МЭ в кожу. В переносе веществ могут также участвовать волосные фолликулы и потовые железы [48]. Аналогичные результаты были показаны при проникновении липофильного флуоресцентного красителя Нильского красного: при времени эксперимента 1 ч краситель практически не проникал в кожу свиней из раствора в изопропилмиристане, но проникал на глубину 300 мкм при использовании обратной МЭ лецитина [41].

В экспериментах *in vivo* было показано [49], что при использовании как прямой, так и обратной МЭ лецитина в качестве носителя местного

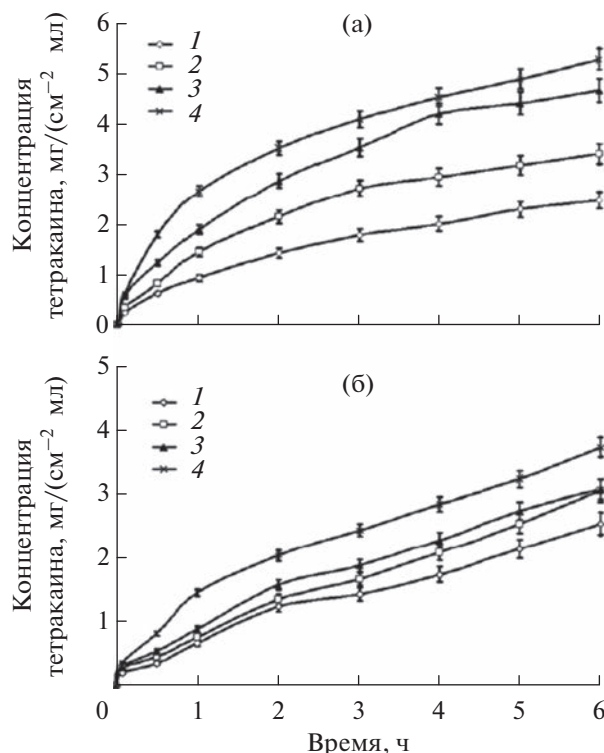


Рис. 5. Кинетика переноса тетракаина через кожу мышей в фосфатный буферный раствор (рН 7.4) из прямой (а) и обратной (б) МЭ в системе лецитин–*n*-пропанол–изопропилмиристат–водный раствор тетракаина. Соотношение лецитин : *n*-пропанол (мас. %): а – 0.5 : 1; б – 1.5 : 1. Содержание воды в МЭ, мас. %: 1 – 20; 2 – 32; 3 – 42; 4 – 49. $T = 37^\circ\text{C}$ [48].

анестетика тетракаина анальгезирующий эффект проявлялся при концентрации тетракаина в МЭ от 2.7 до 12 mg/ml . Максимальный анальгезирующий эффект был обнаружен спустя 10–15 мин после нанесения МЭ, затем его величина снижалась, но даже через 3 ч эффект обезболивания еще присутствовал. Для МЭ обоих типов эффект анальгезии увеличивался с ростом концентрации тетракаина и при повышении содержания воды в МЭ [49], что согласуется с результатами экспериментов по кинетике переноса тетракаина через кожу [48].

Было продемонстрировано, что нанесение на кожу как прямой, так и обратной МЭ в системе лецитин–*n*-пропанол–изопропилмиристат–водный раствор тетракаина не приводило к раздражению кожи и не вызывало окислительного стресса [49]. Низкий уровень раздражающего действия на кожу был показан также для МЭ в системах лецитин–*n*-бутанол–масло Migliol 812 N (синтетические триглицериды)–вода [50] и лецитин–спирт (этанол или изопропанол)–масло Capryol 90 (пропиленгликоль монокаприлат)–вода [51].

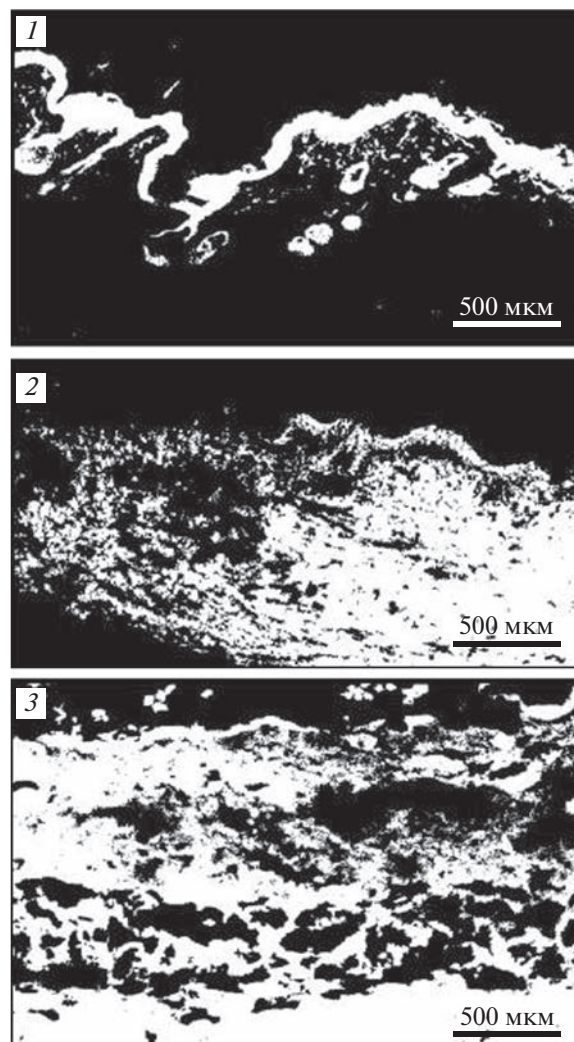


Рис. 6. Проникновение флуоресцентного красителя в кожу мышей (сканирующая лазерная конфокальная микроскопия) после обработки: 1 – 6 ч 0.5 мМ раствором флуоресцеин-5-изотиоцианата (контроль); 2 – 2 ч обратной МЭ в системе лецитин–изопропилмиристат–*n*-МЭ–водный 0.5 мМ раствор флуоресцеин-5-изотиоцианата; 3 – 2 ч прямой МЭ в той же системе. Белый цвет – флуоресценция красителя [48].

Было разработано ранозаживляющее средство на основе обратных МЭ, содержащих лецитин, олеиновую кислоту, вазелиновое масло, масло авокадо, эфирное масло чайного дерева и воду, активным компонентом являлся белково-пептидный экстракт из органов иммунной системы свиней. Оценка эффективности ранозаживления проводилась на модели плоскостных ран мышей. Показано, что прочность рубца через восемь дней после нанесения раны при лечении МЭ, не содержащей активный компонент, была $197 \pm 15\%$ (по сравнению с контролем, принятым за 100%), а при лечении такой же МЭ, содержащей водный

Таблица 2. Примеры составов МЭ лецитина, предложенных в качестве носителей лекарственных веществ

Состав микроэмульсии	Лекарственное вещество	Применение композиции	Ссылка
Лецитин– <i>n</i> -пропанол–изопропилмиристат–вода	Тетракаин гидрохлорид	Трансдермально, для местной анестезии	48, 49
Лецитин–Span 80 (сорбитанмоноолеат)–каприлат натрия/каприловая кислота–изопропилмиристат – вода	Лидокаин	Трансдермально, для местной анестезии	41, 53
Лецитин– <i>n</i> -бутанол–масло Migliol 812 N (синтетические триглицериды)–вода	Кетопрофен	Трансдермально, противовоспалительное	50
Лецитин–спирт (этанол или изопропанол)–масло Carpyol 90 (пропиленгликоль монокаприлат)–вода	Такролимус	Местно (на кожу) для лечения кожных заболеваний	51
Лецитин–этанол–изопропилмиристат–вода	Троксерутин	Перорально, витамин	28
Лецитин–Tween 80–соевое масло–вода	Куркумин	Перорально, противораковое	38
Лецитин–Tween 80–изопропилмиристат–вода, Лецитин–Brij 96V–изопропилмиристат–вода	Амфотерицин В	Внутривенно, противогрибковое	35, 54
Лецитин–Tween 20–Captex (пропиленгликоль дикаприлат/дикапрат)–вода	Амфотерицин В	Противогрибковое	37
Лецитин–олеиновая кислота–вазелиновое масло–масло авокадо–эфирное масло чайного дерева–вода	Белково-пептидный экстракт из органов иммунной системы свиней	Ранозаживляющее	52

белково-пептидный экстракт, составляла $282 \pm 12\%$ [52].

Таким образом, на нескольких примерах была продемонстрирована безопасность и эффективность МЭ лецитина, которые могут использоваться для местного применения (например, для обезболивания и ранозаживления) и для трансдермальной доставки лекарственных веществ. Известные из литературы варианты составов МЭ лецитина и возможностей их применения как носителей лекарственных веществ приведены в табл. 2.

Кроме применения в фармацевтике, МЭ лецитина было предложено использовать в смежных областях, например в пищевой промышленности для солюбилизации фермента липазы [25], для экстрагирования лютеина из лепестков календулы [30] и извлечения ликопена из томатной пасты [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лецитин является широко известным биосовместимым ПАВ, МЭ на его основе могут служить носителями лекарственных веществ.

Было показано, что формированию МЭ лецитина лучше всего способствует использование в качестве соПАВ молекул с короткой алкильной цепью (4–5 атомов С) и относительно большой полярной “головой”, таких как короткоцепочечные алифатические спирты, кислоты и амины;

при этом требуется высокая концентрация соПАВ (массовое соотношение соПАВ : лецитин составляет обычно 1 : 1). Чаще всего для получения МЭ лецитина в различных растворителях в качестве соПАВ применяют этанол, *n*-пропанол и *n*-бутанол; с точки зрения биосовместимости этанол выглядит предпочтительнее. Показана возможность получения МЭ лецитина в природных маслах, таких как рапсовое, подсолнечное, оливковое и соевое, а также в синтетических биосовместимых маслах, например изопропилмиристат, МСТ (смесь триацилглицеридов C_8 – C_{10}) и Ресеол (смесь моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот, в основном олеиновой). Чтобы заменить токсичные спирты на менее токсичные компоненты, в МЭ лецитина вводили другие известные ПАВ, такие как Brij 96V (полиэтиленгликольолеат), Tween 80 (полиоксиэтилен-20-сорбитанмоноолеат), Tween 20 (полиоксиэтилен-20-сорбитанмонолаурат), Тритон X-100 (трет-октилфениловый эфир полиэтиленгликоля) и др.

Для создания МЭ лецитина, пригодных для фармацевтики, было предложено использовать олеиновую кислоту как нетоксичное биосовместимое соПАВ. Обратные МЭ в системах с олеиновой кислотой можно получать на основе коммерческих образцов соевого лецитина, в состав МЭ можно вводить растительные масла, обладающие собственной биологической активностью,

например, масло авокадо, масло из тропического растения гака, эфирные масла чайного дерева и куркумы. Недостатком МЭ лецитина с олеиновой кислотой является относительно узкая область их существования.

В данной работе приведены примеры, показывающие безопасность и эффективность МЭ на основе лецитина, предложенных для трансдермальной доставки биологически активных веществ. Описаны композиции на основе МЭ лецитина для местной анестезии, для доставки витаминов, с противовоспалительным, противогрибковым, противораковым и ранозаживляющим действием.

Несмотря на очевидные преимущества лецитина как ПАВ для получения МЭ, необходима работа по подбору других компонентов. “Идеальная” МЭ лецитина должна иметь широкую, желательно симметричную область существования (т.е. быть сбалансированной) и содержать нетоксичные и биосовместимые другие компоненты: ПАВ, соПАВ и масла, предпочтительно недорогие и разрешенные для медицинского применения или используемые в пищевых продуктах. Возможные поиски новых составов МЭ лецитина могут пойти как по пути усложнения системы и добавления шестого, седьмого и т.д. компонента, так и по пути введения в качестве соПАВ новых веществ, которые ранее для таких целей не рассматривались. Задача создания “идеальной” МЭ лецитина еще не решена, и это стимулирует дальнейшие поиски.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lawrence M.J., Rees G.D.* Microemulsion-based media as novel drug delivery systems // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012. V. 64. Supplement. P. 175–193. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.018>
2. *Fanun M.* Microemulsions as delivery systems // *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2012. V. 17. № 5. P. 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.001>
3. *Callender S.P., Mathews J.A., Koborny K., Wettig S.D.* Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. V. 526. № 1–2. P. 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.005>
4. *Shukla T., Upmanyu N., Agrawal M. et al.* Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. V. 108. P. 1477–1494. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.021>
5. *Alves L.P., da Silva Oliveira K., da Paixao Santos J.A. et al.* A review on developments and prospects of anti-inflammatory in microemulsions // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020. V. 60. P. 102008. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102008>
6. *Szumala P., Macierzanka A.* Topical delivery of pharmaceutical and cosmetic macromolecules using microemulsion systems // *International Journal of Pharmaceutics*. 2022. V. 615. P. 121488. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121488>
7. *van Nieuwenhuyzen W.* Production and Utilization of Natural Phospholipids // Ahmad M.U., Xu X. (Editors) *Polar lipids. Biology, Chemistry and Technology*. Urbana, Illinois, USA: AOCS Press. 2015. P. 245–276. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-044-3.50013-3>
8. *Sjolund M., Rilfors L., Lindblom G.* Reversed hexagonal phase formation in lecithin–alkane–water systems with different acyl chain unsaturation and alkane length // *Biochemistry*. 1989. V. 28. № 3. P. 1323–1329. <https://doi.org/10.1021/bi00429a057>
9. *Angelico R., Ceglie A., Olsson U., Palazzo G.* Phase diagram and phase properties of the system lecithin–water–cyclohexane // *Langmuir*. 2000. V. 16. № 5. P. 2124–2132. <https://doi.org/10.1021/la9909190>
10. *Angelico R., Ceglie A., Colafemmina G. et al.* Phase behavior of the lecithin/water/isooctane and lecithin/water/decane systems // *Langmuir*. 2004. V. 20. № 3. P. 619–631. <https://doi.org/10.1021/la035603d>
11. *Щипунов Ю.А.* Самоорганизующиеся структуры лецитина // *Успехи химии*. 1997. Т. 66. № 4. С. 328–352.
12. *Kumar V.V., Kumar C., Raghunathan P.* Studies on lecithin reverse micelles: Optical birefringence, viscosity, light scattering, electrical conductivity and electron microscopy // *Journal of Colloid and Interface Science*. 1984. V. 99. № 2. P. 315–323.
13. *Scartazzini R., Luisi P.L.* Organogels from lecithins // *Journal of Physical Chemistry*. 1988. V. 92. № 3. P. 829–833. <https://doi.org/10.1021/j100314a047>
14. *Мурашова Н.М., Юртов Е.В.* Лецитиновые органо-гели как перспективные функциональные наноматериалы // *Российские нанотехнологии*. 2015. Т. 10. № 7–8. С. 5–14.
15. *Shinoda K., Carlsson A., Lindman B.* On the importance of hydroxyl groups in the polar head-group of nonionic surfactants and membrane lipids // *Advances in Colloid and Interface Science*. 1996. V. 64. P. 253–271. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(95\)00287-1](https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00287-1)
16. *Shinoda K., Araki M., Sadaghiani A. et al.* Lecithin-based microemulsions: Phase behavior and microstructure // *Journal of Physical Chemistry*. 1991. V. 95. № 2. P. 989–993. <https://doi.org/10.1021/j100155a091>
17. *Aboofazeli R., Lawrence M.J.* Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water–lecithin–alcohol–isopropyl myristate // *International Journal of Pharmaceutics*. 1993. V. 93. № 1–3. P. 161–175. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90174-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90174-E)
18. *Aboofazeli R., Lawrence M.J.* Investigations into the formation and characterization of phospholipid micro-

- emulsions. II. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water–lecithin–isopropyl myristate and alcohol: Influence of purity of lecithin // *International Journal of Pharmaceutics*. 1994. V. 106. № 1. P. 51–61.
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90275-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90275-5)
19. *Aboofazeli R., Lawrence C.B., Wicks S.R., Lawrence M.J.* Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water–lecithin–isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ester or alcohol as cosurfactant // *International Journal of Pharmaceutics*. 1994. V. 111. № 1. P. 63–72.
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90402-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90402-2)
 20. *Aboofazeli R., Patel N., Thomas M., Lawrence M.J.* Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. IV. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water–lecithin–alcohol and oil: The influence of oil // *International Journal of Pharmaceutics*. 1995. V. 125. № 1. P. 107–116.
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)00125-3](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00125-3)
 21. *Kahlweit M., Busse G., Faulhaber B.* Preparing microemulsions with lecithins // *Langmuir*. 1995. V. 11. № 5. P. 1576–1583.
<https://doi.org/10.1021/la00005a027>
 22. *Schurtenberger P., Peng Q., Leser M.E., Luizi P.-L.* Structure and phase behavior of lecithin-based microemulsions: A study of the chain-length dependence // *Journal of Colloid and Interface Science*. 1993. V. 156. № 1. P. 43–51.
<https://doi.org/10.1006/jcis.1993.1078>
 23. *Avramiotis S., Bekiari V., Lianos P., Xenakis A.* Structural and dynamic properties of lecithin–alcohol based w/o microemulsions: A luminescence quenching study // *Journal of Colloid and Interface Science*. 1997. V. 194. № 2. P. 326–331.
<https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5135>
 24. *Reis M.F.T., Bonomo R.C.F., de Souza A.O. et al.* Calorimetric studies of microemulsion systems with lecithin, isooctane and butanol // *Food Research International*. 2012. V. 49. № 2. P. 672–676.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.014>
 25. *Papadimitrou V., Pispas S., Syriou S. et al.* Biocompatible microemulsions based on limonene: Formulation, structure and application // *Langmuir*. 2008. V. 24. № 7. P. 3380–3386.
<https://doi.org/10.1021/la703682c>
 26. *Leser M.E., van Evert W.C., Agterof W.G.M.* Phase behaviour of lecithin–alcohol–triacylglycerol mixtures // *Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*. 1996. V. 116. № 3. P. 293–308.
[https://doi.org/10.1016/0927-7757\(96\)03628-X](https://doi.org/10.1016/0927-7757(96)03628-X)
 27. *Mouri A., Diat O., Lerner D.A. et al.* Water solubilization capacity of pharmaceutical microemulsions based on Peceol, lecithin and ethanol // *International Journal of Pharmaceutics*. 2014. V. 475. № 1–2. P. 324–334.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.018>
 28. *Xu M., Yu Q., Zhao Q. et al.* Development and *in vitro*–*in vivo* evaluation of water-in-oil microemulsion formulation for the oral delivery of troxerutin // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2016. V. 42. № 2. P. 280–287.
<https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1047849>
 29. *Abbasi S., Radi M.* Food grade microemulsion systems: Canola oil/lecithin:*n*-propanol/ water // *Food Chemistry*. 2016. V. 194. P. 972–979.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.078>
 30. *Jalali-Jivan M., Abbasi S.* Novel approach for lutein extraction: Food grade microemulsion containing soy lecithin and sunflower oil // *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2020. V. 66. P. 102505.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102505>
 31. *Amiri-Rigi A., Abbasi S.* Extraction of lycopene using a lecithin-based olive oil microemulsion // *Food Chemistry*. 2019. V. 272. P. 568–573.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.080>
 32. *Trotta M., Cavalli R., Ugazio E., Gasco M.R.* Phase behaviour of microemulsion systems containing lecithin and lysollecithin as surfactants // *International Journal of Pharmaceutics*. 1996. V. 143. № 1. P. 67–73.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04688-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04688-1)
 33. *Trotta M., Pattarino F., Grosa G.* Formation of lecithin-based microemulsions containing *n*-alkanol phosphocholines // *International Journal of Pharmaceutics*. 1998. V. 174. № 1–2. P. 253–259.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00273-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00273-7)
 34. *Graf A., Ablinger E., Peters S. et al.* Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: Nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides // *International Journal of Pharmaceutics*. 2008. V. 350. № 1–2. P. 351–360.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.053>
 35. *Brime B., Moreno M.A., Frutos G. et al.* Amphotericin B in oil–water lecithin-based microemulsions: Formulations and toxicity evaluation // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002. V. 91. № 4. P. 1178–1185.
<https://doi.org/10.1002/jps.10065>
 36. *Moreno M.A., Ballesteros M.P., Frutos P.* Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use; pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003. V. 92. № 7. P. 1428–1437.
<https://doi.org/10.1002/jps.10412>
 37. *Pestana K.C., Formariz T.P., Franzini C.M. et al.* Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2008. V. 66. № 2. P. 253–259.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.06.016>
 38. *Lin C.-C., Lin H.-Y., Chi M.-H. et al.* Preparation of curcumin microemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line // *Food Chemistry*. 2014. V. 154. P. 282–290.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.012>
 39. *Nguyen T.T.L., Edelen A., Neighbors B., Sabatini D.A.* Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: Formulation and potential applications // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010. V. 348. № 2. P. 498–504.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.04.053>
 40. *Das A., Mitra R.K.* Formulation and characterization of a biocompatible microemulsion composed of mixed surfactants: lecithin and Triton X-100 // *Colloid and*

- Polymer Science. 2014. V. 292. № 3. P. 635–644.
<https://doi.org/10.1007/s00396-013-3110-y>
41. Yuan J.S., Acosta E.J. Extended release of lidocaine from linker-based lecithin microemulsions // International Journal of Pharmaceutics. 2009. V. 368. № 1–2. P. 63–71.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.063>
 42. Acosta E., Chung O., Xuan X.Y. Lecithin-linker microemulsions in transdermal delivery // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2011. V. 21. № 1. P. 77–87.
[https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50007-3](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50007-3)
 43. Nouraei M., Acosta E.J. Predicting solubilisation features of ternary phase diagrams of fully dilutable lecithin linker microemulsions // Journal of Colloid and Interface Science. 2017. V. 495. P. 178–190.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.114>
 44. Murashova N.M., Prokopova L.A., Trofimova E.S., Yurtov E.V. Effects of oleic acid and phospholipids on the formation of lecithin organogel and microemulsion // Journal of Surfactants and Detergents. 2018. V. 21. № 5. P. 635–645.
<https://doi.org/10.1002/jsde.12170>
 45. Мурашова Н.М. Самоорганизующиеся структуры ди-(2-этилгексил)фосфата натрия и лецитина в системах “вода–масло–ПАВ” и функциональные наноматериалы на их основе. Диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2022. 380 с.
 46. Мурашова Н.М., Трофимова Е.С., Костюченко М.Ю. и др. Микроэмульсии и лиотропные жидкие кристаллы лецитина как системы для трансдермальной доставки лекарственных веществ // Российские нанотехнологии. 2019. Т. 14. № 1–2. С. 69–75.
 47. Мурашова Н.М., Нгуен Х.Т. Микроэмульсии лецитина с маслом гака и эфирным маслом куркумы // Коллоидный журнал. 2023. Т. 85. № 2. С. 191–199.
 48. Changez M., Varshney M., Chander J., Dinda A.M. Effect of the composition of lecithin/*n*-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: *In vitro* // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2006. V. 50. № 1. P. 18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.03.018>
 49. Changez M., Chander J., Dinda A.M. Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: *In vivo* // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2006. V. 48. № 1. P. 58–66.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.01.007>
 50. Paolino D., Ventura C.A., Nistico S. et al. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: Percutaneous adsorption through human skin and *in vivo* human skin tolerability // International Journal of Pharmaceutics. 2002. V. 244. № 1–2. P. 21–31.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00295-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00295-8)
 51. Savic V., Todosijevic M., Ilic T. et al. Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and *in vitro/in vivo* performances // International Journal of Pharmaceutics. 2017. V. 529. № 1–2. P. 491–505.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.036>
 52. Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya E. et al. *Sus scrofa* immune tissues as a new source of bioactive substances for skin wound healing // Saudi Journal of Biological Sciences. 2021. V. 28. № 3. P. 1826–1834.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.028>
 53. Yuan J.S., Ansari M., Samaan M., Acosta E.M. Linker-based lecithin microemulsions for transdermal delivery of lidocaine // International Journal of Pharmaceutics. 2008. V. 349. № 1–2. P. 130–143.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.07.047>
 54. Brime B., Molero G., Frutos P., Frutos G. Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil–water microemulsion and deoxycholate-amphotericin B in immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans* // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004. V. 22. № 5. P. 451–458.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.04.008>

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ МЕДНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ СМАЧИВАНИЕМ НА ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

© 2023 г. Ф. Ш. Омран¹, *, В. В. Каминский²,
К. А. Емельяненко¹, А. М. Емельяненко¹, Л. Б. Бойнович¹

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Ленинский просп. 31, корп. 4, Москва, 119071 Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение “Российский научный центр рентгенодиагностики”
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Профсоюзная, д. 86, Москва, 117997 Россия

*e-mail: duckyfriedrich@gmail.com

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 19.07.2023 г.

Принята к публикации 28.07.2023 г.

Бактериальные инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются одной из острых проблем современного здравоохранения. Одним из перспективных направлений решения этой проблемы является разработка материалов, которые либо обладают бактерицидным действием по отношению к возбудителям ИСМП, либо препятствуют передаче попадающих на их поверхность бактерий при контактах пациентов и персонала с такими поверхностями. В данной работе исследована антибактериальная эффективность применения медных контактных поверхностей с различной смачиваемостью. Особое внимание уделено изучению влияния на эту эффективность загрязнения поверхностей как потожировыми выделениями при контактах с людьми, так и поддерживающими жизнедеятельность бактерий веществами на примере пептонного раствора. В связи с дороговизной меди, исследована также возможность замены объемного медного материала на менее дорогой с напыленным медным покрытием. Результаты тестирования показали, что бактерицидная эффективность по отношению к штамму *Staphylococcus aureus* как контрольных медных и супергидрофильных медных пластин, так и напыленных медных пленок оказывается близкой к 100% и практически не изменяется после загрязнения пептонным раствором или потожировыми выделениями. Супергидрофобные медные поверхности обладают меньшей бактерицидной эффективностью, но благодаря эффекту несмачиваемости и низкой адгезии клеток к такой поверхности, дольше остаются неконтаминированными и тем самым также способствуют снижению передачи инфекций через изготовленные из них поверхности касания.

Ключевые слова: антибактериальные поверхности, лазерное модифицирование поверхности, биокоррозия, наночастицы, экстремальное смачивание

DOI: 10.31857/S0023291223600499, **EDN:** ECUJVB

ВВЕДЕНИЕ

Одной из главных проблем в сфере здравоохранения на сегодняшний день является борьба с распространением инфекций, которые связаны с медицинской помощью (ИСМП) и называются “нозокомиальными”, “внутрибольничными” или “госпитальными”. Это означает, что инфекция развивается у пациента в процессе лечения в больнице или другом медицинском учреждении и отсутствовала на момент поступления. Кроме того, такие инфекции могут поражать и персонал медицинских учреждений [1]. Эта проблема является наиболее частым неблагоприятным последствием медицинской помощи, и ни одно учреждение или страна не может утверждать, что эта

проблема уже решена [2, 3]. Данные, полученные в ряде стран, свидетельствуют о том, что ежегодно сотни миллионов пациентов во всем мире страдают от внутрибольничных инфекций [4].

Наиболее распространенные бактерии, вызывающие внутрибольничные инфекции, включают *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), в том числе устойчивый к антибиотикам MRSA — метициллин-резистентный золотистый стафилококк (methicillin-resistant *S. aureus*), *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. и *Candida* spp. [5]. Опасность таких инфекций заключается в высокой резистентности к антибиотикам и антибактериальным средствам, которые широко используют в медицинских учреждениях, что значительно затрудняет их ле-

чение. По этой причине поиск альтернативных способов борьбы с внутрибольничными инфекциями является крайне перспективным и важным направлением исследований.

Одним из таких направлений является внедрение в практику использования материалов, обладающих антимикробными свойствами, например, некоторых металлов (серебро, медь, цинк, висмут [6, 7]) и их сплавов.

Антимикробные свойства меди и ее сплавов известны человечеству уже очень продолжительное время. В современной научной медицине выявлены противовоспалительные [8], иммуномодулирующие [9], противоопухолевые, антимикробные свойства медьсодержащих веществ [10–12]. Медь играет важную роль в работе ряда ферментов — тирозиназы, цитохромоксидазы, а также стимулирует кроветворную функцию костного мозга.

Применение меди в лечебных заведениях в качестве покрытия контактных поверхностей, таких как перила, ручки, двери, столешницы и многое другое, может помочь в борьбе с внутрибольничными инфекциями. Такие исследования уже проводились и показали положительные результаты [13–15].

Однако, несмотря на свои полезные антимикробные свойства, медь оказывает токсическое действие на человека: угнетает центральную нервную систему, вплоть до развития болезни Альцгеймера, способствует инактивации ферментов и угнетению дыхания [16–18].

В настоящее время активно идет обсуждение возможности применения антибактериальных свойств наночастиц и металлических поверхностей с иерархической шероховатостью, сформированной жестко закрепленными наночастицами [19], которые появляются при формировании иерархической шероховатости. В зоне воздействия лазерного луча происходит нагрев поверхности до высокой температуры, плавление, возгонка и взрывная абляция материала. При этом частицы материала удаляются с поверхности и впоследствии осаждаются из лазерного факела на поверхность вокруг зоны воздействия в виде микро- и наночастиц [20]. Иерархическая шероховатость позволяет создать материалы с экстремальной смачиваемостью — супергидрофильные или супергидрофобные. Механизмы антимикробного действия таких материалов находятся в стадии активного изучения [19, 21–23]. Благодаря высокой смачиваемости супергидрофильных поверхностей, бактериальная дисперсия может свободно растекаться, распределяя бактериальные клетки по большой площади. Часть бактерий осаждается на шероховатую поверхность, что приводит к их гибели за счет перфорирования и деформации мембраны элементами нанотексту-

ры и потери внутриклеточной жидкости. Дополнительно, большая площадь контакта позволяет цитотоксичным ионам меди эффективнее переходить в жидкость и при контакте с бактериальными клетками вызывать окислительный стресс последних [23].

Супергидрофобные поверхности имеют иные механизмы антибактериального действия. На ранних стадиях контакта с бактериальной средой водоотталкивание и гетерогенный режим смачивания приводят к значительному уменьшению площади контакта между подложкой и бактериальной дисперсией и, таким образом, к уменьшению площади, на которой может происходить адгезия бактерий. Второй механизм связан с уменьшением адгезии между бактериальной клеткой и супергидрофобной поверхностью [24]. Это ингибирует закрепление клеток на поверхности материала и дальнейшее формирование биопленок. При длительном контакте супергидрофобной поверхности с бактериальной средой развиваются коррозионные процессы, которые способствуют деградации супергидрофобного состояния и включению механизмов, аналогичных упомянутым для супергидрофильных поверхностей.

Объединение антибактериальных свойств металлов и особенностей поверхностей с иерархической шероховатостью является многообещающим направлением исследований по борьбе с внутрибольничными инфекциями. Ранее в работах нашей лаборатории уже изучалось действие супергидрофобных и супергидрофильных медных поверхностей на некоторые штаммы бактерий [20, 21, 23, 25–27]. Лучшее токсическое действие показали медные супергидрофильные поверхности, что объяснялось более эффективным контактом каждой бактериальной клетки с поверхностью благодаря полному смачиванию поверхности супергидрофильной меди. Распределяясь по шероховатой текстуре, бактериальные клетки подвергались как физическому действию наночастиц меди на клеточные мембраны, так и активному воздействию ионов меди, негативно влияющих на жизнедеятельность бактериальных клеток.

Супергидрофобные поверхности из-за высокого угла смачивания ограничивали площадь непосредственного контакта бактериальной суспензии с поверхностью. Токсическое действие начинало проявляться только спустя некоторое время, когда начинали развиваться процессы коррозии, и ионы меди попадали в бактериальную дисперсию. Однако основные механизмы антибактериального действия супергидрофобных поверхностей при кратковременном контакте с бактериально загрязненными средами заключаются в минимизации площади контакта бактериальных клеток с такой поверхностью и в снижении первичной адгезии

клеток к поверхности за счет электростатических и стерических взаимодействий [27]. Оба упомянутых механизма способствуют более длительному сохранению бактериальной чистоты супергидрофобной поверхности и препятствуют контактной передаче инфекций.

Еще одним плюсом в использовании медных поверхностей с экстремальным смачиванием вместо свободных наночастиц меди является то, что наночастицы на обработанных лазером шероховатых поверхностях жестко сцеплены с ними и не могут попасть в организм человека, вызывая негативные последствия, описанные выше.

Однако медь является дорогим материалом. Поэтому применение цельнометаллических изделий для оборудования в больницах будет сопряжено с большими экономическими затратами. Приемлемым решением может стать напыление слоя меди поверх уже готовых дверных ручек, переключателей, держателей и др., произведенных из доступных материалов, таких как сталь, алюминий или пластик. В данной работе были оценены антибактериальные свойства алюминиевых пластин с медным напылением.

Так как основная область применения таких поверхностей — контактные поверхности в больницах, то они неизбежно будут взаимодействовать как с неорганическими загрязнителями, так и с выделениями кожи человека. В современной литературе мало обсуждается влияние загрязнений, попадающих при естественной эксплуатации, на функциональные свойства таких поверхностей касания. Чтобы восполнить этот пробел, в данной работе исследовано влияние белковых загрязнений и загрязнений, связанных с касаниями кожей человека, на антибактериальные свойства поверхностей с экстремальным смачиванием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования влияния загрязненности поверхности на антибактериальные свойства необработанных медных (контрольных), супергидрофильных и супергидрофобных поверхностей использовали медные пластины марки M1M. Кроме того, поскольку применение массивной меди для изготовления различных медицинских изделий существенно удорожает их стоимость, для сравнения бактерицидной активности использовали алюминиевые пластины с напыленным слоем меди толщиной 100–200 мкм. Напыление производили с помощью комплекта оборудования для газодинамической металлизации ДИМЕТ модели 404 (ООО “ОЦПН”, Россия).

Лазерное текстурирование поверхностей

Для получения многомодальной шероховатости поверхности медные пластины размером

$10 \times 10 \times 1$ мм³ подвергали методу импульсной лазерной обработки, основанному на растровом сканировании поверхности материала лазерным пучком наносекундной длительности и длиной волны 1.064 мкм, длительностью импульсов 200 нс, частотой импульсов 20 кГц, и пиковой мощностью до 0.95 мДж в режиме TEM₀₀. Плотность линий составляла 400 мм⁻¹, скорость линейного перемещения луча 100 мм/с, флюенс 0.19 Дж/мм². Луч лазера фокусировался на поверхности обрабатываемого образца в пятно с диаметром 40 мкм и двигался с помощью блока управления перемещением лазерного луча RAYLASE MS10 2 (Германия). Детальное исследование морфологии получающейся в таком процессе поверхностной текстуры было проведено в нашей недавней работе [20]. Основные характерные элементы текстуры и их размеры следующие. Макрорельеф формируют слабоупорядоченные чередующиеся гребни и впадины, сформированные крупными пористыми ветвевыми агрегатами наночастиц, с характерным шагом между гребнями/впадинами порядка 50 мкм и глубиной впадин (толщиной пористого слоя) в интервале 1–10 мкм. Следующий уровень характерных размеров рельефа составляют более мелкие агрегаты наночастиц, формирующие “листья” ветвевых агрегатов, их размер порядка десятков и сотен нм, а также формирующиеся при термическом отжиге сфероидальные микрочастицы размером до нескольких мкм, густо покрытые нановискерами. К третьему уровню характерных размеров относятся упомянутые нановискеры, имеющие диаметр порядка 10 нм и длину от сотен нм до нескольких мкм, а также отдельные наночастицы, составляющие основу вышеописанных пористых агрегатов и прочно “спеченные” с ними — их характерные размеры 30–50 нм.

Описанный режим лазерной обработки приводил к формированию развитой супергидрофильной поверхности, в которую капиллярное впитывание капли исследуемой бактериальной дисперсии происходило полностью в течение нескольких секунд.

Создание супергидрофобного покрытия

Для создания супергидрофобных поверхностей полученные супергидрофильные пластины подвергали предобработке на установке Plasma Cleaner PDC-030 (Zhengzhou CY Scientific Instrument, Китай). В данной работе применяли кислородную плазму при давлении O₂ — 20–30 Па. При этом поверхность меди обогащалась хемосорбционно-активными центрами, необходимыми для дальнейшей гидрофобизации.

Методика гидрофобизации ранее была детально представлена в [20], поэтому здесь мы остано-

вима на ней вкратце. Гидрофобизацию проводили с помощью хемосорбции из паров гидрофобного агента — метокси-3 [(2, 2, 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 8-пентадекафтороктил)-окси]-пропил-силана. Это вещество было синтезировано в лаборатории академика А.М. Музафарова. Процесс хемосорбции проводили в герметичном сосуде в печи при температуре $T = 105^{\circ}\text{C}$. Далее образцы с помощью УЗ-ванны отмывали в спирте и ацетоне для того, чтобы избавиться от физически адсорбированных на поверхности молекул гидрофобизатора, после чего помещали в печь для окончательной сшивки гидрофобизирующего агента при $T = 150^{\circ}\text{C}$.

Методы искусственного биологического загрязнения поверхностей

При практическом применении антибактериальных покрытий, используемых на поверхностях касания, возникает проблема оценки влияния биологических загрязнений, наносимых на поверхность при контакте с руками пациентов, на антибактериальную активность покрытий. Для исследования такого влияния третью часть контрольных, гидрофобных и гидрофильных пластин, а также пластин с напыленным медным покрытием контаминировали пептонным раствором на основе бактериологического пептона (RM001, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия), вторую треть образцов каждого типа загрязняли потожировыми отложениями, присутствующими на пальцах рук. Оставшуюся третью часть образцов необработанных, супергидрофильных и супергидрофобных медных пластин и алюминиевых пластин с медным напылением использовали для сравнения бактерицидного действия исходных образцов с различным смачиванием с таковыми после биологического загрязнения. Полученные образцы были маркированы следующим образом: необработанные В, с напыленным медным покрытием С, супергидрофильные Phil, супергидрофобные Phob. Для обозначения типа биологического загрязнения к приведенным выше маркировкам добавлялись буквы Р, если загрязнение осуществлялось пептонным раствором и F, если загрязнение обеспечивалось касанием пальцами рук.

Для обработки в пептонном растворе подложку с пластинами погружали в 2% пептонный раствор и выдерживали на протяжении 1 мин. Далее, подложку с пластинами вынимали из раствора и сушили в вытяжном шкафу на протяжении 10 мин. Процесс повторяли 10 раз, после последнего погружения пластины просушивали 30 мин и упаковывали в чашку Петри для транспортировки и хранения.

Загрязнение потожировыми выделениями кожи производили путем касания пластин подушечками пальцев различными людьми. Для стан-

дартизации этой процедуры загрязнения, каждого образца касались руки 47 человек.

Все полученные пластины перед экспериментом по исследованию антибактериальной активности обрабатывали УФ излучением с длиной волны 253.7 нм и мощностью 15 Вт по 30 мин с каждой стороны, чтобы предотвратить контаминацию нелабораторными штаммами микроорганизмов.

Протоколы оценки бактерицидного действия

В данной работе исследовали бактерицидную активность медных пластин по отношению к дисперсии, содержащей клетки *S. aureus* (*Staphylococcus aureus* ATCC® 29213, Becton Dickinson, США). Для приготовления бактериальной дисперсии суточную бактериальную культуру *S. aureus* вносили в мясопептонный бульон (МПБ; “Медгамал”, Москва) и инкубировали при 37°C в течение 18 ч.

Инкубированную дисперсию разбавляли МПБ до оптической плотности, соответствующей бактериальному титру $\sim 10^8$ КОЕ/мл, при этом для контаминирования тестируемых пластин использовали капли бактериальной дисперсии объемом 10 мкл.

Необходимое в соответствии с экспериментальными протоколами (рис. 1) количество медных необработанных (контрольных), супергидрофильных и супергидрофобных пластин помещали в сухие или влажные условия. Эксперимент в сухих условиях проводили в открытой чашке Петри, при этом происходило постепенное высыхание капель бактериальной дисперсии на поверхности пластин. Эксперимент в условиях влажной среды проводили в закрытых стерильных боксах с размещенной вдоль боковых стенок фильтровальной бумагой, смоченной физиологическим раствором. Поддержание высокой влажности препятствовало испарению воды из дисперсии и поддерживало режим “влажного” контакта дисперсия — подложка. Бактериальную загрязненность пластинки измеряли через 1.5 и 24 ч для сухого контакта, 1 и 24 ч для влажного.

Для количественной оценки бактерицидного действия после фиксированного времени контакта пластины с каплей дисперсии пластину вместе с каплей (для влажного контакта) или ее остатком (для сухого контакта) помещали в пробирку с 1 мл стерильного физиологического раствора и встряхивали на шейкере при 1050 об./мин в течение 10 мин. Далее из пробирки отбирали 0.5 мл полученной бактериальной дисперсии, готовили десятикратные разведения, из каждого разведения отбирали 0.1 мл и равномерно распределяли по поверхности чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтона (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). После инкубации в течение 48 ч при температуре 37°C проводили подсчет количества колоний и определяли титр бактерий на пластине. Для

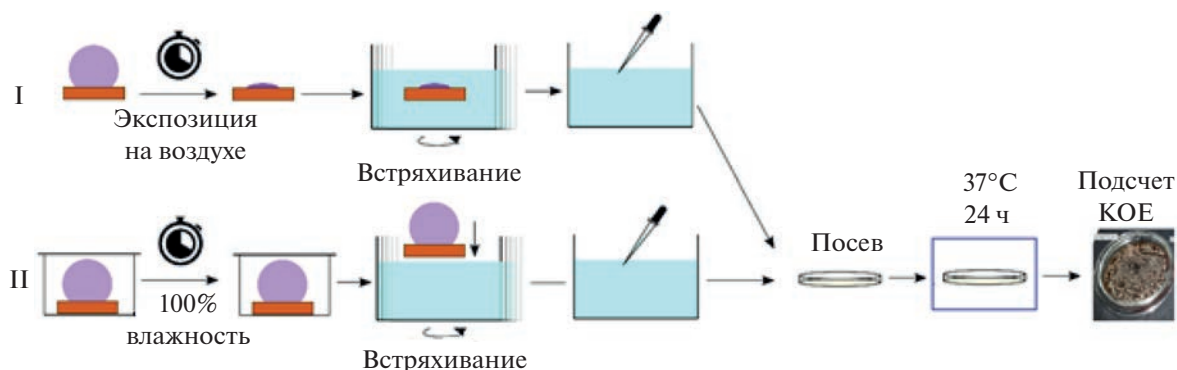


Рис. 1. Схематичное изображение протоколов сухого и влажного контакта.

каждого временного интервала использовали отдельную пластину, и каждый эксперимент повторяли не менее трех раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние загрязнений на смачивание медных пластин с различной обработкой

Поскольку механизм бактерицидного действия и антибактериальная активность зависят от характера смачивания поверхностей водными средами, нами были измерены углы смачивания для исходных и биологически загрязненных пластин трех видов: контрольных, супергидрофильных и супергидрофобных. Кроме того, для исходно супергидрофобных медных пластин также были измерены и углы скатывания. Полученные результаты представлены в табл. 1

Из представленных в табл. 1 данных следует, что наименьшее влияние биологических загрязнений на смачивание наблюдается для необработанных медных пластин. Для супергидрофильных

поверхностей эффект также оказался не сильно выраженным — на поверхности, загрязненной пептонным раствором, все еще сохранялось полное растекание капли, хоть и происходило с меньшей скоростью. Некоторое ухудшение смачиваемости супергидрофильных образцов можно объяснить частичным заполнением пористой поверхности компонентами раствора. При испарении воды из пор твердая фракция, частично заполняя поры, способствует снижению шероховатости, созданию поверхности с гетерогенным смачиванием и, соответственно, более медленному растеканию капли.

Наибольший эффект обработка пептонным раствором оказала на супергидрофобную поверхность. После обработки угол смачивания уменьшился с 170.7° до 142.8° , а угол скатывания вырос с 2.6° до 38.4° . Это может быть связано с физико-химическими свойствами пептонного раствора. Снижение угла смачивания на супергидрофобных поверхностях можно объяснить тем, что образующаяся при высыхании раствора бактериологического пептона пленка содержит аминокислоты и пептиды, гидрофильные функциональные группы ко-

Таблица 1. Углы смачивания различных пластин

Образец	Угол смачивания, град	Угол скатывания/соскальзывания, град
B	71.08 ± 8.93	—
BP	70.46 ± 4.15	—
BF	81.17 ± 8.82	—
Phil	Полное растекание	—
PhilP	Полное растекание	—
PhilF	59.96 ± 18.65	—
Phob	170.7 ± 0.25	2.63 ± 1.22
PhobP	142.79 ± 4.07	38.36 ± 8.25
PhobF	133.36 ± 5.56	55.99 ± 15.66
C	62.72 ± 11.51	—
CP	31.11 ± 8.49	—
CF	74.35 ± 11.38	—

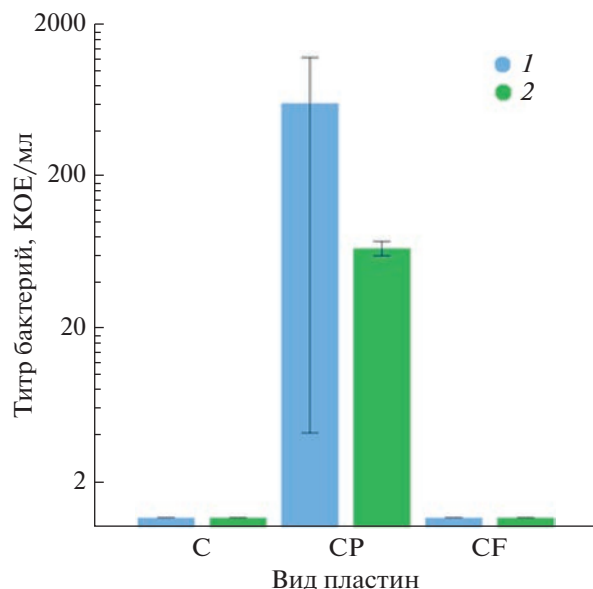


Рис. 2. Экспериментальные данные бактериальной загрязненности пластин с напыленным медным покрытием: исходных, обработанных пептонным раствором и загрязненных потожировыми выделениями. Бактериальная загрязненность возникла в результате контакта пластин с каплей бактериальной дисперсии в условиях сухого контакта (СХ) в течение либо 1.5 (1), либо 24 ч (2). Исходный титр бактериальной дисперсии 2×10^8 КОЕ/мл, то есть в капле содержалось 2×10^6 КОЕ *S. aureus*.

торых склонны к образованию водородных связей с водой, что улучшает смачивание.

После обработки потожировыми выделениями с пальцев рук у контрольных и супергидрофильных образцов угол смачивания увеличился, а у супергидрофобных — значительно уменьшился.

Для объяснения наблюдаемого изменения смачивания здесь следует отметить, что состав потожировых выделений сильно зависит от внешних условий, физической активности, температуры и множества других параметров, а также сильно изменяется для каждого отдельного человека [28–30]. На ладонях и пальцах человека находятся только эккринные потовые железы и отсутствует выработка себума — кожного сала [31]. Пот из этого типа желез в основном состоит из воды и растворенных минеральных солей — хлоридов калия, натрия и кальция, а также некоторых органических веществ — лактата, мочевины, аминокислот, аммиака.

Однако в условиях повседневной жизни неизбежно происходят контакты человеческих рук с другими поверхностями тела — лицом, волосами, на которых активно вырабатывается кожное сало — себум. Поскольку в состав себума входят гидрофобные вещества, такие как триглицериды, восковые эфиры, жирные кислоты и сквален [32], такие за-

грязнения, попадающие на гидрофильные и супергидрофильные образцы, должны вызывать гидрофобизацию их поверхности. Для супергидрофобных поверхностей ситуация иная. Для получения наших супергидрофобных поверхностей мы использовали фтороксисилан для снижения поверхностной энергии текстурированной металлической поверхности. Согласно литературным данным, фторированные соединения с длинной фторуглеродной цепью относятся к соединениям с наименьшей поверхностной энергией. Гидрофобные соединения, присутствующие в потожировых загрязнениях, имеют различные функциональные группы, включая как гидрофобные, так и гидрофильные, что отвечает гораздо большей поверхностной энергии, чем у фтороксисиланов. Поэтому нанесение потожировых загрязнений должно приводить к повышению поверхностной энергии супергидрофобных образцов и, как следствие, к снижению углов смачивания и повышению углов скатывания. При очень значительных загрязнениях возможна даже потеря супергидрофобного состояния поверхности. Данные, представленные в табл. 1, указывают на переход из супергидрофобного в гидрофобное состояние после 47 касаний пальцами различных людей. Такое изменение смачивания, очевидно, должно способствовать увеличению площади контакта между каплей бактериально загрязненной дисперсии и образцом и находить отражение в его антибактериальной активности.

Определение антибактериальной активности

После изучения влияния загрязнений на смачиваемость образцов были проведены опыты по определению антибактериальной активности каждого из типов исследуемых здесь материалов. Контрольные, напыленные, супергидрофильные и супергидрофобные образцы были исследованы с помощью двух протоколов (влажного и сухого контакта) при двух временных промежутках — часовом и суточном.

На чашках Петри с контрольными медными и супергидрофильными пластинами, как исходными, так и загрязненными пептонным раствором или потожировыми выделениями, роста *S. aureus* не наблюдали, что подтверждает высокую бактерицидную эффективность объемной меди, которая была неоднократно отмечена в литературе ранее [21, 26]. Бактериальное загрязнение пластин с напыленной медью, которое наблюдали после контакта с каплями бактериальной дисперсии, представлено на рис. 2.

Полученные данные позволяют рассматривать напыленные медные пленки, как поверхности с высокой бактерицидной эффективностью. Даже на медных пленках, обработанных пептонным раствором, который при испарении растворителя формирует на поверхности пептонный слой, бактериаль-

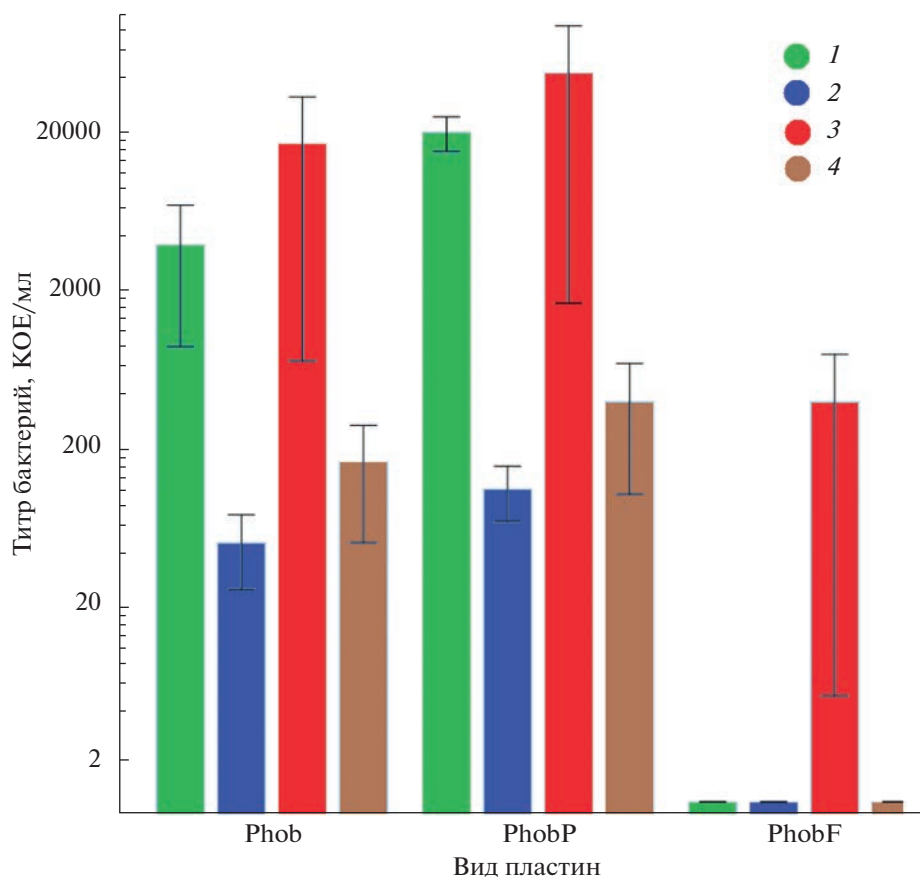


Рис. 3. Экспериментальные данные бактериальной активности на супергидрофобных пластинах с различной обработкой. Исходный титр бактериальной дисперсии 9×10^9 КОЕ/мл, то есть на поверхность пластины попали 9×10^7 КОЕ. Сухой контакт 1.5 (1), 24 ч (2); влажный контакт 1 (3) и 24 ч (4).

ный титр не превышает 5×10^2 КОЕ/мл для исходно очень высокой концентрации бактериальных клеток, что указывает на бактерицидную эффективность таких поверхностей, равную 99.975%.

На супергидрофобных пластинах картина была более сложная. Полученные результаты отображены на рис. 3. Значимый рост наблюдали только на супергидрофобных пластинах 2-х типов: исходных и обработанных пептонным раствором. При этом бактерицидный эффект супергидрофобных пластин проявлялся в том, что 24-часовой контакт капли бактериальной дисперсии с пластинками, как исходными, так и загрязненными пептонным раствором, приводил к снижению титра бактериальных клеток на два порядка. Супергидрофобные пластинки, загрязненные потожировыми выделениями, показывали небольшой рост только для капель бактериальной дисперсии, находившихся в контакте с пластинкой в течение 1 ч в условиях подавления испарения капли (рис. 3).

Полученные результаты можно объяснить следующим образом. На исходных супергидрофобных пластинах, имеющих очень высокие углы

смачивания ($170.7 \pm 0.25^\circ$) и гетерогенный режим смачивания, площадь контакта капли бактериальной дисперсии/подложка оказывается очень маленькой. Это снижает вероятность непосредственного контакта бактерий с медной подложкой, а супергидрофобное состояние поверхности подавляет перенос ионов из подложки в дисперсию. Таким образом, подавляется контакт бактериальных клеток с ионами меди, которые оказывают токсическое действие на клетки *S. aureus*. Как было показано ранее в нашей работе [23], ингибирование контакта ионов меди с бактериальными клетками имеет место до развития коррозионного процесса на поверхности медных пластин. Именно поэтому концентрация в капле бактериальной дисперсии на супергидрофобной подложке не снижается так же быстро, как при контакте с гладкими или супергидрофильными пластинами.

Что касается антибактериальной активности супергидрофобных образцов, загрязненных потожировыми выделениями, то, как отмечалось выше, именно при такой контаминации супергидрофобные пластины обладали наименьшими углами смачивания и наибольшими углами

Таблица 2. Результаты исследования по протоколу с разделением бактериального загрязнения капли и подложки

Тип обработки пластин	Количество бактерий через 1 ч, КОЕ		Количество бактерий через 24 ч, КОЕ	
	пластина	капля	пластина	капля
Phob	0	3.3×10^6	20	8×10^5
	0	3.3×10^6	0	2.3×10^5
PhobP	0	3.2×10^6	10	1.2×10^5
	0	3.0×10^6	90	1.6×10^5
PhobF	0	10^2	0	0
	0	4.0×10^3	0	0

Исходный титр бактериальной дисперсии составлял 1.55×10^9 КОЕ/мл, то есть на поверхность пластины помещалась капля, содержащая 1.55×10^7 КОЕ.

скатывания. Уменьшение угла смачивания приводит к увеличению площади реального контакта капли с поверхностью, что упрощает как осаждение бактериальных клеток на поверхность меди, так и переход токсичных ионов меди в жидкость. Кроме того, в состав потожирового слоя входят минеральные соли (хлориды натрия и калия), которые дополнительно интенсифицируют коррозию меди и насыщение жидкости ионами.

Для дополнительной проверки этого предположения было необходимо узнать, какое количество бактерий остается в капле бактериальной дисперсии, а какое – на поверхности супергидрофобной пластины. Для этого используемые протоколы были модифицированы следующим образом. Супергидрофобную пластину и осажденную на нее каплю по окончании времени выдержки (1 или 24 ч) в условиях влажного контакта помещали в две разные пробирки с 1 мл физиологического раствора для раздельного встряхивания на шейкере. Далее отбираемые пробы засеивали на отдельные чашки Петри для определения количества колоний.

Через 1 ч контакта капель бактериальной дисперсии с пластинами в условиях влажного контакта растворитель практически не испарялся. Как следует из данных, представленных в табл. 2, при удалении капли поверхность оставалась бактериально чистой, поскольку не было обнаружено роста на смывах, получаемых как с исходного супергидрофобного образца, так и с супергидрофобных образцов, загрязненных пептонным раствором или потожировыми загрязнениями. При этом в объеме капель после 1 ч контакта с исходными супергидрофобными пластинами и супергидро-

фобными пластинами, обработанными пептонным раствором, оставалось примерно одинаковое количество колоний (около 20% от исходного значения КОЕ). При контакте капли с супергидрофобными образцами, загрязненными потожировыми выделениями, бактериальный титр оказался меньше на 3–4 порядка, что указывает на более активное бактерицидное действие подложки, связанное с развитием процессов коррозии на поверхности меди.

Через 24 ч непрерывного контакта капли с супергидрофобными подложками, ее объем значительно уменьшался за счет испарения растворителя, что приводило к аккумулярованию следовых количеств бактериальных клеток на поверхности супергидрофобной меди. Высокий защитный эффект супергидрофобного покрытия на исходной супергидрофобной поверхности и поверхности, загрязненной пептонным раствором (см. табл. 1), способствовал экранированию бактериальных клеток, диспергированных в капле, от контакта с медной подложкой и ингибировал коррозионный процесс. Следствием этого является достаточно высокий титр бактериальных клеток в капле на указанных двух подложках. За 24 ч концентрация *S. aureus* в каплях, находящихся на обеих подложках, упала в среднем на порядок. Поверхность пластин, обработанных потожировыми выделениями, имея не очень высокий угол смачивания и высокий угол скатывания, уже не обеспечивала гетерогенный режим смачивания меди бактериальной дисперсией, что способствовало повышению бактерицидного действия меди. В результате, как в капле, так и на подложке бактерий обнаружено не было (см. табл. 2).

Таким образом, представленные в табл. 2 результаты коррелируют с влиянием загрязнений на смачивание супергидрофобных пластин: чем меньше угол смачивания и больше площадь контакта с каплей, тем легче бактериальные клетки подвергаются токсическому действию ионов меди и тем активнее взаимодействуют с опасными для клеточной оболочки наноструктурами на поверхности образцов.

*Влияние загрязнений на процесс
высыхания капель жидкости*

Как обсуждалось выше, бактерицидная активность прямо зависит от характера смачивания поверхности меди бактериальной дисперсией. Однако после осаждения капли на твердую поверхность происходит изменение ее параметров за счет таких процессов, как испарение растворителя, взаимодействие компонентов капли с подложкой, изменение состава капли, происходящее в результате такого взаимодействия. Поэтому для детального понимания механизмов бактерицидного действия поверхностей с различным смачиванием требуется отдельное исследование изменения параметров капли при ее длительном нахождении на поверхности. Одним из основных процессов, сопровождающих длительное нахождение капли на поверхности, является ее испарение. Изменение параметров сидящей капли в процессе ее испарения в условиях недосыщения паров многократно обсуждалось в литературе [33–38].

В общем виде весь процесс испарения капли после нанесения на подложку можно описать четырьмя стадиями изменения параметров: стадия непосредственно растекания; стадия испарения с постоянным диаметром основания и уменьшающимся контактным углом; стадия испарения с постоянным контактным углом и уменьшающимся диаметром основания и, наконец, стадия испарения с уменьшением как краевого угла, так и базового диаметра до исчезновения сидящей капли. Одними из первых на существование стадий испарения с постоянным контактным углом и сжимающейся контактной линией или постоянным диаметром и одновременно контактным углом, снижающимся за счет потерь на испарение, обратили внимание Пикнетт и Бексон [33]. Авторы связали переключение со стадии постоянного диаметра на стадию постоянного угла с достижением углом смачивания значения, соответствующего углу оттекания. Позднее было показано, что на текстурированных и шероховатых подложках существование указанных стадий изменения параметров при испарении приводит к явлению залипания–проскальзывания линии трехфазного контакта капли [36, 38].

Поскольку в качестве дисперсионной среды для дисперсий *S. aureus* использовали фосфатный

буфер (PBS), и именно дисперсионная среда, в основном, определяет процессы взаимодействия бактериальной дисперсии с супергидрофобными поверхностями [25], в данной работе мы изучили эволюцию параметров капель PBS, помещенных на все исследуемые в данной работе супергидрофобные поверхности. Были получены зависимости изменения угла смачивания, поверхностной энергии, площади контакта и объема капли фосфатного буфера (PBS) от времени нахождения капли на подложках в открытых атмосферных условиях при влажности $55.02 \pm 1.12\%$.

На представленных на рис. 4 зависимостях изменения угла смачивания и контактного диаметра от времени можно выделить участок длительностью ~ 1 мин, соответствующий растеканию капли после ее помещения на поверхность. Это растекание соответствует установлению квазиравновесной формы капли, характеризуемой углом натекания. Испарение капли, происходящее в течение всего периода наблюдения за ней, приводит к постоянному снижению ее объема. На зависимости контактного диаметра от времени можно выделить и второй участок, от 1 до 6 мин, соответствующий постоянству контактного диаметра при снижении угла смачивания. Также на зависимостях угла смачивания и контактного диаметра можно отметить слабо выраженные скачки угла и диаметра на 24, 38, 42 мин, соответствующие залипанию–проскальзыванию линии трехфазного контакта капли (выделены стрелками). Интересно отметить, что поверхностное натяжение капли длительное время падает в процессе испарения, что можно связать с десорбцией гидрофобного агента, физически адсорбированного на поверхности текстурированной меди, и его переходом на границу капля–пар. И хотя количество десорбированного агента может быть мало, уменьшение площади поверхности капля–пар в процессе испарения приводит к концентрированию фторированного силана на поверхности капли и соответствующему дальнейшему падению поверхностного натяжения.

Здесь следует отметить, что в процессе испарения на исходной супергидрофобной поверхности не происходит длительного залипания линии трехфазного контакта, и вся капля стягивается в объем с очень небольшой площадью контакта с поверхностью. На это указывает тот факт, что после полного испарения фосфатного буфера на поверхности остаются лишь несколько агрегированных смешанных кристаллов, содержащих хлорид натрия, гидрофосфат натрия, хлорид калия и дигидрофосфат калия (рис. 5а).

На супергидрофобной поверхности, загрязненной потожировыми выделениями (рис. 5б) и пептонным раствором (рис. 5в), сухое кристаллическое вещество фосфатного буфера после испа-

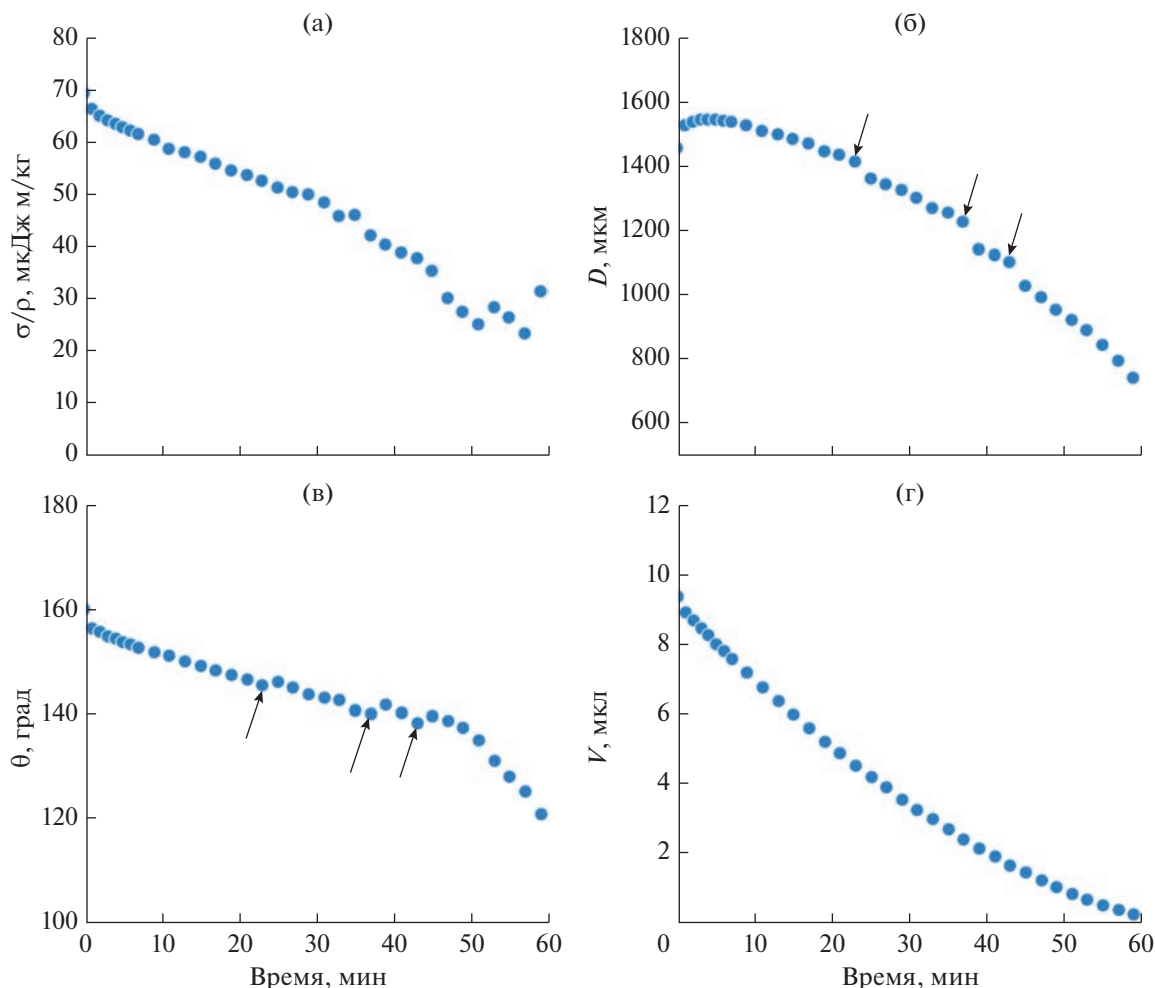


Рис. 4. Изменение во времени характеристик капли PBS на исходной супергидрофобной пластине: (а) отношение поверхностного натяжения σ к плотности ρ ; (б) диаметр контакта D , (в) угол смачивания θ ; (г) объем капли V . Стрелки указывают на участки, соответствующие залипанию—проскальзыванию линии трехфазного контакта капли. Экспериментальная погрешность величин, показанных на графиках, меньше размера значков, используемых для обозначения соответствующих данных.

рения капли распределено практически по всей начальной площади капли, указывая на зацепление контактной линии уже на первых этапах испарения. На это же указывает и поведение угла смачивания и контактного диаметра капли в процессе испарения (рис. 6 и 7). Небольшой рост поверхностного натяжения капли при больших временах контакта на представленных зависимостях указывает на концентрирование солей в капле при ее испарении.

Известно, что увеличение концентрации хлоридов калия и натрия повышает величину поверхностного натяжения водных растворов. Однако, при испарении капли даже небольшого объема, концентрация солей начинает значимо повышаться только при больших временах испарения с многократным изменением объема капли. Следовательно, не ожидается значительного роста

плотности раствора на исследованных временах контакта капли PBS с подложками и наблюдающихся изменениях объема капель (рис. 6 и 7). Таким образом, показанное на этих рисунках небольшое повышение отношения поверхностного натяжения к плотности раствора можно связать с влиянием соли на поверхностное натяжение капли.

Наличие участков со скачкообразным изменением контактного диаметра капли и угла смачивания (рис. 7б, 7в) указывает на залипание—проскальзывание линии трехфазного контакта при испарении капли PBS на обработанной пептонным раствором супергидрофобной пластине. Такое поведение можно интерпретировать, как зацепление линии трехфазного контакта на гидрофильных функциональных группах бактериологического пептона, осаждаемого на поверхность покрытия при контаминации пептонным раствором.

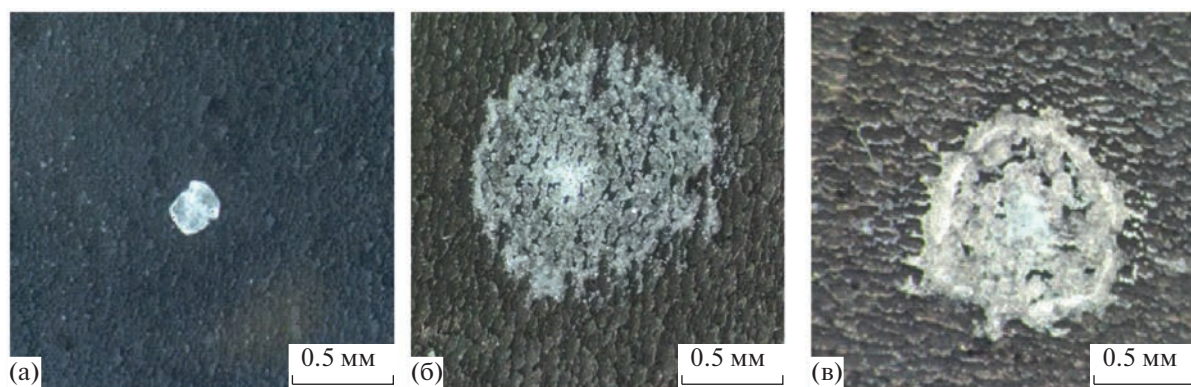


Рис. 5. Внешний вид сухого остатка после испарения капли фосфатного буфера на супергидрофобной поверхности: (а) исходная поверхность; (б) поверхность, загрязненная потожировыми выделениями; (в) поверхность, обработанная пептонным раствором.

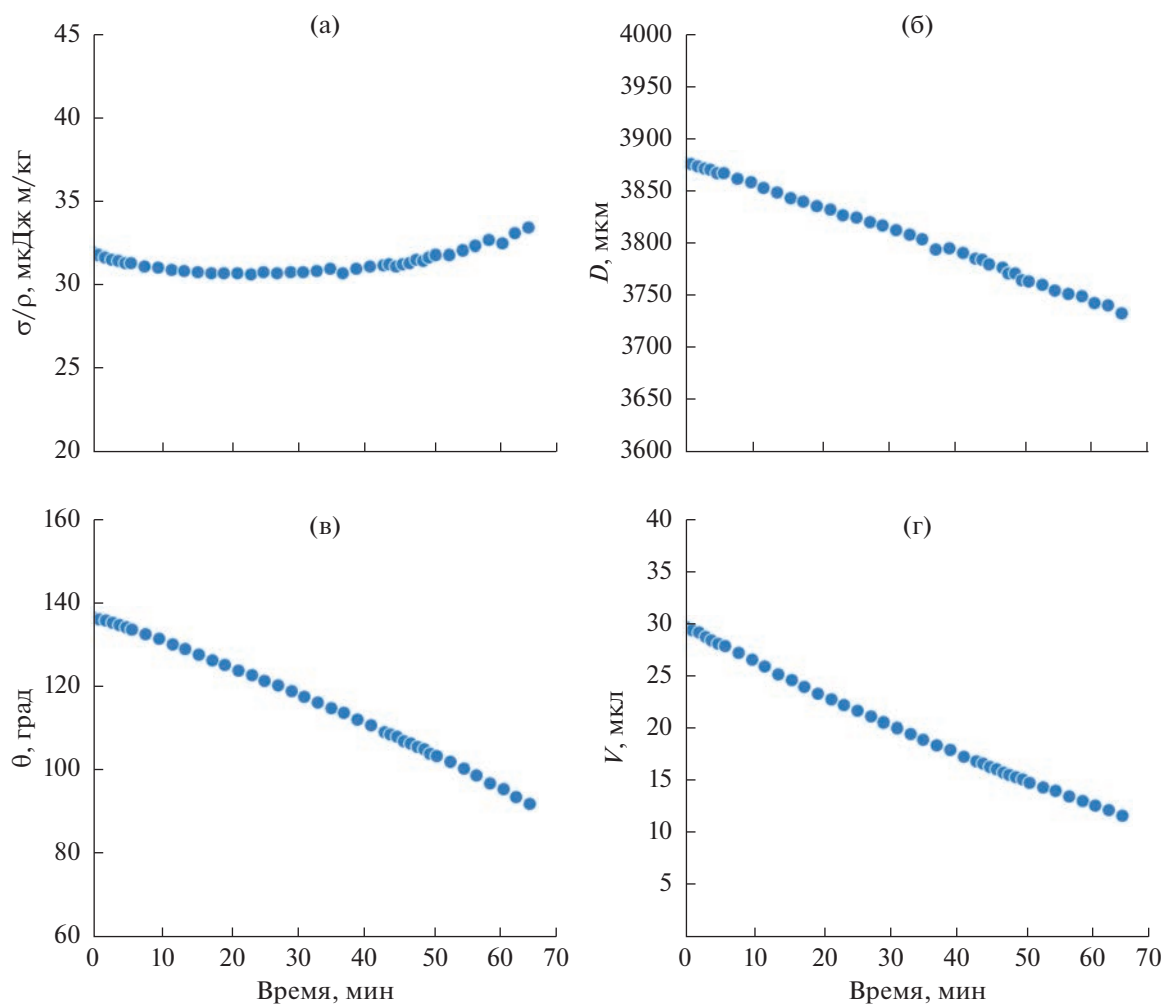


Рис. 6. Изменение во времени характеристик капли PBS на обработанной потожировыми выделениями супергидрофобной пластине: (а) отношение поверхностного натяжения σ к плотности ρ ; (б) диаметр контакта D , (в) угол смачивания θ ; (г) объем капли V . Экспериментальная погрешность величин, показанных на графиках, меньше размера значков, используемых для обозначения соответствующих данных.

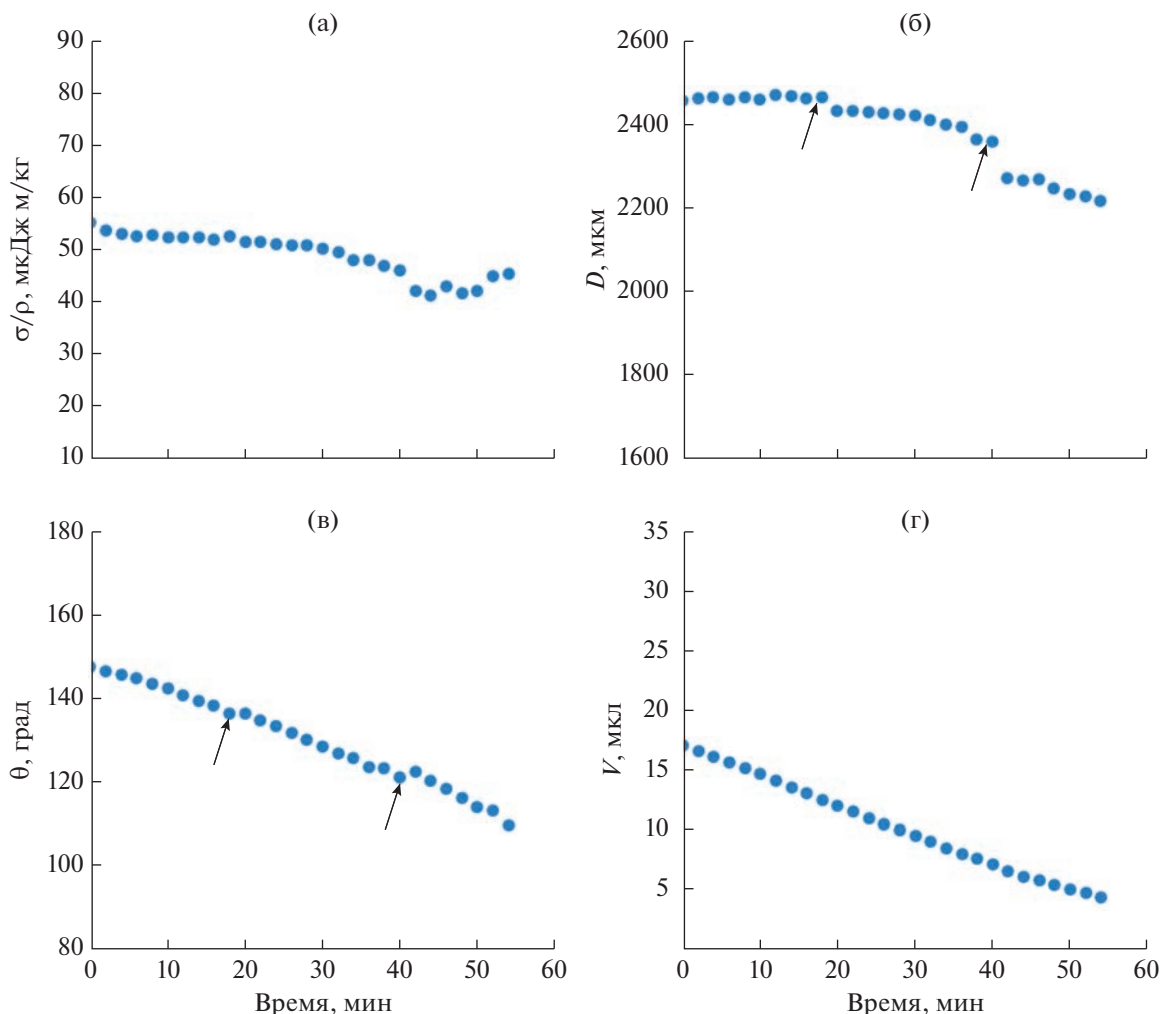


Рис. 7. Изменение во времени характеристик капли PBS на обработанной пептонным раствором супергидрофобной пластине: (а) отношение поверхностного натяжения σ к плотности ρ ; (б) диаметр контакта D , (в) угол смачивания θ ; (г) объем капли V . Стрелки указывают на участки, соответствующие залипанию-проскальзыванию линии трехфазного контакта капли. Экспериментальная погрешность величин, показанных на графиках, меньше размера значков, используемых для обозначения соответствующих данных.

ВЫВОДЫ

В данной работе было показано, что бактерицидная эффективность как контрольных медных и супергидрофильных медных пластин, так и напыленных медных пленок оказывается близкой к 100% и практически не изменяется после загрязнения пептонным раствором или потожировыми выделениями. Это позволяет рассматривать такие материалы, как перспективные для практического применения в учреждениях, связанных с оказанием медицинской помощи. Супергидрофобные поверхности с высокими значениями угла смачивания ($170.7 \pm 0.25^\circ$) показывают значительно меньшую бактерицидную эффективность по отношению к клеткам, находящимся в бактериальной дисперсии, за счет малой площади контакта с каплями бактериальной культуры. Защит-

ные свойства супергидрофобного покрытия подавляют два главных механизма бактерицидного действия медных текстурированных поверхностей — токсическое действие ионов меди и разрушение клеточных оболочек при механическом взаимодействии с наночастицами иерархической поверхности. В то же время, поскольку благодаря супергидрофобности поверхности капли бактериальных дисперсий спонтанно удаляются с поверхности при ее небольшом наклоне или под воздействием вибрации и ветровой нагрузки, супергидрофобные поверхности остаются бактериально чистыми даже при контакте с сильно бактериально загрязненными биологическими средами. В связи с тем, что супергидрофобные свойства поверхности могут быть скомпрометированы биологическими загрязнениями, попадающими на такие

поверхности с рук пациентов, мы в данной работе исследовали эффект деградации бактерицидных свойств, связанный именно с такими внешними загрязнениями. В целом, представленные здесь результаты позволяют рассматривать использование медных поверхностей с различным смачиванием, как эффективный альтернативный метод в борьбе с внутрибольничными инфекциями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование антибактериальных свойств напыленных медных покрытий выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-73-30004, <https://rscf.ru/project/23-73-30004/>. Влияние белковых загрязнений и загрязнений, связанных с касаниями кожей человека, на антибактериальные свойства поверхностей с экстремальным смачиванием изучалось в рамках гранта РФФИ 20-53-56066.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Suksatan W., Jasim S.A., Widjaja G., Jalil A.T., Chupradit S., Ansari M.J., Mustafa Y.F., Hammoodi H.A., Mohammadi M.J.* Assessment effects and risk of nosocomial infection and needle sticks injuries among patients and health care workers // *Toxicology Reports*. 2022. V. 9. P. 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.02.013>
2. *Nimer N.A.* Nosocomial infection and antibiotic-resistant threat in the middle east // *Infection and Drug Resistance*. 2022. V. 15. P. 631–639. <https://doi.org/10.2147/IDR.S351755>
3. *Du Q., Zhang D., Hu W., Li X., Xia Q., Wen T., Jia H.* Nosocomial infection of COVID-19: A new challenge for healthcare professionals // *International Journal of Molecular Medicine*. 2021. V. 47. № 4. P. 1–1. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4864>
4. *World Health Organization.* The burden of health care-associated infection worldwide // *World Health Organization*. 2010.
5. *Ananda T., Modi A., Chakraborty I., Managuli V., Mukhopadhyay C., Mazumder N.* Nosocomial infections and role of nanotechnology // *Bioengineering*. 2022. V. 9. № 2. P. 51. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020051>
6. *Gold K., Slay B., Knackstedt M., Gaharwar A.K.* Antimicrobial activity of metal and metal-oxide based nanoparticles // *Advanced Therapeutics*. 2018. V. 1. № 3. P. 1700033. <https://doi.org/10.1002/adtp.201700033>
7. *Hobman J.L., Crossman L.C.* Bacterial antimicrobial metal ion resistance // *Journal of Medical Microbiology*. 2015. V. 64. № 5. P. 471–497. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023036-0>
8. *Psomas G.* Copper (II) and zinc (II) coordination compounds of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Structural features and antioxidant activity // *Coordination Chemistry Reviews*. 2020. V. 412. P. 213259. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213259>
9. *Ustundag B., Yilmaz E., Dogan Y., Akarsu S., Canatan H., Halifeoglu I., Cikim G., Aygun A.D.* Levels of cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants // *Mediators of Inflammation*. 2005. V. 2005. № 6. P. 331–336. <https://doi.org/10.1155/MI.2005.331>
10. *Vincent M., Hartemann P., Engels-Deutsch M.* Antimicrobial applications of copper // *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2016. V. 219. № 7. Part A. P. 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.06.003>
11. *Vincent M., Duval R.E., Hartemann P., Engels-Deutsch M.* Contact killing and antimicrobial properties of copper. // *Journal of Applied Microbiology*. 2018. V. 124. № 5. P. 1032–1046. <https://doi.org/10.1111/jam.13681>
12. *Grass G., Rensing C., Solioz M.* Metallic Copper as an antimicrobial surface // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. № 5. P. 1541–1547. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-10>
13. *Dollwet H.H.A., Sorenson J.R.J.* Historic uses of copper compounds in medicine // *Trace Elem. Med.* 1985. V. 2. № 2. P. 80–87.
14. *Inkinen J., Makinen R., Keinonen-Toivola M.M., Nordstrom K., Ahonen M.* Copper as an antibacterial material in different facilities // *Lett. Appl. Microbiol.* 2017. V. 64. № 1. P. 19–26. <https://doi.org/10.1111/lam.12680>
15. *Arendsen L.P., Thakar R., Sultan A.H.* The use of copper as an antimicrobial agent in health care, including obstetrics and gynecology // *Clinical Microbiology Reviews*. 2019. V. 32. № 4. P. e00125-18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00125-18>
16. *de Romaña D.L., Olivares M., Uauy R., Araya M.* Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2011. V. 25. № 1. P. 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.11.004>
17. *Turnlund J.R., Keyes W.R., Kim S.K., Domek J.M.* Long-term high copper intake: Effects on indexes of copper status, antioxidant status, and immune function in young men // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004. V. 79. № 6. P. 1037–1044. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.6.1037>
18. *Pelgrom S.M.G.J., Lock R.A.C., Balm P.H.M., Bonga S.W.* Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure // *Aquatic Toxicology*. 1995. V. 32. № 4. P. 303–320. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00004-N](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00004-N)
19. *Emelyanenko A.M., Kaminsky V.V., Pytskii I.S., Emelyanenko K.A., Domantovsky A.G., Chulkova E.V., Shiryaev A.A., Aleshkin A.V., Boinovich L.B.* Antimicrobial activity and degradation of superhydrophobic magnesium substrates in bacterial media // *Metals*. 2021. V. 11. № 7. P. 1100. <https://doi.org/10.3390/met11071100>
20. *Boinovich L.B., Emelyanenko K.A., Domantovsky A.G., Chulkova E.V., Shiryaev A.A., Emelyanenko A.M.*

- Pulsed laser induced triple layer copper oxide structure for durable polyfunctionality of superhydrophobic coatings // *Advanced Materials Interfaces*. 2018. V. 5. № 21. P. 1801099.
<https://doi.org/10.1002/admi.201801099>
21. *Emelyanenko A.M., Kaminskii V.V., Pytskii I.S., Domantovsky A.G., Emelyanenko K.A., Aleshkin A.V., Boinovich L.B.* Antibacterial properties of superhydrophilic textured copper in contact with bacterial suspensions // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020. V. 168. P. 488–491.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04737-5>
 22. *Rosli N.A., Teow Y.H., Mahmoudi E.* Current approaches for the exploration of antimicrobial activities of nanoparticles // *Science and Technology of Advanced Materials*. 2021. V. 22. №. 1. P. 885–907.
<https://doi.org/10.1080/14686996.2021.1978801>
 23. *Emelyanenko A.M., Pytskii I.S., Kaminsky V.V., Chulkova E.V., Domantovsky A.G., Emelyanenko K.A., Sobolev V.D., Aleshkin A.V., Boinovich L.B.* Superhydrophobic copper in biological liquids: Antibacterial activity and microbiologically induced or inhibited corrosion // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020. V. 185. P. 110622.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110622>
 24. *Zarasvand K.A., Rai V.R.* Microorganisms: Induction and inhibition of corrosion in metals // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014. V. 87. P. 66–74.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.023>
 25. *Каминский В.В., Емельяненко А.М., Аleshkin A.B., Емельяненко К.А., Бойнович Л.Б.* Эффективность и механизмы бактерицидного действия на *Escherichia coli* супергидрофильной поверхности магниевого сплава // *Микробиология*. 2021. Т. 90. № 5. С. 613–617.
<https://doi.org/10.31857/S0026365621050098>
 26. *Boinovich L.B., Kaminsky V.V., Domantovsky A.G., Emelyanenko K.A., Aleshkin A.V., Zulkarneev E.R., Kiseleva I.A., Emelyanenko A.M.* Bactericidal activity of superhydrophobic and superhydrophilic copper in bacterial dispersions // *Langmuir*. 2019. V. 35. № 7. P. 2832–2841.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03817>
 27. *Boinovich L.B., Modin E.B., Aleshkin A.V., Emelyanenko K.A., Zulkarneev E.R., Kiseleva I.A., Vasiliev A.L., Emelyanenko A.M.* Effective antibacterial nanotextured surfaces based on extreme wettability and bacteriophage seeding // *ACS Applied Nano Materials*. 2018. V. 1. №. 3. P. 1348–1359.
<https://doi.org/10.1021/acsanm.8b00090>
 28. *Baker L.B., Wolfe A.S.* Physiological mechanisms determining eccrine sweat composition // *European Journal of Applied Physiology*. 2020. V. 120. P. 719–752.
<https://doi.org/10.1007/s00421-020-04323-7>
 29. *Verde T., Shephard R.J., Corey P., Moore R.* Sweat composition in exercise and in heat // *Journal of Applied Physiology*. 1982. V. 53. № 6. P. 1540–1545.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1982.53.6.1540>
 30. *Wilke K., Martin A., Terstegen L., Biel S.S.* A short history of sweat gland biology // *International Journal of Cosmetic Science*. 2007. V. 29. № 3. P. 169–179.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2007.00387.x>
 31. *Collins K.J.* Composition of palmar and forearm sweat // *Journal of Applied Physiology*. 1962. V. 17. № 1. P. 99–102.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1962.17.1.99>
 32. *Picardo M., Ottaviani M., Camera E., Mastrofrancesco A.* Sebaceous gland lipids // *Dermato-Endocrinology*. 2009. V. 1. № 2. P. 68–71.
<https://doi.org/10.4161/derm.1.2.8472>
 33. *Picknett R.G., Bexon R.* The evaporation of sessile or pendant drops in still air // *Journal of Colloid and Interface Science*. 1977. V. 61. № 2. P. 336–350.
[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(77\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(77)90396-4)
 34. *Bourges-Monnier C., Shanahan M.E.R.* Influence of evaporation on contact angle // *Langmuir*. 1995. V. 11. № 7. P. 2820–2829.
<https://doi.org/10.1021/la00007a076>
 35. *Bennacer R., Ma X.* Effect of temperature and surfactants on evaporation and contact line dynamics of sessile drops // *Heliyon*. 2022. V. 8. № 11. P. e11716.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11716>
 36. *Anantharaju N., Panchagnula M., Neti S.* Evaporating drops on patterned surfaces: Transition from pinned to moving triple line // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009. V. 337. № 1. P. 176–182.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.04.095>
 37. *Misyura S.Y., Andryushchenko V.A., Morozov V.S., Smovzh D.V.* The effect of textured surface on graphene wettability and droplet evaporation // *Journal of Materials Science*. 2022. V. 57. № 3. P. 1850–1862.
<https://doi.org/10.1007/s10853-021-06853-7>
 38. *Chulkova E.V., Emelyanenko K.A., Emelyanenko A.M., Boinovich L.B.* Elimination of wetting study flaws in unsaturated vapors based on Laplace fit parameters // *Surface Innovations*. 2022. V. 10. № 1. P. 21–24.
<https://doi.org/10.1680/jsuin.21.00012>

УДК 541.182.4.65

КОНЦЕНТРАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ КАК ВАЖНЫЙ ПАРАМЕТР ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИСПЕРСИЙ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОМЕДИЦИНЕ

© 2023 г. Т. Н. Паширова^{1, *}, З. М. Шайхутдинова¹, Э. Б. Соуто^{2, 3}, П. Массон⁴, В. Ф. Миронов¹

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова,

ФИЦ Казанский научный центр РАН, ул. Акад. Арбузова, 8, Казань, 420088 Россия

²UCIBIO – Applied Molecular Biosciences Unit, MEDTECH, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Department of Drug Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, 4050-313 Portugal

³Associate Laboratory i4HB – Institute for Health and Bioeconomy, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, 4050-313 Portugal

⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

*e-mail: tatyana_pashirova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.06.2023 г.

После доработки 03.08.2023 г.

Принята к публикации 03.08.2023 г.

В настоящее время стоит острая необходимость в стандартизации методов определения концентрации наночастиц и создания эталонных материалов для калибровки измеряемой величины. Точное определение концентрации наночастиц необходимо для оценки максимальной дозы вводимых нанолекарств в области диагностики и терапии *in vivo*, определения порядка реакции при использовании ферментативных нанореакторов. Кроме того, данный параметр обуславливает биологические эффекты, такие как образование белковой короны, улучшение поглощения и интернализации с клетками и т.д. В обзоре представлены наиболее часто встречающиеся способы определения концентрации наночастиц, основанные на их прямой визуализации с использованием методов микроскопии, на поглощении или рассеянии света, прямого подсчета наночастиц и гравиметрии, обсуждены их достоинства, недостатки и способы усовершенствования. Показано, что для более надежного и достоверного определения концентрации наночастиц следует использовать комбинацию нескольких методов.

Ключевые слова: система доставки лекарств, концентрация наночастиц, наночастица, доза-эффект, клеточное поглощение, интернализация, нанореактор

DOI: 10.31857/S0023291223600487, **EDN:** DLPFDE

ВВЕДЕНИЕ

Наноразмерные системы доставки лекарственных веществ (НСДЛВ) представляют большой интерес в области биомедицины и фармацевтики. Как правило, при создании новых НСДЛВ в публикациях описывается их рецептура с точки зрения способа получения, физико-химических свойств и биологической активности. Ключевыми параметрами физико-химических свойств нанолекарств являются размер наночастиц (НЧ), полидисперсность, площадь поверхности, загрузка лекарственного вещества, стабильность, кинетика высвобождения, в некоторых случаях указывается дзета-потенциал, например, в случае доставки генного материала в клетку, когда важен заряд НЧ.

Концентрация НЧ (количество НЧ в объеме, частиц/мл) – важный параметр для всесторонней характеристики нанолекарства. Так, напри-

мер, не только размер, но и количественная (численная) концентрация НЧ влияет на абсорбцию, клиренс и место расположения НСДЛВ в организме человека. Известно, что данный параметр сказывается на эффективном поглощении нанолекарств клетками, например, фагоцитами, т.е. содержание лекарства внутри НЧ будет определять их биологическую активность. Концентрация дает информацию о количественной оценке аффинных сайтов на каждой функционализированной НЧ, что важно при создании вирусов, для генной терапии, визуализирующих зондов и вакцин. Данный параметр позволяет точно оценить концентрацию лекарственного вещества в каждой частице или его распределение между фазами, что определяет, будет ли система являться растворенной или дисперсной, и, следовательно, будет свидетельствовать о кинетике и ме-

ханизме высвобождения. Известно, что эффективность визуализации зависит от мощности лазерного излучения и концентрации наноагентов, поэтому точное определение концентрации НЧ необходимо для оценки максимальной дозы вводимых нанопрепаратов в системный кровоток, что является основополагающим для диагностики *in vivo* и терапии заболеваний [1, 2].

Кроме того, при конструировании эффективного нанореактора концентрация загруженного компонента, например, фермента, будет определять порядок реакции, протекающей внутри замкнутых систем [3–5], что чрезвычайно важно при создании искусственных органелл, клеток и тканей [6], работе ферментных наноустройств [5]. Концентрация нанопрепарата требуется для тщательной характеристики продукта при получении разрешения регулирующих органов [1]. Так, фармакопейные требования, касающиеся безопасности лекарственных форм, ограничивают номинальное содержание числа частиц в объеме для инъекционных фармацевтических суспензий на основе твердых НЧ [7]. Регулирующие органы FDA по составам наноносителей в дополнение к таким характеристикам, как средний размер НЧ и полидисперсность, требуют сообщать их численную концентрацию.

Таким образом, точное определение и контроль количественной концентрации НСДЛВ является ключевой характеристикой в наномедицине для достижения максимальной эффективности лекарства и минимизации его токсичности при введении *in vivo* [8]. Известно, что существуют теоретические способы расчета концентрации НЧ, например, предложенные авторами в работе [9, 10]. Однако математические модели достаточно просты, существуют ограничения для расчетов и расхождения теоретического значения по числу НЧ с эмпирическими результатами [11], и самое главное, — не учитывается сложность биологической среды. Поэтому в настоящее время наблюдается острая потребность в надежных эмпирических методах определения численной концентрации НЧ в биологических средах и органах. В настоящем обзоре кратко представлены существующие методы, типы НЧ и их применение.

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ НАНОЧАСТИЦ

Несмотря на то, что в настоящее время нет сертифицированных стандартов для определения концентрации НЧ или эталонных материалов для калибровки измеряемой концентрации [12–14], в литературе встречаются методы, основанные на поглощении или рассеянии света, а также способы прямого подсчета НЧ. Некоторые методы специфичны для определенного типа НЧ, в то время как другие могут быть адаптированы для

широкого спектра нанообъектов. Например, УФ-видимая спектрофотометрия (UV Vis) [15] и масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой [16, 17] достаточно точны для определения концентрации металлических и полупроводниковых НЧ. Для углеродных наноточек лучшим методом определения их концентрации является УФ-видимая, флуоресцентная и атомно-эмиссионная спектрометрия [18]. Метод турбидиметрии дает хорошие результаты для монодисперсных НЧ с известным показателем преломления и коэффициентом рассеяния, таких как частицы латекса или кремнезема, однако чувствительность метода снижается с уменьшением размера НЧ [19, 20].

Методы визуализации

Способ подсчета НЧ методами прямой визуализации (микроскопии) обеспечивает определение количественной концентрации частиц без использования каких-либо стандартов. Однако в этом случае трудно получить высокую статистическую достоверность и требуется достаточно сложная пробоподготовка, так как методы микроскопии не предназначены для измерений в жидких средах. Атомно-силовая (AFM) и трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ) имеют огромный потенциал, обеспечивающий точное измерение числа НЧ. Долгое время эти методы считались наиболее подходящими для высокого разрешения вплоть до нанометрового диапазона. Однако они склонны к артефактам, и их применение ограничено для “мягких” органических образцов с низкой электронной плотностью. Для увеличения контраста таких образцов требуется использование окрашивающих молекул. Более того, идентификация НЧ усложняется, когда образцы подвергаются деформации и агрегации в процессе сушки. Отметим, что процедура сушки в процессе пробоподготовки постоянно совершенствуется, так, например, в работе [21] использовали сочетание функционализации субстрата и ультрацентрифугирования для обеспечения высокого и равномерного извлечения НЧ на субстрате AFM и количественного определения количества НЧ и их распределения по размерам.

Среди методов подсчета, не основанных на микроскопии, известен метод настраиваемого резистивного измерения импульсов (tunable resistive pulse sensing, TRPS), который позволяет связывать количество НЧ с обнаруженными изменениями тока или сопротивления, когда частицы проходят через электрическое поле.

Оптические методы

УФ-видимая спектроскопия, турбидиметрия и динамическое рассеяние света (DLS) — оптические методы, измеряющие интенсивность света

при поглощении или рассеянии НЧ. Способы измерения массовой или счетной концентрации НЧ с помощью данных методов, как правило, предусматривают построение градуировочного графика (зависимости оптической плотности образца на выбранной длине волны от концентрации НЧ) с помощью серии образцов с известными значениями концентрации частиц (образцов сравнения). Затем измеряют оптическую плотность анализируемого образца на той же длине волны и с помощью градуировочного графика определяют соответствующее ему значение концентрации. Для реализации любого из этих способов необходима серия образцов сравнения с заранее известными значениями концентрации.

Известен также оптический способ, не требующий образцов сравнения и использующий для определения счетной концентрации спектры экстинкции. Способ предполагает расчет концентрации НЧ по значению их экстинкции при длине волны, находящейся на достаточном расстоянии от пика плазмонного резонанса. Для такого расчета необходимо знать размер частиц, который определяется по положению пика плазмонного резонанса по шкале длин волн. Этот способ описан в работах [22, 23] для золотых и [24] для серебряных НЧ. Однако данный метод может быть использован только для монодисперсных частиц (один максимум в распределении частиц по размерам), имеющих пик плазмонного резонанса в доступной для наблюдения области. Для полидисперсных систем, в которых имеются частицы двух и более характерных размеров, сильно отличающихся друг от друга, рассматриваемый способ непригоден, за исключением частиц с размером <20 нм [23]. Кроме того, положение пика плазмонного резонанса зависит как от размеров НЧ, так и их поверхности, а также от свойств среды.

Достаточно простой метод турбидиметрии для определения концентрации силикатных НЧ с использованием экспериментально определенных показателя преломления и спектра мутности представлен в работе [25]. Авторы рекомендуют данный метод и для других коллоидных систем, которые агрегативно устойчивы в среде. Одно из требований к используемым приборам — это ограничение апертуры приемника света для устранения эффектов малоуглового рассеяния [25].

DLS как метод определения относительной численной концентрации модельных систем монодисперсных сферических НЧ латекса размером 60 нм, а также коллоидных НЧ серебра и золота диаметром от 4.5 до 50 нм в растворах был применен в работе [26]. Авторы этой работы отмечают, что используемый прибор Zetasizer Nano (Malvern) не позиционируется для указанной цели, однако с помощью него можно производить сравнительный анализ образцов по числен-

ной концентрации НЧ. Данный способ основан на измерении среднего гидродинамического диаметра НЧ для двух образцов и измерения на том же приборе дополнительной оптической характеристики — скорости счета фотонов рассеянного света для каждого из образцов. Расчет относительной концентрации НЧ в одном из образцов по отношению к другому основан на предположении, что интенсивность рассеяния прямо пропорциональна шестой степени диаметра частиц, т.е. в предположении, что интенсивность рассеяния I подчиняется закону Релея: $I \sim d_H^6 n$.

Наиболее близким к вышеописанному способу является метод, описанный в работе [27], включающий измерение среднего гидродинамического диаметра частиц методом DLS, далее — расчет по измеренному значению эффективности экстинкции частиц, измерение оптической плотности на одной из длин волн видимого диапазона и расчет по полученным данным счетной концентрации НЧ с использованием формул для сечения экстинкции общей теории рассеяния Ми, справедливых для частиц с диаметром до 10000 нм. Формула для расчета представлена ниже:

$$N = 4A_\lambda \ln 10 / \pi d_H^2 Q_{\text{экт}} h,$$

где h — длина оптического пути кюветы; A_λ — оптическая плотность образца относительно фона; d_H — гидродинамический диаметр НЧ; $Q_{\text{экт}}$ — рассчитанное значение эффективности экстинкции, согласно теории рассеяния Ми [28]. Данный метод был апробирован на частицах двуокиси кремния и серебра и позволил получить значения абсолютной концентрации НЧ в жидкостях, тем не менее авторы считают, что предложенный способ может быть использован и для других типов НЧ в различных биологических средах.

За последние несколько лет были созданы установки, основанные на новой оптической технологии, получившей название лазерная спектроскопия пропускания (LTS). Данный метод позволяет определить концентрацию НЧ и их геометрический размер путем однократного измерения зависящего от длины волны коэффициента пропускания лазерного луча через суспензию НЧ золота и полистирола [29–31], а также частиц в нормальных и раковых клеточных лизатах [32]. LTS оказалась достаточно перспективной по чувствительности, в особенности для полистирольных НЧ. Метод LTS может быть адаптирован для характеристики НЧ различной формы и геометрии (например цилиндров, дисков, эллипсов и т.д.) с использованием соответствующих алгоритмов, что также дает возможность реализации данного метода для НЧ различной природы. Применение LTS для природных везикул, таких как экзосомы и везикулы, представлено в работе [33]. Синтетические липосомные дисперсии различно-



Рис. 1. Абсолютная концентрация НЧ, представленная как совокупное количество НЧ в суспензии, деленное на вес одной НЧ.

го состава были исследованы в работе [31]. Необходимо отметить, что с помощью данных, полученных LTS, авторам удалось количественно оценить способность захвата гидрофильного противотуберкулезного препарата (изониазида) липосомами и накопление лекарства в фосфолипидном бислое благодаря взаимодействиям липид – лекарство.

Анализ траектории НЧ (NTA) является надежным методом определения концентрации, который основан на рассеянии света и наблюдении за броуновским движением каждой НЧ в отдельности с целью определения среднеквадратичного смещения отдельных НЧ. Анализ осуществляется без разделения популяций НЧ по размерам [34–36]. Данный метод подходит для различных типов НЧ таких как клеточные везикулы, вирусные частицы, микровезикулы и экзосомы, НЧ золота, фуллерены, липосомы и белковые агрегаты [37–41]. Меньше известно о его использовании для анизотропных частиц. Метод NTA был применен для образцов белка, в качестве стандарта использовались НЧ полистирола. Установлено, что для белков более подходящим является режим мониторинга в реальном времени [42]. Ограничением данного метода является пониженная чувствительность при достижении нижнего предела обнаружения размера частиц. Для получения статистически достоверных результатов рекомендуется работать в области концентраций от 10^7 до 10^9 частиц/мл [43]. Наличие агрегации частиц и неоднородности усложняют измерение концентрации данным методом [34, 44, 45]. Результаты, полученные для везикул методом NTA, зависят от настроек измерения [46], программного и аппаратного обеспечения ZetaView или NanoSight NS300 [47]. Авторы полагают, что дальнейшее развитие метода NTA должно быть сосредоточено на стандартизации измерений в биологических средах для того, чтобы свести к минимуму влияние оператора на измерение концентрации НЧ. Для исследования стержнеобраз-

ных структур (диаметр 10 нм, длина 35–250 нм) и белковых, фибриллярных структур на примере белков миозина ($L/d = 80$, гидродинамический размер $d_h \sim 30\text{--}35$ нм) Hoover и Murphy рекомендуют использовать NTA в комбинации с другими методами, такими как статическое рассеяние света (SLS), DLS и TEM. Метод NTA в дополнение к информации о распределении частиц по размерам и концентрации НЧ может быть использован для детектирования изменения морфологии от глобулярной к фибриллярной в режиме реального времени [48].

Гравиметрические методы

По сравнению с аналитическими методами преимуществом гравиметрических измерений является то, что они позволяют получить абсолютную концентрацию НЧ, используя совокупное количество НЧ в суспензии, деленное на вес одной НЧ (рис. 1) по формулам [19]:

$$N = N_{\text{total}}/N_{\text{particle}}, \quad = m_{\text{total}}/m_{\text{particle}} \quad \text{и} \quad C = N/N_A V,$$

где N – количество НЧ в коллоидной суспензии. N_{total} и m_{total} – совокупное количество НЧ в суспензии (N_{total} – общее количество атомов; m_{total} – общий вес НЧ). N_{particle} и m_{particle} – параметры одной НЧ (N_{particle} – среднее количество атомов на одну НЧ, m_{particle} – вес одной НЧ), C – молярная концентрация, V – объем коллоидной суспензии.

Гравиметрический метод определения концентрации НЧ достаточно просто реализуем, если известна плотность исследуемого наноматериала, и может применяться ко всем типам НЧ. Известно, что концентрацию коммерческих эталонных образцов НЧ полистирола, использующихся в качестве стандартов, производители определяют количественно именно гравиметрическими методами [49]. Тем не менее использование данного метода ограничено неточностью измерения таких параметров, как плотность и количество атомов на одну частицу. Последнее часто приводит к неточности и только грубой оценки концентрации НЧ, например, в случае новых полимерных наноматериалов и т.д. Данный метод постоянно улучшается, так, например, в работе [50] плотность НЧ – наносфер сополимеров поли(стирола/акриламида) определяли центрифугированием, что способствовало повышению точности гравиметрического метода. После определения концентрации НЧ, модифицированных стрептавидином и антителами, успешно удалось определить активные аффинные сайты на каждой биофункциональной НЧ.

Комбинированные подходы

Для обеспечения точного и достоверного определения концентрации НЧ рекомендуется сравнительная оценка с применением нескольких

методов, а именно использующих различные свойства НЧ, например, поглощение света, массу, светорассеяние и/или, например, совместное применение микроскопии высокого разрешения и оптико-спектральных методов. В частности, данный подход применялся для внеклеточных везикул, пегилированных липосом с использованием таких методов как NTA, TRPS, когда НЧ проходят через нанопоры с регулируемым размером [51], nFCM (нанопроточная цитофлуориметрия), CLS (дифференциальное центробежное осаждение) [52], AF4-MALS (фракционирование потока в режиме онлайн с многоугловым детектором светорассеяния) и многоугловое динамическое светорассеяние (MADLS). Наблюдалась достаточно хорошая сходимость полученных результатов для всех 6 методов, например, для полистирольных НЧ она составила около 90%, за исключением метода NTA, который завышал концентрацию НЧ. Для пегилированных липосом метод nFCM значительно снижал концентрацию НЧ в сравнении с другими методами. Для внеклеточных везикул наблюдалось сложное поведение, только для трех методов (NTA, TRPS и nFCM) значение концентрации НЧ находилось в пределах одного порядка [12].

Разрабатываются инновационные комбинации методов, такие как настраиваемое резистивное измерение импульсов [53], нанопроточная цитометрия и MADLS [54, 55], малоугловое рентгеновское рассеяние (SAXS) [56], центробежные методы осаждения и AF4-MALS [56] и т.д. Описан способ, сочетающий иммобилизацию НЧ на анизотропно-коллапсированный агарозный гель с последующим использованием оптической микроскопии и подсчета НЧ. Эталоном служил метод ТЕМ. В качестве объектов исследовали НЧ кремнезема с флуоресцентным красителем, квантовые точки CdSe/ZnS и субмикронные частицы кремнезема [57]. Встречается комбинация электрооспрея (ES) для создания парофазного дисперсного материала с использованием сканирующего измерителя подвижности частиц (SMPS). Подвижность анализировалась с помощью дифференциальной подвижности (DMA), газофазного электрофоретического молекулярного анализа (GEMMA) или масс-спектрометрии (MS) [11, 58]. Нанoeлектрооспрей газофазный анализ молекулярной подвижности (nES GEMMA) используется как альтернативный метод [59].

Метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) чувствителен к ультранизким концентрациям, однако его точность ограничена для частиц субмикронного размера [60], в связи с этим данный метод рекомендуется сочетать с динамическим потоком массы [61]. Сочетание газофазного электрофореза и спектроскопии открывает возможности для тщательного углубленного исследования материала “мягких” НЧ, например, липосом, с точки зрения размера и формы [62]. В

табл. 1 представлены методы определения концентрации НЧ, наиболее широко освещенные в литературе.

КОНЦЕНТРАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ПРИЛОЖЕНИЙ НАНОМЕДИЦИНЫ

Наночастицы и их концентрация в биологических средах

Исследование поведения НЧ в биологических средах, органах и их гомогенатах усложняется ввиду наличия в них макромолекул, изменения свойств НЧ, образования “белковой короны”, процессов агрегации и агломерации. Метод абсорбционной спектроскопии и спектроскопии резонансного рассеяния были применены для определения счетной концентрации НЧ золота [63]. Для НЧ из благородных металлов в качестве характеристики выбирается длина волны, соответствующая пику поверхностного плазмонного резонанса, что дает возможность отличить рассеяние НЧ от рассеяния другими нанообъектами в биологических пробах. ICP-MS [66] был использован для определения концентрации введенных внутривенно НЧ золота с различным размером 10, 50, 100 и 250 нм, дзета-потенциалом и дозой в крови и органах.

Метод NTA был использован для визуализации и отслеживания поведения НЧ в жидких биологических средах [36]. Оценка цитотоксичности показала, что НЧ серебра вызывали значительное снижение целостности мембран и клеточной метаболической активности в зависимости от их концентрации. Определение концентрации липосом в сыворотке крови проводилось для анализа их стабильности в кровотоке [67].

Данные о концентрации НЧ информативны для полиплексов и полидисперсных систем, склонных к агрегации [68]. Так, в работе [69] проведено сравнение НЧ, полученных с использованием новых технологий, таких как микрофлюидика, как в отсутствие, так и в присутствии ДНК, и определение количества плазмид-содержащих НЧ. С биологической точки зрения физико-химический параметр нанопрепаратов — количество НЧ имеет большее значение, чем площадь поверхности или масса, поскольку доза эффективно соответствует количеству рецепторов, которые связывают НЧ. Недавно описана доза нанопрепаратов, введенная инъекционно мыши и представленная с точки зрения количества НЧ, и оценено ее пороговое значение (рис. 2).

Установлено, что введение дозы НЧ (золотые и силикатные НЧ и липосомы), превышающей пороговое значение 1 триллион НЧ/на мышь, значительно улучшало терапевтическую эффективность независимо от дозы активного лекарства. Авторами как экспериментально, так и с учетом

Таблица 1. Физико-химические методы определения концентрации НЧ

Тип НЧ	Метод	Пределы измерения, точность измерения	Недостатки и ограничения	Ссылка
НЧ золота	UV Vis	До 100 нм, 5%	Сложная форма и размеры >100 нм	[15, 22]
НЧ серебра	UV Vis	От 8 до 100 нм	Наличие коэффициента экстинкции	[24]
НЧ золота	ICP-MS	От 5 до 100 нм, 10%	НЧ сложной формы	[63]
НЧ золота и серебра	DLS	От 4.5 нм до 50 нм	Наличие эталонного образца	[26]
НЧ золота	LTS	От 5 до 40 нм	Влияние геометрии НЧ на спектр экстинкции	[29]
НЧ оксида кремния	Турбидиметрия	От 80 до 250 нм	Наличие показателя преломления и устранение эффектов малоуглового рассеяния	[23]
Липосомы	LTS	От 30 до 300 нм	Наличие выборки для получения статистически значимых результатов	[31]
НЧ полистирола	LTS	От 50 3000 нм от 0.5 до 4%	—	[29]
НЧ золота, НЧ кремнезема, вирусные НЧ	NTA	От 80 до 250 нм	Рекомендуется работать в области концентраций от 10^7 до 10^9 НЧ/мл	[64]
НЧ полистирола НЧ альбумина	NTA	От 20 до 1000 нм	Наличие полидисперсности или агрегации	[42]
НЧ полистирола, липосомы Внешние везикулы	NTA	Около 100 нм	Проверка линейности диапазона концентраций	[65]
НЧ монокл. антител	NTA	Субмикронные НЧ	Контроль стабильности	[37, 38]

данных 40 публикаций [2], был проведен пересчет доз НЧ по их количеству и было установлено, что наиболее важным параметром является именно количество НЧ, которое играет определяющую роль при доставке в опухоли по сравнению с другими параметрами, такими как размер, дизайн таргетинга (нацеливания), тип НЧ или модель рака [2]. Далее в работе [70] с учетом дозы 1.5×10^{15} НЧ для человека была пересчитана доза НЧ в мг/кг для различных биоматериалов.

Клеточное поглощение и интернализация

Во всех методах лечения, существует пороговая или терапевтическая доза лекарства, которая должна быть усвоена отдельной клеткой, чтобы эта клетка считалась “вылеченной” [2]. Крайне важно знать, сколько НЧ попадает в (целевые) клетки, чтобы понять, сколько лекарства фактически доставлено. Доза лекарства, доставляемая в клетки, будет зависеть от интернализации, кинетики поглощения, распределения, времени накопления лекарства в органеллах. В то же время необходимо отметить, что поглощение НЧ клетками происходит неравномерно [71]. Эффективное проникновение и клеточная интернализация зависят от различных физико-химических свойств НЧ, включая поверхностный заряд, размер, состав и содержание липидов, а также наличие лигандов, нацеленных на поверхность и т.д. [72]. Тем не менее кинетика поглощения НЧ клетками человека и их последующее внутриклеточное распределение являются ключевыми параметрами [73]. По-прежнему отсутствуют стандартизированные протоколы для измерения клеточных взаимодействий и цитотоксичности сконструированных НЧ. Чтобы охарактеризовать внутриклеточный перенос НЧ с лекарствами, необходимы методы, позволяющие отслеживать их внутри клеток с течением времени и определять их внутриклеточное местоположение, а также время, необходимое для достижения определенного местоположения [74]. Часто внутри одних и тех же клеток некоторые НЧ достигают лизосом за короткое время, в то время как другим требуется гораздо больше времени [75, 76]. Дополнительным и часто игнорируемым параметром, оказывающим большое влияние на степень интернализации наночастиц фагоцитирующими клетками, является концентрация НЧ, т.е. их вводимое количество, а не концентрация действующего лекарственного вещества [11]. Однако в работе [77] было показано, что для лучшего клеточного поглощения необходимо увеличивать концентрацию инкапсулированного лекарства в каждой везикуле, а не количество везикул.

На двух типах НЧ — липосомах и квантовых точках — было проведено исследование о взаимосвязи цитотоксичности и концентрации НЧ [78].

Пороговое значение
1 трлн НЧ на мышь

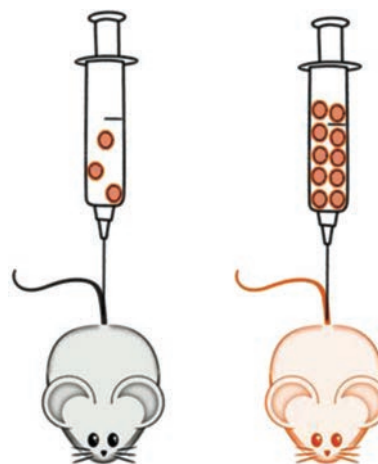


Рис. 2. Пороговое значение дозы нанопрепаратов, введенной инъекционно мыши и представленной с точки зрения количества НЧ [2].

С помощью комбинации теоретических и эмпирических методов (ТЕМ, сканирующий анализатор подвижности частиц), описанных в работе [11], удалось определить концентрацию НЧ, связанных с поверхностью, и концентрацию интернализированных НЧ. Воздействие на клетки различного количества НЧ может подразумевать разную активность поглощения, последствия эндо/фагоцитоза или другие явления [79]. В работах [18, 80] авторы подчеркивают, что только тщательная и полная физико-химическая характеристика НЧ, включая их концентрацию, позволяет объяснить разницу в биологических эффектах (образование белковой короны, взаимодействие, поглощение клетками) для различных типов НЧ, например, для наноматериалов с различной хиральностью.

В литературе нет общепринятой кинетической схемы, лишь обзорно описана кинетика поглощения НЧ и их внутриклеточное распределение [73]. Автор этой работы подчеркивает, что для описания кинетических аспектов необходимым условием является определение количества НЧ. В общую кинетику поглощения он вносит вклады трех процессов: адсорбция/десорбция и клеточная интернализация. В другой работе [81] процесс поглощения полистирольных НЧ был описан кинетической моделью, которая схематично представлена на рис. 3. Для простых молекул поглощение описывается кинетикой первого порядка с равновесными константами скорости (рис. 3а). В случае НЧ (рис. 3б) импорт в клетку определяется независимыми временными потоками (J_{01} — течение через мембрану, J_{12} — течение в сторону эндосом и J_{23} — течение между эндосомами и лизосо-

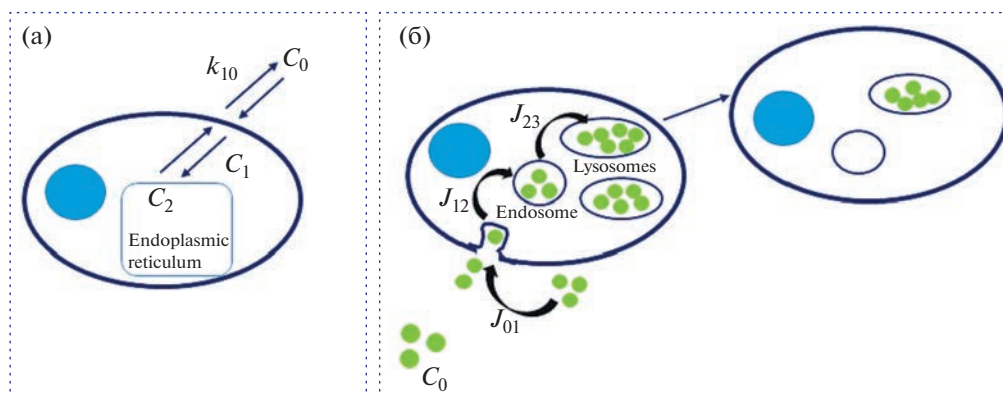


Рис. 3. Модели клеточного поглощения (а) молекулы — флуоресцентного красителя; и (б) НЧ, помеченных флуоресцентным красителем. Клетка состоит из двух контейнеров, представляющих собой общее внутриклеточное пространство (цитоплазму) и эндоплазматический ретикулум в случае красителя и эндосомальный и лизосомальный компартменты в случае НЧ. Адаптировано из [82].

мами), при этом процесс выхода для полистирольных НЧ отсутствует, т.е. они попадают в лизосомы и остаются там [82].

При накоплении НЧ в лизосомах следует обратить внимание на цитотоксичность самих НЧ и лизосомально-индуцированную нанотоксичность [70] для развития наноприложений [83]. В то же время, например, для липосомальных частиц возможен их экспорт из клеток и/или их деградация, а также высвобождение и выход загруженных молекул в окружающую среду [84], т.е. необходимо учитывать и другие вклады в кинетику, такие как деградация, эндосомальное ускользание, клеточное деление, а также транспорт во внеклеточной среде. Например, исходя из времени удвоения клеточной популяции, равного 22 ч (для клеточной линии АТСС), наблюдаемое затухание флуоресценции можно отнести к клеточному делению, т.е. деление клеток приводит к экспоненциальному спаду внутриклеточной концентрации НЧ. В результате непрерывного поступления НЧ устойчивое состояние наступает через некоторое время, так как деление клеток будет конкурировать с процессом поглощения НЧ [85].

Диагностика и биовизуализация

Количественные измерения с помощью техники флуоресценции в биологических средах достаточно сложны ввиду того, что флуорофоры чувствительны к изменению их окружения. Тем не менее абсолютное количество НЧ в органе может быть получено при помощи калибровочных зависимостей, то есть систематических измерений флуоресценции НЧ, растворенных в гомогенатах, полученных из органов при различных известных концентрациях НЧ. Надежность полученных данных увеличивается с использованием

комбинации методов микроскопии и проточной цитометрии [86]. Существуют подходы с определением интенсивности флуоресценции одной частицы и измерений флуоресценции клеток, инкубированных с частицами, далее с использованием данных проточной цитометрии и изображений конфокальной сканирующей лазерной микроскопии можно рассчитать среднее количество интернализованных частиц на клетку [87].

С целью диагностики и фототермической терапии были охарактеризованы модифицированные липопротеинами твердые липидные НЧ с загруженным металлом Cu(II), в том числе определена концентрация НЧ с использованием комбинации методов спектроскопии и микроскопии с сочетанием теории Mie и Drude [88]. В другой работе авторы отметили, что фототермическая эффективность может зависеть от численной концентрации НЧ (золотых наностержней) [89].

Наноустройства для детоксикации

Кинетика ферментативной реакции, протекающей в гомогенной среде с идеально перемешанными реагентами, подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен. Однако эти условия сильно отличаются в случае работы ферментативных нанореакторов (NR): 1) высокая концентрация фермента в среде НЧ, которая не соответствует условиям кинетики Михаэлиса–Ментен; 2) скопление большого количества молекул фермента (Е), так как они инкапсулированы внутри НЧ. Тем самым наблюдается аномальная диффузия веществ, которая изменяет кинетические законы действия масс. Таким образом, в нанореакторах локальная концентрация фермента [Е] выше, чем концентрация субстрата [S], особенно в закрытых наноразмерных системах, такие “замкнутые условия” близки к тем, которые встречаются в клетках. Основной пробле-

мой кинетики ферментативных нанореакторов является точное измерение и управление [E]. Высокая концентрация активных центров фермента в нанореакторах (особенно когда $[E] \geq [S]$) влияет на равновесие. В нанореакторах вместо этого следует учитывать равновесие между субстратом, связанным с ферментом, и продуктом (P) ($K_{NR} = [EP]/[ES]$) [90].

В условиях инъекционного нанореактора для детоксикации токсикант (Т), присутствующий в кровотоке, диффундирует через мембрану нанореактора, где далее в его герметичном отсеке происходит ферментативная реакция детоксикации. Для эффективной работы нанореактора [E] внутри наноносителя должна значительно превышать концентрацию токсиканта [Т], тогда реакция внутри нанореактора будет протекать в условиях $[E] \gg [T]$, или $[E] \approx [T]$. В работе [3] был оценен размер нанореакторов тремя независимыми методами: ТЕМ, DLS и NTA. Все три метода свидетельствовали о монодисперсности образца, что позволило методом NTA определить численную концентрацию нанореакторов и далее, с учетом сферической формы НЧ [4] и эффективности капсулирования, рассчитать объем нанореактора, концентрацию фермента внутри нанореактора и порядок протекающей реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные выше методы определения концентрации НЧ и примеры ее использования для биомедицины свидетельствуют о важности данной характеристики для дальнейшего применения НЧ в доклинических исследованиях и успешного применения в клинике. Только полная характеристика НЧ, включая их концентрацию, может обеспечить дополнительную оценку получаемых биологических эффектов наносистем. Наиболее перспективным и надежным подходом для определения концентрации НЧ является сочетание нескольких методов с учетом прямой визуализации, спектроскопии и гравиметрии. Одним из наиболее удобных и несложных в использовании методов можно рекомендовать анализ траектории движения НЧ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа Т.Н. Пашировой, З.М. Шайхутдиновой и В.Ф. Миронова выполнена за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН. Работа П. Массона (Наноструктуры для детоксикации) выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Clement S., Gardner B., Razali W.A.W. et al.* Quantification of nanoparticle concentration in colloidal suspensions by a non-destructive optical method // *Nanotechnology*. 2017. V. 28. № 47. P. 475702. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa8d89>
2. *Ouyang B., Poon W., Zhang Y.-N. et al.* The dose threshold for nanoparticle tumour delivery // *Nat. Mater.* 2020. V. 19. № 12. P. 1362–1371. <https://doi.org/s41563-020-0755-z>
3. *Pashirova T., Shaihtudinova Z., Mansurova M. et al.* Enzyme nanoreactor for *in vivo* detoxification of organophosphates // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2022. V. 14. № 17. P. 19241–19252. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c03210>
4. *Shajhtudinova Z., Pashirova T., Masson P.* Kinetic processes in enzymatic nanoreactors for *in vivo* detoxification // *Biomedicine*. 2022. V. 10. № 4. P. 784. <https://doi.org/10.3390/biomedicine10040784>
5. *Pashirova T.N., Shaihtudinova Z.M., Mironov V.F., Masson P.* Biomedical nanosystems for *in vivo* detoxification: From passive delivery systems to functional nanodevices and nanorobots // *Acta Naturae*. 2023. V. 15. № 1. P. 4–12. <https://doi.org/2.10.32607/actanaturae.15681>
6. *Qian X., Nymann Westensee I., Brodzki E., Städler B.* Cell mimicry as a bottom-up strategy for hierarchical engineering of nature-inspired entities // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2020. V. 13. № 3. P. e1683. <https://doi.org/10.1002/wnan.1683>
7. *Driscoll D.F., Nicoli D.F.* Analytical methods for determining the size (distribution) in parenteral dispersions // *Non-Biological Complex Drugs. The Science and the Regulatory Landscape*. 2015. V. 20. P. 193–259. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16241-6_7
8. *Soema P.C., Willems G.-J., Jiskoot W., Amorij J.-P., Kersten G.F.* Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015. V. 94. P. 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.026>
9. *Mozafari M.R., Mazaheri E., Dormiani K.* Simple equations pertaining to the particle number and surface area of metallic, polymeric, lipidic and vesicular nanocarriers // *Sci. Pharm.* 2021. V. 89. № 2. P. 15. <https://doi.org/10.3390/scipharm89020015>
10. *Pidgeon C., Hunt C.A.* Calculating number and surface area of liposomes in any suspension // *J. Pharm. Sci.* 1981. V. 70. № 2. P. 173–176. <https://doi.org/10.1002/jps.2600700215>
11. *Epstein H., Afergan E., Moise T. et al.* Number-concentration of nanoparticles in liposomal and polymeric multiparticulate preparations: Empirical and calculation methods // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 4. P. 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.006>

12. Vogel R., Savage J., Muzard J. et al. Measuring particle concentration of multimodal synthetic reference materials and extracellular vesicles with orthogonal techniques: Who is up to the challenge? // *J. Extracell. Vesicles*. 2021. V. 10. № 3. P. e12052. <https://doi.org/10.1002/jev2.12052>
13. Mourdikoudis S., Pallares R.M., Thanh N.T.K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties // *Nanoscale*. 2018. V. 10. № 27. P. 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>
14. Minelli C., Bartczak D., Peters R. et al. Sticky measurement problem: Number concentration of agglomerated nanoparticles // *Langmuir*. 2019. V. 35. № 14. P. 4927–4935. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04209>
15. Shard A.G., Wright L., Minelli C. Robust and accurate measurements of gold nanoparticle concentrations using UV-visible spectrophotometry // *Biointerphases*. 2018. V. 13. № 6. P. 061002. <https://doi.org/10.1116/1.5054780>
16. Chithrani B.D., Ghazani A.A., Chan W.C.W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells // *Nano Lett.* 2006. V. 6. № 4. P. 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
17. Cho E.C., Xie J., Wurm P.A., Xia Y. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I₂/KI etchant // *Nano Lett.* 2009. V. 9. № 3. P. 1080–1084. <https://doi.org/10.1021/nl803487r>
18. Yan H., Cacioppo M., Megahed S. et al. Influence of the chirality of carbon nanodots on their interaction with proteins and cells // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 7208. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27406-1>
19. Shang J., Gao X. Nanoparticle counting: Towards accurate determination of the molar concentration // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. № 21. P. 7267–7278. <https://doi.org/10.1039/C4CS00128A>
20. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Khlebtsov N.G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra // *Langmuir*. 2008. V. 24. № 16. P. 8964–8970. <https://doi.org/10.1021/la8010053>
21. Baalousha M., Prasad A., Lead J.R. Quantitative measurement of the nanoparticle size and number concentration from liquid suspensions by atomic force microscopy // *Environ. Sci. Process. Impacts*. 2014. V. 16. № 6. P. 1338–1347. <https://doi.org/10.1039/C3EM00712J>
22. Haiss W., Thanh N.T.K., Aveyard J., Fernig D.G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. № 11. P. 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
23. Khlebtsov N.G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. № 17. P. 6620–6625. <https://doi.org/10.1021/ac800834n>
24. Paramelle D., Sadovoy A., Gorelik S. et al. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra // *Analyst*. 2014. V. 139. № 19. P. 4855. <https://doi.org/10.1039/C4AN00978A>
25. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Хлебцов Н.Г. Определение размера, концентрации и показателя преломления наночастиц оксида кремния методом спектротурбидиметрии // *Оптика и спектроскопия*. 2008. Т. 105. № 5. С. 801–808.
26. Высоцкий В.В., Урюпина О.Я., Гусельникова А.В., Ролдугин В.И. О возможности определения концентрации наночастиц методом динамического светорассеяния // *Коллоид. журн.* 2009. Т. 71. № 6. С. 728–733.
27. Левин А.Д., Садагов А.Ю. Способ оптического измерения счетной концентрации дисперсных частиц в жидких средах и устройство для его осуществления // Патент № 2610942 С Российская Федерация, МПК G01N 21/00. № 2015151702, заявл. 02.12.2015, опубл. 17.02.2017.
28. Борен К., Хафмен Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами. М.: Мир, 1986.
29. Li F., Schafer R., Hwang C.-T., Tanner C.E., Ruggiero S.T. High-precision sizing of nanoparticles by laser transmission spectroscopy // *Appl. Opt.* 2010. V. 49. № 34. P. 6602. <https://doi.org/10.1364/AO.49.006602>
30. Li F., Mahon A.R., Barnes M.A. et al. Quantitative and rapid DNA detection by laser transmission spectroscopy // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12. P. e29224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029224>
31. Sennato S., Sarra A., La Capria C.P. et al. Quantification of particle number concentration in liposomal suspensions by Laser Transmission Spectroscopy (LTS) // *Colloid. Surf. B*. 2023. V. 222. P. 113137. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113137>
32. Sun N., Johnson J., Stack M.S. et al. Nanoparticle analysis of cancer cells by light transmission spectroscopy // *Anal. Biochem.* 2015. V. 484. P. 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.05.004>
33. Sarra A., Stanchieri G.D.P., De Marcellis A. et al. Laser Transmission Spectroscopy based on tunable-gain dual-channel dual-phase LIA for biological nanoparticles characterization // *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* 2021. V. 15. № 1. P. 177–187. <https://doi.org/10.1109/TBCAS.2021.3060569>
34. Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates // *Pharm. Res.* 2010. V. 27. № 5. P. 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>
35. Griffiths D., Carnell-Morris P., Wright M. Nanoparticle tracking analysis for multiparameter characterization and counting of nanoparticle suspensions // *Methods Mol. Biol.* 2020. P. 289–303. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0319-2_22
36. Gallego-Urrea J.A., Tuoriniemi J., Hassellöv M. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2011. V. 30. № 3.

- P. 473–483.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.005>
37. Tian X., Nejadnik M.R., Baunsgaard D. et al. Comprehensive evaluation of nanoparticle tracking analysis (NanoSight) for characterization of proteinaceous sub-micron particles // J. Pharm. Sci. 2016. V. 105. № 11. P. 3366–3375.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.08.009>
38. Sediq A.S., van Duijvenvoorde R.B., Jiskoot W., Nejadnik M.R. No Touching! Abrasion of adsorbed protein is the root cause of subvisible particle formation during stirring // J. Pharm. Sci. 2016. V. 105. № 2. P. 519–529.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.10.003>
39. Bickel F., Herold E.M., Signes A. et al. Reversible NaCl-induced aggregation of a monoclonal antibody at low pH: Characterization of aggregates and factors affecting aggregation // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2016. V. 107. P. 310–320.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.07.020>
40. Chen C., Zhu S., Huang T., Wang S., Yan X. Analytical techniques for single-liposome characterization // Anal. Methods. 2013. V. 5. № 9. P. 2150.
<https://doi.org/10.1039/c3ay40219c>
41. Barcelos J.M., Hayasaki T.G., de Santana R.C. et al. Photothermal properties of IR-780-based nanoparticles depend on nanocarrier design: A comparative study on synthetic liposomes and cell membrane and hybrid biomimetic vesicles // Pharmaceutics. 2023. V. 15. № 2. P. 444.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020444>
42. Gross J., Sayle S., Karow A.R., Bakowsky U., Garidel P. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2016. V. 104. P. 30–41.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.04.013>
43. Anderson W., Kozak D., Coleman V.A., Jämting Å.K., Trau M. A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions // J. Colloid Interface Sci. 2013. V. 405. P. 322–330.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.02.030>
44. Malloy A., Carr B. NanoParticle tracking analysis – The Halo™ System // Part. Part. Syst. Charact. 2006. V. 23. № 2. P. 197–204.
<https://doi.org/10.1002/ppsc.200601031>
45. Takechi-Haraya Y., Usui A., Izutsu K., Abe Y. Atomic force microscopic imaging of mRNA-lipid nanoparticles in aqueous medium // J. Pharm. Sci. 2023. V. 112. № 3. P. 648–652.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.11.026>
46. Usfoor Z., Kaufmann K., Rakib A.S.H., Hergenröder R., Shpacovitch V. Features of sizing and enumeration of silica and polystyrene nanoparticles by nanoparticle tracking analysis (NTA) // Sensors. 2020. V. 20. № 22. P. 6611.
<https://doi.org/10.3390/s20226611>
47. Bachurski D., Schuldner M., Nguyen P.-H. et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis – An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView // J. Extracell. Vesicles. 2019. V. 8. № 1. P. 1596016.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596016>
48. Hoover B.M., Murphy R.M. Evaluation of nanoparticle tracking analysis for the detection of rod-shaped particles and protein aggregates // J. Pharm. Sci. 2020. V. 109. № 1. P. 452–463.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.006>
49. Reipa V., Purdum G., Choi J. Measurement of nanoparticle concentration using quartz crystal microgravimetry // J. Phys. Chem. B. 2010. V. 114. № 49. P. 16112–16117.
<https://doi.org/10.1021/jp103861m>
50. Wen C.-Y., Tang M., Hu J. et al. Determination of the absolute number concentration of nanoparticles and the active affinity sites on their surfaces // Anal. Chem. 2016. V. 88. № 20. P. 10134–10142.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02613>
51. Maas S.L.N., De Vrij J., Broekman M.L.D. Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing // J. Vis. Exp. 2014. № 92. P. e51623.
<https://doi.org/10.3791/51623>
52. Shard A.G., Sparnacci K., Sikora A. et al. Measuring the relative concentration of particle populations using differential centrifugal sedimentation // Anal. Methods. 2018. V. 10. № 22. P. 2647–2657.
<https://doi.org/10.1039/C8AY00491A>
53. Vaclavek T., Prikryl J., Foret F. Resistive pulse sensing as particle counting and sizing method in microfluidic systems: Designs and applications review // J. Sep. Sci. 2019. V. 42. № 1. P. 445–457.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201800978>
54. Austin J., Minelli C., Hamilton D., Wywijas M., Jones H.J. Nanoparticle number concentration measurements by multi-angle dynamic light scattering // J. Nanoparticle Res. 2020. V. 22. № 5. P. 108.
<https://doi.org/10.1007/s11051-020-04840-8>
55. Marques S.S., Ramos I.I., Silva C. et al. Lab-on-Valve automated and miniaturized assessment of nanoparticle concentration based on light-scattering // Anal. Chem. 2023. V. 95. № 10. P. 4619–4626.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04631>
56. Pauw B.R., Kästner C., Thünemann A.F. Nanoparticle size distribution quantification: Results of a small-angle X-ray scattering inter-laboratory comparison // J. Appl. Crystallogr. 2017. V. 50. № 5. P. 1280–1288.
<https://doi.org/10.1107/S160057671701010X>
57. Hlaváček A., Křivánková J., Brožková H. et al. Absolute counting method with multiplexing capability for estimating the number concentration of nanoparticles using anisotropically collapsed gels // Anal. Chem. 2022. V. 94. № 41. P. 14340–14348.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02989>
58. Li M., Guha S., Zangmeister R., Tarlov M.J., Zachariah M.R. Method for determining the absolute number concentration of nanoparticles from electrospray sources // Langmuir. 2011. V. 27. № 24. P. 14732–14739.
<https://doi.org/10.1021/la202177s>
59. Urey C., Weiss V.U., Gondikas A. et al. Combining gas-phase electrophoretic mobility molecular analysis (GEMMA), light scattering, field flow fractionation and cryo electron microscopy in a multidimensional

- approach to characterize liposomal carrier vesicles // *Int. J. Pharm.* 2016. V. 513. № 1–2. P. 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.049>
60. *Tuoriniemi J., Moreira B., Safina G.* Determining number concentrations and diameters of polystyrene particles by measuring the effective refractive index of colloids using surface plasmon resonance // *Langmuir*. 2016. V. 32. № 41. P. 10632–10640. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b02684>
 61. *Cuello-Nuñez S., Abad-Álvarez I., Bartczak D. et al.* The accurate determination of number concentration of inorganic nanoparticles using spICP-MS with the dynamic mass flow approach // *J. Anal. At. Spectrom.* 2020. V. 35. № 9. P. 1832–1839. <https://doi.org/10.1039/c9ja00415g>
 62. *Weiss V.U., Wieland K., Schwaighofer A., Lendl B., Allmaier G.* Native nano-electrospray differential mobility analyzer (nES GEMMA) enables size selection of liposomal nanocarriers combined with subsequent direct spectroscopic analysis // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 6. P. 3860–3868. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04252>
 63. *Левин А.Д., Нагаев А.И., Рукин Е.М. и др.* Проблемы методического обеспечения биомедицинских нанотехнологий // *Измерительная техника*. 2010. № 8. С. 29–34.
 64. *Du S., Kendall K., Morris S., Sweet C.* Measuring number-concentrations of nanoparticles and viruses in liquids on-line // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2010. V. 85. № 9. P. 1223–1228. <https://doi.org/10.1002/jctb.2421>
 65. *Yahata S., Hirose M., Ueno T., Nagumo H., Sakai-Kato K.* Effect of sample concentration on nanoparticle tracking analysis of small extracellular vesicles and liposomes mimicking the physicochemical properties of exosomes // *Chem. Pharm. Bull.* 2021. V. 69. № 11. P. 1045–1053. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00452>
 66. *De Jong W.H., Hagens W.I., Krystek P. et al.* Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration // *Biomaterials*. 2008. V. 29. № 12. P. 1912–1919. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.037>
 67. *Reshetov V., Zorin V., Siupa A. et al.* Interaction of liposomal formulations of *meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (Temoporfin) with serum proteins: Protein binding and liposome destruction // *Photochem. Photobiol.* 2012. V. 88. № 5. P. 1256–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01176.x>
 68. *Wilson D.R., Green J.J.* Nanoparticle tracking analysis for determination of hydrodynamic diameter, concentration, and zeta-potential of polyplex nanoparticles // *Methods Mol. Biol.* 2017. P. 31–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6840-4_3
 69. *Wilson D.R., Mosenia A., Suprenant M.P. et al.* Continuous microfluidic assembly of biodegradable poly(beta-amino ester)/DNA nanoparticles for enhanced gene delivery // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2017. V. 105. № 6. P. 1813–1825. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36033>
 70. *Uzhychak M., Smolková B., Lunova M. et al.* Lysosomal nanotoxicity: Impact of nanomedicines on lysosomal function // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2023. V. 197. P. 114828. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114828>
 71. *Kato H.* Tracking nanoparticles inside cells // *Nat. Nanotechnol.* 2011. V. 6. № 3. P. 139–140. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.25>
 72. *Rennick J.J., Johnston A.P.R., Parton R.G.* Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics // *Nat. Nanotechnol.* 2021. V. 16. № 3. P. 266–276. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8>
 73. *Åberg C.* Kinetics of nanoparticle uptake into and distribution in human cells // *Nanoscale Adv.* 2021. V. 3. № 8. P. 2196–2212. <https://doi.org/10.1039/D0NA00716A>
 74. *Salvati A., Poelstra K.* Drug targeting and nanomedicine: Lessons learned from liver targeting and opportunities for drug innovation // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. № 1. P. 217. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010217>
 75. *Vtyurina N., Åberg C., Salvati A.* Imaging of nanoparticle uptake and kinetics of intracellular trafficking in individual cells // *Nanoscale*. 2021. V. 13. № 23. P. 10436–10446. <https://doi.org/10.1039/D1NR00901J>
 76. *Åberg C., Piattelli V., Montizaan D., Salvati A.* Sources of variability in nanoparticle uptake by cells // *Nanoscale*. 2021. V. 13. № 41. P. 17530–17546. <https://doi.org/10.1039/D1NR04690J>
 77. *Aizik G., Waiskopf N., Agbaria M. et al.* Delivery of liposomal quantum dots via monocytes for imaging of inflamed tissue // *ACS Nano*. 2017. V. 11. № 3. P. 3038–3051. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.7b00016>
 78. *Labouta H.I., Sarsons C., Kennard J. et al.* Understanding and improving assays for cytotoxicity of nanoparticles: What really matters? // *RSC Adv.* 2018. V. 8. № 41. P. 23027–23039. <https://doi.org/10.1039/C8RA03849J>
 79. *Fan Y., Marioli M., Zhang K.* Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021. V. 192. P. 113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>
 80. *Ma B., Bianco A.* Regulation of biological processes by intrinsically chiral engineered materials // *Nat. Rev. Mater.* 2023. V. 8. № 6. P. 403–413. <https://doi.org/10.1038/s41578-023-00561-1>
 81. *Salvati A., Åberg C., dos Santos T. et al.* Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: Toward models of uptake kinetics // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2011. V. 7. № 6. P. 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.03.005>
 82. *Shi H., He X., Yuan Y., Wang K., Liu D.* Nanoparticle-based biocompatible and long-life marker for lysosome labeling and tracking // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 6. P. 2213–2220. <https://doi.org/10.1021/ac902417s>
 83. *Chen Y.-C., Chen K.-F., Lin K.-Y.A. et al.* Evaluation of the pulmonary toxicity of PSNPs using a Transwell-based normal human bronchial epithelial cell culture system // *Sci. Total Environ.* 2023. V. 895. P. 165213. <https://doi.org/S0048969723038366>

84. Yang K., Tran K., Salvati A. Tuning liposome stability in biological environments and intracellular drug release kinetics // *Biomolecules*. 2022. V. 13. № 1. P. 59. <https://doi.org/10.3390/biom13010059>
85. Faria M., Noi K.F., Dai Q. et al. Revisiting cell–particle association *in vitro*: A quantitative method to compare particle performance // *J. Control. Release*. 2019. V. 307. P. 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.027>
86. Simonsen J.B., Kromann E.B. Pitfalls and opportunities in quantitative fluorescence-based nanomedicine studies — A commentary // *J. Control. Release*. 2021. V. 335. P. 660–667. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.041>
87. Gottstein C., Wu G., Wong B.J., Zasadzinski J.A. Precise quantification of nanoparticle internalization // *ACS Nano*. 2013. V. 7. № 6. P. 4933–4945. <https://doi.org/10.1021/nn400243d>
88. Vischio F., Fanizza E., De Bellis V. et al. Near-infrared absorbing solid lipid nanoparticles encapsulating plasmonic copper sulfide nanocrystals // *J. Phys. Chem. C*. 2019. V. 123. № 37. P. 23205–23213. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b05897>
89. Салаватов Н.А., Большакова А.В., Морозов В.Н. и др. Золотые наностержни с функционализированной органокремнеземной оболочкой: синтез и перспективы применения в тераностике опухолей // *Коллоидный журнал*. 2022. Т. 84. № 1. С. 97–104. <https://doi.org/10.31857/S0023291222010104>
90. Chauhan K., Zárate-Romero A., Sengar P., Medrano C., Vazquez-Duhalt R. Catalytic kinetics considerations and molecular tools for the design of multienzymatic cascade nanoreactors // *ChemCatChem*. 2021. V. 13. № 17. P. 3732–3748. <https://doi.org/10.1002/cctc.202100604>

УДК 544.77:541.18

ФЕРМЕНТОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРОВ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ L-ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТОЙ

© 2023 г. А. Д. Филиппова¹, А. Е. Баранчиков^{1, *}, В. К. Иванов¹

¹Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН,
Ленинский просп. 31, Москва, 119991 Россия

*e-mail: a.baranchikov@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.06.2023 г.

После доработки 26.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

Впервые получены устойчивые водные коллоидные растворы диоксида церия, стабилизированные L-яблочной кислотой, в мольных соотношениях лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.2, 0.5, 1$ и 2 . С помощью метода динамического рассеяния света показано, что золи CeO_2 характеризуются узким мономодальным распределением агрегатов по размерам и сохраняют агрегативную устойчивость в буферном растворе Tris-HCl. Хемилюминесцентный анализ ферментоподобной активности зольей диоксида церия по отношению к пероксиду водорода показал, что модификация поверхности частиц диоксида церия яблочной кислотой приводит к увеличению их ферментоподобной активности до 4.5 раз.

Ключевые слова: нанозимы, пероксидазоподобная активность, золи, агрегаты

DOI: 10.31857/S0023291223600529, **EDN:** DIMEAR

ВВЕДЕНИЕ

Нанокристаллический диоксид церия и материалы на его основе находят многочисленные применения в биомедицинских приложениях в качестве контрастирующих агентов для магнитно-резонансной томографии [1, 2], компонентов противоопухолевых препаратов [3, 4], антибактериальных и регенерирующих композиций [5–11] и др. Использование диоксида церия в тераностике социально-значимых заболеваний обусловлено его высокой биосовместимостью [12–14], селективной цитотоксичностью к трансформированным клеткам [15, 16] и ферментоподобной активностью – способностью CeO_2 имитировать функции ряда природных ферментов, включая каталазу, пероксидазу, супероксиддисмутазу, липопероксидазу, фосфолипипероксидазу и др. [17–21].

Одно из ключевых требований, предъявляемых к биомедицинским препаратам, состоит в необходимости точной дозировки активного вещества [22]. Для дозировки нерастворимых соединений, в том числе диоксида церия, наиболее удобно использовать устойчивые коллоидные растворы [23, 24]. Для стабилизации водных зольей нанокристаллического диоксида церия используют разнообразные органические лиганды [25–27], при этом выбор стабилизатора позволяет дополнитель-

но регулировать ферментоподобную и биологическую активность CeO_2 [28, 29]. Лазич и соавт. показали, что золи диоксида церия, стабилизированные лигандами катехолового ряда (кофейной кислотой, пирокатехином и дофамином), способствуют пролиферации преостеобластов, что, в сочетании с высокой антиоксидантной активностью CeO_2 , перспективно для лечения воспалительных заболеваний костных тканей [30]. Ву и соавт. продемонстрировали, что модификация поверхности частиц диоксида церия янтарной кислотой повышает антиоксидантную активность и улучшает фармакокинетические характеристики CeO_2 при лечении хронической болезни почек [31]. Физикелла и соавт. установили, что стабилизация коллоидного раствора диоксида церия цитратом аммония приводит к снижению генотоксического действия CeO_2 [32].

Выбор биосовместимых стабилизаторов коллоидных растворов для биомедицинских применений зачастую обусловлен тем, что некоторые лиганды выступают в качестве метаболитов в живых системах или проявляют собственную биологическую активность. Одним из таких лигандов является яблочная кислота, которая участвует в цикле трикарбоновых кислот и обладает значимой антиоксидантной активностью [33–35]. Отметим, что производные яблочной кислоты, например, по-

лиабличная кислота, перспективны для создания биомедицинских материалов, обеспечивающих доставку лекарственных препаратов, а также обладающих регенеративными свойствами [36–39]. К настоящему времени в литературе представлены только единичные данные о способах получения и свойствах коллоидных растворов наночастиц, стабилизированных яблочной кислотой. Так, в работе, посвященной анализу характеристик малат-, цитрат- и сукцинат-стабилизированных золей CdSe/CdS, показано, что модификация квантовых точек яблочной кислотой обеспечивает эффективную интернализацию частиц CdSe/CdS бактериями *Escherichia coli*, что может быть использовано для визуализации живых клеток прокариот [40].

В настоящей работе впервые получены золи нанокристаллического диоксида церия, стабилизированные L-яблочной кислотой в диапазоне мольных соотношений лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.2\text{--}2$. Исследование ферментоподобной активности золей было проведено с применением хемилюминесцентного метода, основанного на окислении люминола пероксидом водорода. Анализ особенностей взаимодействия диоксида церия с яблочной кислотой позволил оценить перспективу использования малат-стабилизированных золей CeO_2 для биомедицинских применений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходных веществ использовали гексанитратоцерат(IV) аммония (х.ч., Ланхит), L-яблочную кислоту безводную (х.ч., Sigma-Aldrich), деионизированную воду. Навеску гексанитратоцерата(IV) аммония (2.33 г) растворяли в 23 мл воды; полученный раствор переносили в стеклянный автоклав Synthware™ объемом 100 мл (степень заполнения 25%) и выдерживали при 95°C в течение суток. Полученный желтый осадок отделяли от маточного раствора центрифугированием (20000 об./мин, 5 мин), промывали три раза изопропиловым спиртом, редиспергировали в 25 мл деионизированной воды и кипятили в течение 2 ч для удаления остатков изопропанола. Концентрация полученного золя диоксида церия, определенная методом термогравиметрии, составила 23.4 г/л (0.136 М).

Полученный золь (pH 2.3) стабилизировали L-яблочной кислотой в диапазоне мольных соотношений лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.2\text{--}2$. При этом образовывались сильно опалесцирующие коллоидные растворы; при добавлении к ним 3 М водного раствора аммиака (х.ч., Химмед) до pH 7.3–7.5 золи становились прозрачными. Концентрация полученных золей по диоксиду церия составила ~17.2 г/л (0.1 М).

Для проведения рентгенофазового анализа дисперсной фазы полученные золи высушивали на воздухе при 40°C в течение 4 сут. Рентгенофа-

зовый анализ полученных порошков проводили с использованием порошкового рентгеновского дифрактометра Bruker (США) D8 Advance (CuK_α -излучение) в диапазоне углов $2\theta = 20^\circ\text{--}90^\circ$ с шагом 0.02° и выдержкой 0.2 с/шаг. Дифрактограммы индиферировали с использованием базы данных ICDD PDF2 (2012). Для полнопрофильного анализа дифрактограмм использовали программное обеспечение TOPAS 4.2. Профили пиков аппроксимировали псевдо-функциями Фойгта (параметр формы $K = 0.89$).

Исследования образцов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) проводили с помощью электронного микроскопа JEOL (Япония) JEM-2100 UHR при ускоряющем напряжении 200 кВ. Перед проведением исследований золи CeO_2 наносили на медную сетку с формвар/углеродным покрытием (Ted Pella, Inc.). Микрофотографии получали с помощью 11-мегапиксельной камеры Olympus Quemesa в диапазоне увеличений $\times 20000\text{--}1\,500\,000$.

Спектры поглощения полученных золей регистрировали в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм с шагом 0.1 нм с использованием спектрофотометра ОКБ “Спектр” (Россия) СФ-2000.

Анализ образцов методом инфракрасной (ИК) спектроскопии проводили с использованием спектрометра Perkin Elmer (США) Spectrum 65 методом нарушенного полного внутреннего отражения в интервале $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ при спектральном разрешении 1 см^{-1} .

Исследование золей методом динамического рассеяния света (ДРС) и измерения электрокинетического потенциала (ζ -потенциала) проводили при 20°C с использованием анализатора Photocor (Россия) Compact-Z. Корреляционную функцию для каждой из выборок получали усреднением 10 кривых, каждую из которых накапливали в течение 20 с. Гидродинамический диаметр агрегатов определяли с использованием метода регуляризации (ПО DynalS).

Ферментоподобную активность (пероксидазную/каталазную) золей диоксида церия исследовали в реакции окисления люминола в присутствии пероксида водорода. В качестве среды использовали буферный раствор Tris-HCl (Sigma № 1001859094, $c = 100\text{ мМ}$, pH 7.4). Для приготовления 1 мМ раствора люминола (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, Sigma 123072) навеску люминола (0.0885 г) растворяли в буферном растворе Tris-HCl (500 мл). Раствор пероксида водорода ($c = 1\text{ М}$) готовили разбавлением 30 мас. % раствора H_2O_2 (ос.ч., Химмед) деионизированной водой. Регистрацию хемилюминесценции (ХЛ) осуществляли в пластиковых кюветах объемом 2 мл с помощью 12-канального хемилюминесцентного ДИСофт (Россия) Lum-1200. Для сопряжения хемилюминесцентного и компьютера использо-

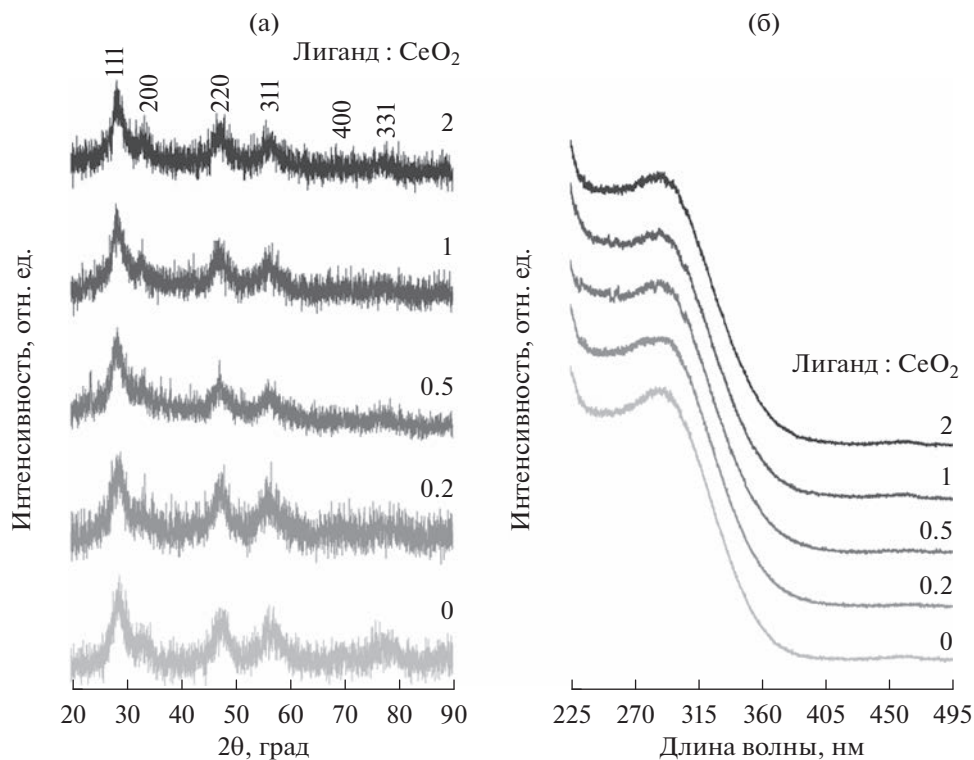


Рис. 1. Дифрактограммы порошков диоксида церия, полученных высушиванием золей CeO_2 , стабилизированных L-яблочной кислотой (а), и спектры поглощения золей диоксида церия в УФ-видимой области спектра (б). Мольные соотношения лиганд : CeO_2 указаны на рисунке.

вали ПО PowerGraph (версия 3.3). Регистрацию аналитического сигнала проводили при термостатировании (36°C) непосредственно в кюветном отделении хемилюминометра. В пластиковую кювету, содержащую буферный раствор Tris-HCl (100 мМ), вносили аликвоты люминола ($c = 50$ мкМ) и H_2O_2 ($c = 10$ мМ). Регистрировали фоновое свечение в течение 60 с, далее вносили аликвоту золя диоксида церия ($c = 0.5\text{--}2.2$ мМ). Общий объем реакционной смеси составлял 1 мл. Значения интегральной интенсивности хемилюминесценции определяли как площадь под кинетической кривой за 20 мин.

Математическое моделирование кинетики хемилюминесценции продукта окисления люминола в присутствии пероксида водорода и диоксида церия проводили с помощью ПО Kinetic Analyser (версия 3.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты рентгенофазового анализа золей диоксида церия, стабилизированных L-яблочной кислотой и высушенных при 40°C , приведены на рис. 1а. Как следует из дифрактограмм, дисперсная фаза полученных золей представляет собой однофазный диоксид церия (PDF2 34-394, пр. гр.

$Fm\bar{3}m$). Размеры областей когерентного рассеяния порошков CeO_2 , оцененные при проведении полнопрофильного анализа дифрактограмм, находятся в диапазоне 3.0–4.5 нм. Отметим, что стабилизация золей CeO_2 L-яблочной кислотой не оказала влияния на фазовый состав дисперсной фазы.

Спектры поглощения малат-стабилизированных золей диоксида церия в УФ-видимой области спектра представлены на рис. 1б. Для всех полученных коллоидных растворов CeO_2 характерна полоса поглощения в диапазоне длин волн 280–300 нм, соответствующая полосе поглощения нанодисперсного диоксида церия с шириной запрещенной зоны ~ 3.4 эВ, что согласуется с литературными данными [41].

По данным ПЭМ (рис. 2а), средний размер индивидуальных частиц диоксида церия в золе CeO_2 , не стабилизированном L-яблочной кислотой, составляет 3.2 нм (стандартное отклонение 0.4 нм). Результаты ПЭМ высокого разрешения (рис. 2б) позволили визуализировать в индивидуальных кристаллитах CeO_2 системы кристаллографических плоскостей с характеристическим межплоскостным расстоянием ~ 2.7 Å, которые могут быть отнесены к плоскостям (200) кристаллической решетки CeO_2 , что согласуется с данными рентгенофазового анализа (рис. 1а).

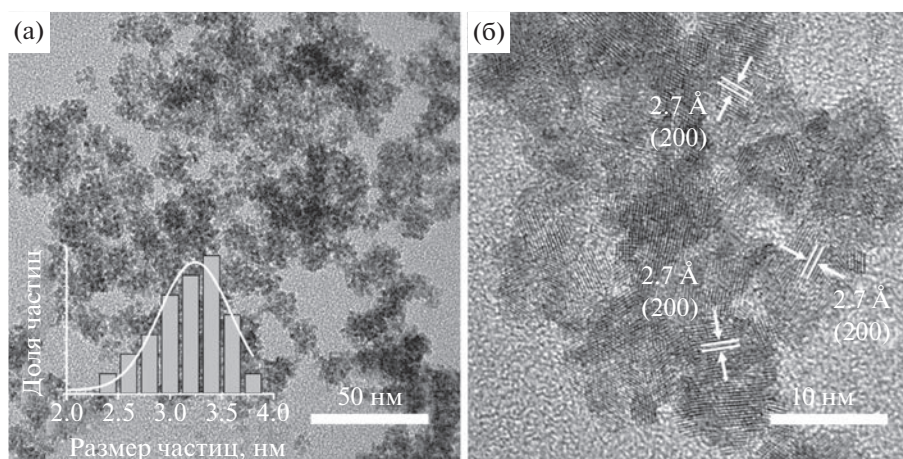


Рис. 2. Микрофотографии ПЭМ золя диоксида церия, не стабилизированного L-яблочной кислотой.

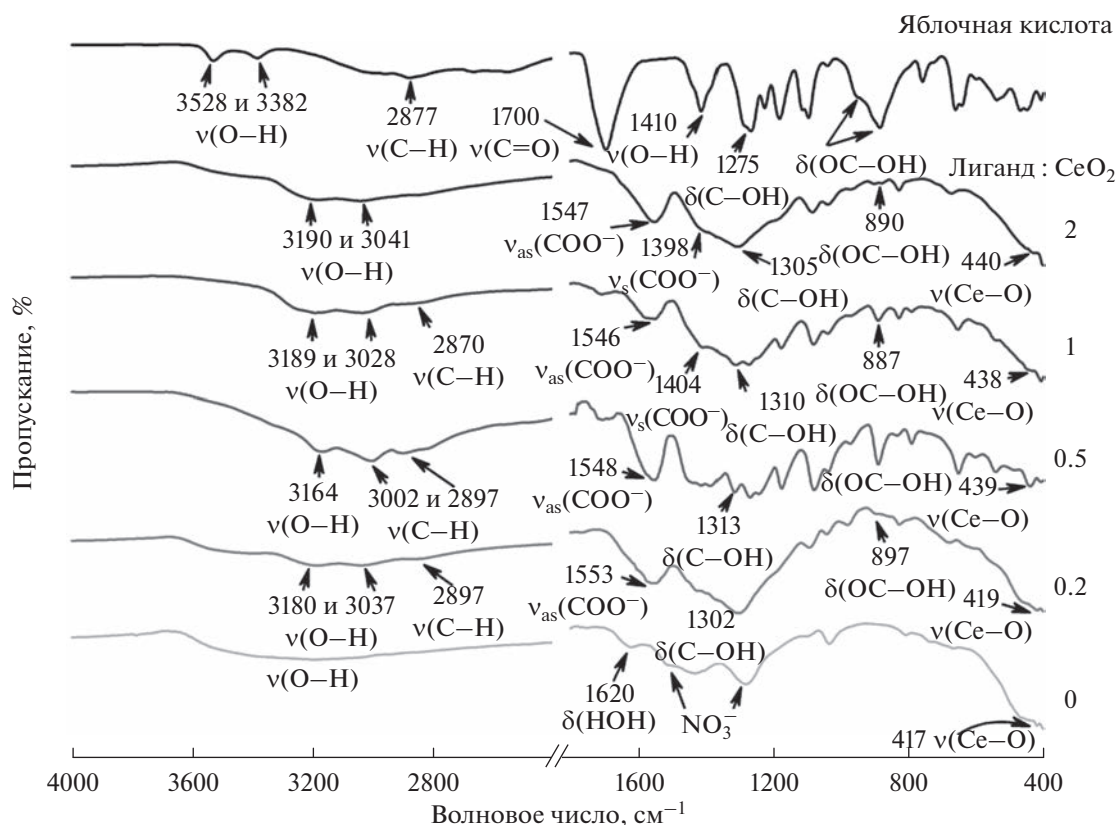


Рис. 3. ИК-спектры L-яблочной кислоты, малат-стабилизированных зольей CeO_2 и нанодисперсного порошка диоксида церия. Соотношение лиганд : CeO_2 указано на рисунке.

В ИК-спектре (рис. 3) нестабилизированного золя диоксида церия присутствуют полосы поглощения в диапазонах $3550\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ (антисимметричные и симметричные колебания $\nu(\text{O-H})$) и $1630\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ ($\delta(\text{HOH})$), а также в диапазонах $1530\text{--}1480$ и $1290\text{--}1250\text{ см}^{-1}$ (соответствуют примесным нитрат-ионам [42]) и в диапазоне 440--

420 см^{-1} (валентные колебания Ce-O) [43]. Для исходной L-яблочной кислоты характерны полосы поглощения при 3528 и 3382 см^{-1} ($\nu(\text{O-H})$), в диапазоне $3000\text{--}2840\text{ см}^{-1}$ ($\nu(\text{C-H})$), при 1700 см^{-1} ($\nu(\text{C=O})$) карбоксильных групп, 1410 см^{-1} ($\nu(\text{O-H})$), 1275 см^{-1} ($\delta(\text{C-OH})$), в диапазоне $960\text{--}880\text{ см}^{-1}$ ($\delta(\text{C(O)OH})$ карбоксильных групп) [44].

В ИК-спектрах (рис. 3) малат-стабилизированных золей CeO_2 можно видеть полосы поглощения в диапазонах 3200–2500 ($\nu(\text{O}-\text{H})$ связанной гидроксильной группы), 3000–2840 cm^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{H})$) и 1610–1550 cm^{-1} (асимметричные колебания $\nu(\text{COO}^-)$) [45]. Отсутствие на спектрах полосы поглощения при 1700 cm^{-1} и присутствие полос поглощения карбоксильной группы указывает на образование карбоксилатных комплексов на поверхности нанодисперсного диоксида церия [46, 47]. Присутствие полосы поглощения в районе 1400 cm^{-1} , характерной, в частности, для цитратных и тартратных комплексов $\text{Ce}(\text{IV})$, также подтверждает связывание малата с CeO_2 [48]. Сдвиг полосы деформационных колебаний гидроксильной группы от 1275 к 1310 cm^{-1} , происходящий при образовании хелатных комплексов оксикислот (молочной, винной и лимонной), дополнительно указывает на связывание L-яблочной кислоты с поверхностью частиц CeO_2 [42]. По результатам ИК-спектроскопии можно предположить, что связывание яблочной кислоты с поверхностью диоксида церия реализуется через карбоксильную и гидроксильную группы.

При добавлении нестабилизированного прозрачного золя CeO_2 (рН 2.3) по каплям в раствор L-яблочной кислоты (рН 1–2) происходит быстрое помутнение смесей и образование сильно опалесцирующих (практически непрозрачных) коллоидных растворов светло-желтого цвета (рН 1.4–2.0). Внешний вид коллоидных растворов при перемешивании остается неизменным, а в отсутствие перемешивания через сутки наблюдается образование осадка. Вероятно, при добавлении наночастиц CeO_2 к раствору яблочной кислоты происходит формирование малатных комплексов на поверхности частиц диоксида церия, аналогично комплексам с лимонной или глутаминовой кислотами [49–51]. Отметим, что при рН < 2 яблочная кислота присутствует в растворах преимущественно в недиссоциированной форме [52], поэтому в таких условиях стабилизация наночастиц CeO_2 , имеющих положительный ζ -потенциал [53], за счет электростатического взаимодействия маловероятна. Кроме того, хорошо известно, что растворимость диоксида церия в кислой среде относительно велика [54]. Грулке и соавт. показали, что нанокристаллический диоксид церия медленно растворяется в водных растворах органических кислот (лимонной, янтарной и яблочной) при рН 4.5 [55]. Для того чтобы повысить седиментационную устойчивость коллоидных растворов диоксида церия с L-яблочной кислотой и избежать возможного растворения частиц CeO_2 , рН смесей доводили водным раствором аммиака до 7.4. В результате добавления аммиака происходило формирование прозрачных золей. При рН > 7 яблочная кислота присутствует в растворах в форме двухзарядного аниона Mal^{2-} ,

что обеспечивает ее адсорбцию на поверхности CeO_2 и электростатическое отталкивание наночастиц, модифицированных малат-анионом [52]. Отметим, что при доведении рН нестабилизированного золя диоксида церия (рН 2.3) до нейтрального (рН ~ 7) наблюдается потеря седиментационной устойчивости и выпадение желтого осадка. Таким образом, стабилизация коллоидного раствора CeO_2 малат-анионом, аналогично стабилизации цитрат-или оксалат-анионами [53], позволила расширить диапазон рН стабильности золя.

Образование седиментационно-устойчивых золей диоксида церия, стабилизированных L-яблочной кислотой, было подтверждено методом ДРС (рис. 4). Для всех полученных золей с различными соотношениями лиганд : CeO_2 характерно модальное распределение агрегатов частиц по размерам. В исходном, нестабилизированном золе диоксида церия (рН 2.3) присутствуют агрегаты с гидродинамическим диаметром около 13 нм. Стабилизация коллоидного раствора CeO_2 L-яблочной кислотой в мольном соотношении лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.2$ приводит к увеличению гидродинамического диаметра агрегатов до 25 нм. Такое увеличение гидродинамического диаметра, вероятнее всего, связано со стерическим фактором, а именно необходимостью покрытия молекулами лиганда всей поверхности агрегата наночастиц для обеспечения стабильности золя. Отметим, что оценка мольного соотношения яблочная кислота : CeO_2 , необходимого для обеспечения полного покрытия наночастиц диаметром 13 нм, выполненного из геометрических соображений в приближении жестких сфер, привела к значению ~1 : 1, что удовлетворительно соответствует данному предположению. Значения гидродинамических диаметров агрегатов малат-стабилизированных золей CeO_2 с соотношением лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.5$ –2 находятся в диапазоне 15–19 нм и практически совпадают друг с другом, а также достаточно близки к размерам агрегатов частиц в исходном, нестабилизированном золе.

Результаты электрокинетических измерений для малат-стабилизированных золей диоксида церия приведены в табл. 1. Величина ζ -потенциала нестабилизированного золя CeO_2 является положительной (+22 мВ), что характерно для коллоидных растворов CeO_2 с низкими значениями рН (2–3) и соответствует ранее полученным данным [53, 56]. Из табл. 1 следует, что стабилизация диоксида церия малат-анионами приводит к изменению знака ζ -потенциала на отрицательный. Стабилизированные золи CeO_2 характеризуются величиной ζ -потенциала около –15 мВ, которая практически не зависит от количества L-яблочной кислоты. Отметим, что золи с величиной электрокинетического потенциала менее 30 мВ, как пра-

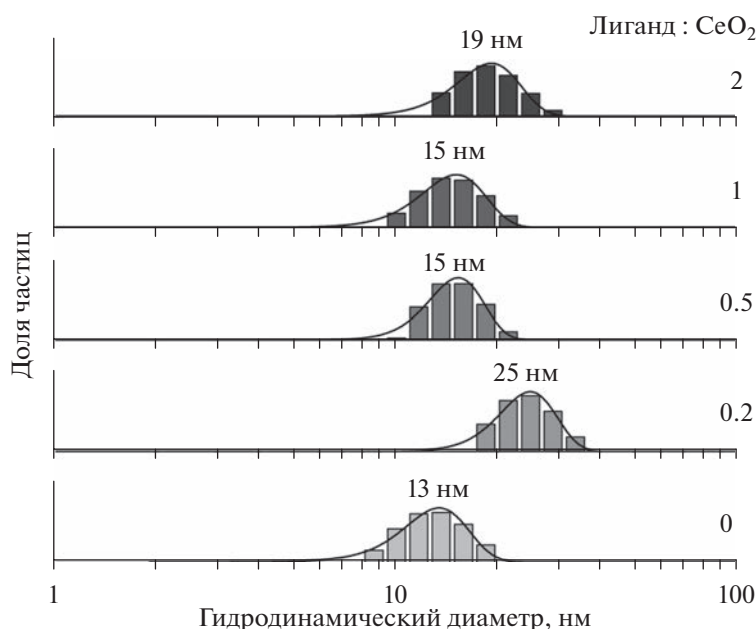


Рис. 4. Распределения частиц CeO_2 по размерам в золях, стабилизированных L-яблочной кислотой в мольных соотношениях лиганд : $\text{CeO}_2 = 0\text{--}2$.

вило, относят к коллоидным растворам с невысокой агрегативной устойчивостью [49, 57].

Добавление аммиака к нестабилизированному золю диоксида церия (pH 2.3) приводит к увеличению его pH до ~ 7 и перезарядке поверхности частиц CeO_2 , их ζ -потенциал становится слабоотрицательным (-3 ± 1 мВ) [56]. В свою очередь, при pH ~ 7 величины ζ -потенциала малат-стабилизированных золь CeO_2 (табл. 1) по абсолютной величине значительно больше, что дополнительно указывает на модифицирование поверхности диоксида церия малат-анионами. В соответствии с данными, приведенными в работе Власовой и соавт., адсорбция двухосновных органических кислот (пикотиновой и оротовой) на поверхности CeO_2 приводит к образованию устойчивых комплексов ($\equiv\text{CeOH}_2^+\text{A}^-$) [58]. Значение ζ -потенциала малат-стабилизированных золь CeO_2 практически не зависит от концентрации L-яблочной кислоты, вероятно, также за счет упомянутого

выше стерического фактора. Хэнкок и соавт. с использованием ЯМР-спектроскопии ^{13}C установили, что связывание цитрат-анионов с поверхностью частиц диоксида церия реализуется через гидроксильную и терминальные карбоксильные группы [49]. Поскольку при pH > 7 в растворе преимущественно присутствуют двухзарядные анионы Mal^{2-} , можно предположить, что координация малат-аниона к поверхности диоксида церия также осуществляется через карбоксильную и гидроксильную группы, что согласуется с данными ИК-спектроскопии. При этом свободная карбоксильная группа находится в анионной форме, что обеспечивает отрицательное значение ζ -потенциала малат-стабилизированных золь CeO_2 (табл. 1).

Ферментоподобная активность полученных золь CeO_2 по отношению к пероксиду водорода была исследована с использованием хемилюминесцентного метода. Кинетические кривые хемилюминесценции продукта окисления люминола пероксидом водорода в присутствии диоксида церия приведены на рис. 5.

При добавлении золь CeO_2 в реакционную смесь, содержащую буферный раствор Tris-HCl, люминол и пероксид водорода, интенсивность хемилюминесценции продукта окисления люминола по сравнению с контрольной смесью, не содержащей CeO_2 , увеличивается (рис. 5). Затем интенсивность свечения постепенно снижается, при этом скорость снижения интенсивности тем выше, чем больше концентрация CeO_2 в реакционной смеси (0.55–2.2 мМ). Отметим, что

Таблица 1. Значения ζ -потенциалов золь CeO_2 (pH 7.4)

Мольное соотношение лиганд : CeO_2	ζ -потенциал, мВ
0 (pH 2.3)	$+22 \pm 1$
0.2	-14 ± 1
0.5	-15 ± 2
1	-16 ± 2
2	-16 ± 1

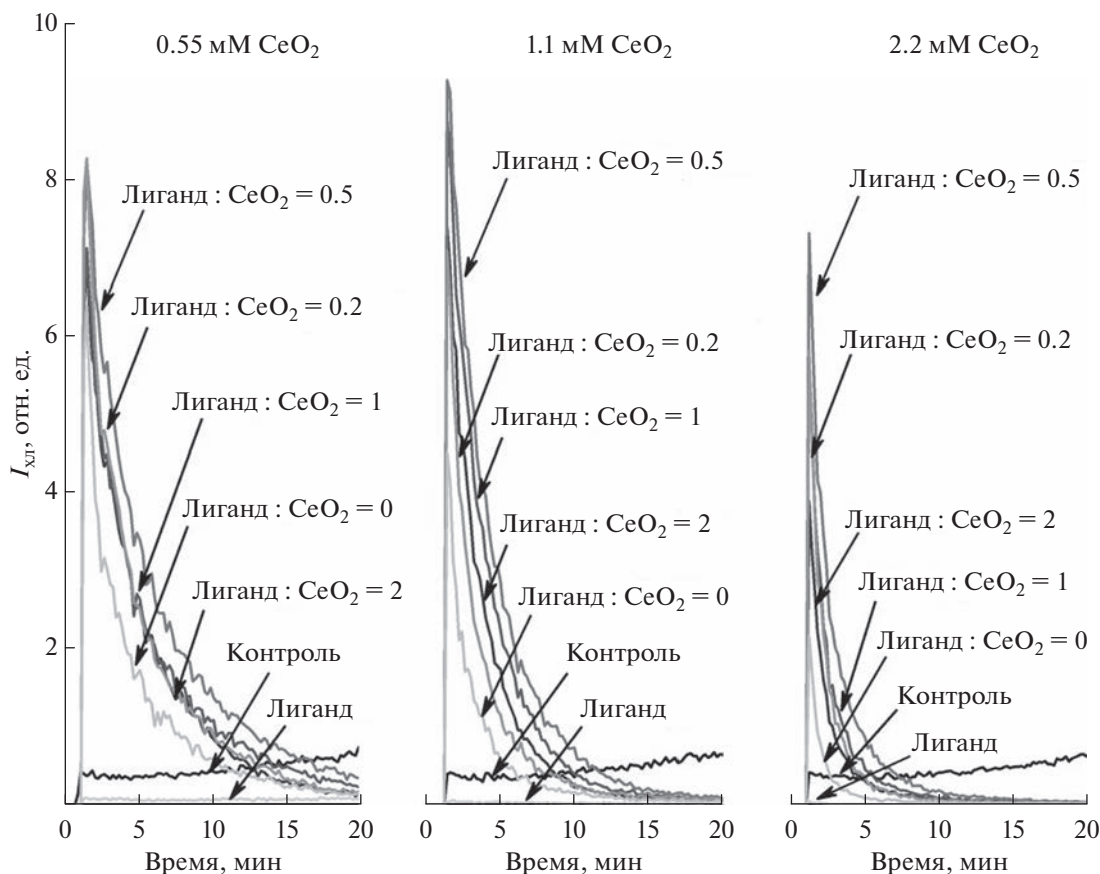


Рис. 5. Кинетические кривые хемилюминесценции продукта окисления люминола пероксидом водорода в реакционной смеси, содержащей буферный раствор Tris-HCl (pH 7.4) и золи диоксида церия, стабилизированные L-яблочной кислотой при мольных соотношениях лиганд : $\text{CeO}_2 = 0\text{--}2$. Значение pH нестабилизированного золя CeO_2 2.3.

для природного фермента пероксидазы хрена в аналогичных условиях регистрируется иной вид хемилюминесцентных кривых, а именно постепенное увеличение интенсивности хемилюминесценции с ее выходом на стационарное значение [59]. Однако, для наноматериалов, проявляющих пероксидазоподобную активность, вид хемилюминесцентных кривых может быть иным, что вероятно связано с взаимодействием наночастиц с компонентами реакционной смеси. Хемилюминесцентные кривые, аналогичные полученным в настоящей работе, и связанные с проявлением пероксидазоподобной активности наблюдали ранее для ряда наноматериалов, в том числе диоксида церия [60, 61], комплекса железа с порфирином [62], металл-органических полимеров Co(II) [63].

Экспериментальные кинетические данные были обработаны в рамках кинетической модели, приведенной в табл. 2 (рис. 6). Выбранная математическая модель основана на механизме пероксидазоподобной активности диоксида церия, предложенном ранее [64, 65]. В результате моделирования (табл. 2) были определены кинетические параметры реакций взаимодействия диоксида церия с

пероксидом водорода (1), взаимодействия люминола с гидроксил-радикалом (2) и реакции хемилюминесценции продукта окисления люминола (3).

Из табл. 2 можно видеть, что с уменьшением концентрации диоксида церия происходит снижение скорости реакции (3), сопровождающейся испусканием кванта света, на порядок величины, что согласуется с различиями в соответствующих экспериментальных кинетических кривых (рис. 5). В свою очередь, стабилизация золь диоксида церия L-яблочной кислотой приводит к снижению скорости реакции (3) в среднем в три раза (табл. 3), что соответствует более медленному затуханию хемилюминесценции реакционных смесей, содержащих малат-стабилизированные золи по сравнению со смесями, содержащими нестабилизированные коллоидные растворы CeO_2 (рис. 5).

Количественный анализ ферментоподобной активности золь диоксида церия проводили путем сравнения значений интегральной интенсивности хемилюминесценции, регистрируемой в течение 20 мин (рис. 7). Водные растворы яблочной кислоты (0.28–1.1 мМ), не содержащие диок-

Таблица 2. Результаты математического моделирования данных хемилюминесцентного анализа для реакционной смеси, содержащей буферный раствор Tris-HCl, люминол, пероксид водорода и нестабилизированный золь диоксида церия (pH 2.3)

Реакция		Константа реакции, мкМ/мин		
		0.55 мМ CeO ₂	1.1 мМ CeO ₂	2.2 мМ CeO ₂
CeO ₂ + H ₂ O ₂ → 2ОН·	(1)	2.6 × 10 ⁶	2.2 × 10 ⁶	6.1 × 10 ⁵
Lum + ОН· → Lum*	(2)	1.5 × 10 ⁻⁶	1.1 × 10 ⁻⁶	1.0 × 10 ⁻⁶
Lum* + Lum* → P + hν	(3)	3.5 × 10 ⁻⁷	6.0 × 10 ⁻⁷	5.0 × 10 ⁻⁶

сида церия, снижают интенсивность свечения люминола в 6–60 раз, что указывает на антиоксидантную активность L-яблочной кислоты по отношению к пероксиду водорода (рис. 7а). Снижение интенсивности хемилюминесценции с увеличением концентрации яблочной кислоты от 0.28 до 1.1 мМ согласуется с литературными данными, в соответствии с которыми яблочная кислота обладает антиоксидантной активностью по отношению к гидроксил-радикалам в диапазоне концентраций 0.05–0.5 мкг/мл, при этом, чем

выше концентрация яблочной кислоты, тем более выражена антиоксидантная активность [33].

Как видно из рис. 7б, пероксидазоподобная активность малат-стабилизированных золь CeO₂ превышает активность нестабилизированного золь диоксида церия. Ферментоподобная активность золь CeO₂, стабилизированного в мольном соотношении лиганд : CeO₂ = 0.5, практически в два раза (CeO₂, 0.55 мМ), в три раза (CeO₂, 1.1 мМ) и в семь раз (CeO₂, 2.2 мМ) выше, чем активность нестабилизированного золь CeO₂. Данное наблюдение согласуется с результатами ДРС, получен-

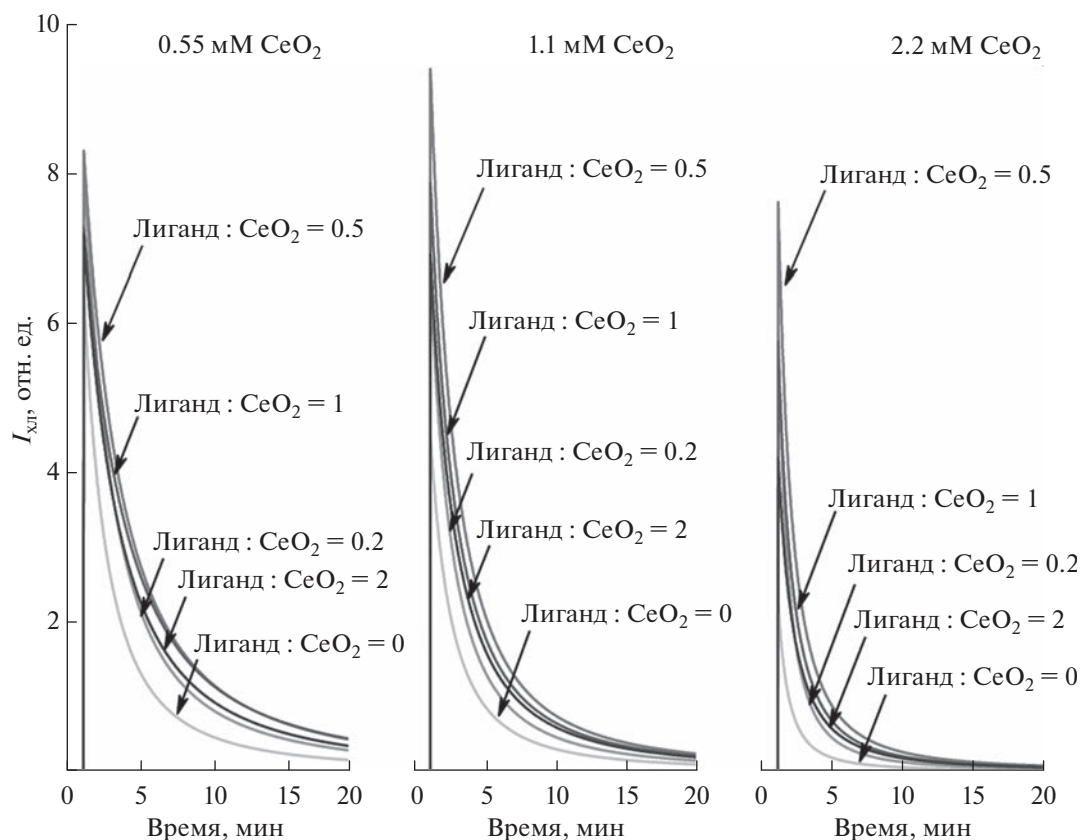


Рис. 6. Кинетические кривые хемилюминесценции продукта окисления люминола пероксидом водорода в присутствии золь диоксида церия, полученные в результате математического моделирования экспериментальных данных (реакции (1)–(3), табл. 2).

Таблица 3. Кинетические параметры реакций (1)–(3) для реакционных смесей, содержащих буферный раствор Tris-HCl, люминол, пероксид водорода и малат-стабилизированные золи диоксида церия

Мольное соотношение лиганд : CeO_2	Реакция	Константа реакции, мкМ/мин		
		0.55 мМ CeO_2	1.1 мМ CeO_2	2.2 мМ CeO_2
0.2	(1)	3.0×10^6	2.0×10^6	8.7×10^5
	(2)	2.1×10^{-6}	1.9×10^{-6}	1.8×10^{-6}
	(3)	1.7×10^{-7}	3.8×10^{-7}	2.0×10^{-6}
0.5	(1)	3.6×10^6	3.3×10^6	1.6×10^6
	(2)	2.3×10^{-6}	1.8×10^{-6}	1.7×10^{-6}
	(3)	1.0×10^{-7}	2.2×10^{-7}	8.5×10^{-7}
1	(1)	3.2×10^6	3.0×10^6	1.3×10^6
	(2)	2.5×10^{-6}	1.7×10^{-6}	1.6×10^{-6}
	(3)	9.4×10^{-8}	2.5×10^{-7}	1.1×10^{-6}
2	(1)	2.6×10^6	2.3×10^6	1.7×10^6
	(2)	2.6×10^{-6}	2.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}
	(3)	1.3×10^{-7}	2.7×10^{-7}	1.2×10^{-6}

ными для золь диоксида церия в буферном растворе Tris-HCl (pH 7.4) (рис. 8). Гидродинамический диаметр агрегатов нестабилизированного золя CeO_2 более чем в 3 раза превышает размер агрегатов в золе диоксида церия, стабилизированном L-яблочной кислотой в мольном соотношении лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.5$. Отметим, что аналогичную зависимость пероксидазоподобной активности от размеров агрегатов частиц наблюдали ранее для феррита марганца [66]. Наиболее вероятной причиной зависимости активности нанозимов от размеров агрегатов частиц является степень доступности их реакционных центров для молекул субстратов. Чем больше размер агрегатов, тем меньше эффективная поверхность взаимодействия активной твердой фазы с компонентами раствора.

С другой стороны, с увеличением мольного соотношения лиганд : CeO_2 в диапазоне 0.5–2 в малат-стабилизированных золях диоксида церия происходит снижение их пероксидазоподобной активности до двух раз (CeO_2 , 2.2 мМ), что, вероятно, связано с собственными антиоксидантными свойствами яблочной кислоты (рис. 7). Ранее Дарэ и соавт. показали, что конъюгация диоксида церия с дубильной кислотой приводит к снижению цитотоксичного действия дубильной кислоты: CeO_2 и конъюгат CeO_2 -дубильная кислота не оказывали значительного влияния на жизнеспособность фибробластов [46]. Жу и соавт. предложили методику модификации поверхности CeO_2

алендроновой кислотой и продемонстрировали, что конъюгат CeO_2 -алендроновая кислота проявляет супероксиддисмутазо- и каталазоподобную активность и обладает антиоксидантными свойствами по отношению к активным формам азота [67]. Ву и соавт. показали, что стабилизация золя диоксида церия цитрат-анионами (5 мас. %) позволяет значительно повысить скорость фотоиндуцированного свободнорадикального окисления N-(фосфонометил)-глицина по сравнению с нестабилизированным золем CeO_2 (константа скорости разложения k_{PMG} увеличилась с 0.0018 до 0.3028 мин⁻¹) [67]. Важно отметить, что величина k_{PMG} , теоретически оцененная для смеси диоксида церия и лимонной кислоты (5 мас. %) в предположении об отсутствии химического взаимодействия компонентов, была на три порядка ниже (0.0005 мин⁻¹), чем константа скорости разложения N-(фосфонометил)-глицина под действием цитрат-модифицированного CeO_2 . Сравнение литературных данных [68] и результатов, полученных в настоящей работе (рис. 7, табл. 2 и 3), позволяет предположить, что увеличение содержания L-яблочной кислоты (лиганд : CeO_2 от 0.5 до 2) затрудняет доступ люминола и пероксида водорода к поверхности частиц диоксида церия, что приводит к уменьшению пероксидазоподобной активности малат-стабилизированных золь CeO_2 .

Необходимо отметить, что золь диоксида церия, стабилизированный яблочной кислотой в соотно-

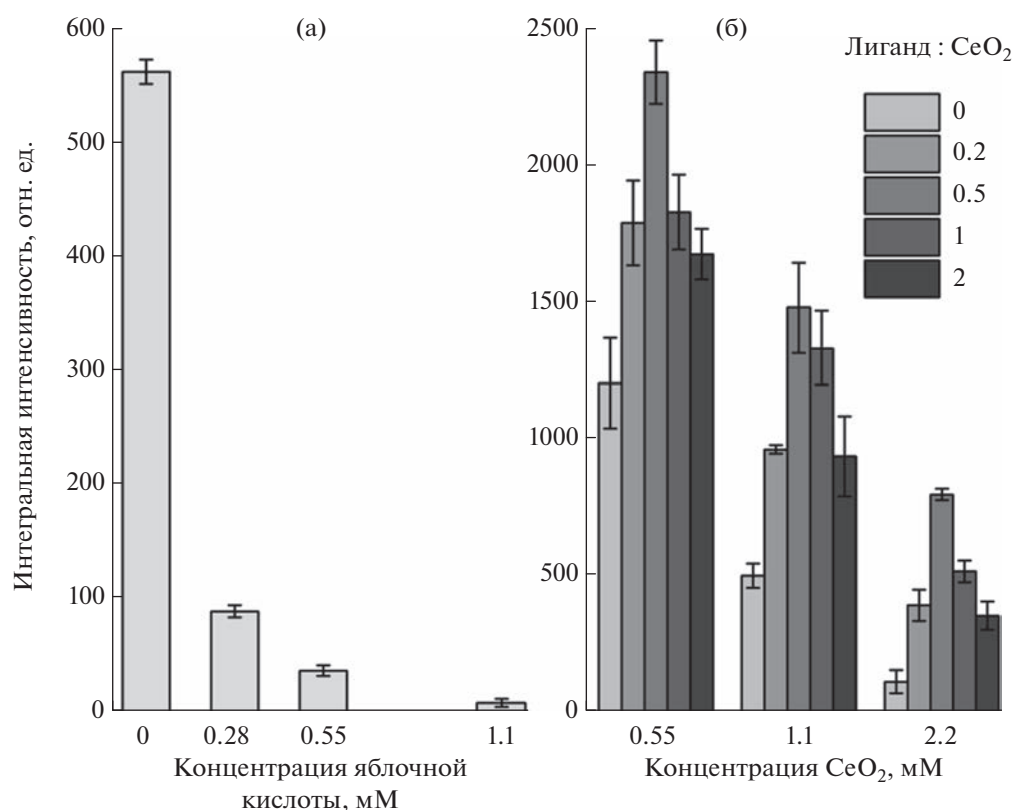


Рис. 7. Зависимость интегральной интенсивности хемилюминесценции продукта окисления люминола от концентрации L-яблочной кислоты (а) в реакционных смесях, содержащих буферный раствор Tris-HCl (pH 7.4), люминол и пероксид водорода, и от концентрации диоксида церия (б) в реакционных смесях, содержащих буферный раствор Tris-HCl (pH 7.4), люминол, пероксид водорода и малат-стабилизированные золи CeO_2 .

шении лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.2$, демонстрирует активность, вдвое меньшую активности золя CeO_2 , стабилизированного при соотношении лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.5$. Невысокая активность малат-стабилизированного коллоидного раствора CeO_2 с соотношением лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.2$ связана с большим значением гидродинамического диаметра агрегатов частиц в воде (рис. 4) и в буферном растворе Tris-HCl (рис. 8) по сравнению с другими стабилизированными золями. Такое различие, как было отмечено выше, вероятнее всего, также связано со стерическим фактором.

Таким образом, стабилизация диоксида церия L-яблочной кислотой в диапазоне мольных соотношений лиганд : CeO_2 от 0.5 до 2 позволяет повысить агрегативную устойчивость золя CeO_2 и его ферментоподобную активность по отношению к пероксиду водорода. Полученные данные свидетельствуют о том, что фактор агрегативной устойчивости наночастиц CeO_2 в коллоидных растворах может иметь большое значение при оценке ферментоподобной активности диоксида церия и других неорганических материалов, особенно в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые получены агрегативно устойчивые золи диоксида церия, стабилизированные L-яблочной кислотой, в диапазоне мольных соотношений лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.2-2$. Образование малатных комплексов на поверхности частиц диоксида церия подтверждено методами ИК-спектроскопии и ДРС. Стабилизация зольей диоксида церия яблочной кислотой снижает степень агрегации наночастиц CeO_2 в буферном растворе Tris-HCl (pH 7.4). Анализ ферментоподобной активности хемилюминесцентным методом продемонстрировал, что стабилизация коллоидных растворов CeO_2 малат-анионом приводит к увеличению пероксидазоподобной активности диоксида церия по сравнению с нестабилизированным золем CeO_2 . Результаты кинетического моделирования хемилюминесцентных данных показали, что увеличение количества малат-аниона в золях диоксида церия (лиганд : $\text{CeO}_2 = 0.5-2$) приводит к снижению ферментоподобной активности CeO_2 , что обусловлено антиоксидантными свойствами яблочной кислоты. Полученные результаты могут быть использованы для анализа биологической активности диоксида церия в при-

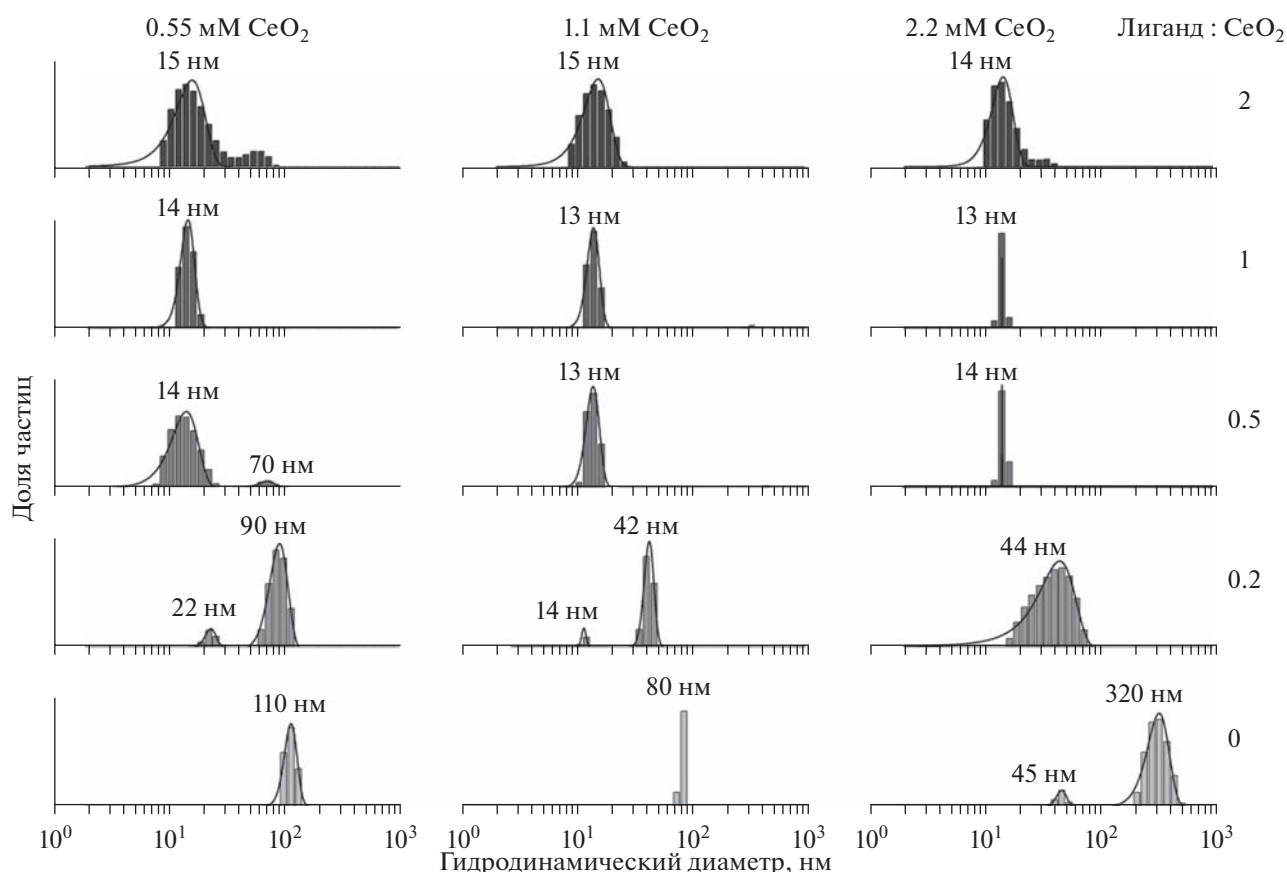


Рис. 8. Распределения по размерам частиц диоксида церия в золях, стабилизированных L-яблочной кислотой при мольных соотношениях лиганд : $\text{CeO}_2 = 0-2$, в буферном растворе Tris-HCl (pH 7.4).

сутствии продуктов катаболизма (цикла Кребса) в живых системах.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ФМИ ИОНХ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 19-13-00416).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shao C., Shen A., Zhang M. et al. Oxygen vacancies enhanced CeO_2/Gd nanoparticles for sensing a tumor vascular microenvironment by magnetic resonance imaging // *ACS Nano*. 2018. V. 12. № 12. P. 12629–12637. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07387>
2. Eriksson P., Tal A.A., Skallberg A. et al. Cerium oxide nanoparticles with antioxidant capabilities and gado-

linium integration for MRI contrast enhancement // *Scientific Reports*. 2018. V. 8. № 1. P. 6999. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25390-z>

3. Tapeinos C., Battaglini M., Prato M. et al. CeO_2 Nanoparticles-loaded pH-responsive microparticles with antitumoral properties as therapeutic modulators for osteosarcoma // *ACS Omega*. 2018. V. 3. № 8. P. 8952–8962. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01060>
4. Pi F., Deng X., Xue Q. et al. Alleviating the hypoxic tumor microenvironment with MnO_2 -coated CeO_2 nanopatform for magnetic resonance imaging guided radiotherapy // *Journal of Nanobiotechnology*. 2023. V. 21. № 1. P. 90. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01850-1>
5. Augustine R., Hasan A., Patan N.K. et al. Cerium oxide nanoparticle incorporated electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) membranes for diabetic wound healing applications // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2020. V. 6. № 1. P. 58–70. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b01352>
6. Kim D.W., Le T.M.D., Lee S.M. et al. Microporous organic nanoparticles anchoring CeO_2 materials: Reduced toxicity and efficient reactive oxygen species-scavenging for regenerative wound healing // *Chem-NanoMat*. 2020. V. 6. № 7. P. 1104–1110. <https://doi.org/10.1002/cnma.202000067>

7. *Rather H.A., Thakore R., Singh R. et al.* Antioxidative study of Cerium Oxide nanoparticle functionalised PCL-gelatin electrospun fibers for wound healing application // *Bioactive Materials*. 2018. V. 3. № 2. P. 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.09.006>
8. *Zheng H., Wang S., Cheng F. et al.* Bioactive anti-inflammatory, antibacterial, conductive multifunctional scaffold based on MXene@CeO₂ nanocomposites for infection-impaired skin multimodal therapy // *Chemical Engineering Journal*. 2021. V. 424. P. 130148. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130148>
9. *Ermakov A., Popov A., Ermakova O. et al.* The first inorganic mitogens: Cerium oxide and cerium fluoride nanoparticles stimulate planarian regeneration via neoblastic activation // *Materials Science and Engineering: C*. 2019. V. 104. P. 109924. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109924>
10. *Shcherbakov A.B., Reukov V.V., Yakimansky A.V. et al.* CeO₂ nanoparticle-containing polymers for biomedical applications: A review // *Polymers*. 2021. V. 13. № 6. P. 924. <https://doi.org/10.3390/polym13060924>
11. *Ivanov V.K., Polezhaeva O.S., Tretyakov Y.D.* Nanocrystalline ceria: Synthesis, structure-sensitive properties, and promising applications // *Russian Journal of General Chemistry*. 2010. V. 80. № 3. P. 604–617. <https://doi.org/10.1134/S1070363210030412>
12. *Saravanakumar K., Sathiyaseelan A., Mariadoss A.V.A. et al.* Antioxidant and antidiabetic properties of biocompatible ceria oxide (CeO₂) nanoparticles in mouse fibroblast NIH3T3 and insulin resistant HepG2 cells // *Ceramics International*. 2021. V. 47. № 6. P. 8618–8626. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.11.230>
13. *Naz S., Kazmi S.T.B., Zia M.* CeO₂ Nanoparticles synthesized through green chemistry are biocompatible: *In vitro* and *in vivo* assessment // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2019. V. 33. № 5. P. e22291. <https://doi.org/10.1002/jbt.22291>
14. *Uzair B., Akhtar N., Sajjad S. et al.* Targeting microbial biofilms: By *Arctium lappa* L. synthesised biocompatible CeO₂-NPs encapsulated in nano-chitosan // *IET Nanobiotechnology*. 2020. V. 14. № 3. P. 217–223. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2019.0294>
15. *Ahamed M., Akhtar M.J., Khan M.A.M. et al.* Evaluation of the cytotoxicity and oxidative stress response of CeO₂-RGO nanocomposites in human lung epithelial A549 cells // *Nanomaterials*. 2019. V. 9. № 12. P. 1709. <https://doi.org/10.3390/nano9121709>
16. *Abbas F., Iqbal J., Maqbool Q. et al.* ROS mediated malignancy cure performance of morphological, optical, and electrically tuned Sn doped CeO₂ nanostructures // *AIP Advances*. 2017. V. 7. № 9. P. 095205. <https://doi.org/10.1063/1.4990790>
17. *Ma Y., Tian Z., Zhai W. et al.* Insights on catalytic mechanism of CeO₂ as multiple nanozymes // *Nano Research*. 2022. V. 15. № 12. P. 10328–10342. <https://doi.org/10.1007/s12274-022-4666-y>
18. *Xiao G., Li H., Zhao Y. et al.* Nanoceria-based artificial nanozymes: Review of materials and applications // *ACS Applied Nano Materials*. 2022. V. 5. № 10. P. 14147–14170. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c03009>
19. *Popov A.L., Shcherbakov A.B., Zholobak N.M. et al.* Cerium dioxide nanoparticles as third-generation enzymes (nanozymes) // *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. 2017. P. 760–781. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2017-8-6-760-781>
20. *Feng N., Liu Y., Dai X. et al.* Advanced applications of cerium oxide based nanozymes in cancer // *RSC Advances*. 2022. V. 12. № 3. P. 1486–1493. <https://doi.org/10.1039/D1RA05407D>
21. *Sozarukova M.M., Proskurnina E. V., Popov A.L. et al.* New facets of nanozyme activity of ceria: lipo- and phospholipoperoxidase-like behaviour of CeO₂ nanoparticles // *RSC Advances*. 2021. V. 11. № 56. P. 35351–35360. <https://doi.org/10.1039/D1RA06730C>
22. *Kim C.K., Kim T., Choi I.-Y. et al.* Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke // *Angewandte Chemie International Edition*. 2012. V. 51. № 44. P. 11039–11043. <https://doi.org/10.1002/anie.201203780>
23. *Gulicovski J.J., Milonjić S.K., Szécsényi K.M.* Synthesis and characterization of stable aqueous ceria sols // *Materials and Manufacturing Processes*. 2009. V. 24. № 10–11. P. 1080–1085. <https://doi.org/10.1080/10426910903032162>
24. *Habib I.Y., Kumara N.T.R.N., Lim C.M. et al.* Dynamic light scattering and zeta potential studies of ceria nanoparticles // *Solid State Phenomena*. 2018. V. 278. P. 112–120. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.278.112>
25. *Huang L., Zhang W., Chen K. et al.* Facet-selective response of trigger molecule to CeO₂ {1 1 0} for up-regulating oxidase-like activity // *Chemical Engineering Journal*. 2017. V. 330. P. 746–752. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.08.026>
26. *Yadav N., Patel V., McCourt L. et al.* Tuning the enzyme-like activities of cerium oxide nanoparticles using a triethyl phosphite ligand // *Biomaterials Science*. 2022. V. 10. № 12. P. 3245–3258. <https://doi.org/10.1039/D2BM00396A>
27. *Wu J., Wang X., Wang Q. et al.* Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II) // *Chemical Society Reviews*. 2019. V. 48. № 4. P. 1004–1076. <https://doi.org/10.1039/C8CS00457A>
28. *Gupta A., Das S., Neal C.J. et al.* Controlling the surface chemistry of cerium oxide nanoparticles for biological applications // *Journal of Materials Chemistry B*. 2016. V. 4. № 19. P. 3195–3202. <https://doi.org/10.1039/C6TB00396F>
29. *Lee S.S., Song W., Cho M. et al.* Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating // *ACS Nano*. 2013. V. 7. № 11. P. 9693–9703. <https://doi.org/10.1021/nn4026806>
30. *Lazić V., Živković L.S., Sredojević D. et al.* Tuning properties of cerium dioxide nanoparticles by surface modification with catecholate-type of ligands // *Langmuir*. 2020. V. 36. № 33. P. 9738–9746. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01163>
31. *Wu Q., Yang L., Zou L. et al.* Small ceria nanoclusters with high ROS Scavenging activity and favorable Phar-

- macokinetic parameters for the amelioration of chronic kidney disease // *Advanced Healthcare Materials*. 2023. P. 2300632.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202300632>
32. Casals E., Zeng M., Parra-Robert M. et al. Cerium oxide nanoparticles: Advances in biodistribution, toxicity, and preclinical exploration // *Small*. 2020. V. 16. № 20. P. 1907322.
<https://doi.org/10.1002/smll.201907322>
 33. Szentmihályi K., Szilágyi M., Balla J. et al. In vitro anti-oxidant activities of magnesium compounds used in food industry // *Acta Alimentaria*. 2014. V. 43. № 3. P. 419–425.
<https://doi.org/10.1556/AAlim.43.2014.3.8>
 34. Jin X., Yang R., Yan X. et al. Malic acid and oxalic acid spraying enhances phytic acid degradation and total antioxidant capacity of mung bean sprouts // *International Journal of Food Science & Technology*. 2016. V. 51. № 2. P. 370–380.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.12941>
 35. Qiu K., He W., Zhang H. et al. Bio-fermented malic acid facilitates the production of high-quality chicken via enhancing muscle antioxidant capacity of broilers // *Antioxidants*. 2022. V. 11. № 12. P. 2309.
<https://doi.org/10.3390/antiox11122309>
 36. Huang Z.W., Laurent V., Chetouani G. et al. New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. 2012. V. 423. № 1. P. 84–92.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.035>
 37. Huang X., Xu L., Qian H. et al. Polymalic acid for translational nanomedicine // *Journal of Nanobiotechnology*. 2022. V. 20. № 1. P. 295.
<https://doi.org/10.1186/s12951-022-01497-4>
 38. Zhang J., Chen D., Liang G. et al. Biosynthetic polymalic acid as a delivery nanopatform for translational cancer medicine // *Trends in Biochemical Sciences*. 2021. V. 46. № 3. P. 213–224.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.09.008>
 39. Ljubimova J.Y., Fujita M., Khazenzon N.M. et al. Nano-conjugate based on polymalic acid for tumor targeting // *Chemico-Biological Interactions*. 2008. V. 171. № 2. P. 195–203.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.015>
 40. Hirschey M.D., Han Y.-J., Stucky G.D. et al. Imaging *Escherichia coli* using functionalized Core/Shell CdSe/CdS quantum dots // *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2006. V. 11. № 5. P. 663–669.
<https://doi.org/10.1007/s00775-006-0116-7>
 41. Huang Y.-C., Wu S.-H., Hsiao C.-H. et al. Mild synthesis of size-tunable CeO₂ octahedra for band gap variation // *Chemistry of Materials*. 2020. V. 32. № 6. P. 2631–2638.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c00318>
 42. Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. John Wiley & Sons, 2009.
 43. Prieur D., Bonani W., Popa K. et al. Size dependence of lattice parameter and electronic structure in CeO₂ nanoparticles // *Inorganic Chemistry*. 2020. V. 59. № 8. P. 5760–5767.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c00506>
 44. Badertscher M., Bühlmann P., Pretsch E. *Structure determination of organic compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. 174 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-540-93810-1>
 45. Bellami L.J. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*. New York, NY: John Wiley & Sons, 1954. 321 p.
 46. Daré R.G., Kolanthai E., Neal C.J. et al. Cerium oxide nanoparticles conjugated with tannic acid prevent uvb-induced oxidative stress in fibroblasts: Evidence of a promising anti-photodamage agent // *Antioxidants*. 2023. V. 12. № 1. P. 190.
<https://doi.org/10.3390/antiox12010190>
 47. Nastasiienko N., Palianytsia B., Kartel M. et al. Thermal transformation of caffeic acid on the nanoceria surface studied by temperature programmed desorption mass-spectrometry, thermogravimetric analysis and FT–IR spectroscopy // *Colloids and Interfaces*. 2019. V. 3. № 1. P. 34.
<https://doi.org/10.3390/colloids3010034>
 48. Petrova N., Todorovsky D., Angelova S. et al. Synthesis and characterization of cerium citric and tartaric complexes // *Journal of Alloys and Compounds*. 2008. V. 454. № 1–2. P. 491–500.
<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2007.01.005>
 49. Hancock M.L., Yokel R.A., Beck M.J. et al. The characterization of purified citrate-coated cerium oxide nanoparticles prepared via hydrothermal synthesis // *Applied Surface Science*. 2021. V. 535. P. 147681.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147681>
 50. Ivanov V.K., Polezhaeva O.S., Shaporev A.S. et al. Synthesis and thermal stability of nanocrystalline ceria sols stabilized by citric and polyacrylic acids // *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 2010. V. 55. № 3. P. 328–332.
<https://doi.org/10.1134/S0036023610030046>
 51. Vlasova N.M., Markitan O.V. Complexation on the oxide surfaces: Adsorption of biomolecules from aqueous solutions: A review // *Theoretical and Experimental Chemistry*. 2022. V. 58. № 1. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1007/s11237-022-09716-7>
 52. Janusz W., Skwarek E. Adsorption of malic acid at the hydroxyapatite/aqueous NaCl solution interface // *Applied Nanoscience*. 2022. V. 12. № 4. P. 1355–1363.
<https://doi.org/10.1007/s13204-021-01938-w>
 53. Shcherbakov A.B., Teplonogova M.A., Ivanova O.S. et al. Facile method for fabrication of surfactant-free concentrated CeO₂ sols // *Materials Research Express*. 2017. V. 4. № 5. P. 055008.
<https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa6e9a>
 54. Plakhova T.V., Romanchuk A.Y., Yakunin S.N. et al. Solubility of nanocrystalline cerium dioxide: Experimental data and thermodynamic modeling // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016. V. 120. № 39. P. 22615–22626.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b05650>
 55. Grulke E.A., Beck M.J., Yokel R.A. et al. Surface-controlled dissolution rates: A case study of nanoceria in carboxylic acid solutions // *Environmental Science: Nano*. 2019. V. 6. № 5. P. 1478–1492.
<https://doi.org/10.1039/C9EN00222G>

56. Barany S., Bohacs K., Chepurna I. et al. Electrokinetic properties and stability of cerium dioxide suspensions // RSC Advances. 2016. V. 6. № 73. P. 69343–69351. <https://doi.org/10.1039/C6RA12725H>
57. Robert J. P., Lennart B. Surface and Colloid Chemistry in Advanced Ceramics Processing / Ed. Pugh R.J., Bergstrom L. CRC Press, 2017. <https://doi.org/10.1201/9780203737842>
58. Vlasova N.N., Golovkova L.P., Stukalina N.G. Adsorption of organic acids on a cerium dioxide surface // Colloid Journal. 2015. V. 77. № 4. P. 418–424. <https://doi.org/10.1134/S1061933X15040201>
59. Izmailov D.Y., Proskurnina E. V., Shishkanov S.A. et al. The effect of antioxidants on the formation of free radicals and primary products of the peroxidase reaction // Biophysics. 2017. V. 62. № 4. P. 557–564. <https://doi.org/10.1134/S0006350917040091>
60. Averchenko E.A., Kavok N.S., Klochkov V.K. et al. Chemiluminescent diagnostics of free-radical processes in an abiotic system and in liver cells in the presence of nanoparticles based on rare-earth elements $\text{NReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = Gd, Y, La) and CeO_2 // Journal of Applied Spectroscopy. 2014. V. 81. № 5. P. 827–833. <https://doi.org/10.1007/s10812-014-0012-9>
61. Iranifam M., Haggi A., Akhteh H. et al. Synthesis of rod-like CeO_2 nanoparticles and their application to catalyze the luminol– O_2 chemiluminescence reaction used in the determination of oxcarbazepine and ascorbic acid // Analytical Sciences. 2022. V. 38. № 5. P. 787–793. <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00096-5>
62. Zhao Y., Xu X., Ma Y. et al. A Novel peroxidase/oxidase mimetic Fe-porphyrin covalent organic framework enhanced the luminol chemiluminescence reaction and its application in glucose sensing // Luminescence. 2020. V. 35. № 8. P. 1366–1372. <https://doi.org/10.1002/bio.3899>
63. Li D., Zhang S., Feng X. et al. A novel peroxidase mimetic Co-MOF enhanced luminol chemiluminescence and its application in glucose sensing // Sensors and Actuators B: Chemical. 2019. V. 296. P. 126631. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126631>
64. Filippova A.D., Sozarukova M.M., Baranchikov A.E. et al. Peroxidase-like activity of CeO_2 nanozymes: Particle size and chemical environment matter // Molecules. 2023. V. 28. № 9. P. 3811. <https://doi.org/10.3390/molecules28093811>
65. Sozarukova M.M., Proskurnina E.V., Ivanov V.K. Pro-oxidant potential of CeO_2 nanoparticles towards hydrogen peroxide // Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics. 2021. V. 12. № 3. P. 283–290. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2021-12-3-283-290>
66. Moreno-Castilla C., Naranjo Á., Victoria López-Ramón M. et al. Influence of the hydrodynamic size and ζ -potential of manganese ferrite nanozymes as peroxidase-mimicking catalysts at pH 4 in different buffers // Journal of Catalysis. 2022. V. 414. P. 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2022.09.010>
67. Zhou X., Zeng W., Rong S., et al. Alendronate-modified nanoceria with multiantioxidant enzyme-mimetic activity for reactive oxygen species/reactive nitrogen species scavenging from cigarette smoke // ACS Applied Materials & Interfaces. 2021. V. 13. № 40. P. 47394–47406. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c15358>
68. Wu H., Sun Q., Chen J. et al. Citric acid-assisted ultrasmall CeO_2 nanoparticles for efficient photocatalytic degradation of glyphosate // Chemical Engineering Journal. 2021. V. 425. P. 130640. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130640>

УДК 544.773.432

БИОСОВМЕСТИМЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ ПОЛИЭФИРОВ И ИХ СОПОЛИМЕРОВ

© 2023 г. Ю. С. Фомина¹, А. С. Семкина^{1, 2}, Ю. Д. Загоскин^{1, *},
М. М. Алексанян³, С. Н. Чвалун^{1, 2}, Т. Е. Григорьев¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный исследовательский центр
“Курчатовский институт”, пл. Академика Курчатова, 1, Москва, 123182 Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт синтетических полимерных материалов
имени Н.С. Ениколопова Российской академии наук, Профсоюзная ул., 70/2, Москва, 117393 Россия

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Российский научный центр хирургии имени
академика Б.В. Петровского”, ГСП-1, Абрикосовский пер., 2, Москва, 119991 Россия

*e-mail: zagos@inbox.ru

Поступила в редакцию 26.06.2023 г.

После доработки 03.08.2023 г.

Принята к публикации 03.08.2023 г.

Гидрогели на основе полиэтиленгликоля достаточно давно зарекомендовали себя в качестве перспективных материалов для различных биомедицинских технологий. В обзоре рассмотрены системы на основе наиболее распространенных и изученных сополимеров полиэтиленгликоля и биоразлагаемых полиэфиров лактида и гликолида. Показаны традиционные и современные подходы синтеза сополимеров и получения гидрогелей на их основе, отражены исследования структуры и свойств материалов, а также основные направления применения данных изделий на практике.

Ключевые слова: гидрогели, амфифильные блок-сополимеры, самоорганизация, полилактид, полилактид-со-гликолид, полиэтиленгликоль

DOI: 10.31857/S0023291223600554, **EDN:** ZAFXKE

ВВЕДЕНИЕ

Гидрогелевые материалы достаточно давно нашли свое применение во многих областях науки и технологии. За счет способности удерживать воду такие системы могут применяться в сельском хозяйстве для сохранения влаги в почве [1–4], а также в различных биомедицинских областях: от контактных линз для коррекции зрения [5, 6] до раневых покрытий [7–10] и основы тканеинженерных конструкций [11–13]. Гидрогели, как правило, представляют собой набухшие в водной среде полимерные сетки. В качестве основы гидрогелей могут выступать как полимеры природного происхождения — коллаген [14], альгинат [15], каррагинан [16], хитозан [17], так и синтетического — полиэтиленгликоль (ПЭГ) [18], поливиниловый спирт [19]. Особый интерес с точки зрения применения гидрогелей в биомедицине представляют материалы на основе ПЭГ. Данный полиэфир биосовместимый, небiorазлагаемый, хорошо удерживает воду и легко выводится из организма при относительно низких молекулярных массах. В то же время его сополимеризация с биоразлагаемыми гидрофобными полиэфирами позволяет создавать полимерные

сетки с контролируемой структурой и свойствами.

В данном обзоре рассмотрены две наиболее распространенные и изученные системы сополимеров ПЭГ и биоразлагаемых полиэфиров лактида (ПЛА) и гликолида. Обзор объединяет синтез сополимеров различного строения, раскрывает методы получения гидрогелей и способы исследования их структуры, а также описывает последние результаты в области применения разрабатываемых гидрогелевых материалов. Большая часть рассматриваемых работ представлена за последние 5 лет, при этом в обзор включены и ранние классические исследования для лучшего представления о структуре и свойствах материалов. Основная цель обзора заключается в систематизации знаний в выбранной области.

1. ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ПОЛИЛАКТИДА

Биосовместимая и биоразлагаемая система блок-сополимеров полиэтиленгликоль-полилактид (ПЭГ-ПЛА) является одной из возможных матриц для создания гидрогелевых материалов

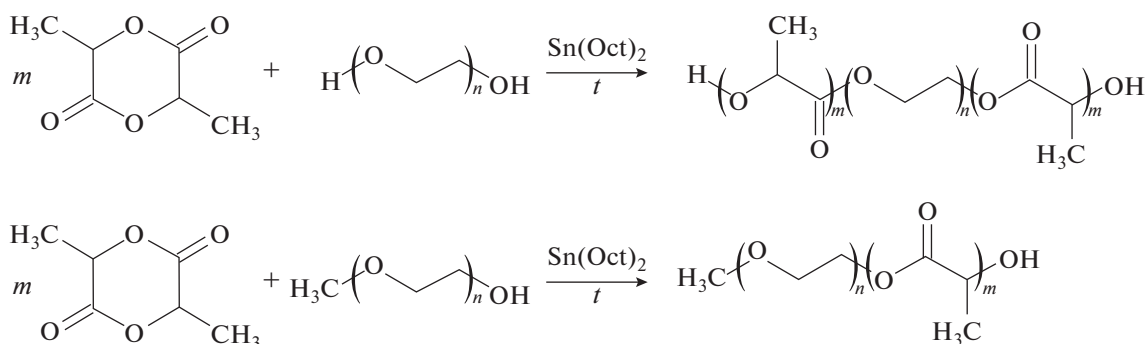


Рис. 1. Схема синтеза двойных и тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля.

вследствие агрегации гидрофобных блоков ПЛА в водной среде с образованием узлов сетки гидрогеля и их структурообразования за счет проходных цепей ПЭГ. Гидрофильно-гидрофобный баланс высокомолекулярных соединений в составе гидрогелей будет оказывать существенное влияние на структуру и физико-механические свойства материалов.

Сополимеры, способные к образованию гидрогелей, могут обладать различной молекулярной структурой: блочной (диблок- (AB), триблок- (ABA или BAB) и мультиблок-сополимеры) или привитой, где А и В – гидрофобный и гидрофильный блоки соответственно [20–22].

1.1. Синтез блок-сополимеров

Синтез блочных амфифильных сополимеров ПЛА и ПЭГ наиболее часто осуществляется методом полимеризации с раскрытием цикла мономера лактида. Главным преимуществом данной методики является отсутствие воды в продуктах, в отличие от реакций поликонденсации, что позволяет получать соединения с более высокой молекулярной массой. Данный синтез может быть проведен как в растворе, так и в расплаве в присутствии различных катализаторов. В частности, сообщается об исследованиях по применению таких катализаторов, как Sb_2O_3 [23], GeO_2 [23], SnO_2 [23], SnCl_2 [24], изопропилат алюминия [25, 26], алколяты редкоземельных элементов [27, 28], Zn [29], CaH_2 [29] и др. Также проведены исследования по сополимеризации с раскрытием цикла без использования катализатора, однако синтез при температуре 140°C в течение 4–8 сут показал недостаточно высокие степени конверсии [30].

Одной из наиболее устоявшихся методик является синтез блок-сополимеров ПЭГ-ПЛА на катализаторе 2-этилгексаноат олова (II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) в растворе (растворитель – толуол) [31–34] или расплаве [35–39] (рис. 1).

Данная методика актуальна и в настоящее время [39]. Соединения олова показали наибольшую эффективность, однако их существенным недостатком является относительно высокая токсичность [40]. В связи с этим $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ приобрел широкую распространенность, т.к. органические соли олова обладают более низкой токсичностью по сравнению с другими его соединениями [41].

Еще одним известным подходом является полимеризация с раскрытием цикла лактида в растворе (растворитель – дихлорметан) на катализаторе 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU). Основными преимуществами данного подхода являются неметаллическая природа катализатора, более мягкие условия проведения процесса, а также более простые методы очистки синтезированных продуктов от остаточного катализатора [42–44].

Помимо устоявшихся известных подходов к синтезу существует направление исследования по разработке альтернативных способов получения блок-сополимеров, например, с использованием принципов “зеленой” химии. В работе [45] Mhiri и соавт. предложили химическую сшивку по реакции Дильса–Альдера функционализированных ПЛА и ПЭГ (рис. 2). ПЭГ модифицировали 3-(3-фурфурилмеркаптанпропокси)-пропан-1,2-диолом и 4,4'-метилена-бис-циклогексизоцианатом (ПЭГ- F_{60}). ПЛА был функционализирован по реакции с глицерином, 4,4'-метилена-бис-циклогексизоцианатом с последующей конденсацией концевой изоцианата со спиртовой группой *N*-гидроксиметилмалеимида (ПЛА- Tri M). Далее по реакции Дильса–Альдера получали сополимер при температуре 90°C без использования катализаторов и растворителей.

Помимо непосредственно синтеза блок-сополимеров ПЭГ-ПЛА, актуальной задачей также является их модификация, которая позволяет регулировать физико-химические свойства сополимеров и, как следствие, характеристики получаемых из них материалов. В работе [46] Buwalda и со-

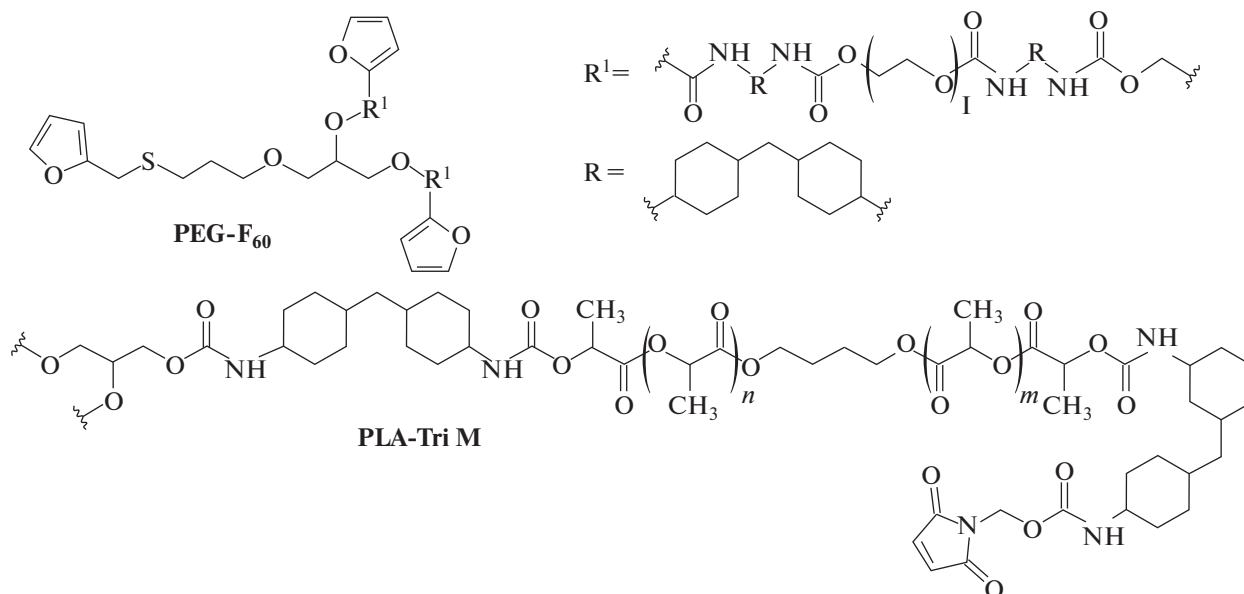


Рис. 2. Функционализированные производные ПЛА и ПЭГ.

авт. модифицировали концевые группы 8-лучевых блок-сополимеров ПЭГ-П(L)ЛА и ПЭГ-П(D)ЛА акрилатами при действии акрилоилхлорида в дихлорметане в течение 18 ч [46]. Такая реакция позволяет впоследствии получать на основе звездообразных сополимеров методом фотополимеризации стабильные и достаточно прочные гидрогели. Pertici и соавт. синтезировали тройные блок-сополимеры П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА и в несколько стадий модифицировали их с помощью поли-*N*-изопропилакриламида (PNIPAAm) [47]. Сначала концевые группы блок-сополимера реагируют с акрилоилхлоридом в ТГФ в течение 20 ч с последующим радикальным 1,2-присоединением алкоксиамина *N*-(2-метилпропил)-*N*-(1-диэтилфосфонат-2,2-диметилпропил)-*O*-(2-карбоксипроп-2-ил)гидроксисиламин (MAMA-SG1) в 1,4-диоксане. После чего проводят полимеризацию по концевым фрагментам *N*-изопропилакриламидом в 1,4-диоксане. Введение блоков PNIPAAm позволяет получать термочувствительные гидрогели на основе данных сополимеров. Способность PNIPAAm к температурно-зависимым фазовым переходам известна еще с 1960-х годов [48, 49]. В работе [50] Trinh и соавт. тройные блок-сополимеры лактида и этиленгликоля модифицировали олигосерином посредством взаимодействия П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА с сульфонамидом серина в дициклогексилкарбонимиде (DCC) в присутствии катализатора 4-диметиламинопиридин (DMAP). Такая реакция приводит к расширению спектра свойств сополимеров и биоматериалов на их основе. Внедрение олигосериновых фрагментов позволяет получать термо- и pH-чувствительные гидрогели. Grosjean и соавт. изучали влияние функционализации 8-лу-

чевых звездообразных ПЭГ-П(D,L)ЛА на адгезию гидрогелевых материалов [51]. Сополимеры модифицировали акрилатами, метакрилатами и пирокатехином, что приводило к различному механизму адгезии гидрогелей к модельным тканям (за счет физических взаимодействий, водородных связей, ковалентных сшивок и т.д.). В работе [38] Darge и соавт. блок-сополимеры П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА модифицировали ангидридом янтарной кислоты для получения концевых карбоксильных групп, а также 3-карбамоил-5-метилгексановой кислотой для функционализации сополимеров аминогруппой. Смесь amino- и карбокси-концевых сополимеров образует гидрогели с фазовым переходом при температуре тела, а также заметно повышает их механическую прочность.

1.2. Получение гидрогелей

Гидрогели могут быть получены как вследствие физических взаимодействий из-за агрегации гидрофобных блоков в водной фазе, так и посредством химических сшивок в результате действия сшивающих агентов, температуры или излучения. Такие материалы могут быть стимул-чувствительными при наличии определенных групп (рН-чувствительные), различных длин блоков (термочувствительные) и т.д.

Основной методикой получения физически сшитых гидрогелей является диспергирование полимера в водной фазе при наличии или отсутствии нагревания. Введение каких-либо низкомолекулярных веществ в гидрогель возможно про-

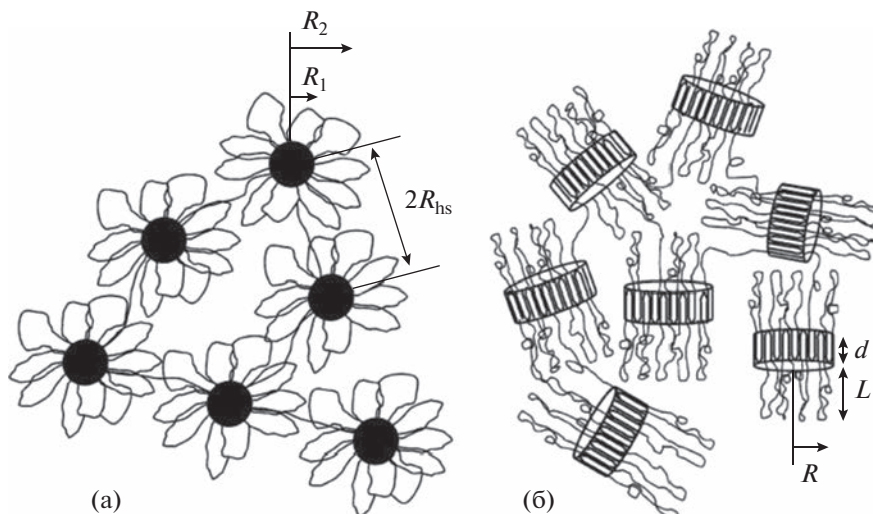


Рис. 3. (а) Цветкоподобные (аморфный гидрофобный блок) и (б) ламеллярные (кристаллический гидрофобный блок) мицеллы, адаптировано с разреза [55].

водить как на стадии самоорганизации надмолекулярной структуры, так и после.

В работе [39] Liu и соавт. получили гидрогель на основе осушенного сополимера ПЭГ-П(Л)ЛА-ПЭГ путем его диспергирования в деионизированной воде при нагревании до 60°C с последующим охлаждением на ледяной бане. Затем в гидрогель импрегнировали два лекарственных препарата (паклитаксел в ПЛА наночастицах и цисплатин). Таким образом был получен термочувствительный гидрогель, золь-гель переходы которого были изучены классическим способом переворачивания пробирки. Похожие методики прослеживаются в ряде исследований [36, 38, 42, 44, 53]. В другой работе сополимеры П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА диспергировали в фосфатном буферном растворе (рН 8.0) и смешивали с раствором циклофосамида в аналогичном буфере [52]. Похожий метод описан также в работе Pertici и соавт. [47].

Принципиально другим подходом к получению гидрогелей является химическое сшивание посредством образования ковалентных связей. В работе [54] Zhao и соавт. использовали 4-лучевые ПЭГ, модифицированные аминогруппой (тетра-ПЭГ-АМ) и сукцинимидилсукцинатом (тетра-ПЭГ-SS). Сшивание было реализовано в три этапа, сначала были проведены по отдельности реакции избытка тетра-ПЭГ-АМ с недостатком тетра-ПЭГ-SS и наоборот. На последней стадии полученные полимеры смешивали, в результате чего происходило образование сильно разветвленной полимерной сети. Такой подход позволяет получать гидрогелевые материалы при достаточно низком содержании полимера. После сшивки гидрогель смешивали с мицеллами

на основе двойных блок-сополимеров ПЭГ-ПЛА, нагруженных лекарственными препаратами (тимололом и латанопростом).

Также существуют научные работы, которые сочетают оба подхода: физическое и химическое сшивание сетки высокомолекулярного соединения. В работе [46] 8-лучевые сополимеры П(Л)ЛА-ПЭГ и П(D)ЛА-ПЭГ были модифицированы акрилатными концевыми группами. На первой стадии смесь сополимеров диспергировали в дистиллированной воде, в результате чего происходило формирование стереокомплексного гидрогеля за счет проходных цепей ПЭГ. На следующем этапе физические гидрогели подвергались сшивке под действием УФ-излучения в присутствии фотоинициатора Ingacure 2959. Для химически сшитых гидрогелей наблюдалось значительное улучшение механических характеристик.

1.3. Структура гидрогелей

Для изучения структуры гидрогелевых материалов наиболее часто применяют методы рентгеновского и нейтронного рассеяния. В работе [55] Agrawal и соавт. изучали процессы самоорганизации ПЛА-ПЭГ-ПЛА в зависимости от длины и кристалличности ПЛА-блока методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) (рис. 3). Тройные блок-сополимеры П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА с аморфным гидрофобным блоком образовывали сферические мицеллы (радиус 10–14 нм, на рис. 3а обозначено R_2) в разбавленных растворах, с увеличением концентрации сополимера наблюдали формирование полимерной сетки за счет проходных цепей. Сополимеры с кристаллическими блоками на основе L-лактида приводили к образованию несферических ламеллярных мицелл

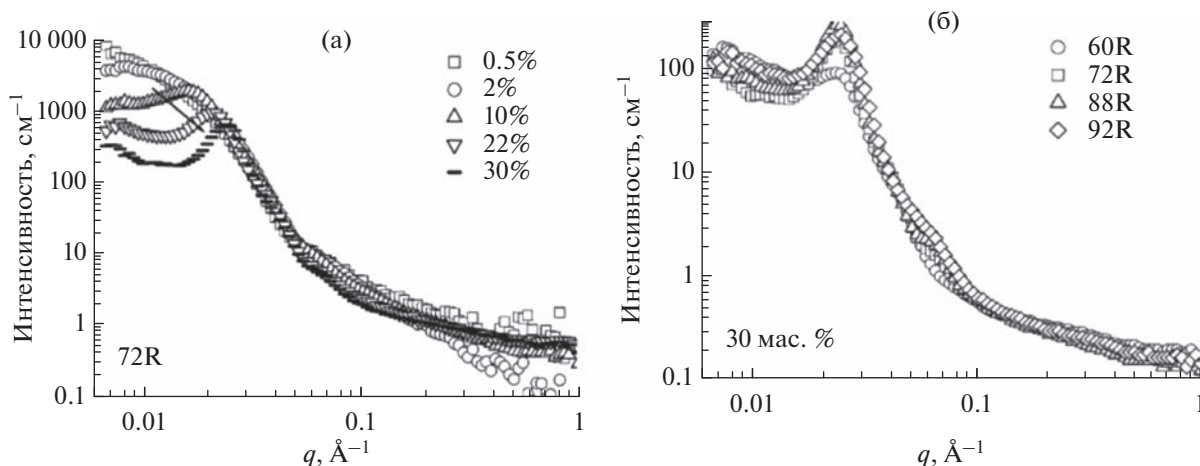


Рис. 4. (а) Изменение спектров МУРН при увеличении концентрации сополимера П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА со степенью полимеризации гидрофобного блока 72 (концентрация сополимера — □, ○, △, ▽); (б) Изменение спектров МУРН с увеличением длины блока ПЛА растворов сополимеров серии П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА с рацемической смесью лактида (длина гидрофобного блока сополимера — □, ○, △, ▽), адаптировано из работы [55].

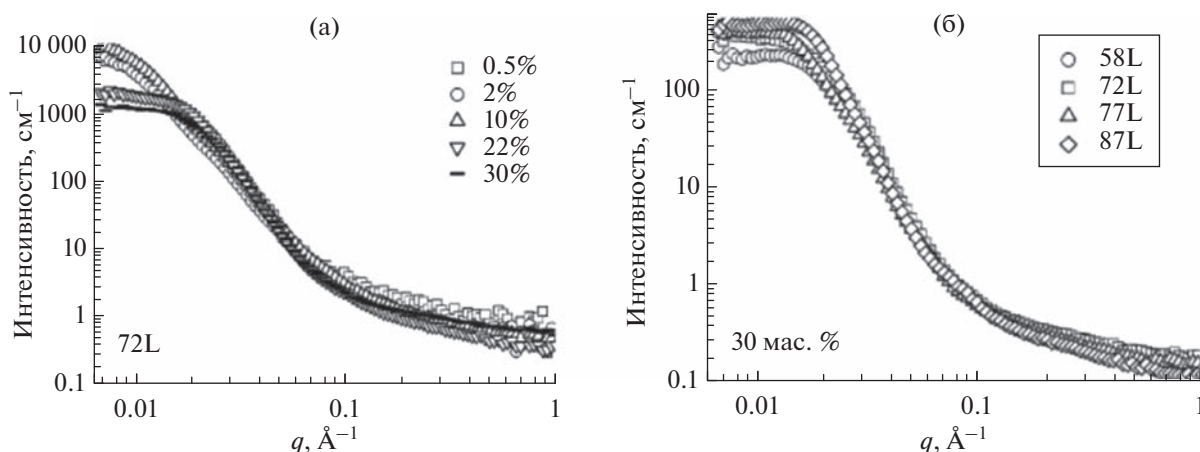


Рис. 5. Спектры МУРН: (а) изменение спектров МУРН при увеличении концентрации сополимера П(L)ЛА-ПЭГ-П(L)ЛА со степенью полимеризации блока 72 (концентрация сополимера — □, ○, △, ▽); (б) изменение спектров МУРН с увеличением длины блока ПЛА растворов сополимеров серии П(L)ЛА-ПЭГ-П(L)ЛА с L-лактоидом (длина гидрофобного блока сополимера — □, ○, △, ▽), адаптировано из работы [55].

(радиус 11–15 нм, на рис. 3б обозначено R ; ширина 8–10 нм, на рис. 3б обозначено d) в разбавленных растворах и формированию сетчатой структуры из беспорядочно ориентированных агрегатов в концентрированных растворах [55].

В случае сополимеров с аморфным гидрофобным блоком при увеличении концентрации мицеллы сближаются и упорядочиваются — при концентрациях выше 10% появляется корреляционный пик, который соответствует расстоянию между рассеивающими центрами в гидрогеле (рис. 4а). При одинаковой концентрации 30% сополимеры с различной длиной гидрофобного блока дают похожие кривые рассеяния, для кото-

рых наблюдается наложение практически во всем диапазоне векторов рассеяния, что свидетельствует о схожей наноструктуре материалов (рис. 4б).

На аналогичных зависимостях для сополимеров с кристаллическим гидрофобным блоком при увеличении концентрации отсутствует корреляционный пик, хотя при концентрациях выше 22% появляется выступ. Его можно рассматривать как широкий пик, связанный с высокой полидисперсностью по размерам ламеллярных мицелл, расстояниям между ними и случайной ориентацией в пространстве (рис. 5а).

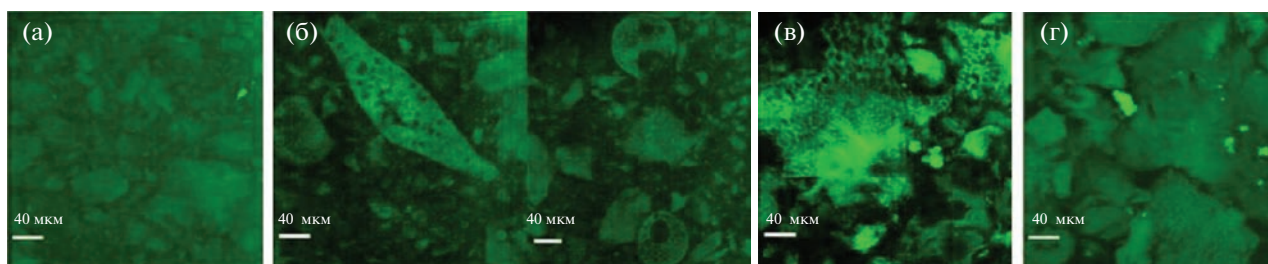


Рис. 6. Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, для гидрогелей с различным L/D соотношением в гидрофобном блоке сополимера ПЛА-ПЭГ-ПЛА: (а) 50/50, (б) 75/25, (в) 95/5, (г) 100/0, адаптировано из работы [53].

Характерный вид кривых не зависит от длины гидрофобного блока: кривые перекрываются во всем диапазоне векторов рассеяния, что свидетельствует об отсутствии взаимосвязи структуры и длины блока (рис. 5б) [55].

Крупномасштабные структуры с различной морфологией были обнаружены методами ультрамалоуглового рассеяния нейтронов и МУРН и подтверждены конфокальной микроскопией в работе Yin и соавт. (рис. 6) [53].

Yin и соавт. изучали серию блок-сополимеров $P(D,L)LA-P\acute{E}G-P(D,L)LA$ с различным соотношением L/D от 50/50 до 100/0. В области малоуглового рассеяния наблюдали корреляционные пики, свидетельствующие об упорядочивании мицелл, по положению максимумов которых могут быть рассчитаны радиус мицелл, расстояние между ними и т.д. Для соотношения 50/50 обнаружена однородная структура, в остальных случаях – сложные наномасштабные структуры: пористые эллипсоиды и сфероиды с темными областями, похожими на заполненные водой поры и каналы (рис. 6).

В другой работе Yin и соавт. гидрогели на основе блок-сополимеров $P(D,L)LA-P\acute{E}G-P(D,L)LA$ с различным соотношением L/D были изучены методом широкоуглового рентгеновского рассеяния [43]. Было показано, что области ПЭГ в водном растворе стали аморфными, то есть характерные пики кристаллического ПЭГ (пик при $q = 1.36 \text{ \AA}^{-1}$ и перекрывающиеся пики при $q = 1.65\text{--}1.66 \text{ \AA}^{-1}$) не наблюдаются ни в одном из гелей. Кроме того, ни один из гелей не демонстрирует признаков стереокомплексобразования. Для образцов с соотношением 95/5 и 90/10 наблюдается пик от кристаллитов $P(L)LA$, которого нет на других кривых. С увеличением вклада L-изомера возрастает степень кристалличности системы.

В работе Mao и соавт. были исследованы стереокомплексные гидрогели, полученные путем смешения водных систем стереоизомерных двойных и тройных блок-сополимеров [56]. На кривых рентгеновского рассеяния в широких углах

наблюдаются рефлексы от кристаллитов ПЛА при 11.9° , 13.5° , 15.4° , 18.0° (обозначены $h\kappa$), пики ПЭГ отсутствуют, что указывает на гомокристаллическую природу ПЛА-доменов. Пики при 9.7° , 16.7° , 19.3° (обозначены sc) соответствуют стереокомплексным кристаллитам (рис. 7а).

Наноструктура гидрогелей была изучена методом малоуглового рентгеновского рассеяния. На некоторых кривых наблюдается пик рассеяния, связанный с расстоянием между агрегатами. Ширина пика указывает на высокую полидисперсность расстояний между узлами в энантиомерных гидрогелях (рис. 7б). С увеличением длины блока ПЭГ и вклада L-изомера происходит увеличение расстояния между рассеивающими центрами. На основании данных о наноструктуре и фазовых диаграммах золь–гель перехода, Mao и соавт. предложили механизм гелеобразования стереокомплексных гидрогелей (рис. 8).

Двойные блок-сополимеры ПЛА-ПЭГ образуют “звездоподобные” мицеллы, тройные ПЛА-ПЭГ-ПЛА – “цветкоподобные”, смеси таких систем с различными конфигурациями гидрофобного блока дают мицеллы со стереокомплексными ядрами (рис. 8а), а блок ПЛА может входить как в одну и ту же мицеллу, так и в две соседние. Однако на гелеобразование будет оказывать влияние не только формирование стереокомплексов, но и длина гидрофильного блока, а также массовое соотношение двойных и тройных блок-сополимеров. В случае короткого гидрофильного блока, размером меньше расстояния между ядрами мицелл, гелеобразования не происходит, т.к. оба блока ПЛА входят в одну мицеллу. При увеличении длины ПЭГ блоки ПЛА могут входить уже в соседние мицеллы с формированием мостиковой структуры, т.е. ПЛА-ПЭГ-ПЛА являются соединительными цепями между “звездоподобными” мицеллами ПЛА-ПЭГ, вследствие чего образуется физическая сетка гидрогеля. При дальнейшем увеличении длины блока ПЭГ наблюдается образование рыхлых слабо сшитых гидрогелей вследствие большого содержания гидрофильной компоненты. Массовый состав энантиомерной смеси

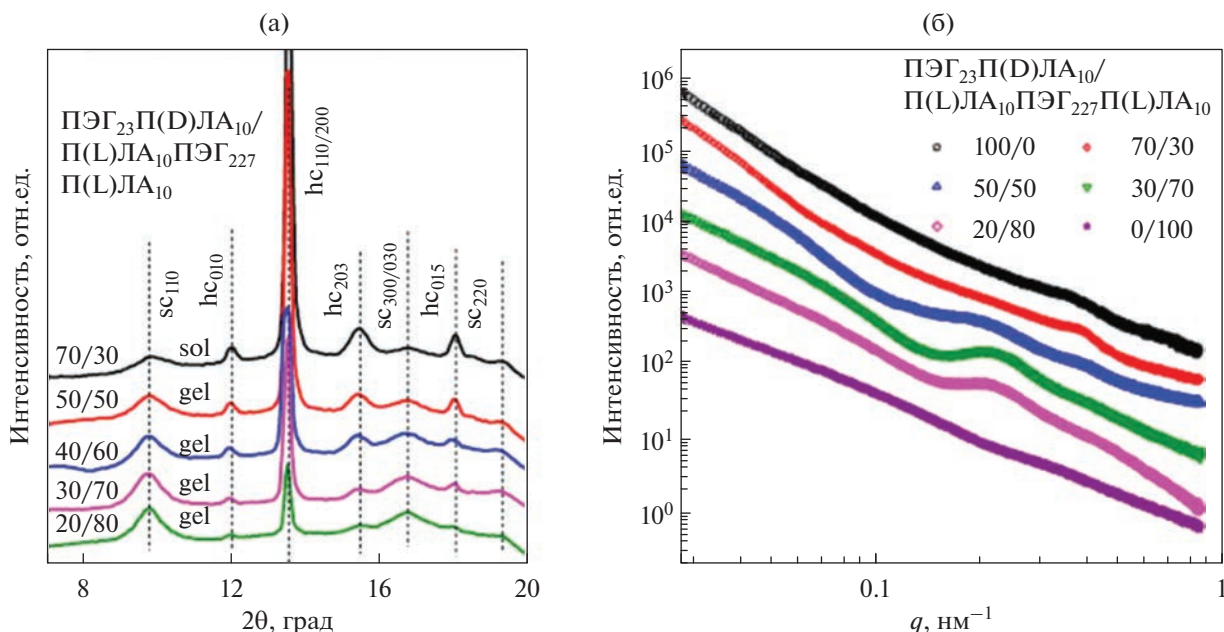


Рис. 7. (а) Широкоугольное рентгеновское рассеяние для стереокомплексных гидрогелей на основе сополимера ПЛА-ПЭГ-ПЛА; (б) малоугловое рентгеновское рассеяние для стереокомплексных гидрогелей на основе сополимера ПЛА-ПЭГ-ПЛА, адаптировано из работы [56].

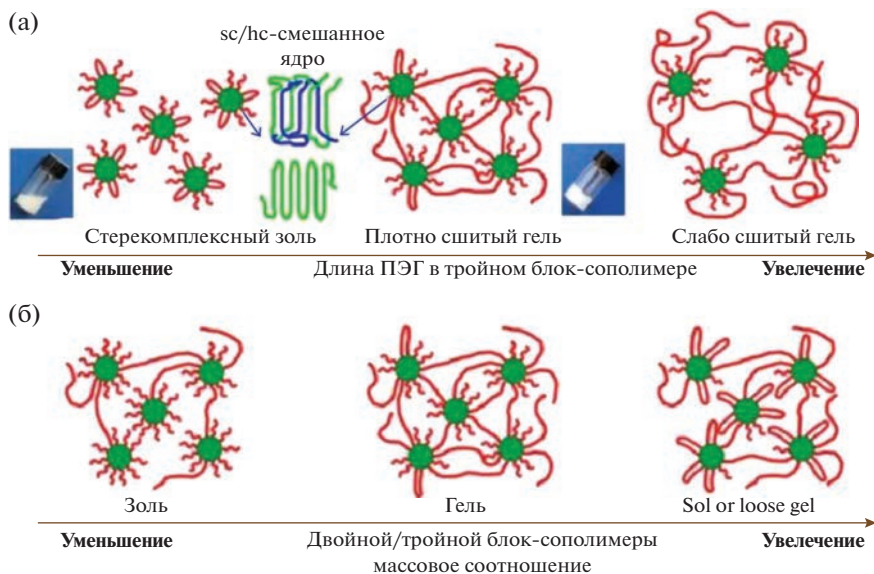


Рис. 8. Механизм гелеобразования, адаптировано из работы [56].

также влияет на образование мостиковой структуры. При содержании ПЛА-ПЭГ-ПЛА менее 40–50 мас. % проходных цепей недостаточно для формирования гидрогеля (рис. 8б). Когда фракция тройного блок-сополимера превышает 80 мас. % в энантиомерной смеси преимущественно обнаруживаются “цветкоподобные” мицеллы. Из-за высокого содержания ПЭГ образование про-

ходных цепей недостаточно для формирования гидрогеля. Наиболее благоприятным содержанием ПЛА-ПЭГ-ПЛА в смеси является 50–80 мас. % [56].

1.4. Механические свойства гидрогелей

Физико-механические свойства гидрогелей являются критически важной характеристикой,

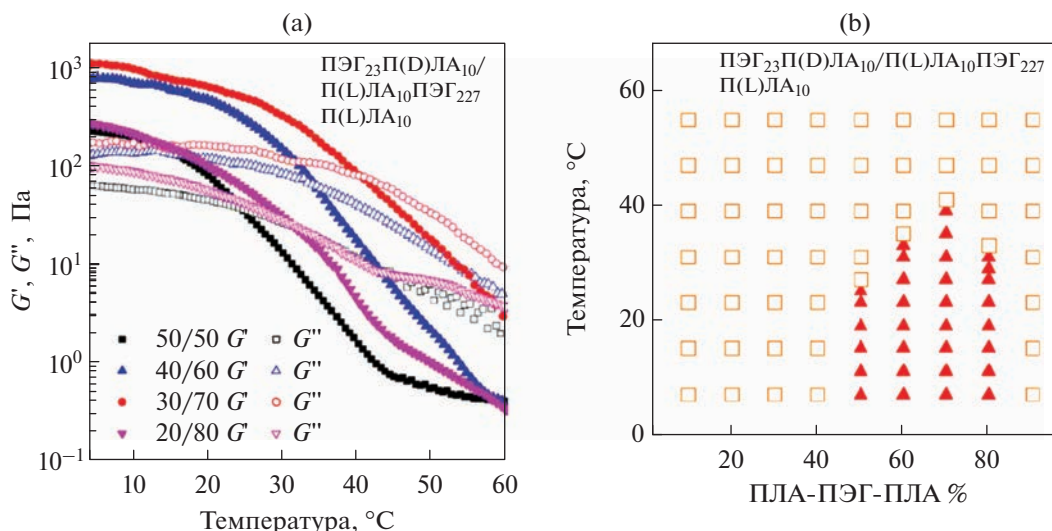


Рис. 9. (а) Зависимость модулей накоплений (G' -закрашенные) и потерь (G'' -пустые) от температуры (частота 1 Гц) для стереокомплексной смеси П(Д)ЛА-ПЭГ/П(Л)ЛА-ПЭГ-П(Л)ЛА; (б) фазовая диаграмма золь-гель перехода для стереокомплексного гидрогеля на основе стереокомплексной смеси П(Д)ЛА-ПЭГ/П(Л)ЛА-ПЭГ-П(Л)ЛА (золь — пустые, гель — закрашенные), адаптировано из работы [56].

определяющей спектр их возможных применений. Основным недостатком гидрогелевых систем на основе блок-сополимеров ПЛА-ПЭГ является их невысокий уровень механических характеристик: модуль накоплений таких материалов, как правило, по результатам реологических исследований от температуры или частоты осцилляций не превышает 1 кПа [39, 42, 52, 54, 56, 57].

В работе [56] Мао с соавт. изучали механические свойства термочувствительных стереокомплексных гидрогелей — системы на основе смесей

стереоизомерных двойных и тройных блок-сополимеров. Видно, что при низких температурах различные составы демонстрируют упруговязкие свойства, золь-гель переход к вязкоупругой жидкости происходит при температурах от 25 до 40 °C (рис. 9а). На начальном участке модуль накоплений (G') превалирует над модулем потерь (G''), что говорит об образовании физически сшитого гидрогеля. Максимальный модуль накоплений порядка 1 кПа наблюдается для состава D/L 30/70 при температурах до 15 °C (рис. 9б).

В работе [43] изучали реологию гидрогелей на основе П(Д,Л)ЛА-ПЭГ-П(Д,Л)ЛА с различным соотношением стереоизомеров L/D. Наблюдается слабая зависимость модуля накоплений (G') от частоты осцилляций, значения G' варьировались от 1 до 10 кПа в зависимости от соотношения, что является достаточно высоким для таких систем по данным литературы.

В другом исследовании изучены механические свойства гидрогелей на основе П(Л)ЛА-ПЭГ-П(Л)ЛА с различной длиной гидрофобного блока [58]. Были проведены испытания на одноосное сжатие, по полученным кривым напряжения от деформации установлены значения модуля упругости для исследуемых образцов. Следует отметить, что в большинстве научных трудов подобные материалы демонстрируют вязкое поведение и только в реологических испытаниях при высоких частотах наблюдается преобладание модуля накоплений (G') над модулем потерь (G'') [39, 42, 52, 54, 56, 57]. В данной работе [58] материалы обладают упругостью без внешнего осцилляционного воздействия, могут быть исследованы на

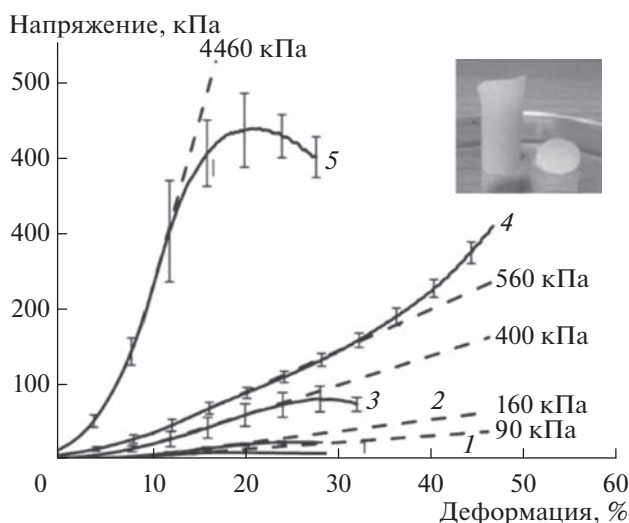


Рис. 10. Зависимость напряжения при сжатии от деформации для гидрогелей на основе сополимеров состава: L₃₈P₁₃₆L₃₈ (1); L₆₅P₁₃₆L₆₅ (2); L₉₅P₁₃₆L₉₅ (3); L₁₆₉P₁₃₆L₁₆₉ (4); L₃₆₁P₁₃₆L₃₆₁ (5) [58].

сжатие и дают рекордные значения модулей упругости для подобных систем (рис. 10). Такой результат можно объяснить длинами блоков сополимера и кристалличностью гидрофобного блока, вследствие чего происходит формирование более крупных и прочных агрегатов в физической сетке гидрогеля, что существенно повышает уровень механических характеристик.

Физически сшитые гидрогели в большинстве научных трудов обладают слабыми механическими характеристиками, однако при наличии химических сшивок можно улучшить эти свойства. В работе Buwaldac и соавт. звездообразные ПЭГ-П(D)ЛА и ПЭГ-П(L)ЛА модифицировали акрилатами и после сшивали под действием УФ-излучения [46]. Первоначально образованный физически сшитый гидрогель при концентрациях сополимера до 10 мас. % демонстрировал модуль накоплений не более 1–2 кПа, а от 10 до 20 мас. % модуль изменялся от 10 до 27 кПа. В случае химически сшитого материала даже при концентрациях менее 10 мас. % модуль накоплений был уже порядка 10 кПа, после 10 мас. % варьировался от 22 до 30 кПа.

1.5. Применение гидрогелей

Гидрогели на основе различных высокомолекулярных соединений — это коммерчески доступные материалы с широким спектром применений [1–10]. Однако помимо прочего такие изделия на основе биосовместимых и биоразлагаемых полимеров могут быть перспективными для использования в различных областях биомедицины в качестве средств доставки лекарственных препаратов, тканеинженерных конструкций и т.д. В настоящий момент активно ведутся исследования по расширению спектра их возможных применений. Одной из таких актуальных областей являются разработки по использованию материалов в терапии онкологических заболеваний [36, 38, 39, 52, 57, 59]. Применение цитотоксических противораковых препаратов имеет ряд недостатков, самый значительный из которых — неизбирательность, т.е. помимо опухолевых клеток, как правило, страдают здоровые органы и ткани. В связи с чем целевая доставка лекарства непосредственно в опухоль является решением данной проблемы.

В работе Darge с соавт. создали термочувствительный инъекционный гидрогель на основе П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА и успешно импрегнировали в него два противораковых препарата бевацизумаб и доксорубицин (DOX) [36]. Исследования *in vitro* показали низкую цитотоксичность самого гидрогеля. В экспериментах *in vivo* уже после однократного введения инъекции наблюдалось эффективное подавление опухоли без заметных повреждений жизненно важных органов.

В работе Liu с соавт. создали композитный термочувствительный гидрогель на основе ПЭГ-П(D,L)ЛА-ПЭГ для терапии меланомы [39]. В гидрогель загружали пористые ПЛА частицы с паклитаксолом и цисплатин. Исследования *in vitro* показали, что полученный материал способен инициировать апоптоз опухолевых клеток и ингибировать их миграцию. *In vivo* на мышках-носителях меланомы был протестирован гидрогелевый композит. Установлено, что высвобождение лекарственных препаратов значительно ингибировало рост опухоли, не оказывая цитотоксического эффекта на здоровые органы и ткани.

В другой работе Yang с соавт. предложили комбинированную стратегию иммунотерапии рака [52]. Первоначально термочувствительный гидрогель на основе П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА загружали циклофосфамидом и вводили мышам, а через несколько дней делали еще одну инъекцию гидрогеля, содержащую цитозин-фосфат-гуаниновые нуклеотиды и лизаты опухолевых клеток для дальнейшего стимулирования противоопухолевых иммунных реакций. Такой подход успешно снижает токсический эффект от циклофосфамида на здоровые органы и ткани, при этом эффективно подавляет рост опухоли.

Среди других перспективных применений стоит отметить работу Zhao с соавт., где авторы предложили гидрогелевый глазной имплантат для терапии глаукомы — заболевания, характеризующегося повышенным внутриглазным давлением [54]. Был получен химически сшитый гидрогель на основе 4-лучевых ПЭГ с сильно разветвленной сетью, после чего его смешивали с мицеллами ПЭГ-ПЛА, в которые импрегнировали латанопрост и тимолол (рис. 11). Имплантат фиксируется в слезном протоке. Исследования *in vitro* показали увеличение действия препарата до 28 дней. Тесты на кроликах *in vivo* продемонстрировали эффект снижения внутриглазного давления в течение более чем 28 дней. Гистологические срезы и исследования по раздражающему действию имплантата на глаза показали достаточную безопасность материала.

Yang с соавт. предложили использовать гидрогелевый материал на основе двойного блок-сополимера в качестве временного эмболизирующего средства [37]. Термочувствительный инъекционный гидрогель нагружали рентгеноконтрастным веществом иодопамином для возможности проведения интраоперационной рентгеновской визуализации. Также авторы считают, что гидрогель может быть использован как предоперационное эмболизирующее средство для удаления опухоли.

Pertici с соавт. применяли гидрогель на основе тройного блок-сополимера П(D,L)ЛА-ПЭГ-П(D,L)ЛА, модифицированного PNIPAAm, в качестве носителя лекарственных средств от нейро-



Рис. 11. Стадии разработки глазного имплантата на основе 4-лучевых ПЭГ, смешанного с мицеллами ПЭГ-ПЛА, адаптировано из работы [54].

дегенеративных патологий (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, пароксизмальные дискинезии и т.д.) [47]. В гидрогель импрегнировали рилузол — нейропротекторное средство для лечения ишемии головного мозга и краситель цианин 5.5 для визуализации, и вводили в крыс. Была показана возможность инъекционного введения такого материала.

Grosjean с соавт. рассматривали в качестве тканевых клеев для лечения ран гидрогели на основе звездообразных ПЭГ-П(D,L)ЛА, функционализированные акрилатами, метакрилатами и пирокатехином [51]. Такой подход к закрытию ран имеет ряд преимуществ по сравнению с классическим наложением швов, т.к. сводится к минимуму повреждения тканей. В настоящее время наиболее часто применяются фибриновые и цианакрилатные биоадгезивы, однако они обладают некоторыми существенными недостатками: несмотря на высокие показатели адгезии, присутствует риск аллергических реакций, материалы могут быть токсичны, не разлагаемы. На модельных тканях было установлено, что производные акрилата и метакрилата достигают адгезионной прочности, близкой к таковой у цианакрилатных биоадгезивов (332 кПа), в свою очередь производные пирокатехина превосходят фибриновый клей (11 и 19 кПа). Низкий уровень цитотоксичности данных материалов подтверждает возможность их применения в качестве тканевых клеев.

Таким образом, гидрогели на основе сополимеров лактида и этиленгликоля обладают широким спектром перспективных применений благодаря своей биосовместимости и биоразлагаемости.

Согласно проведенному анализу, гидрогели на основе сополимеров лактида и этиленгликоля обладают наиболее высокими модулями упругости и при повышении температуры, как правило, претерпевают “гель—золь” переход.

2. ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ПОЛИ(ЛАКТИД-СО-ГЛИКОЛИДА)

В отличие от рассмотренных выше сополимеров лактида и этиленгликоля, существенно большее количество работ посвящено исследованию температурно-индуцированного гелеобразования в растворах сополимеров на основе ПЭГ и поли(лактида-со-гликолида) (ПЛГА). При этом, как будет показано далее, особенности синтеза таких сополимеров определяют изменение механизма гелеобразования и фазового поведения относительно близких по химической структуре ПЭГ-ПЛА.

Материалы на основе сополимеров ПЭГ и ПЛГА являются широко используемыми в различных областях медицины [60–62]. Данные соединения являются примером биоразлагаемых термочувствительных материалов, которые в водной среде за счет амфифильной природы способны образовывать мицеллярные агрегаты, а также гидрогели при изменении температуры. Благодаря различной природе молекул, входящих в состав ядра и оболочки, мицеллы и гидрогели могут включать как гидрофобные, так и гидрофильные лекарственные средства и обеспечивать их пролонгированное высвобождение.

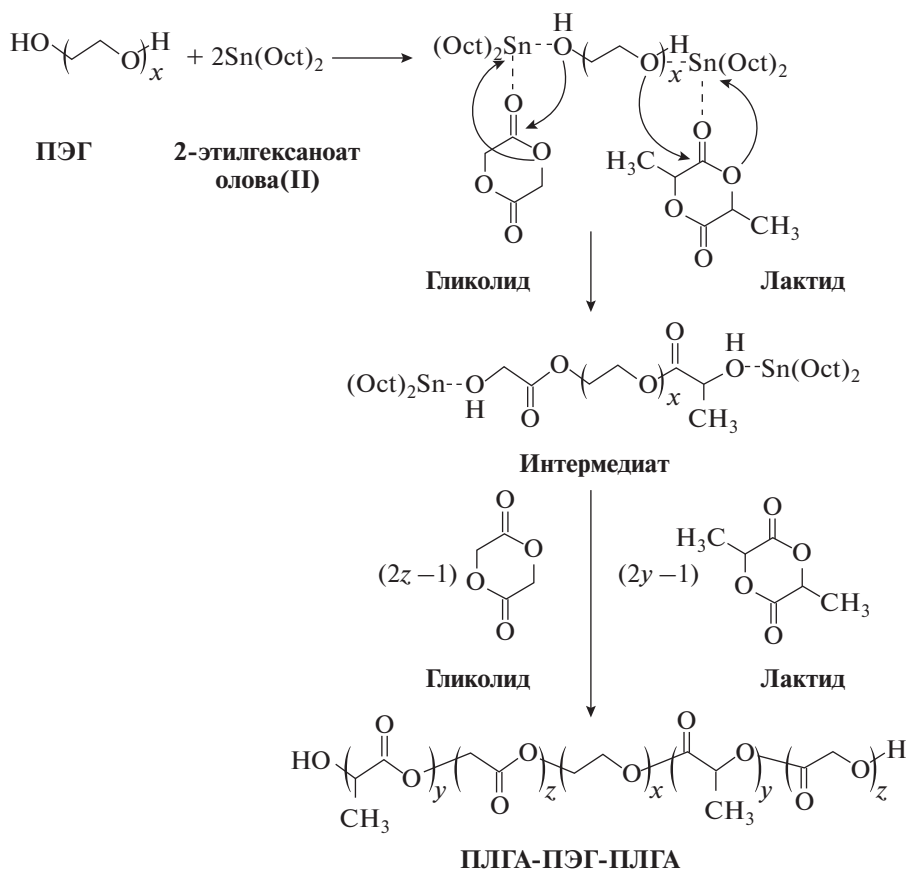


Рис. 12. Схема синтеза тройных блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, адаптировано из работы [60].

2.1. Синтез блок-сополимеров

В целом, синтез сополимеров ПЭГ-ПЛГА неидентичен синтезу ПЭГ-ПЛА. Однако ввиду наличия гликолида, отличающегося по своей реакционной способности от лактида, достижение высоких молекулярных масс полиэфирных блоков затруднено. Вследствие этого усилия исследователей сосредоточены на реакциях с применением $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ в качестве катализатора. Также не известны работы по получению разветвленных и звездообразных полиэфирных блоков.

Широко используемым способом получения блок-сополимеров является полимеризация с раскрытием цикла с использованием катализатора $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ и макроинициатором ПЭГ (или метил-ПЭГ (мПЭГ)) (рис. 12) [20–22, 60–64].

Синтез сополимеров проводится как в растворе, так и в расплаве. На первом этапе ПЭГ осушают в расплаве под вакуумом. Далее перемещают ПЭГ в реакционный сосуд и добавляют заданные количества L- (или D-лактида (L-ЛА или D-ЛА) гликолида (ГА) и $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ и проводят реакцию полимеризации при перемешивании при 120–

160°C в течение определенного времени. Варьируя количества ПЭГ, ГА и L-ЛА (или D-ЛА), регулируют длину цепи и соотношение блоков [20–22, 60–66]. Очищают полученный сополимер переосаждением в этилацетат или *n*-гексан, затем сушат под вакуумом при комнатной температуре [65]. Структурный анализ сополимеров имеет решающее значение как с теоретической, так и с промышленной точки зрения. При изучении сополимеров используют метод ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), который предоставляет информацию о структуре и последовательности звеньев.

В работе [67] структурный анализ и оценку молекулярной массы сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА проводили с применением ^1H -ЯМР-спектроскопии. Сигналы для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА находятся для CH (ЛА) на 5.1 ppm, CH_3 (ЛА) на 1.45 ppm, CH_2 (ГА) на 4.7 ppm, на 3.52 и 4.2 ppm – CH_2 (этиленоксида). Аналогичным образом авторы [68] устанавливают структуру сополимеров, определяя соотношение ЛА/ГА звеньев и среднечисловую молекулярную массу (M_n) сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА. Сигналы основных групп со-

Таблица 1. Молекулярные массы, синтезированных сополимеров, адаптировано из работы [21]

Блок-сополимер	M_n ПЭГ	M_n сополимера	Соотношение ЛА/ГА (моль/моль)	Соотношение ПЛГА/ПЭГ (мас. %/мас. %)
ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА	1000	3420	2.4/1	2.4/1
ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА	1500	5240	2.5/1	2.5/1
ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА	2000	6980	2.4/1	2.5/1
мПЭГ-ПЛГА	750	2630	2.5/1	2.5/1

полимера соотносятся с данными из работы [67]. Соотношения мономеров, которые использовали в процессе полимеризации, соответствовали соотношению ЛА к ГА в сополимере, рассчитанные с помощью ^1H -ЯМР [68].

Тройные блок-сополимеры мПЭГ-ПЛГА-мПЭГ [69], привитые сополимеры ПЭГ-*g*-ПЛГА/ПЛГА-*g*-ПЭГ [70, 71] и звездообразные сополимеры ПЭГ с ПЛГА [72] получают полимеризацией соответствующих мономеров с раскрытием цикла вместе с реакциями прививки.

2.2. Получение гидрогелей

Сополимеры ПЛГА-ПЭГ способны набухать в водной среде с образованием золя при низких температурах и переходить в гель при нагревании [21]. Для того чтобы сополимеры с разной структурой на основе ПЭГ-ПЛГА проявляли температурно-индуцированный фазовый переход в воде, необходимо соблюдать определенное соотношение между гидрофильным и гидрофобным блоками [73]. В работах [21, 64] подробно изучен процесс гелеобразования систем на основе сополимеров ПЭГ-ПЛГА. Были синтезированы тройные блок-сополимеры ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА и двойные блок-сополимеры мПЭГ-ПЛГА с различными молекулярными массами (табл. 1) [21]. Растворы амфифильных блок-

сополимеров были получены путем их растворения в воде при низких температурах, которые при нагревании оказались способны переходить в гель, дальнейшее повышение температуры приводило к образованию золя, а затем к коллапсу сополимеров и образованию осадка.

Авторами был предложен механизм гелеобразования: самособирающаяся структура термогелеобразуемого сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА в воде при низких температурах представляет собой мицеллы сферической формы. В водном растворе гидрофобные блоки ПЛГА в сополимере образуют ядро мицеллы за счет гидрофобных взаимодействий, а гидратированные блоки ПЭГ – гидрофильную оболочку. При этом возможно образование мостиковых структур между мицеллами, приводящее к образованию микрогелей. При повышении температуры термочувствительный ПЭГ теряет растворимость, и нарушается гидрофильная оболочка. Из-за изменения гидрофильно-гидрофобного баланса возникает нестабильное состояние, и мицеллы агрегируют, в результате чего образуется структура в виде связанных гидрофобных каналов ПЛА (рис. 13) [74]. Гидрогели на основе сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА обладают двумя состояниями гидрогелей, называемые гель-1 и гель-2. В первом случае возникают гидрофильные мостики, то есть образуются проходные цепи из ПЭГ между мицеллами, во втором случае формируются гидрофобные каналы за счет слияния ядер мицелл [22, 63]. В то же время отмечается, что гидрогели на основе двойных блок-сополимеров ПЭГ-ПЛГА и обратных тройных блок-сополимеров ПЭГ-ПЛГА-ПЭГ имеют только одно состояние геля, где точками сшивания является гидрофобные каналы [21].

Такой золь–гель–золь переход характерен для всех сополимеров строения ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА [21, 22, 63–65, 75–79]. На фазовых диаграммах (рис. 14), полученных методом переворачивания виалов, представлены границы фазовых переходов золь–гель, где видно, что при увеличении концентрации сополимера в воде температура перехода золь–гель уменьшается, а температура перехода гель–золь, напротив, увеличивается.

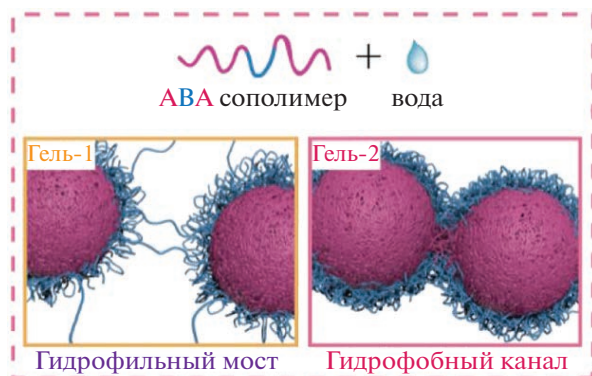


Рис. 13. Точки сшивания гидрогелей ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА для состояний гель-1 и гель-2, адаптировано из работы [21].

Также было обнаружено, что с увеличением молекулярной массы тройных блок-сополимеров окно, где система переходит в гель, перемещается в область более высоких температур, в то время как основной вид диаграммы остается прежним [21, 64, 75–79]. В работе [77] изучили влияние соотношения ПЭГ-ПЛГА на золь-гель переход. В результате было получено и проанализировано 15 тройных блок-сополимеров с различной молекулярной массой и соотношением ПЭГ/ПЛГА. Сополимеры с соотношением ПЭГ/ПЛГА от 0.4 до 1 либо полностью, либо частично гидратируются, что приводит к возможности образования гидрогелей при повышении температуры. При этом, по данным исследования, верхняя граница молекулярной массы, при которой возможно температурно-индуцированное гелеобразование, достигает по меньшей мере 8 кДа. Так, например, дисперсии на основе сополимеров с M_n 5 кДа и 5.9 кДа, соответственно, и соотношением ПЭГ/ПЛГА 0.43 и 0.51, проявляли термогелирующие свойства, подтверждая ограниченный диапазон значений M_w и соотношения ПЭГ/ПЛГА, в котором могут образовываться термогелирующие системы в водных растворах, независимо от концентрации [77]. Также было показано [80], что увеличение гидрофобного блока ПЛГА приводит к снижению температуры гелеобразования, поскольку системе требуется меньше энергии для разрыва водородных связей между гидрофильными сегментами ПЭГ посредством гидрофобных взаимодействий ПЛГА-ПЛГА.

На золь-гель переход также оказывает влияние соотношение ЛА : ГА [78] в составе сополимера: снижение температуры фазового перехода из золя в гель и повышение температуры выпадения осадка происходит при увеличении молярного соотношения ЛА : ГА с 3 : 1 до 7 : 1 (рис. 15а). Такое поведение связано с увеличением концентрации мицелл. При этом рост содержания ПЭГ с 20 до 40% увеличивает температуру золь-гель перехода и снижает температуру выпадения осадка (рис. 15б) [78].

Гелеобразование систем на основе ПЭГ-ПЛГА изучают методами реологии, исследуя зависимость модуля накоплений (G') и модуля потерь (G'') от температуры [22, 62, 64, 65, 77, 80–82]. В работе [81] авторы изучили влияние лекарственного средства – имихимода (R837) и/или карбоната и хлорида кальция на температурно-индуцированное гелеобразование. Показано, что инкапсуляция лекарственного средства не помещала процессу гелеобразования, с повышением температуры значения модуля накоплений G' начинали превалировать над значениями модуля потерь G'' , что указывает на физическое гелеобразование при нагревании [81]. Авторы [65] комплексно охарактеризовали реологические свой-

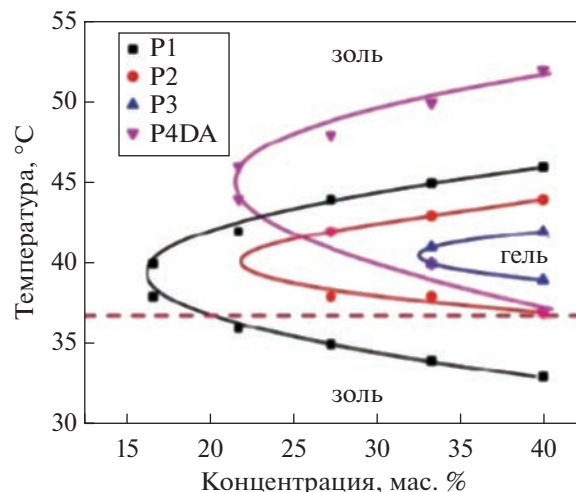


Рис. 14. Типичная фазовая диаграмма перехода золь-гель водного раствора тройных блок-сополимеров на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, адаптировано из работы [65].

ства гидрогелей ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с модифицированными акриловой кислотой концевыми группами для УФ-сшивки. Гидрогели получали путем смешения тройных блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с модифицированными акрилоильными группами аналогичными сополимерами. На первом этапе проводили температурные испытания образцов гидрогелей, полученных на основе не модифицированных сополимеров, а далее полученные зависимости сравнивали с сополимерами с концевыми акрилоильными группами (рис. 16). В обоих случаях значения модулей накоплений и потерь заметно увеличиваются после 30°C, при этом наблюдается точка пересечения графиков изменения модулей G' и G'' , что свидетельствует о гелеобразовании. Дальнейшее увеличение температуры приводит к снижению значений модулей и появлению второй точки пересечения. Таким образом, при увеличении температуры в системе наблюдаются два перехода: золь-гель и гель-золь. Такая зависимость модулей от температуры является типичной для водных растворов сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, способных к температурно-индуцированному гелеобразованию [21, 62, 65, 66, 76, 79, 81].

2.3. Структура и механические свойства гидрогелей

Практически для любого медицинского применения материалов на основе ПЛГА-ПЭГ важными характеристиками являются данные об их структуре и механических свойствах. В работе [65] были получены результаты реологических испытаний гидрогелей в зависимости от изменения угловой частоты. Частотные тесты и тиксотропные

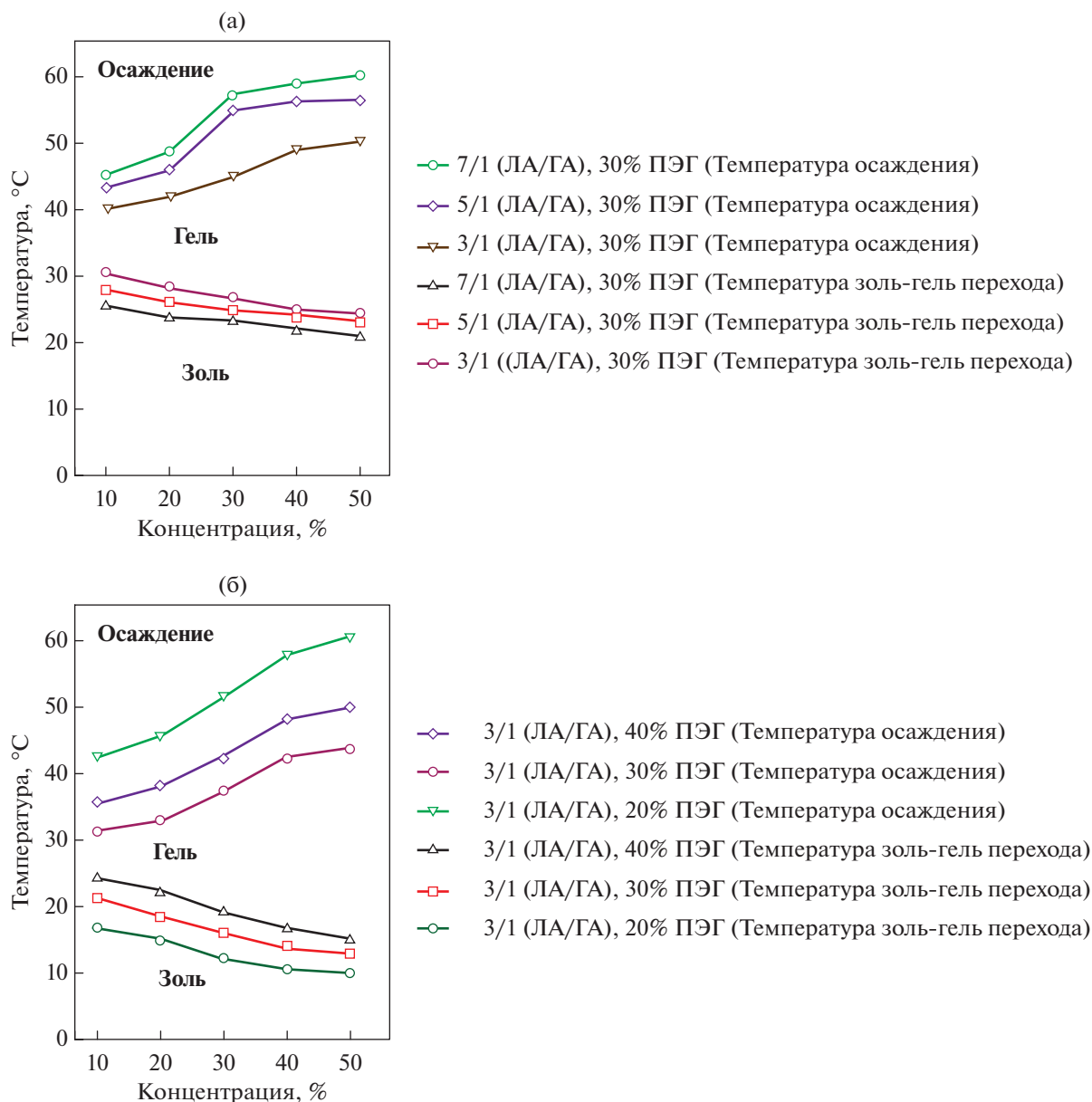


Рис. 15. Фазовые диаграммы ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА. (а) Влияние мольного соотношения лактид/ГА; (б) Влияние содержания ПЭГ [78].

испытания проводили на гидрогелях, полученных смешением сополимеров с модифицированными и не модифицированными концевыми группами. Результаты показали, что механические и другие свойства гидрогелей можно легко регулировать, варьируя долю модифицированного полимера без ущерба для их переработки.

Были получены кривые течения — все образцы демонстрируют линейное снижение вязкости с увеличением скорости сдвига, что указывает на их истончение при сдвиге. А также изучена возможность восстановления структуры после прикладывания напряжения: при низкой деформации 1%

G' был выше, чем G'' , что свидетельствует об упругом состоянии гидрогелей, тогда как резкое падение модуля наблюдалось в случае высокой деформации 100%. После снятия приложенного напряжения G' гидрогелей мгновенно восстанавливается до исходных значений. Степень восстановления гидрогелей не изменяется как минимум после пяти циклов (рис. 17). Данный тест проводили так: на первом и третьем этапах в течение 100 с скорость сдвига была равной 0.1 с^{-1} , на втором этапе в течение 5 с скорость сдвига составляла 100 с^{-1} [65].

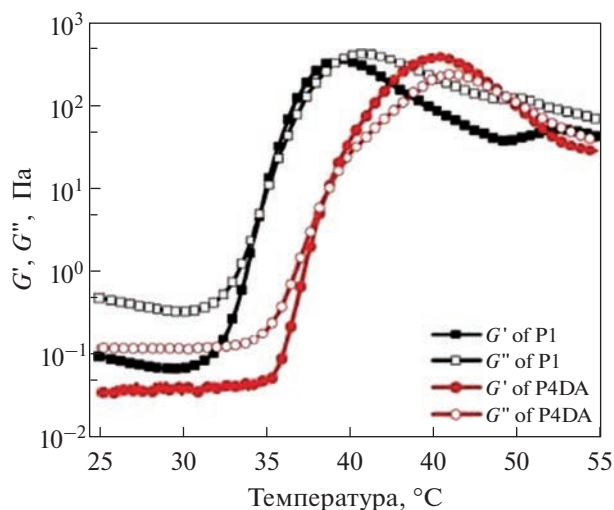


Рис. 16. График зависимости модуля накоплений (G') и модуля потерь (G'') от температуры для водных растворов на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА (частота 1 Гц), адаптировано из работы [65].

Реологический анализ был использован для паст на основе трикальцийфосфата (ТКФ) с добавкой термочувствительного биоразлагаемого сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА [82]. Используемые в работе пасты застывают в течение 40 с после смешения жидкой и порошковой фаз. Добавление сополимера позволяет увеличить модуль накоплений и когезию материалов в первые секунды для возможности инъектировать материалы. Были изучены три системы: сополимер, паста α -ТКФ, смешанная с водой, и паста α -ТКФ с сополимером. Раствор сополимера демонстрирует асимптотическое увеличение напряжения сдвига и экспоненциальное снижение вязкости со скоростью сдвига. После снижения скорости сдвига наблюдается быстрое восстановление вязкого состояния (небольшая петля гистерезиса), что свидетельствует о псевдопластическом, а не тиксотропном реологическом поведении для сополимера. Для пасты α гТКФ, смешанной с водой и сополимером, петля гистерезиса имеет самый большой размер при разных порядках величины как напряжения сдвига, так и вязкости, что говорит о высокой степени тиксотропии (рис. 18). Материал с α -ТКФ, смешанный с сополимером, демонстрировал уменьшение напряжения сдвига с увеличением скорости сдвига после достижения максимальной точки, как и паста α -ТКФ/вода, но при этом сохранял большее значение при максимальной скорости сдвига и частичным восстановлением вязкости. Как было показано, использование сополимера в качестве добавки представляет интерес, поскольку обеспечивает улучшенные псевдопластические свойства пасты на основе α -ТКФ и увеличивает ее вязкость за счет гелеобразования. Пасты поддерживают высокое напряжение сдвига при увеличении скорости сдвига, таким образом предотвращая разделение фаз во время введения [82].

Морфологию системы на основе тройных блок-сополимеров оценивали на примере растворов с концентрацией 1% при помощи просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) при различных температурах [21]. Подобранная концентрация ниже критической концентрации гелеобразования, но наблюдаемые типы морфологии все же могут в некоторой степени отражать эволюцию структуры материалов во время золь-гель перехода в концентрированной системе. Бы-

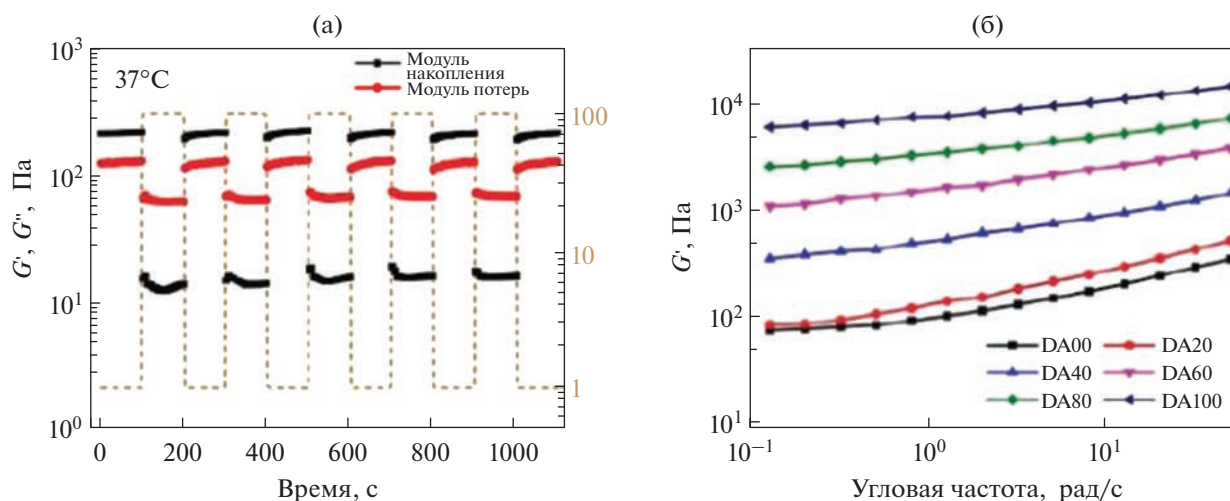


Рис. 17. Тиксотропный тест гидрогелей на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА. (а) Модуль накоплений (G' – черный) и модуль потерь (G'' – красный) гидрогеля как функция времени. (б) Частотный тест. Модуль накоплений как функция угловой частоты, адаптировано из работы [65].

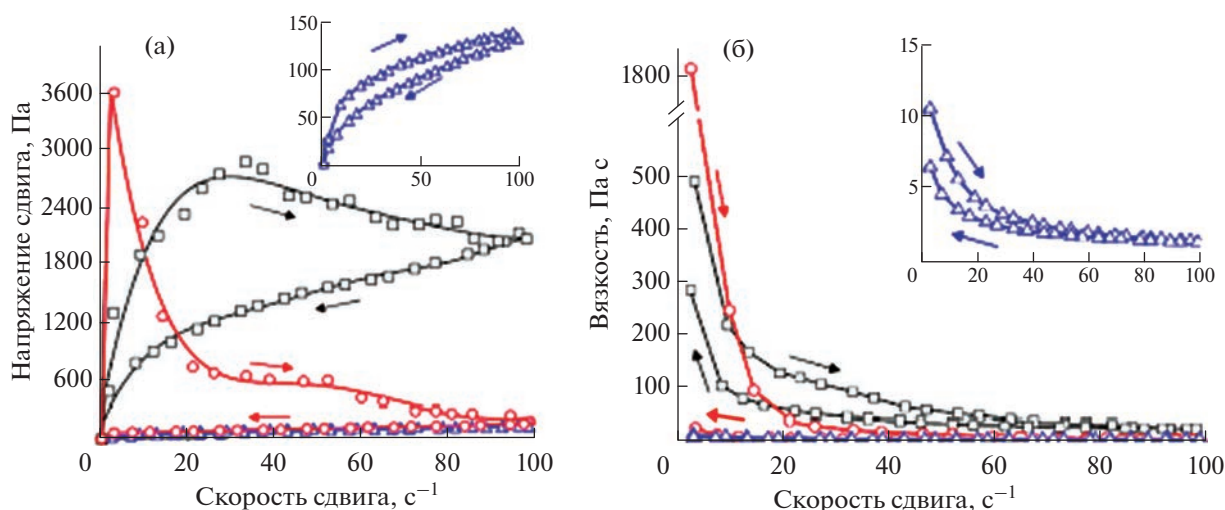


Рис. 18. Зависимость между напряжением сдвига и скоростью сдвига (а) и зависимость между вязкостью и скоростью сдвига (б) раствора сополимера 20 мас./об. % (синяя линия с треугольниками), пасты α -ТКФ с деионизированной водой (красная линия с кружками) и пасты α -ТКФ с раствором сополимера 20 мас./об. % (черная линия с квадратами), при 25°C. Стрелки указывают направление изменения скорости сдвига; петля гистерезиса указывает на тиксотропию, адаптировано из работы [82].

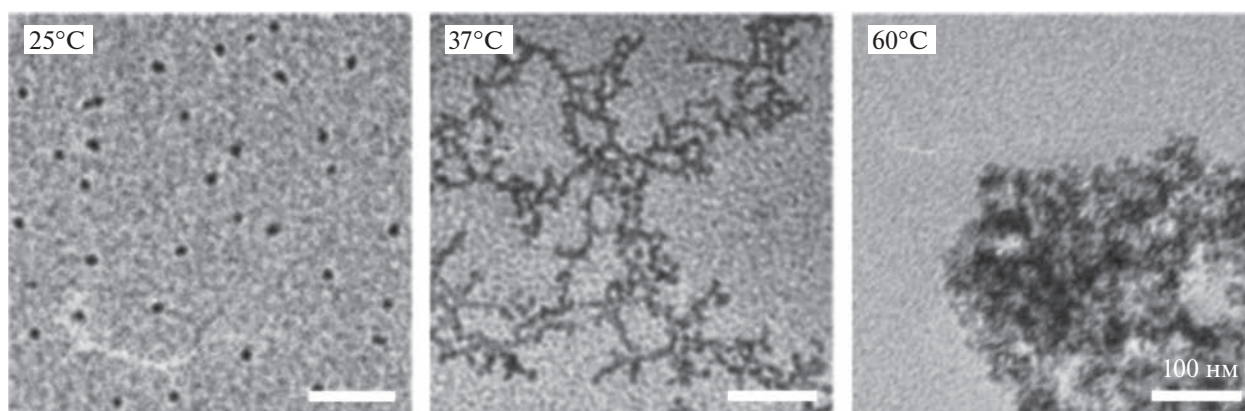


Рис. 19. ПЭМ-изображения водной системы сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА при различных температурах, адаптировано из работы [21].

ло показано, что молекулы сополимера образуют мицеллы при 25°C; формирование крупных агрегатов с сетчатой структурой наблюдали при 37°C; при этом при 60°C образуются плотные агрегаты, макроскопически соответствующие осадку. В работе [83] также с использованием ПЭМ исследовали структуру ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, гидроксиапатита (ГАП) и композитного геля на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА/ГАП. Были получены данные, совпадающие с результатами других исследователей: в растворе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА образует мицеллы сферической формы (рис. 19) [21, 84].

Также авторы [84] методом динамического светорассеяния установили размеры мицелл для данных водных растворов тройных блок-сополи-

меров. Средний размер составил 26 нм, при этом его величина оставалась постоянной при различных степенях разбавления.

Для характеристики мицеллярной структуры тройных блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА также применяют метод МУРН [85]. Полученная кривая МУРН была аппроксимирована с использованием модели сферической частицы со строением ядро-оболочка. Было подтверждено, что размер гидрофобного мицеллярного ядра зависит от молекулярной массы ПЛГА: с уменьшением молекулярной массы радиус гидрофобного ядра и мицеллы в целом уменьшаются. В работе [86] был обнаружен корреляционный пик в полуразбавленной системе сополимер–вода, что свидетельствует об упорядоченных структурах с ха-

рактерным межмицеллярным расстоянием. При этом в области гелеобразования на фазовой диаграмме корреляционный пик исчезает – формируется менее организованная структура. С увеличением температуры образуется цилиндрическая структура, а при еще более высоких температурах происходит беспорядочная упаковка цилиндров. В разбавленном растворе профили МУРН сополимера с коротким ПЭГ-блоком имеют асимметричную (эллипсоидную) форму. Помимо структуры научная группа [86] оценивала показатель мутности гидрогелей. Для чувствительных к температуре блок-сополимеров определение мутности является ценным инструментом для исследования термодинамических изменений и агрегации в системе в зависимости от температуры. Повышение мутности может указывать на рост гидрофобных ассоциаций между мицеллами или самосборку цепей: более высокая концентрация способствует более частому столкновению мицелл, что приводит к образованию более крупных ассоциативных комплексов и повышенной мутности. Было показано, что при высоких температурах происходит резкое снижение мутности сополимеров, а амплитуда переходного пика более выражена для сополимеров с более коротким ПЭГ. Максимум мутности на фазовой диаграмме находится в области гидрогеля. При более высоких температурах мутность заметно снижается, что связано с разрушением гелевой сетки вследствие уплотнения гидрофобных микродоменов и структурной перестройки от связанных мицелл геля до уплотненных цилиндров [86].

2.4. Биоразложение гидрогелей

Важной характеристикой получаемых гидрогелей является их способность к биоразложению, так как они имеют широкий спектр применения в медицине [87]. В работе [88] были получены *in situ* термочувствительные гидрогели на основе тройного блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, которые могут доставлять корилагин и низкомолекулярный хитозан (LC) непосредственно в опухолевую ткань. После инъекции раствор корилагина/LC/сополимера эффективно трансформируется в гидрогель в подкожных тканях мышей. Кроме этого, он полностью разрушается на 12-й день имплантации, что подтверждают исследования *in vivo*. Было показано, что после завершения терапии имплантированный гидрогель удаляется без хирургического вмешательства [88].

Авторы [89] исследовали как биосовместимость, так и биоразложение инъекционных имплантатов на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с пролонгированной доставкой лекарственных средств. Нагруженный флуоресцином натрия термочувствительный гидрогель вводили в стекловидное тело глаза кролика, а затем регистриро-

вали серию флуоресцентных изображений в определенные моменты времени для неинвазивного мониторинга внутриглазной ретенции сформированного *in situ* материала. Было показано, что матрица гидрогеля полностью разложилась за неделю, а прилегающие ткани не изменили обычную морфологию. Кроме того, ни в одном из исследований не наблюдалось признаков воспаления, некроза тканей или потери клеток эндотелия роговицы, что говорит о биосовместимости гидрогелевых материалов.

Для оценки биоразложения ученые [83] проводили как *in vitro*, так и *in vivo* исследования гелей на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с ГАП. Материалы показали постепенную деградацию, на пятую неделю степень разложения составила свыше 90%. Эксперименты показали, что композитные гели с ГАП обладают свойствами биоразложения и биосовместимости. Однако стоит заметить, что для данных материалов возникала незначительная воспалительная реакция в подкожной клетчатке через 7 дней после имплантации [83].

2.5. Применение гидрогелей

Тройные блок-сополимеры ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА привлекают большое внимание благодаря простоте синтеза, воспроизводимости структуры, биобезопасности, термочувствительности и биоразлагаемости. Сополимеры и материалы на их основе подходят для многих областей применения: доставки противораковых, противобактериальных лекарственных средств, регенерации тканей и органов, лечения неоваскуляризации роговицы глаза, а также доставки инсулина для больных диабетом. За последние несколько лет спрос на термочувствительные сополимеры существенно вырос [90], а тройные блок-сополимеры ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА являются основой для гидрогелей различного применения. Так, мицеллы ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с загруженным в них противораковым компонентом гексаметилендиаминном 3 β -ацетокси-урс-12-ен-28-овой кислоты (US597) были получены в работе [91] для лечения рака с длительной терапией. Было зафиксировано, что пиковая концентрация мицелл-US597 в плазме крови была почти в четыре раза выше по сравнению со свободным US597. Таким образом, мицеллы-US597 всасывались быстрее, чем свободный US597, у крыс, и степень всасывания, измеряемая по пиковой концентрации лекарственного средства в плазме, была значительно выше. Помимо этого, поменялась и фармакокинетика действующего вещества. Мицеллы-US597 имели в два раза более короткое время полувыведения, чем свободный US597 (8.716 ± 7.003 ч для мицелл-US597 и 16.433 ± 8.821 ч для US597), что указывает на то, что US597 выводился из плазмы крыс быстрее в случае мицелл-US597 по

сравнению со свободным US597. Также было показано, что мицеллы-US597 характеризуются лучшей биодоступностью, чем свободное лекарственное средство. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что мицеллы-US597 обладают лучшей абсорбцией, метаболизмом и выведением, чем свободный US597, а также более длительным временем действия лекарственного средства, тем самым обладая более высокой растворимостью и противоопухолевой эффективностью. Увеличение концентрации и получение гидрогеля из подобной системы могут быть полезны при точечной доставке противоракового препарата.

Ученые [92] исследовали термочувствительный гель на основе ПЛГА-ПЭГ с включенным DOX. Была исследована противоопухолевая эффективность препаратов, содержащих DOX, на опухоли молочной железы у самок-мышей. Группы со свободным DOX, липосомами DOX, гелем DOX и липосомальным гелем, обогащенным DOX, имели показатели ингибирования опухоли 56.2, 59.7, 75.9 и 86.5% соответственно. Объем опухоли был значительно меньше в группах, получавших DOX не в свободном виде, следовательно, перитуморальная инъекция обладала более высокой противоопухолевой эффективностью. Липосомальный гель, содержащий DOX, имел самую высокую эффективность, что свидетельствует о наибольшей способности подавления опухоли, поскольку захваченное лекарственное средство должно проходить через липосомальный бислой и затем диффундировать из геля. Эти результаты предполагают, что гибридная система доставки лекарств, состоящая из липосом и гидрогелей ПЛГА-ПЭГ, может поддерживать высвобождение лекарств и улучшать их профиль высвобождения, а также повышать противоопухолевую эффективность за счет локализованной терапии и снижать цитотоксичность.

Доставка терапевтических лекарственных средств в задний сегмент глаза является сложной задачей из-за анатомии и физиологии глазных барьеров, поэтому становится актуальным подобрать способы доставки с пролонгированным действием. В работе [89] исследовали в качестве инъекционной матрицы гидрогели на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с различным соотношением блоков. Мицеллы, образованные смесью сополимеров, способствовали солиubilизации гидрофобных молекул дексаметазона (DEX) в водной среде. С помощью парцетеза оценивали фармакокинетику после введения термочувствительного гидрогеля с DEX. В работе приведены профили высвобождения DEX, из которых видно, что препарат оставался обнаруживаемым в течение 9 дней после однократной инъекции гидрогеля. Также авторы отмечают, что начальная концентрация DEX, доставляемая в гелевой матрице, хорошо контролируется и составляет менее 10 мкг/мл в стекловидном

теле. Эти данные свидетельствуют, что водный раствор сополимера быстро превращается в гидрогель в физиологической среде глаза после введения, и, таким образом, первая стадия высвобождения (взрывной эффект) нивелируется [89].

В работе [93] изучили гидрогели, полученные на основе смеси тройных блок-сополимеров поликапролактон-*co*-лактид-ПЭГ-поликапролактон-*co*-лактид (ПКЛА-ПЭГ-ПКЛА) и ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА. Микросферы ПЛГА использовали для инкапсулирования эксенатида, которые затем заключали в гидрогели. Инъекция приготовленной выше композиции приводит к стабильной концентрации глюкозы в крови у обработанных мышей, а также к хорошему сохранению массы тела в течение 20 дней в фармакодинамическом исследовании. Эффекты микросфер и гидрогеля с микросферами и эксенатидом сравнивали с помощью перорального глюкозотолерантного теста на 20-й день после инъекции. Результаты показали, что в группе, получавшей гидрогель с частицами, сохранялось высокое биоактивное высвобождение эксенатида, тогда как в группе, которая получала только микросферы, оно прекращалось ранее. Таким образом, было установлено, что гидрогель с микросферами, нагруженный эксенатидом, является потенциально возможным препаратом длительного действия для лечения диабета.

В другом исследовании [94] синтезировали гидрогели на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, в которые вводили симвастатин. Свойства гидрогелей были исследованы *in vivo* с использованием модели костного дефекта крысы. По сравнению с контрольными образцами, эксперименты с использованием гидрогелей ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с симвастатином демонстрировали высокую скорость роста новой костной ткани. Профили высвобождения препарата из гелей *in vitro* показали замедленное высвобождение симавастина: концентрация высвободившегося препарата лишь на 14 сут достигала приблизительно 80%. Таким образом, результаты этого исследования показали, что симвастатин/ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА может иметь терапевтические перспективы для восстановления костной ткани [94].

В работе [95] создали систему доставки инсулина путем включения наночастиц хитозана в гидрогель ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА (ICNPH). Субконъюнктивальное введение гидрогеля уменьшало амплитуду скотопической В-волны, устраняло микро- и ультраструктурные нарушения в сетчатке и уменьшало апоптоз клеток сетчатки у крыс с диабетической ретинопатией. В результате экспериментов с различными группами животных, в том числе с контрольными группами, было доказано, что субконъюнктивальная инъекция ICNPH оказывала значительное нейропротек-

торное воздействие на сетчатку у крыс с диабетической ретинопатией и способствовала регулированию доставки инсулина [95].

Таким образом, сополимеры ПЭГ-ПЛГА, как правило, имеют невысокие молекулярные массы, и за счет этого способны к “золь–гель–золь” переходу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гидрогелевые материалы на основе сополимеров биоразлагаемых полиэфигов и ПЭГ являются перспективными во многих областях биомедицины. Наблюдается неугасающий интерес к данным системам ввиду резорбируемости и биосовместимости полимерной сетки, а также из-за возможности точно “настраивать” механические свойства и структуру гидрогелей. За счет возможности синтеза сополимеров этиленгликоля с лактидом с относительно высокими молекулярными массами, гидрогели на их основе, как правило, имеют “гель–золь” переход и не обладают термочувствительностью. Такие материалы могут быть использованы в качестве имплантатов мягких тканей. При этом, как показано в обзоре, присутствует ряд работ, где все же используются термочувствительные гидрогели на основе сополимеров ПЭГ-ПЛА низкой молекулярной массы. Гораздо большее число исследований термочувствительных гидрогелей проведено для систем ПЭГ-ПЛГА. Гели на основе данных сополимеров имеют “золь–гель–золь” переход и могут быть использованы для доставки лекарств. В то же время существуют вопросы, требующие дополнительных исследований в данной области: подбор эффективных безопасных катализаторов для синтеза сополимеров, детальные исследования механизмов гелеобразования, получение материалов с высокими модулями упругости и др.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского (договор № 769-ЭА-23-НИР от 26.06.23).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимова Ю.Г., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Полимерные гидрогели в сельском хозяйстве (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2023. Т. 58. № 1. С. 23–42. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.1.23rus>
2. Kaur P., Agrawal R., Pfeffer F.M. et al. Hydrogels in agriculture: Prospects and challenges // Journal of Poly-

- mers and the Environment. 2023. V. 35. P. 3701–3718. <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02859-1>
3. Асулян Л.Д., Бояркина В.В., Агаева М.В. Гидрогели поливинилового спирта как влагоудерживающие сорбенты // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2021. № 1. С. 13–19. <https://doi.org/10.24412/2071-6176-2021-1-13-19>
4. Рабаданов Р.Г., Рабаданов Г.Г., Мукайлов М.Д., Атаев М.З. Сильнонабухающие полимерные гидрогели на плодоносящих виноградниках Южного Дагестана // Проблемы развития АПК региона. 2017. Т. 29. № 1(29). С. 46–52.
5. Tran N-P-D., Yang M-C., Tran-Nguyen P.L. Evaluation of silicone hydrogel contact lenses based on poly(dimethylsiloxane) dialkanol and hydrophilic polymers // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2021. V. 206. P. 111957. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111957>
6. Бондаренко П.И., Пинчук Л.С., Дравица Л.В., Бондаренко Н.Ю. Лечебные контактные линзы и способы их изготовления (обзор) // Офтальмология. Восточная Европа. 2011. № 3(10). С. 78–91.
7. Мельник С.И., Торикашвили В.Д., Якута К.Д., Лебедева С.А. Раневые повязки и мягкие лекарственные формы на основе коллагена для лечения ран различной этиологии // Фармацевтическое дело и технология лекарств. 2020. № 6. С. 10–16. <https://doi.org/10.33920/med-13-2006-01>
8. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Усов В.В., Андрюков Б.Г. Биосовместимые и биodeградируемые раневые покрытия на основе полисахаридов из морских водорослей (обзор литературы) // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2020. Т. 179. № 4. С. 109–115. <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2020-179-4-109-115>
9. Дуданов И.П., Виноградов В.В., Криштон В.В., Никонорова В.Г. Преимущества и недостатки гелевых покрытий в терапии ожоговых ран и ожогов (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2022. Т. 16. № 2. С. 13–22. <https://doi.org/10.24412/2075-4094-2022-2-1-2>
10. Ушмаров Д.И., Гуменюк А.С., Гуменюк С.Е. и др. Сравнительная оценка многофункциональных раневых покрытий на основе хитозана: многоэтапное рандомизированное контролируемое экспериментальное исследование // Кубанский научный медицинский вестник. 2021. Т. 28. № 3. С. 78–96. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2021-28-3-78-96>
11. Glukhova S.A., Molchanov V.S., Kharitonova E.P. et al. Green nanocomposite gels based on binary network of sodium alginate and percolating halloysite clay nanotubes for 3D printing // Carbohydrate Polymers. 2022. V. 282. P. 119106. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119106>
12. Григорьев А.М., Басок Ю.Б., Кириллова А.Д. и др. Криогенно-структурированный гидрогель на основе желатина как резорбируемая макропористая матрица для биомедицинских технологий // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2022. Т. 24. № 2. С. 83–93. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2022-2-83-93>
13. Osidak E.O., Andreev A. Yu., Avetisov S.E. et al. Corneal stroma regeneration with collagen-based hydrogel as an

- artificial stroma equivalent: A comprehensive *in vivo* study // *Polymers*. 2022. V. 14. № 19. P. 4017.
<https://doi.org/10.3390/polym14194017>
14. Васильев А.В., Кузнецова В.С., Галицына Е.В. и др. Биосовместимость и остеогенные свойства коллаген-фибронектинового гидрогеля, импрегнированного BMP-2 // *Стоматология*. 2019. Т. 98. № 6(2). С. 5–11.
<https://doi.org/10.17116/stomat2019980625>
15. Шилова С.В., Миргалеев Г.М., Волкова М.В. и др. Биосовместимые системы доставки антибиотика цефотаксима на основе гелевых микрочастиц альгината кальция // *Вестник Технологического университета*. 2021. Т. 24. № 12. С. 56–59.
16. Yermak I.M., Gorbach V.I., Karnakov I.A., Davydova V.N. *et al.* Carrageenan gel beads for echinochrome inclusion: Influence of structural features of carrageenan // *Carbohydrate Polymers*. 2021. V. 272. P. 118479.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118479>
17. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B. *et al.* Influence of the degree of deacetylation of chitosan and BMP-2 concentration on biocompatibility and osteogenic properties of BMP-2/PLA granule-loaded chitosan/ β -glycerophosphate hydrogels // *Molecules*. 2021. V. 26. № 2. P. 261.
<https://doi.org/10.3390/molecules26020261>
18. Wang Z., Ye Q., Yu S., Akhavan B. Poly ethylene glycol (PEG)-based hydrogels for drug delivery in cancer therapy: A comprehensive review // *Advanced Healthcare Materials*. 2023. V. 12. № 18. P. 2300105.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202300105>
19. Бакеева И.В., Докторова А.В., Дамшкани Л.Г., Лозинский В.И. Криоструктурирование полимерных систем. 54. Гибридные органо-неорганические криогели поливинилового спирта, наполненные образующимся *in situ* // *Коллоидный журнал*. 2021. Т. 83. № 1. С. 35–50.
<https://doi.org/10.31857/S002329122101002X>
20. Jeong B., Wang L.Q., Gutowska A. Biodegradable thermoreversible gelling PLGA-g-PEG copolymers† // *Chemical Communications*. 2001. № 16. P. 1516–1517.
<https://doi.org/10.1039/B102819G>
21. Cui S., Yu L., Ding J. Thermogelling of amphiphilic block copolymers in water: ABA type versus AB or BAB type // *Macromolecules*. 2019. V. 52. P. 3697–3715.
<https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b00534>
22. Yu L., Ding J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials // *Chemical Society Reviews*. 2008. V. 37. P. 1473–1481.
<https://doi.org/10.1039/B713009K>
23. Kricheldorf H.R., Meier-Haack J. Polylactones, 22[†] ABA triblock copolymers of L-lactide and poly(ethylene glycol) // *Macromolecular Chemistry*. 1993. V. 194. № 2. P. 715–725.
<https://doi.org/10.1002/macp.1993.021940229>
24. Deng X.M., Xu R.P., Xiong C.D., Cheng L.M. Synthesis and characterization of block copolymers from D,L-lactide and poly(ethylene glycol) with stannous chloride // *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters*. 1990. V. 28. № 13. P. 411–416.
<https://doi.org/10.1002/pol.1990.140281303>
25. Kissel T., Li Y.X., Volland C. Properties of block- and random-copolymers of lactic acid and glycolic acid // *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* 1993. P. 127–128.
26. Youxin L., Kissel T. Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly (L-lactic acid) or poly (L-lactic-co-glycolic acid) A-blocks attached to central poly (oxyethylene) B-blocks // *Journal of Controlled Release*. 1993. V. 27. № 3. P. 247–257.
[https://doi.org/10.1016/0168-3659\(93\)90155-X](https://doi.org/10.1016/0168-3659(93)90155-X)
27. Stevels W.M., Ankone M.L.K., Dijkstra P.J., Feijen J. Kinetics and mechanism of L-lactide polymerization using two different yttrium alkoxides as initiators // *Macromolecules*. 1996. V. 29. № 19. P. 6132–6138.
<https://doi.org/10.1021/ma960531i>
28. Stevels W.M., Ankone M.L.K., Dijkstra P.J., Feijen J. A versatile and highly efficient catalyst system for the preparation of polyesters based on lanthanide tris(2,6-di-*tert*-butylphenolate)s and various alcohols // *Macromolecules*. 1996. V. 29. № 9. P. 3332–3333.
<https://doi.org/10.1021/ma951813o>
29. Li S., Anjard S., Rashkov I., Vert M. Hydrolytic degradation of PLA/PEO/PLA triblock copolymers prepared in the presence of Zn metal or CaH₂ // *Polymer*. 1998. V. 39. № 22. P. 5421–5430.
[https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)10272-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)10272-5)
30. Cerrai P., Tricoli M. Block copolymers from L-lactide and polyethylene glycol through a non-catalyzed route // *Macromolecular Chemistry Rapid Communications*. 1993. V. 9. № 9. P. 529–538.
<https://doi.org/10.1002/marc.1993.030140901>
31. Sanabria-DeLong N., Agrawal S.K., Bhatia S.R., Tew G.N. Impact of synthetic technique on PLA-PEO-PLA physical hydrogel properties // *Macromolecules*. 2007. V. 40. № 22. P. 7864–7873.
<https://doi.org/10.1021/ma071243f>
32. Hamia M., Aminib M. *et al.* Synthesis and *in vitro* evaluation of a pH-sensitive PLA–PEG–folate based polymeric micelle for controlled delivery of docetaxel // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014. V. 116. P. 309–317.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.015>
33. Subbu S. Venkatraman., Pan Jie *et al.* Micelle-like nanoparticles of PLA–PEG–PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier // *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2005. V. 298. № 1. P. 219–232.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.023>
34. Li L., Cao Z.-Q. *et al.* Poly(L-lactic acid)-polyethylene glycol-poly(L-lactic acid) triblock copolymer: A novel macromolecular plasticizer to enhance the crystallization of poly(L-lactic acid) // *European Polymer Journal*. 2017. V. 97. P. 272–281.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.10.025>
35. Qin W., Chuandong W. *et al.* Synthesis, thermosensitive gelation and degradation study of a biodegradable triblock copolymer // *Journal of Macromolecular Science*. 2013. V. 50. № 2. P. 200–207.
<https://doi.org/10.1080/10601325.2013.742794>
36. Darge H.F., Andrgie A.T. *et al.* Localized controlled release of bevacizumab and doxorubicin by thermo-sensitive hydrogel for normalization of tumor vasculature and to enhance the efficacy of chemotherapy // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. V. 575. P. 118799.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118799>

37. Yang H., Lei K. et al. Injectable PEG/polyester thermogel: A new liquid embolization agent for temporary vascular interventional therapy // *Materials Science & Engineering C*. 2019. V. 102. P. 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.075>
38. Darge H.F., Andrgie A.T. et al. Multifunctional drug-loaded micelles encapsulated in thermo-sensitive hydrogel for *in vivo* local cancer treatment: Synergistic effects of anti-vascular and immuno-chemotherapy // *Chemical Engineering Journal*. 2021. V. 406. P. 126879. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126879>
39. Liu. Y., Ma W. et al. *In situ* administration of temperature-sensitive hydrogel composite loading paclitaxel microspheres and cisplatin for the treatment of melanoma // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023. V. 160. P. 114380. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114380>
40. Tanzi M.C., Verderio P. et al. Cytotoxicity of some catalysts commonly used in the synthesis of copolymers for biomedical use // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1994. V. 5. P. 393–396. <https://doi.org/10.1007/BF00058971>
41. Chen G.X., Kim H.S. et al. Synthesis of high-molecular-weight poly(L-lactic acid) through the direct condensation polymerization of L-lactic acid in bulk state // *European Polymer Journal*. 2006. V. 42. № 2. P. 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.07.022>
42. Fenton O. S., Tibbitt M.W. et al. Injectable polymer–nanoparticle hydrogels for local immune cell recruitment // *Biomacromolecules*. 2019. V. 20. № 12. P. 4430–4436. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01129>
43. Yin X., Hewitt D.R.O. et al. Impact of stereochemistry on rheology and nanostructure of PLA–PEO–PLA triblocks: Stiff gels at intermediate L/D-lactide ratios // *Soft Matter*. 2018. V. 14. № 35. P. 7255–7263. <https://doi.org/10.1039/C8SM01559G>
44. Yin X., Hewitt D.R.O. et al. Effect of stereochemistry on nanoscale assembly of ABA triblock copolymers with crystallizable blocks // *Polymer*. 2021. V. 223. P. 123683. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.123683>
45. Mhiri S., Abid M. et al. Green synthesis of covalent hybrid hydrogels containing PEG/PLA-based thermoreversible networks // *Journal of Polymer Research*. 2022. V. 29. № 8. P. 328. <https://doi.org/10.1007/s10965-022-03153-9>
46. Buwalda S.J., Dijkstra P.J. et al. *In situ* forming stereo-complexed and post-photocrosslinked acrylated star poly(ethylene glycol)-poly(lactide) hydrogels // *European Polymer Journal*. 2017. V. 94. P. 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.07.002>
47. Pertici V., Pinbarre C. et al. Degradable and injectable hydrogel for drug delivery in soft tissues // *Biomacromolecules*. 2018. V. 20. № 1. P. 149–163. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01242>
48. Heskins M., Guillet J.E. Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide) // *Journal of Macromolecular Science: Part A. Chemistry*. 1968. V. 2. № 8. P. 1441–1455. <https://doi.org/10.1080/10601326808051910>
49. Fujishige S., Kubota K., Ando I. Phase transition of aqueous solutions of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylmethacrylamide) // *Journal of Physical Chemistry*. 1989. V. 93. № 8. P. 3311–3313. <https://doi.org/10.1021/j100345a085>
50. Trinh T.A., Le T.M.D. et al. A novel injectable pH–temperature sensitive hydrogel containing chitosan–insulin electrosprayed nanosphere composite for an insulin delivery system in type I diabetes treatment // *Biomaterials*. 2020. V. 8. № 14. P. 3830–3843. <https://doi.org/10.1039/D0BM00634C>
51. Grosjean M., Girard E. et al. Degradable bioadhesives based on star PEG–PLA hydrogels for soft tissue applications // *Biomacromolecules*. 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01166>
52. Yang F., Shi K., Hao Y. et al. Cyclophosphamide loaded thermo-responsive hydrogel system synergize with a hydrogel cancer vaccine to amplify cancer immunotherapy in a prime-boost manner // *Bioactive Materials*. 2021. V. 6. № 10. P. 3036–3048. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.003>
53. Yin X., Hewitt D.R. et al. Hierarchical assembly in PLA–PEO–PLA hydrogels with crystalline domains and effect of block stereochemistry // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019. V. 180. P. 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.031>
54. Zhao J., Xiong J. et al. A triple crosslinked micelle-hydrogel lacrimal implant for localized and prolonged therapy of glaucoma // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023. V. 185. P. 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.02.011>
55. Agrawal S.K., Sanabria-DeLong N. et al. Structural characterization of PLA–PEO–PLA solutions and hydrogels: Crystalline vs amorphous PLA domains // *Macromolecules*. 2008. V. 41. № 5. P. 1774–1784. <https://doi.org/10.1021/ma070634r>
56. Mao H., Pan P. et al. *In situ* formation and gelation mechanism of thermoresponsive stereocomplexed hydrogels upon mixing diblock and triblock poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) copolymers // *The Journal of Physical Chemistry*. 2015. V. 119. № 21. P. 6471–6480. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03610>
57. Yang. F., Shi K. et al. A biodegradable thermosensitive hydrogel vaccine for cancer immunotherapy // *Applied Materials Today*. 2020. V. 19. P. 100608. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100608>
58. Загоскин Ю.Д., Григорьев Т.Е. и др. Гидрогели и губчатые материалы на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля // *Доклады академии наук*. 2019. Т. 486. № 4. С. 433–436. <https://doi.org/10.1134/S001250081906003X>
59. Gholizadeh H., Landh E., Silva D.M. et al. *In vitro* and *in vivo* applications of a universal and synthetic thermoresponsive drug delivery hydrogel platform // *International Journal of Pharmaceutics*. 2023. V. 635. P. 122777. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122777>
60. Chen S., Pieber R. et al. Triblock copolymers: Synthesis, characterization, and delivery of a model protein // *International Journal of Pharmaceutics*. 2005. V. 288. № 2. P. 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.026>
61. Qiao M., Chen D. et al. Injectable biodegradable temperature-responsive PLGA–PEG–PLGA copolymers: Synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer-based hydrogels // *In-*

- ternational Journal of Pharmaceutics. 2005. V. 294. № 1–2. P. 103–112.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.01.017>
62. Yu L., Xu W. et al. Poly(lactic acid-co-glycolic acid)–poly(ethylene glycol)–poly(lactic acid-co-glycolic acid) thermogel as a novel submucosal cushion for endoscopic submucosal dissection // *Acta Biomaterialia*. 2014. V. 10. № 3. P. 1251–1258.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.007>
63. Chen L., Ci T., Li T. et al. Effects of molecular weight distribution of amphiphilic block copolymers on their solubility, micellization, and temperature-induced sol–gel transition in water // *Macromolecules*. 2014. V. 47. № 17. P. 5895–5903.
<https://doi.org/10.1021/ma501110p>
64. Chen L., Ci T., Yu L. et al. Effects of molecular weight and its distribution of PEG block on micellization and thermogellability of PLGA–PEG–PLGA copolymer aqueous solutions // *Macromolecules*. 2015. V. 48. № 11. P. 3662–3671.
<https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00168>
65. Zhou Y., Cui Y., Wang L.Q. A Dual-sensitive hydrogel based on poly(lactide-co-glycolide)–poly(ethylene glycol)–poly(lactide-co-glycolide) block copolymers for 3D printing // *International Journal of Bioprinting*. 2021. V. 7. № 3. P. 140–152.
<https://doi.org/10.18063/ijb.v7i3.389>
66. Zentner G., Rathi R., Shih C. et al. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs // *Journal of Controlled Release*. 2001. V. 72. № 1–3. P. 203–215.
[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00276-0)
67. Ghahremankhani A., Dorkoosh F., Dinarvand R. PLGA–PEG–PLGA tri-block copolymers as *in situ* gel-forming peptide delivery system: Effect of formulation properties on peptide release // *Pharmaceutical Development and Technology*. 2008. V. 13. № 1. P. 49–55.
<https://doi.org/10.1080/10837450701702842>
68. Khodaverdi E., Tekie F. et al. Preparation and investigation of sustained drug delivery systems using an injectable, thermosensitive, *in situ* forming hydrogel composed of PLGA–PEG–PLGA // *AAPS PharmSci-Tech*. 2012. V. 13. P. 590–600.
<https://doi.org/10.1208/s12249-012-9781-8>
69. Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W. Thermoreversible gelation of PEG–PLGA–PEG triblock copolymer aqueous solutions // *Macromolecules*. 1999. V. 32. № 21. P. 7064–7069.
<https://doi.org/10.1021/ma9908999>
70. Jeong B., Lee K.M., Gutowska A., An Y.H. %Thermogelling biodegradable copolymer aqueous solutions for injectable protein delivery and tissue engineering // *Biomacromolecules*. 2002. V. 3. № 4. P. 865–868.
<https://doi.org/10.1021/bm025536m>
71. Chung Y.-M., Simmons K.L., Gutowska A., Jeong B. Sol-gel transition temperature of PLGA-g-PEG aqueous solutions // *Biomacromolecules*. 2002. V. 3. № 3. P. 511–516.
<https://doi.org/10.1021/bm0156431>
72. Lee S.J., Han B.R., Park S.Y. et al. Sol–gel transition behavior of biodegradable three-arm and four-arm star-shaped PLGA–PEG block copolymer aqueous solution // *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2006. V. 44. № 2. P. 888–899.
<https://doi.org/10.1002/pola.21193>
73. Shi J., Yu L., Ding J. PEG-based thermosensitive and biodegradable hydrogels // *Acta Biomaterialia*. 2021. V. 128. P. 42–59.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.04.009>
74. Cui S., Yu L., Ding J. Semi-bald micelles and corresponding percolated micelle networks of thermogels // *Macromolecules*. 2018. V. 51. № 16. P. 6405–6420.
<https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b01014>
75. Lopez-Cano J.J., Sigen A., Andrés-Guerrero V. et al. Thermo-responsive PLGA–PEG–PLGA hydrogels as novel injectable platforms for neuroprotective combined therapies in the treatment of retinal degenerative diseases // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 2. P. 234.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020234>
76. Wei P.-S., Chen Y.J., Lin S.Y. et al. *In situ* subcutaneously injectable thermosensitive PEG–PLGA diblock and PLGA–PEG–PLGA triblock copolymer composite as sustained delivery of bispecific anti-CD3 scFv T-cell/anti-EGFR Fab Engager (BiTEE) // *Biomaterials*. 2021. V. 278. P. P. 121166.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121166>
77. Cespi M., Bonacucina G., Tiboni M. et al. Insights in the rheological properties of PLGA–PEG–PLGA aqueous dispersions: Structural properties and temperature-dependent behavior // *Polymer*. 2021. V. 213. P. 123216.
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123216>
78. Kamali H., Khodaverdi E., Hadizadeh F. et al. Comparison of *in-situ* forming composite using PLGA–PEG–PLGA with *in-situ* forming implant using PLGA: *In-vitro*, *ex-vivo*, and *in-vivo* evaluation of naltrexone release // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019. V. 50. P. 188–200.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.011>
79. Chen X., Wang H. et al. An injectable and active hydrogel induces mutually enhanced mild magnetic hyperthermia and ferroptosis // *Biomaterials*. 2023. V. 298. P. 122139.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122139>
80. Steinman N.Y., Haim-Zada M. et al. Effect of PLGA block molecular weight on gelling temperature of PLGA–PEG–PLGA thermoresponsive copolymers // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2019. V. 57. № 1. P. 35–39.
<https://doi.org/10.1002/pola.29275>
81. Cao D., Guo W., Cai C. et al. Unified therapeutic-prophylactic vaccine demonstrated with a postoperative filler gel to prevent tumor recurrence and metastasis // *Advanced Functional Materials*. 2022. V. 32. № 40. P. 2206084.
<https://doi.org/10.1002/adfm.202206084>
82. Vojtova L., Michlovská L., Valova K. et al. The effect of the thermosensitive biodegradable PLGA–PEG–PLGA copolymer on the rheological, structural and mechanical properties of thixotropic self-hardening tricalcium phosphate cement // *International Journal of Molecular Science*. 2019. V. 20. № 2. P. 391.
<https://doi.org/10.3390/ijms20020391>
83. Yuan B., Zhang Y., Wang Q. et al. Thermosensitive vancomycin@PLGA–PEG–PLGA/HA hydrogel as an all-in-one treatment for osteomyelitis // *International*

- Journal of Pharmaceutics. 2022. V. 627. P. 122225.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122225>
84. Gao Y., Ji H., Peng L. *et al.* Development of PLGA-PEG-PLGA hydrogel delivery system for enhanced immunoreaction and efficacy of newcastle disease virus DNA vaccine // *Molecules*. 2020. V. 25. № 11. P. 2505.
<https://doi.org/10.3390/molecules25112505>
 85. Maeda T., Tanimoto K., Hotta A. Thermogelling nanocomposite hydrogel: PLGA molecular weight in PLGA-b-PEG-b-PLGA affecting the thermogelling behavior // *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2022. V. 223. № 1. P. 2100316.
<https://doi.org/10.1002/macp.202100316>
 86. Khorshid N.K., Zhu K., Knudsen K.D. *et al.* Novel structural changes during temperature-induced self-assembly and gelation of PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer in aqueous solutions // *Macromolecular Bioscience*. 2016. V. 16. № 12. P. 1838–1852.
<https://doi.org/10.1002/mabi.201600277>
 87. Rahmani F., Atabaki R., Behrouzi S. *et al.* The recent advancement in the PLGA-based thermo-sensitive hydrogel for smart drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. 2023. V. 631. P. 122484.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122484>
 88. Jin X., Fu Q., Gu Z. *et al.* Injectable corilagin/low molecular weight chitosan/PLGA-PEG-PLGA thermo-sensitive hydrogels for localized cancer therapy and promoting drug infiltration by modulation of tumor microenvironment // *International Journal of Pharmaceutics*. 2020. V. 589. P. 119772.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119772>
 89. Zhang L., Shen W., Luan J. *et al.* Sustained intravitreal delivery of dexamethasone using an injectable and biodegradable thermogel // *Acta Biomaterialia*. 2015. V. 23. P. 271–281.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.05.005>
 90. Osorno L.L., Maldonado D.E., Whitener R.J. *et al.* Amphiphilic PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer nanogels varying in gelation temperature and modulus for the extended and controlled release of hyaluronic acid // *Journal of Applied Polymer Science*. 2019. V. 137 № 25. P. 48678.
<https://doi.org/10.1002/app.48678>
 91. Chen X., Chen J., Li B. *et al.* PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles as oral drug delivery system: *In vitro* drug release and *in vivo* pharmacokinetics assessment // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017. V. 490. P. 542–552.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.089>
 92. Cao D., Zhang X., Akabar M. *et al.* Liposomal doxorubicin loaded PLGA-PEG-PLGA based thermogel for sustained local drug delivery for the treatment of breast cancer // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019. V. 47. № 1. P. 181–191.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1548470>
 93. Wang P., Zhuo X., Chu W., Tang X. Exenatide-loaded microsphere/thermosensitive hydrogel long-acting delivery system with high drug bioactivity // *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. V. 528. № 1–2. P. 62–75.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.069>
 94. Yan Q., Xiao L.Q., Tan L. *et al.* Controlled release of simvastatin-loaded thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue regeneration: *In vitro* and *in vivo* characteristics // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015. V. 103. № 11. P. 3580–3589.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.35499>
 95. Rong X., Ji Y., Zhu X. *et al.* Neuroprotective effect of insulin-loaded chitosan nanoparticles/PLGA-PEG-PLGA hydrogel on diabetic retinopathy in rats // *International Journal of Nanomedicine*. 2019. V. 14. P. 45–55.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S184574>

УДК 544.77.052.12

ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ И ДОСТАВКИ ЛЮТЕИНА

© 2023 г. А. Д. Широких¹, *, Ю. А. Гурулева¹, Е. А. Маринец¹, М. Ю. Королева¹, **

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Миусская площадь, д. 9, Москва, 125047 Россия

*e-mail: adshirokikh@gmail.com

**e-mail: m.yu.kor@gmail.com

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 29.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

В последнее время липидные наночастицы интенсивно исследуют в качестве носителей липофильных лекарственных соединений. В данной работе проведено изучение устойчивости наноэмульсий с углеводородным маслом, твердых липидных наночастиц со стеариновой кислотой и наноструктурированных липидных частиц, содержащих углеводородное масло и стеариновую кислоту в массовом соотношении 1 : 1. Результаты показали, что при стабилизации неионогенными поверхностно-активными веществами Tween 60 и Span 60 все исследованные липидные системы сохраняли устойчивость к агрегации и последующей седиментации более 30 сут. Включение в состав липидных дисперсий лютеина практически не оказывало влияния на их устойчивость, при этом размер твердых липидных наночастиц и наноструктурированных липидных частиц уменьшался от 28–30 до 15–17 нм. Биодоступность лютеина при его инкапсулировании в липидные наночастицы определялась по их влиянию на восстановление скорости кровотока при моделировании гемической гипоксии. Практически сразу же после нанесения липидных наночастиц снижение скорости кровотока прекращалось и через 5–10 мин наблюдалась тенденция к его восстановлению. Это показывает перспективность использования липидных наночастиц с углеводородным маслом и стеариновой кислотой для доставки липофильных лекарственных соединений.

Ключевые слова: наноэмульсии, твердые липидные наночастицы, наноструктурированные липидные частицы, лютеин, адресная доставка лекарственных веществ

DOI: 10.31857/S0023291223600530, EDN: DIKBRW

1. ВВЕДЕНИЕ

В последнее время возрос интерес к исследованию липидных наночастиц для доставки различных биологически активных соединений, в том числе лекарственных. Благодаря наличию липидного ядра в такие наночастицы возможно инкапсулирование липофильных веществ и, соответственно, повышение их биодоступности. К подобным липидным носителям активных соединений относятся наноэмульсии, капли дисперсной фазы которых состоят из жидких липофильных соединений [1], твердые липидные наночастицы, образованные твердыми при комнатной или физиологической температурах липидами, и наноструктурированные липидные частицы, включающие смесь твердых и жидких липидов [2]. В данной работе исследованы липидные наночастицы, состоящие из жидкого углеводородного масла и твердой стеариновой кислоты, поэтому в дальнейшем мы будем придерживаться указанной выше терминологии.

Наноструктурированные липидные частицы, занимая промежуточное состояние между наноэмульсиями и твердыми липидными наночастицами, сочетают в себе ряд достоинств последних. Благодаря наличию жидких липидных компонентов для наноструктурированных липидных частиц характерна высокая емкость по отношению к липофильным лекарственным веществам, что свойственно наноэмульсиям. Присутствие твердых липофильных веществ в их составе обеспечивает высокую физическую и биологическую устойчивость по отношению к средам организма, которая является достоинством твердых липидных наночастиц [3, 4]. Помимо прочего, комбинирование твердого и жидкого липидов позволяет избежать перекристаллизации в более стабильные кристаллические модификации, приводящей к неконтролируемому высвобождению инкапсулированного активного вещества [5, 6].

Дисперсии липидных наночастиц являются кинетически стабильными системами, хотя следует

отметить, что такие системы могут быть устойчивыми в течение длительного времени. Так как липидные наночастицы, предназначенные для биомедицинского применения, наиболее часто стабилизируют неионогенными поверхностно-активными веществами (ПАВ), то в их дисперсиях чаще протекают агрегация и оствальдово созревание [7, 8]. Агрегация липидных наночастиц может быть значительно замедлена при образовании твердообразной оболочки на поверхности липидных капель в наноэмульсиях или твердых липидных наночастицах [9]. Скорость оствальдова созревания можно снизить практически до нулевых величин при включении в состав жидких капель дисперсной фазы вещества, растворимость которого в дисперсионной среде значительно меньше, чем растворимость основного компонента [10]. Комбинирование липидов, имеющих разную растворимость в водной фазе, в том числе жидких и твердых, способствует повышению устойчивости дисперсий липидных наночастиц к оствальдову созреванию [11].

Липидные частицы получали из смеси стеариновой и олеиновой кислот [12], пальмитиновой и олеиновой кислот [13], пчелиного воска и олеиновой кислоты [14], комбинации каприновой (C_{10}), миристиновой (C_{14}) и стеариновой (C_{18}) кислот с подсолнечным маслом [15]. Однако следует отметить, что в большинстве работ размеры полученных липидных частиц превышали 150–200 нм. Для стабилизации липидных частиц обычно используют Tween 80 [16–18], смесь хлорида цетилпиридиния и Span 20 [19], Span 60 [20], Span 80 [21], смесь Tween 60 и Span 60 [22], различные полосамеры [23, 24].

Лютеин известен как биологически активное соединение, способствующее повышению остроты и защите органов зрения. Он может накапливаться в сетчатке глаза и выступать в качестве антиоксиданта, препятствующего образованию активных форм кислорода [25]. Помимо этого, отмечают его нейропротекторное [26] и противовоспалительное действия [27]. Поскольку основным источником лютеина является пища и лекарственные препараты для перорального введения, то для достижения сетчатки глаза необходимо преодоление разных физиологических барьеров. Увеличить биодоступность лютеина можно посредством его инкапсулирования в липидные наночастицы и последующим конъюнктивальным введением.

Для инкапсулирования лютеина исследовали наноэмульсии, состоящие из среднецепочечных триглицеридов и стабилизированные Tween 80, со средним диаметром капель ~100 нм [28]. Наноэмульсии на основе изопропилмиристата, триацетина, Tween 80 и этилового спирта, с размером капель 10–12 нм сохраняли стабильность более 7 сут [29]. Эмульсии, состоящие из лютеина, рас-

творенного в подсолнечном масле с высоким содержанием олеиновой кислоты, имели капли дисперсной фазы ~220 нм при стабилизации крахмалом, модифицированным октенилсукцинатом, и ~170 нм при стабилизации моностеаратом сахарозы и сохраняли стабильность более 30 сут [30].

В эмульсиях, содержащих лютеин, растворенный в кукурузном масле, размер липидных капель составлял 220–250 нм. При этом эмульсии, стабилизированные Tween 80 и сапонином из квиллайи мыльной, сохраняли устойчивость более 10 сут. В эмульсии с изолятом сывороточного протеина размер капель увеличивался в течение данного интервала времени [31].

Наноэмульсии с лютеином с размером липидных капель 70–80 нм, стабилизированные изолятом сывороточного протеина, обладали низкой цитотоксичностью, при этом их захват клетками линии Сасо-2 был высоким [32].

Биодоступность лютеина, инкапсулированного в наноэмульсиях из линолевой и олеиновой кислоты с размером капель ~110 нм, стабилизированных Tween 20, составляла 87.4% по сравнению с неинкапсулированным лютеином (15.0%) в экспериментах *in vivo* на крысах [33].

Твердые липидные частицы с лютеином, состоящие из глицеролмоностеарата, карнаубского воска и рыбьего жира, стабилизированные Tween 80 и Poloxamer 407, имели размер 167–207 нм [34]. Липидные частицы с лютеином диаметром ~120 нм были получены из глицеролмоностеарата и стабилизированы лецитином и Poloxamer 188. Скорость проникновения таких частиц через роговицу была выше в 1.52 раза, чем у неинкапсулированного лютеина [35].

Было проведено сравнение свойств эмульсий с кукурузным маслом, твердых липидных частиц из кокосового масла и наноструктурированных частиц из кукурузного и кокосового масел с инкапсулированным лютеином, стабилизированных Tween 80 или зейн пептидами. Размеры липидных частиц варьировались от 110 до 200 нм. Размеры твердых липидных частиц немного увеличивались в течение 10 сут из-за агрегации, а размеры наноэмульсий и наноструктурированных липидных частиц изменялись незначительно в течение этого же интервала времени [36].

Наноэмульсии из среднецепочечных триглицеридов Miglyol 812, твердые липидные частицы из цетилпальмитата, глицеролтрипальмитата или карнаубского воска, наноструктурированные липидные частицы из Miglyol 812 и глицеролтрипальмитата или карнаубского воска имели размеры от 150 до 350 нм. Наиболее высокая степень высвобождения лютеина через 24 ч наблюдалась из наноэмульсий и составляла 19.5%, средняя — из наноструктурированных липидных частиц (7.4–12.1%) и наиболее низкая — из твердых ли-

пидных частиц (0.4%). При этом проникновение твердых и наноструктурированных липидных частиц с лютеином через свежую свиную кожу в течение 24 ч практически отсутствовало и не превышало 0.37% в случае наноэмульсий, что свидетельствовало об их местном накоплении и отсутствии системной биодоступности [37].

Таким образом, липидные наночастицы являются перспективными носителями липофильных лекарственных соединений, в том числе и лютеина. Однако, как показал анализ литературных данных, большие размеры и недостаточная агрегативная устойчивость ограничивают эффективность их применения. Известно, что использование углеводородного масла и стеариновой кислоты в качестве основы для носителей активных соединений позволяет получать агрегативно устойчивые высокодисперсные системы [38, 39], однако отсутствуют публикации, посвященные их комбинации, инкапсулированию в них лютеина и влиянию его на агрегативную и седиментационную устойчивость. В данной работе изучена устойчивость наноэмульсий с углеводородным маслом, твердых липидных наночастиц со стеариновой кислотой и наноструктурированных липидных частиц, содержащих углеводородное масло и стеариновую кислоту. Биодоступность данных липидных дисперсий с инкапсулированным лютеином определяли по их влиянию на восстановление скорости кровотока при моделировании гемической гипоксии.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Реактивы и материалы

В составе липидных наночастиц в качестве органической фазы использовали углеводородное масло (Britol 20 USP, puriss) и стеариновую кислоту (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$). В качестве ПАВ применяли полиэтиленгликоль сорбитанмоностеарат — Tween 60 (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$) и сорбитанмоностеарат — Span 60 (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$). В качестве водной фазы выступал физиологический раствор (0.15 M NaCl), для приготовления которого использовали NaCl (Merck, extra pure) и бидистиллированную воду. В качестве биологически активного соединения, инкапсулированного в липидных наночастицах, использовали масляный экстракт лютеина ($\geq 20\%$; Shaanxi Jiahe Phytohem Co.). Реактивы, использованные в работе, дополнительной очистке не подвергали.

2.2. Получение дисперсий липидных наночастиц

Дисперсии липидных наночастиц получали методом температурной инверсии фаз [40]. В случае наноэмульсий органическая фаза состояла из углеводородного масла, твердые липидные наночастицы состояли из стеариновой кислоты, наноструктурированные липидные частицы — из смеси

углеводородного масла и стеариновой кислоты в массовом соотношении 1 : 1. Доля органической фазы в дисперсиях составляла 25 об. %. Для стабилизации использовали 15 об. % смесь Tween 60 и Span 60 в мольном соотношении 0.76 [38]. Объем получаемых дисперсий составлял 10 мл.

Для получения дисперсий липидных наночастиц в стеклянный сосуд помещали углеводородное масло, либо стеариновую кислоту, либо смесь углеводородного масла и стеариновой кислоты, а также смесь Tween 60 и Span 60 и водный раствор NaCl. Полученную смесь нагревали до температуры, превышающей температуру инверсии фаз, при умеренном перемешивании. Затем смесь охлаждали в ледяной бане с температурой 0°C при интенсивном перемешивании.

В липидных наночастицах с инкапсулированным биологически активным соединением концентрация лютеина составляла 0.1 мас. %. Лютеин предварительно растворяли в углеводородном масле, стеариновой кислоте или их смеси при 80°C. Дальнейшее получение липидных наночастиц проводили по методике, описанной выше.

2.3. Исследование физико-химических свойств липидных наночастиц

Определение диаметра липидных наночастиц проводили методом динамического светорассеяния с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), оснащенный гелий-неоновым лазером ($\lambda = 633$ нм) с регистрацией рассеянного света под углом 173°. Определение размеров наночастиц проводили без разбавления систем. Каждое измерение включало в среднем 14 пробегов. Распределения липидных наночастиц по размерам определяли с использованием модели Multiple Narrow Modes. В данной работе использовали гистограммы распределения размеров частиц по их объемной доле. Измерения проводили при 25°C. По результатам не менее пяти измерений каждого образца рассчитывали средние значения диаметров наночастиц.

Электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) липидных наночастиц рассчитывали на основании измерений электрофоретической подвижности частиц с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Для определения ζ -потенциала липидных наночастиц дисперсии были разбавлены в 100 раз физиологическим раствором. Измерения проводили при 25°C. Каждый исследуемый образец анализировали не менее пяти раз и рассчитывали среднее значение.

Устойчивость дисперсий липидных наночастиц к агрегации и последующей седиментации исследовали путем анализа обратного светорассеяния монохромного излучения с использованием Multiscan MS 20 (DataPhysics Instruments GmbH).

Измерения интенсивности обратного светорассеяния проводили при сканировании образца по высоте с шагом 20 мкм, скорость сканирования составляла 12.5 мм/с. Длина волны монохромного излучения была равна 880 нм. Измерения проводили при 25°C, между измерениями образцы хранили при той же температуре. С использованием полученных данных были построены зависимости обратного светорассеяния от высоты образца, на которых высота образца с дисперсией липидных наночастиц обозначена как расстояние от дна сосуда и выражена в относительных величинах — от 0 до 1.

2.4. Оценка биодоступности инкапсулированного лютеина

Оценку биологической активности дисперсий липидных наночастиц осуществляли методом ультразвуковой доплерографии на куриных эмбрионах с помощью ультразвукового доплеровского сканера Минимакс-Допплер-К (СП Минимакс) и программного обеспечения Minimax Doppler v.1.7. Для анализа использовали 9-дневные куриные эмбрионы. Поскольку скорость кровотока прямо пропорциональна давлению крови, ее изменение является свидетельством изменения кровяного давления и может использоваться для определения биологической активности веществ, обладающих потенциальным гипер- или гипотензивным действием. Для анализа скорости кровотока использовали датчик с частотой 25 МГц.

Анализ осуществляли в соответствии с методикой [41]. Куриные эмбрионы предварительно выдерживали при 37.8–38.0°C в течение 1 сут, а исследуемые образцы термостатировали при той же температуре не менее 2 ч. Воздушную камеру эмбриона освобождали от скорлупы и удаляли подскорлуповую оболочку, предварительно смочив ее физиологическим раствором и исключая повреждения хориоаллантоисной оболочки, затем наносили 400 мкл физиологического раствора для предотвращения высыхания. Для измерения скорости кровотока выбирали наиболее крупный сосуд на поверхности хориоаллантоисной оболочки и определяли скорость венозного кровотока в нем (нулевое измерение). Датчик располагали под углом 60° к сосуду и выбирали такое положение, при котором наблюдались слабые по амплитуде, без острых пиков пульсации на доплерограммах. Для анализа раздражающего действия дисперсий измерения проводили через 10, 30 и 60 мин. Между измерениями яйцо помещали в термостат с температурой 37.8–38.0°C.

Для анализа гипер- или гипотензивного действия дисперсий липидных наночастиц осуществляли моделирование гемической гипоксии посредством введения 400 мкл 0.15 М раствора нитрита натрия на хориоаллантоисную оболочку сразу

после нулевого измерения. Исследуемые дисперсии липидных наночастиц, незагруженных и загруженных лютеином, предварительно разбавляли в 100 раз физиологическим раствором. Через 5 мин после введения раствора нитрита натрия на хориоаллантоисную оболочку наносили 400 мкл разбавленной дисперсии липидных наночастиц. Скорость венозного кровотока измеряли через 5, 25 и 55 мин после введения дисперсии липидных наночастиц, что соответствует 10, 30 и 60 мин после начала эксперимента.

Каждое измерение проводили не менее трех раз. Все системы были исследованы не менее, чем на пяти куриных эмбрионах. По полученным результатам находили среднее значение.

Исследования на хориоаллантоисной оболочке куриных эмбрионов не считаются экспериментальными на животных в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей, поскольку до 11 дня нервная система куриных эмбрионов не развивается.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние состава органической фазы на средний размер липидных наночастиц и устойчивость их дисперсий

В данной работе липидные наночастицы получали с использованием метода температурной инверсии фаз [38], в котором сначала получают обратную макроэмульсию при повышенной температуре. Затем эту макроэмульсию резко охлаждают ниже температуры инверсии фаз, что приводит к образованию прямой наноэмульсии или дисперсии липидных наночастиц. Для стабилизации липидных наночастиц использовали смесь ПАВ с высоким и низким значениями гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) Tween 60 (ГЛБ 14.9) и Span 60 (ГЛБ 4.7), что позволяло эффективно стабилизировать как обратную макроэмульсию, так и прямую липидную нанодисперсию. Как было показано ранее, при адсорбции Tween 60 и Span 60 на поверхности липидных наночастиц образуется твердообразная оболочка, что способствует увеличению агрегативной устойчивости систем [9, 38, 42].

В наноэмульсиях с углеводородным маслом средний диаметр капель составлял 28 ± 5 нм (рис. 1а). Также в системе было небольшое количество флокул, но их содержание не превышало 1.7 об. %. Через 30 сут средний диаметр нанокapель практически не изменялся, количество флокул не увеличивалось. Это свидетельствует о высокой агрегативной устойчивости наноэмульсий.

Включение в состав органической фазы стеариновой кислоты в массовом соотношении с уг-

леводородным маслом 1 : 1 не приводило к заметному изменению размеров наноструктурированных липидных частиц. Их диаметр составлял 30 ± 5 нм (рис. 1б). В липидной дисперсии присутствовали агрегаты наночастиц со средним размером ~ 350 нм. Данные системы также были устойчивыми, средний диаметр частиц изменялся незначительно за 30 сут. При этом количество агрегатов наночастиц с течением времени немного возросло, но не превышало 5.6 об. %.

Размер твердых липидных наночастиц со стеариновой кислотой составлял 28 ± 5 нм (рис. 1в). С течением времени наблюдалось некоторое увеличение содержания агрегатов от 2.0 до 6.2 об. %.

Сканирование по высоте столба наноэмульсий и дисперсий наноструктурированных липидных частиц показало, что обратное светорассеяние практически не изменялось более 30 сут (рис. 2а и 2б). Если не учитывать флуктуации светорассеяния, то его величина была относительно постоянной по высоте столба липидных дисперсий, что свидетельствует об однородности структуры этих систем в течение длительного времени.

В дисперсиях твердых липидных наночастиц со стеариновой кислотой наблюдалось некоторое снижение обратного светорассеяния в нижней части сосуда (рис. 2в). Это может свидетельствовать о протекании обратной седиментации агрегатов наночастиц и некотором уменьшении концентрации частиц около дна сосуда. Это снижение концентрации органической фазы в нижних слоях было незаметно невооруженным глазом и не сопровождалось отслаиванием водной фазы.

ζ -потенциал капель дисперсной фазы в наноэмульсии составлял $-(1.8 \pm 0.4)$ мВ, наноструктурированных липидных частиц $-(1.6 \pm 0.5)$ мВ, твердых липидных наночастиц $-(1.2 \pm 0.7)$ мВ. Исследованные липидные наночастицы были стабилизированы неионогенными ПАВ, поэтому их поверхностный заряд был таким низким. При этом наноэмульсии были кинетически стабильны в течение более 30 сут. В дисперсиях твердых липидных наночастиц и наноструктурированных липидных частиц в некоторой степени протекала агрегация, но ее скорость была очень низкой, и это не приводило к расслаиванию систем. Наиболее вероятно, что устойчивость дисперсий была следствием образования твердообразной оболочки ПАВ на поверхности липидных наночастиц [38]. Наночастицы сталкивались в результате броуновского движения как “жесткие шары”, т. е. столкновения не были эффективными и не приводили к агрегации.

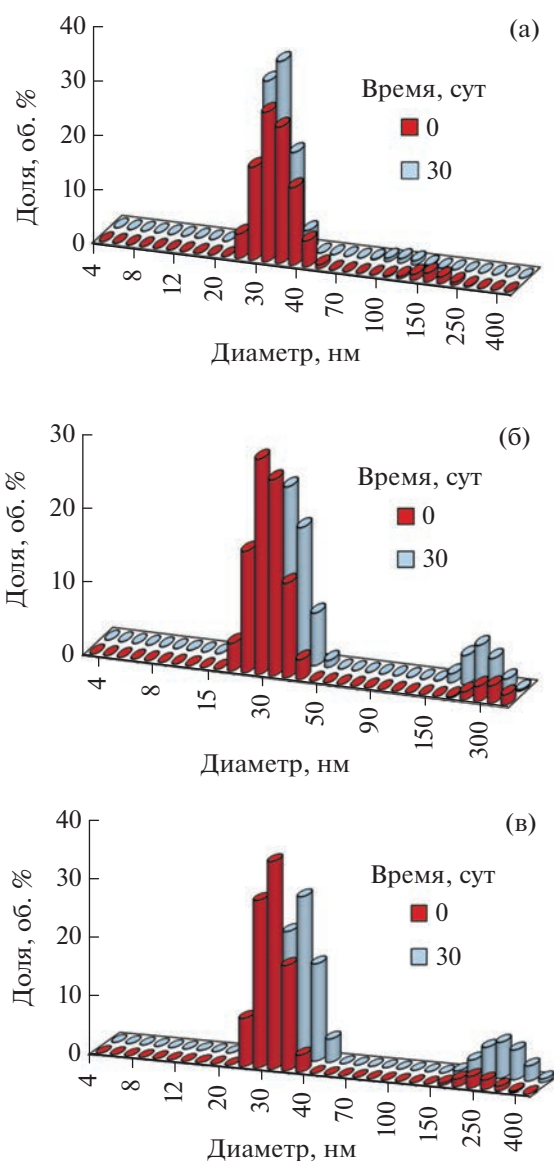


Рис. 1. Распределения по размерам капель дисперсной фазы в наноэмульсии с углеводородным маслом (а), наноструктурированных липидных частиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом в массовом соотношении 1 : 1 (б), твердых липидных наночастиц со стеариновой кислотой (в).

3.2. Влияние инкапсулированного лютеина на дисперсность и устойчивость дисперсий липидных наночастиц

Лютеин является природным пигментом и относится к группе гидроксилированных каротиноидов. Благодаря наличию полярных групп лютеин обладает амфифильными свойствами. Известно, что биодоступность лютеина, поступающего с пищей, повышается в присутствии липидов. Он встраивается в структуру мицелл, располагаясь на границе раздела фаз. При инкапсулировании в липидные наночастицы данное биологически ак-

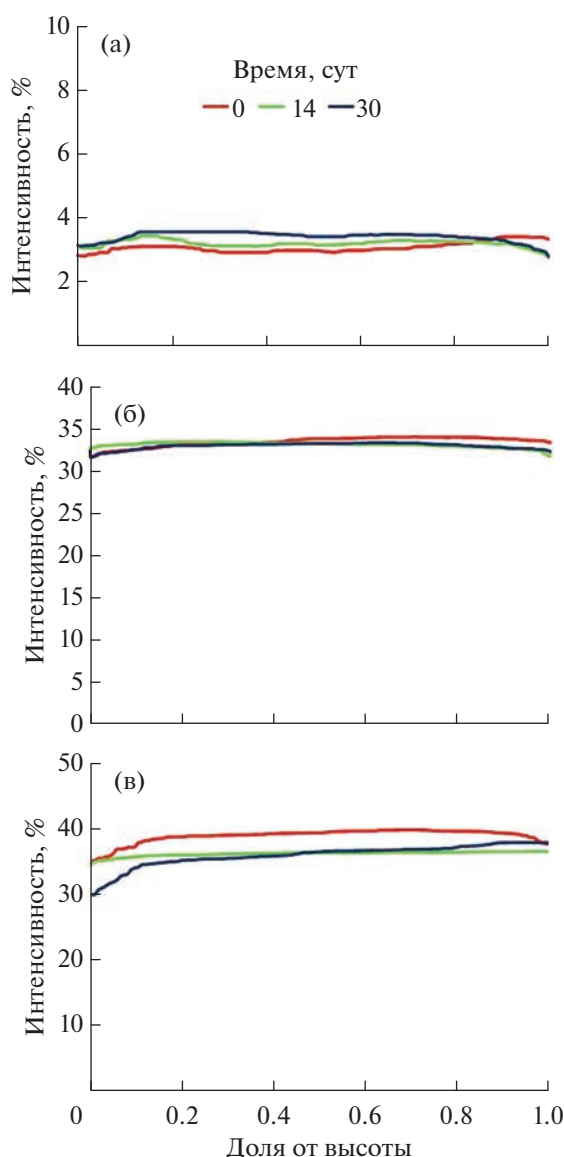


Рис. 2. Интенсивности обратного светорассеяния в наномульсии с углеводородным маслом (а), дисперсии наноструктурированных липидных частиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом в массовом соотношении 1 : 1 (б), дисперсии твердых липидных наночастиц со стеариновой кислотой (в).

тивное соединение может оказывать влияние как на дисперсность, так и на стабильность липидных дисперсий. Концентрация лютеина в исследованных дисперсиях липидных наночастиц составляла 0.1 мас. %. Данная концентрация была получена расчетным путем, исходя из пересчета суточной дозы, необходимой человеку, на массу эмбриона с учетом объема аликвоты, вносимой при измерении скорости кровотока (см. раздел 3.3).

Исследования показали, что при инкорпорировании лютеина в наномульсии диаметр капель дисперсной фазы практически не изменялся

(табл. 1). Включение лютеина в липидные наночастицы, в состав которых входила стеариновая кислота, заметно влияло на их размер.

При этом средний размер наноструктурированных липидных частиц с лютеином был немного больше, чем твердых липидных наночастиц. По-видимому, лютеин, обладая амфифильными свойствами, наряду со стеариновой кислотой частично встраивался в адсорбционный слой на поверхности липидных наночастиц, что способствовало уменьшению их размера.

Следует отметить, что все исследованные липидные системы с лютеином были стабильны более 30 сут. В течение этого времени средний размер липидных наночастиц изменялся в пределах погрешности измерений.

3.3. Оценка биодоступности лютеина, инкапсулированного в липидные наночастицы

9-дневный куриный эмбрион является распространенным объектом, на котором проводят исследования действия различных биологически активных соединений. К этому времени у него формируется развитая сосудистая сеть, но при этом белочная оболочка еще достаточно тонкая и возможно ее удаление без повреждения кровеносных сосудов. Хориоаллантоисная оболочка, прилегающая к белочной, является естественной окружающей средой для кровеносных сосудов и обеспечивает их взаимодействие с эмбрионом [34].

Влияние ненагруженных липидных наночастиц в отсутствии гемической гипоксии на скорость кровотока

Определение влияния дисперсий липидных наночастиц проводили в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.4: разбавленную дисперсию липидных наночастиц наносили на хориоаллантоисную оболочку и измеряли скорость кровотока через определенные промежутки времени.

Как показали результаты измерений, при нанесении каждой из трех липидных дисперсий скорость кровотока уменьшалась не более чем на 4% (рис. 3). Такие колебания скорости кровотока являются допустимыми и связаны с жизнедеятельностью куриного эмбриона. Это показывает, что наномульсии, наноструктурированные липидные частицы и твердые липидные наночастицы данного состава и размера не оказывают существенного влияния на интенсивность кровотока куриных эмбрионов и могут быть использованы в качестве носителей для повышения биодоступности биологически активных соединений.

Таблица 1. Размер липидных наночастиц незагруженных и с инкапсулированным лютеином

Состав дисперсной фазы	Средний диаметр наночастиц без лютеина, нм	Средний диаметр наночастиц с лютеином, нм	
	0 сут	0 сут	30 сут
Углеводородное масло	28 ± 5	28 ± 5	32 ± 5
Углеводородное масло : стеариновая кислота (1 : 1)	30 ± 5	17 ± 2	20 ± 5
Стеариновая кислота	28 ± 5	15 ± 2	18 ± 3

Влияние липидных наночастиц с инкапсулированным лютеином на скорость кровотока при моделировании гемической гипоксии

Для оценки биодоступности лютеина, инкапсулированного в липидные наночастицы, были проведены исследования по восстановлению скорости кровотока куриных эмбрионов после моделирования гемической гипоксии. На хориоаллантаоисную оболочку наносили нитрит натрия, а затем — разбавленную дисперсию ненагруженных липидных наночастиц или липидных наночастиц с инкапсулированным лютеином, и для сравнения — водно-спиртовой раствор лютеина (0.1 мас. % раствор лютеина в этиловом спирте, разбавленный в 100 раз физиологическим раствором). Также наблюдали за контрольным образцом без воздействия липидных наночастиц и лютеина, в котором скорость кровотока восстанавливалась естественным образом.

Нанесение раствора нитрита натрия как наиболее известного метгемоглобинообразователя приводило к формированию гипоксического состояния. В результате этого наблюдалось резкое снижение скорости кровотока. Как видно на рис. 4, в течение первых 5 мин после введения нитрита натрия скорость кровотока уменьшилась более чем на 18%. Естественное восстановление скорости кровотока после моделирования гемической гипоксии происходило медленно и не достигало величин, близких к исходным, в течение 1 ч исследований.

Лютеин относится к природным каротиноидам, обладающим антиоксидантным и противовоспалительным действиями. Известно его положительное воздействие при атеросклерозе, артериальной гипотензии и др. [36]. Он способствует связыванию активных форм кислорода и, как следствие, снижению воздействия свободных радикалов на клетки крови и кровеносных сосудов [37]. Таким образом, нанесение лютеина ожидаемо способствовало нормализации кровяного давления и восстановлению скорости кровотока после моделирования гемической гипоксии у куриных эмбрионов. При нанесении водно-спиртового раствора лютеина на хориоаллантаоисную оболочку наблюдалось заметное снижение интенсивности уменьшения скорости крово-

тока и более быстрое его восстановление. Однако использование таких лекарственных форм нецелесообразно из-за раздражающего действия этанола.

При инкапсулировании лютеина в липидных наночастицах заметно возрастала его биодоступность. Практически сразу же после нанесения липидных наночастиц на хориоаллантаоисную оболочку снижение скорости кровотока прекращалось и через 5–10 мин наблюдалась тенденция к его восстановлению. Наиболее заметное влияние обнаружили при воздействии наноземульсии с углеводородным маслом. В течение 5 мин после их нанесения на хориоаллантаоисную мембрану куриных эмбрионов происходило практически полное восстановление скорости кровотока. При нанесении дисперсии наноструктурированных липидных частиц и твердых липидных наночастиц скорость кровотока восстанавливалась немного медленнее по сравнению с наноземульсиями, но значительно быстрее, чем без воздействия лютеина. По-видимому, наличие жидкого при физиологической температуре углеводородного масла в липидных наночастицах способствовало более быстрому высвобождению лютеина, что увеличивало эффективность его воздействия на кровеносную систему куриных эмбрионов.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность применения липидных наночастиц для повышения биодоступности биологически активных соединений связана с их дисперсностью, агрегативной и седиментационной устойчивостью. Кроме этого, компоненты, входящие в их состав, должны обладать высокой биосовместимостью и биоразлагаемостью. В данной работе были исследованы системы со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, стабилизированные неионогенными ПАВ Tween 60 и Span 60.

Размер полученных наночастиц с углеводородным маслом, стеариновой кислотой и с их смесью в массовом соотношении 1 : 1 составлял 30 ± 5 нм, слабо зависел от состава дисперсной фазы и оставался неизменным более 30 сут. Инкапсулирование лютеина в наноземульсии с углеводородным маслом практически не влияло на

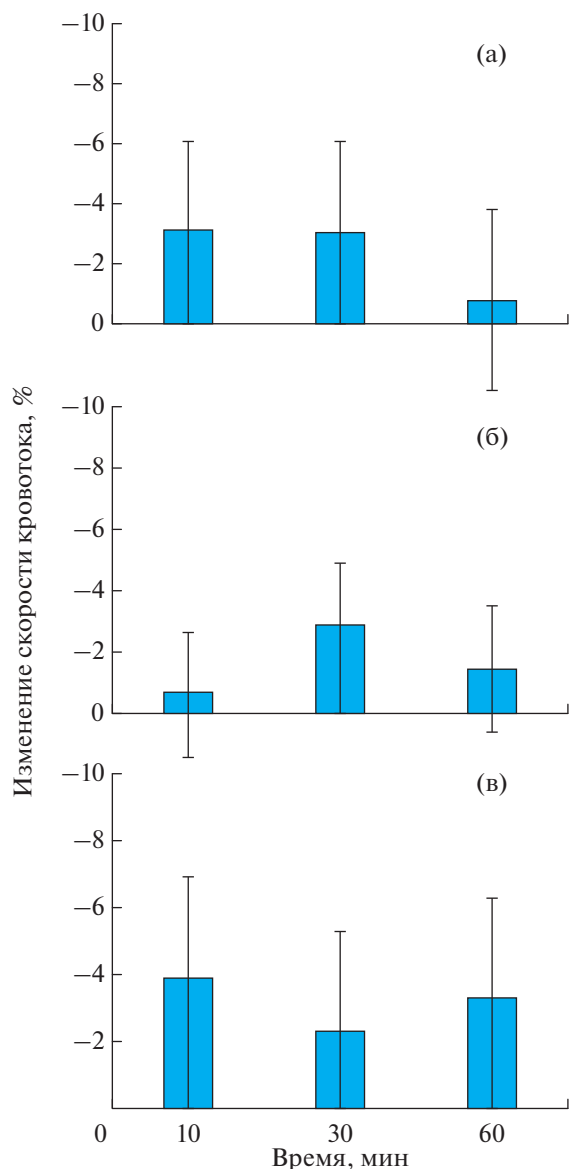


Рис. 3. Изменение скорости венозного кровотока куриных эмбрионов после введения наноэмульсии с углеводородным маслом (а), дисперсии наноструктурированных липидных частиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом в массовом соотношении 1 : 1 (б), дисперсии твердых липидных наночастиц со стеариновой кислотой (в).

размер нанокapпель. Инкорпорирование лютеина в липидные наночастицы, содержащие стеариновую кислоту, приводило к уменьшению их размеров до 15–17 нм. При этом все исследованные липидные системы с лютеином были стабильны более 30 сут.

Изучение биодоступности лютеина при инкапсулировании в липидные наночастицы проводили на 9-дневных куриных эмбрионах. Оценивали их влияние на восстановление скорости кровотока при моделировании гемической гипоксии.

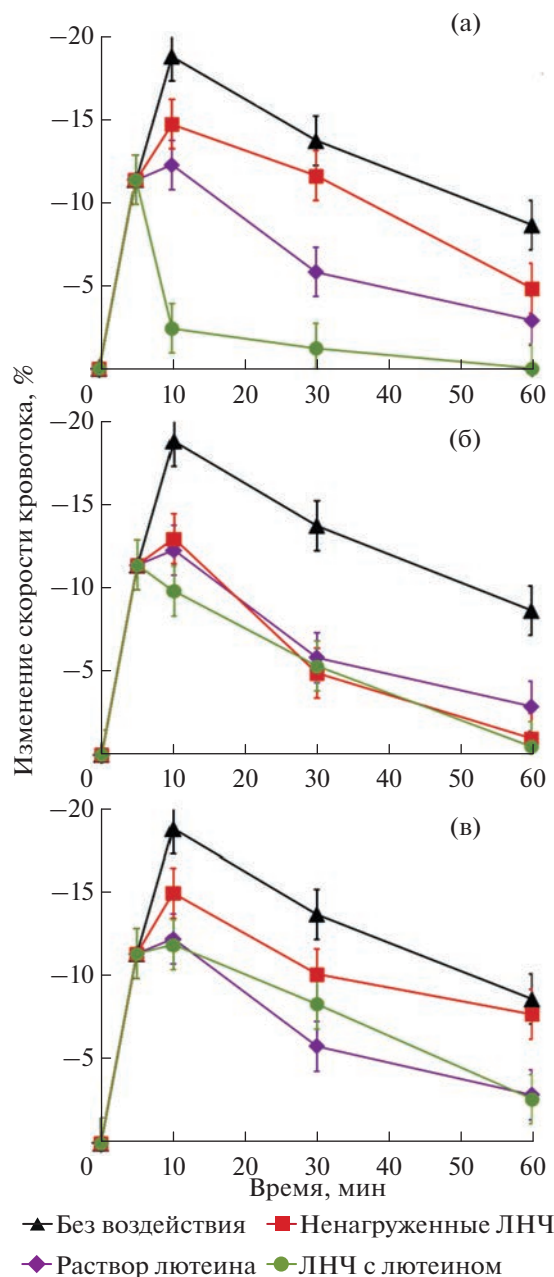


Рис. 4. Изменение скорости венозного кровотока куриных эмбрионов при моделировании гемической гипоксии после введения наноэмульсии с углеводородным маслом (а), дисперсии наноструктурированных липидных частиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом в массовом соотношении 1 : 1 (б), дисперсии твердых липидных наночастиц со стеариновой кислотой (в). ЛНЧ – липидные наночастицы.

После нанесения липидных наночастиц снижение скорости кровотока прекращалось, и через 5–10 мин наблюдалась тенденция к его восстановлению. Это показывает перспективность использования липидных наночастиц с углеводородным маслом и стеариновой

кислотой для доставки липофильных лекарственных соединений.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность руководителю Испытательной лаборатории биологической активности и токсикологической безопасности Е.Ю. Белянкиной и генеральному директору Завода экологической техники и экопитания “Диод” В.П. Тихонову за возможность проведения исследований по изучению биодоступности лутеина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tadros T., Izquierdo P., Esquena J. Solans C.* Formation and stability of nano-emulsions // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2004. V. 108. P. 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
2. *McClements D.J., Decker E.A., Weiss J.* Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components // *J. Food Sci.* 2007. V. 72. № 8. P. 109–124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
3. *Khosa A., Reddi S., Saha R.N.* Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery // *Biomed. & Pharmacother.* 2018. V. 103. P. 598–613. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.055>
4. *Tang C.H., Chen H.L., Dong J.R.* Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) as food-grade nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals or bioactives // *Appl. Sci.* 2023. V. 13. № 3. P. 1726. <https://doi.org/10.3390/app13031726>
5. *Zhong Q., Zhang L.* Nanoparticles fabricated from bulk solid lipids: Preparation, properties, and potential food applications // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2019. V. 273. P. 102033. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102033>
6. *Gordillo-Galeano A., Mora-Huertas C.E.* Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 133. P. 285–308. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.017>
7. *McClements D.J., Jafari S.M.* General aspects of nanoemulsions and their formulation // *Nanoemulsions: Academic press.* 2018. P. 3–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1>
8. *Koroleva M.Y., Yurtov E.V.* Nanoemulsions: The properties, methods of preparation and promising applications // *Russ. Chem. Rev.* 2012. V. 81. № 1. P. 21–43. <https://doi.org/10.1070/RC2012v081n01ABEH004219>
9. *Koroleva M., Portnaya I., Mischenko E., Abutbul-Ionita I., Kolik-Shmuel L., Danino D.* Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability // *J. Colloid Interface Sci.* 2022. V. 610. P. 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.12.010>
10. *Higuchi W.I., Misra J.* Physical degradation of emulsions via the molecular diffusion route and the possible prevention thereof // *J. Pharm. Sci.* 1962. V. 51. № 5. P. 459–466. <https://doi.org/10.1002/jps.2600510514>
11. *Koroleva M.Y., Yurtov E.V.* Ostwald ripening in macro- and nanoemulsions // *Russ. Chem. Rev.* 2021. V. 90. № 3. P. 293–323. <https://doi.org/10.1070/RCR4962>
12. *Ribeiro M.D.M.M., Arellano D.B., Grosso C.R.F.* The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process // *Food Res. Int.* 2012. V. 47. № 1. P. 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.007>
13. *Jeitler R., Glader C., Tetyczka C., Zeiringer S., Absenger-Novak M., Selmani A., Fröhlich E., Roblegg E.* Investigation of cellular interactions of lipid-structured nanoparticles with oral mucosal epithelial cells // *Frontiers in Mol. Biosci.* 2022. V. 9. P. 917921. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.917921>
14. *Dantas I.L., Bastos K.T.S., Machado M., Galvao J.G., Lima A.D., Gonsalves J.K.M.C., Almeida E.D.P., Araújo A.A.S., de Meneses C.T., Sarmiento V.H.V., Nunes R.S., Lira A.A.M.* Influence of stearic acid and beeswax as solid lipid matrix of lipid nanoparticles containing tacrolimus // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2018. V. 132. P. 1557–1566. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7072-7>
15. *Pinto F., de Barros D.P., Reis C., Fonseca L.P.* Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with retinoids by central composite design // *J. Mol. Liq.* 2019. V. 293. P. 111468. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111468>
16. *de Souza I.D., Saez V., de Campos V.E., Mansur C.R.* Size and vitamin E release of nanostructured lipid carriers with different liquid lipids, surfactants and preparation methods // *Macromolecular Symposia.* 2019. V. 383. № 1. P. 1800011. <https://doi.org/10.1002/masy.201800011>
17. *Almeida E.D.P., Silva L.A.S., de Araújo G.R.S., Montalvão M.M., Matos S.S., da Cunha Gonsalves J.K.M., de Souza Nunes R., de Meneses C.T., Araújo R.G.O., Sarmiento V.H.V., de Lucca Junior W., Correa C.B., Rodrigues Júnior J.J., Lira A.A.M.* Chitosan-functionalized nanostructured lipid carriers containing chloroaluminum phthalocyanine for photodynamic therapy of skin cancer // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2022. V. 179. P. 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.09.009>
18. *Sánchez-López E., Espina M., Doktorovova S., Souto E.B., García M.L.* Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye—Part II—Ocular drug-loaded lipid nanoparticles // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017. V. 110. P. 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.10.013>
19. *Matarazzo A.P., Elisei L.M.S., Carvalho F.C., Bonfílio R., Ruela A.L.M., Galdino G., Pereira G.R.* Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2021. V. 159. P. 105698. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105698>
20. *Lüdike F.L., Stahl M.A., Grimaldi R., Forte M.B.S., Gigante M.L., Ribeiro A.P.B.* Optimization of high pressure homogenization conditions to produce nanostructured lipid carriers using natural and synthetic emulsi-

- fiers // Food Res. Int. 2022. V. 160. P. 111746.
https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111746
21. Kelidari H.R., Saeedi M., Akbari J., Morteza-Semnani K., Valizadeh H., Maniruzzaman M., Farmoudeh A., Nokhodchi A. Development and optimisation of spironolactone nanoparticles for enhanced dissolution rates and stability // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2017. V. 18. P. 1469–1474.
https://doi.org/10.1208/s12249-016-0621-0
 22. Shirokikh A.D., Anikina V.A., Zamyatina E.A., Mishchenko E.V., Koroleva M.Y., Ivanov V.K., Popova N.R. Bioavailability of nanoemulsions modified with curcumin and cerium dioxide nanoparticles // Nanosystems: Phys. Chem. Math. 2023. V. 14. № 1. P. 89–97.
https://doi.org/10.17586/2220-8054-2023-14-1-89-97
 23. Gadad A.P., Tigadi S.G., Dandagi P.M., Mastiholmath V.S., Bolmal U.B. Rosuvastatin loaded nanostructured lipid carrier: For enhancement of oral bioavailability // Indian J. Pharm. Ed. Res. 2016. V. 50. № 4. P. 605–611.
https://doi.org/10.5530/ijper.50.4.13
 24. Moghddam S.M.M., Ahad A., Aqil M., Imam S.S., Sultana Y. Optimization of nanostructured lipid carriers for topical delivery of nimesulide using Box–Behnken design approach // Artif. Cells, Nanomed., and Biotechnol. 2017. V. 45. № 3. P. 617–624.
https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1167699
 25. Becerra M.O., Contreras L.M., Lo M.H., Díaz J.M., Herrera G.C. Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability // J. Funct. Foods. 2020. V. 66. 103771.
https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103771
 26. Ozawa Y., Sasaki M., Takahashi N., Kamoshita M., Miyake S., Tsubota K. Neuroprotective effects of lutein in the retina // Curr. Pharm. Des. 2012. V. 18. № 1. P. 51–56.
https://doi.org/10.2174/138161212798919101
 27. Ahn Y.J., Kim H. Lutein as a modulator of oxidative stress-mediated inflammatory diseases // Antioxidants. 2021. V. 10(9). P. 1448.
https://doi.org/10.3390/antiox10091448
 28. Wang Y., Geng M., Zhang X., Yan M., Sun L., Zhao Q. Preparation of lutein nanoemulsion by ultrasonic homogenization method: Stability and *in vitro* anti-inflammatory activity // Algal Res. 2023. V. 73. P. 103154.
https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103154
 29. Lim C., Kim D.W., Sim T., Hoang N.H., Lee J.W., Lee E.S., Youn Y.S., Oh K.T. Preparation and characterization of a lutein loading nanoemulsion system for ophthalmic eye drops // J. Drug Delivery Sci. Technol. 2016. V. 36. P. 168–174.
https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.10.009
 30. Doost A.S., Afghari N., Abbasi H., Nasrabadi M.N., Dewettinck K., Van der Meeren P. Nano-lipid carriers stabilized by hydrophobically modified starch or sucrose stearate for the delivery of lutein as a nutraceutical beverage model // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 2020. V. 605. P. 125349.
https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125349
 31. Weigel F., Weiss J., Decker E.A., McClements D.J. Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability // Food Chem. 2018. V. 242. P. 395–403.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.060
 32. Teo A., Lee S.J., Goh K.K., Wolber F.M. Kinetic stability and cellular uptake of lutein in WPI-stabilised nanoemulsions and emulsions prepared by emulsification and solvent evaporation method // Food Chem. 2017. V. 221. P. 1269–1276.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.030
 33. Toragall V., Srirangam P., Jayapala N., Baskaran V. Lutein encapsulated oleic-linoleic acid nanoemulsion boosts oral bioavailability of the eye protective carotenoid lutein in rat model // Mater. Today Commun. 2021. V. 28. P. 102522.
https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102522
 34. Lacatusu I., Mitrea E., Badea N., Stan R., Oprea O., Meghea A. Lipid nanoparticles based on omega-3 fatty acids as effective carriers for lutein delivery. Preparation and *in vitro* characterization studies // J. Funct. Foods. 2013. V. 5. № 3. P. 1260–1269.
https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.04.010
 35. Tan F., Cui H., Bai C., Qin C., Xu L., Han J. Preparation, optimization, and transcorneal permeability study of lutein-loaded solid lipid nanoparticles // J. Drug Delivery Sci. Technol. 2021. V. 62. P. 102362.
https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102362
 36. Liu M., Wang F., Pu C., Tang W., Sun Q. Nanoencapsulation of lutein within lipid-based delivery systems: Characterization and comparison of zein peptide stabilized nano-emulsion, solid lipid nanoparticle, and nano-structured lipid carrier // Food Chem. 2021. V. 358. P. 129840.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129840
 37. Mitri K., Shegokar R., Gohla S., Anselmi C., Müller R.H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance // Int. J. Pharm. 2011. V. 414. № 1–2. P. 267–275.
https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.008
 38. Koroleva M., Nagovitsina T., Yurtov E. Properties of nanocapsules obtained from oil-in-water nanoemulsions // Mendelev Commun. 2015. V. 25. P. 389–390.
https://doi.org/10.1016/j.mencom.2015.09.026
 39. Koroleva M., Portnaya I., Mischenko E., Abutbul-Ionita I., Kolik-Shmuel L., Danino D. Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability // J. Colloid Interface Sci. 2022. V. 610. P. 61–69.
https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.12.010
 40. Izquierdo P., Feng J., Esquena J., Tadros T.F., Dederen J.C., Garcia M.J., Azemar N., Solans C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the PIT method // J. Colloid Interface Sci. 2005. V. 285. № 1. P. 388–394.
https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.047
 41. Tikhonov V.P., Shevchenko T.V., Rodina I.A., Beljankina E.J., Pligina K.L., Makarova M.N., Girina M.B. Method of evaluating irritating action and activity of natural, synthetic substances and ready preparations on chick embryos by method of ultrasonic dopplerography // RF patent: RU 2383888 C1. 2010.
 42. Mishchenko E.V., Timofeeva E.E., Artamonov A.S., Portnaya I.B., Koroleva M.Y. Nanoemulsions and nanocapsules with oleic acid // Colloid J. 2022. V. 84. № 1. P. 64–70.
https://doi.org/10.1134/S1061933X22010082