

На правах рукописи

**Кузнецова Дарья Александровна**

**СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ КАТИОННЫХ  
ПАВ, СОДЕРЖАЩИХ ПРИРОДНЫЙ ФРАГМЕНТ:  
АГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С  
БИОМОЛЕКУЛАМИ**

02.00.04 – Физическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Казань – 2019

Работа выполнена в лаборатории Высокоорганизованных сред Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

Научный руководитель: Доктор химических наук, профессор  
**Захарова Люция Ярулловна**

Официальные оппоненты: **Штыков Сергей Николаевич**,  
Доктор химических наук, профессор,  
федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Саратовский национальный  
исследовательский государственный  
университет имени Н.Г. Чернышевского»,  
кафедра аналитической химии и химической  
экологии, профессор

**Бурилов Владимир Александрович**,  
кандидат химических наук,  
федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет», кафедра  
органической химии, доцент

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Тверской государственный  
университет»

Защита состоится «19» июня 2019 года в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 022.004.02 при ФИЦ КазНЦ РАН по адресу: г. Казань, ул. Академика Арбузова, дом 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, конференц-зал.

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

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

Автореферат разослан «23» апреля 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



А.В. Торопчина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В настоящее время амфифильные соединения, в том числе, поверхностно-активные вещества (ПАВ), востребованы во многих высокоэффективных технологиях, направленных на доставку лекарственных средств. Амфифильные соединения применяют для увеличения растворимости и биодоступности лекарств, создания невирусных векторов – переносчиков ДНК, и модификации липидных носителей лекарственных веществ, что позволяет решить проблему химической и физической нестабильности традиционно используемых липосом и увеличивает их способность преодолевать биологические барьеры. Значительный потенциал в области биотехнологий имеют системы ПАВ-биополимер. Введение амфифилов, содержащих биофрагменты, инициирует комплементарные взаимодействия, позволяет контролировать порог агрегации и стабилизировать подобные комплексы, что имеет большое значение для диагностики и лечения некоторых генетических заболеваний, связанных с агрегацией белков. Высокое прикладное значение наносистем на основе ПАВ, их биомиметический характер и соответствие критериям «зеленой химии» стимулируют поиск новых амфифильных соединений с заданными функциональными свойствами. Для достижения этой цели необходимо решить ключевую фундаментальную задачу: установление корреляции «химическая структура амфифила – свойство системы». Выявление подобных закономерностей позволит осуществлять направленный дизайн амфифильных соединений и прогнозировать функциональную активность систем на их основе. Вышеизложенное обуславливает актуальность представляемой работы, ее практическую значимость и научный потенциал.

**Степень разработанности темы исследования.** Синтез новых амфифильных соединений и их практическое применение привлекают широкое внимание исследователей. Вместе с тем имеется ряд нерешенных проблем в области физикохимии организованных систем, связанных с созданием супрамолекулярных ансамблей с заданными свойствами, контролем их морфологических и функциональных характеристик, снижением токсичности синтетических амфифилов. Одним из способов создания биомиметических наносистем, обладающих полифункциональной активностью и высоким сродством к биомолекулам, является введение в структуру ПАВ природных фрагментов. В рамках диссертационной работы исследованы супрамолекулярные системы на основе катионных ПАВ, содержащих имидазольный или пиримидиновый фрагменты, введение которых позволяет инициировать дополнительные межмолекулярные взаимодействия и обеспечивает разнообразное морфологическое поведение систем. Полученные данные представляют интерес для создания мицеллярных наноконтейнеров, модификации липосом, контроля вторичной структуры биополимеров.

**Целью работы** является создание полифункциональных супрамолекулярных систем с контролируемыми свойствами на основе катионных поверхностно-активных веществ, содержащих природный фрагмент (имидазольный или пиримидиновый), и оценка влияния структурного фактора на агрегационную, сольубилизационную, мембранотропную активность и связывание с биополианионами.

**Научная новизна работы.**

1. Показано влияние структурных факторов (длина гидрофобного радикала, варьирование структуры головной группы, наличие гидроксильных фрагментов) на агрегационную способность амфифильных соединений с природным фрагментом (имидазольный или пиримидиновый). Определены критическая концентрация ми-

целлообразования (ККМ), степень связывания противоионов, рН, гидродинамический диаметр, дзета-потенциал агрегатов.

2. Впервые проведена оценка комплексообразования имидазол- и пиримидинсодержащих ПАВ с декамером ДНК. Показано, что для амфифилов с планарными ароматическими головными группами реализуется неклассический механизм взаимодействия: высокая эффективность связывания компонентов в сочетании с низким уровнем нейтрализации заряда фосфатных фрагментов нуклеотидных звеньев.

3. Получены агрегационные характеристики бинарных систем на основе имидазолсодержащих ПАВ и бычьего сывороточного альбумина. Выявлены механизм взаимодействия компонентов и предпочтительные участки связывания амфифилов с белковой макромолекулой. Установлено, что имидазолсодержащие ПАВ в отличие от своих классических аналогов триметиламмониевого ряда не оказывают денатурирующего действия на белок.

4. Впервые получены липосомы на основе дипальмитоилфосфатидилхолина, модифицированные имидазолсодержащими ПАВ, для инкапсулирования лекарственного вещества метронидазола и нового производного бибензимидазола, обладающего противоопухолевой активностью. Показано, что лекарственные формы на основе полученных липидных формулировок обладают цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, сопоставимой с коммерческим препаратом доксорубицином, но не токсичны в отношении нормальной линии клеток.

**Методы исследования.** В рамках данной работы применяли широкий комплекс физико-химических методов исследования, в который входили тензиометрия, кондуктометрия, рН-метрия, динамическое и электрофоретическое рассеяние света, потенциометрия с использованием Вг-селективного электрода, флуориметрия, турбидиметрия, спектрофотометрия, трансмиссионная электронная микроскопия.

**Теоретическая и практическая значимость.** В диссертационной работе сформирована информационная база, характеризующая агрегационные и солюбилизационные свойства новых амфифильных соединений при варьировании длины алкильного радикала и природы головной группы. Определение закономерностей самоорганизации и функциональной активности амфифилов позволяет создавать биомиметические системы с контролируемыми свойствами. Это имеет важное практическое значение при разработке носителей для адресной доставки лекарственных веществ. В диссертационной работе получены новые супрамолекулярные системы на основе катионных ПАВ, способные к солюбилизации гидрофобных соединений, комплексообразованию с биополимерами, интегрированию в липидный бислой, представляющие перспективы для решения ряда биотехнологических задач в области доставки лекарственных средств.

**На защиту выносятся:**

1. Закономерность изменения агрегационной способности и адсорбционных параметров имидазол- и пиримидинсодержащих амфифилов при варьировании их структуры (длины углеводородного радикала, варьирования головной группы, введения гидроксильного фрагмента).

2. Количественная оценка комплексообразующей способности и механизма связывания катионных ПАВ с декамером ДНК.

3. Оценка влияния структуры головной группы и длины углеводородного радикала в ряду имидазолсодержащих ПАВ на комплексообразующую способность с белком – бычьим сывороточным альбумином, а также выявление механизма комплексообразования компонентов и молекулярных участков их взаимодействия.

4. Разработка модифицированных катионных липосом на основе имидазолсодержащих амфифилов для загрузки гидрофильных и гидрофобных субстратов на примере лекарственного вещества – метронидазола и нового биологически активного соединения 7-(бензимидазол-2-ил)-6-(2,4-дихлорфенил)-2-тиоксо-2,3-дигидроптеридин-4(1H)-она; выявление роли длины гидрофобного радикала в изменении эффективности инкапсулирования лекарственного соединения и свойств липосом.

**Обоснованность и достоверность полученных результатов** обусловлена применением широкого ряда физико-химических методов и подтверждается хорошим согласованием данных, полученных разными методами. Результаты работы интерпретированы в рамках современных теоретических представлений, согласуются с имеющимися литературными данными, опубликованы в рецензируемых журналах.

**Апробация работы.** На основе результатов, представленных в диссертационной работе, сделаны доклады на VI Бакеевской Всероссийской с международным участием школе-конференции для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты» (Москва, 2016); 9-ом Международном Симпозиуме «Молекулярная подвижность и порядок в полимерных системах» (Санкт-Петербург, 2017); 16-ом Международном Семинаре по соединениям включения и 3-ей Молодежной Школе по Супрамолекулярной и Координационной химии (Казань, 2017); XI Всероссийской школе – конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем (крестовские чтения)» (Иваново, 2017); XVI Международной конференции "Поверхностные силы" (Казань, 2018); 1-м Российско-Китайском Семинаре по Органической и Супрамолекулярной химии (Казань, 2018); V Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (Санкт-Петербург, 2018).

**Публикации.** Результаты диссертационного исследования опубликованы в 13 статьях в журналах, входящих в перечень, рекомендуемый ВАК РФ, и 12 тезисах докладов.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы (198 литературных ссылок на публикации отечественных и зарубежных авторов). Общий объем диссертации составляет 147 страниц, включая 18 таблиц, 86 рисунков.

**Личный вклад автора.** Приведенные в диссертационной работе результаты получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор выражает глубокую признательность руководителю диссертационной работы г.н.с. Захаровой Л.Я. за неоценимую помощь в инициировании и развитии диссертационной работы, н.с. Габдрахманову Д.Р. (лаборатория высокоорганизованных сред) за участие в обсуждении экспериментальных данных; с.н.с. Лукашенко С.С. (лаборатория высокоорганизованных сред) за синтез имидазолиевых амфифилов, г.н.с. Семенову В.Э. (лаборатория химии нуклеотидных оснований) за предоставление пиримидинсодержащих ПАВ; г.н.с. Мамедову В.А. (лаборатория химии гетероциклических соединений) за предоставление соединения ВР-2; н.с. Низамееву И.Р. (лаборатория электрохимического синтеза) за проведение исследований с использованием трансмиссионной электронной микроскопии.

**Работа выполнена** в лаборатории Высокоорганизованных сред Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук». Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 15-03-

05434 «Супрамолекулярные системы на основе полимеризующихся и комплексообразующих амфифилов: мультифакторный контроль самоорганизации и функциональной активности»; РФФИ 18-33-00144 «Направленный дизайн катионных амфифилов для комплексообразования с полиэлектролитами различной природы».

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

**Первая глава** представляет собой литературный обзор, в котором рассмотрены современные направления исследований в области организованных систем на основе амфифилов с циклической головной группой и их использование для комплексообразования с белками, нуклеотидами и липидами.

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

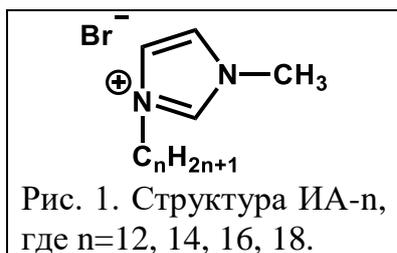
**Третья глава** посвящена обсуждению результатов исследований агрегирующей способности и функциональной активности имидазол- и пиримидинсодержащих ПАВ при варьировании их структуры и концентрации. Определены агрегационные и адсорбционные характеристики ПАВ в водных растворах, солюбилизационная способность по отношению к гидрофобному зонду, комплексообразующая способность по отношению к олиго- и полинуклеотидам. Для имидазолсодержащих ПАВ изучено взаимодействие с белком – бычьим сывороточным альбумином, охарактеризована мембранотропная способность и возможность формирования модифицированных липосом с заданными свойствами.

### Самоорганизация амфифилов с природным фрагментом. Роль структурных факторов

В рамках диссертационной работы проведено систематическое исследование супрамолекулярных систем на основе ПАВ, содержащих природный фрагмент. В качестве объектов исследования выбраны амфифилы с имидазолиевой головной группой и различной длиной углеводородного радикала ИА- $n$  ( $n=12,14,16,18$ ) и гетероциклические ПАВ с гетероциклическими головными группами: морфолиниевыми (МА), пиперидиниевыми (ПА) и триазольными (ТА и ТА(ОН)).

#### Агрегационное поведение амфифилов с имидазолиевой головной группой. Влияние длины углеводородного радикала

Одним из важнейших факторов, определяющих агрегационную активность амфифилов, является длина углеводородного радикала. В рамках данной работы изучен гомологический ряд монокатионных ПАВ с имидазолиевой головной группой ИА-



$n$  (Рис. 1). Оценку их агрегации в водных растворах проводили методами тензиометрии, кондуктометрии и флуориметрии. Полученные тремя методами величины ККМ для ИА- $n$  хорошо согласуются между собой (Табл. 1). На основании тензиометрических данных рассчитаны характеристики адсорбции ПАВ на границе раздела фаз «воздух-вода» (Табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение длины гидрофобного

радикала приводит к уменьшению значения максимальной адсорбции на границе раздела фаз. Процессы адсорбции и мицеллообразования с увеличением длины алкильного радикала становятся более термодинамически выгодными, о чем говорят отрицательные значения  $\Delta G_m$  и  $\Delta G_{ad}$ .

Табл. 1. Значения ККМ, максимальной адсорбции ( $\Gamma_{max}$ ), минимальной поверхности в расчете на головную группу ПАВ ( $A_{min}$ ), свободной энергии мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ) и адсорбции ( $\Delta G_{ad}$ ) для гомологического ряда ИА-п.

ПАВ	ККМ, мМ			$10^6 \Gamma_{max}$ /моль м <sup>-2</sup>	$A_{min}$ / нм <sup>2</sup>	$-\Delta G_m$ / кДж моль <sup>-1</sup>	$-\Delta G_{ad}$ / кДж моль <sup>-1</sup>
	Тензиометрия	Кондуктометрия	Флуориметрия				
ИА-12	10	10.5	10.2	2.69	0.618	28.4	40.2
ИА-14	2.7	2.5	2.7	2.01	0.826	31.1	44.7
ИА-16	0.9	0.8	0.9	1.91	0.990	34.2	54.2
ИА-18	0.2	0.2	0.7	1.70	0.970	40.7	59.3

Установлено, что переход от классических аналогов триметиламмониевого ряда к имидазолиевым ПАВ не влияет на закономерность изменения агрегационных характеристик. Как и в случае аммониевых ПАВ, для ИА-п наблюдается снижение ККМ с увеличением длины гидрофобного радикала (Табл. 1).

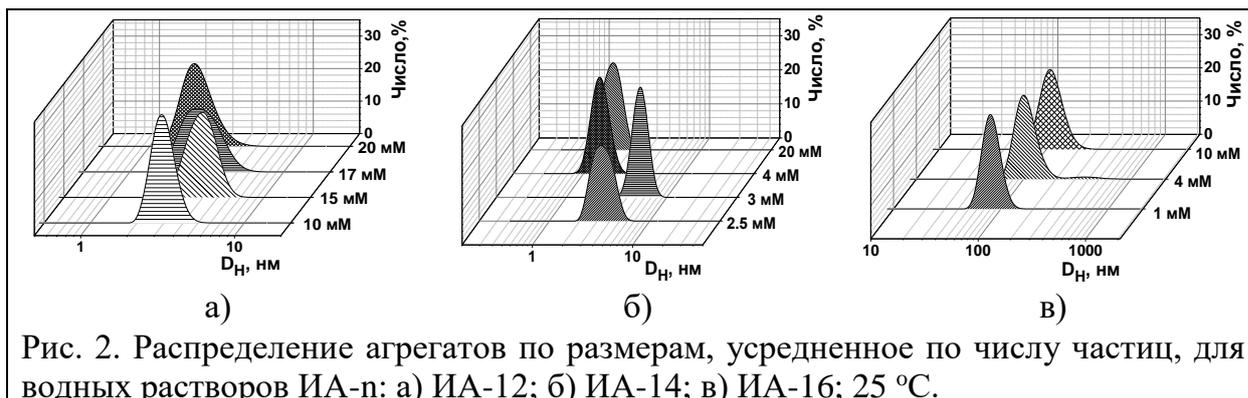


Рис. 2. Распределение агрегатов по размерам, усредненное по числу частиц, для водных растворов ИА-п: а) ИА-12; б) ИА-14; в) ИА-16; 25 °С.

Оценка размеров агрегатов методом динамического рассеяния света показала, что в случае ИА-12 и ИА-14 наблюдается формирование агрегатов с гидродинамическим диаметром  $D_H$  до 10 нм (Рис. 2а,б). В случае ИА-14 в области ККМ формируются агрегаты с  $D_H$  до 6-10 нм (Рис. 2б), но с увеличением концентрации ПАВ их гидродинамический диаметр уменьшается до ~4 нм. Для высших гомологов, ИА-16 и ИА-18, во всем диапазоне концентраций формируются агрегаты размером около 100 нм (Рис. 2в). Можно предположить, что в отличие от ИА-12 и ИА-14 в случае высших членов ряда реализуется дополнительный вклад стэкинговых взаимодействий с участием имидазолиевых фрагментов в агрегирующую способность.

### Агрегационное поведение геминальных ПАВ с пиримидиновым фрагментом в спейсере. Влияние природы головной группы.

Кроме монокатионных ПАВ с циклической головной группой в работе исследованы геминальные ПАВ с пиримидиновым фрагментом в спейсере и гетероциклическими головными группами: пиперидиновыми (ПА), морфолиновыми (МА), и триазолиновыми (ТА и ТА(ОН)) (Рис. 3).

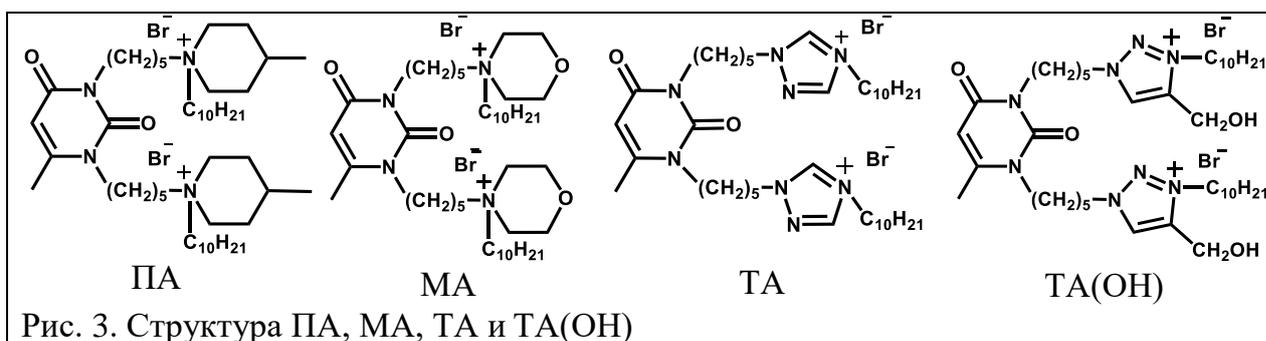


Рис. 3. Структура ПА, МА, ТА и ТА(ОН)

Оценку агрегационных характеристик в данных системах проводили методами тензиометрии, кондуктометрии и флуоресцентной спектроскопии (Табл. 2). На рисунке 4 приведены изотермы поверхностного натяжения водных растворов пиридинсодержащих ПАВ. Для всех амфифилов значения ККМ, определенные различными методами, идентичны, что говорит о незначительном влиянии природы полярной группы на процесс мицеллообразования.

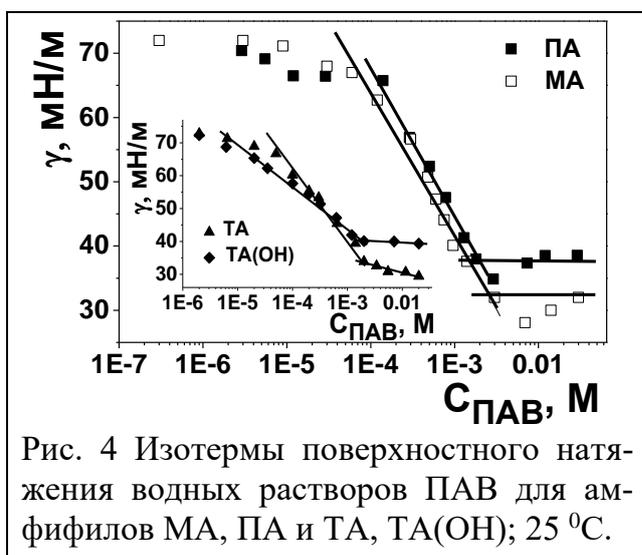


Рис. 4 Изотермы поверхностного натяжения водных растворов ПАВ для амфифилов МА, ПА и ТА, ТА(ОН); 25 °С.

Адсорбционные параметры для пиридинсодержащих амфифилов, рассчитанные на основании тензиометрических данных, приведены в таблице 2. Самое низкое значение минимальной площади в расчете на молекулу ПАВ ( $A_{min}$ ), найденное для амфифила с пиперидиниевыми головными группами, может быть обусловлено их меньшей гидрофильностью и, соответственно, менее эффективной гидратацией. Это, вероятно, обеспечивает более плотную упаковку молекул ПАВ на поверхности.

Табл. 2. Значения критической концентрации мицеллообразования, максимальной адсорбции ( $\Gamma_{max}$ ), минимальной поверхности в расчете на молекулу ПАВ ( $A_{min}$ ), свободной энергии мицеллообразования ( $\Delta G_m$ ) и адсорбции ( $\Delta G_{ad}$ ) для пиридинсодержащих ПАВ.

ПАВ	ККМ, мМ			$10^6 \Gamma_{max}$ / моль $м^{-2}$	$A_{min}$ / $нм^2$	$-\Delta G_m$ / кДж моль $^{-1}$	$-\Delta G_{ad}$ / кДж моль $^{-1}$
	Тензиометрия	Кондуктометрия	Флуориметрия				
МА	3	2.6	-	1.15	1.44	22.7	57.6
ПА	2	2.2	3.2	1.45	1.15	27.9	50.7
ТА	2	2	-	0.776	2.14	21.7	68.2
ТА(ОН)	2	2	3.1	0.585	2.84	28.8	83.3

Введение электроотрицательных атомов в головные группы ПАВ приводит к увеличению значения  $A_{min}$  в связи с тем, что оба гетероатома в циклической головной группе стремятся к локализации на границе раздела фаз вода/воздух. Триазольные головные группы в силу своей ароматичности, вероятно, целиком располагаются на границе раздела фаз, поэтому  $A_{min}$  в случае ТА принимает более высокое значение. Величина максимальной адсорбции  $\Gamma_{max}$ , обратно пропорциональная  $A_{min}$ ,

принимает минимальное значение в случае ТА(ОН). Показано, что процессы мицеллообразования и адсорбции термодинамически выгодны для всех амфифилов, о чем говорят отрицательные значения  $\Delta G_m$  и  $\Delta G_{ad}$ . Полученные наиболее отрицательные значения свободных энергий в случае ТА(ОН) могут быть свидетельством образования дополнительных межмолекулярных водородных связей с участием ОН-групп. Увеличение свободной энергии адсорбции при переходе от МА к ПА указывает на то, что процесс адсорбции становится менее энергетически выгодным. Вероятно, ключевым фактором, контролирующим изменение величины  $\Delta G_{ad}$ , является гидрофильность головной группы ПАВ.

Методом динамического рассеяния света проведена оценка размеров агрегатов пиримидинсодержащих ПАВ в водных растворах. Для ПА в области ККМ характерно формирование достаточно крупных агрегатов ( $D_H$  45-100 нм) по так называемой открытой модели ассоциации, которые при увеличении концентрации ПАВ до 7 мМ перестраиваются в небольшие мицеллоподобные ассоциаты ( $D_H \sim 4$  нм), образующиеся по закрытой модели. В случае ТА наблюдается аналогичное агрегационное поведение, но уменьшение размеров агрегатов происходит при более высоких концентрациях ПАВ. В случае МА и ТА(ОН) отмечен характерный для типичных ПАВ рост мицелл с увеличением концентрации. Для МА гидродинамический диаметр агрегатов достигает 60 нм в области ККМ и далее увеличивается до 140 нм с возрастанием концентрации ПАВ. Для ТА(ОН) вблизи ККМ наблюдали формирование небольших мицеллоподобных агрегатов ( $D_H \sim 4$  нм), но затем их размер возрастал до 100 нм и далее до 400 нм. Оценка поверхностного заряда агрегатов пиримидинсодержащих ПАВ показала, что значения дзета-потенциала зависят от структуры головных групп и находятся в диапазоне от 20 до 60 мВ.

### Солюбилизационная способность амфифилов с природным фрагментом.

#### Солюбилизационная способность имидазолсодержащих амфифилов.

##### Влияние длины углеводородного радикала.

Способность агрегатов ИА-*n* выступать в качестве наноконтейнеров для гидрофобных субстратов продемонстрирована на примере спектрофотометрического определения их солюбилизационной способности по отношению к гидрофобному красителю Оранж ОТ. Для всех ПАВ отмечена выраженная способность к солюбилизации гидрофобного гостя (Рис. 5) при концентрации выше ККМ. Количественным параметром солюбилизационной способности ПАВ является величина солюбилизационной емкости  $S$ , которая характеризует число молей гидрофобного соединения, приходящихся на 1 моль ПАВ. Вычисленные значения  $S$  составляют: 0.0075 моль<sub>Оранж ОТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub> для ИА-12, 0.014 моль<sub>Оранж ОТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub> для ИА-14, 0.02 моль<sub>Оранж ОТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub> для ИА-16 и 0.035 моль<sub>Оранж ОТ</sub>/моль<sub>ПАВ</sub> для ИА-18. Таким образом, удлинение углеводородного радикала ПАВ с переходом от ИА-12 к ИА-18 позволяет увеличить солюбилизационную емкость почти в 5 раз.



Рис. 5. Зависимость оптической плотности Оранж ОТ при длине волны 495 нм от концентрации ИА-*n*; 25 °С.

## Солюбилизационная способность пиримидинсодержащих амфифилов. Влияние природы головной группы.

Аналогичные спектрофотометрические исследования для агрегатов на основе пиримидинсодержащих амфифилов показали, что они обладают солюбилизирующим действием, эффективность которого зависит от природы головной группы ПАВ (Рис. 6). Количественный расчет солюбилизационной емкости  $S$  агрегатов пи-

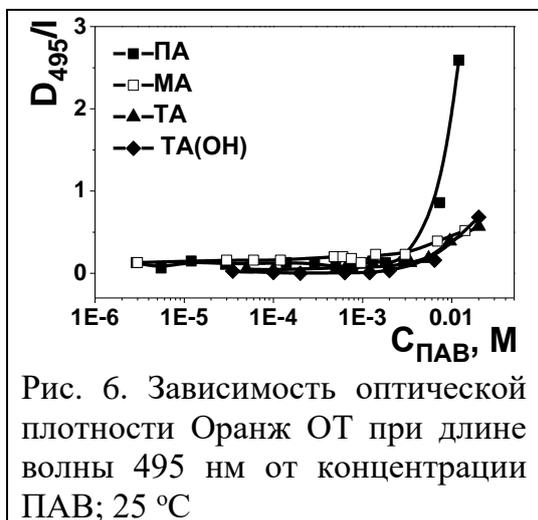


Рис. 6. Зависимость оптической плотности Оранж ОТ при длине волны 495 нм от концентрации ПАВ; 25 °С

римидинсодержащих ПАВ показал, что в случае ПА количество солюбилизованного гидрофобного красителя ( $0.0197 \text{ моль}_{\text{Оранж}} / \text{моль}_{\text{ПАВ}}$ ) в 15 раз выше, чем для МА ( $0.0013 \text{ моль}_{\text{Оранж}} / \text{моль}_{\text{ПАВ}}$ ); в 12 раз выше, чем для ТА(ОН) ( $0.0016 \text{ моль}_{\text{Оранж}} / \text{моль}_{\text{ПАВ}}$ ) и в 5 раз выше, чем для ТА ( $0.0041 \text{ моль}_{\text{Оранж}} / \text{моль}_{\text{ПАВ}}$ ). Более выраженная солюбилизационная способность агрегатов ПА, вероятно, является следствием низкой гидрофильности и меньшей гидратации головных групп амфифила, что понижает степень «обводненности» периферийной зоны и увеличивает сродство наноконтейнеров к гидрофобному зонду.

### Комплексообразование в системе катионные ПАВ/олигонуклеотид

Одним из важнейших направлений применения катионных ПАВ является создание на их основе систем доставки генного материала. Однако, на данный момент не выявлена роль стехиометрических и кооперативных взаимодействий в эффективности комплексообразования катионных амфифилов с ДНК. Поэтому поиск новых переносчиков генетического материала и оценка роли различных факторов, в том числе, вклада гидрофобных, электростатических, водородных связей, стэкинг-взаимодействий в изменении комплексообразующей способности компонентов бинарных систем ПАВ/ДНК являются актуальной задачей. С точки зрения функционирования катионных амфифилов в качестве невирусных векторов ключевыми характеристиками являются размер комплексов ПАВ/ДНК, их заряд и степень связывания компонентов. Поэтому в работе проведена оценка этих параметров на примере систем катионные ПАВ/олигонуклеотид (ОНу).

### Комплексообразование в системе имидазолсодержащие амфифилы/олигонуклеотид. Влияние длины гидрофобного радикала.

Методом динамического рассеяния света показано, что для всех имидазолсодержащих амфифилов независимо от длины углеводородного радикала связывание с ОНу начинается с минимальных мольных соотношений компонентов. Во всем диапазоне концентраций ПАВ величина  $D_H$  комплексов находится в пределах 200-250 нм. Это удовлетворяет биотехнологическим критериям, в частности, обеспечивает возможность пролонгированной циркуляции липоплексов в кровеносной системе. Для оценки способности имидазолсодержащих ПАВ к нейтрализации отрицательного заряда нуклеотидных звеньев проведено электрофоретическое титрование ОНу раствором ИА-п (Рис. 7). Установлено, что, в отличие от ранее изученных аммониевых ПАВ, компенсация отрицательного заряда олигонуклеотида при увеличении концентрации имидазолиевых ПАВ не достигается.

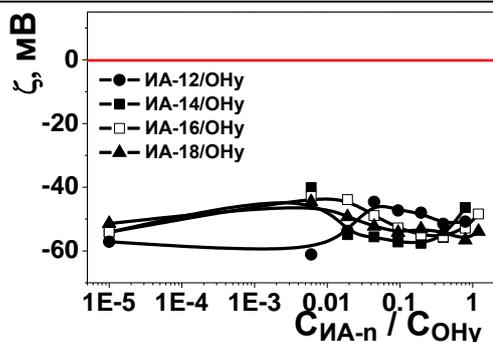


Рис. 7. Зависимость электрокинетического потенциала бинарных систем ИА-n/ОНу от мольного соотношения ПАВ/ОНу; 25 °С.

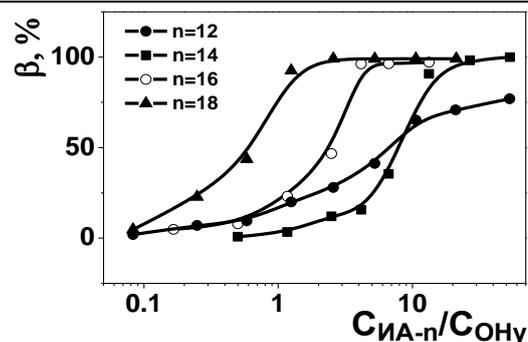


Рис. 8. Зависимость степени связывания ИА-n/ОНу от мольного соотношения компонентов; 25 °С.

Подобное поведение может быть связано с делокализацией положительного заряда по имидазолиевому кольцу, что ослабляет взаимодействие головных групп ПАВ с фосфатными фрагментами ОНу. Проведенные исследования показали, что в данном гомологическом ряду нет различий в электростатическом взаимодействии ОНу с молекулами ПАВ (ИА-12, ИА-14) и агрегатами ПАВ (ИА-16, ИА-18). Это является оригинальным результатом, поскольку ранее для некоторых ПАВ с аммониевыми головными группами установлено значительное различие в способности ПАВ в молекулярном и агрегированном виде к нейтрализации заряда ОНу. Количественная оценка связывающей способности имидазолсодержащих амфифилов по отношению к олигонуклеотиду показала, что для амфифила ИА-12 максимальная степень связывания составляет 75 %, а для амфифилов ИА-14, ИА-16, ИА-18 наблюдается количественное связывание с декамером ДНК (Рис. 8). Удлинение гидрофобного радикала на 4 метиленовых звена позволяет достичь 100% связывания компонентов при 10-кратно меньшей концентрации амфифила.

Исследования, проведенные с использованием зонда-интеркалятора этидий бромида, позволяют предположить, что в случае имидазолиевых ПАВ реализуется неклассический механизм связывания, с преимущественным вкладом интеркаляционного взаимодействия ПАВ/ДНК. Имидазолиевые головные группы, имеющие плоскую геометрию, встраиваются между азотистыми основаниями олигонуклеотида, вытесняя этидий бромид. В ранее опубликованных исследованиях показано, что амфифилы с идентичной структурой головной группы, но более короткими хвостами не взаимодействуют с ДНК подобным образом. На основе полученных нами результатов можно утверждать, что в случае имидазолиевых ПАВ реализуется два механизма связывания: гидрофобные взаимодействия и интеркаляционное встраивание, что обуславливает количественное связывание компонентов даже при слабом электростатическом взаимодействии.

### **Комплексообразование в системе пиримидинсодержащие амфифи- лы/нуклеотиды. Влияние природы головной группы.**

Аналогичные исследования по оценке размера комплексов ПАВ/ОНу, их заряда и степени связывания проводили для пиримидинсодержащих амфифилов. Можно было ожидать, что введение пиримидинового фрагмента повысит биомиметический характер систем и увеличит эффективность комплексообразования за счет дополнительных связей с нуклеотидными звеньями по принципу комплементарности.

Оценка размеров агрегатов показала, что 1) для системы ПА/ОНу в зависимости от мольного соотношения компонентов можно выделить три участка с различными размерными характеристиками. При низких мольных соотношениях ПА/ОНу происходит формирование комплексов с гидродинамическим диаметром 50-60 нм; в диапазоне мольных соотношений от 0.08 до 0.33 происходит увеличение размера агрегатов от 60 нм до 300-400 нм, вероятно, отражающее агломерацию отдельных комплексов в кластерные структуры. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ происходит насыщение липоплексов молекулами ПАВ, что приводит к формированию свободных сферических мицелл ПАВ ( $D_H \sim 2$  нм; 2). Для системы ТА/ОНу при небольших добавках ПАВ наблюдается формирование липоплексов с гидродинамическим диаметром 150-250 нм. Дальнейшее увеличение концентрации амфифила выше мольного соотношения ПАВ/ОНу 0.8 приводит к увеличению размеров частиц до микрометровых значений; 3) в системе ТА(ОН)/ОНу связывание компонентов начинается с мольных соотношений ПАВ/ОНу  $\sim 0.02$ , что отражается в появлении пика с гидродинамическим диаметром в области 100 нм. При достижении мольного соотношения ПАВ/ОНу 0.3 в дополнение к основному пику липоплексов при  $D_H \sim 100$  нм появляется дополнительный пик с гидродинамическим диаметром 400 нм. Дальнейшее увеличение содержания ПАВ в системе приводит к формированию больших ассоциатов ПАВ/ОНу в микрометровой области и появлению свободных мицелл ПАВ, которым отвечает пик с  $D_H \sim 3$  нм.

Электрофоретическое исследование показало, что изоэлектрическая точка для бинарной системы ПА/ОНу достигается при мольном соотношении ПАВ/ОНу 0.5 (Рис. 9), что свидетельствует о высокой способности данного амфифила компенсировать отрицательный заряд нуклеотидных звеньев. В случае ТА нейтрализация заряда нуклеотидных звеньев не наблюдается даже при большом избытке ПАВ. В то же время для ТА(ОН) изоэлектрическая точка достигается при дефиците ПАВ: компенсация заряда ОНу начинается с мольного соотношения ПАВ/ОНу  $\sim 0.3$  и достигает точки нейтрализации при мольном соотношении ТА(ОН)/ОНу  $\sim 0.6$ . Вероятно, введение двух дополнительных ОН-групп инициирует образование межмолекулярных водородных связей между молекулами ПАВ и нуклеотидными звеньями, усиливающих комплексообразование.

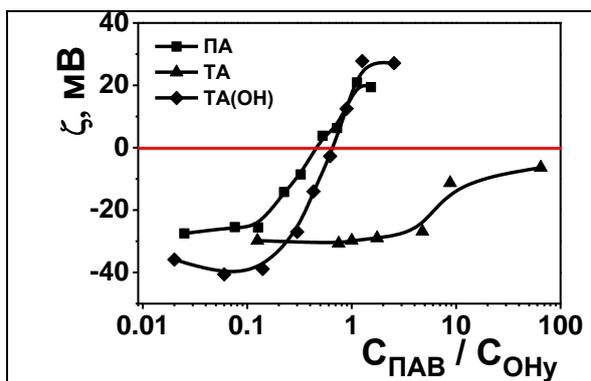


Рис. 9. Зависимость электрокинетического потенциала бинарных систем ПАВ/ОНу от мольного соотношения ПАВ/ОНу; 25 °С

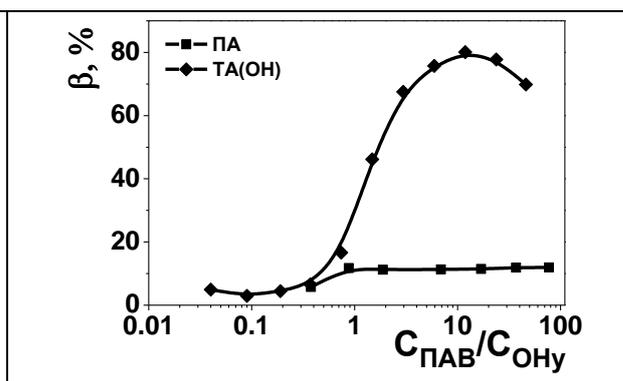


Рис. 10. Зависимость степени связывания ПАВ с олигонуклеотидом от мольного соотношения ПАВ/ОНу; 25 °С.

Исследование тушения флуоресценции зонда-интеркалятора этидий бромид в присутствии ПАВ показало, что ПА обладает низкой комплексообразующей способностью в отношении олигонуклеотида (Рис. 10), несмотря на высокое электростатическое сродство компонентов, обнаруженное при электрофоретическом титровании. Причиной этого может быть неблагоприятный геометрический фактор, препятствующий встраиванию головных групп ПАВ между азотистыми основаниями и вытеснению локализованного там ЭБ. Переход к планарным триазольным головным группам позволяет увеличить степень связывания амфифила и ОНУ до 80 %, что является высоким показателем для потенциального невирусного вектора. Предположительно, в данном случае реализуется интеркаляционный механизм взаимодействия компонентов.

Для проверки сохранения закономерностей комплексообразования, установленных для систем ПАВ/ОНУ, при переходе от низкомолекулярного ОНУ к полинуклеотидам, в рамках данной работы на примере МА исследовано комплексообразование с плазмидной ДНК рК 18. Измерение размеров липоплексов показало, что до мольного соотношения ПАВ/ДНК 0.25 образуются комплексы  $\leq 250$  нм (Рис. 11). При дальнейшем увеличении концентрации амфифила происходит возрастание размера комплексов до 400 нм. В данном случае можно говорить о компактизации молекул ДНК с помощью ПАВ, так как размер одной молекулы ДНК рК 18 находится в микрометровом диапазоне. Измерение электрокинетического потенциала показало способность амфифила компенсировать отрицательный заряд нуклеиновой кислоты. Изоэлектрическая точка обнаружена при мольном соотношении ПАВ/ДНК 5 (Рис. 12). Количественная оценка связывающей способности МА с ДНК рК 18 методом тушения флуоресценции этидий бромид продемонстрировала высокую комплексообразующую способность этого амфифила по отношению к ДНК: степень связывания составляет 75% (Рис. 12 вставка).

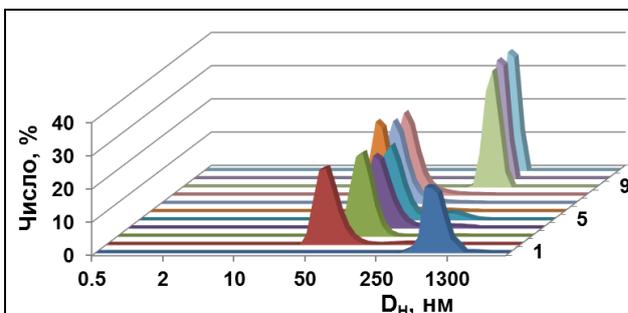


Рис. 11. Распределение агрегатов по размерам, усредненное по числу частиц, для бинарной системы МА/рК 18 при различных мольных соотношениях компонентов: 1 – инд. рК 18, 2 – 0.005, 3 – 0.01, 4 – 0.02, 5 – 0.05, 6 – 0.09, 7 – 0.15, 8 – 0.25, 9 – 0.44, 10 – 1.64, 11 – 3.24; 25 °С;

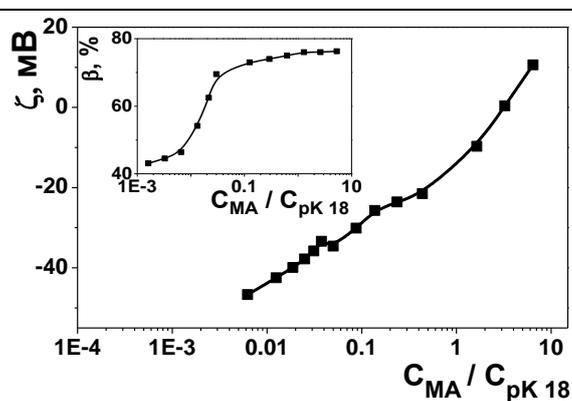


Рис. 12. Зависимость электрокинетического потенциала бинарной системы МА/рК 18 от мольного соотношения ПАВ/рК 18; (на вставке – степень связывания компонентов); 25 °С

## Мембранотропная активность имидазолсодержащих амфифилов. Влияние длины алкильного радикала.

Одной из важных особенностей амфифилов при доставке генетического материала является их способность к прохождению через межклеточные мембраны, представляющие собой липидный бислой. Поэтому нами исследована способность имидазолсодержащих ПАВ к встраиванию в липосомы на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ).

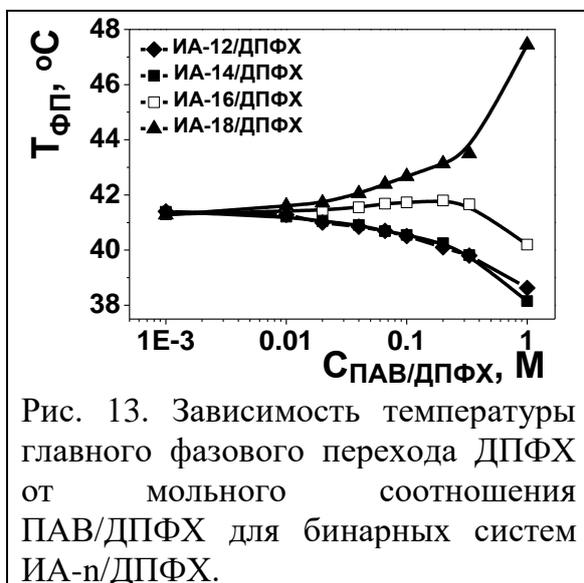


Рис. 13. Зависимость температуры главного фазового перехода ДПФХ от мольного соотношения ПАВ/ДПФХ для бинарных систем ИА-n/ДПФХ.

Для ДПФХ главный фазовый переход жидкие кристаллы – гель происходит при температуре  $T_{фп} = 41 \pm 1$  °С. Модифицирующие добавки, в том числе ПАВ, способны изменять эту температуру. Амфифилы ИА-12 и ИА-14 по своей способности к взаимодействию с липидным бислоем отличаются незначительно (Рис. 13). Наблюдаемое понижение  $T_{фп}$  с увеличением мольного соотношения ПАВ/ДПФХ обусловлено тем, что молекулы амфифилов встраиваются в липидный бислой, разрыхляя его и увеличивая текучесть. Подобное явление способствует увеличению проницаемости липидного бислоя, что можно использовать для решения биотехнологических задач. Для

высшего гомолога ИА-18 наблюдается увеличение  $T_{фп}$  с ростом мольного соотношения ПАВ/липид, что свидетельствует о стабилизации липидного бислоя ДПФХ. Подобный результат может объясняться совпадением длины алкильного радикала ПАВ с длиной гидрофобного хвоста ДПФХ, что может способствовать упорядочиванию упаковки алкильных радикалов в липидном бислое. Таким образом, варьируя длину гидрофобного хвоста имидазолсодержащих ПАВ, можно инициировать как процессы разупорядочивания, так и уплотнения упаковки липидного бислоя и тем самым изменять его текучесть и проницаемость для транспорта молекул.

## Комплексообразование имидазолсодержащих амфифилов с бычьим сывороточным альбумином. Влияние длины гидрофобного радикала.

Бинарные системы ПАВ/белок имеют большое прикладное значение, однако механизмы взаимодействия ПАВ с глобулярными белками недостаточно изучены и требуют дополнительных исследований для выявления закономерностей и разработки теоретических представлений. В качестве модельной макромолекулы, как правило, используется бычий сывороточный альбумин (БСА), состоящий из 583 аминокислотных остатков и по своей структуре близкий к человеческому сывороточному альбумину, транспортному белку крови. Поэтому в представленной работе различными физико-химическими методами исследованы системы на основе имидазолсодержащих ПАВ ИА-n (где n=12, 14, 16, 18) и бычьего сывороточного альбумина при варьировании концентрации ПАВ и фиксированной концентрации белка (0.05% масс.). Методом тензиометрии оценивали агрегационные характеристики систем ПАВ/БСА (Рис. 14). На изотермах поверхностного натяжения для бинарных систем ИА-n/БСА наблюдалось два перегиба. Первый перегиб в области

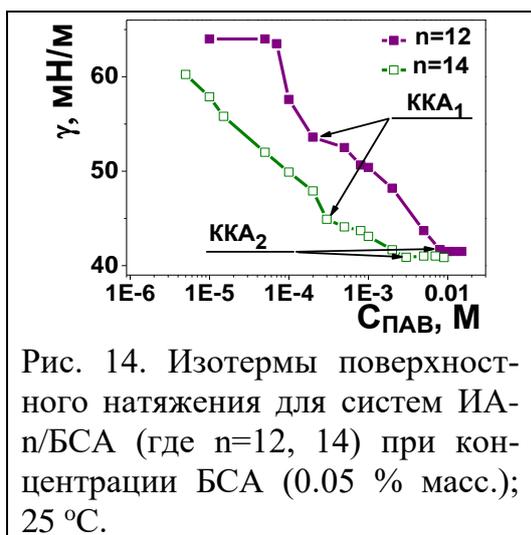


Рис. 14. Изотермы поверхностного натяжения для систем ИА-n/БСА (где n=12, 14) при концентрации БСА (0.05 % масс.); 25 °С.

низких концентраций ПАВ соответствует критической концентрации ассоциации (ККА), отвечающей началу образования комплексов ПАВ/БСА. Второй перегиб в области высоких концентраций ПАВ указывает на образование индивидуальных агрегатов ПАВ и соответствует величине ККМ. Показано, что для системы ИА-12/БСА формирование агрегатов начинается при концентрации в 45 раз ниже, чем для индивидуальной системы ПАВ. Размеры комплексов ПАВ/БСА во всем диапазоне концентраций составляют ~10-12 нм, что говорит о том, что имидазолиевые амфифилы не оказывают денатурирующего действия на белок.

Отсутствие процессов денатурации подтверждается методом трансмиссионной электронной микроскопии на примере системы ИА-16/БСА (Рис. 15). Представленные микрофотографии позволяют утверждать, что при добавлении ИА-16 к БСА не происходит разрушения белковой структуры: диаметр частиц находится в пределах 20 нм. Электрофоретическое титрование БСА растворами ИА-n показало, что при увеличении концентрации ПАВ в системе во всех случаях наблюдается переход значений дзета-потенциала из отрицательной области в положительную (Рис. 16). Увеличение длины углеводородного радикала имидазолсодержащего ПАВ оказывает существенное влияние на достижение изоэлектрической точки в системе. Для высших гомологов нейтрализация отрицательного заряда БСА наблюдается при более низких концентрациях ПАВ, предположительно, за счет дополнительных гидрофобных взаимодействий между БСА и ПАВ.

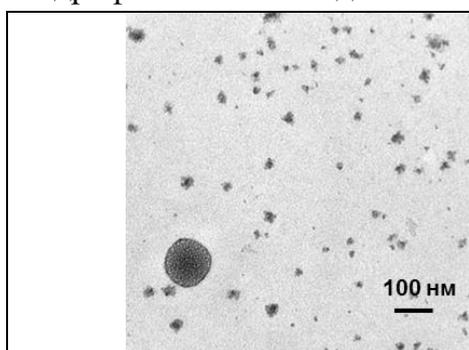


Рис. 15. Микрофотографии для системы ИА-16/БСА полученные с помощью метода ТЭМ,  $C_{\text{ПАВ}} = 5 \text{ мМ}$

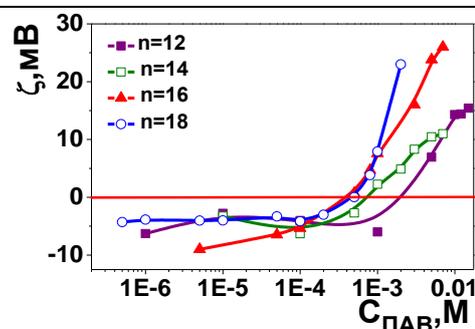


Рис. 16. Зависимость электрокинетического потенциала бинарных систем ИА-n/БСА от концентрации ПАВ; 25 °С.

Проведена количественная оценка эффективности взаимодействия имидазолсодержащих амфифилов с БСА с применением различных флуоресцентных методик (Рис. 17-19). Регистрация спектров флуоресценции систем показала, что во всех случаях введение ПАВ к БСА приводит к тушению флуоресценции и смещению максимума полосы поглощения в коротковолновую область (Рис. 17). Подобное явление свидетельствует о связывании полипептида с амфифилами, которое приводит к изменению микроокружения остатков триптофана (Trp) и тирозина (Tyr) белковой макромолекулы. С использованием флуоресцентных данных были рассчитаны константы скорости тушения для всех систем. Показано, что во всех

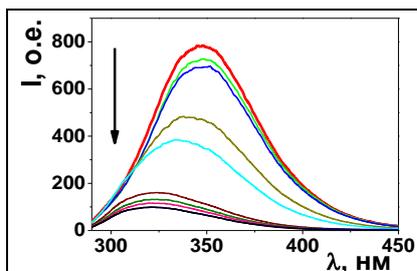


Рис. 17. Эмиссионные спектры флуоресценции бинарных систем ИА-16/БСА при варьировании концентрации ПАВ (содержание БСА 0.05 % масс) (стрелкой показано увеличение концентрации ПАВ); 25 °С.

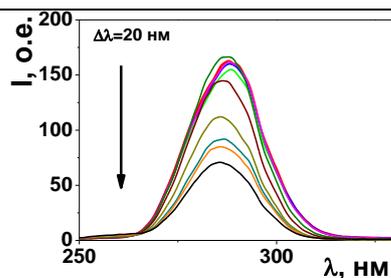


Рис. 18. Синхронные спектры флуоресценции БСА в присутствии различных концентраций ПАВ для бинарной системы ИА-18/БСА,  $\Delta\lambda=20$  нм, (стрелкой показано увеличение концентрации ПАВ); 25 °С.

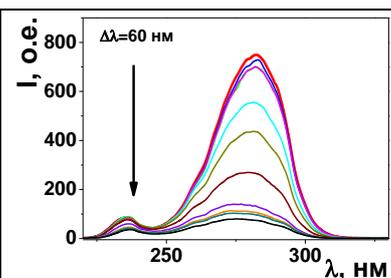


Рис. 19. Синхронные спектры флуоресценции БСА в присутствии различных концентраций ПАВ для бинарной системы ИА-18/БСА,  $\Delta\lambda=60$  нм, (стрелкой показано увеличение концентрации ПАВ); 25 °С.

случаях имеет место статический механизм тушения флуоресценции, предполагающий, что ПАВ и БСА образуют нековалентно связанный комплекс за счет адсорбции молекул ПАВ на гидрофобных доменах белка. Для того, чтобы подтвердить данное предположение, с использованием рассчитанных значений констант связывания компонентов  $K_a$  были получены значения изменений энтальпии  $\Delta H^0$ , энтропии  $\Delta S^0$  и свободной энергии Гиббса  $\Delta G^0$  при формировании комплексов (Табл. 3).

Табл. 3. – Значения констант связывания компонентов  $K_a$ , изменения энтальпии  $\Delta H^0$ , энтропии  $\Delta S^0$  и свободной энергии Гиббса  $\Delta G^0$  для исследуемых систем при варьировании температуры.

Система	$T, K$	$K_a, \text{л/моль}$	$\Delta H^0, \text{кДж/моль}$	$\Delta S^0, \text{Дж/моль}\cdot\text{К}$	$\Delta G^0, \text{кДж/моль}$
ИА-12/БСА	298	1148	46.38	209.45	-16.04
	303				-17.08
	308				-18.13
	313				-19.18
ИА-14/БСА	298	707	42.09	195.30	-16.11
	303				-17.08
	308				-18.06
	313				-19.04
ИА-16/БСА	298	933	26.97	147.76	-17.06
	303				-17.80
	308				-18.54
	313				-19.28
ИА-18/БСА	298	109648	117.82	477.26	-24.40
	303				-26.79
	308				-29.18
	313				-31.56

Во всех случаях  $\Delta H^0 > 0$  и  $\Delta S^0 > 0$ , что согласно существующим представлениям, свидетельствует о преобладании вклада гидрофобных взаимодействий при формировании комплексов ИА-п/БСА для всех гомологов. Отрицательные значения энергии Гиббса свидетельствуют о том, что процесс формирования комплексов ПАВ/БСА термодинамически выгоден и протекает самопроизвольно, а увеличение длины гидрофобного радикала на 6 метиленовых звеньев приводит практически к двукратному энергетическому выигрышу.

Для получения информации о том, какой из аминокислотных фрагментов (тирозин или триптофан) принимает участие во взаимодействии с молекулами ПАВ, используется техника синхронной флуоресцентной съемки с заданными значениями разницы длин волн  $\Delta\lambda$ :  $\Delta\lambda = 20$  нм, характеризующая связывание по тирозиновому фрагменту и  $\Delta\lambda = 60$  нм, определяющая связывание по триптофановому фрагменту. Для примера на рисунках 18 и 19 приведены синхронные спектры флуоресценции для системы ИА-18/БСА. Анализ данных показал, что для всех амфифилов интенсивность полосы поглощения, отвечающей за вклад во взаимодействие с триптофаном, начинает снижаться при небольших концентрациях ПАВ. Аналогичная полоса для тирозина изменяет свою интенсивность только после достижения ККА в данных системах. Подобное явление говорит о том, что связывание ПАВ и БСА происходит преимущественно по триптофановому остатку.

Оценка солюбилизационной активности бинарных систем ИА-п/БСА по отношению к гидрофобному красителю Оранжевый OT показала, что с удлинением алкильного радикала наблюдается увеличение величины солюбилизационной емкости  $S$ . Кроме того, для комплексов ПАВ/БСА характерны более высокие значения солюбилизационной емкости, чем в случае индивидуальных агрегатов ПАВ. Это, вероятно связано с наличием гидрофобных доменов в молекуле белка, в которых локализуется дополнительное количество красителя.

### Гибридные липосомы на основе имидазолсодержащих амфифилов для инкапсулирования лекарственных препаратов



В рамках данной работы получены гибридные липосомы, состоящие из дипальмитоилфосфатидилхолина и имидазолсодержащих ПАВ с различной длиной углеводородного радикала, при варьировании мольного соотношения компонентов. Разработанные липосомальные формулировки использовали для инкапсулирования гидрофильного лекарственного препарата - метронидазола и нового гидрофобного биологически активного вещества BP-2 (Рис. 20). Основной проблемой использования метронидазола является достаточно быстрое выведение из организма (лекарственный препарат достигает своей максимальной концентрации в организме в течение часа). В случае BP-2 проблема связана с его гидрофобностью, что препятствует использованию этого соединения в биологических системах. Эти ограничения могут быть устранены за счет инкапсулирования данных субстратов в липосомы. С целью оптимизации состава формулировок отработано получение пустых модифицированных липосом при варьировании мольных соотношений ПАВ/липид: 1:50; 1:25; 1:10; 1:5. Размеры модифицированных липосом в зависимости от выбранного гомолога ИА-п и мольного соотношения компонентов составляют ~70-120 нм. Установлено, что введение в систему любого

из гомологов ИА-п способно придавать липосомам положительный заряд, что обеспечивает их высокую стабильность и сродство к клеточным мембранам. Увеличение дзета-потенциала с ростом концентрации ПАВ указывает на то, что количество молекул ПАВ в составе липосом, увеличивается. Значения дзета-потенциала для изученных систем составляют  $\geq 60$  мВ. Показано, что размерные и зарядовые характеристики модифицированных липосом изменяются незначительно с течением времени (более полугода), в то время как индивидуальные липосомы ДПФХ в отсутствие модифицирующих добавок разрушаются в течение двух недель.

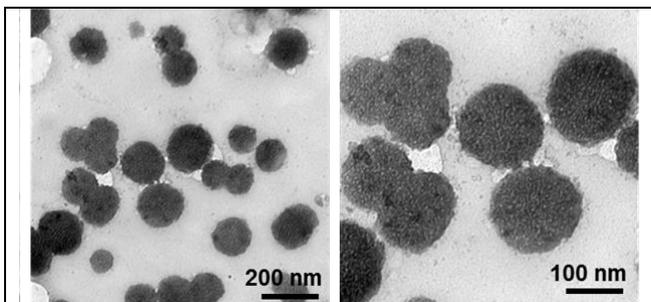


Рис. 21. Изображения, полученные методом ТЭМ, для модифицированных липосом ИА-18/ДПФХ при мольном соотношении компонентов 1:10, 25 °С.

Для визуализации полученных липосом (на примере ИА-18/ДПФХ при мольном соотношении компонентов 1:10) использовали метод ТЭМ (Рис. 21). Показано, что гибридные носители являются монодисперсными, частицы имеют сферическую форму и размеры составляют  $\sim 100$  нм, что совпадает с данными метода динамического рассеяния света.

Основными параметрами, определяющими эффективность носителя лекарственного препарата, являются высокая

эффективность инкапсулирования, а также пролонгированное высвобождение загруженного вещества. Поэтому нами проведена оценка эффективности инкапсулирования лекарственного вещества в липосомы и его высвобождения в условиях *in vitro*. Для инкапсулирования метронидазола выбрали оптимальные соотношения ПАВ/липид 1:25 и 1:10, для которых была выявлена наиболее высокая стабильность липосом при хранении (Табл. 4).

Табл. 4. – Физико-химические характеристики модифицированных липосом с метронидазолом

Система	Соотношение компонентов	$D_n$ , нм	$\zeta$ , мВ
ИА-14/ДПФХ	1:25	78 $\pm$ 2	52 $\pm$ 2
ИА-14/ДПФХ	1:10	92 $\pm$ 1	58 $\pm$ 2
ИА-14/ДПФХ	1:5	105 $\pm$ 1	59 $\pm$ 1
ИА-16/ДПФХ	1:25	79 $\pm$ 1	46 $\pm$ 2
ИА-16/ДПФХ	1:10	105 $\pm$ 2	58 $\pm$ 1
ИА-18/ДПФХ	1:25	42 $\pm$ 2	51 $\pm$ 2
ИА-18/ДПФХ	1:10	92 $\pm$ 2	68 $\pm$ 2

Размер липосом, содержащих лекарственное вещество, близок к размеру пустых липосом. Дзета-потенциал частиц с инкапсулированным метронидазолом несколько ниже, чем для пустых формулировок, но системы устойчивы и стабильны в течение длительного хранения. Для исследования высвобождения лекарственного препарата *in vitro* использовали метод диализа. На рисунке 22 показаны зависимости степени высвобождения метронидазола  $\beta$  во времени для водной дисперсии лекарства и его липосомальных формулировок. Из полученных данных следует, что скорость высвобождения метронидазола из водного раствора составляет примерно

60 минут. Инкапсулирование метронидазола в гибридные липосомы позволяет варьировать высвобождение лекарственного препарата от 3.5 до 8 часов. Так, в случае систем ИА-14/ДПФХ и ИА-16/ДПФХ метронидазол высвобождается в 3.5 раза дольше, чем из водного раствора (3.5 часа) вне зависимости от мольного соотношения компонентов. В случае системы ИА-18/ДПФХ мольное соотношение компонентов влияет на скорость высвобождения лекарства: при соотношении компонентов 1:25 полное высвобождение осуществляется за 6 часов, а при соотношении 1:10 - в течение 8 часов, что является приемлемым для медицинского применения.

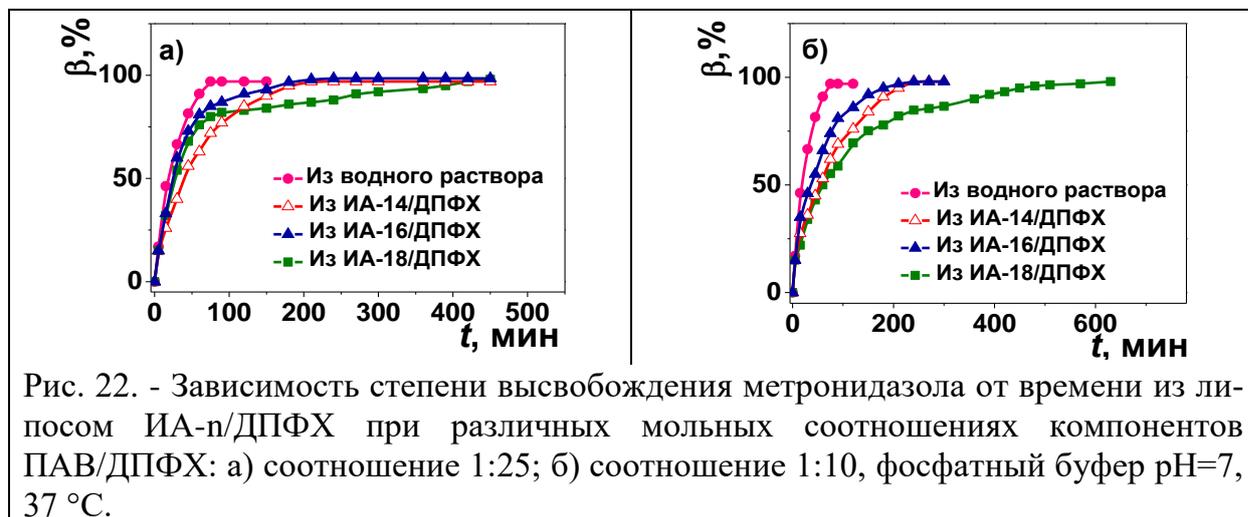


Рис. 22. - Зависимость степени высвобождения метронидазола от времени из липосом ИА-*n*/ДПФХ при различных мольных соотношениях компонентов ПАВ/ДПФХ: а) соотношение 1:25; б) соотношение 1:10, фосфатный буфер рН=7, 37 °С.

Нами определена эффективность инкапсулирования (ЕЕ) и эффективность загрузки (ЛС) лекарственного вещества в липосомы. ЕЕ показывает процентное содержание лекарственного препарата в липосомах, а ЛС - количество загружаемого лекарственного средства на единицу веса наночастицы.

Табл. 5 – Эффективность инкапсулирования и эффективность загрузки метронидазола в гибридные липосомы ИА-*n*/ДПФХ.

Система	Соотношение компонентов	ЕЕ%	ЛС%
ДПФХ	1	15	5
ИА-14/ДПФХ	1:25	48.7	16.5
ИА-14/ДПФХ	1:10	48.6	16
ИА-16/ДПФХ	1:25	43	14
ИА-16/ДПФХ	1:10	42	14.5
ИА-18/ДПФХ	1:25	50	18
ИА-18/ДПФХ	1:10	75	25

Согласно полученным данным (Табл. 5), в случае индивидуальных липосом ДПФХ эффективность инкапсулирования метронидазола незначительна, в то время как использование модифицированных липосом позволяет увеличить эффективность инкапсулирования от 15 до 75 %. В случае системы ИА-18/ДПФХ достигается загрузка максимального количества лекарства. Аналогичная картина характерна и для динамики изменения ЛС с увеличением гидрофобности ПАВ. Для системы ИА-18/ДПФХ это значение принимает более высокие значения (18% для соотношения 1:25 и 25% для соотношения 1:10) по сравнению с низшими гомологами. Это может быть связано с тем, что в системе ИА-18/ДПФХ липидный бислой

наиболее плотный (Рис. 13), что препятствует истечению лекарственного вещества из липосом.

Кроме гидрофильного коммерческого лекарственного вещества метронидазола проведено инкапсулирование в липосмы нового биологически активного вещества ВР-2 (Рис. 20). Данное соединение обладает противоопухолевой активностью, однако высокая гидрофобность не позволяет использовать его в биологических системах. Создание водорастворимой формы соединения может быть достигнуто путем его инкапсулирования в липосомы. Нами разработаны модифицированные липосомы ИА-16/ДПФХ при мольном соотношении компонентов 1:50. Показано, что гидродинамический диаметр частиц составляет ~100 нм и незначительно изменяется в течение трех месяцев, однако электрокинетический потенциал частиц варьировался от +44 до + 14.5 мВ. Это свидетельствует о том, что ВР-2 дестабилизирует частицы. Эффективность инкапсулирования и эффективность загрузки составляют 88 % и 5 %, соответственно.

На следующем этапе исследовано цитотоксическое действие ВР-2 в свободном виде (в диметилсульфоксиде (ДМСО)) и в составе липосом в отношении нормальной и опухолевой клеточных линий человека. Для экспериментов использовали опухолевые культуры клеток М-Нела клон 11 (эпителиоидная карцинома шейки матки, сублиния Нела, клон М-Нела) и культуру нормальных клеток печени (Chang liver). Цитотоксичность на клеточных линиях человека изучали в концентрациях, рекомендованных для скрининга новых противоопухолевых агентов (100 – 1  $\mu$ М).

Табл. 6 – Цитотоксическое действие ВР-2 в липосомах и в свободном виде (в диметилсульфоксиде) в отношении нормальной и опухолевой клеточных линий человека.

Соединение	IC <sub>50</sub> (мкМ)	
	Опухолевые линии	Нормальные линии
	М-Нела	Chang liver
ВР-2 в липосомах	7.9±0.7	>100
ВР-2 в ДМСО	54.0±4.1	61±5.2
Доксорубицин	3.0±0.2	3.0±0.1

Показано, что ВР-2 в индивидуальном состоянии (раствор в диметилсульфоксиде) проявляет цитотоксичность по отношению к опухолевой линии М-Нела, но при достаточно высокой концентрации (в 18 раз выше, чем препарат сравнения доксорубицин), однако при этой концентрации вызывает гибель половины здоровых клеток (Табл. 6). Инкапсулирование ВР-2 в модифицированные липосомы значительно повышает цитотоксичность по отношению к опухолевой клеточной линии М-Нела (значения IC<sub>50</sub> ВР-2 в липосомах сопоставимы с данными по препарату сравнения доксорубицину). Важным результатом является снижение токсичности липосомальной формы ВР-2 в отношении нормальной линии клеток печени Chang liver: в 2 раза по сравнению со свободным препаратом и в 37 раз по сравнению с доксорубицином) (Табл. 6).

## Заключение

1. Показано, что адсорбционные и агрегационные характеристики монокатионных имидазолиевых ПАВ (ИА-n) контролируются вкладом гидрофобного эффекта (энергетический фактор) и монотонно изменяются в пределах гомологической серии. Наблюдается снижение свободной энергии мицеллообразования и адсорбции с увеличением липофильности ПАВ. В то же время морфологическое поведение низших и высших гомологов существенно различается. В случае додецильного и тетрадецильного производных гидродинамический диаметр агрегатов не превышает 10 нм, а в системах на основе ИА-16 и ИА-18 образуются агрегаты ~100 нм во всем диапазоне концентраций.
2. Установлено, что функциональная активность супрамолекулярных систем на основе имидазолиевых ПАВ определяется фактором гидрофобности. Величина солюбилизационной емкости в отношении красителя Оранж ОТ возрастает при переходе от ИА-12 к ИА-18 почти в 5 раз. Мембранотропная активность (способность встраиваться в липидные мембраны) существенно зависит от длины углеводородного радикала: в присутствии низших гомологов происходит разупорядочивание липидного бислоя, а добавки высших гомологов приводят к его стабилизации.
3. Установлены закономерности самоорганизации новых геминальных пиримидинсодержащих ПАВ, различающихся структурой головной группы: пиперидиниевой (ПА), морфолиниевой (МА) и триазолиевой (ТА, ТА(ОН)). Показано, что природа головной группы определяет вклад в процесс самоорганизации геометрического фактора, который незначительно влияет на агрегационную активность, но определяет морфологию и размер агрегатов. В случае ПА и незамещенного ТА наблюдается структурный переход от крупных частиц к мицеллоподобным агрегатам, а для МА и гидроксиэтилированного ТА отмечена противоположная тенденция.
4. Выявлены факторы, определяющие эффективность комплексообразования имидазол- и пиримидинсодержащих ПАВ с олигонуклеотидом и плазмидной ДНК. Показано, что для амфифилов с имидазолиевой головной группой реализуется неклассическая модель связывания компонентов за счет гидрофобного эффекта и интеркаляционного механизма встраивания. Для пиримидинсодержащих ПАВ механизм взаимодействия компонентов зависит от структуры головной группы. Наличие гидроксиэтильных фрагментов, способных к образованию водородных связей, обеспечивает более эффективное комплексообразование в системах ПАВ/ОНу.
5. Установлено, что комплексообразование в бинарных системах ПАВ-БСА сопровождается снижением порога агрегации до 45 раз. Связывание компонентов происходит преимущественно по триптофановому аминокислотному остатку белковой макромолекулы и определяется вкладом гидрофобных взаимодействий. В отличие от аммониевых аналогов, вызывающих денатурацию БСА, имидазолиевые ПАВ оказывают стабилизирующий эффект на структуру белка.
6. Впервые получены гибридные липосомы, модифицированные катионными имидазолиевыми ПАВ, для инкапсулирования лекарственных веществ различной природы, стабильные в течение длительного времени (более 6 месяцев). Проведена оптимизация состава липосом с целью достижения максимальной эффективности инкапсулирования и загрузки лекарств. Установлено, что модифицированные липосомы, загруженные новым гетероциклическим биологически активным веществом, обладают цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам M-Hela на уровне коммерческого препарата доксорубицина, но менее токсичны в отношении

нормальной линии клеток печени Chang liver в 37 раз.

Системы, полученные в настоящей работе, могут найти применение в качестве носителей генетического материала, наноконтейнеров для доставки лекарственных веществ различной природы, увеличения биосовместимости и биодоступности липофильных соединений.

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

1. Gabdrakhmanov, D. Novel dicationic pyrimidinic surfactant: Self-assembly and DNA complexation / D. Gabdrakhmanov, **D. Samarkina**<sup>\*</sup>, V. Semenov, V. Syakaev, R. Giniyatullin, N. Gogoleva, L. Zakharova // *Colloids Surf., A* – 2015. – V. 480. – P. 113–121.
2. Gabdrakhmanov, D.R. Supramolecular systems based on dicationic pyrimidine-containing surfactants and polyethyleneimine / D.R. Gabdrakhmanov, **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, F.G. Valeeva, L.F. Saifina, V.E. Semenov, V.S. Reznik, L.Ya. Zakharova, A.I. Konovalov // *Russian Chemical Bulletin* – 2015. – V. 64. – N.3. – P. 573–578.
3. Gabdrakhmanov, D.R. Cationic surfactant with 1,2,4-triazole- and uracil moieties as amphiphilic building blocks for supramolecular nanocontainers / D.R. Gabdrakhmanov, **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, V.E. Semenov, E.S. Krylova, V.S. Reznik, L.Ya. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2016. – V. 218. – P. 255–259.
4. Gabdrakhmanov, D.R. Amphiphilic macrocyclic derivative of pyrimidine: Self-assembly, solubilization and interaction with DNA decamer / D.R. Gabdrakhmanov, **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, V.E. Semenov, L.F. Saifina, L.Ya. Zakharova // *Macroheterocycles*. – 2017. – V. 10. – P. 567–573.
5. **Самаркина, Д.А.**<sup>\*</sup> Новый амфифильный мультигетероцикл: мицеллообразующие свойства и влияние на реакционную способность эфиров кислот фосфора / Д.А. Самаркина, Д.Р. Габдрахманов, В.Э. Семенов, Ф.Г. Валеева, А.Е. Николаев, Л.Ф. Сайфина, Л.Я. Захарова // *Журн. Общ. Хим.* – 2017. – Т. 87. – № 9. – С. 1495–1503.
6. **Samarkina, D.A.**<sup>\*</sup> Cationic amphiphiles bearing imidazole fragment: From aggregation properties to potential in biotechnologies / **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, A.R. Khamatgalimov, V.I. Kovalenko, L.Y. Zakharova // *Colloids Surf., A*. – 2017. – V. 529. – P. 990–997.
7. **Самаркина, Д.А.**<sup>\*</sup> Агрегирующая способность и комплексообразующие свойства системы на основе имидазолсодержащего амфифила и бычьего сывороточного альбумина / **Д.А. Самаркина**<sup>\*</sup>, Д.Р. Габдрахманов, С.С. Лукашенко, А.Р. Хаматгалимов, Л.Я. Захарова // *Журн. Общ. Хим.* – 2017. – Т. 87. – № 12. – С. 2009–2015.
8. Gabdrakhmanov, D.R. The first representative of cationic amphiphiles bearing three unsaturated moieties: Self-assembly and interaction with polypeptide / D.R. Gabdrakhmanov, F.G. Valeeva, **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, S.S. Lukashenko, A.B. Mirgorodskaya, L.Ya. Zakharova // *Colloids Surf., A*. – 2018. – V.558. – P. 463–469.
9. Vasilieva, E.A. Self-assembly of the mixed systems based on cationic surfactants and different types of polyanions: The influence of structural and concentration factors / E.A. Vasilieva, **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, G.A. Gaynanova, S.S. Lukashenko, D.R. Gabdrakhmanov, V.M. Zakharov, L.A. Vasileva, L.Ya. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2018. – V.272. – P. 892–901.

<sup>\*</sup>Фамилия Самаркина была изменена на Кузнецову 21.07.2018 г.

10. Габдрахманов, Д.Р. Полимер-коллоидные комплексы на основе нового амфифильного гетероцикла: агрегационные и солюбилизационные характеристики / Д.Р. Габдрахманов, **Д.А. Кузнецова**, Э.А. Васильева, Е.С. Крылова, Л.Ф. Сайфина, В.Э. Семенов, Л.Я. Захарова // Жидк. крист. и их практич. использ. – 2018. – Т. 18. – № 4. – С. 16–26.
11. Gabdrakhmanov, D.R. Supramolecular Systems Based on Novel Amphiphiles and a Polymer: Aggregation and Selective Solubilization / D.R. Gabdrakhmanov, **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, E.S. Krylova, I.V. Kapitanov, Y. Karpichev, Sh.K. Latypov, V.E. Semenov, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Ya. Zakharova // J. Surfact. Deterg. – 2019. – DOI 10.1002/jsde.12257.
12. **Samarkina, D.A.**<sup>\*</sup> Homologous series of amphiphiles bearing imidazolium head group: Complexation with bovine serum albumin / **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Ya. Zakharova // J. Mol. Liq. – 2019. - V. 275. – P. 232–240.
13. **Kuznetsova D.A.** Novel hybrid liposomal formulations based on imidazolium-containing amphiphiles for drug encapsulation / D.A. Kuznetsova, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, L.R. Ahtamyanova, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Ya. Zakharova // Colloids Surf., B. – 2019. – V. 178. - P. 352–357.
14. Gabdrakhmanov, D.R. Substrate specific nanoreactors based on pyrimidine-containing amphiphiles of various structures for cleavage of phosphonates / D.R. Gabdrakhmanov, **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, V.E. Semenov, F.G. Valeeva, L.Ya. Zakharova, V.S. Reznik // The 21st International Conference on Phosphorus Chemistry. Book of abstracts. – Kazan. – 2016. – P. 332.
15. **Самаркина, Д.А.**<sup>\*</sup> Супрамолекулярные системы на основе имидазолсодержащих амфифилов: агрегация и взаимодействие с декамером ДНК / Д.А. Самаркина, Д.Р. Габдрахманов, С.С. Лукашенко, Л.Я. Захарова // VI Бакеевская Всероссийская с международным участием школа-конференция для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты». Тезисы докладов. – Москва. – 2016. – С. 125.
16. **Samarkina, D.A.**<sup>\*</sup> Physico-chemical investigations on the interactions between cationic imidazole-containing surfactant and bovine serum albumin / D.A. Samarkina, A.G. Garieva, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, L.Ya. Zakharova // 9<sup>th</sup> International Symposium Molecular Mobility and Order in Polymer Systems. Book of abstracts. - St. Petersburg. – 2017. - P. 303.
17. **Samarkina, D.A.**<sup>\*</sup> Self-assembly property, membranotropic activity and guest-host interaction of methyl-3-dodecylimidazolium bromide / D.A. Samarkina, N.L. Rozental, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, L.Ya. Zakharova // XVI International Seminar on Inclusion Compounds and III-rd Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry. Book of abstracts. – Kazan. – 2017. – P. 130.
18. Gabdrakhmanov, D.R. Pyrimidin-containing amphiphile study: from aggregation properties to potential in biotechnologies / D.R. Gabdrakhmanov, **D.A. Samarkina**<sup>\*</sup>, V.E. Semenov, L.Ya. Zakharova, V.S. Reznik // XVI-th International Seminar on Inclusion Compounds and III-rd Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry. Book of abstracts. – Kazan. – 2017. – P. 69.
19. **Самаркина, Д.А.**<sup>\*</sup> Взаимодействие катионных имидазолсодержащих амфифилов с биомолекулами: бычьим сывороточным альбумином, декамером ДНК и

\*Фамилия Самаркина была изменена на Кузнецову 21.07.2018 г.

дипальмитоилфосфатидилхолином / Д.А. Самаркина, Д.Р. Габдрахманов, С.С. Лукашенко, Л.Я. Захарова // XI Всероссийская школа – конференция молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем». Тезисы докладов. – Иваново. – 2017. – С.118.

20. **Самаркина, Д.А.\*** Комплексообразующие и солубилизационные свойства бинарных систем на основе катионного имидазолсодержащего ПАВ и бычьего сывороточного альбумина / Д.А. Самаркина, А.Г. Гариева, Д.Р. Габдрахманов, С.С. Лукашенко, Л.Я. Захарова // V Всероссийская научная конференция «Теоретические и экспериментальные исследования процессов синтеза, модификации и переработки полимеров». Тезисы докладов. – Уфа. – 2017. – С. 108.

21. **Samarkina, D.\*** Aggregation and solubilization properties of novel cationic amphiphile in the absence and in the presence of polyelectrolyte / D. Samarkina, D. Gabdrakhmanov, E. Krylova, V. Semenov, L. Zakharova // XVI international conference surface forces. Book of abstracts. – Kazan. – 2018. – P. 92.

22. **Samarkina, D.\*** Imidazolium-containing surfactants bearing hydroxyethyl moiety: self-assembly in aqueous solutions, solubilization capacity and interaction with bioobjects / Samarkina, D. Gabdrakhmanov, S. Lukashenko, L. Zakharova // XVI international conference surface forces. Book of abstracts. – Kazan. – 2018. – P. 94.

23. Gabdrakhmanov, D.R., The first representative of cationic amphiphiles bearing three unsaturated moieties: self-assembly and interaction with polypeptide / D.R. Gabdrakhmanov, F.G. Valeeva, **D.A. Samarkina\***, S.S. Lukashenko, A.B. Mirgorodskaya, L.Ya. Zakharova // 1<sup>st</sup> Russian-Chinese Workshop on Organic and Supramolecular Chemistry (RCWOSC-1). Book of abstracts. – Kazan. – 2018. – P. 70.

24. **Samarkina, D.A.\*** Hybrid nanoparticles on the basis of imidazolium amphiphile and dipalmitoylphosphatidylcholine: drug encapsulation and controlled release / D.A. Samarkina, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, L.Ya. Zakharova // 1<sup>st</sup> Russian-Chinese Workshop on Organic and Supramolecular Chemistry (RCWOSC-1). Book of abstracts. – Kazan. – 2018. – P. 113.

25. **Samarkina, D.A.\*** Homologous series of novel cationic imidazolium-containing surfactants bearing hydroxyethyl moiety: interaction with bovine serum albumin / D.A. Samarkina, D.R. Gabdrakhmanov, S.S. Lukashenko, L.Ya. Zakharova // V International Conference on Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics. Book of abstracts. – St. Petersburg. – 2018. – P. 205.