# Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

На правах рукописи

### Широких Анастасия Дмитриевна

## Липидные наночастицы как средства доставки биологически активных соединений

2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы

### ДИССЕРТАЦИЯ

## на соискание ученой степени

### кандидата химических наук

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор Королёва М.Ю.

Введение6
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР14
1.1. Общая характеристика липидных наночастиц: наноэмульсий,
наноструктурированных и твердых липидных наночастиц 14
1.2. Методы получения дисперсий липидных наночастиц 18
1.2.1. Высокоэнергетические методы получения дисперсий
липидных наночастиц19
1.2.2. Низкоэнергетические методы получения дисперсий липидных
наночастиц
1.3. Компоненты дисперсий липидных наночастиц
1.3.1. Компоненты дисперсной фазы липидных наночастиц 32
1.3.2. Поверхностно-активные вещества, применяемые для
стабилизации дисперсий липидных наночастиц 53
1.4. Стерилизация липидных наночастиц
1.5. Влияние лиофилизации на физико-химические свойства
липидных наночастиц
1.6. Применение липидных наночастиц
2. МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ. 78
2.1. Реактивы и материалы 78
2.2. Получение липидных наночастиц методом температурной инверсии
фаз
2.3. Лиофилизация липидных наночастиц 80
2.4. Методы исследования 81
2.4.1. Кондуктометрический метод определения температуры
инверсии фаз

## Содержание

2.4.7. Метод инфракрасной спектроскопии для исследования молекулярной структуры компонентов дисперсий липидных наночастиц 85

2.4.9. Микропланшетный метод исследования влияния облучения на бактериальную активность в наноэмульсиях с углеводородным маслом .. 87

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ...... 89

3.4. Лиофилизация липидных наночастиц ...... 130

3.5. Потенциальные области применения липидных наночастиц ...... 149

3.5.2.4. Применение наноэмульсий с углеводородным маслом для повышения биодоступности куркумина и наночастиц диоксида церия ... 182

Благодарности	191
Заключение	192
Список литературы	194

#### Введение

#### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Проблемы повышения биодоступности липофильных лекарственных соединений, снижения их системной токсичности широко обсуждаются в научной литературе. Для их решения в качестве носителей активных соединений были предложены липидные наночастицы различного состава – наноэмульсии, включающие жидкие капли нанометрового размера, твердые липидные наночастицы (ТЛН) и наноструктурированные липидные частицы (НЛЧ), сочетающие твердые и жидкие липидные компоненты. Эти наночастицы имеют размер менее 100 нм, что позволяет обеспечить их эффективное проникновение через естественные барьеры организма. Для их получения используют различные методы, в том числе низкоэнергетические, например, метод температурной инверсии фаз (ТИФ).

Для эффективного применения в медицине и фармацевтической промышленности дисперсии липидных наночастиц должны обладать высокой кинетической устойчивостью. Для стабилизации липидных частиц, предназначенных для инкорпорирования биологически активных соединений, широкое распространение получили неионогенные поверхностно-активные вещества (ПАВ) благодаря их низкой токсичности. Некоторые из них, например, полисорбаты и сорбитаны, способны обеспечивать образование мелких капель и частиц при инверсии фаз, что позволяет эффективно применять их для получения липидных наночастиц. Однако требуется исследование влияния состава дисперсий липидных наночастиц и условий получения на их дисперсность, агрегативную и седиментационную устойчивость.

Состав дисперсной фазы оказывает существенное влияние на эффективность инкапсуляции и удержания инкорпорируемых лекарственных или биологически активных соединений. ТЛН являются более стабильными к агрегации по сравнению с наноэмульсиями, однако способны инкапсулировать меньше активного вещества. Кроме того, твердые липиды, входящие в состав ТЛН, склонны к перекристаллизации, что может приводить к неконтролируемому высвобождению инкорпорированных соединений. Комбинирование твердых и жидких липидов в составе липидных наночастиц позволяет снизить степень кристалличности твердых компонентов, способствует разупорядочиванию их кристаллической решетки, что повышает эффективность инкапсуляции и удержания липофильных соединений. В качестве компонентов дисперсной фазы применяют глицериды жирных кислот, стеариновую, олеиновую и другие жирные кислоты, парафины и др., которые для удобства в литературе называют липидами.

Проблема долгосрочного хранения дисперсий липидных наночастиц остаётся актуальной. Применение традиционных способов для увеличения срока хранения – термической сушки и стерилизации автоклавированием – невозможно из-за разрушения липидных наночастиц. Перспективной является лиофилизация, однако в литературе практически не уделяется внимание хранению лиофилизатов, в то время как условия выдержки могут оказывать влияние на дисперсность систем после редиспергирования. Представляет интерес стерилизация при воздействии ионизирующего излучения, которая проводится при температуре окружающей среды. Однако требуется исследование влияния ионизирующего излучения на физико-химические свойства дисперсий, а также на жизнеспособность микроорганизмов в таких системах.

Таким образом, актуальной проблемой является исследование возможности получения агрегативно и седиментационно устойчивых дисперсий липидных частиц из биосовместимых и биоразлагаемых компонентов, последующей лиофилизации, позволяющей увеличить срок их хранения, а также стерилизации при воздействии ионизирующего излучения и ее влияния на физико-химические свойства систем. Полученные липидные наночастицы могут быть перспективными носителями, повышающими эффективность действия лекарственных и биологически активных соединений дерматологического, офтальмологического и другого действия.

Цели и задачи исследования

Целью исследования являлось получение устойчивых к агрегации и седиментации дисперсий липидных наночастиц методом ТИФ как носителей для доставки лекарственных и биологически активных соединений.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. выявление условий получения дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином, стабилизированных неионогенными ПАВ – Tween 60 и Span 60;

2. исследование дисперсности липидных частиц с различным соотношением вышеуказанных компонентов в составе дисперсной фазы, агрегативной и седиментационной устойчивости их дисперсий;

3. изучение термических характеристик липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином;

4. исследование влияния лиофилизации на дисперсность липидных наночастиц и определение оптимальных условий их хранения;

5. изучение устойчивости дисперсий липидных наночастиц к воздействию ионизирующего излучения и исследование влияния поглощенной дозы различной мощности на эффективность стерилизации дисперсий липидных наночастиц;

6. оценка токсичности липидных наночастиц и влияния инкорпорирования в них биологически активных соединений на биологическую доступность на примере астаксантина и лютеина.

Научная новизна исследования

Установлены условия получения методом ТИФ дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином размером менее 100 нм.

Показано, что увеличение концентрации углеводородного масла или парафина в составе липидных наночастиц со стеариновой кислотой приводит к

укрупнению частиц, а также к снижению степени кристалличности компонентов. Увеличение доли углеводородного масла в составе липидных наночастиц с парафином, напротив, способствует уменьшению размеров наночастиц.

Показано, что при воздействии ионизирующего излучения с дозой до 25 кГр на липидные наночастицы не происходит изменений молекулярной структуры компонентов и дисперсности, снижения агрегативной и седиментационной устойчивости их дисперсий. Доза, необходимая для стерилизации, составляла не менее 15 кГр по отношению к грамположительным бактериям *Staphylococcus aureus* и не менее 5 кГр по отношению к грамотрицательным бактериям *Escherichia Coli*.

На основании результатов ультразвуковой допплерографии сосудов хориоаллантоисной оболочки куриных эмбрионов показано, что дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином проявляют низкую токсичность по отношению к живым организмам, а инкорпорирование в них астаксантина и лютеина ускоряет процесс восстановления после моделирования гемической гипоксии по сравнению с растворами данных биологически активных соединений. Причем наибольшую эффективность восстановления скорости кровотока демонстрировали системы на основе наноэмульсии с углеводородным маслом.

#### Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что водные дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином, стабилизированные Span 60 и Tween 60, сохраняют агрегативную и седиментационную устойчивость более 30 сут.

Показана возможность лиофилизации липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом без снижения их дисперсности при последующем редиспергировании. Хранение лиофилизованных липидных наночастиц с парафином и со смесью стеариновой кислоты и парафина не рекомендуется из-за их агрегации.

Показано, что стерилизация липидных наночастиц может проводиться при воздействии ионизирующего излучения с дозой, не превышающей 15 кГр. Это позволяет предположить, что липидные наночастицы могут быть использованы в качестве носителей радиофармацевтических препаратов, в присутствии которых будет происходить пролонгированное поддержание стерильности медицинских препаратов, содержащих наноэмульсии, НЛЧ и ТЛН.

#### Методология и методы исследования

Для определения среднего диаметра липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином использовали методы динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). ζ-потенциал наночастиц определяли с помощью лазерной допплеровской велосиметрии. Для определения температуры инверсии фаз использовали кондуктометрический метод. Агрегативную и седиментационную устойчивость дисперсий липидных наночастиц исследовали оптическими методами, основанными на анализе распределения интенсивности светопропускания и обратного светорассеяния монохромного света по высоте образца. Термическое поведение, температуры и энтальпии фазовых переходов липидных наночастиц и их компонентов определяли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Молекулярная структура компонентов дисперсий была исследована методом инфракрасной (ИК) спектроскопии на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Лиофилизацию проводили путем замораживания дисперсий липидных наночастиц и последующей сублимационной сушки при пониженной температуре и давлении. Облучение дисперсий липидных наночастиц осуществляли с помощью рентгеновской трубки на кафедре химии высоких энергий и радиоэкологии РХТУ им. Д.И. Менделеева. Влияние поглощенной дозы различной мощности на эффективность стерилизации дисперсий липидных наночастиц исследовали микропланшетным методом на грамположительных бактериях *Staphylococcus aureus* или грамотрицательных *Escherichia Coli* на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева. Оценку биологического действия дисперсий липидных наночастиц осуществляли методом высокочастотной допплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона в лаборатории ПАО «Диод».

Результаты исследования были интерпретированы с учётом современных знаний о физико-химических свойствах дисперсий липидных наночастиц. Полученные данные соответствуют результатам, полученным другими учёными при изучении свойств аналогичных систем.

Положения, выносимые на защиту:

1. закономерности влияния состава липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином на дисперсность, агрегативную и седиментационную устойчивость их дисперсий;

 условия хранения лиофилизатов липидных наночастиц, при которых они сохраняют средний размер не более 100 нм при последующем редиспергировании;

3. возможность стерилизации ионизирующим излучением дисперсий липидных наночастиц при сохранении молекулярной структуры их компонентов, их дисперсности, агрегативной, седиментационной устойчивости и необходимая мощность поглощенной дозы по отношению к грамположительным бактериям *Staphylococcus aureus* или грамотрицательным *Escherichia Coli;* 

4. повышение биодоступности биологически активных веществ: астаксантина и лютеина – при инкорпорировании в липидные наночастицы со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином.

Личный вклад автора

На всех этапах исследования от разработки и планирования до проведения экспериментов, анализа данных и формулирования выводов автор принимал непосредственное участие. Подготовка материалов для публикации осуществлялась совместно с научным руководителем.

#### Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных данных обусловлена применением комплекса взаимодополняющих современных и верифицированных методов исследования, включая методы динамического светорассеяния, лазерной допплеровской велосиметрии, ПЭМ, ДСК, кондуктометрический метод, исследование распределения интенсивности светопропускания и обратного светорассеяния монохромного света по высоте образца. Результаты экспериментов были хорошо воспроизводимыми.

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на XI и XII ежегодных конференциях Нанотехнологического общества России (г. Москва, 2020 и 2021 гг.); Международных конференциях молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2020», «МКХТ-2021», «МКХТ 2022», «МКХТ-2023», «МКХТ-2024» (г. Москва, 2020-2024 гг.); на конференции «Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ» (г. Москва, 2020 г.); VI междисциплинарном научном форуме с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (г. Москва, 2020 г.); I и III конференциях Школы молодых ученых «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (г. Москва, 2021 и 2023 гг.); XV Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых, специалистов и студентов вузов «Научно-практические проблемы в области химии и химических технологий» (г. Апатиты, 2021 г.); XVIII международной научной конференции «Физико-химические процессы в атомных системах» (г. Москва, 2022 г.); Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023», «Ломоносов-2024» (г. Москва, 2023 и 2024 гг.); VI Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (IC CCPCM), посвященной 125-летию со дня рождения П.А. Ребиндера (г. Казань, 2023 г.); VII Съезде биофизиков России (г. Краснодар, 2023 г.); Форуме молодых исследователей ХимБиоSeasons 2024 (г. Калининград, 2024 г.).

По материалам исследований, обобщенных автором в диссертации, опубликовано 29 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях и индексируемых в международных базах данных, 26 работ в материалах всероссийских и международных конференций, форумов, конгрессов.

### 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

# 1.1. Общая характеристика липидных наночастиц: наноэмульсий, наноструктурированных и твердых липидных наночастиц

Эффективность применения лекарственных соединений при лечении различных заболеваний напрямую связана с их биодоступностью и минимизацией токсического воздействия на здоровые органы и ткани. Современные носители активных веществ представляют собой наночастицы и наноструктуры различного состава с возможностью дополнительной модификации и функционализации их поверхности, полученные из биосовместимых и биоразлагаемых компонентов и обеспечивающие пролонгированную циркуляцию лекарственных соединений в кровотоке, более эффективное накопление в пораженных органах и тканях, защиту от преждевременной деградации под действием физиологических сред и защитных систем организма. Наиболее актуальными на сегодняшний день являются такие носители, как липосомы, полиэлектролитные капсулы, а также наноэмульсии, НЛЧ и ТЛН благодаря возможности получения из физиологических, биосовместимых или нейтральных для человеческого организма компонентов [18-21], которым и посвящена данная работа.

Наноэмульсии представляют собой коллоидные системы, состоящие из двух несмешивающихся жидкостей, одна из которых (дисперсная фаза) распределена в другой (дисперсионной среде) в виде капель диаметром до 100 нм. Их также называют субмикронными, ультрадисперсными или миниэмульсиями. В зависимости от распределения несмешивающихся жидкостей эмульсии делят на прямые («масло-в-воде», М/В), обратные («вода-в-масле», В/М) и множественные («вода-в-масле-в-воде», В/М/В или «масло-в-воде-в-масле», М/В/М). Наноэмульсии являются кинетически устойчивыми и термодинамически неустойчивыми системами в отличие от микроэмульсий и обладают способностью инкапсулировать биологически активные и лекарственные соединения, что делает их особенно перспективными системами для применения в фармацевтической, пищевой промышленности и др. [22-24].

Из-за наноразмерности капель и, как следствие, большой площади межфазной поверхности наноэмульсии обладают большой избыточной энергией. Адсорбция ПАВ на поверхности капель позволяет снизить межфазное натяжение (о) и способствует повышению стабильности. Поверхностная энергия рассчитывается по формуле 1.1:

$$\mathbf{G}_{\mathbf{s}} = \boldsymbol{\sigma} \cdot \mathbf{S},\tag{1.1}$$

где G<sub>s</sub> – поверхностная энергия, σ – межфазное натяжение, S – площадь межфазной поверхности.

Основными процессами, приводящими к потере агрегативной устойчивости и снижению дисперсности наноэмульсий являются коагуляция (агрегация), коалесценция и оствальдово созревание (изотермическая перегонка).

В процессе коагуляции происходит слипание капель – происходит образование агрегатов, но их размеры капель остаются прежними. Это не приводит к существенному уменьшению свободной поверхностной энергии, однако может приводить к потере седиментационной устойчивости и гравитационному разделению фаз [25]. Если две и более капель наноэмульсии сливаются в одну, происходит коалесценция. Наравне с коалесценцией оствальдово созревание, или изотермическая перегонка, считается основным процессом, который приводит к потере агрегативной устойчивости наноэмульсий [26]. При этом происходит перенос вещества от более мелких капель дисперсной фазы к более крупным, обусловленный более высоким химическим потенциалом капель меньшего размера (эффект Кельвина) и соответственно более высокой растворимостью компонентов более мелких капель в дисперсионной среде [27].

Для снижения интенсивности коагуляции и коалесценции исследуют влияние типа и концентрации ПАВ, используют различные способы модификации поверхности липидных наночастиц, например, с помощью полисахаридов и полиэтиленгликоля [28-30]. Чтобы уменьшить интенсивность оствальдова созревания, в состав капель дисперсной фазы наноэмульсий включают вещества с меньшей растворимостью в дисперсионной среде по сравнению с другими компонентами дисперсной фазы. Обычно для этого используют масла, содержащие длинноцепочечные триглицериды насыщенных кислот, которые добавляют в рапсовое, подсолнечное, кукурузное, пальмовое масло или масло виноградной косточки [31-33].

ТЛН представляют собой наноразмерные частицы, состоящие из твёрдых при комнатной температуре липидных или липидоподобных веществ, таких как стеариновая кислота и др., и стабилизированные с помощью ПАВ (рисунок 1.1). Впервые они были предложены в 1992 г. как альтернативные существующим системы для парентеральной доставки лекарственных соединений [3, 4]. Первые ТЛН были получены из триглицеридов жирных кислот. В настоящее время наиболее часто используемыми из них остаются трипальмитат и тристеарат глицерина. Тем не менее, большинство исследований ТЛН сосредоточено на стеариновой кислоте (более 25% научных работ) [15]. В последнее время широкое распространение получили наночастицы на основе твердых при комнатной температуре компонентов близких по физико-химическим свойствам, но не являющихся липидами, такими как жирные кислоты, спирты, воски и др. [34, 35]. Для единства терминологии в научной литературе липидные частицы, полученные из них, также относят к ТЛН.

Благодаря своему составу, ТЛН обеспечивают хорошую адгезию к эпителиальным клеткам кишечника и эндотелиальным клеткам стенок сосудов и повышение эффективности проникновения в пораженные клетки инкорпорированных лекарственных и биологически активных соединений [36]. Они устойчивы к коалесценции и оствальдову созреванию в отличие от наноэмульсий. Однако вследствие возможной перекристаллизации в процессе хранения для них характерно неконтролируемое высвобождение инкорпорированного лекарственного вещества [14].



м ПАВ

Капли жидкого липида, распределенные в твёрдом

Рисунок 1.1 – Структура ТЛН и НЛЧ:

 а) ТЛН с упорядоченной кристаллической структурой, б) ТЛН или НЛЧ с неупорядоченной кристаллической структурой, в) НЛЧ с частично аморфной структурой, г) НЛЧ с включениями жидкого липида

В процессе получения ТЛН компоненты дисперсной фазы затвердевают в виде переохлажденного расплава или кристаллизуются в разупорядоченной форме с большим количеством дефектов, в которых возможно дислоцирование инкорпорируемых лекарственных соединений. Процесс перекристаллизации и упорядочивания кристаллической решетки (рисунок 1.1а) приводит к неконтролируемому высвобождению активных веществ из ТЛН [15].

Для решения проблемы перекристаллизации и неконтролируемого высвобождения инкорпорированных соединений были предложены НЛЧ, которые состоят из комбинации твердого и жидкого или аморфных компонентов (рисунок 1.16-г). Это позволяет замедлить или предотвратить перекристаллизацию дефектной кристаллической структуры и повысить эффективность удержания-лекарственных соединений [6].

При комбинировании липидов в разном агрегатном состоянии возможно образование различных типов структур. При комбинировании жирных кислот с различной длиной цепи и насыщенностью связей как правило образуется структура, состоящая из различных кристаллических модификаций твердого липида с большим количеством дефектов, способствующих удержанию молекул лекарственного вещества (рисунок 1.1б). Некоторые твердые и жидкие липиды при смешении и затвердевании образуют аморфную структуру, которая позволяет инкорпорировать активные соединения в некристаллическую матрицу (рисунок 1.1в). Встраивание жидкого липида возможно в виде наноразмерных жидких включений в твердую матрицу (рисунок 1.1г) [37].

Наноэмульсии и дисперсии ТЛН и НЛЧ являются перспективными системами для адресной доставки и повышения эффективности лекарственных и биологически активных соединений. Однако актуальной остается задача получения липидных наночастиц необходимого размера, дисперсии которых обладают высокой агрегативной и седиментационной устойчивостью в течение длительного времени.

#### 1.2. Методы получения дисперсий липидных наночастиц

Методы получения дисперсий липидных наночастиц можно условно разделить на высоко- и низкоэнергетические. В первую группу входят методы, при которых обеспечивается подача энергии для диспергирования расплавленного твердого или жидкого липидов. К высокоэнергетическим относятся такие методы как диспергирование под высоким давлением, ультразвуковая обработка, микрофлюидные технологии др. [38]. К низкоэнергетическим методам относятся метод ТИФ, метод инверсии фаз при изменении состава системы, метод спонтанного эмульгирования и др. Последние позволяют обеспечивать получение наноразмерных систем с малыми энергозатратами с помощью достаточно простого оборудования.

## 1.2.1. Высокоэнергетические методы получения дисперсий липидных наночастиц

Одним из наиболее распространенных и широко используемых высокоэнергетических методов получения дисперсий является диспергирование под высоким давлением. Он позволяет получать наноразмерные капли и частицы диаметром 50-200 нм. Для этого грубодисперсную эмульсию прокачивают под давлением через канал малого диаметра, где в результате турбулентного движения потоков жидкостей, кавитации и сдвиговых напряжений происходит диспергирование [39]. В зависимости от организации потоков в камере диспергирования аппараты делятся на радиальные, струйные и сопловые различной геометрии.

Диспергирование под высоким давлением позволяет получать капли определенного размера путем варьирования давления и количества циклов диспергирования [40]. При получении липидных наночастиц (ТЛН или НЛЧ), содержащих твердые при комнатной температуре липиды, методом диспергирования под высоким давлением требуется нагрев выше их температуры плавления [41]. При этом частицы наименьшего размера образуются при использовании 3-5 циклов диспергирования при давлении 50-150 МПа [42]. Более высокое давление при диспергировании может приводить к образованию склонных к коалесценции капель из-за превышения скорости образования новой поверхности над скоростью адсорбции ПАВ на ней и, как следствие, недостаточной стабилизации, приводящей к потере агрегативной и седиментационной устойчивости. Вследствие этого требуется исследование влияния состава дисперсий (концентрации ПАВ, дисперсной фазы) и условий её получения на дисперсность липидных наночастиц и стабильность их дисперсий в течение длительного времени [43]. Повышение температуры расплава способствует уменьшению размеров капель предварительно полученной эмульсии и размеров получаемых липидных частиц за счет снижения вязкости и, как следствие, увеличения вклада турбулентности и кавитации в процесс диспергирования [43]. Так, в [44] предварительную эмульсию с β-каротином и смесью среднецепочечных триглицеридов получали с помощью высокоскоростного гомогенизатора, затем диспергировали при высоком давлении. При этом повышение температуры диспергирования в гомогенизаторе высокого давления с 30 до 50 °C способствовало уменьшению размеров капель с 168 до 136 нм.

Однако многие лекарственные соединения, инкорпорируемые в липидные наночастицы, могут деградировать при термическом воздействии, что существенно ограничивает области применения метода горячего диспергирования. В этом случае возможно проведение холодного диспергирования, при котором получают более крупные липидные частицы микрометрового размера с инкапсулированным активным соединением. Для этого предварительно полученные твердые частицы измельчают и диспергируют в холодный раствор ПАВ для предотвращения агрегации [45]. Стоит отметить, что метод холодного диспергирования при высоком давлении позволяет получать частицы более крупного размера с большей полидисперсностью и менее устойчивые к агрегации [46].

Наиболее простым высокоэнергетическим методом получения дисперсий липидных наночастиц с точки зрения аппаратурного оформления является механическое диспергирование. Для его реализации компоненты дисперсий нагревают до полного расплавления и подвергают обработке с помощью высокоскоростного диспергатора с последующим охлаждением для формирования ТЛН или НЛЧ при использовании твердых липидов [24]. Несмотря на его простоту, метод является энергозатратным, с его помощью сложно получить наночастицы диаметром менее 200-300 нм.

Так же, как при получении методом диспергирования под высоким давлением, с увеличением концентрации дисперсной фазы механическое измельчение капель становится более энергозатратным, и при одинаковых условиях получения размер капель дисперсной фазы увеличивается [47]. Аналогично с увеличением доли компонента с более низкой температурой плавления –

например, жидкого при комнатной температуре – в составе дисперсной фазы НЛЧ происходит уменьшение размеров частиц [48]. Это связывают со снижением вязкости смеси липидов [49, 50] и последующим разупорядочиванием кристаллической структуры твердого липида после затвердевания вследствие встраивания жидкого компонента [51].

При получении дисперсии липидных наночастиц путем микрофлюидизации водная и масляная фаза по отдельности или предварительно подготовленная грубодисперсная эмульсия под давлением от 3 до 140 МПа прокачивается через микроканалы. В результате столкновения потоков, движущихся с высокой скоростью, возникают ударные силы, кавитация и сдвиговые напряжения, которые способствуют диспергированию системы [52]. При получении ТЛН и НЛЧ требуется обеспечение повышенной температуры в каналах микрофлюидизатора для поддержания липидов в расплавленном состоянии и последующее охлаждение для их кристаллизации [53].

Микрофлюидизаторы позволяют получать липидные наночастицы небольшого размера, который возможно контролировать путем варьирования давления. Так, в [54] показано, что увеличение давления от 100 до 170 МПа и количества циклов пропускания через микрофлюидизатор способствует уменьшению размеров липидных наночастиц с маслом семян камелии с 68 до 41 нм [55]. В среднем при реализации микрофлюидного метода наноразмерные липидные частицы получают с помощью 3-6 циклов микрофлюидизации [55-57], однако оптимальное количество может достигать 15-20 в зависимости от состава системы [54]. Отмечено, что микрофлюидные технологии позволяют получать наноэмульсии с более узким распределением капель дисперсной фазы по размерам и меньшего размера, чем, например, метод диспергирования под высоким давлением в аналогичных условиях [24, 58-61].

Конструкция и диаметр капилляров также оказывают влияние на размер получаемых капель. Существуют микрофлюидизаторы с сонаправленным, Н-, Y-, T-образным движением потоков жидкостей [24]. Так, получение наноэмульсий и дисперсий ТЛН с октадеканом с помощью Y-образного микрофлюидизатора позволяло получать липидные наночастицы меньшего размера – до 36-43 нм – по сравнению с устройствами других геометрий [62]. Несмотря на широкие возможности микрофлюидного метода для получения наноэмульсий, ТЛН и НЛЧ, его применение ограничено сложностью конструкции, масштабирования технологии, получения липидных наночастиц из высоковязких липидов [63].

Получение липидных наночастиц возможно посредством ультразвуковой обработки расплавленных компонентов с последующим охлаждением для формирования ТЛН и НЛЧ. Ультразвуковое диспергирование предполагает использование зонда, создающего акустические волны. При получении наноэмульсии это способствует формированию кавитационных пузырьков в жидкости, при разрушении которых высвобождающаяся энергия способствует диспергированию эмульсии [64, 65].

Перемешивание при ультразвуковой обработке происходит за счет формирования потоков под действием акустического давления – жидкость движется от плоского ультразвукового зонда ко дну сосуда и, затем, к его стенкам [66]. Конический наконечник обеспечивает более сложное движение потоков, однако менее интенсивное перемешивание. Но, несмотря на это, конические зонды более предпочтительны для ультразвукового диспергирования за счет более эффективного диспергирующего воздействия вследствие формирования большего количества кавитационных пузырьков по сравнению с плоской и усеченной формой [67].

Регулируя интенсивность ультразвукового воздействия и продолжительность процесса, можно контролировать размер частиц. Наиболее существенное влияние на размер частиц оказывает длительность ультразвуковой обработки. С увеличением времени воздействия уменьшается размер капель и частиц, как правило, до некоторого предела. При дальнейшей ультразвуковой обработке размер частиц остается постоянным [68-70] или незначительно увеличивается [71]. С увеличением амплитуды колебаний акустического зонда, как правило, также происходит уменьшение размеров капель и частиц [70], однако для некоторых составов выявлен предел увеличения амплитуды, свыше которого наблюдается укрупнение частиц [68]. Это может быть связано с локальным разогревом дисперсии вблизи зонда и интенсификацией процессов коалесценции в процессе диспергирования. Ультразвуковое диспергирование позволяет получать высокодисперсные липидные наночастицы [72], но требует определения оптимальных условий получения – интенсивности, времени ультразвуковой обработки и пр. [73].

Благодаря простоте и эффективности, ультразвуковое диспергирование часто применяют в комбинации с другими методами, что позволяет уменьшить размер получаемых липидных наночастиц [74-76]. Несмотря на то, что ультразвуковое диспергирование является доступным и эффективным высокоэнергетическим методом, его масштабирование затруднено, так как эффективное диспергирование происходит вблизи зонда – в зоне образования кавитационных пузырей, а также происходит локальный разогрев дисперсии, что может негативно влиять на эффективность инкапсулирования лекарственного вещества, размеры липидных наночастиц и пр.

При получении дисперсий липидных частиц мембранными методами происходит продавливание расплавленной дисперсной фазы через поры мембраны в непрерывно движущуюся, нагретую выше температуры плавления компонентов дисперсионную среду, которая уносит формирующиеся мелкие капли [77, 78]. Затвердевание ТЛН и НЛЧ происходит при их последующем охлаждении [79]. Выявлено, что увеличение скорости протекания компонентов дисперсной фазы через поры мембраны [80], увеличение диаметра пор и уменьшение скорости движения дисперсионной среды [81] приводит к уменьшению дисперсности капель. Размер липидных наночастиц, получаемых мембранным методом, в среднем в 2-9 раз превышает диаметр пор, однако возможно повторное прокачивание полученной эмульсии через мембрану, что способствует уменьшению размеров капель и частиц до размеров в 2-3 раза меньше, чем поры мембраны [82]. Несмотря на перспективность и широкий диапазон варьируемых параметров для получения липидных наночастиц необходимого размера, мембранное диспергирование не получило широкого распространения из-за сложности получения липидных наночастиц менее 100 нм, масштабирования и обслуживания мембранных модулей.

В зависимости от используемого оборудования и выбранного высокоэнергетического метода получения диспергирование может осуществляться посредством различных режимов течения жидкостей. Выделяют *ламинарновязкое* диспергирование, при котором капли деформируются и разбиваются в результате равномерного движения потока жидкости, *турбулентно-вязкое*, при котором диспергирование происходит под действием крупных турбулентных вихрей, существенно превышающих по размеру капли эмульсии, *турбулентно-инерционное* – в этом случае, аналогично ламинарно-вязкому диспергированию, капли деформируются и разбиваются под действием завихрений, соразмерных с ними, и *кавитационное* диспергирование в результате высвобождения энергии при разрыве кавитационных пузырьков. Преобладающие механизмы диспергирования в зависимости от высокоэнергетического метода представлены в таблице 1.1.

В зависимости от метода получения в систему подводится различное количество энергии для разбивания капель предварительной эмульсии, однако практически во всех высокоэнергетических методах оно превышает теоретически необходимое, которое находится в диапазоне от 10 до 100 кДж/м<sup>3</sup> в зависимости от концентрации дисперсной фазы (таблица 1.1). Это обусловлено тем, что, например, при механическом диспергировании или получении липидных наночастиц под давлением большая часть энергии расходуется на интенсификацию движения жидкости для обеспечения высокоинтенсивной турбулентности, необходимой для диспергирования. При ультразвуковой обработке преобладающее количество энергии преобразуется в вибрацию жидкости, не приводящее к разбиванию капель. Наиболее энергоэффективным методом является мембранное диспергирование, однако его масштабирование является затруднительным.

Таблица 1.1 – Сравнение высокоэнергетических методов получения липидных наночастиц [78]

Метод получения	Механизм	Плотность	Минималь-	Ссылка
	диспергиро-	энергии,	ный размер	
	вания	кДж/м <sup>3</sup>	капель, нм	
Механическое дисперги-	ТИ, ТВ, ЛВ	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	61,9	[47]
рование				
Диспергирование под	ТИ, ТВ, К	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>	20,3	[83]
высоким давлением				
Микрофлюидизация	ТИ, ТВ, К	104-106	20,5	[84]
Ультразвуковое диспер-	К	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	29,3	[85]
гирование				
Мембранное дисперги-	ЛВ	10-10 <sup>3</sup>	50	[86]
рование				

Примечание: ЛВ – ламинарно-вязкое, ТВ – турбулентно-вязкое, ТИ – турбулентно-инерционное, К – кавитационное диспергирование

Применение высокоэнергетических методов зачастую ограничено вязкостью систем (таблица 1.1). Так, получение низковязких высокодисперсных систем возможно с помощью диспергаторов высокого давления и микрофлюидизаторов, средневязкие дисперсии предпочтительнее получать путем ультразвуковой или мембранной обработки, а высоковязкие – механическим диспергированием [78].

## 1.2.2. Низкоэнергетические методы получения дисперсий липидных наночастиц

Высокоэнергетические методы получения наноэмульсий и дисперсий липидных наночастиц часто требуют значительных затрат энергии и могут приводить к разрушению термочувствительных компонентов систем в результате локального разогрева. Низкоэнергетические методы позволяют получать дисперсии с меньшими энергетическими затратами без неконтролируемого термического воздействия на компоненты липидных наночастиц и инкорпорируемые соединения [87]. Однако они более требовательны к свойствам компонентов – масляной фазе и ПАВ. При использовании низкоэнергетических методов в качестве основных стабилизаторов практически не применяют белки и полисахариды, поскольку они не могут обеспечивать спонтанного эмульгирования или инверсии фаз, необходимой для образования наноразмерных капель и частиц [38].

Метод спонтанного эмульгирования предполагает самопроизвольное образование эмульсии в результате взаимной диффузии водной и масляной фаз при их контакте. Для его реализации одну из фаз, смешанную с ПАВ, по каплям вводят в другую при постоянном перемешивании. По одному из предполагаемых механизмов на поверхности раздела фаз происходит формирование бинепрерывной эмульсии с последующим образованием липидных наночастиц (рисунок 1.2). Самопроизвольное эмульгирование возможно и в отсутствии ПАВ, но с использованием растворителей (эффект узо) и часто используется в пищевой промышленности [88].

Метод спонтанного эмульгирования крайне чувствителен к составу компонентов и условиям получения эмульсии. Так, в [89] на примере наноэмульсии с октановой кислотой, Capryol 90 и этилолеатом, стабилизированной Tween 80 и Span 20 и со-ПАВ, было показано, что увеличение доли масляной фазы с 5 до 27 об.% и кислотности водной фазы с pH 7,4 до 1,2 приводило к увеличению размеров капель наноэмульсии, однако он не превышал 200 нм. Постепенное введение одной фазы в другую позволяло получать более мелкодисперсную систему или не оказывало существенного влияния на их диаметр по сравнению с быстрым смешением фаз.



Рисунок 1.2 – Иллюстрация предполагаемых стадий образования наноэмульсии при спонтанном эмульгировании [12]

При этом размер липидных наночастиц, получаемых методом спонтанного эмульгирования, зачастую оказывается меньше, чем в аналогичных системах, полученных высокоэнергетическими методами. Так, в [90] показано, что метод спонтанного эмульгирования позволяет получать капли наноэмульсии с маслом семян чиа не более 150 нм за одну стадию, в то время как при использовании микрофлюидных технологий необходимо использование большого количества циклов, что является энергозатратным и делает метод спонтанного эмульгирования более перспективным и масштабируемым [91]. Стоит отметить, что данным методом возможно получение агрегативно устойчивых наноэмульсий с размером капель 20-60 нм в том числе из природных эфирных масел [92]. Метод спонтанного эмульгирования также используют для получения ТЛН и НЛЧ, однако процесс последующего охлаждения и кристаллизации может оказывать влияние на устойчивость и физико-химические свойства липидных наночастиц [93, 94].

К низкоэнергетическим относятся методы, основанные на инверсии фаз – переходе обратной эмульсии в прямую – при определенных условиях, такие как метод инверсии фаз при изменении состава системы и метод ТИФ. Для их реализации предварительно получают обратную эмульсию. При изменении состава или температуры, соответственно, происходит изменение кривизны слоя ПАВ вплоть до практически нулевых значений, образование бинепрерывной эмульсии с последующим переходом в прямую и затвердеванием липидной матрицы при получении ТЛН и НЛЧ (рисунок 1.3). При обеспечении достаточно высокой скорости перехода обратной эмульсии в прямую, оптимального состава системы и условий получения дисперсий данные методы позволяют получать липидные наночастицы с узким распределением по размерам [95].



Рисунок 1.3 – Схематичное изображение получения наноэмульсии методами инверсии фаз при изменении состава (А) и температурной инверсии фаз (Б) [95]

Метод инверсии фаз при изменении состава наиболее широко применяют для получения наноэмульсий благодаря простоте и масштабируемости. Так, для получения прямой эмульсии масляную фазу смешивают с ПАВ и в неё по каплям добавляют компоненты водной фазы. При этом происходит образование обратной эмульсии, которая при увеличении концентрации водной фазы переходит в прямую. Повышение скорости введения водной фазы может способствовать снижению дисперсности наноэмульсии, а интенсивное перемешивание – напротив, уменьшать размеры капель, как это было показано на примере наноэмульсии с имбирным маслом, стабилизированной Tween 80 [96]. Увеличение температуры проведения процесса эмульгирования также может способствовать уменьшению размеров капель наноэмульсии [97]. Наноэмульсии на основе Capryol 90, полученные методами диспергирования под высоким давлением и инверсии фаз при изменении состава, имели близкий размер капель – 23-78 нм в зависимости от состава и условий получения. При этом присутствовали пики, соответствующие каплям и агрегатам размером более 200 нм. Низкоэнергетический метод инверсии фаз при изменении состава позволяет получать системы с более низким индексом полидисперсности и близким к мономодальному распределением капель по размерам [98].

Метод ТИФ позволяет получать не только наноэмульсии, но и дисперсии ТЛН и НЛЧ и представляет особый интерес для их получения, поскольку изначально предполагает нагревание, необходимое для расплавления твёрдых компонентов. Температуры инверсии зачастую превышают температуры плавления наиболее часто используемых липидных компонентов, а последующее охлаждение способствует кристаллизации липидной матрицы [12].

В отличие от метода инверсии фаз при изменении состава в ТИФ наиболее широко используют ПАВ, которые обладают способностью менять сродство к водной и масляной фазам в зависимости от температуры [24]. К ним относятся, например, неионогенные ПАВ полиоксиэтиленового типа, которые склонны к изменению степени гидратации полиоксиэтиленовых групп при нагревании и охлаждении, что приводит к изменению кривизны слоя ПАВ и инверсии фаз [9]. При низкой температуре полярные группы молекул ПАВ сильно гидратированы, поэтому они проявляют высокие значения гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ). При нагревании происходит дегидратация, и ПАВ становится преимущественно липофильным, соответственно, ГЛБ снижается. При температуре инверсии слой ПАВ на границе раздела фаз обладает минимальной кривизной. Благодаря снижению межфазного натяжения до практически нулевых значений возможно получение наноразмерных систем без высоких затрат энергии [12]. При этом быстрое охлаждение способствует увеличению их дисперсности [99].

Взаимные переходы прямой и обратной эмульсии при инверсии фаз в процессе нагревания-охлаждения сопровождаются существенным изменением электропроводности системы вследствие изменения дисперсионной среды между токопроводящей водной фазой и органической, обладающей низкой электропроводностью. При этом на кондуктометрической кривой (рисунок 1.4) с повышением температуры наблюдается постепенное снижение электропроводности прямой эмульсии вплоть до её перехода в бинепрерывную. Это может сопровождаться увеличением проводимости с последующим снижением после инверсии фаз и перехода эмульсии в обратную [11].

Состав дисперсионной среды также оказывает существенное влияние на физико-химические характеристики липидных наночастиц. Так, использование в качестве водной фазы фосфатного буферного раствора способствовало уменьшению размеров НЛЧ со среднецепочечными триглицеридами и глицерилбегенатом по сравнению с аналогичными дисперсиями с дистиллированной водой: с 77,52 $\pm$ 1,07 до 69,75 $\pm$ 2,19 нм, соответственно. Это сопровождалось увеличением абсолютного значения ζ-потенциала с 19,70 $\pm$ 1,14 до 24,80 $\pm$ 0,15 мB, что обусловлено образованием двойного электрического слоя [102].



Рисунок 1.4 – Зависимость электропроводности эмульсий, образующихся в системе водный 10<sup>-2</sup> М раствор NaCl/Brij 30/гексадекан, при различных концентрациях Brij 30 (S) от температуры [11]

По сравнению с высокоэнергетическими методами получения наноэмульсий и дисперсий ТЛН и НЛЧ метод ТИФ позволяет получать более высокодисперсные системы с близким к мономодальному распределением частиц по размерам. В [103] было показано, что капли наноэмульсии со стиреном и н-гексадеканом, полученные методом ТИФ, имели диаметр 71-87 нм в зависимости от концентрации ПАВ, в то время как ультразвуковая обработка позволяла получать системы аналогичного состава с каплями размером 79-144 нм.

Таким образом, благодаря простоте реализации, возможности получать липидные наночастицы из биосовместимых, биоразлагаемых компонентов, низким энергозатратам, за счет отсутствия необходимости использовать органические растворители получение наноэмульсий и дисперсий ТЛН и НЛЧ методом ТИФ является перспективным, поскольку позволяет получать системы с высокой дисперсностью и узким распределением частиц по размерам. Од-

нако для этого требуется исследование физико-химических особенностей процесса, влияния состава на дисперсность липидных наночастиц, биодоступность, а также агрегативную и седиментационную устойчивость их дисперсий.

#### 1.3. Компоненты дисперсий липидных наночастиц

Основными компонентами прямых наноэмульсий и дисперсий ТЛН и НЛЧ являются твердые и жидкие липиды, составляющие дисперсную фазу, ПАВ для её стабилизации и водная дисперсионная среда, представляющая собой как правило воду или растворы неорганических солей. Возможно инкорпорирование лекарственных и биологически активных соединений и модификация поверхности капель и частиц, например, для нацеливания и повышения биодоступности [104]. Поскольку липидные наноразмерные системы получили наибольшее распространение в пищевой, медицинской и косметической промышленности, их компоненты должны быть биосовместимыми, биоразлагаемыми и нетоксичными.

#### 1.3.1. Компоненты дисперсной фазы липидных наночастиц

Наноэмульсии и дисперсии ТЛН и НЛЧ широко применяют для повышения биодоступности и обеспечения контролируемого высвобождения липофильных лекарственных веществ, поэтому липидная матрица должна обеспечивать высокую ёмкость и эффективность удержания активных соединений. На эти характеристики оказывает существенное влияние структура образующихся липидных наночастиц и взаимодействие твердых и жидких компонентов дисперсной фазы между собой [1].

Большинство твёрдых липидов, используемых в качестве основы для ТЛН, таких как глицериды жирных кислот, стеариновая кислота и др., существуют в нескольких полиморфных модификациях. Наиболее разупорядоченной является α-модификация, имеющая преимущественно гексагональную кристаллическую решетку. Она является наименее стабильной и имеет наиболее низкую температуру и удельную теплоту плавления. При перекристаллизации возможен переход в более упорядоченную и устойчивую метастабильную орторомбическую β'-модификацию, а также триклинную или моноклинную β-форму с более высокой температурой плавления и большей удельной теплотой плавления [105]. Перекристаллизация липидов в процессе хранения липидных наночастиц приводит к неконтролируемому высвобождению лекарственных и биологически активных соединений, инкорпорированных в дефектную кристаллическую решетку липида. Комбинирование жидких и/ или твёрдых липидов разного химического строения в составе ТЛН и НЛЧ способствует стабилизации дефектной кристаллической структуры и препятствует протеканию процессов перекристаллизации за счет формирования более мелких кристаллитов. Их укрупнение затруднено из-за присутствия компонентов дисперсной фазы отличающегося химического строения. Такое разупорядочивание кристаллической структуры повышает эффективность удержания-лекарственных веществ наночастицами [15].

Наиболее распространенным твердым компонентом дисперсной фазы является стеариновая кислота [15], являющаяся одним из липидов, непосредственно участвующих в человеческом метаболизме [106]. Особый интерес стеариновая кислота представляет в качестве основы для систем трансдермальной доставки активных соединений. Для проникновения через липидную матрицу между корнеоцитами кожи активное вещество должно иметь небольшую молекулярную массу (<600 дальтон), а его носитель – малый размер (<100 нм) и высокую растворимость в липидной матрице [107]. Благодаря этому использование носителей на основе жирных кислот существенно повышает эффективность трансдермального проникновения [108]. Помимо прочего, стеариновая кислота обладает высокой химической стабильностью, стойкостью к окислению, что обеспечивает возможность длительного хранения получаемых ТЛН и НЛЧ, и хорошо исследованной кристаллической структурой, что позволяет получать носители, обеспечивающие высокую эффективность удержания и контролируемое высвобождение инкорпорированных активных компонентов из наночастиц [109].

Благодаря биосовместимости и близости химического строения наиболее часто применяемым жидким липидом при получении НЛЧ со стеариновой кислотой является олеиновая кислота. В большинстве работ описано получение наночастиц диаметром от 100 до 500 нм, который уменьшается с увеличением массовой доли олеиновой кислоты в составе дисперсной фазы. В [110] связывают повышение дисперсности со снижением вязкости липидной фазы. В [110] и [111] были получены НЛЧ со стеариновой и олеиновой кислотами, стабилизированные лаурилсульфатом натрия, диаметром от 125 до 498 нм. Однако липидные наночастицы, полученные в [110], демонстрировали высокую агрегативную устойчивость более 6 мес., в то время как в [111] укрупнялись до 539 нм в течение 90 дней.

Олеиновую кислоту также применяют для получения высокодисперсных наноэмульсий для повышения биодоступности лекарственных и биологически активных веществ. Предложены методики получения коллоидных дисперсий, капли которых не превышают 200 нм [112-114]. В [114] отмечено, что при использовании Span 60, который является твердым при комнатной температуре, и Tween 60 на поверхности капель образуется твердообразная оболочка ПАВ, что обеспечивает более эффективную стабилизацию по сравнению с жидкими Span 80 и Tween 80.

Результаты ДСК подтверждают, что включение олеиновой кислоты в состав ТЛН со стеариновой кислотой способствует снижению температуры плавления и степени кристалличности. Так, в [115] ТЛН со стеариновой кислотой имели температуру и энтальпию плавления 57,15 °C и 185,2 Дж/г, соответственно, которые снижались до 47,61 °C и 69,17 Дж/г при включении 30% олеиновой кислоты. Это сопровождалось снижением степени кристалличности от 100 до 53%, что свидетельствовало о разупорядочивании кристаллической решетки стеариновой кислоты, что является предпочтительным для инкорпорирования лекарственных соединений [115].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных НЛЧ со стеариновой и олеиновой кислотами, в большинстве из них получают липидные наночастицы размером более 100 нм. Публикаций, посвященных наночастицам менее 50 нм, позволяющих обеспечивать эффективное проникновение через клетки в пораженные органы и ткани, сравнительно меньше (таблица 1.2).

Таблица	12	- Наи	более	nacm	nocri	паненные	компонент	гы пи	пилных	наноча	стип
Гаолица	1.2	Turr	00100	paon		parierindie	KOWINOIICI		пидпыл	nuno iu	отиц

Твердый липид	Жидкий липид	Соотношение твер-	ПАВ	Средний раз-	Ссылка
		дого и жидкого липи-		мер, нм	
		дов			
Стеариновая кислота	-	-	Poloxamer 188,	15-150	[116]
			Poloxamer 407,		
			Tween 20, Tween 80		
Стеариновая кислота	-	-	Tween 60 + Span 60	21	[117]
Стеариновая кислота	-	-	Лецитин, Myrj59	55	[118]
Стеариновая кислота	-	-	Соевый лецитин	55-98	[119]
Стеариновая кислота	-	-	Гексадецилтриме-	110	[120]
			тил аммоний бро-		
			мид, соевый леци-		
			тин		
Стеариновая кислота	-	-	Лецитин, таурохо-	165-210	[121]
			лат натрия		
Стеариновая кислота	-	-	Tween 80,	200-500	[122]
			Poloxamer 407		
Стеариновая кислота,	-	-	Poloxamer 188	201	[123]
Dynasan 114,				232	
Парафин,				234	
Dynasan 118,				274	
Compritol ATO 888				314	
Продолжение таблицы 1.2.

Стеариновая кислота	-	-	Соевый лецитин +	277-304	[124]
			Tween 80,		
			Соевый лецитин +	318-406	
			Pluronic F127		
Стеариновая кислота,	-	-	Tween 80	304	[125]
Глицерил бегенат +				317	
Стеариновая кислота,					
Глицерил бегенат				333	
Стеариловый спирт	-	-	Polysorbate 60,	95-130	[126]
			Brij 78,		
			РЕG6000 моносте-		
			арат		
Трипальмитат глице-	-	-	Tween 20	65-125	[127]
рина					
Трипальмитат глице-	-	-	Lipoid S100,	100-230	[128]
рина			Гликохолат натрия,		
			Dynasan 116,		
			Тилоксапол,		
			Solutol HS 15,		
			Cremophor EL,		
			Олеат натрия		
Моностеарат глице-	-	-	Tween 80	188-419	[129]
рина					

Продолжение таблицы 1.2.

Цетилпальмитат	-	-	Pluronic F68	175	[130]
Geleol	-	-	Tween 80	236	[131]
Карнаубский воск,	-	-	Tween 80,	114-182	[132]
Воск из рисовых от-			Span 80,	173-224	
рубей,			Lipoid S100	117-153	
Пчелиный воск					
Compritol ATO 888,	-	-	Tween 80,	101-105	[133]
Парафин			Span 85	103-105	
-	Олеиновая кислота	-	Tween 60, Span 60;	28-35	[114]
			Tween 80, Span 80	33-35	
-	Олеиновая кислота	-	Lipoid E80, дистеа-	147-170	[112]
			роилфосфатидил-		
			этаноламин – по-		
			лиэтиленгли-		
			коль 2000		
			(mPEG2000-DSPE)		
-	Олеиновая кислота	-	Маннид моно-	154	[113]
			олеат,		
			Tween 80		
-	Карвакрол + смесь	-	Tween 80, олеат ка-	19-177	[134]
	среднецепочечных		лия		
	триглицеридов				
	(MCT)				

# Продолжение таблицы 1.2.

-	Изопропилмиристат	-	Лаурет-11 карбоно-	20-200	[135]
			вая кислота, лаури-		
			новая кислота		
-	Каприловый/капри-	-	Полиглицерил-10	60-130	[136]
	новый триглицерид		лаурат, полиглице-		
			рил-3 метилглю-		
			коза дистеарат,		
			гидрогенизирован-		
			ный лецитин		
-	Miglyol 812	-	Tween 80	45-170	[137]
-	Минеральное масло	-	Tween 20	172	[138]
	M5904				
-	Оливковое масло,	-	Tween 80	12	[139]
	Линолевая кислота,			17	
	Соевое масло,			93	
	Масло камелии,			107	
	Подсолнечное масло			222	
-	Кунжутное масло	-	Tween 20,	13-191	[140]
			Tween 80		
-	Эфирные масла ко-	-	Tween 80	24-137	[141]
	рицы, тмина и розма-				
	рина				

Продолжение таблицы 1.2.

-	Эфирное масло ко-	-	Чайный сапонин,	128-489	[142]
	рицы		хитозан		
-	Эфирное масло ла-	-	Соевый протеин	152	[143]
	ванды				
Стеариновая кислота	Олеиновая кислота	3:1	Tween 80	102-369	[144]
Стеариновая кислота	Олеиновая кислота,	1:4	Tween 80, Span 60,	103-155	[145]
	Эфирное масло да-		Span 80		
	масской розы				
Стеариновая кислота	Олеиновая кислота	От 3:2 до 4:1	Лаурилсульфат	125-497	[110]
			натрия		
Стеариновая кислота,	Олеиновая кислота	1:3	Tween 80	137-252	[146]
Пчелиный воск					
Стеариновая кислота	Олеиновая кислота	От 4:1 до 1:0	Лаурилсульфат	143-292	[111]
			натрия		
Стеариновая кислота	Олеиновая кислота	От 13:9 до 19:1	Додецилсульфат	151-379	[147]
			натрия		
Стеариновая кислота	Олеиновая кислота	От 1:1 до 3:1	Poloxamer 407	150-179	[148]
Стеариновая кислота	Олеиновая кислота,	От 1:1 до 2:1	Tween 80, Span 80	184-356	[149]
	Изопропилмиристат,				
	Изопропилпальмитат				
Стеариновая кислота	Олеиновая кислота	5:3	Цетилпиридиний	285	[150]
			хлорид		

Продолжение таблицы 1.2.

Стеариновая кислота	Кунжутное масло	2:1	Tween 80, Лаурил-	74-130	[151]
			сульфат натрия		
Стеариновая кислота,	Масло антарктиче-	1:1	Лецитин	112-989	[152]
Лауриновая кислота,	ского криля				
Миристиновая кис-					
лота,					
Моностеарат глице-					
рина,					
Дистеарат глицерина,					
Тристеарат глице-					
рина,					
Тримиристат глице-					
рина,					
Трилаурат глицерина					
Стеариновая кислота	Касторовое масло	10:1	Tween 20,	169-1813	[153]
			Tween 80,		
			Poloxamer 188		
Стеариновая кислота	Phosal 53 MCT	От 1:1 до 4:1	Lutrol micro 68	180-250	[154]
Стеариновая кислота	Сквален	8:1	Соевый лецитин	223	[155]
Стеариновая кислота,	Масло эхиума	1:3	Изолят сывороточ-	280-300	[156]
Лауриновая кислота,			ного протеина	160-190	
Пальмитиновая кис-					
лота				180-200	

Продолжение таблицы 1.2.

Стеариновая кислота	Масло моринги	5:1	Poloxamer 188	393	[157]
Миристиновая кис-	Capmul MCM	От 7:3 до 9:1	Poloxamer 188,	24-48	[158]
лота			Tween 80		
Миристиновая кис-	Олеиновая кислота,	От 7:3 до 4:1	Tween 80, Span 80	289-596	[159]
лота	Изопропилмиристат,			232-316	
	Изопропилпальмитат			248-349	
Лауриновая кислота	Олеиновая кислота	От 7:3 до 9:1	Tween 80	71-289	[160]
Пальмитиновая кис-	Олеиновая кислота	9:1	Tween 80	252	[161]
лота					
Тримиристат глице-	Соевое масло	От 1:1до 17:3	Соевый лецитин,	73-126	[162]
рина			Poloxamer 188,		
			Tween 80, дезокси-		
			холат натрия		
Монолаурат глице-	Тимол	От 1:4 до 4:1	Казеинат натрия	125-162	[163]
рина					
Тристеарат глице-	Триолеат глицерина,	От 5:1до 39:1	Tween 60	130-160	[164]
рина	Трикаприлат глице-				
	рина,			140-150	
	Пентадекан,			130-150	
	Оливковое масло,			130-260	
	Пальмовое масло			140-300	

Продолжение таблицы 1.2.

Пчелиный воск,	Масло гранатовых	От 1:1 до 9:1	Tween 80, лецитин	100-350	[51]
Прополисовый воск,	косточек			90-210	
Пчелиный воск +				78-250	
Compritol 888 ATO,					
Прополисовый воск +				80-280	
Compritol 888 ATO					
Compritol 888 ATO,	Олеиновая кислота +	3:2	Додецилсульфат	213-445	[165]
Пчелиный воск +	Эфирное масло ли-		натрия	301-318	
Карнаубский воск	пии				
Карнаубский воск	Изопропилпальми-	От 1:9 до 1:4	Tween 80, моносте-	143-165	[166]
	тат,		арат глицерина		
	Miglyol TM 812			279-504	
Канделильский воск	Кукурузное масло	От 1:99 до 3:2	Tween 80	162-197	[167]
Масло какао	Оливковое масло,		Tween 80	119-142	[168]
	масло кардамона				
Масло какао,	Кунжутное масло,	4:1	Tween 80,	133-193	[169]
Моностеарат глице-	Масло эхиума		Фосфатидилхолин,		
рина			Poloxamer 188		
Масло какао,	Кунжутное масло,	От 1:4 до 3:10	Pluronic 68	193-222	[170]
Масло ши,	Миндальное масло,				
Пчелиный воск	Масло копабии				

Продолжение таблицы 1.2.

Цетилпальмитат,	Масло пентаклетры	От 1:4 до 1:1	Tween 80, Span 20,	131-448	[171]
Карнаубский воск			додецилсульфат	139-1747	
Масло ши			натрия, Plantacare	163-430	
			2000		
Precirol ATO 5	Кунжутное масло	-	Tween 80	103-159	[172]
Precirol ATO5	Аргановое масло	7:3	Tween 80	138	[173]
Apifil CG,	Capryol TM 90,	От 2:1 до 4:1	Tween 80,	27-73	[174]
Plurol stearique WL	Жидкий парафин		Labrafil M 2130 CS		
1009					
Гидрогенизованное	Оливковое масло	От 7:3 до 9:1	Polysorbate 80	64-102	[175]
пальмовое масло					

Наиболее существенное влияние на дисперсность НЛЧ оказывают твердые липиды, поскольку они в большей мере обеспечивают формирование кристаллической структуры липидных наночастиц. Путем молекулярно-динамического моделирования было показано, что полярные группы молекул липидов (например, олеиновой и стеариновой кислот) располагаются преимущественно на поверхности частиц, что может вносить дополнительных вклад в стабилизацию и повышение дисперсности наночастиц, в то время как взаимное распределение неполярных липидов в них происходит равномерно и хаотично [115].

Комбинирование различных твердых липидов, например, стеариновой кислоты с пчелиным воском в составе дисперсной фазы с олеиновой кислотой позволяет получать более высокодисперсные НЛЧ. В [146] было отмечено, что с увеличением доли пчелиного воска и уменьшением доли стеариновой кислоты в составе дисперсной фазы размеры липидных наночастиц, стабилизированных полиэтиленгликолями с разной молекулярной массой (PEG400, PEG1500, PEG4000) и Tween 80, уменьшались с 251,6±5,6 до 137,1±4,2 нм, а распределение по размерам становилось более узким. Это может быть связано с гидролизом эфиров, входящих в состав пчелиного воска, до короткоцепочечных карбоновых кислот, присутствием карбоксилатных ионов, локализующихся на поверхности наночастиц, а также образованием водородных связей между гидроксильной группой гидроксикислот и диолами, входящими в состав пчелиного воска. Они могут оказывать дополнительное стабилизирующее действие на липидные наночастицы и способствовать образованию более мелких частиц. Данное предположение подтверждается увеличением абсолютного значения ζ-потенциала с увеличением концентрации пчелиного воска. Он составлял от -16,6±1,45 до -19,9±0,62 мВ [146].

В качестве жидких компонентов дисперсной фазы в комбинации со стеариновой кислотой широко применяют сложные эфиры жирных кислот – изопропилмиристат, изопропилпальмитат, глицериды жирных кислот и др., а также их смеси. Так, НЛЧ со стеариновой кислотой и изопропилпальмитатом

45

имели меньший диаметр частиц (184±16 нм), чем аналогичные наночастицы со стеариновой кислотой и смесью изопропилпальмитата с олеиновой кислотой или изопропилмиристатом (236±59 и 356±29 нм, соответственно) [149]. Стоит отметить, что при использовании глицеридов различного строения возможно получение наноэмульсий с размером капель не более 20 нм [134, 135].

Возможно получение НЛЧ со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и смесью среднецепочечных триглицеридов, при этом размеры могут варьироваться от сотен нанометров [154] до нескольких микрометров [176]. В [154] было показано, что размер нанометровых частиц слабо зависит от соотношения стеариновой кислоты и Phosal MCT 53, а их средний размер увеличивается в процессе хранения.

Широко распространено получение липидных наночастиц с природными маслами, поскольку в их состав входят компоненты с высокой биологической активностью. Известно получение наноэмульсий, размер капель дисперсной фазы которых не превышает 30 нм, из оливкового [139], кунжутного масла [140], эфирного масла корицы, тмина и розмарина [141]. В [139] показано, что оливковое масло позволяет получать более высокодисперсные наноэмульсии по сравнению с соевым, подсолнечным маслами и маслом камелии. Это может быть связано с тем, что оно обладает более низкой растворимостью в водной фазе, что препятствует оствальдову созреванию и способствует образованию более мелких наночастиц. Однако стоит отметить, что одной из основных проблем применения природных масел для получение липидных наночастиц является непостоянство химического состава, что приводит к сложностям получения систем с контролируемыми физико-химическими свойствами.

При комбинировании природных масел со стеариновой кислотой в большинстве опубликованных работ получают НЛЧ диаметром свыше 100 нм. Известно получение НЛЧ со стеариновой кислотой и кунжутным маслом [151], скваленом [155], маслом эхиума [156] и моринги [157] и др. Эфирные масла также комбинируют с другими жидкими компонентами дисперсной фазы при получении НЛЧ со стеариновой кислотой [145].

В [156] было показано, что с увеличением длины углеводородной цепи с  $C_{12}$  (лауриновая) до  $C_{18}$  (стеариновая) в составе НЛЧ с маслом эхиума наблюдалось укрупнение размеров частиц с 160-190 до 280-300 нм в зависимости от условий получения. При этом увеличение длины углеводородной цепи жирной кислоты способствовало образованию более разупорядоченной кристаллической решетки. Стоит отметить, что в отличие от метода ТИФ, когда быстрое охлаждение способствует образованию более мелких наночастиц [99], при получении методом спонтанного эмульгирования при медленном охлаждении и затвердевании липидов при комнатной температуре размер образующихся липидных наночастиц оказывается незначительно меньше, чем при быстром охлаждении на ледяной бане. Это может быть связано с наличием слабых эмульгирующих свойств у жирных кислот, вследствие чего при медленном охлаждении они способны в большей степени адсорбироваться на границе раздела фаз, способствовать снижению межфазного натяжения и, как следствие, образованию более мелких НЛЧ [156].

Лишь в незначительном количестве исследований получают НЛЧ на основе жирных кислот размером менее 50 нм. Так, в [158] были получены липидные наночастицы с миристиновой кислотой и Capmul MCM, стабилизированные смесью Poloxamer 188 и Tween 80, диаметром 24-48 нм. На термограммах наблюдалось снижение температуры плавления липидных наночастиц по сравнению с объемным липидом с 60,6 до 54,2 °C. Исследователи связывают это с формированием кристаллической решетки с бо́льшим количеством дефектов, образующихся в результате комбинирования компонентов, а также с размерным эффектом, связанным со снижением температуры плавления наноразмерных частиц [158].

Комбинирование жирных кислот с их жидкими при комнатной температуре производными позволяет получать более мелкие наночастицы, чем НЛЧ с олеиновой кислотой. Так, замена олеиновой кислоты в НЛЧ с миристиновой кислотой на изопропилмиристат или изопропилпальмитат способствовала уменьшению размеров наночастиц с  $289,2\pm20,8$  до  $232,1\pm18,0$  и  $248,2\pm22,7$  нм, соответственно, а  $\zeta$ -потенциал полученных наночастиц составлял -55 мВ и практически не зависел от длины углеводородной цепи кислотного остатка в составе эфира. Температура плавления НЛЧ с миристиновой кислотой и изопропилмиристатом составляла 41,55 °C, а применение в качестве жидкого липида изопропилпальмитата позволяло получать липидные наночастицы, плавящиеся при 34,25 °C. Степень кристалличности составляла не более 8%, однако была выше, чем у аналогичных наночастиц с олеиновой кислотой [159].

Широкое распространение в качестве твердых компонентов дисперсной фазы ТЛН и НЛЧ получили глицериды жирных кислот. В [152] было показано, что их применение позволяет получать НЛЧ с маслом антарктического криля, стабилизированные лецитином, меньшего размера, чем использование соответствующих жирных кислот в качестве твердых компонентов дисперсной фазы. Так, НЛЧ с трилауратом глицерина имели размер  $236\pm2$  нм, в то время как аналогичные частицы с лауриновой кислотой –  $653\pm37$  нм. Аналогичные тенденции были отмечены и с глицеридами стеариновой и миристиновой кислот. При этом показано, что с увеличением длины углеродной цепи триглицеридов насыщенных жирных кислот от C<sub>12</sub> до C<sub>18</sub> размер частиц увеличивался: с  $236\pm2$  нм до  $341\pm2$  нм, что сопровождалось увеличением степени кристалличности — от 39,1 % до 50,0 % и снижением эффективности инкапсуляции эйкозапентаеновой кислоты – с  $88,72\pm0,47$  % до  $72,86\pm1,06$  % [152].

Концентрация жидкого липида, длина и количество ненасыщенных связей компонентов дисперсной фазы оказывает влияние также на агрегативную устойчивость систем. В дисперсиях НЛЧ с тристеаратом глицерина и такими жидкими липидами, как трикаприлат глицерина, пентадекан, оливковое масло было показано, что с увеличением концентрации жидкого липида наблюдалось увеличение агрегативной устойчивости дисперсий, объемная доля агрегатов снижалась. При этом в дисперсиях преобладали наночастицы размером не более 300 нм. Было выдвинуто предположение о том, что комбинирование

48

компонентов дисперсной фазы с разной длиной и степенью насыщенности углеводородных цепей способствует формированию более мелких частиц, устойчивых к агрегации, и разупорядочиванию кристаллической решетки, что подтверждалось смещением в низкотемпературную область и уширением пиков плавления на термограммах [164].

Среди твёрдых при комнатной температуре компонентов НЛЧ природного происхождения наиболее широкое распространение получили воски. Пчелиный воск преимущественно состоит из сложных эфиров длинноцепочечных алифатических спиртов и пальмитиновой, пальмитолеиновой, гидроксипальмитиновой и олеиновой кислот, а также углеводородов с различной длиной цепи. Его получают путем переплавки пчелиных сот. В зависимости от состава его плавление начинается при температуре 45-65 °C, а пик плавления наблюдается при 70-80 °C [177, 178].

Канделильский воск получают из кустарника Канделилла, который вырабатывает его для защиты от потери влаги в условиях пустыни, где он преимущественно произрастает. В его составе преобладают углеводороды с длиной цепи  $C_{21}$ - $C_{33}$ , также в различных концентрациях могут присутствовать сложные эфиры, жирные кислоты и длинноцепочечные спирты, причем преимущественно разветвленного строения. Плавление канделильского воска наблюдается в диапазоне температур от 54 до 92 °C, а на термограммах присутствует несколько пиков при 59-76 °C, которые соответствуют изменению кристаллической структуры и последующему плавлению воска [178, 179].

Карнаубский воск имеет наиболее высокую температуру плавления среди натуральных коммерческих восков и плавится в широком температурном диапазоне от 70 до 180 °C с пиком плавления при ~90 °C. Его получают из листьев пальмы *Copernicia cerifera*. Он преимущественно состоит из эфиров карбоновых кислот с длинной углеводородной цепи от  $C_{24}$  до  $C_{28}$  и первичных неразветвленных спиртов с длиной углеводородной цепи от  $C_{32}$  до  $C_{34}$  [180]. Альтернатива воскам природного происхождения – парафиновый воск или парафин, являющийся продуктом нефтепереработки. При высокой степени очистки, он также может применяться в косметической, фармацевтической, пищевой промышленности и др. Благодаря синтетическому происхождению, он имеет более постоянный химический состав – углеводороды с разной длиной цепи  $C_{20}$ - $C_{45}$  с преобладанием  $C_{27}$ - $C_{30}$ , вследствие чего имеет узкий температурный диапазон плавления в интервале температур от 40 до 90 °C с пиками при ~49-50 и ~63-66 °C [178, 181].

ТЛН на основе восков зачастую имеют размер более 100 нм [133]. В [132] отмечают, что дисперсность систем в значительной мере зависит от химического состава восков. Так, воск из рисовых отрубей содержит более 90% длинноцепочечных эфиров ( $C_{46}$ - $C_{62}$ ), из-за чего имеет сравнительно высокую температуру плавления 82 °C, при этом из-за более высокой вязкости систем ухудшается эффективность гомогенизации. Размер ТЛН из воска из рисовых отрубей составлял более 173 нм. В то время как ТЛН из карнаубского и пчелиного воска, полученные так же методом горячей гомогенизации, имели диаметр от 114 и 117 нм, соответственно, благодаря меньшему содержанию длинноцепочечных эфиров ( $C_{46}$ - $C_{62}$ ) – менее 65% [132].

Для получения НЛЧ, дисперсная фаза которых состоит из природных компонентов (восков), их часто комбинируют с природными маслами. В [51] были получены липидные наночастицы с твердыми пчелиным и прополисовым восками и жидким маслом гранатовых косточек, стабилизированные смесью Tween 80 и лецитина. С увеличением концентрации масла гранатовых косточек с 10 до 50% от массы липидов наблюдалось уменьшение размеров НЛЧ с пчелиным воском с 366 до ~280 нм. Размер аналогичных систем с прополисовым воском, напротив, незначительно увеличивался с ~180 до ~210 нм [51].

Комбинирование пчелиного воска с Compritol 888 АТО (1:1) в качестве твердых компонентов дисперсной фазы способствовало уменьшению размеров липидных наночастиц до ~250 нм вне зависимости от концентрации масла

гранатовых косточек в их составе. Это объясняется присутствием моно- и диглицеридов жирных кислот в составе Compritol 888 АТО, которые могут проявлять поверхностную активность, снижать межфазное натяжение и способствовать образованию более мелких частиц. В дисперсиях с прополисовым воском комбинирование его с Compritol 888 АТО, напротив, приводило к укрупнению частиц до 270-290 нм, что может быть связано с увеличением температуры плавления дисперсной фазы. Липидные наночастицы имели ζ-потенциал от -18,3 до -27,2 мВ при использовании фосфатного буферного раствора в качестве дисперсионной среды [51].

Как было показано ранее, увеличение концентрации жидкого компонента в составе дисперсной фазы позволяет получать наночастицы меньшего размера. Так, при комбинировании карнаубского воска с изопропилпальмитатом и стабилизации дисперсий смесью Tween 80 и моностеарата глицерина возможно получение НЛЧ размером от 142,5±3,1 до 164,9±2,1 нм при массовом соотношении твердого и жидкого липидов от 1:9 до 1:4, соответственно. При этом замена изопропилпальмитата на Miglyol TM 812 приводила к укрупнению липидных наночастиц до 279-504 нм при тех же массовых соотношениях. Авторы связывают это с тем, что при комнатной температуре Miglyol TM 812 имеет более высокую вязкость, чем изопропилпальмитат, что затрудняет диспергирование. Электрокинетический потенциал таких частиц был отрицательным и не превышал 30 мВ по абсолютной величине [166]. Стоит отметить, что известно получение дисперсий наночастиц карнаубского воска размером 70-300 нм, которые сохраняли агрегативную устойчивость более 3 мес. без использования ПАВ. Такой эффект исследователи связывали с присутствием в составе карнаубского воска веществ с функциональными группами -ОН, -СООН, -СНО, которые при расплавлении обращаются в сторону полярной водной фазы и оказывают стабилизирующее действие [182].

Получение наночастиц размером менее 100 нм из природных компонентов затруднительно, однако есть исследования, в которых получали НЛЧ на основе производных пчелиного воска – Apifil CG – и дистеарата глицерина – Plurol Stearique WL 1009 в качестве твердых липидов. При комбинировании их с углеводородным маслом размер частиц составлял 54-69 нм, а ζ-потенциал изменялся в диапазоне от -30,8±4,0 до -48,11±8,32 мВ в дистиллированной воде [174].

В качестве твердых компонентов НЛЧ также применяют различные природные масла – какао [168-170, 183], ши [170, 171] продукты переработки и модификации природных масел – Softisan 100 на основе кокосового масла [184], Lipocire DM – продукт гидрогенизации пальмового масла [185]. Помимо ранее упомянутых жидких липидов для получения НЛЧ в комбинации с твердыми компонентами используют аргановое [173], оливковое [168, 175], кунжутное [169, 170, 172], масло сладкого миндаля [170], касторовое [153, 186] и другие природные масла.

При этом возможна дополнительная модификация компонентов дисперсной фазы с целью придания необходимых свойств. Так, например, для улучшения высвобождения лекарственного соединения в очагах воспаления с повышенной кислотностью были предложены pH-чувствительные липидные наночастицы на основе аминированных производных стеариновой и олеиновой кислот. При pH < 6 происходило протонирование компонентов дисперсной фазы липидных наночастиц, что приводило к набуханию НЛЧ и более интенсивному высвобождению инкорпорированного соединения в очаге поражения [187].

Таким образом, выбор компонентов дисперсной фазы обусловлен физико-химическими свойствами липидов такими как температура плавления, химическое строение и др., биологической совместимостью и способностью повышать биодоступность инкорпорируемых активных соединений, а также собственной биологической активностью компонентов, которая присуща часто природным маслам [188]. Зачастую выбор компонентов дисперсной фазы осуществляют исходя из растворимости инкорпорируемого компонента [189, 190]. Несмотря на большое количество публикаций, посвященных исследованию липидных наночастиц с различным составом дисперсной фазы, в большинстве исследований получают частицы, размер которых превышает 100 нм, хотя известно, что частицы меньшего размера обеспечивают лучшую биодоступность лекарственных соединений [8]. Также практически отсутствуют публикации, в которых рассматривается структура получаемых липидных наночастиц и зависимость их дисперсности и физико-химических свойств от химического строения компонентов дисперсной фазы.

Стеариновая кислота является широко используемым и доступным липидом, обеспечивающим высокую биодоступность инкорпорируемых лекарственных соединений, поэтому в дальнейшей работе в качестве твердых компонентов дисперсной фазы была выбрана она и парафин, менее исследованный в качестве компонента липидных наночастиц. Для сравнения влияния взаимодействия липидов разного химического строения на физико-химические свойства липидных наночастиц в качестве жидкого липида для дальнейших исследований было выбрано углеводородное масло, состоящее из насыщенных углеводородов с более короткой углеводородной цепью, чем парафин, которое ряд исследователей предлагают в качестве основы для носителей лекарственных соединений, однако липидные наночастицы с ним изучены недостаточно.

### 1.3.2. Поверхностно-активные вещества, применяемые для стабилизации дисперсий липидных наночастиц

Для получения липидных наночастиц используют различные ПАВ, которые играют ключевую роль в процессе формирования наночастиц. ПАВ во многом определяют размер, стабильность и другие физико-химические свойства наночастиц, а также могут оказывать влияние на кристаллическую структуру компонентов дисперсной фазы и взаимодействие носителей с клетками организма. Наиболее часто применяемыми ПАВ являются Tween 20 [153, 191], Tween 60[117, 191, 192], Tween 80[191, 193], Poloxamer 188[194],Poloxamer 407[193, 195], Poloxamer 182[196, 197], додецилсульфатнатрия[198, 199], лецитины[200, 201] и пр. [15].

Одним из критериев выбора ПАВ является значение их ГЛБ. Для стабилизации прямых эмульсий обычно требуются ПАВ со значениями ГЛБ от 8 до 18. Такие ПАВ лучше растворяются в водной фазе и могут эффективно стабилизировать прямые эмульсии. Обратные эмульсии стабилизируют ПАВ с более низким значением ГЛБ – от 3 до 6, которые имеют большее сродство к масляной фазе [190].

Необходим выбор оптимального ПАВ или их смеси для каждой системы в соответствии с ГЛБ компонентов дисперсной фазы для обеспечения их эффективного взаимодействия и образования стабильной эмульсии. Так, ПАВ со значением ГЛБ в диапазоне от 13 до 17 – Tween 60, Tween 80, Tween 20 и др. – наиболее эффективно стабилизируют дисперсии липидных наночастиц с глицеридами жирных кислот, стеариновой и олеиновой кислотами. ПАВ со значениями ГЛБ менее 11, например, лецитин и Span 20, проявляют большую эффективность при стабилизации в сочетании с твёрдыми жирами, такими как какао-масло. Оптимальный ГЛБ ПАВ для конкретной системы можно рассчитать на основе ГЛБ компонентов дисперсной фазы, считая, что он является аддитивной величиной [190, 202].

Существенную роль при выборе ПАВ играет их полярность. Так, анионные стабилизаторы, такие как додецилсульфат натрия, могут придавать или увеличивать по абсолютному значению отрицательный заряд липидных наночастиц, обеспечивая их электростатическую стабилизацию [190]. Стоит отметить, что слабоотрицательный заряд наночастиц способствует увеличению продолжительности циркуляции их в кровотоке и, как следствие, более пролонгированному действию инкорпорированных лекарственных соединений [8]. Катионные ПАВ, например, цетилтриметиламмония бромид придают липидным наночастицам положительный заряд поверхности и способствуют проникновению стабилизированных ими липидных наночастиц через отрицательно заряженные клеточные мембраны. Это особенно проявляется в случае опухолевых эндотелиальных клеток и местах хронического воспаления по причине аномально развитой кровеносной системы по сравнению с нормальной сосудистой сетью. Однако при этом снижается длительность циркуляции липидных наночастиц в кровотоке [190].

Наибольшее распространение для стабилизации липидных наночастиц получили неионогенные ПАВ, поскольку они являются наименее токсичными, биосовместимыми и биоразлагаемыми. К тому же нейтральный или слабоотрицательный заряд наночастиц способствует снижению степени адсорбции белков на их поверхности и, как следствие, увеличивает время циркуляции носителей в кровотоке [203]. При трансдермальной доставке использование нейтрально заряженных частиц в качестве носителей позволяет обеспечивать пролонгированное действие инкорпорированных активных соединений за счет более длительного проникновения липидных наночастиц через слои кожи. В [204] показано, что применяемые для стабилизации анионные ПАВ додецилсульфат натрия, лаурилэфирсульфат натрия – способствовали наиболее быстрому трансдермальному проникновению наноэмульсии по сравнению с амфотерными – Lipoid S45, Lipoid S75, Lipoid S100 – и неионогенными – Plantacare 810 UP, Tween 80. При этом стоит отметить, что по результатам, опубликованным в данной работе, наноэмульсии, стабилизированные неионогенными и анионными ПАВ, проявляли близкую цитотоксичность на кератиноцитах и фибробластах. При этом неионогенные ПАВ зачастую менее чувствительны к изменению внешних условий (в определенном диапазоне рН и др.) и обеспечивают лучшую устойчивость липидных наночастиц [190].

Во многих исследованиях отмечают, что тип ПАВ оказывает существенное влияние на агрегативную устойчивость липидных наночастиц. Исследованы системы, стабилизированные смесями ПАВ различного типа. Так, в [205] были получены НЛЧ с Compritol ATO 888 и Miglyol 812, стабилизированные Tween 80 (неионогенным ПАВ), додецилсульфатом натрия (анионным ПАВ) или хлоридом цетилпиридиния (катионным ПАВ). Размер частиц практически не отличался и составлял 165-180 нм. Стабилизация наночастиц смесью ионогенного и неионогенного ПАВ (Tween 80 + додецилсульфат натрия или Tween 80 + хлорид цетилпиридиния), а также смесью трех типов ПАВ способствовала уменьшению диаметра НЛЧ до 120-160 нм (рисунок 1.5). При этом при стабилизации смесью Tween 80, додецилсульфата натрия и хлорида цетилпиридиния получали НЛЧ наименьшего размера, что авторы связывают с электростатическим взаимодействием ионных ПАВ. Аналогичные тенденции были получены в системах НЛЧ со стеариновой кислотой и кунжутным маслом, стабилизированных Tween 80 и/или додецилсульфатом натрия, – размер частиц уменьшался с 108-130 до 74-97 нм [151]. Было выявлено повышение агрегативной устойчивости дисперсий при их стабилизации комбинацией ионогенного и неионогенного ПАВ, особенно при преобладании последнего. Комбинирование трех типов ПАВ, напротив, приводило к усилению агрегации, что также может быть связано с образованием катион-аниноных пар молекул ПАВ [205]. Эти выводы подтверждаются зависимостями, полученными при исследовании дисперсности и агрегативной устойчивости НЛЧ с коксовым маслом и маслом эхиума [169].

Выбор ПАВ также может быть обусловлен технологическими параметрами процесса получения дисперсий липидных наночастиц. Например, такие неионогенные ПАВ, как Kolliphor RH 40, Kolliphor P188 и Kolliphor P407 способствуют интенсивному пенообразованию, что затрудняет получение липидных наночастиц методами, предполагающими интенсивное перемешивание, и может приводить в поломке гомогенизаторов и насосов. В то время как Kolliphor EL, Tween 20 и Tween 80 позволяют получать липидные наночастицы размером менее 200 нм в тех же условиях [161].



Рисунок 1.5 – Средний размер липидных наночастиц, стабилизированных различными ПАВ, при хранении при 25 °С:

NLC-С – НЛЧ с хлоридом цетилпиридиния, NLC-S – НЛЧ с додецилсульфатом натрия, NLC-T – НЛЧ с Tween 80, NLC-CT – НЛЧ со смесью хлорида цетилпиридиния и Tween 80, NLC-ST – НЛЧ со смесью додецилсульфата натрия и Tween 80, NLC-CST – НЛЧ с хлоридом цетилпиридиния, додецилсульфата натрия и Tween 80 [205]

Очевидно, что с увеличением концентрации ПАВ происходит уменышение размеров липидных наночастиц, стабилизированных ими, что и показано в большинстве работ. Авторы [51] продемонстрировали, что увеличение концентрации смеси Tween 80 и лецитина в качестве ПАВ с 2 до 6 мас.% способствовало уменьшению размеров липидных наночастиц с маслом гранатовых косточек, пчелиным или прополисовым воском, а также их смеси с глицерил бегенатом. Так, наиболее существенное увеличение дисперсности при увеличении концентрации ПАВ с 2 до 6% наблюдалось у НЛЧ с пчелиным воском в качестве твёрдого липида – размер частиц уменьшался с 366 до ~95 нм. Стоит отметить, что при стабилизации 6% ПАВ частицы были менее 100 нм. Как отмечают авторы, низкие концентрации ПАВ обеспечивают недостаточное отталкивание между частицами и, следовательно, агрегацию и низкую устойчивость в процессе хранения.

Для каждого конкретного состава системы необходимо исследование влияния количества ПАВ на физико-химические свойства, поскольку чрезмерное увеличение концентрации ПАВ, напротив, может приводить к укрупнению наночастиц и снижению агрегативной устойчивости. Так, в [206] размер НЛЧ с Precirol ATO 5 и октилоктаноатом, стабилизированных Poloxamer 407, при увеличении концентрации ПАВ с 2 до 6% уменьшался от 100 до 74 нм, соответственно. Это сопровождалось повышением агрегативной устойчивости – дисперсии, стабилизированные 6% ПАВ, оставались стабильными более 2 мес., в то время как в остальных – наблюдалась агрегация. При дальнейшем увеличении доли стабилизатора до 8% происходило укрупнение НЛЧ до 779 нм, которые также были агрегативно неустойчивыми в процессе хранения. Образование крупных частиц при небольших концентрациях ПАВ обусловлено тем, что при адсорбции молекулы стабилизатора закрывают не всю площадь поверхности образующихся капель и наночастиц, что приводит к низкой устойчивости в процессе хранения. С другой стороны, увеличение концентрации ПАВ может приводить к значительному увеличению размеров частиц, по предположению авторов, из-за мицеллообразования ПАВ [206]. Стоит отметить, что увеличение концентрации ПАВ может также повышать токсичность НЛЧ и ограничивать их возможное применение в медицине и косметологии [175].

ПАВ могут оказывать влияние на процессы перекристаллизации твердых компонентов в липидных наночастицах. В [205] на примере липидных наночастиц с Compritol ATO 888 и Miglyol 812 показано, что ионогенные ПАВ, особенно анионные, способствуют снижению степени кристалличности липидов в составе наночастиц, а также образованию и повышению устойчивости к перекристаллизации наименее устойчивой  $\alpha$ - и метастабильной  $\beta$ '-форм, которые являются более предпочтительными для инкорпорирования лекарственных и биологически активных соединений. Стоит отметить, что комбинирование ионогенного и неионогенного ПАВ способствовало большему разупорядочиванию кристаллической решетки. Наиболее интенсивное увеличение степени кристалличности в процессе хранения происходило в липидных наночастицах, стабилизированных катионным ПАВ, а наименее – анионным [205].

В [207] были получены стабилизированные Poloxamer 188 наночастицы с маслом канолы, обогащенным стеариновой кислотой, и экспериментально показано, что увеличение концентрации неионогенного ПАВ в составе липидных наночастиц приводит к преимущественному образованию  $\beta$ -формы. С увеличением концентрации ПАВ наблюдалось постепенное исчезновение пиков, характерных для  $\alpha$ -формы на кривых ДСК и дифрактограммах. Стоит отметить, что вне зависимости от концентрации ПАВ в процессе хранения наблюдалась постепенная перекристаллизация  $\alpha \rightarrow \beta$ , причем она протекала медленнее при 4 °C –  $\alpha$ -модификация присутствовала спустя 2 мес. в системах с концентрацией ПАВ до 2,5%. В то время как при 20 °C полиморфные превращения в наиболее стабильную модификацию завершались уже спустя 1 мес. в большинстве систем [207].

В ряде публикаций высказано предположение, что полиморфный переход начинается на границе раздела фаз, а не в ядре липидной наночастицы [128, 205], что подтверждается различным влиянием на процесс перекристаллизации разных типов ПАВ. Поскольку молекулы компонентов дисперсной фазы вблизи границы раздела имеют более высокую энергию и подвижность, чем те, которые полностью интеркалированы в кристаллическую решетку, они могут легче подвергаться конформационным изменениям, необходимым для полиморфного превращения. При этом молекулы ПАВ, адсорбированные на границе раздела, оказывают влияние на этот процесс, однако причины такого воздействия не установлены. Косвенное влияние ПАВ на перекристаллизацию обусловлено также тем, что увеличение концентрации стабилизатора способствует уменьшению размеров наночастиц. Молекулы липидов на поверхности наночастиц меньшего размера могут быть более подвержены полиморфным превращениями и переходу в более устойчивые кристаллические формы вследствие бо́льших площадей поверхности раздела фаз с высокой подвижностью молекул на них [207].

В [208] было отмечено, что процесс кристаллизации твердых липидов зависит от температуры плавления ПАВ. Отмечено, что в присутствии жидкого при комнатной температуре Tween 80 происходила кристаллизации трипальмитата глицерина в  $\beta$ - и  $\beta$ '-модификациях, в то время как при стабилизации ПАВ с более высокой температурой плавления – Tween 60 происходило образование  $\alpha$ -формы. По предположению авторов, ПАВ с высокой температурой плавления стимулируют поверхностное гетерогенное зародышеобразование, и из-за различия кристаллических решеток происходит кристаллизация липида в  $\alpha$ -модификации, что подтверждается другими исследователями [209-211]. При этом ПАВ с высокой температурой плавления обеспечивают бо́льшую устойчивость к процессу перекристаллизации и переходу в  $\beta$ -форму, что способствует лучшему удержанию инкорпорированных биологически активных соединений [208]. Аналогичные результаты были получены в присутствии лецитина и других ПАВ [201].

Для реализации метода температурной инверсии фаз комбинируют ПАВ с различным значением ГЛБ и растворимостью в водной и масляной фазах. Так, в качестве ПАВ с низким ГЛБ чаще всего применяют Span 40 [212, 213], Span 60 [114, 214, 215], Span 80 [216-219] и др. Среди стабилизаторов с высоким ГЛБ наиболее часто отдают предпочтение Cremophor RH 40 [184, 216, 217], Tween 40 [213, 220], Tween 60 [215, 221], Tween 80 [218, 219] и др.

Получение дисперсий липидных наночастиц методом ТИФ требует исследования влияния типа и концентрации ПАВ для систем с разным составом дисперсной фазы на дисперсность и условия образования наноразмерных частиц. Так, в [218] было показано, что увеличение массового соотношения смеси ПАВ Tween 80 + Span 80 и углеводородного масла с 0,1 до 0,35 способствовало снижению температуры инверсии фаз с ~90 до ~60 °C, а увеличение этого соотношения с 0,2 до 0,5 – уменьшению диаметра капель наноэмульсии

60

с 95 до 45 нм. Аналогичные тенденции были экспериментально показаны и в дисперсиях ТЛН и НЛЧ со стеариновой и миристиновой кислотами [219]

При получении дисперсий ТЛН, НЛЧ и наноэмульсий методом ТИФ особое внимание уделяют влиянию неорганических солей, растворенных в дисперсионной среде, на условия образования прямых и обратных эмульсий. В наноэмульсиях с углеводородным маслом, стабилизированных смесью Tween 80 и Span 80, при увеличении концентрации NaCl с 0,01 до 2,0 М наблюдалось снижение температуры инверсии фаз с ~70 до ~40 °C. Аналогичное влияние оказывало присутствие 0,01-0,4 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Авторы связывают это с изменением ГЛБ ПАВ, входящих в состав системы, из-за присутствия неорганических солей [222].

В [218] на примере наноэмульсии с углеводородным маслом, стабилизированной смесью Tween 80 и Span 80, было показано, что использование в качестве дисперсионной среды 0,1 М растворов Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl и KCl способствовало формированию дисперсий с высокой агрегативной устойчивостью – диаметр капель составлял 100-150 нм и практически не укрупнялся в течение более 5 мес. В то время как в присутствии CaCl<sub>2</sub> и AlCl<sub>3</sub>, напротив, наблюдалось интенсивное укрупнение частиц в процессе хранения до 200-350 нм (рисунок 1.6а). Повышение концентрации Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub> и KCl в дисперсионной среде до 0,4 М приводило к тому, что наночастицы интенсивно агрегировали спустя 10, 30 и 70 сут, соответственно, размер капель дисперсной фазы превышал 300 нм. Высокую агрегативную устойчивость демонстрировали системы с NaCl и CaCl<sub>2</sub> (рисунок 1.66). Электрокинетический потенциал капель таких наноэмульсий был отрицательным и снижался по абсолютной величине с увеличением концентрации солей. Это происходило из-за сжатия диффузной части двойного электрического слоя вокруг капель дисперсной фазы наноэмульсии при повышении ионной силы раствора, являющегося дисперсионной средой [218].



Рисунок 1.6 – Зависимости радиуса капель углеводородного масла в наноэмульсиях с дисперсионной средой, состоящей из 0,1 М (а) и 0,4 М раствора (б) неорганических солей, от времени хранения [218]

Стоит отметить, что увеличение концентрации солей приводило к уменьшению температуры инверсии фаз, вплоть до ~42-45 °C при 0,4 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 2,0 M NaCl. Это приводило к интенсификации процесса коалесценции и снижению агрегативной устойчивости дисперсий [9]. Известно, что для подавления процессов укрупнения частиц температура хранения должна быть на 20-65 °C ниже температуры инверсии фаз [223, 224].

Применение твердых при комнатной температуре ПАВ, например, Tween 60 и Span 60 позволяет повысить агрегативную устойчивость наноэмульсий и ТЛН за счет создания твердой оболочки ПАВ вокруг них, которая существенно замедляет коалесценцию и оствальдово созревание [117].

Таким образом, ПАВ, применяемые для стабилизации наноэмульсий и дисперсий ТЛН и НЛЧ, оказывают существенное влияние на физико-химические характеристики дисперсий липидных наночастиц, особенно при получении их методом ТИФ. Метод ТИФ позволяет получать липидные наночастицы размером менее 100 нм, обеспечивающие высокую биодоступность инкорпорируемых лекарственных и биологически активных соединений. Однако с помощью метода ТИФ, как правило, получают наноэмульсии и ТЛН, но крайне мало исследований, посвященных НЛЧ, полученным с помощью этого метода. Наибольший интерес в качестве ПАВ представляют сорбитаны (Span) и полисорбаты (Tween) благодаря низкой токсичности, высокой эффективности стабилизации липидных наночастиц. В частности, Tween 60 и Span 60 формируют твердообразную оболочку вокруг наночастиц, что позволяет получать агрегативно устойчивые дисперсии липидных наночастиц, перспективные для доставки лекарственных и биологически активных соединений.

### 1.4. Стерилизация липидных наночастиц

Долгосрочное хранение и применение лекарственных и биологически активных препаратов предполагает обеспечение высокого уровня стерильности. Процесс стерилизации играет ключевую роль в обеспечении безопасности и эффективности таких продуктов. Государственная фармакопея Российской Федерации предусматривает четыре вида стерилизации: термическую, химическую, радиационную и стерилизацию фильтрованием [225].

Химическая стерилизация предполагает газовую обработку оксидом этилена или его смесью с бромистым метилом, а также растворами антисептиков, однако их применение рекомендовано только для стерилизации медицинских изделий из резины, полимерных материалов, стекла и металлов ввиду возможности химического взаимодействия и повышения токсичности препаратов [225].

Стерилизация фильтрованием заключается в пропускании дисперсных систем через мембранные фильтры с размером пор не более 0,45 мкм [225]. Однако его применение для дисперсий липидных наночастиц может быть ограничено высокой вязкостью систем, возможностью закупоривания фильтров и может приводить к агрегации липидных наночастиц при повышении давления в системе, необходимом для продавливания липидных дисперсий через мембрану [226].

В зависимости от состава материала термическая стерилизация осуществляется насыщенным водяным паром при температуре 120-122 °С под

давлением 120 кПа и при температуре 130-132 °C под давлением 200 кПа или горячим воздухом при температуре не менее 160 °C [225]. Ряд исследователей отмечают возможность автоклавирования дисперсий липидных наночастиц на основе стеариновой кислоты [227], трипальмитата глицерина [228], моностеарата глицерина и касторового масла [229] и др. без существенного снижения их дисперсности, однако это представляется маловероятным. Так, в большинстве публикаций отмечают существенное укрупнение липидных наночастиц и снижение эффективности инкапсуляции активного соединения [230-232]. Применение термической стерилизации дисперсий липидных наночастиц ограничено ввиду вероятности расплавления компонентов, разрушения оболочки ПАВ и высвобождения лекарственного или биологически активного соединения.

С моей точки зрения радиационная стерилизация является наиболее предпочтительным способом обеспечения стерильности дисперсий липидных частиц как носителей лекарственных и биологически активных соединений. Энергия ионизирующего излучения воздействует на жизненно важные части микроорганизмов и приводит к разрушению клеточных мембран в результате воздействия образующихся свободных радикалов [226]. Радиационная стерилизация относится к «холодным» способам и представляет особый интерес для обеспечения стерильности термочувствительных фармацевтических препаратов и носителей лекарственных и биологически активных соединений. Она применяется для стерилизации медицинских изделий, фармацевтических лекарственных форм и сырья, готовых лекарственных препаратов и вспомогательных веществ [233]. В соответствии с ГОСТ 11137-1-2011 стерилизующую дозу определяют на основе данных по количеству бионагрузки, а также устойчивости микроорганизмов к радиоактивному излучению или выбирают дозу 15 или 25 кГр в зависимости от того, какая доза нужна для обеспечения необходимого уровня стерильности [234].

В области носителей лекарственных и биологически активных соединений радиационная обработка получила широкое распространение для обеспечения стерильности липосомальных систем. В 1970-х гг. было предложено применять радиационную стерилизацию лиофилизованных липосом для увеличения срока хранения носителей противоопухолевых радиофармацевтических препаратов на основе <sup>99m</sup>Tc [235]. Стоит отметить, что при радиационной стерилизации липосом при высоких дозах зачастую отмечали нежелательные эффекты в липосомальных системах: непредсказуемое изменение их дисперсности и С-потенциала [236, 237], химические взаимодействия и превращения компонентов [238-242], изменение физико-химических свойств дисперсий – вязкости, термического поведения [243, 244] и др. Причиной этому может быть образование реакционноспособных радикалов, которые впоследствии взаимодействуют с компонентами липосом, приводят к их деструкции [241]. Стоит отметить, что наиболее существенное влияние на бислои липосом при этом оказывают продукты радиолиза воды, в особенности радикалы ОН•, наибольшая часть которых образуется вне везикул в дисперсионной среде. При этом они обладают достаточным временем жизни для взаимодействия с поверхностью липосом, причем небольшая часть радикалов может проникать и в фосфолипидный бислой липосом. Радикал ОН• и некоторые органические радикалы могут приводить к перекисному окислению фософлипидов и других компонентов, входящих в состав липосом [245]. Образование свободных радикалов может вызывать химическую деградацию, дестабилизацию и нежелательное взаимодействие компонентов между собой, что может приводить к агрегации наночастиц, перекристаллизации твердых компонентов, снижению эффективности инкапсуляции и преждевременному высвобождению инкорпорированных лекарственных и биологически активных соединений и другим нежелательным эффектам [229]. Однако по сравнению с другими способами радиационная стерилизация липидных наночастиц является наиболее предпочтительной.

Так, на примере липидных наночастиц с цетостеариловым спиртом, глицерилбегенатом и смесью среднецепочечных глицеридов было показано, что после радиационной стерилизации с дозой 5 кГр практически не наблюдалось изменения физико-химических характеристик дисперсных систем, в то время как автоклавирование при 121 °C в течение 15 мин приводило к укрупнению частиц с 218-492 до 500-4000 нм в зависимости от состава, уменьшению ζ-потенциала с ~40-56 до нескольких единиц милливольт и снижению эффективности инкапсуляции метазоламида с 25-31 до 10-20% [17].

Исследователи отмечают, что после радиационного воздействия с поглощенной дозой 25 кГр возможно ухудшение высвобождения инкорпорированного лекарственного соединения – степень высвобождения пеметрекседа из ТЛН на основе тристеарата и трипальмитата глицерина снижалась с 45 до 25%. Авторы предположили, что может быть связано с повышением жесткости липидной матрицы в результате воздействия излучения, однако механизм его не обосновали [246]. Аналогичное предположение было высказано в [247]. Также в процессе радиационной стерилизации могут протекать изменения молекулярной структуры компонентов липидных наночастиц, их перекристаллизация [248].

Таким образом, наиболее предпочтительным способом обеспечения стерильности дисперсий липидных наночастиц является радиационная стерилизация. Однако её применение может приводить к изменениям физико-химических свойств носителей. В литературе встречается мало публикаций, посвященных физико-химической устойчивости липидных наночастиц по отношению к радиационному воздействию и практически отсутствуют микробиологические исследования, посвященные антибактериальной активности ионизирующего излучения в присутствии дисперсий липидных наночастиц.

## 1.5. Влияние лиофилизации на физико-химические свойства липидных наночастиц

Лиофилизация — это процесс сушки систем, при котором удаление водной фазы происходит посредством замораживания дисперсионной среды и сублимации растворителя. Лиофилизацию также называют лиофильной или сублимационной сушкой. Она позволяет продлить срок хранения и повысить устойчивость липидных наночастиц, не прибегая к распылительной или термической сушке, которые могут привести к расплавлению липидной матрицы и разрушению носителей.

Лиофильная сушка дисперсий липидных наночастиц, особенно наноэмульсий, предотвращает оствальдово созревание, однако может приводить к интенсификации коалесценции, коагуляции, перекристаллизации и пр. [249]. При лиофилизации происходит сближение липидных наночастиц, которое может быть необратимым и приводить к агрегации. Лиофильная сушка включает в себя замораживание, первичную сушку, при которой происходит сублимация образовавшегося льда, и вторичную сушку, при которой происходит удаление абсорбированной в слой ПАВ воды. При медленном замораживании происходит постепенное концентрирование дисперсной фазы в незамороженной части дисперсионной среды, что может приводить к агрегации липидных наночастиц. Удаление абсорбированной в слой ПАВ воды на этапе вторичной сушки может приводить к разрыву межфазной пленки и снижению эффективности стабилизации липидных наночастиц при последующем редиспергировании [250]. Помимо этого, при лиофилизации может протекать коалесценция липидных наночастиц с жидким ядром. Это может происходить в том числе и при проникновении частично закристаллизовавшихся липидов одних наночастиц в жидкое ядро других при замораживании [251].

Наиболее распространенным подходом для предотвращения агрегации при лиофилизации является включение в состав липидных наночастиц крио-

протекторов. В качестве таких добавок чаще всего используют аэросил, различные сахариды - сахарозу, маннитол, мальтодекстрин [252], сорбитол, трегалозу [253] и др. Выделяют два механизма стабилизации наночастиц при лиофилизации за счет криопротекторов. Первый из заключается в формировании стекловидной оболочки вокруг липидных наночастиц [16]. Второй механизм подразумевает, что криопротекторы образуют водородные связи с компонентами наноэмульсий, ТЛН и НЛЧ, замещая абсорбированные молекулы воды по мере её сублимации, предотвращая их необратимую агрегацию [250, 254, 255].

Тип криопротектора и скорость замораживания оказывают наиболее существенное влияние на дисперсность липидных наночастиц при лиофилизации. Наибольшую эффективность в качестве криопротектора проявляет трегалоза [256-258]. Это связывают с наиболее высокой среди сахаридов, применяемых в качестве криопротекторов, температурой стеклования – 113 °C, в то время как, например, у глюкозы и сахарозы она составляет 37 и 72 °C, соответственно, что оказывает влияние на вязкость и подвижность оболочки из сахаридов вокруг наночастиц [259].

При этом исследователи отмечают, что быстрое замораживание дисперсий ТЛН при -70 °C позволяло получать агрегаты наночастиц меньшего размера без криопротектора и в присутствии декстрана, глицина и др., чем замороженных более медленно при -20 °C. В присутствии трегалозы размер наночастиц после лиофилизации и редиспергирования практически не изменялся по сравнению с размерами липидных наночастиц сразу после получения и не подвергавшихся лиофилизации [258].

Липиды и ПАВ, входящие в состав липидных наночастиц, оказывают существенное влияние на их агрегативную устойчивость в процессе лиофилизации. В [16] предположили, что на агрегацию при лиофильной сушке наибольшее влияние оказывает размер молекул ПАВ, от которого зависит вклад стерического фактора в стабилизацию наночастиц. Tween 80 с небольшой молекулярной массой создаёт у наночастиц барьер, недостаточный для их устойчивости к коагуляции при последующем редиспергировании, по сравнению с казеинатом натрия, гидроксипропилметил целлюлозой и низкометоксилированным пектином.

ТЛН со стеариновой кислотой зачастую обладают высокой агрегативной устойчивостью при лиофилизации. В [260] показали, что в отличие от ТЛН с цетилпальмитатом и Compritol 888 АТО, стабилизированных катионными ПАВ, ТЛН со стеариновой кислотой после редиспергирования сохраняли свой размер.

Тем не менее, многие исследователи отмечают, что лиофилизация способствует интенсификации перекристаллизации твердых компонентов дисперсной фазы, переходу в более упорядоченную и энергетически выгодную кристаллическую модификацию и повышению степени кристалличности, что может приводить к неконтролируемому высвобождению инкорпорированного лекарственного или биологически активного соединения и укрупнению наночастиц [127, 216, 260]. Комбинирование твердых и жидких липидов в составе дисперсной фазы позволяет снизить интенсивность перекристаллизации при лиофилизации липидных наночастиц. Это способствует также менее интенсивному укрупнению НЛЧ по сравнению с ТЛН, дисперсная фаза которых состоит только из твердых липидов [261, 262].

Таким образом, лиофилизация липидных наночастиц является перспективным способом увеличения длительности их хранения, однако требует определения оптимального состава дисперсной фазы и концентрации криопротекторов для снижения интенсивности перекристаллизации компонентов и обеспечения высокой агрегативной устойчивости дисперсий липидных наночастиц при лиофильной сушке и последующем редиспергировании. При этом ТЛН и НЛЧ со стеариновой кислотой демонстрируют наиболее высокую агрегативную устойчивость при лиофильной сушке, а комбинирование стеариновой кислоты с другими твердыми и жидкими липидами может способствовать сохранению дисперсности систем при лиофилизации без добавления криопротекторов. Однако необходимо исследование влияния лиофильной сушки на физико-химические характеристики таких систем.

#### 1.6. Применение липидных наночастиц

Благодаря биосовместимости, способности преодолевать биологические барьеры и обеспечивать контролируемое высвобождение активных веществ ТЛН, НЛЧ и наноэмульсии представляют интерес как носители лекарственных и биологически активных соединений. Возможность получения липидных наночастиц определенного размера с контролируемой температурой плавления путем варьирования их состава позволяет повышать эффективность доставки активных веществ за счет лучшего проникновения через слои эпителиальных клеток организма и увеличения времени циркуляции в кровотоке, обеспечивать контролируемое высвобождение инкорпорированных компонентов в пораженных органах и тканях [8].

Особый интерес липидные наночастицы представляют как перспективные носители противоопухолевых лекарственных соединений. Так, в [263] показана эффективность использования НЛЧ с Precirol ATO 5 и скваленом, стабилизированных лецитином, для инкапсулирования паклитаксела для лечения рака легких. НЛЧ демонстрировали более эффективную интернализацию в клетках по сравнению с неинкапсулированным лекарственным соединением, а дополнительная модификация наночастиц рибонуклеиновой кислотой повышала степень интернализации. Также НЛЧ с Precirol ATO 5 и скваленом, стабилизированные Tween 80 и соевым лецитином, были предложены для инкапсулирования доксорубицина [264].

Инкапсулирование доксорубицина в НЛЧ с Miglyol 812 и Compritol 888 в качестве компонентов дисперсной фазы позволило повысить количество апоптических клеток рака молочной железы, а дополнительное инкорпорирование хризина, обладающего противовоспалительными, антиоксидантными, антидиарейными и противораковыми свойствами, в качестве адьюванта дополнительно повышало эффективность системы [265]. Для лечения рака молочной железы были также предложены НЛЧ с гидрогенизированным пальмовым и оливковым маслом и инкапсулированным тимохиноном. Цитотоксичность (IC<sub>50</sub>) по отношению к клеткам рака молочной железы MDA-MB-231 была наиболее высокой – концентрация жизнеспособных клеток не превышала 7 мкМ спустя 24 ч. Исследования были проведены также на клетках рака шейки матки SiHa и HeLa, однако эффективность была ниже, и IC<sub>50</sub> составляла 19-23 мкМ. При этом на здоровые клетки в таком же диапазоне концентраций липидных наночастиц влияния выявлено не было [266].

Благодаря возможности прохождения через гематоэнцефалический барьер и обеспечению локализации липидных наночастиц в мозге применение НЛЧ, ТЛН и наноэмульсий возможно для лечения глиобластомы. Так, при инкапсулировании куркумина в НЛЧ с трипальмитатом глицерина и олеиновой кислотой эффективность ингибирования клеток рака мозга возрастала с 19,5% до 82,3%, при этом гибель раковых клеток в мозге мышей была обусловлена именно апоптозом, а не некрозом [267]. В другом исследовании [268] была показана эффективность инкорпорирования куркумина в НЛЧ с Precirol ATO5 и Capmul MCM, стабилизированных Tween 80 и соевым лецитином. В присутствии куркумина, инкорпорированного в липидные наночастицы, наблюдалось интенсивное ингибирование раковых клеток глиобластомы, что подтверждало цитотоксичность НЛЧ с куркумином по отношению к ним и перспективность применения против рака. Также для борьбы с раковыми заболеваниями мозга были исследованы липидные наночастицы с инкапсулированными этопозидом [269], кармустином [270], темозоломидом [271], вориностатом [272] и др. Было показано, что при инкорпорировании доксорубицина, цитрата силденафила и аргинил-глицил-аспарагиновой кислоты в НЛЧ с Precirol ATO5 и Miglyol 812 в качестве липидов и Poloxamer 407 как ПАВ наблюдалось более интенсивное поглощение и накопление наночастиц со смесью активных компонентов в клетках по сравнению с липидными наночастицами с инкорпорированными по отдельности активными соединениями. По мнению авторов это связано с комплексным воздействием на клеточные рецепторы, приводящим к эндоцитозу [273].

Особый интерес липидные наночастицы представляют для лечения рака кожи. Благодаря входящим в состав липидам, близким по составу к компонентам кожи, они могут обеспечивать проникновение в глубокие слои эпидермиса и пролонгированное высвобождение инкорпорированных активных соединений. В [274] были исследованы НЛЧ со стеариновой кислотой, Labrafil M 1944 и рибоциклибом и показано, что инкорпорирование активного соединения в липидные наночастицы способствует более быстрому проникновению через роговый слой, но пролонгированному высвобождению: проницаемость кожи мышей по отношению к НЛЧ была в 1,91 раза выше, чем по отношению к неинкорпорированному рибоциклибу, при этом ограниченная проницаемость матрицы липидных наночастиц по отношению к активному соединению обеспечивала его длительное высвобождение. Инкорпорирование 5-фторурацила и ресвератрола в НЛЧ с Emulcire 61 WL 2659 и Labrasol, стабилизированные Tween 80, демонстрировало более высокую скорость проникновения и в 2,5 раза более высокие концентрации активных веществ в дерме и эпидермисе спустя 8 ч после нанесения, а также более высокую цитотоксичность по отношению к клеткам эпидермоидной карциномы по сравнению с неинкапсулированными лекарственными соединениями [275]. В качестве перспективного препарата для лечения меланомы были предложены липидные наночастицы с миристил миристатом и Miglyol 812 в качестве компонентов дисперсной фазы с инкорпорированным доцетакселем и лидокаином. Несмотря на снижение общей цитотоксичности по отношению к раковым клеткам, было отмечено увеличение длительности высвобождения, что при проведении терапии может быть более эффективным и безопасным для пациента [276].

НЛЧ предлагают использовать для повышения биодоступности лекарственных соединений для лечения болезни Паркинсона. НЛЧ с отрицательным
зарядом поверхности с Compritol 888 АТО и Labrafac Lipophile WL1349 и инкапсулированным ропиниролом продемонстрировали на 77,3% более высокую биодоступнось лекарственного соединения по сравнению с раствором активного вещества, вводимого так же интраназально. При этом аналогичные НЛЧ с положительным зарядом поверхности, полученные с добавлением стеариламина, демонстрировали повышение биодоступности по сравнению с раствором ропинирола на 44%. При этом стоит отметить, что в присутствии положительно заряженных НЛЧ наблюдалось существенное повреждение слизистой оболочки носового эпителия у крыс, в то время как в присутствии отрицательно заряженных – лишь легкое или умеренное воспаление [277]. Для лечения болезни Паркинсона ропинирол предлагают также вводить перорально и трансдермально. При этом ТЛН и НЛЧ с Dynasan 114 и Capryol 90, стабилизированные Poloxamer 188, обеспечивают замедленное высвобождение и улучшенную проницаемость по сравнению с раствором ропинирола [278]. Для этого также предлагают НЛЧ с допамином [279], таншиноном IIA [280], селегилином [281], наночастицами CeO<sub>2</sub>, обладающими антиоксидантными свойствами [282], и др.

Стабилизированные Tween 80 НЛЧ с цетилпальмитатом, олеиновой кислотой и холестерином в качестве липидов предлагают использовать для инкапсулирования ресвератрола в качестве антиоксиданта для интраназального введения при лечении болезни Альцгеймера. При инкорпорирвании гуперзина А в НЛЧ с цетилпальмитатом и Miglyol 812, стабилизированные соевым лецитином и Solutol HS15, в исследованиях *in vitro* было выявлено интенсивное высвобождение инкапсулированного соединения на начальном этапе с последующим пролонгированным выделением до 96 ч [283]. В качестве другого антиоксидантного агента был исследован кверцетин. Инкорпорирование его в ТЛН с Compritol 888 способствовало улучшению визуальной памяти у крыс при его внутривенном введении, что свидетельствует об успешном прохождении гематоэнцефалического барьера при нахождении в кровотоке [284]. Отмечено повышение биодоступности и обеспечение пролонгированного высвобождения лекарственных соединений при лечении болезни Альцгеймера с помощью ривастигмина [285], берберина [286], астаксантина [287, 288], донепезила [288] и др. Липидные наночастицы считаются перспективными носителями, проникающими через гематоэнцефалический барьер при лечении рассеянного склероза, ишемического инсульта, церебральной малярии, менингита, биполярного расстройства, шизофрении, эпилепсии и различных нейродегенеративных заболеваниях при их внутривенном введении [108, 289-291].

Вследствие высокой чувствительности глаз, а также низкой биодоступности и потенциальной системной токсичности многих активных соединений, применяемых для лечения глазных болезней, НЛЧ представляют интерес и в офтальмологической терапии. Липидные наночастицы с моностеаратом глицерина и Miglyol 812N, стабилизированные Cremophor EL и лецитином, с инкорпорированным непафенаком не проявляли значительной цитотоксичности в эпителиальных клетках роговицы человека, при этом инкапсулирование активного соединения обеспечивало его лучшее проникновение. Данные составы перспективны для лечения воспалений после удаления катаракты [292]. В [293] лютеин был инкорпорирован в липидные наночастицы с моностеаратом глицерина, стабилизированные Poloxamer 188 и лецитином. ТЛН проникали через роговицу в 1,52 раза быстрее по сравнению с неинкасулированным лютеином. При лечении бактериального эндофтальмита особый интерес представляют лекарственные препараты, обеспечивающее длительное, постепенное высвобождение активных компонентов. Для этих целей были предложены НЛЧ с Precirol ATO 5, олеиновой кислотой и инкорпорированным ципрофлоксацином. Они обеспечивали устойчивое высвобождение активного соединения в течение 24 ч. При этом наблюдалось увеличение проницаемости в 2 раза [294]. Для лечения синдрома сухого глаза (сухого кератоконъюнктивита) было исследовано инкапсулирование дексаметазона в НЛЧ с Labrafac Lipophile WL1349 и холестерином, стабилизированные Tween 80, выявлена интернализация в эпителиальных клетках роговицы человека, а также продемонстрировано *ex vivo* подходящее распределение в роговице глаза свиньи [295].

Для лечения атопического дерматита предложены НЛЧ и наноэмульсии с Precirol ATO 5 и Capryol 90 и инкапсулированным такролимусом, стабилизированные Tween 80 и соевым лецитином. Исследователи отметили, что наноэмульсии и НЛЧ демонстрировали близкую эффективность для доставки такролимуса в роговой слой. Однако наблюдалось повышенное накопление в волосяных фолликулах и значительно более высокая скорость проникновения такролимуса, инкорпорированного в НЛЧ, через трансфоликулярный путь [296]. НЛЧ с Capmul MCM, Compritol 888 АТО в качестве липидов и инкорпорированным метотрексатом для лечения псориаза при местном нанесении на ухо мыши способствовали значительному уменьшению площади псориатического поражения и индекса тяжести, уменьшению воспаления [297].

При лечении ревматоидного артрита липидные наночастицы, наносимые на кожу, позволяют защитить лекарственное вещество от метаболизма первого прохождения и желудочно-кишечной реакции, которые неизбежны при внутривенном и пероральном введении. Это было показано на примере НЛЧ с Compritol 888 ATO, Capryol 90 в качестве липидов и инкорпорированным триптолидом, стабилизированных Tween 80 и Transcutol HP. Они способствовали уменьшению отека и подавлению воспаления [298]. Также отмечено повышение биодоступности противоревматоидных лекарственных соединений, например, целастрола и индометацина вследствие улучшения проникновения через трансфоликулярный путь [299]. Стоит отметить, что дополнительное воздействие слабым электрическим током (ионофорез) при трансдермальном введении улучшает скорость проникновения липидных наночастиц, однако это может приводить к перекристаллизации липидов и более быстрому высвобождению лекарственного соединения [300].

Липидные наночастицы часто предлагают использовать для противоожоговой терапии. НЛЧ с Precirol ATO 5, Labrafac lipophile WL 1349 и эфирным маслом корицы демонстрируют ускоренное заживление и антимикробные свойства [301]. Известно применение систем на основе наноэмульсий с куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub>, обладающими антибактериальными и ранозаживляющими свойствами для лечения глубоких ожоговых повреждений [302, 303].

В ряде случаев трансдермальное введение лекарственных веществ может быть предпочтительным не только для лечения дерматологических заболеваний. В [304] было исследовано введение симвастатина, который был инкорпорирован в НЛЧ с Compritol 888АТО и Softigen 767, стабилизированные Span 80 и Poloxamer 188, перорально и трансдермально. По сравнению с традиционной таблетированной формой активного соединения – препаратом Зокор – при инкапсулировании симвастатина в липидные наночастицы и пероральном введении наблюдалось повышение биодоступности на 9,64%, в то время как при трансдермальном пути доставки его содержание в плазме крови повышалось более существенно и биодоступность возрастала на 18,40% [304].

В последние годы набирают популярность продукты питания, обогащенные витаминами, микроэлементами и пр. Их функционализация возможна с помощью липидных наночастиц. Наибольший интерес представляет инкорпорирование каротиноидов [305, 306], флавоноидов, фитостеролов [307], эфирных масел [168, 308], витаминов [206, 309] для защиты их от воздействия окружающей среды. Применение липидных наночастиц перспективно также в косметической промышленности, например, для повышения биодоступности коэнзима Q10 [310-312]. На основе липидных наночастиц разрабатывают составы, обладающие солнцезащиными свойствами [160, 313]. С помощью НЛЧ предлагают повышать скорость, длительность и эффективность воздействия анальгетиков [314], противогрибковых [148], антибактериальных [187], противоалопеционных [108] активных соединений. Липидные наночастицы предлагают также использовать в качестве основы для материалов, способных поглощать, сохранять и выделять тепловую энергию в результате фазовых переходов [315]. Таким образом, благодаря биосовместимости, биоразлагаемости и нетоксичности компонентов липидные наночастицы представляют наибольший интерес в качестве систем для повышения эффективности и биодоступности активных соединений. Они могут применяться в медицине, фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, а также в других областях.

Большинство исследований посвящено получению липидных наночастиц, размер которых превышает 100 нм. Несмотря на существенный интерес к получению носителей, дисперсная фаза которых состоит из комбинации твердого и жидкого липидов, во многих исследованиях доля жидкого компонента не превышает 20-30%. При этом внимание уделяется применению и биологическому воздействию систем, но в недостаточной мере исследуется влияние компонентов дисперсной фазы, их соотношения, а также типа твердого и жидкого липидов на физико-химические характеристики дисперсий липидных наночастиц – агрегативную, седиментационную устойчивость, термическое поведение, структуру. Стоит отметить, что вопросу хранения липидных наночастиц в литературных источниках уделяется крайне мало внимания – практически отсутствуют исследования, посвященные устойчивости к радиационной стерилизации дисперсий, а также агрегативной устойчивости при лиофилизации.

Поэтому на основании вышесказанного является актуальным исследование физико-химических характеристик липидных наночастиц, полученных низкоэнергетическими методами из биосовместимых и доступных липидов различного химического строения – стеариновой кислоты, парафина и углеводородного масла, стабилизированных неионогенными ПАВ, обеспечивающими высокую устойчивость, такими как Span 60 и Tween 60.

77

# 2. МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ 2.1. Реактивы и материалы

Для получения и исследования наноэмульсий и дисперсий липидных наночастиц в данной работе использовали реактивы, приведенные в таблице 2.1.

N⁰	Наименование	Изготовитель	Примечание
1	Углеводородное масло (Britol 20 USP)	USP, Канада	«ХЧ» (puriss.)
2	Стеариновая кислота	Sigma-Aldrich,	95,0 мас.% основного
	Ĩ	США	вещества
		Парафин ОАО	
2	Парафин	«Славнефть-	П-2
3		Ярославнефте-	ГОСТ 23683-89
		оргсинтез»	
4	Сорбитан моностеарат	Sigma-Aldrich,	95,0 мас.% основного
	(Span 60)	CIIIA	вещества
5	Полиэтиленгликоль сорби-	Sigma-Aldrich,	95,0 мас.% основного
5	тан моностеарат (Tween 60)	США	вещества
6	Хлорид натрия (NaCl)	Химмед, Россия	«ХЧ»
		Fuji Chemical In-	5 мас.% основного ве-
7	Астаксантин	dustries Co., Ltd.,	щества в масляной
		Япония	форме
8	Лютеин	Shaanxi Jiahe	20 мас.% основного
		Phytochem Co.,	вещества в масляной
		Ltd., Китай	форме
9	Гидроксид натрия (NaOH)	РусХим, Россия	«ЧДА»

Таблица 2.1 – Реактивы, использованные в работе

10	Карбонат иттрия (Y <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	Химмед, Россия	«ХЧ»
11	Азотная кислота (HNO <sub>3</sub> )	Химмед, Россия	«ХЧ»
12	Гексан (С6Н14)	РусХим. Россия	99,0 мас.% основного
			вещества
13	Этиловый спирт (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Константа-Фарм	95,0 мас.% основного
		М, Россия	вещества
		Honeywell	
14	Нитрит натрия (NaNO <sub>2</sub> )	Riedel-de Haen,	«ЧДА»
		Германия	
		1	

Реактивы, используемые в работе, дополнительной очистке не подвергались.

# 2.2. Получение липидных наночастиц методом температурной инверсии фаз

Метод ТИФ основан на том, что при использовании смеси ПАВ с разным значением ГЛБ при нагревании выше температуры инверсии фаз происходит образование обратной эмульсии, которая при охлаждении переходит в прямую. При обеспечении достаточно резкого охлаждения и интенсивного перемешивания при температуре, близкой к температуре инверсии фаз, происходит формирование нанометровых капель. В случае использования твердых при комнатной температуре компонентов дисперсной фазы при дальнейшем охлаждении происходит их кристаллизация с образованием твердых липидных наночастиц.

В качестве компонентов дисперсной фазы липидных наночастиц использовали стеариновую кислоту, углеводородное масло и парафин в различном массовом соотношении. Дисперсная фаза составляла 25 об.%. Дисперсии стабилизировали смесью неионогенных ПАВ – Span 60 (для стабилизации обратной эмульсии) и Tween 60 (для стабилизации прямой эмульсии) – в мольном соотношении 1:0,76 [316] с суммарной концентрацией 12,5-15,0 об.%. Дисперсионной средой выступал физиологический раствор (0,15 M NaCl).

Для получения дисперсий липидных наночастиц с углеводородным маслом, стеариновой кислотой и парафином, стабилизированных Span 60 и Tween 60, смесь компонентов нагревали выше температуры инверсии фаз, определённой в разделе 3.1 для различных составов систем, а затем резко охлаждали на ледяной бане при постоянном перемешивании (1000 об/мин).

Для получения липидных наночастиц с инкорпорированными липофильными веществами добавки (стеарат иттрия, астаксантин, лютеин) предварительно растворяли в компонентах дисперсной фазы, нагретых до 80 °C, при постоянном перемешивании (300 об/мин). Далее дисперсии липидных наночастиц получали по описанной выше методике.

#### 2.3. Лиофилизация липидных наночастиц

Лиофилизацию дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином проводили в лиофильной сушилке FreeZone 1L (Labconco), где происходила возгонка воды при температуре -50 °C и давлении 500 Па. Системы предварительно замораживали в морозильной камере при -25 °C. Лиофильную сушку осуществляли до постоянной массы на протяжении 6-8 ч.

Для проведения дальнейших исследований физико-химических характеристик полученные лиофилизаты редиспергировали в бидистиллированной воде, количество которой соответствовало потере массы при лиофилизации. Высушенные липидные наночастицы выдерживали при температуре 20 °C и в морозильной камере при -25 °C в течение 2, 4 и 6 мес., так же редиспергировали и определяли дисперсность методом динамического светорассеяния.

### 2.4. Методы исследования

Для исследования физико-химических характеристик дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином использовали следующие методы анализа: кондуктометрия, метод динамического светорассеяния, определение электрофоретической подвижности, анализ светопропускания и обратного светорассеяния монохромного излучения, ДСК, ПЭМ, ИК-спектроскопия. Для исследования биологического действия дисперсий липидных наночастиц использовали метод ультразвуковой допплерографии и микропланшетный метод.

### 2.4.1. Кондуктометрический метод определения температуры инверсии фаз

При переходе прямой и обратной эмульсии друг в друга при ТИФ происходит скачкообразное изменение электропроводности системы вследствие изменения дисперсионной среды и её полярности. Это позволяет определять температуру данного перехода кондуктометрическим методом.

Электрическую проводимость систем исследовали с помощью портативного кондуктометра с автоматической термокомпенсацией Hanna HI8733 (HANNA Instruments). Измерения проводили в диапазоне от 50,0 до 98,5 °C. Температуру изменяли с шагом 2,5 °C, выдерживали систему в течение 10 мин и определяли электропроводность. По полученным данным строили зависимость электрической проводимости от температуры и по перегибу на кривой определяли диапазон, в котором протекала инверсия фаз.

# 2.4.2. Метод динамического светорассеяния для определения размера липидных наночастиц

Диаметр липидных наночастиц определяли методом динамического светорассеяния с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern). Принцип его действия основан том, что испускаемый гелий-неоновым лазером свет с длиной волны 633 нм рассеивается субмикронными частицами и регистрируется под углом 173°. Благодаря тому, что частицы находятся в постоянном броуновском движении, данные об интенсивности рассеянного света через возрастающие промежутки времени позволяют рассчитывать распределения по размерам частиц в исследуемой дисперсии.

Для исследования систем методом динамического светорассеяния в полистирольную кювету DTS0012 помещали 1,0-1,5 мл дисперсии липидных наночастиц. Измерения проводили при температуре 25 °C. Для каждого исследуемого образца проводили не менее 5 измерений по 10-20 прогонов (оптимальное количество определялось автоматически) в режиме Multiple Narrow Modes. По результатам каждой серии измерений вычисляли среднее значение.

### 2.4.3. Определение ζ-потенциала липидных наночастиц

Электрокинетический потенциал (ζ-потенциал) липидных наночастиц определяли с помощью лазерного анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern) по методике, использованной ранее [317].

Метод основан на комбинации лазерной доплеровской велосиметрии и лазерного светорассеяния для анализа электрофоретической подвижности частиц дисперсии и последующем расчете их ζ-потенциала с использованием уравнения Генри (формула 2.1):

$$\zeta = f \frac{\eta U_E}{\varepsilon \varepsilon_0},\tag{2.1}$$

где  $\zeta$  – электрокинетический потенциал частицы, f – численный коэффициент, зависящий от формы частиц и отношения их размера к диффузной части двойного электрического слоя,  $\eta$  – вязкость среды, U<sub>E</sub> – электрофоретическая подвижность частиц,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость среды,  $\varepsilon_0$  – диэлектрическая постоянная. Для наноразмерных, у которых толщина двойного электрического слоя велика по сравнению с радиусом, используется приближение Хюккеля, при котором численный коэффициент, позволяющий учитывать соотношение размеров частиц и диффузной части двойного электрического слоя  $f = \frac{3}{2}$ .

При приложении электрического поля заряженные частицы притягиваются к противоположно заряженному электроду. При этом скорость их движения и электрофоретическая подвижность зависят от заряда частиц, вязкости и диэлектрической проницаемости среды.

Для определения ζ-потенциала липидных наночастиц в полистирольную кювету DTS1060 с помощью шприца помещали 0,75 мл исследуемого образца. Проводили не менее 5 измерений при температуре 25 °C, по результатам каждой серии которых определяли среднее значение.

# 2.4.4. Анализ светопропускания и обратного светорассеяния монохромного излучения для исследования седиментационной и агрегативной устойчивости дисперсий липидных наночастиц

Исследование седиментационной и агрегативной устойчивости дисперсий липидных наночастиц и контроль отслаивания водной фазы осуществляли с помощью анализатора Multiscan MS 20 (DataPhysics Instruments) по методике, использованной ранее [317]. Принцип действия прибора основан на анализе распределения интенсивности светопропускания и обратного светорассеяния монохромного света ближнего инфракрасного диапазона с длиной волны 870 нм по высоте образца. Для исследования седиментационной и агрегативной устойчивости дисперсий стеклянный бюкс заполняли так, чтобы высота образца составляла не менее 20 мм. Измерения проводили при температуре 25 °С через 1 мин после установки бюкса в башню анализатора. Контроль отслаивания водной фазы осуществляли на протяжении не менее 30 сут. Агрегативную и седиментационную устойчивость определяли по характеру кривых распределения обратного светорассеяния монохромного света.

# 2.4.5. Метод дифференциальной сканирующей калориметрии для анализа фазовых превращений в липидных наночастицах

Определение характеристик фазовых превращений в липидных наночастицах осуществляли с помощью синхронного термоанализатора STA 449 F5 Jupiter (NETZSCH-Gerätebau GmbH). Исследования проводили в алюминиевых тиглях объемом 40 мкл с перфорированной крышкой. Навеска образца составляла 8-12 мг.

Перед началом измерения проводили предварительную продувку измерительной ячейки азотом в течение 5 мин. Нагрев осуществляли со скоростью 1 °С/мин с 25 до 95 °С. Исследования проводили в атмосфере азота (ток – 50 мл/мин).

Анализ полученных кривых осуществляли с помощью программного обеспечения Proteus Analysis (NETZSCH-Proteus) в соответствии с ГОСТ Р 56724-2015.

## 2.4.6. Метод просвечивающей электронной микроскопии для визуализации липидных наночастиц

Исследования формы и размеров липидных наночастиц проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100F. Пробоподготовку проводили с негативным контрастированием с использованием раствора уранил ацетата.

Исследования методом ПЭМ были проведены совместно с сотрудниками кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова к.ф.-м.н., ведущим научным сотрудником Багровым Д.В. и младшему научному сотруднику Внуковой А.А.

# 2.4.7. Метод инфракрасной спектроскопии для исследования молекулярной структуры компонентов дисперсий липидных наночастиц

Анализ химического состава стеарата иттрия, а также молекулярной структуры компонентов дисперсий липидных наночастиц проводили методом ИК-спектроскопии на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 380 (Thermo Fisher Scientific Inc.) в ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева. ИК-спектры получали при спектральном разрешении 4 см<sup>-1</sup> в диапазоне 4000-400 см<sup>-1</sup>. Управление спектрометром осуществляли с помощью компьютерного программного обеспечения OMNIC 7.3.

Измерения выполнены на оборудовании ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева.

# 2.4.8. Метод ультразвуковой допплерографии для исследования раздражающего и гипер- / гипотензивного действия дисперсий липидных наночастиц

Оценку биологического действия дисперсий липидных наночастиц осуществляли методом ультразвуковой допплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки куриных эмбрионов. Скорость кровотока куриных эмбрионов определяли с помощью ультразвукового компьютеризированного допплерографа «Минимакс-Допплер-К» (Минимакс), оснащенного датчиком с частотой 25 МГц, и программного обеспечения Minimax Doppler v.1.7. Для анализа использовали девятидневные куриные эмбрионы, которые предварительно выдерживали в термостате при 37,8-38,0 °C в течение 1 сут. Исследуемые образцы термостатировали при той же температуре не менее 2 ч. Скорость кровотока прямо пропорциональна давлению крови, поэтому данный параметр можно использовать для оценки биологической активности веществ, обладающих потенциальным гипер- или гипотензивным действием. Для проведения исследования от скорлупы освобождали воздушную камеру, поверхность подскорлуповой оболочки смачивали физиологическим раствором и удаляли её так, чтобы не повредить хориоаллантоисную мембрану. Для предотвращения высыхания её смачивали 400 мкл физиологического раствора.

Для определения скорости венозного кровотока выбирали наиболее крупный сосуд на поверхности хориоаллантоисной оболочки, датчик ультразвукового допплерографа располагали так, чтобы он находился под углом 60° к исследуемому сосуду. Изменяя положение датчика, добивались слабых по амплитуде, без острых пиков, пульсаций допплерограмм.

После определения скорости венозного кровотока в выбранном сосуде (нулевое измерение) на поверхность хориоаллантоисной оболочки наносили 400 мкл исследуемого образца, предварительно разбавленного в 100 раз физиологическим раствором (0,15 M NaCl). 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°С.

Для исследования гипер- и гипотензивного действия дисперсий липидных наночастиц моделировали состояние гемической гипоксии путем нанесения после нулевого измерения 400 мкл 0,15 М раствора нитрита натрия на хориоаллантоисную оболочку. Через 5 мин наносили 400 мкл исследуемого образца, разбавленного в 100 раз физиологическим раствором. Скорость венозного кровотока измеряли через 5, 25 и 55 мин после нанесения дисперсии липидных наночастиц, что соответствует 10, 30 и 60 мин после начала эксперимента.

Каждое измерение повторяли не менее трех раз. Исследование каждого образца повторяли не менее, чем на пяти куриных эмбрионах. По полученным данным находили среднее значение.

До 11 сут нервная система куриных эмбрионов не развивается, поэтому исследования на хориоаллантоисной оболочке куриных эмбрионов не считаются экспериментами 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.

Исследования методом ультразвуковой допплерографии были выполнены в лаборатории ПАО «Диод».

# 2.4.9. Микропланшетный метод исследования влияния облучения на бактериальную активность в наноэмульсиях с углеводородным маслом

Исследования антибактериальной активности дисперсий липидных наночастиц при радиоактивном облучении проводили в присутствии грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* или грамотрицательных *Escherichia Coli*. Предварительно в питательную среду (L-бульон, Кинг) вносили инокулят культуры и инкубировали на термостатируемом шейкере Thermo-Shaker PST-60H1-4 (BioSan) при 320 об/мин при 37 °C в течение 24 ч. Полученную культуру клеток разбавляли в 1000 раз.

В исследуемые образцы вносили культуры *Staphylococcus aureus* или *Escherichia Coli* до их концентрации в исследуемых образцах 4,6·10<sup>4</sup> и 6·10<sup>4</sup> КОЕ/мл. Полученные системы облучали с помощью рентгеновской трубки 5БХВ6-Мо (анодный ток 50 мА, напряжение 40 кВ) с мощностью поглощенной дозы 3 Гр/с (по дозиметру Фрике). Облучение проводили в течение 5,55 мин - 2,3 ч до достижения поглощенной дозы 1-25 кГр. После радиационной обработки проводили измерения оптической плотности дисперсий с микроорганизмами при длине волны 505 нм на фотометре для микропланшетов iMark (Bio-Rad Lab. Inc.) в течение 24 ч.

Результаты исследований представлены с учетом поправки на оптическую плотность незараженных наноэмульсий. Каждое измерение повторяли не менее трех раз, по полученным результатам находили среднее значение.

Микробиологические исследования были осуществлены инженером кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева Ванюшенковой А.А. под руководством д.т.н., профессора Белова А.А., облучение образцов проводил старший преподаватель кафедры химии высоких энергии и радиоэкологии РХТУ им. Д.И. Менделеева Фенин А.А.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследованы физико-химические свойства: дисперсность, агрегативная и седиментационная устойчивость, термическое поведение, ζ-потенциал – и влияние на биодоступность лекарственных соединений, инкапсулированных в липидные наночастицы со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином.

Первые ТЛН получали из глицеридов жирных кислот, однако для удобства сравнения и единства терминологии сейчас ТЛН называют все наночастицы, предлагаемые в качестве систем доставки лекарственных веществ, состоящие из твердой при комнатной температуре органической фазы, диспергированной в водной среде и стабилизированной ПАВ. Поэтому в данной работе под ТЛН понимаются липидные частицы, состоящие из стеариновой кислоты или парафина, а также их комбинации. Наноэмульсии — это дисперсные системы, в которых дисперсная фаза является жидкой и состоит из углеводородного масла. При получении носителей лекарственных и биологически активных соединений возможно комбинирование твердых и жидких компонентов дисперсной фазы. Так, в работе исследованы липидные наночастицы, состоящие из комбинации стеариновой кислоты и углеводородного масла, а также парафина и углеводородного масла, такие системы традиционно называют наноструктурированными липидными частицами, поэтому далее они будут обозначены как НЛЧ.

Выбор данных липидов обусловлен их биосовместимостью и нетоксичностью по отношению к человеческому организму, а также таким термическим поведением, которое позволяет получать наночастицы с варьируемой в зависимости от состава температурой плавления, необходимой для эффективной доставки лекарственных и биологически активных соединений.

Дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином получали низкоэнергетическим методом ТИФ. Он предполагает использование ПАВ, аффинность которых зависит от температуры, или смесей ПАВ с различным значением ГЛБ для обеспечения устойчивости как прямой, так и обратной эмульсий. Для стабилизации дисперсий липидных наночастиц использовали смесь неионогенных ПАВ – Span 60 и Tween 60, которые также характеризуются биосовместимостью и биоразлагаемостью, обладают низким и высоким ГЛБ, соответственно, что позволяет их использовать для получения методом ТИФ, а также образуют твердообразную оболочку вокруг липидных наночастиц [117, 317].

## 3.1. Температура инверсии фаз в системах с липидными наночастицами со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином

В работе дисперсии липидных наночастиц получали методом ТИФ. Данный метод заключается в том, что за счет использования смеси ПАВ с различным значением ГЛБ при повышенной температуре происходит образование обратной эмульсии, а при понижении температуры протекает инверсия фаз с образованием прямой эмульсии. При этом резкое охлаждение способствует образованию наноразмерных липидных наночастиц. Для получения более мелких частиц с узким распределением по размерам необходимо обеспечить нагревание выше температуры инверсии фаз, которая зависит как от используемых ПАВ, так и состава дисперсной фазы и дисперсионной среды. Таким образом, требуется знание температурных диапазонов существования прямых и обратных эмульсий для каждой конкретной системы.

Дисперсная фаза исследованных систем составляла 25 об.% и состояла из комбинации компонентов: стеариновой кислоты и углеводородного масла, стеариновой кислоты и парафина, парафина и углеводородного масла – в массовых соотношениях 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 и 0:1. Дисперсии стабилизировали смесью Span 60 и Tween 60 в мольном соотношении 1:0,76 [316, 318] с суммарной концентрацией 12,5 об.%. Дисперсионной средой выступал физиологический раствор (0,15 M NaCl).

Определение ТИФ было проведено кондуктометрическим методом [11]. Обратная эмульсия имеет низкую электрическую проводимость, обусловленную неполярностью дисперсионной среды. При переходе ее в прямую происходит увеличение электропроводности, поскольку дисперсионной средой становится водная фаза.

Предварительно получали липидные частицы методом ТИФ, а затем определяли электропроводность систем при нагревании от 30 до 100 °C с шагом 2,5 °C. При каждой температуре системы выдерживали в течение 10 мин для обеспечения равномерного нагрева всего объема эмульсии, после чего проводили определение её электропроводности.

На рисунке 3.1 представлены зависимости электропроводности систем со стеариновой кислотой и углеводородным маслом от температуры.



Рисунок 3.1 – Зависимости электропроводности систем с разным массовым соотношением стеариновой кислоты и углеводородного масла от темпера-

#### туры

В зависимости от состава температурный диапазон инверсии фаз в системах со стеариновой кислотой и/или углеводородным маслом изменялся от 75,0 до 92,5 °C (таблица 3.1). При этом отмечено, что более низкотемпературный диапазон инверсии фаз наблюдался в дисперсиях наночастиц, состоящих только из стеариновой кислоты. Включение углеводородного масла в состав дисперсной фазы приводило к смещению температурного диапазона инверсии фаз в область более высоких температур.

Таблица 3.1 – Температуры инверсии фаз в системах с разным массовым соотношением стеариновой кислоты и углеводородного масла

Массовое соотношение стеариновой кислоты и углеводородного масла	Температурный диапазон инверсии фаз, °С
1:0	75,0-80,0
3:1	85,0-87,5
1:1	
1:3	87,5-92,5
0:1	

При дальнейшем увеличении количества углеводородного масла температурный диапазон инверсии фаз не изменялся – она происходила при 87,5-92,5 °C.

Более низкая температура инверсии фаз дисперсий со стеариновой кислотой по сравнению с системами, содержащими углеводородное масло, по-видимому, обусловлена частичным встраиванием полярных молекул стеариновой кислоты в адсорбционный слой ПАВ.

Диапазоны температур инверсии фаз дисперсий с разным соотношением стеариновой кислоты и парафина практически не отличались от аналогичных систем со стеариновой кислотой и/или углеводородным маслом – инверсия фаз происходила в интервале температур до 95,0 °C (рисунок 3.2). Включение парафина в состав дисперсной фазы приводило к увеличению температуры инверсии фаз – при массовом соотношении 3:1 она наблюдалась при 85,0-87,5 °C. При дальнейшем уменьшении количества стеариновой кислоты наблюдалось

постепенное смещение диапазона инверсии фаз в область более высоких температур. Температурные диапазоны инверсии фаз дисперсий со стеариновой кислотой и парафином приведены в таблице 3.2.



Рисунок 3.2 – Зависимость электропроводности систем с разным массовым соотношением стеариновой кислоты и парафина от температуры

Таблица 3.2 – Температуры инверсии фаз в системах с разным массовым соотношением стеариновой кислоты и парафина

Массовое соотношение стеариновой кислоты и парафина	Температурный диапазон инверсии фаз, °С
1:0	75,0-80,0
3:1	85.0-87.5
1:1	
1:3	87,5-90,0
0:1	92,5-95,0

В дисперсиях с парафином диапазон температур инверсии фаз находился в области наиболее высоких значений – 92,5-95,0 °С. Комбинирование его с углеводородным маслом способствовало незначительному смещению температурного диапазона инверсии фаз до 87,5 -92,5 °С (рисунок 3.3).



Рисунок 3.3 – Зависимость электропроводности систем с разным массовым соотношением парафина и углеводородного масла от температуры

Стоит отметить, что вне зависимости от массового соотношения парафина и углеводородного масла при комбинировании этих неполярных компонентов дисперсной фазы наблюдалось протекание инверсии фазы практически в одинаковом диапазоне температур (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Температуры инверсии фаз в системах с разным массовым соотношением парафина и углеводородного масла

Массовое соотношение	Температурный диапазон
парафина и углеводород-	инверсии фаз, °С
ного масла	
1:0	92,5-95,0
3:1	
1:1	87 5-92 5
1:3	07,5-72,5
0:1	

Таким образом, были определены температурные диапазоны инверсии фаз в системах с липидными наночастицами из стеариновой кислоты, углеводородного масла и парафина, стабилизированными Tween 60 и Span 60. Для получения наноэмульсий с углеводородным маслом, ТЛН из парафина и НЛЧ, содержащих углеводородное масло и парафин, методом ТИФ необходим предварительный нагрев не менее, чем до 95 °C для образования обратной эмульсии. Для образования обратной эмульсии со стеариновой кислотой при получении ТЛН смесь компонентов достаточно нагреть до 85 °C.

### 3.2. Влияние состава липидных наночастиц на устойчивость их дисперсий

Дисперсность и агрегативная устойчивость липидных наночастиц являются физико-химическими характеристиками, определяющими возможность и эффективность применения их для доставки лекарственных веществ [8]. В связи с этим было исследовано влияние состава липидных наночастиц: концентрации ПАВ, соотношения стеариновой кислоты, углеводородного масла и парафина – в составе дисперсной фазы на их агрегативную и седиментационную устойчивость.

## 3.2.1. **С**-потенциал липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином

Поверхностный заряд частиц может оказывать влияние на стабильность их дисперсий за счет электростатического фактора. К тому же известно, что положительный заряд на поверхности частиц способствует более интенсивному образованию белковой короны, а следовательно – более быстрой интернализации их макрофагами и выводу из кровотока. Инкорпорирование активных соединений в нейтрально или слабоотрицательно заряженные частицы, напротив, обеспечивает более длительную циркуляцию и эффективную адресную доставку, что объясняет тенденцию использования для стабилизации дисперсий неионогенных ПАВ, в том числе благодаря их биосовместимости [319].

В таблице 3.4 представлены значения ζ-потенциала полученных липидных наночастиц с различным соотношением стеариновой кислоты, парафина и углеводородного масла и концентрацией Tween 60 и Span 60.

Таблица 3.4 – Значения ζ-потенциала липидных наночастиц с различным соотношением стеариновой кислоты, парафина и углеводородного масла в составе дисперсной фазы, стабилизированных 12,5 и 15,0 об.% ПАВ

Массовое со- отношение	ре со- дисперсная фаза ние					
компонентов	Стеариновая кислота :		Стеариновая кислота :		Парафин : углеводо-	
в составе дис-	углеводородное масло		парафин		родное масло	
персной фазы	12,5 об.%	15,0 об.%	12,5 об.%	15,0 об.%	12,5 об.%	15,0 об.%
	ПАВ	ПАВ	ПАВ	ПАВ	ПАВ	ПАВ
1:0	-(1,2±0,7)	-(1,8±1,0)	-(1,2±0,7)	-(1,8±1,0)	-(1,6±0,7)	-(2,1±0,8)
3:1	-(1,6±1,0)	-(2,4±1,0)	-(1,8±0,8)	-(2,0±0,5)	-(1,6±0,7)	-(2,5±0,2)
1:1	-(2,2±0,8)	-(2,4±0,9)	-(2,1±0,8)	-(2,4±0,9)	-(2,0±0,4)	$-(2,4\pm0,3)$
1:3	-(2,2±0,5)	-(2,4±0,6)	-(2,4±0,4)	-(2,6±0,7)	-(1,8±0,1)	-(2,2±0,6)
0:1	-(1,3±0,8)	-(2,1±0,6)	-(1,6±0,7)	-(2,1±0,8)	-(1,3±0,8)	-(2,1±0,6)

Соотношение стеариновой кислоты, углеводородного масла и парафина в составе дисперсной фазы и концентрация ПАВ не оказывали существенного влияния на ζ-потенциал наночастиц.

Вне зависимости от типа и концентрации компонентов частицы имели отрицательный ζ-потенциал, который не превышал нескольких единиц милливольт, что свидетельствует об отсутствии влияния электростатического фактора стабилизации на агрегативную устойчивость липидных наночастиц.

# 3.2.2. Дисперсность липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, агрегативная и седиментационная устойчивость их дисперсий

Ранее было выявлено, что наиболее высокая агрегативная и седиментационная устойчивость дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой и наноэмульсии с углеводородным маслом, стабилизированных смесью Tween 60 и Span 60, полученных методом ТИФ, наблюдается при концентрациях ПАВ 12,5-15,0 об.% [317]. Однако в литературе подробно не рассмотрена устойчивость липидных наночастиц с дисперсной фазой, состоящей из комбинации компонентов. В исследуемых системах концентрация дисперсной фазы составляла 25 об.%. Массовое соотношение стеариновой кислоты и углеводородного масла варьировали от 1:0 до 0:1.

В исследованных системах с различным соотношением стеариновой кислоты и углеводородного масла в составе дисперсной фазы, стабилизированных 12,5 и 15,0 об.% смеси Tween 60 и Span 60, наблюдалось бимодальное распределение частиц по размерам (рисунок 3.4). Причем во всех исследованных дисперсиях преобладали наночастицы диаметром в диапазоне от 20 до 50 нм (таблица 3.5, рисунок 3.5), а доля агрегатов наночастиц, соответствующих второму пику на гистограммах, не превышала 8 об.%.

Распределения по размерам наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, стабилизированных 12,5 об.% смеси Tween 60 и Span 60, приведены на рисунке 3.5а. Средний диаметр липидных наночастиц со стеариновой кислотой составлял  $24\pm4$  нм, а размер их агрегатов –  $220\pm30$  нм, причем содержание последних не превышало 3 об.%. Включение углеводородного масла в состав дисперсной фазы приводило к незначительному укрупнению липидных наночастиц [320] (таблица 3.5). Так, при массовом соотношении 1:1 их диаметр составлял  $36\pm4$  нм. При этом также наблюдалось укрупнение агрегатов наночастиц до  $340\pm40$  нм, а их количество возрастало до 8 об.%.

Наноэмульсии с углеводородным малом состояли преимущественно из капель размером 33±3 нм [320].



Рисунок 3.4 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и углеводородного масла в различном массовом соотношении, стабилизированных 12,5 (а) и 15,0 об.% ПАВ (б)

Таблица 3.5 – Средний диаметр липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, стабилизированных 12,5 и 15,0 об.% ПАВ

Массовое соотношение	Средний диаметр наночастиц, нм	
стеариновой кислоты и	Концентрация ПАВ, об.%	
углеводородного масла	12,5	15,0
1:0	24±4	27±4
3:1	30±3	31±3
1:1	36±4	33±3
1:3	41±4	35±3
0:1	33±3	30±4



Рисунок 3.5 – ПЭМ-микрофотографии липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии из углеводородного масла (в), стабилизированных 15 об.% ПАВ

С уменьшением концентрации стеариновой кислоты в составе дисперсной фазы наблюдалось укрупнение частиц (таблица 3.5). Увеличение количества углеводородного масла, предположительно, способствовало формированию менее упорядоченной кристаллической решетки с большим количеством дефектов. Увеличение степени разупорядоченности кристаллической струк-

99

туры стеариновой кислоты, предположительно, благоприятно влияет на возможность носителей удерживать активные соединения и предотвращать неконтролируемое высвобождение в результате перекристаллизации.

В дисперсиях липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, стабилизированных 15 об.% ПАВ, размер частиц практически не зависел от состава дисперсной фазы. Распределения по размерам частиц после получения и через 30 сут представлены на рисунке 3.6.



Рисунок 3.6 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии из углеводородного масла (в), стабилизированных 15 об.% ПАВ, после получения и через 30 сут

Гистограммы для систем, стабилизированных 12,5 об.% ПАВ, выглядели аналогично. Средний размер исследованных липидных наночастиц с различным соотношением стеариновой кислоты и углеводородного масла оставался неизменным более 30 сут. В дисперсиях ТЛН, содержащих стеариновую кислоту, (рисунок 3.6 а и б) наблюдалось незначительное увеличение количества агрегатов: с 2 до 7 об.% в дисперсиях ТЛН со стеариновой кислотой и с 5 до 7 об.% в дисперсиях липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом. Наноэмульсии сохраняли агрегативную устойчивость на протяжении всего времени исследования (рисунок 3.6в).

В дисперсиях липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом наблюдалась высокая устойчивость к обратной седиментации (рисунок 3.7).



Рисунок 3.7 - Распределения интенсивности отраженного монохроматического света по высоте дисперсии липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б) и капель наноэмульсии с углеводородным маслом (в), стабилизированных 15,0 об.% ПАВ

Если не учитывать флуктуации светорассеяния, то его величина была относительно постоянной по высоте столба дисперсий липидных наночастиц.

С течением времени не было выявлено перераспределения концентрации липидных наночастиц по высоте дисперсии, что подтверждалось отсутствием перегибов на кривых распределения интенсивности обратного рассеянного света по высоте и свидетельствовало об однородности структуры этих систем в течение длительного времени. Это подтверждало их седиментационную и агрегативную устойчивость в течение 30 сут.

Таким образом, было показано, что инкорпорирование углеводородного масла в состав ТЛН со стеариновой кислотой приводило к укрупнению липидных наночастиц. В дисперсиях, стабилизированных 12,5 об.% смеси ПАВ, наблюдалось увеличение размеров частиц с 24 до 41 нм с увеличением доли углеводородного масла в составе дисперсной фазы [320]. Увеличение концентрации смеси Span 60 и Tween 60 до 15 об.% позволяло получать наночастицы со стеариновой кислотой и углеводородным маслом размером 30-35 нм при всех исследованных соотношениях компонентов дисперсной фазы. При этом исследованные в данном разделе дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом оставались агрегативно и седиментационно устойчивыми более 30 сут.

# 3.2.3. Дисперсность липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином, агрегативная и седиментационная устойчивость их дисперсий

Было исследовано влияние состава дисперсной фазы, состоящей из комбинации твердых компонентов – стеариновой кислоты и парафина, на дисперсность липидных наночастиц. Дисперсии стабилизировали 12,5 и 15,0 об.% смеси Span 60 и Tween 60. В качестве дисперсионной среды использовали физиологический раствор (0,15 M NaCl). В дисперсиях ТЛН со стеариновой кислотой и парафином наблюдалось бимодальное распределение наночастиц по размерам (рисунок 3.8). Включение парафина в состав дисперсной фазы приводило к тому, что размер стабилизированных 12,5 об.% ПАВ липидных наночастиц возрастал с  $24\pm4$  нм у наночастиц со стеариновой кислотой до  $40\pm3$  нм у наночастиц со стеариновой кислотой до  $40\pm3$  нм у наночастиц со стеариновой кислотой до  $250\pm30$  нм, соответственно (рисунок 3.8а). Содержание агрегатов в дисперсиях липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином в массовом соотношении 1:1 не превышало 9 об.%.



Рисунок 3.8 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и парафина в различном массовом соотношении, стабилизированных 12,5 (а) и 15,0 об.% ПАВ (б)

Увеличение массовой доли парафина в составе дисперсной фазы липидных наночастиц, дисперсии которых были стабилизированы 12,5 об.% ПАВ, приводило к незначительному увеличению размеров до 35±2 - 40±4 нм при 25-75 мас.% парафина, соответственно (таблица 3.6). Диаметр липидных наночастиц с парафином, стабилизированных 12,5 об.% ПАВ, составлял 78±7 нм (рисунок 3.8a, таблица 3.6).

Увеличение концентрации ПАВ до 15 об.% в составе дисперсий ТЛН и НЛЧ со стеариновой кислотой не оказывало существенного влияния на размер липидных наночастиц, в то время как в дисперсиях ТЛН с парафином это приводило к уменьшению среднего размера липидных наночастиц до 68±6 нм (рисунок 3.86, таблица 3.6).

Массовое соотношение	Средний диаметр наночастиц, нм		
стеариновой кислоты и	Концентрация ПАВ, об.%		
парафина	12,5	15,0	
1:0	24±4	27±4	
3:1	35±2	36±6	
1:1	40±3	39±5	
1:3	40±4	38±3	
0:1	78±7	68±6	

Таблица 3.6 – Средний диаметр липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином, стабилизированных 12,5 и 15,0 об.% ПАВ

Дисперсии со стеариновой кислотой и парафином состояли из сферических липидных наночастиц, что подтверждается микрофотографиями, полученными с помощью ПЭМ (рисунок 3.9а). Частицы с парафином имели как сферическую, так эллипсообразную форму (рисунок 3.9б). Средний диаметр частиц на микрофотографиях соответствует размерам, полученным по результатам динамического светорассеяния.

Гистограммы распределения частиц дисперсий, стабилизированных 15 об.% ПАВ, по размерам представлены на рисунке 3.6а, 3.10. Вне зависимости от состава дисперсной фазы липидные наночастицы со стеариновой кислотой и парафином сохраняли агрегативную устойчивость на протяжении более 30 сут. Средние размеры липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином не изменялись в течение исследуемого времени. При этом объемная доля агрегатов также оставалась практически неизменной и не превышала 2 об.%.



Рисунок 3.9 – ПЭМ-микрофотографии липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (а) и парафина (б), стабилизированных 15 об.% ПАВ



Рисунок 3.10 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (а) и парафина (б), стабилизированных 15 об.% ПАВ, после получения и через 30 сут

Распределения интенсивности отраженного монохроматического света по высоте дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином в разные моменты времени оставались практически постоянными (рисунок 3.11). В течение 30 сут не наблюдалось отслоения водной фазы и перераспределения концентрации липидных наночастиц по высоте. Это подтверждает, что исследованные дисперсии обладали высокой седиментационной и агрегативной устойчивостью.



Рисунок 3.11 - Распределения интенсивности отраженного монохроматического света по высоте дисперсий липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (а) и парафина (б), стабилизированных 15 об.% ПАВ

Таким образом, включение парафина в состав ТЛН со стеариновой кислотой приводило к незначительному укрупнению частиц. Это свидетельствовало о том, что в процессе образования сферических частиц парафин кристаллизовался совместно со стеариновой кислотой вследствие близких температур плавления, что приводило к взаимному разупорядочиванию кристаллической структуры компонентов вследствие различий в их химическом строении. Дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином, стабилизированные 12,5 и 15,0 об.% смеси Span 60 и Tween 60, сохраняли агрегативную и седиментационную устойчивость более 30 сут.

## 3.2.4. Дисперсность липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом, агрегативная и седиментационная устойчивость их дисперсий

Углеводородное масло и парафин являются близкими по химическому составу компонентами дисперсной фазы. Они состоят из углеводородов с разной длиной углеводородной цепи, что обеспечивает их различное агрегатное состояние при комнатной температуре. Поэтому они были выбраны в качестве компонентов дисперсной фазы в разном массовом соотношении от 1:0 до 0:1. Объемная концентрация дисперсной фазы составляла 25 об.%. Для стабилизации липидных наночастиц использовали смесь ПАВ Span 60 и Tween 60 с концентрацией 12,5 и 15,0 об.%. Дисперсионной средой выступал физиологический раствор (0,15 M NaCl).

Вне зависимости от исследуемых концентраций ПАВ липидные наночастицы с парафином и углеводородным маслом имели бимодальное распределение по размерам. Пример такого распределения представлен на рисунке 3.12.



Рисунок 3.12 – Распределения по размерам липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1, стабилизированных 12,5 и 15,0 об.% ПАВ

Увеличение содержания углеводородного масла в составе дисперсной фазы липидных наночастиц способствовало уменьшению их размеров (таблица 3.7). Так, частицы с массовым соотношением жидкого и твердого компонентов 3:1, стабилизированные 12,5 об.% ПАВ, имели диаметр 35±3 нм, причем с увеличением концентрации ПАВ в составе дисперсии до 15,0 об.% он уменьшался до 29±4 нм. Дальнейшее увеличение содержания углеводородного масла до 50 и 75 мас.% в составе дисперсной фазы приводило к образованию липидных наночастиц размером 32±4 нм при 12,5 об.% ПАВ и 28±4 нм при 15,0 об.% ПАВ. При варьировании состава дисперсной фазы НЛЧ с парафином и углеводородным маслом и концентрации ПАВ размеры частиц изменялись в пределах погрешности измерений.

Таблица 3.7 – Средний диаметр липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом, стабилизированных 12,5 и 15,0 об.% ПАВ

	Средний диаметр наночастиц с		
Массовое соотношение	концентрацией дисперсной фазы		
парафина и углеводо-	25 об.%, нм		
родного масла	Концентрация ПАВ, об.%		
	12,5	15,0	
1:0	78±7	68±6	
3:1	35±3	29±4	
1:1	32±4	28±4	
1:3	32±4	28±4	
0:1	33±3	30±4	

Результаты ПЭМ представлены на рисунке 3.13. Полученные частицы с парафином и углеводородным маслом имели сферическую форму.


Рисунок 3.13 – ПЭМ-микрофотографии липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1, стабилизированных 15 об.% ПАВ

Как было показано ранее, дисперсии липидных наночастиц из парафина и наноэмульсии с углеводородным маслом сохраняли агрегативную устойчивость более 30 сут. Наночастицы, дисперсная фаза которых состояла из углеводородного масла и парафина в различном массовом соотношении, также оставались агрегативно устойчивыми на протяжении исследования (рисунок 3.14).

Дисперсии липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом оставались седиментационно и агрегативно устойчивыми более 30 сут, что подтверждалось распределениями интенсивности отраженного монохроматического света по высоте, которые практически не изменялись со временем, – не наблюдалось появления заметных перегибов, свидетельствовавших о перераспределении липидных наночастиц разного размера по высоте или обратной седиментации (рисунок 3.15).

109



Рисунок 3.14 – Распределения по размерам липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1, стабилизированных 15 об.% ПАВ, после получения и через 30 сут



Рисунок 3.15 - Распределения интенсивности отраженного монохроматического света по высоте дисперсий липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1, стабилизированных 15 об.% ПАВ

Таким образом, включение углеводородного масла в состав дисперсной фазы липидных наночастиц с парафином способствовало уменьшению размеров частиц. Близкое химическое строение жидкого и твердого компонентов приводило к однородному смешению расплава парафина и углеводородного масла при нагревании в процессе получения обратной эмульсии фаз и способствовало образованию липидных наночастиц меньшего размера. Дисперсии липидных наночастиц с углеводородным маслом и парафином обладали высокой устойчивостью к агрегации и обратной седиментации более 30 сут.

# 3.3. Фазовые переходы в дисперсиях липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином

Температура фазовых переходов, протекающих в липидных наночастицах, определяет возможности и области их применения в качестве систем доставки лекарственных и биологически активных веществ. Путем варьирования температуры плавления возможно обеспечение контролируемых условий высвобождения активных соединений за счет физиологических особенностей организма (повышенная температура в опухолях и пр.) и теплового воздействия.

Поскольку различные полиморфные модификации твердых компонентов дисперсной фазы, особенно стеариновой кислоты, имеют отличающиеся друг от друга температуры плавления [105, 321], на основе информации о температурных интервалах фазовых превращений можно сделать вывод о кристаллической структуре твердых липидов в составе наночастиц, что важно для эффективного удержания ими лекарственных веществ и снижения вероятности неконтролируемого высвобождения в результате перекристаллизации и полиморфных превращений.

Термограммы дисперсий липидных наночастиц и их компонентов получали методом ДСК. Были исследованы липидные наночастицы со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином, описанные в разделе 3.2.

Оценку степени кристалличности (CI) проводили по формуле 3.1:

$$CI = \frac{\Delta H_{disp}}{\Delta H_{vol} \cdot \omega} \cdot 100\%, \qquad (3.1)$$

где ΔH<sub>disp</sub> – энтальпия плавления исследуемого вещества в диспергированном состоянии, ΔH<sub>vol</sub> – энтальпия плавления исследуемого вещества, кристаллизующегося в объемном состоянии, ω – массовая доля исследуемого кристаллизующегося вещества в составе липидных наночастиц.

Дисперсии анализировали при нагревании от 20-25 до 95 °C со скоростью 1 °C/мин. Степень кристалличности смешанных систем рассчитывали с учетом массовой доли компонентов.

Фазовые переходы ПАВ, входящих в состав исследованных в данной работе липидных наночастиц, были определены ранее: Span 60 – 51,9±0,8 °C, Tween 60 - 21,6±0,5 и 24,5±0,5 °C, смесь Span 60 и Tween 60 в мольном соотношении 1:0,76 - 29,5±0,5 и 44,4±0,7 °C [317].

# 3.3.1. Влияние переохлаждения на характеристики фазовых переходов в компонентах липидных наночастиц

Поскольку при получении липидных наночастиц методом ТИФ компоненты дисперсной фазы подвергают нагреву выше температуры плавления и резкому охлаждению, в полученных ТЛН и НЛЧ они могут находиться в переохлажденном состоянии. Для дальнейшего анализа структуры липидных наночастиц был проведен дифференциальный термический анализ переохлажденных смесей липидов, входящих в состав дисперсной фазы. Для этого стеариновую кислоту, парафин, смесь стеариновой кислоты и углеводородного масла, стеариновой кислоты и парафина, парафина и углеводородного масла нагревали выше температуры плавления и резко охлаждали. Дополнительно исследовали их термическое поведение в смесях с ПАВ. Span 60 и Tween 60 добавляли в том же количестве, что и в дисперсии липидных наночастиц с аналогичным составом дисперсной фазы – в массовом соотношении липидов и ПАВ 2:1, что соответствовало 12,5 об.% ПАВ в аналогичных дисперсиях. Их также нагревали выше температуры плавления липидов и резко охлаждали. Полученные температуры максимумов пиков плавления и степень кристалличности представлены в таблице 3.8. Стоит отметить, что пики, характерные для фазовых переходов смеси ПАВ, расположенные при 21,6-44,4°С [317], имели малую интенсивность и перекрывались фазовыми переходами в ротаторную (ротационную) фазу парафина [322], поэтому в таблице 3.8 они не приведены.

Таблица 3.8 – Температуры максимумов пиков плавления и степень кристалличности стеариновой кислоты, парафина, углеводородного масла и их смесей в переохлажденном и объемном состоянии

Массовое соотношение			Температура пика плавления,			Степень кристалличности,		
липидов			°C			%		
Стеа- рино- вая кис- лота	Угле- водо- родное масло	Пара- фин	Объем- ное	Пере- охла- жденное объем- ное	Пере- охла- жденное объем- ное с ПАВ	Объем- ное	Пере- охла- жден- ное объем- ное	Пере- охла- жден- ное объем- ное с ПАВ
1	0	0	72,0±2,2	71,9±2,2	68,5±2,0	~100	~100	87,6±7,9
0	0	1	55,7±1,6	53,2±1,6	54,4±1,6	~100	~100	77,9±7,0
1	1	0	64,6±1,9	63,9±1,9	62,1±1,9	39,2±3,5	40,7±3,7	33,6±3,0
1	0	1	64,2±1,9	62,6±1,9	58,7±1,8	41,6±3,7	42,0±3,8	25,6±2,3
			53,5±1,6	53,6±1,6	54,2±1,6	~100	~100	87,2±7,8
0	1	1	42,3±1,7	42,3±1,7	52,5±1,6	78,2±7,0	50,8±4,6	55,5±5,0

Переход стеариновой кислоты в состояние переохлажденного расплава не приводил к снижению температуры, соответствующей максимуму пика плавления, или изменению степени кристалличности. При резком охлаждении расплавленной смеси стеариновой кислоты и ПАВ происходило снижение температуры плавления стеариновой кислоты – максимум пика плавления смещался до 68,5±2,0 °C, а степень кристалличности снижалась до 87,6±7,9% (рисунок 3.16). Известно, что ПАВ могут способствовать стабилизации менее упорядоченной формы липидов [128, 201]. Снижение степени кристалличности в присутствии ПАВ может быть обусловлено встраиванием молекул ПАВ в кристаллизующийся расплав стеариновой кислоты, что способствовало формированию разупорядоченной кристаллической структуры.



Рисунок 3.16 – Термограммы объемной стеариновой кислоты и переохлажденной объемной стеариновой кислоты с и без ПАВ

Переохлаждение парафина не приводило к существенным изменениям термического поведения. Так, на термограммах объемного парафина наблюдались пики плавления с максимумами при  $36,3\pm1,1$  и  $55,7\pm1,6$  °C (рисунок 3.17), которые соответствовали фазовому переходу в ротаторную (ротационную) фазу парафина и плавлению, соответственно [322]. При резком охлаждении практически не наблюдалось смещения пиков, температура плавления изменялась в пределах погрешности и максимумы пиков находились при  $35,6\pm1,1$  и  $53,2\pm1,6$  °C. При этом практически не происходило изменения степени кристалличности – она составляла практически 100%. При кристаллизации переохлажденной расплавленной смеси парафина с ПАВ степень кристалличности снижалась до  $77,9\pm7,0$ %. Стоит отметить, что ПАВ оказывали более существенное влияние на кристалличность парафина по сравнению со стеариновой кислотой.



Рисунок 3.17 – Термограммы объемного парафина и переохлажденного объемного парафина с и без ПАВ

Комбинирование стеариновой кислоты с углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1 способствовало значительному разупорядочиванию кристаллической решетки даже при постепенной кристаллизации смеси из расплавленного состояния – степень кристалличности составляла 39,2±3,5% (рисунок 3.18). При кристаллизации в переохлажденном объемном состоянии при резком охлаждении степень кристалличности стеариновой кислоты практически не изменялась и составляла 40,7±3,7%. При этом температура плавления объемной и переохлажденной объемной стеариновой кислоты отличалась незначительно и составляла 64,6±1,9 и 63,9±1,9 °C, соответственно.



Рисунок 3.18 – Термограммы объемной смеси стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 и переохлажденной объемной смеси с и без ПАВ

При добавлении ПАВ в смесь стеариновой кислоты и углеводородного масла максимум пика плавления смещался в область более низких температур и находился при температуре  $62,1\pm1,9$  °C, а степень кристалличности снижалась до  $33,6\pm3,0\%$ .

Термическое поведение кристаллических состояний, образующихся при постепенном и резком охлаждении смеси стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1, практически не отличались друг от друга. На термограммах присутствовало два пика: пик, соответствующий плавлению фазы, обогащенной парафином, с максимумом при 53,5-54,1 °C и пик плавления стеариновой кислоты при 62,6-64,2 °C (рисунок 3.19). Также на кривых присутствовал слабо выраженный пик при 36,2-36,3 °C, соответствующей плавлению смеси ПАВ или ротаторной (ротационной) фазы парафина. При смешении липидов в объемном состоянии степень кристалличности парафина практически не изменялась, в то время как стеариновой кислоты – уменьшалась до  $41,6\pm3,7\%$ . В отличие от объемного состояния, в переохлажденном объемном состоянии наблюдалось незначительное снижение температуры максимума пика плавления стеариновой кислоты в пределах погрешности измерений с  $64,2\pm1,9$  до  $62,6\pm1,9$  °C, соответственно. При этом степень кристалличности стеариновой кислоты практически не изменялась.



Рисунок 3.19 – Термограммы объемной смеси стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 и переохлажденной объемной смеси с и без ПАВ

В присутствии ПАВ в переохлажденном состоянии наблюдалось снижение температуры, соответствующей максимуму пика плавления стеариновой кислоты, до  $58,7\pm1,8$  °C, а температуры, соответствующие пикам плавления парафина, практически не изменялись. При этом степень кристалличности снижалась до  $25,6\pm2,3\%$  у стеариновой кислоты и  $87,2\pm7,8\%$  у парафина.

При кристаллизации объемной и переохлажденной объемной смеси парафина с углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1 на термограммах наблюдался один пик с максимумом при 42,3±1,7 °C (рисунок 3.20). Такое термическое поведение свидетельствовало о том, что включение жидкого углеводородного масла в кристаллическую решетку парафина способствовало смещению температуры плавления в область более низких температур. Это происходило благодаря близости химического строения молекул парафина и углеводородного масла, представляющих собой углеводородные цепи разной длины, что способствовало их однородному смешению и существенному влиянию углеводородного масла на кристаллизацию парафина. Это подтверждали результаты оценки степени кристалличности, которая составляла 78,2±7,0% в объемном состоянии и снижалась до 50,8±4,6% в переохлажденном. В аналогичной смеси стеариновой кислоты и парафина, а также стеариновой кислоты и углеводородного масла, рассмотренных ранее, подобного уменьшения степени кристалличности не наблюдалось в связи с разным химическим строением твердых липидов – слабой полярностью стеариновой кислоты и неполярностью парафина и углеводородного масла.

При добавлении ПАВ к смеси парафина и углеводородного масла наблюдалось незначительное смещение максимумов пиков и увеличение в пределах погрешности степени кристалличности фазы, обогащенной парафином, до 55,5±5,0%.

Следует отметить, что на кривых, соответствующих переохлажденной объемной смеси парафина и углеводородного масла и смеси парафина, углеводородного масла и ПАВ, имелись слабовыраженные пики при  $50,1\pm1,5$  и  $51,5\pm1,5$  °C, которые могут свидетельствовать о частичном разделении фаз.



Рисунок 3.20 – Термограммы объемной смеси парафина и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 и переохлажденной объемной смеси с и без ПАВ

Таким образом, показано, что комбинирование твердых и жидких липидов между собой способствовало разупорядочиванию кристаллической решетки и снижению степени кристалличности твердых липидов. При этом стеариновая кислота, парафин, а также их смесь при резком охлаждении практически не изменяли своего термического поведения и кристаллической структуры. Комбинирование твердых и жидких липидов близкого химического строения – парафина и углеводородного масла – способствовало более существенному снижению степени кристалличности и температуры плавления, чем комбинирование слабополярной стеариновой кислоты с неполярными углеводородным маслом или парафином. Присутствие ПАВ способствовало снижению температуры плавления и степени кристалличности вследствие встраивания молекул ПАВ в структуру кристаллизующейся стеариновой кислоты. В смеси парафина и углеводородного масла присутствие ПАВ вероятно способствовало фазовой сегрегации.

## 3.3.2. Характеристики фазовых переходов в липидных наночастицах со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином

Известно, что быстрое охлаждение и кристаллизация веществ из расплавов способствует образованию менее упорядоченных полиморфных модификаций [128]. В процессе получения липидных наночастиц методом ТИФ осуществлялось резкое охлаждение обратной эмульсии из расплавленных компонентов на ледяной бане, поэтому представляло интерес исследование температуры плавления и степени кристалличности липидов, находящихся в диспергированном состоянии, после резкого охлаждения.

На термограмме свежеполученной дисперсии ТЛН со стеариновой кислотой наблюдалось два выраженных эндотермических пика плавления (рисунок 3.21), что свидетельствовало об образовании частично упорядоченной структуры с пиком плавления при температуре  $58,5\pm1,8$  °C и упорядоченной кристаллической структуры стеариновой кислоты с пиком при  $73,5\pm2,2$  °C. Следует отметить, что частично упорядоченная фаза является наиболее предпочтительной для инкорпорирования лекарственных веществ за счет образования большого количества дефектов в кристаллической решетке [323]. Также на кривой имелось уширение в низкотемпературной области, что было обусловлено присутствием в составе липидных наночастиц смеси ПАВ.



Рисунок 3.21 – Термограммы свежеполученной и лиофилизованной дисперсии ТЛН со стеариновой кислотой

На термограмме лиофилизата ТЛН наблюдался узкий эндотермический пик при 67,7±2,0 °C, соответствующий плавлению стеариновой кислоты, а также широкий пик в низкотемпературной области, обусловленный плавлением твердой оболочки из смеси Tween 60 и Span 60 на поверхности липидных наночастиц [317] (рисунок 3.21). Исчезновение пика, соответствующего частично разупорядоченной фазе стеариновой кислоты, и смещение основного пика плавления стеариновой кислоты в области более низких температур свидетельствовало о протекании процесса перекристаллизации при лиофильной сушке, которая часто наблюдается в липидных системах [126, 127]. При этом степень кристалличности стеариновой кислоты в лиофилизате ТЛН составляла 71,3%, что ниже значений, представленных в разделе 3.3.1 (таблица 3.8) для переохлажденной объемной стеариновой кислоты без и в присутствии ПАВ. При получении липидных наночастиц к моменту начала кристаллизации стеариновая кислота находится в виде наноразмерных капель. При этом вероятность образования зародышей кристаллизации снижается, что препятствует образованию более упорядоченной кристаллической решетки. Вследствие этого при быстром охлаждении стеариновая кислота в наночастицах затвердевает с более низкой степенью кристалличности.

На термограммах наноэмульсии с углеводородным маслом присутствовали широкие эндотермические пики до 40 °C, соответствующие плавлению твердообразной оболочки смеси ПАВ – Tween 60 и Span 60 на поверхности капель [317] (рисунок 3.22). Термограммы липидных наночастиц с парафином имели эндотермический пик с максимумом при 36,8±1,1 °C (рисунок 3.22), соответствующий плавлению входящих в состав дисперсий ПАВ – Tween 60 и Span 60 и фазовому переходу ротаторной (ротационной) фазы парафина. Наиболее интенсивный пик плавления на термограммах ТЛН с парафином наблюдался при 54,9±1,6 °C. При этом степень кристалличности парафина в ТЛН была близка к 100%, что соответствует предположению, что парафин при переохлаждении кристаллизуется так же, как и в объемном состоянии.



Рисунок 3.22– Термограммы наноэмульсии с углеводородным маслом и дисперсии ТЛН с парафином

Включение углеводородного масла в состав дисперсной фазы ТЛН со стеариновой кислотой приводило к снижению температуры пика плавления (рисунок 3.23). Температуры максимумов пиков плавления липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, а также степень кристалличности стеариновой кислоты в них представлены в таблице 3.9.



Рисунок 3.23 – Термограммы дисперсий липидных наночастиц с различным массовым соотношением стеариновой кислоты и углеводородного масла в составе дисперсной фазы

Таблица 3.9 – Температуры максимумов пиков плавления липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом и степень кристалличности стеариновой кислоты

Массовое соотношение стеариновой кислоты и углеводородного масла	Температура максимума пика плавления, °С	Степень кристаллич- ности, %
1:0	67,7±2,0	71,3±6,4
3:1	64,2±1,9	56,4±5,1
1:1	59,2±1,8	33,6±3,0
1:3	50,9±1,5	29,6±2,7
0:1	-	-

Снижение температуры плавления липидных наночастиц с увеличением массовой доли углеводородного масла в составе дисперсной фазы сопровождалось снижением степени кристалличности твердой липидной матрицы. Это может быть связано с особенностями взаимного растворения и термического поведения компонентов [324]. В литературе такие эффекты также связывают с уменьшением размеров частиц и полиморфными превращениями их компонентов [325]. Как было отмечено в разделе 3.2.2, включение углеводородного масла в состав дисперсной фазы липидных наночастиц не приводило к заметному изменению их размеров. Стоит отметить, что температура максимума пика плавления объемной и переохлажденной объемной смеси углеводородного масла и стеариновой кислоты (таблица 3.8) была выше, чем температура плавления соответствующих НЛЧ, а степень кристалличности объемной смеси липидов – выше, чем в НЛЧ. Это позволяет сделать предположение о том, что в процессе кристаллизации происходило формирование структуры с повышенной концентрацией стеариновой кислоты, разупорядоченной вследствие частичного встраивания углеводородного масла, ближе к поверхности липидных наночастиц, так как молекулы стеариновой кислоты обладают амфифильными свойствами, и центральной частью, обогащенной углеводородным маслом (рисунок 3.24). Причем с увеличением массовой доли жидкого липида в составе дисперсной фазы происходило утоньшение слоя с повышенной концентрацией стеариновой кислоты, а также снижение степени её кристалличности, что и приводило к смещению пика плавления в область более низких температур.



Рисунок 3.24 – Структура липидных наночастиц с массовым соотношением стеариновой кислоты и углеводородного масла a) 3:1, б) 1:1, в) 1:3

При комбинировании твердых липидов – стеариновой кислоты и парафина – с увеличением массовой доли последнего до массового соотношения 1:1 на кривых наблюдалось два пика, соответствующих плавлению фазы, обогащенной стеариновой кислотой, при более высокой температуре и фазы, обогащенной парафином, при более низкой температуре (рисунок 3.25, таблица 3.10).



Рисунок 3.25 – Термограммы дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином

Таблица 3.10 – Температуры максимумов пиков плавления липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином и степень кристалличности липидов

Массовое соотношение	Температура максимума	Степень кристаллично-		
стеариновой кислоты и		сти стеариновой кис-		
парафина	пика плавления, С	лоты и парафина, %		
1:0	67,7±2,0	71,3±6,4		
3.1	63,8±1,9	35,3±3,2		
5.1	53,0±1,6	45,8±4,1		
1.1	59,4±1,8	19,6±1,8		
1.1	53,4±1,6	65,5±5,9		
1:3	53,1±1,6	70,8±6,4		
0:1	54,9±1,6	~100		

При снижении массовой доли стеариновой кислоты до 1:3 на кривых присутствовал пик, соответствующий только фазе, обогащенной парафином.

124

Следует отметить, что температура плавления фазы, обогащенной парафином, оставалась практически неизменной в диапазоне массовых соотношений стеариновой кислоты и парафина от 3:1 до 1:3. Это свидетельствовало о том, что концентрация стеариновой кислоты в этой фазе была практически постоянной. Также на термограммах ТЛН, состоящих из смеси стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:3, а также парафина, присутствовал пик с максимумом при температуре 33,8-39,2 °C, соответствовавший плавлению смеси ПАВ и фазовому переходу ротаторной (ротационной) фазы парафина.

Снижение температуры плавления стеариновой кислоты при увеличении массовой доли парафина в составе липидных наночастиц со стеариновой кислотой сопровождалось уменьшением степени её кристалличности с 71,3±6,4% в ТЛН со стеариновой кислотой до 19,6±1,8% в ТЛН с массовым соотношением липидов 1:1 (таблица 3.10). Это свидетельствовало о том, что наблюдалось разупорядочивание кристаллической структуры стеариновой кислоты вследствие частичного встраивания парафина в неё.

При этом с увеличением массовой доли парафина в составе ТЛН происходило лишь незначительное увеличение степени его кристалличности. При массовом соотношении стеариновой кислоты и парафина 1:3 степень кристалличности увеличивалась до 70,8±6,4%, что несущественно меньше данной величины, соответствующей наблюдаемой у переохлажденной объемной смеси липидов и ПАВ, приведенной в разделе 3.3.1 (таблица 3.8).

Это позволяет сделать предположение о том, что при комбинировании стеариновой кислоты и парафина в составе липидных наночастиц происходило формирование структуры с неполярным липидным ядром. При этом между твердой оболочкой из ПАВ и неполярных ядром, состоящим преимущественно из парафина, находилась фаза, обогащенная стеариновой кислотой, с низкой степенью кристалличности, что является предпочтительным для инкапсулирования лекарственных соединений (рисунок 3.26).



Рисунок 3.26 – Структура липидной наночастицы со стеариновой кислотой и парафином

При включении углеводородного масла в состав дисперсной фазы с парафином наблюдалось снижение температуры плавления липидных наночастиц (рисунок 3.27, таблица 3.11). Максимум температуры плавления липидных наночастиц с массовым соотношением парафина и углеводородного масла 3:1 снижался до  $51,8\pm1,6$  °C. При увеличении доли углеводородного масла до массового соотношения 1:1 пик, соответствующий плавлению парафина, с максимумом при  $50,0\pm1,5$  °C практически исчезал. Однако на термограммах появлялся второй пик с максимумом при  $44,6\pm1,3$  °C, соответствующий фазе, обогащенной углеводородным маслом. Дальнейшее увеличение концентрации углеводородного масла приводило к тому, что пик, соответствующий плавлению липидов, отсутствовал. На всех кривых наблюдался максимум, соответствующий плавлению ПАВ или ротаторной (ротационной) фазы парафина.

126



Рисунок 3.27 – Термограммы дисперсий липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом

Таблица 3.11 – Температуры максимумов пиков плавления липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом и степень кристалличности парафина

Массовое соотношение парафина и углеводо- родного масла	Температура максимума пика плавления, °С	Степень кристаллич- ности парафина, %
1:0	54,9±1,6	~100
3:1	51,8±1,6	77,2±6,9
1:1	44,6±1,3	74,3±6,7
1:3	_	_
0:1		

Постепенное снижение температуры плавления смеси парафина и углеводородного масла может быть связано с их взаимной растворимостью друг в друге ввиду близкого химического строения, что приводило к тому, что в процессе затвердевания липидных наночастиц происходило формирование струк-

127

туры с обогащенной парафином областью вблизи адсорбционного слоя и центральной частью с более высокой концентрацией углеводородного масла (рисунок 3.28). При этом происходило разупорядочивание кристаллической решетки парафина, что подтверждалось снижением степени его кристалличности с практически 100% в ТЛН до 74,3±6,7% в НЛЧ, состоящих из парафина и углеводородного масла, с массовым соотношением 1:1.



Рисунок 3.28 – Структура липидной наночастицы с парафином и углеводородным маслом

Ранее было высказано предположение, что в присутствии ПАВ происходила сегрегация на фазу, обогащенную парафином, и фазу с повышенной концентрацией углеводородного масла. На ПЭМ изображениях расколотых НЛЧ с парафином и углеводородным маслом видно, что они состоят из твердой оболочки толщиной около 5-7 нм и внутренней полости, в которой предположительно находилась фаза, обогащенная углеводородным маслом (рисунок 3.29).



Рисунок 3.29 – ПЭМ-микрофотография липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1

Таким образом, показано, что включение неполярных углеводородного масла или парафина в состав липидных наночастиц с полярной стеариновой кислотой приводило к снижению температуры их плавления и степени кристалличности стеариновой кислоты. Благодаря амфифильным свойствам молекул стеариновой кислоты и частичному встраиванию углеводородного масла в её кристаллическую решетку наблюдалось формирование структуры с повышенной концентрацией разупорядоченной стеариновой кислоты ближе к поверхности липидных наночастиц и центральной частью, обогащенной углеводородным маслом. При образовании НЛЧ со стеариновой кислотой и парафином вблизи границы адсорбционного слоя ПАВ также находилась фаза, обогащенная стеариновой кислотой, с низкой степенью кристалличности, в то время как в ядре частицы располагался парафин с высокой степенью кристалличности. При комбинировании углеводородного масла и парафина в составе дисперсной фазы наблюдалась сегрегация на фазу, обогащенную парафином, вблизи поверхности НЛЧ и фазу с повышенной концентрацией углеводородного масла в центральной части.

### 3.4. Лиофилизация липидных наночастиц

Долгосрочное хранение дисперсий липидных наночастиц требует присутствия консервантов в составе систем или удаления водной фазы, например, путем лиофилизации. Невозможность сушки при нагревании из-за невысоких температур плавления компонентов делает лиофилизацию наиболее перспективным способом удаления дисперсионной среды для увеличения срока хранения липидных наночастиц. Однако в процессе лиофилизации может происходить необратимая агрегация наночастиц, а также разрушение их структуры.

Часто для повышения устойчивости липидных наночастиц используют криопротекторы - декстран, глицин, маннит, сорбит, трегалозу и другие. Однако это приводит к увеличению размеров носителей лекарственных соединений за счет формирования оболочки вокруг наночастиц [258]. ТЛН на основе стеариновой кислоты демонстрируют высокую устойчивость к агрегации в процессе лиофильной сушки, однако для них характерна перекристаллизация в процессе лиофилизации, что может впоследствии приводить к неконтролируемому высвобождению инкорпорированного лекарственного соединения [260].

Для исследования влияния лиофилизации на дисперсность липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином полученные системы замораживали при температуре -25 °C и высушивали в лиофильной сушилке при -50 °C и 500 Па до постоянной массы (в течение 6-8 ч). Системы редиспергировали в бидистиллированной воде сразу после лиофилизации или после выдержки в течение 2, 4, 6 мес. Для исследования влияния условий хранения порошки липидных наночастиц хранили при температуре 20 °C и в морозильной камере при -25 °C. Дисперсность липидных наночастиц определяли после редиспергирования методом динамического светорассеяния.

#### 130

# 3.4.1. Лиофилизация липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом

Были проведены исследования влияния лиофилизации на дисперсность липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, содержащих 25 об.% дисперсной фазы и стабилизированных 15 об.% смеси Span 60 и Tween 60.

Твердые липидные наночастицы со стеариновой кислотой после сушки представляли собой белый сыпучий, слабо комкующийся порошок, рассыпающийся при механическом воздействии (рисунок 3.30а). Включение в состав дисперсной фазы углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 приводило к тому, что лиофилизат липидных частиц становился пастообразным и происходило формирование плотных, не разрушающиеся при механическом воздействии образований (рисунок 3.30б). Высушенная наноэмульсия имела вязкую, нетекучую консистенцию и была полупрозрачной (рисунок 3.30в).



Рисунок 3.30 – Фотографии лиофилизованных липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии из углеводородного родного масла (в)

Размеры липидных наночастиц сразу после получения и после лиофильной сушки и редиспергирования представлены в таблице 3.12. Они практически не изменялись при лиофилизации. Лиофильная сушка не оказывала существенного влияния на дисперсность липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом.

Таблица 3.12 – Средний диаметр свежеполученных липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом и редиспергированных сразу после лиофилизации

Массовое соотношение	Средний диаметр липидных наночастиц, нм				
стеариновой кислоты и	Ло пиофицизации	После пиофилизации			
углеводородного масла	До люфилизиции	после знофизизации			
1:0	27±4	30±3			
3:1	31±3	30±2			
1:1	33±3	31±3			
1:3	35±3	33±4			
0:1	30±4	33±3			

Распределение липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом по размерам оставалось бимодальным вне зависимости от соотношения твердого и жидкого компонентов в составе дисперсной фазы (рисунок 3.31). Во всех исследованных системах наблюдалось увеличение содержания и размеров агрегатов после лиофилизации. Размер липидных частиц со стеариновой кислотой, а также стеариновой кислотой и углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1 изменялся в пределах погрешности измерений. При этом происходило укрупнение агрегатов с 220-250 до 340-370 нм (рисунок 3.31а, б). Стоит отметить, что несмотря на увеличение объемной доли агрегатов, их содержание в дисперсиях не превышало 10 об.%. Наиболее интенсивное укрупнение агрегатов процессе лиофилизации наноэмульсии с углеводородным маслом. Флокулы увеличивались со  $164\pm15$  до  $360\pm50$  нм, а их количество возрастало с 1,6 до 7,8 об.% (рисунок 3.31в). При этом размеры капель оставались практически неизменными: 27±4 и 30±3 нм до и после лиофилизации, соответственно.



Рисунок 3.31 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии из углеводородного масла (в) до и после лиофилизации

Высушенные липидные наночастицы со стеариновой кислотой и углеводородным маслом сохраняли дисперсность на протяжении 4 мес. вне зависимости от состава дисперсной фазы при хранении при 20 °С (рисунок 3.32). При этом наблюдалось некоторое уменьшение размеров частиц до 15-25 нм [326] (таблица 3.13).



Рисунок 3.32 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии из углеводородного масла (в), редиспергированных сразу после лиофилизации и через 2, 4 и

6 мес. хранения при 20 °С

При дальнейшей выдержке при 20 °C в дисперсиях ТЛН со стеариновой кислотой происходило образование агрегатов, которые не разрушались при редиспергировании. Их размер составлял 150±20 нм спустя 6 мес. (рисунок 3.32а). Включение в состав дисперсной фазы углеводородного масла в массовом соотношении более 1:1 способствовало повышению агрегативной устойчивости по сравнению с ТЛН со стеариновой кислотой – размер лиофилизованных липидных наночастиц оставался неизменным более 6 мес. При этом объемная доля агрегатов также практически не изменялась (рисунок 3.32б). При хранении наноэмульсии с углеводородным маслом при 20 °C

спустя 6 мес. наблюдалось увеличение содержания флокул размером 220±20 нм до 25 об.% (рисунок 3.32в).

Таблица 3.13 – Средний диаметр редиспергированных липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, хранившихся при температуре 20 и -25 °C

Массовое соот-	Средний диаметр наночастиц, нм						
новой кислоты и	0.1422		20 °C			-25 °C	
углеводородного масла	0 мес.	2 мес.	4 мес.	6 мес.	2 мес.	4 мес.	6 мес.
1:0	30±3	27±4	20±4	150±20	28±5	32±7 / 250±30	180±30
3:1	30±2	25±5	20±3	190±30	22±5	32±3 / 400±80	255±30
1:1	31±3	25±5	25±4	20±3	20±3	35±9 / 400±70	225±40
1:3	33±4	15±3	15±2	16±5	30±4	24±4 / 220±50	280±20
0:1	33±3	17±3	17±3	20±4	30±3	25±4	33±7

Снижение температуры хранения до -25 °С приводило к снижению агрегативной устойчивости липидных наночастиц, содержащих стеариновую кислоту в составе дисперсной фазы. В таких дисперсиях уже спустя 4 мес. наблюдалось увеличение содержания агрегатов до 12-25 об.% (рисунок 3.33а, б). Спустя 6 мес. липидные частицы, содержащие стеариновую кислоту в составе дисперсной фазы, находились в агрегированном состоянии и имели размер 180-280 нм [326] (таблица 3.13). Причем хранение при температуре -25 °С приводило к увеличению размеров агрегатов по сравнению с хранением при 20 °С. По-видимому, это обусловлено перекристаллизацией стеариновой кислоты, входящей в состав липидных наночастиц [326]. Установлено, что в процессе лиофилизации возможно увеличение степени кристалличности вследствие полиморфных превращений, упорядочивания кристаллической решетки и образования более стабильной формы стеариновой кислоты [260]. Стоит отметить, что с увеличением содержания углеводородного масла наблюдалось укрупнение образующихся агрегатов.



Рисунок 3.33 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии из углеводородного масла (в), редиспергированных сразу после лиофилизации и через 2, 4 и 6 мес. хранения при температуре -25 °C

Снижение температуры хранения, напротив, способствовало сохранению дисперсности капель наноэмульсии с углеводородным маслом более 6 мес. (рисунок 3.33в).

Таким образом, было выявлено, что дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом сохраняли свою дисперсность в процессе лиофилизации. Однако в процессе хранения высушенных липидных наночастиц наблюдалось увеличение количества их агрегатов. ТЛН со стеариновой кислотой агрегировали вне зависимости от условий хранения, однако при хранении в морозильной камере доля агрегатов была ниже. Включение в состав дисперсной фазы углеводородного масла способствовало тому, что липидные частицы сохраняли свою дисперсность на протяжении 6 мес. при хранении при 20 °C. Наноэмульсии с углеводородным маслом, напротив, демонстрировали высокую агрегативную устойчивость лиофилизата при хранении в морозильной камере.

### 3.4.2. Лиофилизация липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином

Исследовали влияние лиофилизации на дисперсность ТЛН со стеариновой кислотой и парафином, стабилизированных 15 об.% смеси Span 60 и Tween 60. Объемная доля дисперсной фазы составляла 25 об.%. Высушенные липидные наночастицы хранили при 20 и -25 °C и редиспергировали непосредственно перед определением размеров частиц методом динамического светорассеяния.

Вне зависимости от соотношения стеариновой кислоты и парафина в составе дисперсной фазы высушенные липидные наночастицы представляли собой белые, легко комкующиеся порошки. Однако включение парафина в состав дисперсной фазы приводило к формированию более плотных агломератов, не рассыпающихся при механическом воздействии (рисунок 3.20). Высушенные липидные наночастицы с парафином имели плотную комкующуюся структуру (рисунок 3.34б).



Рисунок 3.34 – Фотографии лиофилизованных липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (а) и парафина (б)

Влияние лиофилизации ТЛН со стеариновой кислотой было рассмотрено ранее в разделе 3.4.1. Характер распределения лиофилизованных и сразу же редиспергированных липидных наночастиц, состоящих из комбинации стеариновой кислоты и парафина, по размерам был аналогичен нелиофилизированным дисперсиям – на гистограммах присутствовало два пика, причем содержание агрегатов размером 290±30 нм не превышало 6 об.% (рисунок 3.35а). Однако наблюдалось уменьшение размеров наночастиц с 36-39 до 20-25 нм [326] (таблица 3.14). Это, вероятно, связано с перекристаллизацией парафина и стеариновой кислоты при низкой температуре, приводящей к увеличению степени кристалличности компонентов, уменьшению объема кристаллической структуры и, как следствие, размеров наночастиц.

Липидные наночастицы с парафином, напротив, незначительно укрупнялись в процессе лиофильной сушки. Их размер после лиофилизации составлял 80±9 нм, а распределение оставалось мономодальным, как и в свежеполученной системе (рисунок 3.356).



Рисунок 3.35 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (а) и парафина (б), до и после лиофилизации

Таблица 3.14 – Средний диаметр свежеполученных липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином и редиспергированных сразу после лиофилизации

Массовое соотношение	Средний диаметр липидных наночастиц, нм				
стеариновой кислоты и	До лиофилизации	После лиофилизации			
парафина					
1:0	27±4	30±3			
3:1	36±6	20±3			
1:1	39±5	25±2			
1:3	38±3	20±3			
0:1	68±6	80±9			

В процессе хранения лиофилизованных липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином происходило постепенное увеличение их размеров. При хранении при 20 °C уже спустя 2 мес. наблюдалось укрупнение частиц из комбинации компонентов до 90-220 нм. При этом распределение становилось мономодальным (рисунок 3.36а). Вероятно, происходило разрушение ранее образовавшихся агрегатов частиц и формирование флокул меньшего размера, состоящих из нескольких наночастиц. При выдержке при 20 °C в течение 4-6 мес. происходило дальнейшее укрупнение частиц.



Рисунок 3.36 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (а) и парафина (б), редиспергированных сразу после лиофилизации и через 2, 4 и 6 мес. хранения при 20 °C

В дисперсиях с парафином также наблюдалась постепенная агрегация частиц при сохранении мономодального распределения (рисунок 3.36б). Спустя 2 мес. при хранении при 20 °C размеры частиц увеличились от 80±9 до 180±50 нм. Дальнейшее хранение в течение 4-6 мес. приводило к укрупнению до 250±90 и 340±90 нм, соответственно (таблица 3.15).

Снижение температуры хранения до -25 °C способствовало повышению устойчивости липидных наночастиц. Так, спустя 2 мес. хранения в морозильной камере липидные наночастицы со стеариновой кислотой и парафином сохраняли бимодальное распределение по размерам, однако происходило увеличение объемной доли агрегатов до 12-17 об.% (рисунок 3.37а). При дальнейшем хранении в морозильной камере в течение 4-6 мес. также наблюдалось укрупнение агрегатов наночастиц до 120-230 нм (таблица 3.15). Стоит отметить, что при -25 °C образовывались агрегаты меньшего размера, чем при 20 °C.

Таблица 3.15 – Средний диаметр редиспергированных липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином, хранившихся при температуре 20 и -25 °C

Массовое со- отношение		Средний диаметр наночастиц, нм					
стеариновой	0 мес.	20 °C			-25 °C		
рафина		2 мес.	4 мес.	6 мес.	2 мес.	4 мес.	6 мес.
1:0	30±3	27±4	20±4	150±20	28±5	32±7 / 250±30	180±30
3:1	20±3	220±20	200±30	190±40	20±2 / 200±20	20±5 / 300±70	180±40
1:1	25±2	90±10	190±30	150±60	20±4 / 240±50	230±50	190±40
1:3	20±3	160±30	180±50	90±20	23±5 / 190±40	135±40	120±20
0:1	80±9	180±50	250±90	340±90	140±60	140±60	340±50

Укрупнение липидных наночастиц с парафином также замедлялось при хранении при -25 °C. Вплоть до 4 мес. средний диаметр частиц не превышал 150 нм, а распределение оставалось мономодальным (рисунок 3.376, таблица 3.15).



Рисунок 3.37 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (а) и парафина (б), редиспергированных сразу после лиофилизации и через 2, 4 и 6 мес. хранения при температуре -25 °C

Таким образом, выявлено, что при лиофилизации липидных наночастиц со стеариновой кислотой и парафином происходило незначительное уменьшение размеров частиц. В процессе хранения высушенных систем наблюдалось их укрупнение, причем снижение температуры хранения способствовало снижению интенсивности укрупнения частиц.

## 3.4.3. Лиофилизация липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом

Исследование влияние лиофилизации на дисперсность липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом с объемной долей дисперсной фазы 25 об.%, стабилизированных 15 об.% смеси Span 60 и Tween 60 проводили аналогично разделам 3.4.1 и 3.4.2.

Как и в случае комбинирования стеариновой кислоты с углеводным маслом (твердого и жидкого липидов), высушенные дисперсии с парафином и углеводородным маслом представляли собой легко комкующиеся, не рассыпающиеся при механическом воздействии пастообразные системы (рисунок 3.38).

142

При этом наблюдалось образование более маслянистой структуры по сравнению с аналогичными системами со стеариновой кислотой в качестве твердого компонента в составе дисперсной фазы.



Рисунок 3.38 – Фотография лиофилизованных липидных наночастиц из парафина и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1

Влияние лиофилизации на наноэмульсии с углеводородным маслом и твердые липидные наночастицы с парафином было рассмотрено ранее в разделах 3.4.1 и 3.4.2, соответственно.

Липидные частицы, состоящие из комбинации парафина и углеводородного масла, имели бимодальное распределение по размерам как до, так и после редиспергирования сразу же после лиофилизации (рисунок 3.39). При этом средний диаметр частиц изменялся в пределах погрешности и составлял 25-32 нм (таблица 3.16).

После лиофилизации и последующего редиспергирования липидных наночастиц с углеводородным маслом и парафином наблюдалось увеличение размеров присутствующих агрегатов с 100-150 до 200-350 нм. Стоит отметить, что увеличение размеров агрегатов протекало без укрупнения самих НЛЧ. Это может быть обусловлено перекристаллизацией парафина при лиофилизации. Как показано на рисунке 3.40б, наночастицы парафина имели округлую или удлиненную форму. По-видимому, в результате перекристаллизации парафина размеры игольчатых наночастиц возрастали, что способствовало их агрегации с другими наночастицами и приводило к увеличению числа частиц в агрегатах [327].



Рисунок 3.39 – Распределения по размерам липидных наночастиц из парафина и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 до и после лиофилизации

Таблица 3.16 – Средний диаметр свежеполученных липидных наночастиц с
парафином и углеводородным маслом и редиспергированных сразу после лио-
филизации

Массовое соотношение	Средний диаметр липидных наночастиц, нм				
парафина и углеводо-	До лиофилизации	После лиофилизации			
родного масла					
1:0	68±6	80±9			
3:1	29±4	32±4			
1:1	28±4	25±3			
1:3	28±4	25±4			
0:1	30±4	33±3			

В лиофилизованных дисперсиях с парафином и углеводородным маслом, хранившихся при 20 °C, в течение 2-6 мес. происходило постепенное укрупнение наночастиц. Пример распределения липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом по размерам приведен на рисунке 3.40.


Рисунок 3.40 – Распределения по размерам липидных наночастиц из парафина и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1, редиспергированных сразу после лиофилизации и через 2, 4 и 6 мес. хранения при 20 °C

С увеличением доли углеводородного масла в составе дисперсной фазы липидных наночастиц наблюдалось снижение интенсивности укрупнения размеров частиц (таблица 3.17). Так, при массовом соотношении парафина и углеводородного масла 3:1 спустя 6 мес. редиспергированные липидные наночастицы присутствовали в дисперсии только в виде агрегатов диаметром 390±30 нм. При соотношении 1:1 спустя 6 мес. также наблюдалось мономодальное распределение по размерам, а средний диаметр липидных наночастиц составлял 66±8 нм (рисунок 3.40, таблица 3.17). Дальнейшее увеличение доли углеводородного масла в составе дисперсной фазы способствовало сохранению бимодального распределения частиц по размерам с преобладанием отдельных наночастиц не более 20 нм.

При понижении температуры хранения лиофилизованных дисперсий липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом до 25 °C в них на протяжении 6 мес. сохранялось бимодальное распределение частиц по размерам (рисунок 3.41).

Таблица 3.17 – Средний диаметр редиспергированных липидных наночастиц с парафином и углеводородным маслом, хранившихся при температуре 20 и -25 °C

Массовое соот-	Средний диаметр наночастиц, нм						
фина и углево-	0	20 °C			-25 °C		
масла	мес.	2 мес.	4 мес.	6 мес.	2 мес.	4 мес.	6 мес.
1:0	80±9	180±50	250±90	340±90	140±60	140±60	190±50
3:1	32±4	55±10	30±5	390±30	32±9	33±6	43±4
1:1	25±3	47±5	46±9	68±5	34±4	41±5	66±8
1:3	25±4	16±3	15±3	15±3	17±4	17±3	17±7
0:1	33±3	17±3	17±3	20±4	30±3	25±4	33±4



Рисунок 3.41 – Распределения по размерам липидных наночастиц из парафина и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1, редиспергированных сразу после лиофилизации и через 2, 4 и 6 мес. хранения при температуре -25 °C

В НЛЧ с массовым соотношением твердого и жидкого компонентов дисперсной фазы 3:1 на протяжении 6 мес. преобладали отдельные наночастицы, а доля агрегатов не превышала 7 об.%, в отличие от липидных наночастиц, хранившихся при 20 °C, которые спустя 6 мес. хранения полностью агрегировали. Диаметр липидных наночастиц с массовым соотношением парафина и углеводородного масла 1:1 увеличивался в процессе хранения аналогично системам, хранившимся при 20 °C. Дальнейшее увеличение углеводородного масла в составе дисперсной фазы НЛЧ способствовало повышению агрегативной устойчивости – размер наночастиц сохранялся на протяжении 6 мес.

Таким образом, отмечено, что включение углеводородного масла в состав липидных наночастиц с парафином способствует повышению агрегативной устойчивости лиофилизованных НЛЧ. При 20 °C существенное укрупнение наночастиц наблюдалось в системах с массовым соотношением парафина и углеводородного масла более 3:1, в то время как понижение температуры хранения до -25 °C способствовало снижению интенсивности агрегации в них. Лиофилизованные липидные наночастицы с массовым соотношением парафина и углеводородного масла не более 1:1 оставались агрегативно устойчивыми на протяжении 6 мес.

Были определены рекомендуемые сроки хранения лиофилизованных липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином при температурах 20 и -25 °C (таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Сро	ки хранения	лиофилизованных	липидных	наночастиц	co
стеариновой кислот	ой, углеводој	родным маслом и па	арафином		

Массовое соотношение компонен-		Рекомендуемый срок хранения при			
тов в составе дисперсной фазы			определенной температуре		
Стеари-	геари- Углеводо- Парафи		20 °C	-25 °C	
новая	родное				
кислота	масло				
1	0	0	Не более 4 мес.	Не более 2 мес.	
3	1	0	Не более 4 мес.	Не более 2 мес.	
1	1	0	Более 6 мес.	Не более 2 мес.	
1	3	0	Более 6 мес.	Не более 2 мес.	
0	1	0	Более 6 мес.	Более 6 мес.	
3	0	1			
1	0	1	He peroveu weren	Us paravauuumanan	
1	0	3	_ пе рекомендуется пе рекоменд		
0	0	1			
0	1	3	Не более 4 мес.	Более 6 мес.	
0	1	1	Более 6 мес.	Более 6 мес.	
0	3	1	Более 6 мес.	Более 6 мес.	

На основании представленных данных можно сделать заключение, что не рекомендуется хранение лиофилизованных ТЛН с парафином, а также парафином и стеариновой кислотой в связи с их агрегацией. Лиофилизованные липидные наночастицы со стеариновой кислотой, а также стеариновой кислотой и углеводородным маслом сохраняют дисперсность не менее 4 мес. при 20 °C и не более 2 мес. при -25 °C. Хранение лиофилизованных липидных наночастиц с углеводородным маслом и парафином возможно более 6 мес., при этом более предпочтительна температура -25 °C.

# 3.5. Потенциальные области применения липидных наночастиц 3.5.1. Липидные наночастицы как перспективные носители радиофармацевтических активных веществ

Одним из наиболее эффективных подходов при лечении раковых заболеваний является лучевая терапия, однако его применение требует минимизации радиоактивного воздействия на здоровые органы и ткани, например, путем радиоэмболизации с использованием носителей лекарственных веществ [328]. Наночастицы, благодаря своим размерам, низкой токсичности и возможности модификации поверхности, могут преодолевать биологические барьеры и обеспечивать доставку радиоактивных изотопов в пораженные органы [329]. В качестве таких носителей могут использоваться липидные наночастицы. Однако, несмотря на значительный интерес исследователей к разработке радиофармацевтических препаратов, практически отсутствуют исследования, в которых были бы изучены наноэмульсии, НЛЧ и ТЛН в качестве носителей.

#### 3.5.1.1. Влияние стеарата иттрия на физико-химические свойства дисперсий липидных наночастиц

Одним из широко применяемых в практике лучевой терапии изотопов является Y-90 с периодом полураспада 64,2 ч [330]. Однако инкорпорирование радиоактивных соединений в липидные наночастицы может оказывать влияние на их агрегативную и седиментационную устойчивость.

Чтобы показать возможность применения липидных наночастиц в качестве носителей радиофармацевтических препаратов, было проведено исследование их стабильности на примере дисперсий со стеариновой кислотой и углеводородным маслом, описанных в разделе 3.2.2 и стабилизированных 12,5 об.% смеси Span 60 и Tween 60. В них был инкорпорирован стеарат иттрия, полученный по адаптированной методике, используемой для получения олеата иттрия [331].

Для получения стеарата иттрия карбонат иттрия медленно растворяли в слабоконцентрированной азотной кислоте (0,3 М). Отдельно получали стеарат натрия путем смешения расплавленной стеариновой кислоты и гидроксида натрия, к раствору которого затем приливали смесь гексана и этилового спирта до объемного соотношении 1 : 1,33 : 2,33 и раствор полученного ранее нитрата иттрия. Смесь выдерживали на магнитной мешалке 24 ч при температуре 60 °C, промывали и сушили в печи при 70 °C для удаления остатков растворителей. Состав полученной соли был подтвержден гравиметрическим методом и путем анализа молекулярной структуры методом ИК-спектроскопии [332].

На спектрах полученного стеарата иттрия присутствовали пики при 2915, 2850 и 1107 см<sup>-1</sup>, соответствовавшие валентным колебаниям -CH<sub>2</sub>группы и связи С-Н в алифатических соединениях. Пик при 1700 см<sup>-1</sup> свидетельствовал о присутствии непрореагировавшей стеариновой кислоты, поскольку относился к валентным колебаниям карбонильной группы в неионизированной карбоксильной группе (рисунок 3.42).



Рисунок 3.42 – ИК-спектр стеарата иттрия

При замене иона водорода на ион металла в молекуле стеариновой кислоты происходила ионизация карбоксильной группы, что приводило к смещению пиков в более коротковолновую область [331]. В связи с чем присутствие на ИК-спектрах интенсивных пиков при 1543 и 1469 см<sup>-1</sup> подтверждало образование иттриевой соли стеариновой кислоты.

Химический состав полученного стеарата иттрия был также подтвержден с помощью гравиметрического анализа путем прокаливания образца до разложения его до оксида иттрия. Теоретическое содержание оксида иттрия в стеарате составляет 12,00 мас.%. По результатам пяти измерений содержание оксида иттрия в полученном образце составило 11,04±0,80 мас.%, что подтверждало образование стеарата иттрия с незначительным присутствием непрореагировавшей стеариновой кислоты.

При инкорпорировании полученного стеарата иттрия в исследуемые липидные наночастицы со стеариновой кислотой и углеводородным маслом во всех системах сохранялось бимодальное распределение частиц по размерам (рисунок 3.43). При этом при включении стеарата иттрия наблюдалось незначительное повышение их дисперсности.

Так, инкорпорирование 0,25 мас.% стеарата иттрия в ТЛН со стеариновой кислотой способствовало незначительному уменьшению их размеров с  $24\pm4$  до  $21\pm3$  нм (рисунок 3.43а). Объемная доля агрегатов размером  $250\pm40$ нм при этом не превышала 4 об.%. При включении стеарата иттрия в состав наноструктурированных липидных носителей со стеариновой кислотой и углеводородным маслом в массовом соотношении 1:1 наблюдалось наиболее существенное уменьшение диаметра с  $36\pm4$  до  $24\pm3$  нм (рисунок 3.436). При этом содержание флокул снижалось с 3,9 до 1,8 об.%. Размер капель наноэмульсии при инкорпорировании в них стеарата иттрия оставался неизменным (рисунок 3.43в).



Рисунок 3.43 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии с углеводородным маслом (в), без стеарата иттрия (YSt) и содержащих 0,25 мас.% стеарата ит-

трия

Как было показано в разделе 3.2.1, липидные наночастицы со стеариновой кислотой и углеводородным маслом имели слабоотрицательный ζ-потенциал (таблица 3.4), не превышавший нескольких единиц милливольт по абсолютной величине. Инкорпорирование стеарата иттрия в их состав приводило к некоторому увеличению ζ-потенциала по абсолютной величине, однако эти изменения находились в пределах погрешности измерений (таблица 3.19).

Исследованные дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом при включении в состав стеарата иттрия сохраняли агрегативную и седиментационную устойчивость более 30 сут. Это подтверждено результатами анализа распределения отраженного монохроматического света по высоте дисперсий в течение указанного времени (рисунок 3.44). Его интенсивность оставалась практически постоянной и не изменялась по высоте столба дисперсии.



Таблица 3.19 – ζ-потенциалы липидных наночастиц со стеаратом иттрия

Рисунок 3.44 – Распределения интенсивности отраженного монохроматического света по высоте дисперсии липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б) и капель наноэмульсии с углеводородным маслом (в), с 0,25 мас.% стеарата иттрия Таким образом, показано, что дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом сохраняли устойчивость при инкорпорировании в них стеарата иттрия, при этом происходило уменьшение размеров и увеличение значения ζ-потенциала по модулю. Можно предположить, что стеарат иттрия, обладая поверхностной активностью, частично встраивался в адсорбционный слой ПАВ наряду со стеариновой кислотой, приводя к снижению размеров липидных наночастиц и увеличению ζ-потенциала по абсолютной величине.

## 3.5.1.2. Влияние радиационной обработки на устойчивость дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом

Внедрение радиоактивных элементов в липидные наночастицы с целью получения радиофармацевтических препаратов предполагает, что носители также подвергаются радиоактивному воздействию. Это может приводить к изменению молекулярной структуры и физико-химических свойств наночастиц, например, их дисперсности вследствие потери агрегативной устойчивости. Обычно при радиоэмболизации доза не превышает нескольких сотен Гр [333]. При радиационной стерилизации медицинских изделий минимальная доза составляет 3 кГр [334]. Чтобы оценить возможность стерилизации была проведена обработка дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом рентгеновским излучением и анализ их дисперсности. Исследование радиационной стойкости липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом проводили при дозе, несколько превышающей значения, характерные для стерилизации медицинских изделий, — 5 кГр. Радиационную обработку дисперсий проводили с помощью рентгеновской трубки в течение 28 мин с мощностью поглощенной дозы 3 Гр/с. Облучение образцов проводил старший преподаватель кафедры химии высоких энергии и радиоэкологии РХТУ им. Д.И. Менделеева Фенин А.А. Для

оценки устойчивости дисперсий анализировали молекулярную структуру липидных наночастиц с помощью ИК-спектроскопии и агрегативную устойчивость с использованием метода динамического светорассеяния.

В результате воздействия рентгеновского излучения с дозой 5 кГр не наблюдалось существенного изменения размеров липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом и капель наноэмульсии с углеводородным маслом. Размеры частиц до и после облучения представлены в таблице 3.20.

Таблица 3.20 – Размер липидных наночастиц до и после облучения с дозой 5 кГр

Массовое соотноше-	Средний диаметр наночастиц, нм		
ние стеариновой кис-			
лоты и углеводород-	До облучения	После облучения	
ного масла			
1:0	24±4	28±5	
1:1	36±4	32±5	
0:1	33±3	28±5	

После воздействия ионизирующего излучения в дисперсиях со стеариновой кислотой и углеводородным маслом сохранялся бимодальный характер распределения частиц по размерам (рисунок 3.45). Не наблюдалось существенного смещения, уширения или сужения пиков, что свидетельствует об агрегативной устойчивости систем к радиоактивному облучению.



Рисунок 3.45 – Распределения по размерам липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии с углеводородным маслом (в), до и после облучения с дозой 5 кГр

Для подтверждения сохранения молекулярной структуры компонентов липидных наночастиц в процессе облучения проводили исследование методом ИК-спектроскопии до и после воздействия ионизирующего излучения. На всех полученных спектрах присутствовали пики, соответствующие колебаниям функциональных групп компонентов дисперсий (рисунок 3.46).



Рисунок 3.46 – ИК-спектры липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), и капель наноэмульсии с углеводородным маслом (в), до и после облучения с дозой 5 кГр

На ИК-спектрах всех исследованных дисперсий наблюдались пики, относящиеся к валентным колебаниям -CH<sub>2</sub>-группы (1470, 2850, 2915 см<sup>-1</sup>) и -CH<sub>3</sub> (1370 см<sup>-1</sup>), которые присутствовали в углеводородном масле и стеариновой кислоте. Пики при 950 и 2850 см<sup>-1</sup> соответствовали колебаниям связей С-Н в алифатических соединениях. Пики при 1100 и 1150, 1350, 1635-1700 и 3440 см<sup>-1</sup> относились к гетероциклам фуранового ряда и функциональным группам -COC-, -C-O, -C=O, -OH, присутствующим в молекулах ПАВ. Широкий пик с максимумом при 3370 см<sup>-1</sup> соответствовал водной фазе. В дисперсиях липидных наночастиц со стеариновой кислотой присутствовал пик при 1700 см<sup>-1</sup>, который является характерным для нее и относится к асимметричным и симметричным валентным колебаниям группы -COO- (рисунок 3.46a, б).

Снижение доли стеариновой кислоты в составе дисперсной фазы приводило к усилению пиков при 2850-2925 см<sup>-1</sup> в связи с увеличением вклада групп -CH<sub>2</sub>, присутствующих в углеводородном масле (рисунок 3.46в).

Таким образом, выявлено, что при радиационной обработке дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом не происходило заметных изменений молекулярной структуры компонентов, что подтверждалось сохранением положения и интенсивности характерных пиков на ИК-спектрах. В результате облучения дисперсность частиц также оставалась практически неизменной.

#### 3.5.1.3. Влияние мощности поглощенной дозы на устойчивость наноэмульсий с углеводородным маслом

Как было показано ранее в разделе 3.5.1.2, при радиоактивном воздействии с мощностью дозы 5 кГр, не наблюдалось заметных изменений дисперсности и молекулярной структуры липидных наночастиц со стеариновой кислотой и углеводородным маслом. В связи с тем, что стерилизация таких дисперсий невозможна традиционными высокотемпературными методами, один из возможных методов обеспечения стерильности систем – радиационная стерилизация. Однако в соответствии с ГОСТ 11137-2-1011 при неизвестной биологической нагрузке в качестве стерилизующей дозы выбирают 15-25 кГр. Такая высокая доза может оказывать влияние на физико-химические характеристики дисперсий липидных наночастиц и в дальнейшем ограничивать возможности их применения в качестве носителей лекарственных веществ и приводить к изменению их свойств в процессе радиационной стерилизации.

Исследование влияния мощности поглощенной дозы на агрегативную и седиментационную устойчивость липидных наночастиц проводили на примере наноэмульсий с углеводородным маслом, стабилизированных 12,5 об.% смеси Span 60 и Tween 60. Для обработки дисперсий использовали рентгеновскую трубку с мощностью поглощенной дозы 3 Гр/с. Облучение проводили в течение 5,55 мин - 2,3 ч для достижения поглощенной дозы 1-25 кГр. Для оценки устойчивости дисперсий проводили анализ молекулярной структуры компонентов липидных наночастиц с помощью ИК-спектроскопии и изучали их агрегативную и седиментационную устойчивость методом динамического светорассеяния и путем анализа распределения отраженного монохроматического света по высоте дисперсий.

Облучение наноэмульсий с углеводородным маслом с поглощенной дозой 1-25 кГр не приводило к изменению их дисперсности. Распределения по размерам капель после радиационной обработки представлены на рисунках 3.47-3.48. Средний диаметр изменялся в пределах погрешности измерений и составлял 30±3 нм.

При облучении с поглощенной дозой 1-15 кГр наноэмульсии с углеводородным маслом сохраняли агрегативную устойчивость более 30 сут (рисунок 3.47). Средний диаметр частиц оставался неизменным, размер агрегатов – изменялся незначительно. При этом содержание последних не превышало 4 об.% на протяжении всего времени исследования.

Увеличение поглощенной дозы до 20-25 кГр не оказывало влияния на дисперсность наноэмульсий с углеводородным маслом сразу, однако после облучения наблюдалось незначительное снижение агрегативной устойчивости в процессе хранения (рисунок 3.48). Так, диаметр капель дисперсии, облученной с дозой 20 кГр, оставался неизменным (30±5 нм) на протяжении 21 сут. В дальнейшем наблюдалась агрегация до 48±7 нм (рисунок 3.48а). При этом размер агрегатов не изменялся и составлял 170±60 нм, а их содержание не превышало 5 об.%.



Рисунок 3.47 – Распределения по размерам капель наноэмульсии с углеводородным маслом с течением времени после облучения с дозой 1 (а), 3 (б), 5 (в), 10 (г) и 15 (д) кГр



Рисунок 3.48 – Распределения по размерам капель наноэмульсии с углеводородным маслом с течением времени после облучения с дозой 20 (а) и 25 (б) кГр

Дальнейшее увеличение поглощенной дозы до 25 кГр приводило к более интенсивной потере агрегативной устойчивости системы – укрупнение капель до 45±5 нм наблюдалось уже на 7 сут (рисунок 3.486). Спустя 30 сут их диаметр составлял 55±7 нм. Это сопровождалось постепенным увеличением размеров агрегатов от 120±20 до 250±70 нм. Стоит отметить, что в процессе хранения наблюдалось уширение распределения капель по размерам, вероятно, обусловленное локальным разогревом при воздействии больших доз облучения, при этом средний размер капель оставался практически постоянным.

Наноэмульсии с углеводородным маслом, необлученные и облученные дозой до 20 кГр, сохраняли седиментационную устойчивость более 30 сут. Это подтверждено анализом изменения интенсивности распределения отраженного монохроматического света по высоте столба дисперсий с течением времени. В образцах наноэмульсий наблюдались незначительные колебания, связанные с флуктуациями светорассеяния и не свидетельствующие о протекающих процессах обратной седиментации. Интенсивность отраженного света с течением времени оставалась практически неизменной. Пример распределения отраженного монохроматического света по высоте столба наноэмульсий с углеводородным маслом, облученных с дозой 10 кГр приведены на рисунке 3.49а.



Рисунок 3.49 – Распределения интенсивности отраженного монохроматического света по высоте наноэмульсии с углеводородным маслом после облучения с дозой 10 (а) и 25 (б) кГр

В наноэмульсии с углеводородным маслом, облученной с дозой 25 кГр протекала обратная седиментация, что подтверждалось наличием заметных перегибов на кривых распределения отраженного монохроматического света по высоте столба дисперсий с течением времени (рисунок 3.496). Потеря седиментационной устойчивости коррелировала с укрупнением капель наноэмульсии, рассмотренным ранее (рисунок 3.486).

Путем ИК-спектроскопии наноэмульсий с углеводородным маслом, облученных с дозой 5, 10 и 25 кГр, было подтверждено отсутствие изменений молекулярной структуры в результате воздействия рентгеновского излучения (рисунок 3.50). На спектрах не наблюдалось смещения, появления или исчезновения пиков, соответствующих функциональным группам компонентов. Это свидетельствует о том, что снижение агрегативной устойчивости происходило, вероятно, в результате локального разогрева в процессе облучения.

На всех полученных спектрах присутствовали пики, характерные присутствующим в углеводородном масле -CH<sub>2</sub>-группам (1470, 2850, 2915 см<sup>-1</sup>) и -CH<sub>3</sub> (1370 см<sup>-1</sup>). Колебаниям связей С-Н в алифатических соединениях соответствовали пики при 950 и 2850 см<sup>-1</sup>. Ряд пиков при 1100 и 1150, 1350, 1635 1700 и 3440 см<sup>-1</sup> подтверждали присутствие функциональных групп гетероциклов фуранового ряда, и -COC-, -C-O, -C=O, -OH, соответственно, присутствующих в молекулах ПАВ. Широкий пик с максимумом при 3370 см<sup>-1</sup> соответствовал водной фазе.



Рисунок 3.50 – ИК-спектры наноэмульсий с углеводородным маслом до и после облучения с дозой 5, 10 и 25 кГр

Таким образом, облучение наноэмульсии с углеводородным маслом с поглощенной дозой 1-25 кГр не оказывало влияния на их дисперсность, при этом радиационная обработка с дозой, превышающей 20 кГр, приводила снижению агрегативной устойчивости и незначительному укрупнению частиц в процессе хранения. В наноэмульсиях с углеводородным маслом не наблюдалось изменений молекулярной структуры в результате воздействия рентгеновского излучения. Наноэмульсии с углеводородным маслом продемонстрировали высокую устойчивость к облучению, что свидетельствовало о возможности их радиационной стерилизации дозами до 15 кГр и применения их в качестве носителей для радиофармацевтических препаратов. Однако применение бо́льших доз радиоактивного излучения также возможно, поскольку размер капель остается в пределах значений, необходимых для адресной доставки лекарственных веществ.

#### 3.5.1.4. Влияние мощности поглощенной дозы на эффективность стерилизации наноэмульсий с углеводородным маслом

Наиболее простой и распространенный метод стерилизации при повышенных температурах лекарственных форм на основе дисперсий липидных наночастиц невозможен вследствие их неустойчивости при повышенных температурах из-за плавления твердой оболочки ПАВ и компонентов дисперсной фазы. Радиационная стерилизация является широко применяемой альтернативой автоклавированию и нагреванию. Как показано в разделе 3.5.1.3, при радиационной обработке наноэмульсии с углеводородным маслом сохраняют свою дисперсность, что подтверждает возможность применения радиационной стерилизации для биологически активных и лекарственных препаратов на их основе.

В данном разделе проведена оценка эффективности радиационной стерилизации дисперсий липидных наночастиц на примере наноэмульсий с углеводородным маслом, стабилизированных 12,5 об.% смеси Span 60 и Tween 60. В исследуемые образцы вносили культуры грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных *Escherichia Coli* до концентрации  $4,6\cdot10^4$  и  $6,0\cdot10^4$  КОЕ/мл, соответственно, которые характерны для протекания инфекционных процессов в организме. Полученные системы облучали с помощью рентгеновской трубки с мощностью поглощенной дозы 3 Гр/с. Облучение проводили в течение 5,55 мин - 2,3 ч для достижения поглощенной дозы 1-25 кГр. Микробиологическую нагрузку анализировали микропланшетным методом путем измерения оптической плотности систем в течение 24 ч. Микробиологические исследования были осуществлены инженером кафедры био-

технологии РХТУ им. Д.И. Менделеева Ванюшенковой А.А. под руководством д.т.н., профессора Белова А.А. Данные представлены с учетом поправки на оптическую плотность незараженных наноэмульсий.

В контрольном образце, состоящем из бактерий *Staphylococcus aureus* в питательной среде, и во всех системах в течение первых 4 ч оптическая плотность изменялась незначительно (рисунок 3.51). Спустя 24 ч в образцах без облучения и облученных с дозой не более 10 кГр происходило существенное увеличение оптической плотности, свидетельствующее об увеличении концентрации микроорганизмов в системах. При этом наблюдался заметный рост популяции бактерий *Staphylococcus aureus* в присутствии наноэмульсии с углеводородным маслом по сравнению с питательной средой. В образцах, которые подвергались облучению дозой до 5 кГр, было зафиксировано увеличение концентрации культуры по сравнению с контрольным образцом через 24 ч (рисунок 3.51). При этом повышение поглощённой дозы от 0 до 5 кГр не оказало существенного влияния на активность микроорганизмов.

При дальнейшем увеличении поглощенной дозы до 10 кГр наблюдалось снижение оптической плотности наноэмульсии с углеводородным маслом спустя 24 ч по сравнению с системами, облученными с меньшей мощностью дозы, что свидетельствует о снижении скорости роста культуры *Staphylococcus aureus*. При этом оптическая плотность и, следовательно, концентрация микроорганизмов в наноэмульсии, облученной с мощностью дозы 10 кГр, соответствовала контрольному образцу в пределах погрешности (рисунок 3.51).

При облучении наноэмульсий углеводородным С маслом И Staphylococcus aureus с дозой 15-25 кГр, что соответствует наиболее часто применяемой радиационной стерилизации В при соответствии С ГОСТ 11137-2-1011, наблюдалось существенное снижение оптической плотности систем практически до нулевых значений (рисунок 3.51). Это свидетельствует об ингибировании бактериальной активности и эффективной радиационной стерилизации.



Рисунок 3.51 – Изменение оптической плотности наноэмульсии с углеводородным маслом и бактериями *Staphylococcus aureus* после облучения с дозой 0-25 кГр в течение 24 ч. В качестве контрольного образца использованы *Staphylococcus aureus* в питательной среде.

Оптическая плотность наноэмульсий с углеводородным маслом и грамотрицательной культурой *Escherichia Coli*, необлученных и облученных с различной мощностью дозы, практически не изменялась в течение первых 4 ч, аналогично системам с *Staphylococcus aureus*. Спустя 24 ч наблюдался интенсивный рост микробиологической массы при облучении с дозой до 3 кГр (рисунок 3.52). При этом оптическая плотность была близкой аналогичным значениям контрольного образца.

Увеличение поглощенной дозы до 5 кГр способствовало существенному (более, чем в 8 раз) снижению оптической плотности (рисунок 3.52), что соответствовало снижению концентрации микроорганизмов в системе и свидетельствовало об антибактериальном действии радиоактивного излучения на штамм *Escherichia Coli* в присутствии наноэмульсии с углеводородным мас-

лом. При дальнейшем увеличении поглощенной дозы до 10-25 кГр происходило уменьшение оптической плотности систем вплоть до нуля при 25 кГр (рисунок 3.52).



Рисунок 3.52 – Изменение оптической плотности наноэмульсии с углеводородным маслом и бактериями *Escherichia Coli* после облучения с дозой 0-25 кГр в течение 24 ч. В качестве контрольного образца использованы *Escherichia Coli* в питательной среде.

Таким образом, показана возможность проведения радиационной стерилизации дисперсий липидных наночастиц на примере наноэмульсии с углеводородным маслом. Высокая эффективность снижения микробиологической активности наблюдалась при облучении с дозой не менее 15 кГр по отношению к грамположительным бактериям *Staphylococcus aureus* и не менее 5 кГр по отношению к грамотрицательным бактериям *Escherichia Coli*. Стоит отметить, что при сравнительно малых дозах облучения, соответствующих активности коммерчески применимых радиофармацевтических препаратов (как правило не превышает 1 кГр), не наблюдалось подавляющего воздействия на рост микроорганизмов. Однако для исследования была выбрана очень большая концентрация культур, соответствующая концентрациям микроорганизмов при протекании инфекционных процессов в организме. Естественно, что при обычной стерилизации медицинских препаратов концентрация микроорганизмов существенно меньше. Поэтому можно предположить, что при инкорпорировании радиоактивного изотопа Y-90 в виде стеарата иттрия будет происходить пролонгированное поддержание стерильности при хранении медицинских препаратов, содержащих наноэмульсии, НЛЧ и ТЛН.

#### 3.5.2. Липидные наночастицы для повышения биодоступности биологически активных веществ

Инкорпорирование активных соединений в липидные наночастицы позволяет решать проблему низкой биодоступности липофильных лекарственных и биологически активных веществ. Инкапсулирование активных соединений в носители позволяет повысить эффективность проникновения в пораженные клетки и, следовательно, снизить необходимую концентрацию действующего вещества. Также это позволяет снизить токсическое воздействие лекарственных веществ на здоровые органы и ткани. При этом инкапсулированные активные вещества могут оказывать влияние на размер липидных наночастиц и их агрегативную устойчивость.

Оценку биологической активности дисперсий липидных наночастиц осуществляли методом ультразвуковой допплерографии на куриных эмбрионах. Для анализа использовали девятидневные куриные эмбрионы. С помощью ультразвукового датчика определяли скорость венозного кровотока в наиболее крупном сосуде на поверхности хориоаллантоисной оболочки. 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, а также оценки их токсического воздействия. Оценку раздражающего действия и влияния инкапсулирования биологических соединений на хориоаллантоисной оболочке куриных эмбрионов проводили на базе и при сотрудничестве с ПАО «Диод». Предварительно дисперсии разбавляли физиологическим раствором (0,15 M NaCl) в 100 раз – до концентрации дисперсной фазы 0,25 об.%.

Исследования на хориоаллантоисной оболочке куриных эмбрионов не считаются экспериментами 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.

### 3.5.2.1. Оценка раздражающего действия дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином

Для оценки раздражающего действия дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином предварительно определяли скорость венозного кровотока в наиболее крупном сосуде на поверхности хориоаллантоисной оболочки (нулевое измерение), затем наносили дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином и проводили аналогичные измерения через 10, 30 и 60 мин. Между измерениями яйцо помещали в термостат с температурой 37,8-38,0 °C [318].

При нанесении дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином, не нагруженных лекарственными и биологически активными веществами, и в отсутствии других раздражающих факторов скорость кровотока девятидневных куриных эмбрионов изменялась не более, чем на 4% (рисунок 3.53). Такие колебания являются допустимыми и связанны с жизнедеятельностью эмбриона.



Рисунок 3.53 – Изменение скорости венозного кровотока куриных эмбрионов после введения дисперсий липидных наночастиц, состоящих из стеариновой кислоты (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла в массовом соотношении 1:1 (б), углеводородного масла (в), углеводородного масла и парафина в массовом соотношении 1:1 (г), парафина (д) и стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (е)

Полученные результаты показывают, что исследованные системы не оказывают существенного влияния на интенсивность кровотока куриных эмбрионов и могут быть использованы в качестве носителей для повышения биодоступности лекарственных и биологически активных соединений.

Для оценки гипертензивного действия дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином были проведены исследования по восстановлению скорости кровотока куриных эмбрионов после моделирования гемической гипоксии. На хориоаллантоисную оболочку наносили раствор нитрита натрия (0,15 M), а через 5 мин – разбавленную дисперсию ненагруженных липидных наночастиц. Скорость кровотока определяли через 5, 25 и 55 мин после нанесения раствора нитрита натрия, т. е. через 10, 30 и 60 мин после начала эксперимента.

Нанесение раствора нитрита натрия как наиболее известного метгемаглобинообразователя приводило к формированию гипоксического состояния [293]. В результате этого наблюдалось резкое снижение скорости кровотока – в течение первых 5 мин после нанесения нитрита натрия скорость кровотока уменьшилась более чем на 11% и на 18% в последующие 5 мин (рисунок 3.54). Естественное восстановление скорости кровотока после моделирования гемической гипоксии происходило медленно и не достигало величин, близких к исходным, в течение 1 ч исследований (рисунок 3.54).

Уже в течение 5 мин после нанесения дисперсий липидных наночастиц наблюдалось снижение интенсивности изменения скорости кровотока до 11 15% (рисунок 3.54). При этом восстановление кровотока происходило быстрее и спустя 60 мин после начала исследования изменение его скорости достигало меньших значений (5-7%), чем при естественном восстановлении.

Изменение скорости кровотока после нанесения дисперсий липидных частиц разного состава практически не отличалось – разница не превышала пределы погрешностей. Однако стоит отметить, наиболее существенный эффект наблюдался при нанесении дисперсий липидных частиц, содержащих парафин и углеводородное масло. Более быстрое восстановление скорости кровотока связано с более быстрым выведением нитрита натрия из кровотока куриных эмбрионов в присутствии дисперсий липидных частиц и благоприятным влиянием углеводородных дисперсий на стенки сосудов за счет проникновения в слой эпителиальных клеток.



Рисунок 3.54 – Изменение скорости венозного кровотока куриных эмбрионов при моделировании гемической гипоксии без воздействия и после нанесения дисперсий липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином

Таким образом, дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином не оказывают раздражающего и гипотензивного действия на куриные эмбрионы, способствуют восстановлению после гемической гипоксии и могут быть использованы в качестве носителей для лекарственных и биологически активных соединений.

#### 3.5.2.2. Влияние инкапсулированных астаксантина и лютеина на дисперсность липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином

Инкапсулирование биологически активных веществ в липидные наночастицы способствует повышению их биодоступности и пролонгированию их действия. Однако они могут оказывать влияние на дисперсность и устойчивость дисперсий. В данном разделе рассмотрено влияние астаксантина и лютеина на средний размер липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином [318].

Астаксантин или лютеин предварительно растворяли в расплавленных компонентах дисперсной фазы из расчета 0,1 мас.% активного вещества в составе готовой дисперсии и получали их методом ТИФ. Концентрация дисперсной фазы составляла 25 об.%. Дисперсии стабилизировали 15 об.% смеси Span 60 и Tween 60 [318].

Инкапсулирование астаксантина или лютеина приводило к увеличению дисперсности во всех исследованных системах (таблица 3.21). Наиболее существенное уменьшение размеров наблюдалось у ТЛН со стеариновой кислотой при включении в их состав лютеина – практически в 2 раза с 27±4 до 15±2 нм. При инкорпорировании астаксантина в них наблюдалось менее интенсивное снижение диаметра частиц – до 17±2 нм. Вероятно, это связано с тем, что молекулы лютеина и астаксантина обладают амфифильными свойствами и частично встраивались в слой ПАВ на поверхности липидных наночастиц, благодаря чему происходило уменьшение их размеров [318].

В дисперсиях с парафином, а также со стеариновой кислотой и углеводородным маслом или парафином в массовом соотношении 1:1 в составе дисперсной фазы при включении астаксантина или лютеина также наблюдалось уменьшение размеров частиц. Размер липидных наночастиц с углеводородным маслом и парафином в массовом соотношении 1:1, а также капель наноэмульсии с углеводородным маслом оставался неизменным в пределах погрешности измерений.

Таблица 3.21 – Средний размер липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином без и с инкапсулированными астаксантином или лютеином

Массовое соотношение компонен-			Средний	Средний диаметр частиц	
тов дисперсной фазы			диаметр	с биологически актив-	
			частиц без	ным веществом, нм	
Стеарино-	Углеводо-	Парафин	биологи-	Астаксантин	Лютеин
вая кис-	родное		чески ак-		
лота	масло		тивных		
			веществ,		
			НМ		
1	0	0	27±4	17±2	15±2
1	1	0	33±3	24±3	17±2
0	1	0	30±4	30±3	28±3
1	0	1	39±5	32±3	31±4
0	0	1	68±6	60±9	57±7
0	1	1	28±4	31±4	29±3

Наиболее существенное снижение размеров частиц, в дисперсной фазе которых присутствовала стеариновая кислота, при инкапсулировании астаксантина или лютеина в них связано с тем, что молекулы биологически активных веществ (рисунки 3.55 и 3.56) обладают поверхностной активностью и, предположительно, частично встраиваются в адсорбционный слой наряду со стеариновой кислотой, способствуя образованию более мелких липидных наночастиц.



Рисунок 3.55 – Молекула астаксантина



Рисунок 3.56 – Молекула лютеина

Таким образом, показано, что инкапсулирование астаксантина и лютеина в липидные наночастицы со стеариновой кислотой, её комбинацией с парафином и углеводородным маслом и ТЛН с парафином способствует уменьшению их размеров. Причем наиболее существенное снижение диаметра наблюдается в присутствии лютеина. Размер капель наноэмульсии с углеводородным маслом при включении биологически активных соединений практически не изменялся [318].

### 3.5.2.3. Оценка биодоступности астаксантина и лютеина, инкапсулированных в липидные наночастицы со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином, при моделировании гемической гипоксии

Оценку влияния инкапсулирования биологически активных веществ в липидные наночастицы со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином проводили на примере астаксантина (рисунок 3.55) и лютеина [318] (рисунок 3.56). Они относятся к биологически активным соединениям класса каротиноидов, обладающих антиоксидантной, противовоспалительной и нейропротекторной активностью [335-338]. Они оказывают положительное влияние на остроту зрения и способствуют снижению утомляемости глаз. Поскольку основным источником астаксантина и лютеина является пища и лекарственные препараты для перорального введения, то для достижения сетчатки глаза необходимо преодоление физиологических барьеров организма. Увеличить биодоступность астаксантина и лютеина можно при их инкапсулировании в липидные наночастицы и последующем конъюнктивальном введении [318].

Помимо прочего астаксантин и лютеин оказывают положительное влияние на микроциркуляцию крови и улучшают ее реологические показатели. Это позволяет использовать для анализа их биодоступности упомянутый ранее метод, основанный на моделировании гемической гипоксии куриных эмбрионов и последующей ультразвуковой допплерографии [318].

Сразу после определения скорости венозного кровотока в наиболее крупном сосуде на хориоаллантоисную оболочку наносили 400 мкл 0,15 М раствора нитрита натрия. Исследуемые дисперсии липидных наночастиц, ненагруженные и нагруженные астаксантином и 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. Для сравнения использовали водно-спиртовые растворы астаксантина и лютеина (0,1 мас.% раствор биологически активного вещества в этиловом спирте, разбавленный в 100 раз физиологическим раствором) [318].

Как было показано ранее, при нанесении раствора нитрита натрия в первые 10 мин наблюдалось резкое снижение скорости венозного кровотока куриных эмбрионов (рисунок 3.54). Также в разделе 3.5.1.1 было выявлено, что

дисперсии липидных наночастиц положительно влияют на темпы восстановления скорости кровотока (рисунок 3.54).

При нанесении на хориоаллантоисную оболочку куриных эмбрионов водно-спиртового раствора астаксантина восстановление скорости кровотока наблюдалось уже через 5 мин – изменение скорости кровотока снижалось с 12 до 10% (рисунок 3.57). Спустя 60 мин изменение скорости кровотока составляло 6% от характерной для нормальной жизнедеятельности куриного эмбриона.

Инкапсулирование астаксантина в липидные наночастицы со стеариновой кислотой (рисунок 3.57а) и стеариновой кислотой и углеводородным маслом (рисунок 3.57б) не оказывало существенного влияния на биодоступность биологически активного соединения – влияние на скорость кровотока находилось в пределах погрешности измерения по сравнению с водно-спиртовым раствором астаксантина.

Инкапсулирование в липидные наночастицы, содержащие парафин, (рисунок 3.57г-е) повышало биодоступность астаксантина. Наблюдалось более интенсивное восстановление скорости кровотока по сравнению с куриными эмбрионами, находившимися под воздействием водно-спиртового раствора астаксантина. При этом дисперсии липидных наночастиц с парафином и биологически активным веществом способствовали практически полному восстановлению в течение времени исследования [318] (рисунок 3.57д).

Исследование влияния инкапсулирования в липидные наночастицы со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином на биодоступность лютеина было проведено аналогично. Результаты исследования представлены на рисунке 3.58.

Водно-спиртовой раствор лютеина оказывал менее существенное восстанавливающее действие на скорость кровотока по сравнению с астаксантином – спустя 5 и 10 мин изменение показателей ультразвуковой допплерографии оставались неизменными (рисунок 3.58), что свидетельствовало о купировании гипоксии, наблюдаемой в результате действия нитрита натрия.



Рисунок 3.57 – Изменение скорости венозного кровотока куриных эмбрионов после введения дисперсий липидных наночастиц (ЛНЧ), состоящих из стеариновой кислоты (СтК) (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла (УВМ) в массовом соотношении 1:1 (б), углеводородного масла (в), углеводородного масла и парафина (Пар) в массовом соотношении 1:1 (г), парафина (д) и стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (е) с инкапсулированным астаксантином при моделировании гемической гипоксии



Рисунок 3.58 – Изменение скорости венозного кровотока куриных эмбрионов после введения дисперсий липидных наночастиц (ЛНЧ), состоящих из стеариновой кислоты (СтК) (а), стеариновой кислоты и углеводородного масла (УВМ) в массовом соотношении 1:1 (б), углеводородного масла (в), углеводородного масла и парафина (Пар) в массовом соотношении 1:1 (г), парафина (д) и стеариновой кислоты и парафина в массовом соотношении 1:1 (е) с инкапсулированным лютеином при моделировании гемической гипоксии

Как при воздействии лютеина, инкапсулированного во все исследованные дисперсные системы, так и при нанесении его водно-спиртового раствора на хориоаллантоисную оболочку наблюдалась высокая эффективность восстановления скорости кровотока – спустя 60 мин после начала эксперимента изменение скорости кровотока не превышало 3% от характерных для нормальной жизнедеятельности куриного эмбриона значений. Как и в случае с астаксантином, инкапсулирование лютеина в липидные наночастицы со стеариновой кислотой, а также со стеариновой кислотой и углеводородным маслом не приводило к заметному изменению биологической доступности активного соединения (рисунок 3.58а-б).

Наиболее эффективное увеличение биодоступности лютеина наблюдалось также при инкапсулировании его в капли наноэмульсии с углеводородным маслом. Уже спустя 5 мин после нанесения дисперсии с лютеином наблюдалось снижение изменения скорости кровотока с 12,0 до 2,5% (рисунок 3.58в), а практически полное восстановление происходило менее, чем через 30 мин после начала эксперимента.

Инкапсулирование лютеина в липидные наночастицы, содержащие парафин, способствовало интенсификации процесса восстановления в первые 5 мин после нанесения дисперсии. Дальнейший процесс восстановления скорости кровотока протекал с такой же скоростью, что и при нанесении водно-спиртового раствора лютеина (рисунок 3.58г-е).

Помимо изменения скорости кровотока в результате воздействия раствора нитрита натрия, дисперсий ненагруженных и нагруженных астаксантином и лютеином липидных наночастиц в отдельных случаях наблюдалось изменение внешнего вида сосудов, расположенных на хориоаллантоисной оболочке. Несмотря на постепенное восстановление скорости кровотока после моделирования гемической гипоксии в отсутствие воздействия липидных наночастиц происходило локальное сужение сосудов (рисунок 3.59).


Рисунок 3.59 – Девятидневные куриные эмбрионы до начала эксперимента (а), через 5 (б), 30 (в) и 60 (г) мин после нанесения нитрита натрия

Нанесение дисперсий ненагруженных липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином не только ускоряло восстановление, как было показано ранее, но и оказывало положительное действие на кровеносные сосуды – в процессе восстановления после гемической гипоксии не наблюдалось их значительного сужения. На рисунке 3.60 приведены фотографии девятидневных куриных эмбрионов до и после нанесения нитрита натрия, а также после нанесения наноэмульсии с углеводородным маслом через различные временные промежутки.



Рисунок 3.60 – Девятидневные куриные эмбрионы до начала эксперимента (а), через 5 мин после нанесения нитрита натрия (б), через 25 (в) и 55 мин (г) после введения ненагруженной наноэмульсии с углеводородным маслом 30 и 60 мин, соответственно, после начала эксперимента

В результате воздействия дисперсий нагруженных липидных наночастиц также не наблюдалось сужения сосудов (рисунок 3.61), что свидетельствовало об их восстанавливающем действии.



Рисунок 3.61 – Девятидневные куриные эмбрионы до начала эксперимента (а), через 5 мин после введения нитрита натрия (б), через 20 (в) и 50 мин (г) после введения наноэмульсии с углеводородным маслом, нагруженной люте-

#### ином

Таким образом, было показано, что инкапсулирование биологически активных соединений в дисперсии липидных наночастиц со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином повышало их биодоступность и ускоряло восстановление скорости кровотока девятидневных куриных эмбрионов при моделировании гемической гипоксии. Наибольшая эффективность наблюдалась при применении наноэмульсии с углеводородным маслом. Практически сразу после нанесения липидных наночастиц снижение скорости кровотока прекращалось и через 5-10 мин наблюдалась тенденция к его восстановлению. Это показывает перспективность использования липидных наночастиц для доставки липофильных лекарственных соединений.

# 3.5.2.4. Применение наноэмульсий с углеводородным маслом для повышения биодоступности куркумина и наночастиц диоксида церия

Некоторые перспективные соединения для биомедицинского применения имеют низкую растворимость в воде, что может ограничивать их использование. Одним из таких соединений является куркумин, обладающий противовоспалительными, антиоксидантными, антимикробными, ранозаживляющими и противораковыми свойствами. Однако при определенных условиях он может проявлять цитотоксичность к здоровым клеткам, вызывая окислительный стресс. Сочетание куркумина с наночастицами оксида церия позволяет снизить его токсичность к здоровым клеткам благодаря инактивации активных форм кислорода, сохраняя при этом эффективность против раковых клеток. Кроме этого, наночастицы CeO<sub>2</sub> проявляют антибактериальные, радиопротекторные, регенеративные и ранозаживляющие свойства. Применение капель наноэмульсии в качестве носителей куркумина и наночастиц CeO<sub>2</sub> способствует повышению их биодоступности и особенно актуально для создания трансдермальных и пероральных биологически активных систем [303].

В качестве носителей были исследованы наноэмульсии с углеводородным маслом, стабилизированные 12,5 об.% смеси Span 60 и Tween 60. Куркумин предварительно растворяли в углеводородном масле и получали эмульсию методом ТИФ. Концентрация куркумина в наноэмульсии составляла 4 мас.% [303].

Получение наночастиц CeO<sub>2</sub> и исследования *in vitro* и *in vivo* были проведены младшими научными сотрудниками Аникиной В.А. и Замятиной Е.А. и заведующим лабораторией, ведущим научным сотрудником, кандидатом биологических наук Поповой Н.Р., ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук» (г. Пущино; ИТЭБ РАН) [339]. Размер наночастиц CeO<sub>2</sub> составлял 5±1 нм. Для получения эмульсий Пикеринга с наночастицами CeO<sub>2</sub> золь приливали к готовой наноэмульсии при интенсивном перемешивании 1000 об/мин.

Определение активности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ в живых клетках проводили с использованием МТТ-теста, основанного на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромида). Для анализа использовали мышиные эмбриональные фибробласты. Калориметрические исследования проводили с помощью Multiscan MS (Thermo Labsystems) при 570 нм. Оценку жизнеспособности клеток, культивируемых в присутствии наноэмульсии, проводили с помощью микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200.

Исследование токсичности наноэмульсий с углеводородным маслом, куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> проводили на беспородных белых мышах

внутрибрюшинной однократной инъекцией с исследуемых систем (0,3 мл/мышь). Наноэмульсии предварительно разбавляли в 10 раз физиологическим раствором (0,15 M NaCl). Для проведения контрольных экспериментов животным внутрибрюшинно вводили только стерильный физиологический раствор. Токсичность систем изучали на мышах с использованием теста на 14-суточную выживаемость. Все процедуры с мышами проводились с учетом международных правил работы с лабораторными животными и требований Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН (№ 25/2021) от 09.02.2021 г.). Содержание животных осуществлялось в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза о защите животных.

Размер капель наноэмульсии с куркумином составлял 58±5 нм (рисунок 3.62). Куркумин имеет липофильную природу, однако его молекула содержит полярные группы, которые придают ей амфифильные свойства. Предположительно, куркумин располагался вблизи поверхности капель и частично был встроен в слой ПАВ.



Рисунок 3.62 – Распределения по размерам капель наноэмульсии с углеводородным маслом, куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub>

Размер капель наноэмульсии без куркумина, модифицированных наночастицами CeO<sub>2</sub>, составлял 63±5 нм. Комбинирование инкапсулированного в капли наноэмульсии куркумина и наночастиц CeO<sub>2</sub> приводило к увеличению диаметра до  $78\pm5$  нм, а распределение по размерам становилось более широким. Это свидетельствовало о том, что наночастицы CeO<sub>2</sub> адсорбировались на поверхности капель с образованием внешней оболочки, как в эмульсиях Пикеринга [340], которая была более плотной в присутствии куркумина, о чем свидетельствовало увеличение размеров капель (рисунок 3.51).

Как было показано ранее, поскольку капли наноэмульсии были стабилизированы неионогенными ПАВ, их ζ-потенциал был низким и не превышал нескольких милливольт. В присутствии куркумина, обладающего амфифильными свойствами, ζ-потенциал капель несколько увеличивался по абсолютной величине (таблица 3.22).

Таблица 3.22 – ζ-потенциал капель наноэмульсий с углеводородным маслом, куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub>

Образец	ζ-потенциал, мВ
Капли наноэмульсии	-(1,3±0,8)
Капли наноэмульсии с куркумином	-(7±1)
Золь наночастиц СеО <sub>2</sub>	-(57±4)
Капли наноэмульсии с наночастицами CeO <sub>2</sub>	-(16±2)
Капли наноэмульсии с куркумином и наноча- стицами CeO <sub>2</sub>	-(38±3)

Наночастицы CeO<sub>2</sub> обладали существенным отрицательных зарядом, их  $\zeta$ -потенциал составлял -(57±4) мВ. Модифицирование ими капель наноэмульсии приводило к увеличению величины зарядов поверхности капель по абсолютной величине (таблица 3.22). Однако заряд модифицированных капель был ниже, чем заряд отдельных наночастиц CeO<sub>2</sub>, что связано с экранированием зарядов наночастиц в адсорбционном слое на поверхности капель наноэмульсии.

На основе уравнений для расчета энергии притяжения и отталкивания, представленных в [341], были получены потенциальные кривые парного взаимодействия капель наноэмульсии с углеводородным маслом и наночастиц

CeO<sub>2</sub> (рисунок 3.63). Несмотря на высокое значение ζ-потенциала наночастиц CeO<sub>2</sub>, значение потенциального барьера в их суспензии было довольно низким (менее 4 кT).

В случае взаимодействия капель наноэмульсии и наночастиц CeO<sub>2</sub> потенциальный барьер отсутствовал. Эти результаты указывают на то, что наночастицы CeO<sub>2</sub> могут адсорбироваться на поверхности капель с образованием оболочки, формируя эмульсии Пикеринга.



Рисунок 3.63 – Потенциальные кривые парного взаимодействия капель наноэмульсии с углеводородным маслом и наночастиц CeO<sub>2</sub>

Анализ цитотоксичности наноэмульсий с углеводородным маслом, куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> проводили на мышиных эмбриональных фибробластах с помощью MTT-теста. Для исследования воздействия на клетки наноэмульсии разбавляли до концентрации 0,0001% и 1% и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч. При концентрации 0,0001% значительных отличий от контрольной группы не наблюдалось (рисунок 3.64). Метаболическая активность мышиных эмбриональных фибробластов при инкубации в течение 24-72 ч в присутствии 1% наноэмульсий с углеводородным маслом без и с куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> снизилась на 40-90% по сравнению с контрольной группой (рисунок 3.64).



Рисунок 3.64 – Метаболическая активность, оцененная с помощью МТТ-теста, мышиных эмбриональных фибробластов в присутствии наноэмульсии

(НЭ) с углеводородным маслом, куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> (0,0001%, 1%) после 24, 48 и 72 ч инкубации. Линия контрольной группы соответствует клеткам, которые не подвергались обработке. Значимые различия оценивались с использованием t-критерия Уэлча при 0,01<p<0,05 (\*),

0,001<p<0,01 (\*\*).

В группе с наноэмульсией с наночастицами CeO<sub>2</sub> метаболическая активность мышиных эмбриональных фибробластов увеличилась на 30% относительно контроля через 72 ч, что может быть связано с присутствием наночастиц CeO<sub>2</sub> в данной системе. В группе с наноэмульсией с куркумином через 72 ч наблюдалось снижение метаболической активности на 15% по сравнению с контролем.

Результаты анализа жизнеспособности клеток методом флуоресцентного окрашивания показали, что наноэмульсии с углеводородным маслом без и с куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> в диапазоне концентраций от 0,0001% до 1% не оказывали цитотоксического действия на мышиные эмбриональные фибробласты при инкубации в течение 24, 48 и 72 ч (рисунок 3.65), LD<sub>50</sub> для данного типа клеток не были обнаружены. Стоит отметить, что инкубация клеток с наноэмульсиями с концентрацией 1% приводила к незначительному снижению дегидрогеназной активности клеток, что, однако, не приводило к существенному увеличению их гибели по сравнению с контролем.

Токсическое воздействие наноэмульсии с углеводородным маслом без и с куркумином и наночастицами  $CeO_2$  *in vivo* оценивали по общему состоянию животных и их выживаемости. Наблюдение и подсчет выживших и погибших особей проводили в течение 14 сут после внутрибрюшинной инъекции дисперсий. На протяжении всего периода наблюдения их состояние оставалось нормальным. За 14 сут не было обнаружено значительных отклонений в двигательной активности, координации движений, состоянии кожи, шерсти и окраске видимых слизистых оболочек, а также в потреблении воды и пищи и изменениях массы тела.

После однократного внутрибрюшинного введения наноэмульсий с углеводородным маслом без и с куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> (860 мг/кг) в группах подопытных животных гибели животных не наблюдалось в течение 14 сут (таблица 3.23). Соотношение погибших и выживших особей (LD<sub>50</sub>) определить не удалось. Выбранная доза не являлась токсичной для мышей при однократном внутрибрюшинном введении.



Рисунок 3.65 – Отношение количества мёртвых клеток к их общему числу (Live/Dead-тест) для мышиных эмбриональных фибробластов после 24, 48, 72 ч инкубации в присутствии наноэмульсии (НЭ) с углеводородным маслом, куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> (0,0001%, 1%). Линия контрольной группы соответствует клеткам, которые не подвергались обработке.

Таблица 3.23 – Данные, характеризующие токсичность наноэмульсий с углеводородным маслом, куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> *in vivo* 

		Колич	ество жи	вотных,		
Образец	Доза,	ШТ.			Леталь-	I D.
	мг/кг	Общее	Погиб-	Выжив-	ность, %	$LD_{50}$
			ших	ших		
Контроль	0	12	0	12	0	Не опреде-
	Ū	12		12	Ū	лена
Наноэмульсия	860	12	0	12	0	Не опреде-
	000	12		12	Ū	лена
Наноэмульсия с наночасти- цами CeO <sub>2</sub>	860	12	0	12	0	Не опреде- лена
Наноэмульсия	860	12	0	12	0	Не опреде-
с куркумином	000		Ŭ		Ŭ	лена
Наноэмульсия с куркумином и наночастицами CeO <sub>2</sub>	860	12	0	12	0	Не опреде- лена

Таким образом, показана возможность использования наноэмульсий с углеводородным маслом как носителей органических липофильных биологически активных соединений на примере куркумина и неорганических – на примере наночастиц CeO<sub>2</sub>. Отсутствие потенциального барьера при взаимодействии капель наноэмульсии и наночастиц CeO<sub>2</sub> способствует формированию структур типа эмульсий Пикеринга и приданию наноэмульсии антиоксидантных свойств. Наноэмульсии с углеводородным маслом без и с куркумином и наночастицами CeO<sub>2</sub> не проявляли токсичности по отношению к мышиным эмбриональным фибробластам (*in vitro*) и при однократном внутрибрюшинном введении мышам (*in vivo*).

## Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность:

• кандидату физико-математических наук, ведущему научному сотруднику кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Багрову Д.В. и младшему научному сотруднику Внуковой А.А. за проведение исследований методом ПЭМ;

• старшему преподавателю кафедры химии высоких энергий и радиоэкологии РХТУ им. Д.И. Менделеева Фенину А.А. за обработку дисперсий липидных наночастиц ионизирующим излучением;

• инженеру кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева Ванюшенковой А.А. и доктору технических наук, профессору Белову А.А. за проведение микробиологических исследований;

• генеральному директору ПАО «Диод» Тихонову В.П. и начальнику лаборатории Белянкиной Е.Ю. за проведение совместных исследований раздражающего и гипер- / гипотензивного действия дисперсий липидных наночастиц методом ультразвуковой допплерографии;

• младшим научным сотрудникам ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук» (г. Пущино) Аникиной В.А. и Замятиной Е.А. и кандидату биологических наук, заведующему лабораторией, ведущему научному сотруднику Поповой Н.Р. за проведение совместных исследований применения наноэмульсий для повышения биодоступности куркумина и наночастиц СеО<sub>2</sub> и проведение исследований *in vitro* и *in vivo*;

• ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева.

## Заключение

1. Определены температурные диапазоны инверсии фаз в системах с липидными наночастицами из стеариновой кислоты, парафина и углеводородного масла, стабилизированными Tween 60 и Span 60, установлены условия получения их дисперсий методом ТИФ.

2. Показано, что инкорпорирование углеводородного масла или парафина в состав липидных наночастиц со стеариновой кислотой, стабилизированных Span 60 и Tween 60 и, приводит к их незначительному укрупнению, в то время как включение углеводородного масла в состав липидных наночастиц с парафином, напротив, способствует уменьшению их размеров. Полученные дисперсии липидных наночастиц сохраняют агрегативную и седиментационную устойчивость более 30 сут.

3. На основании данных термического анализа и ПЭМ предложено строение липидных наночастиц, при котором слабополярная стеариновая кислота с разупорядоченной кристаллической структурой концентрируется вблизи адсорбционного слоя ПАВ вокруг неполярного ядра. При комбинировании неполярных липидов происходит сегрегация на фазу, обогащенную парафином, вблизи поверхности липидных наночастиц и фазу с повышенной концентрацией углеводородного масла.

4. Определены условия лиофилизации и последующего хранения липидных наночастиц. Липидные наночастицы с углеводородным маслом и парафином рекомендуется хранить при -25 °C, срок хранения – более 6 мес., наночастицы со стеариновой кислотой, а также со стеариновой кислотой и углеводородным маслом – более 4 мес. при 20 °C, но не более 2 мес. при - 25 °C. Наночастицы с парафином, а также с парафином и стеариновой кислотой гой лиофилизировать не рекомендуется из-за их агрегации при последующем редиспергировании.

5. Выявлено, что липидные наночастицы со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином обладают высокой устойчивостью при

воздействии ионизирующего излучения. Увеличение поглощенной дозы до 25 кГр не приводит к изменению молекулярной структуры, при этом наблюдается лишь незначительное укрупнение липидных наночастиц.

6. Продемонстрирована возможность стерилизации ионизирующим излучением липидных наночастиц на примере наноэмульсий с углеводородным маслом. Высокая эффективность снижения микробиологической активности наблюдается при облучении с дозой не менее 15 кГр по отношению к грамположительным бактериям *Staphylococcus aureus* и не менее 5 кГр по отношению к грамотрицательным бактериям *Escherichia Coli*.

7. Показано, что инкорпорирование астаксантина и лютеина в липидные наночастицы со стеариновой кислотой, углеводородным маслом и парафином способствует повышению биодоступности и ускоряет восстановление скорости кровотока девятидневных куриных эмбрионов при моделировании гемической гипоксии. Наибольшая эффективность наблюдается при применении наноэмульсии с углеводородным маслом.

## Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективным является дальнейшее исследование структуры липидных наночастиц, состоящих из липидов различного химического строения, изучение агрегации при редиспергировании лиофилизованных липидных наночастиц, а также разработка способов её предотвращения. Представляет интерес применение липидных наночастиц в качестве носителей широкого спектра лекарственных и биологически активных соединений, а также исследование их на различных биологических объектах.

К технологическим перспективам дальнейшей разработки темы можно отнести разработку радиофармацевтических препаратов на основе полученных липидных наночастиц для противоопухолевой терапии и тераностики, а также фармацевтических препаратов для адресной доставки лекарственных и биологически активных соединений.

# Список литературы

1. Viegas C. Solid lipid nanoparticles vs. nanostructured lipid carriers: a comparative review / C. Viegas, A.B. Patrício, J.M. Prata, A. Nadhman, P.K. Chintamaneni, P. Fonte // Pharmaceutics. – 2023. – V. 15. – Is. 6. – No. 1593.

Solans C. Nano-emulsions / C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar,
 M.J. Garcia-Celma // Current opinion in colloid & interface science. – 2005. – V.
 10. – Is. 3-4. – P. 102-110.

3. Lucks J.S. Solid lipid nanoparticles (SLN)-an alternative parenteral drug carrier system / J.S. Lucks, R.H. Müller, B. Konig // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 1992. – V. 38. – Is. 33. – P. 149.

4. Siekmann B. Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipid / B. Siekmann, K. Westesen // Pharm. Pharmacol. Lett. – 1992. – V. 1. – P. 123– 126.

5. Patent No. US8663692B1 United States, PCT/EP2000/004112, Int. Cl. A6 IK 9/14 (2006.01), A6 IK 9/16 (2006.01), A6 IK 8/02 (2006.01). Lipid particles on the basis of mixtures of liquid and solid lipids and the method for producing same: Pub. Date: 16.11.2000 / Müller R.H., Jenning V., Mäder K., Lippacher A. – 35 pp.

6. Alatawi H.M. Nanostructured lipid carriers (NLCs) as effective drug delivery systems: methods of preparation and their therapeutic applications / H.M. Alatawi, S.S. Alhwiti, K.A. Alsharif, S.S. Albalawi, S.M. Abusaleh, G.K. Sror, M. Qushawy // Recent Patents on Nanotechnology. – 2024. – V. 18. – Is. 2. – P. 179-189.

7. Elmowafy M. Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies / M. Elmowafy, M.M. Al-Sanea // Saudi Pharm. J. – 2021. – V. 29. – Is. 9. – P. 999-1012.

8. Blanco E. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery / E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari // Nature biotechnology. – 2015. – V. 33. – Is. 9. – P. 941-951.

9. Shinoda K. The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT-method / K. Shinoda, H. Saito // J. Colloid Interface Sci. – 1969. – V. 30. – Is. 2. – P. 258-263.

10. Shinoda K. Principles of attaining ultra-low interfacial tension: the role of hydrophile-lipophile-balance of surfactant at oil/water interface / K. Shinoda,
M. Hanrin, H. Kunieda, H. Saito // Colloid Surf. – 1981. – V. 2. – Is. 4. – P. 301-314.

11. Izquierdo P. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method / P. Izquierdo, J. Esquena, T. F.Tadros, C. Dederen, M. J. Garcia, N. Azemar, C. Solans // Langmuir. – 2002. – V. 18. – Is. 1. – P. 26-30.

12. Komaiko J.S. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods / J.S. Komaiko, D.J. McClements // Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety. – 2016. – V. 15. – Is. 2. – P. 331-352.

Qushawy M. Solid lipid nanoparticles (SLNs) as nano drug delivery carriers: Preparation, characterization and application / M. Qushawy, A.L.I. Nasr // Int.
 J. Appl. Pharm. – 2020. – V. 12. – Is. 1. – P. 1-9.

14. Zhong Q. Nanoparticles fabricated from bulk solid lipids: Preparation, properties, and potential food applications / Q. Zhong, L. Zhang // Adv. Colloid Interface Sci. – 2019. – V. 273. – No. 102033.

15. Gordillo-Galeano A. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release / A. Gordillo-Galeano, C.E. Mora-Huertas // European J. Pharm. Biopharm. – 2018. – V. 133. – P. 285-308.

16. Zafeiri I. O/W emulsions stabilised by solid lipid particles: Understanding how the particles' Pickering functionality can be retained post their dehydration and sub-sequent rehydration / I. Zafeiri, P. Smith, I.T. Norton, F. Spyropoulos // Colloid Surf., A. -2020. -V. 599. -No. 124916.

17. Youshia J. Gamma sterilization and in vivo evaluation of cationic nanostructured lipid carriers as potential ocular delivery systems for antiglaucoma

drugs / A.O. Kamel, A. El Shamy, S. Mansour // European J. Pharm. Sci. – 2021. – V. 163. – No. 105887.

 Mateos-Maroto. A. Polyelectrolyte multilayered capsules as biomedical tools / A. Mateos-Maroto, L. Fernández-Peña, I. Abelenda-Núñez, F. Ortega, R.G. Rubio, E. Guzmán // Polymers. – 2022. – V. 14. – Is. 3. – No. 479.

19. Han H. Polymer-and lipid-based nanocarriers for ocular drug delivery: current status and future perspectives / H. Han, S. Li, M. Xu, Y. Zhong, W. Fan, J. Xu, T. Zhou, J. Ji, J. Ye, K. Yao // Adv. Drug Delivery Rev. – 2023. – V. 196. – No. 114770.

20. Guimarães D. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications / D. Guimarães, A. Cavaco-Paulo, E. Nogueira // Int. J. Pharm. – 2021.
– V. 601. – No. 120571.

21. Hao Y. Lipid-based nanoparticles as drug delivery systems for cancer immunotherapy / Y. Hao, Z. Ji, H. Zhou, D. Wu, Z. Gu, D. Wang, P. Ten Dijke // MedComm. – 2023. – V. 4. – Is. 4. – No. e339.

22. Gupta A. Nanoemulsions: formation, properties and applications / A. Gupta, H.B. Eral, T.A. Hatton, P.S. Doyle // Soft. Mat. – 2016. – V. 12. – Is 11. – P. 2826-2841.

23. McClements D.J. General aspects of nanoemulsions and their formulation
/ D.J. McClements, S.M. Jafari // Nanoemulsions. – Academic press, 2018. –
P. 3-20.

24. Koroleva M.Yu. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications / M.Yu. Koroleva, E.V. Yurtov // Chem. Rev. – 2012. – V. 81. – P. 21-43.

25. de Oca-Ávalos J.M.M. Nanoemulsions: stability and physical properties /
J.M.M. de Oca-Ávalos, R.J. Candal, M.L. Herrera // Curr. Opin. Food Sci. – 2017.
– V. 16. – P. 1-6.

26. Tadros T. Formation and stability of nano-emulsions / T. Tadros,
P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans // Adv. Colloid Interface Sci. – 2004. – V. 108.
– P. 303-318.

27. Koroleva M.Y., Yurtov E.V. Ostwald ripening in macro- and nanoemulsions // Russian Chem. Rev. – 2021. – V. 90. – Is. 3. – No. 293.

28. Gharsallaoui A. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview / A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, R. Saurel // Food Res. Int. – 2007. – V. 40. – Is. 9. – P. 1107-1121.

29. Kong I. Polysaccharide-based edible films incorporated with essential oil nanoemulsions: physico-chemical, mechanical properties and its application in food preservation – a review / I. Kong, P. Degraeve, L.P. Pui // Foods. – 2022. – V. 11. – Is. 4. – No. 555.

30. Wang M. Improving the stability of oil-in-water nanoemulsions with corn fiber gum / M. Wang, X. Fei, L. Jiang // Colloid Surf., A. – 2015. – V. 482. – P. 217-225.

31. Mushtaq A. Recent insights into nanoemulsions: their preparation, properties and applications / A. Mushtaq, S.M. Wani, A.R. Malik, A. Gull, S. Ramniwas, G.A. Nayik, S. Ercisli, R.A. Marc, R. Ullah, A. Bari // Food Chemistry: X. – 2023. – V. 18. – No. 100684.

32. Majeed H. Influence of carrier oil type, particle size on in vitro lipid digestion and eugenol release in emulsion and nanoemulsions / H. Majeed, J. Antoniou, J. Hategekimana, H.R. Sharif, J. Haider, F. Liu, B. Ali, L. Rong, J. Ma, F. Zhong // Food Hydrocolloids. – 2016. – V. 52. – P. 415-422.

33. Lee S.J. Effects of oil type on the stability of oil-in-water lipid nanoemulsion / S.J. Lee, S.R. Han, J.H. Jeong, J.D. Kim // J. Korean Appl. Sci. Technol. – 2016. – V. 33. – Is. 4. – P. 667-675.

34. Bibi M. Cilostazol-loaded solid lipid nanoparticles: Bioavailability and safety evaluation in an animal model / M. Bibi, F. ud Din, Y. Anwar, N.A. Alkenani, A.T. Zari, M. Mukhtiar, I.M.A. Zeid, E.H. Althubaiti, H. Nazish, A. Zeb, I. Ullah, G.M. Khan, H.G. Choi // J. Drug Delivery Sci. Technol. – 2022. – V. 74. – No. 103581.

35. Dobreva M. Natural lipids as structural components of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for topical delivery / M. Dobreva, S. Stefanov, V. Andonova // Curr. Pharm. Design. – 2020. – V. 26. – Is. 36. – P. 4524-4535.

36. Shirodkar R.K. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: emerging lipid based drug delivery systems / R.K. Shirodkar, L. Kumar, S. Mutalik, S. Lewis // Pharm. Chem. J. – 2019. – V. 53. – P. 440-453.

37. Haider M. Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics:
A review / M. Haider, S.M. Abdin, L. Kamal, G. Orive // Pharmaceutics. – 2020. –
V. 12. – Is. 3. – No. 288.

38. McClements D.J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity / D.J. McClements, J. Rao // Critical Rev. Food Sci. Nutrition. – 2011. – V. 51. – Is. 4. – P. 285-330.

39. Kumar M. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: a review / M. Kumar, R.S. Bishnoi, A.K. Shukla, C.P. Jain // Preventive Nutrition Food Sci. – 2019. – V. 24. – Is. 3. – No. 225.

40. Hidajat M.J. Effective droplet size reduction and excellent stability of limonene nanoemulsion formed by high-pressure homogenizer / M.J. Hidajat, W. Jo, H. Kim, J. Noh // Colloid Interfaces. – 2020. – V. 4. – Is. 1. – No. 5.

41. Singh S. A review on pharmacological action, techniques and stability study of solid lipid nanoparticles / S. Singh, V.K. Verma, N.A. Singh // J. Survey Fisheries Sci. – 2023. – V. 10. – Is. 1. – P. 3432-3441.

42. Yadav V. Solid lipid nanoparticles (SLN): formulation by high pressure homogenization / V. Yadav, S. AlokMahor, S. Alok, A. AmitaVerma, N. Kumar, S. Kumar // World J. Pharm. Pharm. Sci. – 2014. – V. 3. – Is. 11. – P. 1200-1213.

43. Yadav K.S. High pressure homogenizer in pharmaceuticals: understanding its critical processing parameters and applications / K.S. Yadav, K. Kale // J. Pharm. Innovation. – 2020. – V. 15. – P. 690-701. 44. Yuan Y. Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions / Y. Yuan, Y. Gao, J. Zhao, L. Mao // Food Res. Int. – 2008. – V. 41. – Is. 1. – P. 61-68.

45. Naseri N. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application / N. Naseri, H. Valizadeh, P. Zakeri-Milani // Adv. Pharm. Bullet. – 2015. – V. 5. – Is. 3. – No. 305.

46. Kasongo K.W. The use of hot and cold high pressure homogenization to enhance the loading capacity and encapsulation efficiency of nanostructured lipid carriers for the hydrophilic antiretroviral drug, didanosine for potential administration to paediatric patients / K.W. Kasongo, R.H. Müller, R.B. Walker // Pharm. Dev. Technol. -2012. -V. 17. -Is. 3. -P. 353-362.

47. Hien L.T.M. Formation of nanoemulsion from black pepper essential oil by high speed homogenization method / L.T.M. Hien, D.T.A. Dao // Vietnam J. Chem. – 2019. – V. 57. – Is. 3. – P. 352-356.

48. Gardouh A.R. Influence of formulation factors on the size of nanostructured lipid carriers and nanoemulsions prepared by high shear homogenization // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. -2018. - V. 10. - Is. 4. - P. 61-75.

49. Puglia C. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation / C. Puglia, P. Blasi, L. Rizza, A. Schoubben, F. Bonina, C. Rossi, M. Ricci // Int. J. Pharm. – 2008. – V. 357. – Is. 1-2. – P. 295-304.

50. Mu L. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS / L. Mu, S.S. Feng // J. Controlled Release. – 2003. – V. 86. – Is. 1. – P. 33-48.

51. Soleimanian Y. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil / Y. Soleimanian, S.A.H. Goli, J. Varshosaz, S.M. Sahafi // Food Chem. – 2018. – V. 244. – P. 83-92.

52. Gurpreet K. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques / K. Gurpreet, S.K. Singh // Indian J. Pharm. Sci. – 2018. – V. 80. – No. 5.

53. Ganesan P. Microfluidization trends in the development of nanodelivery systems and applications in chronic disease treatments / P. Ganesan, G. Karthivashan, S.Y. Park, J. Kim, D.K. Choi // Int. J. Nanomedicine. – 2018. – V. 13. – P. 6109-6121.

54. Li L.W. Oil-in-water camellia seeds oil nanoemulsions via high pressure microfluidization: Formation and evaluation / L.W. Li, X.Y. Chen, L.C. Liu, Y. Yang, Y.J. Wu, G. Chen, Z.F. Zhang, P. Luo // Lwt. – 2021. – V. 140. – No. 110815.

55. Wang S. Preparation and characterization of Eucommia ulmoides seed oil O/W nanoemulsion by dynamic high-pressure microfluidization / S. Wang, X. Wang, M. Liu, L. Zhang, Z. Ge, G. Zhao, W. Zong // Lwt. – 2020. – V. 121. – No. 108960.

56. Xing Z. Fabrication of cinnamon essential oil nanoemulsions with high antibacterial activities via microfluidization / Z. Xing, Y. Xu, X. Feng, C. Gao, D. Wu, W. Cheng, L. Meng, Z. Wang, T. Xu, X. Tang // Food Chem. – 2024. – V. 456. – No. 139969.

57. García-Márquez E. Design of fish oil-in-water nanoemulsion by microfluidization / E. García-Márquez, I. Higuera-Ciapara, H. Espinosa-Andrews // Inn. Food Sci. Emerging Technol. – 2017. – V. 40. – P. 87-91.

58. Espitia P.J.P. Nanoemulsions: Synthesis, characterization, and application in bio-based active food packaging / P.J.P. Espitia, C.A. Fuenmayor, C.G. Otoni // Compr. Rev. Food Sci. Food Safety. – 2019. – V. 18. – Is. 1. – P. 264-285.

59. Anderluzzi G. Scalable manufacturing processes for solid lipid nanoparticles / G. Anderluzzi, G. Lou, Y. Su, Y. Perrie // Pharm. Nanotechnology. – 2019. – V. 7. – Is. 6. – P. 444-459.

60. Zhang J. Preparation and characterization of nanoemulsions stabilized by food biopolymers using microfluidization / J. Zhang, T.L. Peppard, G.A. Reineccius // Flavour Fragrance J. – 2015. – V. 30. – Is. 4. – P. 288-294.

61. Tripathi P. Formulation and characterization of amphotericin B loaded nanostructured lipid carriers using microfluidizer / P. Tripathi, A. Verma,

P. Dwivedi, D. Sharma, V. Kumar, R. Shukla, V.T. Banala, G. Pandey, S.D. Pachauri, S.K. Singh, P.R. Mishra // J. Biomat. Tissue Eng. – 2014. – V. 4. – Is. 3. – P. 194-197.

62. Helgason T. Formation of transparent solid lipid nanoparticles by microfluidization: Influence of lipid physical state on appearance / T. Helgason, H. Salminen, K. Kristbergsson, D.J. McClements, J. Weiss // J. Colloid Interface Sci. – 2015. – V. 448. – P. 114-122.

63. Ozturk O.K. Applications of microfluidization in emulsion-based systems, nanoparticle formation, and beverages / O.K. Ozturk, H. Turasan // Trends Food Sci. Technol. – 2021. – V. 116. – P. 609-625.

64. Ahari H. Ultrasonic technique for production of nanoemulsions for food packaging purposes: A review study / H. Ahari, M. Nasiri // Coatings. – 2021. – V. 11. – Is. 7. – No. 847.

65. Singh Y. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery / Y. Singh, J.G. Meher, K. Raval, F.A. Khan, M. Chaurasia, N.K. Jain, M.K. Chourasia // J. Controlled Release. – 2017. – V. 252. – P. 28-49.

66. Modarres-Gheisari S.M.M. Ultrasonic nano-emulsification – A review /
S.M.M. Modarres-Gheisari, R. Gavagsaz-Ghoachani, M. Malaki, P. Safarpour,
M. Zandi // Ultrason. Sonochem. – 2019. – V. 52. – P. 88-105.

67. Fang Y. Cavitation and acoustic streaming generated by different sonotrode tips / Y. Fang, T. Yamamoto, S. Komarov // Ultrason. Sonochem. – 2018. – V. 48. – P. 79-87.

68. Sinsuebpol C. Effects of ultrasonic operating parameters and emulsifier system on sacha inchi oil nanoemulsion characteristics / C. Sinsuebpol, N. Changsan // J. Oleo Sci. – 2020. – V. 69. – Is. 5. – P. 437-448.

69. Pratap-Singh A. Optimal ultrasonication process time remains constant for a specific nanoemulsion size reduction system / A. Pratap-Singh, Y. Guo, S. Lara Ochoa, F. Fathordoobady, A. Singh // Sci. Reports. – 2021. – V. 11. – Is. 1. – No. 9241. 70. Pucek-Kaczmarek A. Influence of process design on the preparation of solid lipid nanoparticles by an ultrasonic-nanoemulsification method / A. Pucek-Kaczmarek // Processes. -2021. - V. 9. - Is. 8. - No. 1265.

71. Espinosa-Andrews H. Optimization of ultrasonication curcumin-hydroxylated lecithin nanoemulsions using response surface methodology / H. Espinosa-Andrews, G. Páez-Hernández // J. Food Sci. Technol. – 2020. – V. 57. – Is. 2. – P. 549-556.

72. Tang S.Y. Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions – comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer / S.Y. Tang, P. Shridharan, M. Sivakumar // Ultrason. Sonochem. – 2013. – V. 20. – Is. 1. – P. 485-497.

73. Fathordoobady F. Comparing microfluidics and ultrasonication as formulation methods for developing hempseed oil nanoemulsions for oral delivery applications / F. Fathordoobady, N. Sannikova, Y. Guo, A. Singh, D.D. Kitts, A. Pratap-Singh // Sci. Reports. – 2021. – V. 11. – Is. 1. – No. 72.

74. Chutia H. Properties of starch nanoparticle obtained by ultrasonication and high-pressure homogenization for developing carotenoids-enriched powder and Pickering nanoemulsion / H. Chutia, C.L. Mahanta // Inn. Food Sci. Emerging Technol. -2021. - V.74. - No. 102822.

75. Gómez-Mascaraque L.G. Potential of microencapsulation through emulsion-electrospraying to improve the bioaccesibility of  $\beta$ -carotene / L.G. Gómez-Mascaraque, R. Perez-Masiá, R. González-Barrio, M.J. Periago, A. López-Rubio // Food Hydrocolloids. – 2017. – V. 73. – P. 1-12.

76. Calligaris S. Nanoemulsion preparation by combining high pressure homogenization and high-power ultrasound at low energy densities / S. Calligaris, S. Plazzotta, F. Bot, S. Grasselli, A. Malchiodi, M. Anese // Food Res. Int. – 2016. – V. 83. - P. 25-30.

77. Piacentini E. Membrane emulsification technology: Twenty-five years of inventions and research through patent survey / E. Piacentini, E. Drioli, L. Giorno // J. Membr. Sci. – 2014. – V. 468. – P. 410-422.

78. Håkansson A. General principles of nanoemulsion formation by high-energy mechanical methods / A. Håkansson, M. Rayner // Nanoemulsions. – Academic Press, 2018. – P. 103-139.

79. Khairnar S.V. Review on the scale-up methods for the preparation of solid lipid nanoparticles / S.V. Khairnar, P. Pagare, A. Thakre, A.R. Nambiar, V. Junnuthula, M.C. Abraham, P. Kolimi, D. Nyavanandi, S. Dyawanapelly // Pharmaceutics. -2022. -V. 14. -Is. 9. -No. 1886.

80. Ahmed El-Harati A. Influence of the formulation for solid lipid nanoparticles pre-pared with a membrane contactor / A. Ahmed El-Harati, C. Charcosset, H. Fessi // Pharm. Dev. Technol. – 2006. – V. 11. – Is. 2. – P. 153-157.

81. Charcosset C. Preparation of nanoparticles with a membrane contactor /
C. Charcosset, H. Fessi // J. Membr. Sci. – 2005. – V. 266. – Is. 1-2. – P. 115-120.

82. Vladisavljević G.T. Preparation of microemulsions and nanoemulsions by membrane emulsification / G.T. Vladisavljević // Colloid Surf., A. – 2019. – V. 579. – No. 123709.

83. Kim J.H. Preparation of a capsaicin-loaded nanoemulsion for improving skin penetration / J.H. Kim, J.A. Ko, J.T. Kim, D.S. Cha, J.H. Cho, H.J. Park, G.H. Shin // J. Agric. Food. Chem. – 2014. – V. 62. – Is. 3. – P. 725-732.

84. Wooster T.J. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability / T.J. Wooster, M. Golding, P. Sanguansri // Langmuir. – 2008. – V. 24. – No. 22. – P. 12758-12765.

85. Ghosh V. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity / V. Ghosh, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran // Ultrason. Sonochem. – 2013. – V. 20. – No. 1. – P. 338-344.

86. D'oria C. Preparation of solid lipid particles by membrane emulsification—Influence of process parameters / C. D'oria, C. Charcosset, A.A. Barresi, H. Fessi // Colloid Surf., A. – 2009. – V. 338. – No. 1-3. – P. 114-118.

87. Safaya M. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique / M. Safaya, Y.C. Rotliwala // Mater. Today. – 2020. – V. 27. – P. 454-459.

88. Solans C. Spontaneous emulsification / C. Solans, D. Morales, M. Homs
// Curr. Opin. Colloid Interface Sci. – 2016. – V. 22. – P. 88-93.

89. Algahtani M.S. Investigation of factors influencing formation of nanoemulsion by spontaneous emulsification: impact on droplet size, polydispersity index, and stability / M.S. Algahtani, M.Z. Ahmad, J. Ahmad // Bioengineering. - 2022. - V. 9. - Is. 8. - No. 384.

90. Teng J. Fabrication of chia (Salvia hispanica L.) seed oil nanoemulsions using different emulsifiers / J. Teng, X. Hu, M. Wang, N. Tao // J. Food Process. Preservation. – 2018. – V. 42. – Is. 1. – No. e13416.

91. Rodríguez-Burneo N. Magnetic nanoemulsions: comparison between nanoemulsions formed by ultrasonication and by spontaneous emulsification / N. Rodríguez-Burneo, M.A. Busquets, J. Estelrich // Nanomaterials. -2017. - V. 7. - Is. 7. - No. 190.

92. Liew S.N. Physical, morphological and antibacterial properties of lime essential oil nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification method / S.N. Liew, U. Utra, A.K. Alias, T.B. Tan, C.P. Tan, N.S. Yussof // Lwt. – 2020. – V. 128. – No. 109388.

93. Shirvani A. Fabrication of edible solid lipid nanoparticle from beeswax/propolis wax by spontaneous emulsification: Optimization, characterization and stability / A. Shirvani, S.A.H. Goli, J. Varshosaz, L. Salvia-Trujillo, O. Martín-Belloso // Food Chemistry. – 2022. – V. 387. – No. 132934.

94. Ortiz A.C. Development of a nanostructured lipid carrier (NLC) by a lowenergy method, comparison of release kinetics and molecular dynamics simulation / A.C. Ortiz, O. Yañez, E. Salas-Huenuleo, J.O. Morales // Pharmaceutics. – 2021. – V. 13. – Is. 4. – No. 531.

95. Solans C. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods / C. Solans,
I. Solé // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. – 2012. – V. 17. – Is. 5. – P. 246-254.

96. Farshbaf-Sadigh A. Preparation of ginger oil in water nanoemulsion using phase inversion composition technique: Effects of stirring and water addition rates

on their Physico-chemical properties and stability / A. Farshbaf-Sadigh, H. Jafarizadeh-Malmiri, N. Anarjan, Y. Najian // Zeitschrift für Physikalische Chemie. – 2021. – V. 235. – Is. 3. – P. 295-314.

97. Li H. Oil-in-water nanoemulsion with reversible charge prepared by the phase inversion composition method / H. Li, H. Lu, Y. Zhang, D. Liu, J. Chen // J. Mol. Liq. -2021. - V. 336. - No. 116174.

98. Kotta S. Formulation of nanoemulsion: a comparison between phase inversion composition method and high-pressure homogenization method / S. Kotta, A.W. Khan, S.H. Ansari, R.K. Sharma, J. Ali // Drug delivery. – 2015. – V. 22. – Is. 4. – P. 455-466.

99. Ozawa K. Spontaneous formation of highly concentrated oil-in-water emulsions / K. Ozawa, C. Solans, H. Kunieda // J. Colloid Interface Sci. – 1997. – V. 188. – Is. 2. – P. 275-281.

100. Della Sala F. Ultrasmall solid-lipid nanoparticles via the polysorbate sorbitan phase-inversion temperature technique: a promising vehicle for antioxidant delivery into the skin / F. Della Sala, A. Borzacchiello, C. Dianzani, E. Muntoni, M. Argenziano, M.T. Capucchio, M.C. Valsania, A. Bozza, S. Garelli, M. Di Muro, F. Scorziello, L. Battaglia // Pharmaceutics. – 2023. – V. 15. – Is. 7. – No. 1962.

101. Calderón-Colón X. Design and characterization of lipid nanocarriers for oral delivery of immunotherapeutic peptides / X. Calderón-Colón, Y. Zhang, O. Tiburzi, J. Wang, S. Hou, G. Raimondi, J. Patrone // J. Biomed. Mat. Res. Part A. – 2023. – V. 111. – Is. 7. – P. 938-949.

102. Simão D.O. Preparation and cytotoxicity of lipid nanocarriers containing a hydrophobic flavanone / D.O. Simao, T.D. Honorato, G.G. Gobo, H.L. Piva, P.L. Goto, L.A. Rolim, C.O. Turrin, M. Blanzat, A.C. Tedesco, M.P. Siqueira-Moura // Colloid Surf., A. – 2020. – V. 601. – No. 124982.

103. Galindo-Alvarez J. Miniemulsion polymerization templates: A systematic comparison between low energy emulsification (Near-PIT) and ultrasound emulsification methods / J. Galindo-Alvarez, D. Boyd, P. Marchal, C. Tribet, P. Perrin, E. Marie-Bégué, A. Durand, V. Sadtler // Colloid Surf., A. – 2011. – V. 374. – Is. 1-3. – P. 134-141.

104. Arana L. Solid lipid nanoparticles surface modification modulates cell internalization and im-proves chemotoxic treatment in an oral carcinoma cell line / L. Arana, L. Bayón-Cordero, L.I. Sarasola, M. Berasategi, S. Ruiz, I. Alkorta // Nanomaterials. – 2019. – V. 9. – Is. 3. – No. 464.

105. Severino P. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles / P. Severino, S.C. Pinho, E.B. Souto, M.H. Santana // Colloid Surf., B. – 2011. – V. 86. – Is. 1. – P. 125-130.

106. Van Smeden J. Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes / J. Van Smeden, W.A. Boiten, T. Hankemeier, R. Rissmann, J.A. Bouwstra, R.J. Vreeken // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1841. – Is. 1. – P. 70-79.

107. Barry B.W. Is transdermal drug delivery research still important today?
/ B.W. Barry // Drug Discovery Today. - 2001. - V. 6. - Is. 19. - P. 967-971.

108. Noor N.M. Engineered dutasteride-lipid based nanoparticle (DST-LNP) System using oleic and stearic acid for topical delivery / N.M. Noor, S. Umar, A. Abdul-Aziz, K. Sheikh, S. Somavarapu // Bioengineering. – 2022. – V. 9. – Is. 1. – No. 11.

109. Pereira-Leite C. Exploring stearic-acid-based nanoparticles for skin applications – Focusing on stability and cosmetic benefits / C. Pereira-Leite, M. Bom,
A. Ribeiro, C. Almeida, C. Rosado // Cosmetics. – 2023. – V. 10. – Is. 4. – No. 99.

110. Abdelhameed A.H. Formulation, optimization, and in-vivo evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with Fexofenadine HCl for oral delivery / A.H. Abdelhameed, W.A. Abdelhafez, M.S. Mohamed // J. Drug Delivery Sci. Technol. – 2022. – V. 74. – No. 103607.

111. Almeida E.D.P. Skin permeation, biocompatibility and antitumor effect of chloroaluminum phthalocyanine associated to oleic acid in lipid nanoparticles /

E.D.P. Almeida, L.V. Dipieri, F.C. Rossetti, J.M. Marchetti, M.V.L. Bentley, R.D.S. Nunes, V.H.V. Sarmento, M.E.G. Valerio, J.J. Rodrigues Júnior, M.M. Montalvão, C.B. Correa, A.A.M. Lira // Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2018. – V. 24. – P. 262-273.

112. Zhao H. Nanoemulsion loaded with lycobetaine-oleic acid ionic complex: physicochemical characteristics, in vitro, in vivo evaluation, and antitumor activity / H. Zhao, H. Lu, T. Gong, Z. Zhang // Int. J. Nanomedicine. – 2013. – V. 8. – P. 1959-1973.

113. Sravanthi V. Oleic acid nanoemulsion for nasal vaccination: Impact on adjuvanticity based immune response / V. Sravanthi, M.P. Pallavi, S.R. Bonam, S. Sathyabama, H.M.S. Kumar // J. Drug Delivery Sci. Technol. – 2015. – V. 28. – P. 56-63.

114. Mishchenko E.V. Nanoemulsions and nanocapsules with oleic acid /
E.V. Mishchenko, E.E. Timofeeva, A.S. Artamonov, I.B. Portnaya, M.Y. Koroleva
// Colloid J. – 2022. – V. 84. – Is. 1. – P. 64-70.

115. Pornputtapitak W. Effect of functional groups in lipid molecules on the stability of nanostructured lipid carriers: experimental and computational investigations / W. Pornputtapitak, Y. Thiangjit, Y. Tantirungrotechai // ACS omega. – 2024. – V. 9. – Is. 9. – P. 11012-11024.

116. Yeo S. Solid lipid nanoparticles of curcumin designed for enhanced bioavailability and anticancer efficiency / S. Yeo, M.J. Kim, Y.K. Shim, I. Yoon, W.K. Lee // ACS omega. – 2022. – V. 7. – Is. 40. – P. 35875-35884.

117. Koroleva M. Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability / M. Koroleva, I. Portnaya, E. Mischenko, I. Abutbul-Ionita, L. Kolik-Shmuel, D. Danino // J. Colloid Interface Sci. – 2022. – V. 610. – P. 61-69.

118. Zhu R. Phospho-sulindac (OXT-328) inhibits the growth of human lung cancer xenografts in mice: enhanced efficacy and mitochondria targeting by its formulation in solid lipid nanoparticles / R. Zhu, K.W. Cheng, G. Mackenzie, L. Huang, Y. Sun, G. Xie, K. Vrankova, P.P. Constantinides, B. Rigas // Pharm. Res. – 2012.
- V. 29. – P. 3090-3101.

119. Cavalli R. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with  $\beta$ -cyclodextrins / R. Cavalli, E. Peira, O. Caputo, M.R. Gasco // Int. J. Pharm. – 1999. – V. 182. – Is. 1. – P. 59-69.

120. Lee S.E. Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles to overcome drug-resistance in tumor cells / S.E. Lee, C.D. Lee, J.B. Ahn, D.H. Kim, J.K. Lee, J.Y. Lee, J.S. Choi, J.S. Park // J. Drug Delivery Sci. Technol. – 2019. – V. 50. – P. 365-371.

121. Shrestha S.C. Formulation and characterization of phytostanol ester solid lipid nanoparticles for the management of hypercholesterolemia: an ex vivo study / S.C. Shrestha, K. Ghebremeskel, K. White, C. Minelli, I. Tewfik, P. Thapa, S. Tewfik // Int. J. Nanomedicine. -2021. - V. 16. - P. 1977-1992.

122. Ahmed S.S. Oral delivery of solid lipid nanoparticles surface decorated with hyaluronic acid and bovine serum albumin: A novel approach to treat colon cancer through active targeting / S.S. Ahmed, M.Z. Baba, U. Wahedi, J. Koppula, M.V. Reddy, D. Selvaraj, S. Venkatachalam, J. Selvaraj, V. Sankar, J. Natarajan // Int. J. Biological Macromol. – 2024. – V. 279. – No. 135487.

123. Schöler N. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages / N. Schöler, H. Hahn, R.H. Müller, O. Liesenfeld // Int. J. Pharm. – 2002. – V. 231. – Is. 2. – P. 167-176.

124. Peres L.B. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique / L.B. Peres, L.B. Peres, P.H.H. de Araújo, C. Sayer // Colloid Surf., B. – 2016. – V. 140. – P. 317-323.

125. Öztürk A.A. Influence of glyceryl behenate, tripalmitin and stearic acid on the properties of clarithromycin incorporated solid lipid nanoparticles (SLNs):
Formulation, characterization, antibacterial activity and cytotoxicity / A.A. Öztürk,
A. Aygül, B. Şenel // J. Drug Delivery Sci. Technol. – 2019. – V. 54. – No. 101240.

126. Howard M.D. Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid-lipid nanoparticles / M.D. Howard, X. Lu, M. Jay, T.D. Dziubla // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2012. – V. 38. – Is. 10. – P. 1270-1279.

127. Patel M.R. Characterization of ergocalciferol loaded solid lipid nanoparticles / M.R. Patel, M.F. San Martin-Gonzalez // J. Food Sci. – 2012. – V. 77. – Is. 1. – P. 8-13.

128. Bunjes H. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles / H. Bunjes, M.H.J. Koch, K. Westesen // J. Pharm. Sci. – 2003. – V. 92. – Is. 7. – P. 1509-1520.

129. Prajapati B.G. Enhancing exemestane delivery: Solid lipid nanoparticles formulation and pharmacokinetic evaluation / B.G. Prajapati, P. Patel, H. Paliwal, D. Khunt // Nano-Structures & Nano-Objects. – 2024. – V. 40. – No. 101388.

130. Arduino I. Microfluidic formulation of diazoxide-loaded solid lipid nanoparticles as a Novel approach for Friedreich's ataxia treatment / I. Arduino, A. Santoro, S. De Santis, R.M. Iacobazzi, A.A. Lopedota, E. Paradies, G. Merla, S.A. Virmouni, L. Palmieri, C.M.T. Marobbio, N. Denora // J. Drug Delivery Sci. Technol. – 2024. – V. 97. – No. 105837.

131. Moussa Y.A. From beverage to anticancer agent: The repurposing of green coffee bean extract loaded in solid lipid nanoparticles / Y.A. Moussa, M.H. Teaima, M.M. Elmazar, D.A. Attia, M.A. El-Nabarawi // J. Drug Delivery Sci. Technol. – 2024. – V. 100. – No. 106022.

132. Rojanaratha T. Preparation, physicochemical characterization, ex vivo, and in vivo evaluations of asiatic acid-loaded solid lipid nanoparticles formulated with natural waxes for nose-to-brain delivery / T. Rojanaratha, P. Tienthai, W.Woradulayapinij, T. Yimsoo, V. Boonkanokwong, G.C. Ritthidej // European J. Pharm. Sci. – 2024. – V. 203. – No. 106935.

133. Olbrich C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA / C. Olbrich, U. Bakowsky, C.M. Lehr, R.H. Müller, C. Kneuer // J. Controlled Release. – 2001. – V. 77. – Is. 3. – P. 345-355.

134. Santamaría E. Study of nanoemulsions using carvacrol/MCT-(Oleic acid-potassium oleate)/Tween 80®-water system by low energy method / E. Santamaría, A. Maestro, S. Vilchez, C. González // Heliyon. – 2023. – V. 9. – Is. 6. – No. e16967.

135. Cheng L.C. Thermally and pH-responsive gelation of nanoemulsions stabilized by weak acid surfactants / L.C. Cheng, S.M. Hashemnejad, B. Zarket, S. Muthukrishnan, P.S. Doyle // J. Colloid Interface Sci. – 2020. – V. 563. – P. 229-240.

136. Yun S. Ensuring long-term stability and size control of nanoemulsion via post-microfluidization dilution toward energy saving scale-up process / S. Yun, G.W. Kim, J. Jang, J.B. Lee, S.Y. Kim // Colloid Surf., A. – 2024. – V. 691. – No. 133845.

137. Saberi A.H. Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification / A.H. Saberi, Y. Fang, D.J. McClements // J. Colloid Interface Sci. – 2013. – V. 411. – P. 105-113.

138. Moghassemi S. Metallic-based phthalocyanine nanoemulsions for photodynamic purging of ovarian tissue in leukemia patients / S. Moghassemi, A. Dadashzadeh, S. Nikanfar, P. Ghaffari-Bohlouli, P.E.N. de Souza, A. Shavandi, R.B. de Azevedo, C.A. Amorim // Colloid Surf., B. – 2025. – V. 245. – No. 114338.

139. Zhu H. O/W nanoemulsions encapsulated octacosanol: Preparation, characterization and anti-fatigue activity / H. Zhu, T. Xu, H. Tan, M. Wang, J. Wang // Colloid Surf., B. – 2024. – V. 241. – No. 114066.

140. Ghosh V. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage / V. Ghosh, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran // Colloid Surf., B. – 2014. – V. 114. – P. 392-397.

141. Nikkhah M. A novel antifungal nanoemulsion based on reuterin-assisted synergistic essential oils: Preparation and in vitro/in vivo characterization / M. Nik-khah, M.B.H. Najafi, M. Hashemi // Int. J. Food Microbiology. – 2024. – V. 418. – No. 110735.

142. Zhu Y. Preparation and characterization of a novel green cinnamon essential oil nanoemulsion for the enhancement of safety and shelf-life of strawberries / Y. Zhu, T. Chen, Z. Meng, T. Li, J. Zhang, N. Zhang, G. Luo, Z. Wang, Y. Zhou // Int. J. Food Microbiology. – 2025. – V. 427. – No. 110935.

143. Khan A.A. Structure-property relationship of ultrasound-assisted nanoemulsion-impregnated bioactive polysaccharide films for enhanced shelf life of mushrooms / A.A. Khan, M.W. Ullah, A. Qayum, I. Khalifa, M. Ul-Islam, S.A.S. Bacha, U. Zeb, F.J. Yao, S.A. Alharbi, M. Shrahili, Y. Yang, W. Jia, W. Li, F.J. Cui // Food Packaging and Shelf Life. – 2024. – V. 46. – No. 101372.

144. Almurshedi A.S. Development of inhalable nanostructured lipid carriers for ciprofloxacin for noncystic fibrosis bronchiectasis treatment / A.S. Almurshedi, H.A. Aljunaidel, B. Alquadeib, B.N. Aldosari, I.M. Alfagih, S.S. Almarshidy, E.K.D. Eltahir, A.Z. Mohamoud // Int. J. Nanomedicine. – 2021. – V. 16. – P. 2405-2417.

145. Yari E. Effect of Rosa damascena Essential oil loaded in nanostructured lipid carriers on the proliferation of human breast cancer cell line MDA-MB-231 in comparison with cisplatin / E. Yari, S. Sari, H. Kelidari, K. Asare-Addo, A. Nokhod-chi // J. Pharm. Innovation. -2024. - V. 19. - Is. 1. - No. 4.

146. Elmowafy M. Multifunctional carbamazepine loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation / M. Elmowafy, K. Shalaby, M.M. Badran, H.M. Ali, M.S. Abdel-Bakky, H.M. Ibrahim // Int. J. Pharm. – 2018. – V. 550. – Is. 1-2. – P. 359-371.

147. Hu F.Q. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system / F.Q. Hu, S.P. Jiang, Y.Z. Du, H. Yuan, Y.Q. Ye, S. Zeng // Colloid Surf., B. – 2005. – V. 45. – Is. 3-4. – P. 167-173.

148. Kumar M. Itraconazole loaded nano-structured lipid carrier for topical ocular delivery: Optimization and evaluation / M. Kumar, A. Tiwari, S.M.B. Asdaq,

A.B. Nair, S.Bhatt, P. Shinu, A.K.Al. Mouslem, S. Jacob, A.S. Alamri, W.F. Alsanie, M. Alhomrani, V. Tiwari, S. Devi, A. Pathania, N. Sreeharsha // Saudi J. Biological Sci. – 2022. – V. 29. – Is. 1. – P. 1-10.

149. Aryani N.L.D. Experimental development and molecular docking: nanostructured lipid carriers (NLCs) of coenzyme Q10 using stearic acid and different liquid lipids as lipid matrix / N.L.D. Aryani, S. Siswandono, W. Soeratri, D.R.K. Sari // Int. J. Appl. Pharm. – 2021. – V. 13. – Is. 1. – P. 108-116.

150. Matarazzo A.P. Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain / A.P. Matarazzo, L.M.S. Elisei, F.C. Carvalho, R. Bonfilio, A.L.M. Ruela, G. Galdino, G.R. Pereira // European J. Pharm. Sci. – 2021. – V. 159. – No. 105698.

151. Makeen H.A. Gefitinib loaded nanostructured lipid carriers: characterization, evaluation and anti-human colon cancer activity in vitro / H.A. Makeen, S. Mohan, M.A. Al-Kasim, I.M. Attafi, R.A. Ahmed, N.K. Syed, M.H. Sultan, M. Al-Bratty, H.A. Alhazmi, M.M. Safhi, R. Ali, M. Intakhab Alam // Drug delivery. – 2020. – V. 27. – Is. 1. – P. 622-631.

152. Lin Y. Influence of different solid lipids on the properties of a novel nanostructured lipid carrier containing Antarctic krill oil / Y. Lin, W. Yin, Y. Li, G. Liu // Int. J. Food Sci. Technol. – 2022. – V. 57. – Is. 5. – P. 2886-2895.

153. Fernandes A.V. Design, preparation and in vitro characterizations of fluconazole loaded nanostructured lipid carriers / A.V. Fernandes, C.R. Pydi, R. Verma, J. Jose, L. Kumar // Brazilian J. Pharm. Sci. – 2020. – V. 56. – No. e18069.

154. Noor N.M. Preparation and characterization of dutasteride-loaded nanostructured lipid carriers coated with stearic acid-chitosan oligomer for topical delivery / N.M. Noor, K. Sheikh, S. Somavarapu, K.M. Taylor // European J. Pharm. Biopharm. – 2017. – V. 117. – P. 372-384.

155. Maretti E. In vivo β-carotene skin permeation modulated by Nanostructured Lipid Carriers / E. Maretti, E. Leo, C. Rustichelli, E. Truzzi, C. Siligardi, V. Iannuccelli // Int. J. Pharm. – 2021. – V. 597. – No. 120322. 156. Azizi M. Improvement of physicochemical properties of encapsulated echium oil using nanostructured lipid carriers / M. Azizi, A. Kierulf, M.C. Lee, A. Abbaspourrad // Food chemistry. – 2018. – V. 246. – P. 448-456.

157. Garg R. Tacrolimus loaded nanostructured lipid carriers using Moringa oleifera seed oil: design, optimization and in-vitro evaluations / R. Garg, A. Garg // J. Micro-encapsulation. – 2023. – V. 40. – Is. 7. – P. 502-516.

158. Walimbe C.A. Optimisation of nanostructured lipid carriers of Ritonavir
/ C.A. Walimbe, S.S. More, R.U. Walawalkar, R.R. Shah, D. Ghodake // Infection.
- 2012. - V. 7. - P. 8.

159. Aryani N.L.D. Development, characterization in vitro and in silico of coenzyme Q10 loaded myristic acid with different liquid lipids nanostructured lipid carriers / N.L.D. Aryani, S. Siswandono, W. Soeratri, D.Y. Putri, P.D. Puspitasarini // J. Pharm. Pharmacognosy Res. – 2021. – V. 9. – Is. 5. – P. 573-583.

160. Ijaz M. Fatty acids based  $\alpha$ -Tocopherol loaded nanostructured lipid carrier gel: In vitro and in vivo evaluation for moisturizing and anti-aging effects / M. Ijaz, N. Akhtar // J. Cosmetic Dermatology. – 2020. – V. 19. – Is. 11. – P. 3067-3076.

161. Tetyczka C. Development of nanostructured lipid carriers for intraoral delivery of Domperidone / C. Tetyczka, M. Griesbacher, M. Absenger-Novak, E. Fröhlich, E. Roblegg // Int. J. Pharm. – 2017. – V. 526. – Is. 1-2. – P. 188-198.

162. Aditya N.P. Arthemeter-loaded lipid nanoparticles produced by modified thin-film hydration: Pharmacokinetics, toxicological and in vivo anti-malarial activity / N.P. Aditya, S. Patankar, B. Madhusudhan, R.S.R. Murthy, E.B. Souto // European J. Pharm. Sci. -2010. - V. 40. - Is. 5. - P. 448-455.

163. Ge Y. Formation, stability, and antimicrobial efficacy of eutectic nanoemulsions containing thymol and glycerin monolaurate / Y. Ge, H. Liu, S. Peng, L. Zhou, D.J. McClements, W. Liu, J. Luo // Food Chemistry. – 2024. – V. 453. – No. 139689.

164. Yang Y. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers / Y. Yang, A. Corona III, B. Schubert, R. Reeder, M.A. Henson // J. Colloid Interface Sci. – 2014. – V. 418. – P. 261-272.

165. Baldim I. Nanostructured lipid carriers loaded with Lippia sidoides essential oil as a strategy to combat the multidrug-resistant Candida auris / I. Baldim, M.H. Paziani, P.H. Grizante Barião, M.R.V.Z. Kress, W. P. Oliveira // Pharmaceutics. – 2022. – V. 14. – Is. 1. – No. 180.

166. Shalaby E.S. Innovative Indian propolis loaded Carnauba wax based lipid structured nanocarriers: preparation, characterization and in vitro/in vivo antifungal activities / E.S. Shalaby, M.F. Abdelhameed, S.A. Ismail, Y.H. Ahmed, S. Aboutaleb // Bionanoscience. – 2024. – V. 14. – Is. 2. – P. 1726-1743.

167. Sislioglu K. In vitro digestion of edible nanostructured lipid carriers: Impact of a Candelilla wax gelator on performance / K. Sislioglu, C.E. Gumus, C.K. Koo, I. Karabulut, D.J. McClements // Food Res. Int. – 2021. – V. 140. – No. 110060.

168. Nahr F.K. Food grade nanostructured lipid carrier for cardamom essential oil: Preparation, characterization and antimicrobial activity / F.K. Nahr,
B. Ghanbarzadeh, H. Hamishehkar, H.S. Kafil // J. Functional foods. – 2018. – V. 40. – P. 1-8.

169. Bratu A. The association effect of cocoa butter with vegetable oils on the obtaining of lipid nanocarriers loaded with antidepressant and antipsychotic drugs / A. Bratu, C. Ott, B. Balanuca, N. Badea, I. Lacatusu // Revue Roumaine de Chimie. – 2020. – V. 65. – Is. 1. – P. 57-67.

170. Ribeiro L.N.M. Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies / L.N.M. Ribeiro, M.C. Breitkreitz, V.A. Guilherme, G.H. da Silva, V.M. Couto, S.R. Castro, B.O. de Paula, D. Machado, E. de Paula // European J. Pharm. Sci. – 2017. – V. 106. – P. 102-112.

171. Ajala T.O. Shea butter (Vitellaria paradoxa) and Pentaclethra macrophylla oil as lipids in the formulation of Nanostructured lipid carriers / T.O. Ajala, A. Abraham, C.M. Keck, O.A. Odeku, T.O. Elufioye, J.O. Olopade // Sci. African. - 2021. - V. 13. - No. e00965.

172. Abourehab M.A.S. Sesame oil-based nanostructured lipid carriers of nicergoline, intranasal delivery system for brain targeting of synergistic cerebrovascular protection / M.A.S. Abourehab, A. Khames, S. Genedy, S. Mostafa, M.A. Khaleel, M.M. Omar, A.M. El Sisi // Pharmaceutics. – 2021. – V. 13. – Is. 4. – No.581.

173. Tichota D.M. Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration / D.M. Tichota, A.C. Silva, J.M. Sousa Lobo, M.H. Amaral // Int. J. Nanomedicine. – 2014. – V. 9. – P. 3855-3864.

174. Ammar H.O. Development of folic acid-loaded nanostructured lipid carriers for topical delivery: preparation, characterisation and ex vivo investigation / H.O. Ammar, M.M. Ghorab, D.M. Mostafa, S.H. Abd El-Alim, A.A. Kassem, S. Salah, E.S. Shalaby // J. Microencapsulation. – 2020. – V. 37. – Is. 5. – P. 366-383.

175. How C.W. Characterization and cytotoxicity of nanostructured lipid carriers formulated with olive oil, hydrogenated palm oil, and polysorbate 80 / C.W. How, A. Rasedee, R. Abbasalipourkabir // IEEE Transactions on Nanobioscience. -2012. - V. 12. - Is. 2. - P. 72-78.

176. Naeem M. Formulation and development of Fenofibrate loaded liposphere system / M. Naeem, K.S. Bhise // J. Drug Deliv. Ther. – 2013. – V. 3. – P. 1-10.

177. Kabir M.S. Thermo-physical properties of beeswax / M.S. Kabir, I.A. Yola // Fudma J. Sci. – 2020. – V. 4. – Is. 1. – P. 460-465.

178. Bucio A. Characterization of beeswax, candelilla wax and paraffin wax
for coating cheeses / A. Bucio, R. Moreno-Tovar, L. Bucio, J. Espinosa-Dávila,
F. Anguebes-Franceschi // Coatings. – 2021. – V. 11. – Is. 3. – No. 261.

179. Winkler-Moser J.K. Physical properties of beeswax, sunflower wax, and candelilla wax mixtures and oleogels / J.K. Winkler-Moser, J. Anderson,

F.C. Felker, H.S. Hwang // J. Am. Oil Chem. Soc. – 2019. – V. 96. – Is. 10. – P. 1125-1142.

180. Milanovic J. Microencapsulation of flavors in carnauba wax / J. Milanovic, V. Manojlovic, S. Levic, N. Rajic, V. Nedovic, B. Bugarski // Sensors. – 2010.
– V. 10. – Is. 1. – P. 901-912.

181. Jayalakshmi V. Characterization of paraffin waxes by DSC and high temperature GC / V. Jayalakshmi, V. Selvavathi, M.S. Sekar, B. Sairam // Pet. Sci. Technol. – 1999. – V. 17. – Is. 7-8. – P. 843-856.

182. Lozhechnikova A. Surfactant-free carnauba wax dispersion and its use for layer-by-layer assembled protective surface coatings on wood / A. Lozhechnikova, H. Bellanger, B. Michen, I. Burgert, M. Österberg // Appl. Surf. Sci. – 2017. – V. 396. – P. 1273-1281.

183. Pirouzifard M.K. Cocoa butter and cocoa butter substitute as a lipid carrier of Cuminum cyminum L. essential oil; physicochemical properties, physical stability and controlled release study / M.K. Pirouzifard, H. Hamishehkar, S. Pirsa // J. Mol. Liq. – 2020. – V. 314. – No. 113638.

184. Tortorici S. Nanostructured lipid carriers of essential oils as potential tools for the sustainable control of insect pests / C. Cimino, M. Ricupero, T. Musumeci, A. Biondi, G. Siscaro, C. Carbone, L. Zappalà // Industrial Crops and Products. – 2022. – V. 181. – No. 114766.

185. Hung L.C. An improved method for the preparations of nanostructured lipid carriers containing heat-sensitive bioactives / L.C. Hung, M. Basri, B.A. Tejo, R. Ismail, H.L.L. Nang, H.A. Hassan, C.Y. May // Colloids Surf., B. – 2011. – V. 87. – Is. 1. – P. 180-186.

186. Jawahar N. Enhanced oral bioavailability of an antipsychotic drug through nanostructured lipid carriers / N. Jawahar, P.K. Hingarh, R. Arun, J. Selvaraj, A. Anbarasan, S. Sathianarayanan, G. Nagaraju // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – V. 110. – P. 269-275.
187. Osman N. Novel fatty acid-based pH-responsive nanostructured lipid carriers for enhancing antibacterial delivery / N. Osman, C.A. Omolo, R. Gannimani, A.Y. Waddad, S. Rambharose, C. Mocktar, S. Singh, R. Parboosing, T. Govender // J. Drug Delivery Sci. Tech. – 2019. – V. 53. – No. 101125.

188. Chauhan I. A comprehensive literature review of lipids used in the formulation of lipid nanoparticles / I. Chauhan, L. Singh // Current Nanomaterials. – 2023. – V. 8. – Is. 2. – P. 126-152.

189. Apostolou M. The effects of solid and liquid lipids on the physicochemical properties of nanostructured lipid carriers / M. Apostolou, S. Assi, A.A. Fatokun, I. Khan // J. Pharm. Sci. – 2021. – V. 110. – Is. 8. – P. 2859-2872.

190. Subramaniam B. Optimization of nanostructured lipid carriers: Understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations / B. Subramaniam, Z.H. Siddik, N.H. Nagoor // J. Nanoparticle Res. – 2020. – V. 22. – P. 1-29.

191. Eh Suk V.R. Development of nanostructured lipid carrier (NLC) assisted with polysorbate nonionic surfactants as a carrier for 1-ascorbic acid and Gold Tri. E 30 / E. Musielak, A. Feliczak-Guzik, I. Nowak // J. Food Sci. Tech. – 2020. - V. 57. - P. 3259-3266.

192. Musielak E. Optimization of the conditions of solid lipid nanoparticles (SLN) synthesis / E. Musielak, A. Feliczak-Guzik, I. Nowak // Molecules. – 2022. – V. 27. – Is. 7. – No. 2202.

193. Izza N. Systematic characterization of nanostructured lipid carriers from cetyl palmitate/caprylic triglyceride/Tween 80 mixtures in an aqueous environment / N.M. Izza, K. Suga, Y. Okamoto, N. Watanabe, T.T. Bui, Y. Wibisono, C.R. Fadila, H. Umakoshi // Langmuir. – 2021. – V. 37. – Is. 14. – P. 4284-4293.

194. Aldayel T.S. Optimization of cationic nanoparticles stabilized by poloxamer 188: A potential approach for improving the biological activity of Aloe perryi / T.S. Aldayel, M.M. Badran, A.H. Alomrani, N.A. AlFaris, J.Z. Altamimi, A.S. Alqahtani, F.A. Nasrf, S. Ghaffar, R. Orfali // Heliyon. – 2023. – V. 9. – Is. 12. – No. e22691. 195. Marques A.C. Rheological and injectability evaluation of sterilized Poloxamer-407-based hydrogels containing docetaxel-loaded lipid nanoparticles / A.C. Marques, P.C. Costa, S. Velho, M.H. Amaral // Gels. – 2024. – V. 10. – Is. 5. – No. 307.

196. Taylor J.M. Using pyrene to probe the effects of poloxamer stabilisers on internal lipid microenvironments in solid lipid nanoparticles / J.M. Taylor, K. Scale, S. Arrowsmith, A. Sharp, S. Flynn, S. Rannard, T.O. McDonald // Nanoscale Adv. - 2020. - V. 2. - Is. 12. - P. 5572-5577.

197. Lee J. Fabrication and characterization of nanoparticles with lecithin liposomes and poloxamer micelles: Impact of conformational structures of poloxamers / J. Lee, E. Yoo, S.J. Choi // Food Chemistry. – 2024. – V. 435. – No. 137613.

198. Satyanarayana S.D. Ocular delivery of bimatoprost-loaded solid lipid nanoparticles for effective management of glaucoma / S.D. Satyanarayana, A.S. Abu Lila, A. Moin, E.H. Moglad, E.S. Khafagy, H.F. Alotaibi, A.J. Obaidullah, R.N. Charyulu // Pharmaceuticals. – 2023. – V. 16. – Is. 7. – No. 1001.

199. Anantaworasakul P. Enhanced transdermal delivery of concentrated capsaicin from chili extract-loaded lipid nanoparticles with reduced skin irritation / P. Anantaworasakul, W. Chaiyana, B.B. Michniak-Kohn, W. Rungseevijitprapa, C. Ampasavate // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12. – Is. 5. – No. 463.

200. Abosabaa S.A. Hybrid chitosan-lipid nanoparticles of green tea extract as natural anti-cellulite agent with superior in vivo potency: full synthesis and analysis / S.A. Abosabaa, M.G. Arafa, A.N. El-Meshad // Drug delivery. – 2021. – V. 28. – Is. 1. – P. 2160-2176.

201. Salminen H. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles / H. Salminen, T. Helgason, S. Aulbach, B. Kristinsson, K. Kristbergsson, J. Weiss // J. Colloid Interface Sci. – 2014. – V. 426. – P. 256-263.

202. Americas I.C.I. The HLB system: a time-saving guide to emulsifier selection // ICI Americas, Incorporated. – 1984. 203. Alexis F. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles / F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad // Mol. Pharm. – 2008. – V. 5. – Is. 4. – P. 505-515.

204. Vater C. Cytotoxicity of lecithin-based nanoemulsions on human skin cells and ex vivo skin permeation: Comparison to conventional surfactant types / C. Vater, A. Adamovic, L. Ruttensteiner, K. Steiner, P. Tajpara, V. Klang, A. Elbe Bürger, M. Wirth, C. Valenta // Int. J. Pharm. – 2019. – V. 566. – P. 383-390.

205. Karn-Orachai K. The effect of surfactant composition on the chemical and structural properties of nanostructured lipid carriers / K. Karn-Orachai, S.M. Smith, S. Phunpee, A. Treethong, S. Puttipipatkhachorn, S. Pratontep, U.R. Ruktanonchai // J. Microencapsulation. – 2014. – V. 31. – Is. 6. – P. 609-618.

206. Pezeshki A. Encapsulation of vitamin A palmitate in nanostructured lipid carrier (NLC)-effect of surfactant concentration on the formulation properties / A. Pezeshki, B. Ghanbarzadeh, M. Mohammadi, I. Fathollahi, H. Hamishehkar // Adv. Pharm. Bullet. – 2014. – V. 4. – Is. 2. – No. 563.

207. Trujillo C.C. Properties and stability of solid lipid particle dispersions based on canola stearin and Poloxamer 188 / C.C. Trujillo, A.J. Wright // J. Am. Oil Chem. Soc. – 2010. – V. 87. – P. 715-730.

208. Helgason T. Impact of surfactant properties on oxidative stability of βcarotene encapsulated within solid lipid nanoparticles / T. Helgason, T.S. Awad, K. Kristbergsson, E.A. Decker, D.J. McClements, J. Weiss // J. Agric. Food. Chem. – 2009. – V. 57. – Is. 17. – P. 8033-8040.

209. Bunjes H. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications / H. Bunjes, F. Steiniger, W. Richter // Langmuir. – 2007. – V. 23. – Is. 7. – P. 4005-4011.

210. Bunjes H. Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles / H. Bunjes, M.H.J. Koch // J. Controlled Release. – 2005. – V. 107. – Is. 2. – P. 229-243. 211. Awad T.S. Temperature scanning ultrasonic velocity study of complex thermal transformations in solid lipid nanoparticles / T.S. Awad, T. Helgason, K. Kristbergsson, J. Weiss, E.A. Decker, D.J. McClements // Langmuir. – 2008. – V.24. – Is. 22. – P. 12779-12784.

212. Aoki M. Application of surface active agents to pharmaceutical preparations. XV. Factors affecting on the preparation of oil-in-water emulsion. A new determination of a required HLB and an adaptability of surfactants to oils / M. Aoki, N. Yata, K. Kato, I. Yoshioka // Chem. Pharm. Bullet. – 1970. – V. 18. – Is. 1. – P. 36-42.

213. Chow M.C. Properties of palm-oil-in-water emulsions: Effect of mixed emulsifiers / Chow M.C., Ho C.C. // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1996. – V. 73. – P. 47-53.

214. Ontiveros J.F. A simple method to assess the hydrophilic lipophilic balance of food and cosmetic surfactants using the phase inversion temperature of C10E4/n-octane/water emulsions / J.F. Ontiveros, C. Pierlot, M. Catté, V. Molinier, J.L. Salager, J.M. Aubry // Colloids Surf., A. – 2014. – V. 458. – P. 32-39.

215. Weerapol Y. New approach for preparing solid lipid nanoparticles with volatile oil-loaded quercetin using the phase-inversion temperature method / Y. Weerapol, S. Manmuan, N. Chaothanaphat, S. Limmatvapirat, J. Sirirak, P. Tamdee, S. Tubtimsri // Pharmaceutics. -2022. -V. 14. -Is. 10. -No. 1984.

216. Gomes G.V.L.  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol coencapsulated in nanostructured lipid carriers of muru-muru (Astrocaryum murumuru) butter produced by phase inversion temperature method: characterisation, dynamic in vitro digestion and cell viability study / G.V.L. Gomes, M.R. Sola, A.L. Rochetti, H. Fukumasu, A.A. Vicente, S.C. Pinho // J. Microencapsulation. – 2019. – V. 36. – Is. 1. – P. 43-52.

217. Gomes G.V.L. Physico-chemical stability and in vitro digestibility of beta-carotene-loaded lipid nanoparticles of cupuacu butter (Theobroma grandiflorum) produced by the phase inversion temperature (PIT) method / G.V.L. Gomes, M.R. Sola, L.F. Marostegan, C.G. Jange, C.P. Cazado, A.C. Pinheiro, A.A. Vicente, S.C. Pinho // J. Food Eng. – 2017. – V. 192. – P. 93-102.

218. Mei Z. O/W nano-emulsions with tunable PIT induced by inorganic salts/ Z. Mei, J. Xu, D. Sun // Colloids Surf., A. – 2011. – V. 375. – Is. 1-3. – P. 102-108.

219. Pinto F. Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with retinoids by central composite design / F. Pinto, D.P. de Barros, C. Reis, L.P. Fonseca // J. Mol. Liq. – 2019. – V. 293. – No. 111468.

220. Pham D.H. Preparation of tamanu oil nanoemulsions by phase inversion temperature / D.H. Pham, T.T. Nguyen // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – IOP Publishing, 2020. – V. 991. – Is. 1. – No. 012116.

221. Nollet M. An efficient method to determine the hydrophile-lipophile balance of surfactants using the phase inversion temperature deviation of CiEj/n-octane/water emulsions / M. Nollet, H. Boulghobra, E. Calligaro, J.D. Rodier // Int. J. Cosmetic Sci. -2019. - V. 41. - Is. 2. - P. 99-108.

222. Sharif A.A.M. The effect of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration in aqueous phase on the phase inversion temperature O/W nanoemulsions / A.A.M. Sharif, A.M. Astaraki, P.A. Azar, S.A. Khorrami, S. Moradi // Arabian J. Chem. – 2012. – V. 5. – Is. 1. – P. 41-44.

223. Roger K. Formation of 10-100 nm size-controlled emulsions through a sub-PIT cycle / K. Roger, B. Cabane, U. Olsson // Langmuir. – 2010. – V. 26. – Is. 6. – P. 3860-3867.

224. Rao J. Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement / J. Rao, D.J. McClements // J. Agric. Food. Chem. – 2010. – V. 58. – Is. 11. – P. 7059-7066.

225. ОФС.1.1.0016.15. Стерилизация // Общая фармакопейная статья. Государственная фармакопея РФ. XIV изд. — М.: Федеральная электронная медицинская библиотека, 2023. — URL: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0016-15-sterilizatsiya/?ysclid=m3lr1o5wrr529744431 (дата обращения: 27.04.2025).

226. Bernal-Chávez S.A. Insights into terminal sterilization processes of nanoparticles for biomedical applications / S.A. Bernal-Chávez, M.L. Del Prado Audelo, I.H. Caballero-Florán, D.M. Giraldo-Gomez, G.Figueroa Gonzalez, O.D. Reyes-Hernandez, M. González-Del Carmen, M. González-Torres, H. Cortés, G. Leyva-Gomez // Molecules. – 2021. – V. 26. – Is. 7. – No. 2068.

227. Viveksarathi K. Effect of the moist-heat sterilization on fabricated nanoscale solid lipid particles containing rasagiline mesylate / K. Viveksarathi, K. Kannan // Int. J. Pharm. Inv. – 2015. – V. 5. – Is. 2. – P. 87-91.

228. Mancini G. Lecithin and parabens play a crucial role in tripalmitin-based lipid nanoparticle stabilization throughout moist heat sterilization and freeze-drying / G. Mancini, R.M. Lopes, P. Clemente, S. Raposo, L.M. Gonçalves, A. Bica, H.M. Ribeiro, A.J. Almeida // European J. Lipid Sci. Tech. – 2015. – V. 117. – Is. 12. – P. 1947-1959.

229. El-Salamouni N.S. Effect of sterilization on the physical stability of brimonidine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers / N.S. El-Salamouni, R.M. Farid, A.H. El-Kamel, S.S. El-Gamal // Int. J. Pharm. – 2015. – V. 496. – Is. 2. – P. 976-983.

230. Venkateswarlu V. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles / V. Venkateswarlu, K. Manjunath // J. Controlled Release. – 2004. – V. 95. – Is. 3. – P. 627-638.

231. Schwarz C. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery.
I. Production, characterization and sterilization / C. Schwarz, W. Mehnert,
J.S. Lucks, R.H. Müller // J. Controlled Release. – 1994. – V. 30. – Is. 1. – P. 83-96.

232. Cavalli R. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles / R. Cavalli, O. Caputo, M.E. Carlotti, M. Trotta, C. Scarnecchia, M.R. Gasco // Int. J. Pharm. – 1997. – V. 148. – Is. 1. – P. 47-54.

233. Dziedzic-Goclawska A. Trends in radiation sterilization of health care products / A. Dziedzic-Goclawska, A. Kaminski, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, J. Michalik, W. Stachowicz // Vienna: International Atomic Energy Agency. – 2008. – P. 231-256.

234. ГОСТ ISO 11137-1-2011. Стерилизация медицинской продукции. Радиационная стерилизация. Ч. 1. Требования к разработке, валидации и текущему контролю процесса стерилизации медицинских изделий : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 1381-ст : введен впервые : дата введения 2013-01-01 / разработан Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт стандартизации и сертификации в машиностроении» (ВНИИНМАШ). – М: Стандартинформ, 2013. – 35 с.

235. Richardson V.J. Tissue distribution and tumour localization of 99m-technetium-labelled liposomes in cancer patients / V.J. Richardson, B.E. Ryman, R.F.Jewkes, K. Jeyasingh, M.N. Tattersall, E.S. Newlands, S.B. Kaye // British J. Cancer. – 1979. – V. 40. – Is. 1. – P. 35-43.

236. Stensrud G. Effects of gamma irradiation on solid and lyophilised phospholipids / G. Stensrud, K. Redford, G. Smistad, J. Karlsen // Radiat. Phys. Chem. – 1999. – V. 56. – Is. 5-6. – P. 611-622.

237. Sakar F. Nano drug delivery systems and gamma radiation sterilization /
F. Sakar, A.Y. Özer, S. Erdogan, M. Ekizoglu, D. Kart, M.S. Özalp, S. Colak,
Y. Zencir // Pharm. Dev. Tech. – 2017. – V. 22. – Is. 6. – P. 775-784.

238. Botelho M.L. Radiation sterilization of antibiotic liposome formulations: A case study / M.L. Botelho, S.C. Verde, L. Alves, A. Belchior, J. Reymao, S. Trabulo, M.M. Gaspar, M.E.M Cruz, S. Simoes // Radiat. Phys. Chem. – 2007. – V. 76. – Is. 8-9. – P. 1542-1546.

239. Tinsley P.W. Effect of low-dose γ-radiation on individual phospholipids in aqueous suspension / P.W. Tinsley, G. Maerker // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1993. – V. 70. – Is. 2. – P. 187-191.

240. Maerker G. A-ring oxidation products from  $\gamma$ -irradiation of cholesterol in liposomes / G. Maerker, K.C. Jones // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1993. – V. 70. – Is. 3. – P. 255-259.

241. Zuidam N.J. Gamma-irradiation of liposomes composed of saturated phospholipids. Effect of bilayer composition, size, concentration and absorbed dose on chemical degradation and physical destabilization of liposomes / N.J. Zuidam, C. Versluis, E.A. Vernooy, D.J. Crommelin // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – V. 1280. – Is. 1. – P. 135-148.

242. Napia L.M.A. Effect of gamma irradiation on the physical stability of DPPC liposomes / L.M.A. Napia, I.A. Rahman, M.Y. Hamzah, F. Mohamed, H.K. Mohd, I.S.A. Bastamam, S. Sharin, N.M. Hidzir, S. Radiman // Sains Malaysiana. – 2018. – V. 47. – Is. 6. – P. 1235-1240.

243. Turker S. Gamma-irradiated liposome/niosome and lipogelosome/niogelosome formulations for the treatment of rheumatoid arthritis / S. Turker, A. Yekta Özer, E. Kiliç, M. Özalp, S. Colak, M. Korkmaz // Interventional Med. Appl. Sci. – 2013. – V. 5. – Is. 2. – P. 60-69.

244. Özer A. The effects of gamma irradiation on diclofenac sodium, liposome and niosome ingredients for rheumatoid arthritis / A. Özer, S. Turker, S. Colak, M. Korkmaz, E. Kiliç, M. Özalp // Interventional Med. Appl. Sci. – 2013. – V. 5. – Is. 3. – P. 122-130.

245. Stark G. The effect of ionizing radiation on lipid membranes / G. Stark // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – V. 1071. – Is. 2. – P. 103-122.

246. Küçüktürkmen B. Development and characterization of cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide to glioblastoma cells / B. Küçüktürkmen, A. Bozkır // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2018. – V. 44. – Is. 2. – P. 306-315.

247. Marathe D. Radiation-induced changes in permeability in unilamellar phospholipid liposomes / D. Marathe, K.P. Mishra // Radiat. Res. – 2002. – V. 157. – Is. 6. – P. 685-692.

248. Domańska I.M. The influence of ionizing radiation on paclitaxel-loaded nanoparticles based on PLGA / I.M. Domańska, R. Figat, A. Zalewska, K. Cieśla, S. Kowalczyk, K. Kędra, M. Sobczak // Applied Sciences. – 2023. – V. 13. – Is. 19. – No. 11052.

249. Yadav N. Solid lipid nanoparticles – a review / N. Yadav, S. Khatak, U.V.S. Sara // Int. J. Appl. Pharm. – 2013. – V. 5. – Is. 2. – P. 8-18.

250. Trenkenschuh E. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization / E. Trenkenschuh, W. Friess // European J. Pharm. Biopharm. – 2021. – V. 165. – P. 345-360.

251. Abla K.K. Freeze-drying: A flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products / K.K. Abla, M.M. Mehanna // Int. J. Pharm. – 2022. – V. 628. – No. 122233.

252. Varshosaz J. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants / J. Varshosaz, S. Eskandari, M. Tabbakhian // Carbohydr. Polym. – 2012. – V. 88. – Is. 4. – P. 1157-1163.

253. Karakash I. Freeze-drying of nanostructured lipid carriers loaded with Salvia off. Extract for Alzheimer's disease treatment / I. Karakash, J. Vasileska, D. Shalabalija, L. Mihailova, M.G. Dodov, R.S. Raicki, M.S. Crcarevska // Maced. Pharm. Bullet. – 2020. – V. 66. – P. 219-220.

254. Attama A.A. The use of solid lipid nanoparticles for sustained drug release / A.A. Attama, C.E. Umeyor // Therapeutic delivery. – 2015. – V. 6. – Is. 6. – P. 669-684.

255. Chen C. An overview of liposome lyophilization and its future potential / C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang // J. Controlled Release. – 2010. – V. 142. – Is. 3. – P. 299-311.

256. Wen Z. Influences of trehalose-modification of solid lipid nanoparticles on drug loading / Z. Wen, J. Lin, J. Su, Z. Zheng, Q. Chen, L. Chen // European J. Lipid Sci. Tech. – 2017. – V. 119. – Is. 9. – No. 1600364.

257. Schwarz C. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) / C. Schwarz, W. Mehnert // Int. J. Pharm. – 1997. – V. 157. – Is. 2. – P. 171-179.

258. Amis T.M. Selection of cryoprotectant in lyophilization of progesteroneloaded stearic acid solid lipid nanoparticles / T.M. Amis, J. Renukuntla, P.K. Bolla, B.A. Clark // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12. – Is. 9. – No. 892. 259. dC Molina M. The stability of lyophilized lipid/DNA complexes during prolonged storage / M. dC Molina, T.K. Armstrong, Y.E. Zhang, M.M. Patel, Y.K. Lentz, T.J. Anchordoquy // J. Pharm. Sci. – 2004. – V. 93. – Is. 9. – P. 2259-2273.

260. Vighi E. Re-dispersible cationic solid lipid nanoparticles (SLNs) freezedried without cryoprotectors: characterization and ability to bind the pEGFP-plasmid / E. Vighi, B. Ruozi, M. Montanari, R. Battini, E. Leo // European J. Pharm. Biopharm. – 2007. – V. 67. – Is. 2. – P. 320-328.

261. Veider F. Design of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles for enhanced cellular uptake / F. Veider, Z.B. Akkuş-Dağdeviren, P. Knoll, A.Bernkop-Schnürch // Int. J. Pharm. – 2022. – V. 624. – No. 122014.

262. Seyfoddin A. Development of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for improving ocular delivery of acyclovir / A. Seyfoddin, R. Al-Kassas // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2013. – V. 39. – Is. 4. – P. 508-519.

263. Garbuzenko O.B. Strategy to enhance lung cancer treatment by five essential elements: inhalation delivery, nanotechnology, tumor-receptor targeting, chemo-and gene therapy / O.B. Garbuzenko, A. Kuzmov, O. Taratula, S.R. Pine, T. Minko // Theranostics. – 2019. – V. 9. – Is. 26. – No. 8362.

264. Taratula O. Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA / O. Taratula, A. Kuzmov, M. Shah, O.B. Garbuzenko, T. Minko // J. Controlled Release. – 2013. – V. 171. – Is. 3. – P. 349-357.

265. Sabzichi M. Chrysin loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) triggers apoptosis in MCF-7 cancer cells by inhibiting the Nrf2 pathway / M. Sabzichi, J. Mohammadian, R. Bazzaz, M.B. Pirouzpanah, M. Shaaker, H. Hamishehkar, H. Chavoshi, R. Salehi, N. Samadi // Process Biochem. – 2017. – V. 60. – P. 84-91.

266. Ng W.K. Thymoquinone-Loaded Nanostructured Lipid Carrier Exhibited Cytotoxicity towards Breast Cancer Cell Lines (MDA-MB-231 and MCF-7) and Cervical Cancer Cell Lines (HeLa and SiHa) / W.K. Ng, L. Saiful Yazan, L.H. Yap, W.A.G. Wan Nor Hafiza, C.W. How, R. Abdullah // BioMed research international. - 2015. – V. 2015. – Is. 1. – No. 263131.

267. Chen Y. Nanostructured lipid carriers enhance the bioavailability and brain cancer inhibitory efficacy of curcumin both in vitro and in vivo / Y. Chen, L. Pan, M. Jiang, D. Li, L. Jin // Drug Delivery. – 2016. – V. 23. – Is. 4. – P. 1383-1392.

268. Madane R.G. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and in vivo study / R.G. Madane, H.S. Mahajan // Drug delivery. – 2016. – V. 23. – Is. 4. – P. 1326-1334.

269. Zhang S. Targeted delivery of etoposide to cancer cells by folate-modified nanostructured lipid drug delivery system / S. Zhang, C. Lu, X. Zhang, J. Li, H. Jiang // Drug Delivery. – 2016. – V. 23. – Is. 5. – P. 1838-1845.

270. Kuo Y.C. Inhibition of human brain malignant glioblastoma cells using carmustine-loaded catanionic solid lipid nanoparticles with surface anti-epithelial growth factor receptor / Y.C. Kuo, C.T. Liang // Biomaterials. – 2011. – V. 32. – Is.12. – P. 3340-3350.

271. Song S. Novel RGD containing, temozolomide-loading nanostructured lipid carriers for glioblastoma multiforme chemotherapy / S. Song, G. Mao, J. Du, X. Zhu // Drug delivery. – 2016. – V. 23. – Is. 4. – P. 1404-1408.

272. Tran T.H. Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for targeted delivery of vorinostat to CD44 overexpressing cancer cells / T.H. Tran, J.Y. Choi, T. Ramasamy, D.H. Truong, C.N. Nguyen, H.G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim // Carbohydr. Polym. – 2014. – V. 114. – P. 407-415.

273. Hajipour H. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD) containing nanostructured lipid carrier co-loaded with doxorubicin and sildenafil citrate enhanced anticancer effects and overcomes drug resistance / H. Hajipour, M. Ghorbani, H. Kahroba, F. Mahmoodzadeh, R.Z. Emameh, R.A. Taheri // Process Biochem. – 2019. – V. 84. – P. 172-179. 274. Aldawsari M.F. Optimized Ribociclib nanostructured lipid carrier for the amelioration of skin cancer: Inferences from ex-vivo skin permeation and dermatokinetic studies / M.F. Aldawsari, M.A. Kamal, M.F. Balaha, T. Jawaid, M. Jafar, S. Hashmi, M.A. Ganaie, A. Alam // Saudi Pharm. J. – 2024. – V. 32. – Is. 3. – No.101984.

275. Iqubal M.K. Combinatorial lipid-nanosystem for dermal delivery of 5fluorouracil and resveratrol against skin cancer: Delineation of improved dermatokinetics and epidermal drug deposition enhancement analysis / M.K. Iqubal, A. Iqubal, K. Imtiyaz, M.M.A. Rizvi, M. M. Gupta, J. Ali, S. Baboota // European J. Pharm. Biopharm. – 2021. – V. 163. – P. 223-239.

276. de Moura L.D. Docetaxel and lidocaine co-loaded (NLC-in-hydrogel) hybrid system designed for the treatment of melanoma / L.D. de Moura, L.N. Ribeiro, F.V. de Carvalho, G.H. Rodrigues da Silva, P.C. Lima Fernandes, S.Q. Brunetto, C.D. Ramos, L.A. Velloso, D.R. de Araújo, E. de Paula // Pharmaceutics. – 2021. – V. 13. – Is. 10. – No. 1552.

277. Gabal Y.M. Effect of surface charge on the brain delivery of nanostructured lipid carriers in situ gels via the nasal route / Y.M. Gabal, A.O. Kamel, O.A. Sammour, A.H. Elshafeey // Int. J. Pharm. – 2014. – V. 473. – Is. 1-2. – P. 442-457.

278. Dudhipala N. Neuroprotective effect of ropinirole lipid nanoparticles enriched hydrogel for parkinson's disease: In vitro, ex vivo, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation / N. Dudhipala, T. Gorre // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12. – Is. 5. – No. 448.

279. Neha S.L. Design and evaluations of a nanostructured lipid carrier loaded with dopamine hydrochloride for intranasal bypass drug delivery in Parkinson's disease / S.L. Neha, A.K. Mishra, L. Rani, S. Paroha, H.K. Dewangan, P.K. Sahoo // J. Microencapsulation. – 2023. – V. 40. – Is. 8. – P. 599-612.

280. Hassan D.M. Chitosan-coated nanostructured lipid carriers for effective brain delivery of Tanshinone IIA in Parkinson's disease: interplay between nuclear factor-kappa  $\beta$  and cathepsin B / D.M. Hassan, A.H. El-Kamel, E.A. Allam,

B.A. Bakr, A.A. Ashour // Drug Delivery and Translational Research. – 2024. – V. 14. – Is. 2. – P. 400-417.

281. Mishra N. Development and characterization of nasal delivery of selegiline hydrochloride loaded nanolipid carriers for the management of Parkinson's disease / N. Mishra, S. Sharma, R. Deshmukh, A. Kumar, R. Sharma // Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry. – 2019. – V. 19. – Is. 1. – P. 46-56.

282. Battaglini M. Design, fabrication, and in vitro evaluation of nanoceria-loaded nanostructured lipid carriers for the treatment of neurological diseases / M. Battaglini, C. Tapeinos, I. Cavaliere, A. Marino, A. Ancona, N. Garino, V. Cauda, F. Palazon, D. Debellis, G. Ciofani // ACS Biomaterial. Sci. Eng. – 2018. – V. 5. – Is. 2. – P. 670-682.

283. Yang C.R. Preparation, optimization and characteristic of huperzine a loaded nanostructured lipid carriers / C.R. Yang, X.L. Zhao, H.Y. Hu, K.X. Li, X. Sun, L. Li, D.W. Chen // Chem. Pharm. Bull. – 2010. – V. 58. – Is. 5. – P. 656-661.

284. Dhawan S. Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery / S. Dhawan, R. Kapil, B. Singh // J. Pharm. Pharmacol. – 2011. – V. 63. – Is. 3. – P. 342-351.

285. Jain D. Transferrin functionalized nanostructured lipid carriers for targeting Rivastigmine and Resveratrol to Alzheimer's disease: Synthesis, in vitro characterization and brain uptake analysis / D. Jain, N. Hasan, S. Zafar, J. Thakur, K. Haider, S. Parvez, F.J. Ahmad // J. Drug Delivery Sci. Tech. – 2023. – V. 86. – No. 104555.

286. Raju M. Berberine loaded nanostructured lipid carrier for Alzheimer's disease: design, statistical optimization and enhanced in vivo performance / M. Raju, S.S. Kunde, S.T. Auti, Y.A. Kulkarni, S. Wairkar // Life sciences. – 2021. – V. 285. – No. 119990.

287. Shehata M.K. Nose to brain delivery of astaxanthin–loaded nanostructured lipid carriers in rat model of Alzheimer's disease: preparation, in vitro and in vivo evaluation / M.K. Shehata, A.A. Ismail, M.A. Kamel // Int. J. Nanomedicine. – 2023. – V. 18. – P. 1631-1658.

288. Shehata M.K. Combined donepezil with astaxanthin via nanostructured lipid carriers effective delivery to brain for Alzheimer's disease in rat model / M.K. Shehata, A.A. Ismail, M.A. Kamel // Int. J. Nanomedicine. – 2023. – V. 18. – P. 4193-4227.

289. Tapeinos C. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases / C. Tapeinos, M. Battaglini, G. Ciofani // J. Controlled Release. – 2017. – V. 264. – P. 306-332.

290. Ahmad J. Nanostructured lipid carriers (NLCs): Nose-to-brain delivery and theranostic application / J. Ahmad, M. Rizwanullah, S. Amin, M.H. Warsi, M.Z. Ahmad, M.A. Barkat // Current Drug Metabolism. – 2020. – V. 21. – Is. 14. – P. 1136-1143.

291. Khan S. An overview of nanostructured lipid carriers and its application in drug delivery through different routes / S. Khan, A. Sharma, V. Jain // Adv. Pharm. Bull. – 2022. – V. 13. – Is. 3. – No. 446.

292. Yu S. Nanostructured lipid carrier (NLC)-based novel hydrogels as potential carriers for nepafenac applied after cataract surgery for the treatment of inflammation: design, characterization and in vitro cellular inhibition and uptake studies / S. Yu, G. Tan, D. Liu, X. Yang, W. Pan // RSC advances. – 2017. – V. 7. – Is. 27. – P. 16668-16677.

293. Tan F. Preparation, optimization, and transcorneal permeability study of lutein-loaded solid lipid nanoparticles / F. Tan, H. Cui, C. Bai, C. Qin, L. Xu, J. Han // J. Drug Delivery Sci. Technol. – 2021. – V. 62. – No. 102362.

294. Youssef A. Ciprofloxacin loaded nanostructured lipid carriers incorporated into in-situ gels to improve management of bacterial endophthalmitis / A. Youssef, N. Dudhipala, S. Majumdar // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12. – Is. 6. – No. 572.

295. Kumari S. Dexamethasone-loaded nanostructured lipid carriers for the treatment of dry eye disease / S. Kumari, M. Dandamudi, S. Rani, E. Behaeghel,

G. Behl, D. Kent, N.J. O'Reilly, O. O'Donovan, P. McLoughlin, L. Fitzhenry // Pharmaceutics. – 2021. – V. 13. – Is. 6. – No. 905.

296. Savić V. et al. Tacrolimus-loaded lecithin-based nanostructured lipid carrier and nanoemulsion with propylene glycol monocaprylate as a liquid lipid: Formulation characterization and assessment of dermal delivery compared to referent ointment / V. Savić, T. Ilić, I. Nikolić, B. Marković, B. Čalija, N. Cekić, S. Savić // Int. J. Pharm. – 2019. – V. 569. – No. 118624.

297. Agrawal Y.O. Methotrexate-loaded nanostructured lipid carrier gel alleviates imiquimod-induced psoriasis by moderating inflammation: formulation, optimization, characterization, in-vitro and in-vivo studies / Y.O. Agrawal, U.B. Mahajan, H.S. Mahajan, S. Ojha // Int. J. of Nanomedicine. – 2020. – V. 15. – P. 4763-4778.

298. Gu Y. Transdermal drug delivery of triptolide-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, pharmacokinetic, and evaluation for rheumatoid arthritis / Y. Gu, X. Tang, M. Yang, D. Yang, J. Liu // Int. J. Pharm. – 2019. – V. 554. – P. 235-44.

299. Kang Q. Transdermal delivery system of nanostructured lipid carriers loaded with Celastrol and Indomethacin: optimization, characterization and efficacy evaluation for rheumatoid arthritis / Q. Kang, J. Liu, Y. Zhao, X. Liu, X.Y. Liu, Y.J. Wang, N.L. Mo, Q. Wu // Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. – 2018. – V. 46. – Is. 3. – P. 585-597.

300. Moura R.B.P. Combination of lipid nanoparticles and iontophoresis for enhanced lopinavir skin permeation: Impact of electric current on lipid dynamics / R.B.P. Moura, L.M. Andrade, L. Alonso, A. Alonso, R.N. Marreto, S.F. Taveira // European J. Pharm. Sci. – 2022. – V. 168. – No. 106048.

301. Wen M.M. Nanophyto-gel against multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa burn wound infection / M.M. Wen, I.A. Abdelwahab, R.G. Aly, S.A. El Zahaby // Drug Delivery. – 2021. – V. 28. – Is. 1. – P. 463-477.

302. Singh H. Nanoceria laden decellularized extracellular matrix-based curcumin releasing nanoemulgel system for full-thickness wound healing / H. Singh, S.M. Bashir, S.D. Purohit, R. Bhaskar, M.A. Rather, S.I. Ali, I. Yadav, D.M. Makhdoomi, M.U. Din Dar, M.A. Gani, M.K. Gupta, N.C. Mishra // Biomaterials Advances. – 2022. – V. 137. – No. 212806.

303. Shirokikh A.D. Bioavailability of nanoemulsions modified with curcumin and cerium dioxide nanoparticles / A.D. Shirokikh, V.A. Anikina, E.A. Zamyatina, E.V. Mishchenko, M.Y. Koroleva, V.K. Ivanov, N.R. Popova // Nanosystems: Phys. Chem. Math. – 2023. – V. 14. – Is. 1. – P. 89-97.

304. Brito Raj S. Formulation, in-vitro and in-vivo pharmacokinetic evaluation of simvastatin nanostructured lipid carrier loaded transdermal drug delivery system / S. Brito Raj, K.B. Chandrasekhar, K.B. Reddy // Future J. Pharm. Sci. – 2019. – V. 5. – P. 1-14.

305. Pezeshki A. Nanostructured lipid carriers as a favorable delivery system for  $\beta$ -carotene / A. Pezeshki, H. Hamishehkar, B. Ghanbarzadeh, I. Fathollahy, F. Nahr, M.K. Heshmati, M. Mohammadi // Food Bioscience. – 2019. – V. 27. – P. 11-17.

306. Mao X. Development of a solid self-emulsification delivery system for the oral delivery of astaxanthin / X. Mao, R. Sun, Y. Tian, D. Wang, Y. Ma, Q. Wang, J. Huang, Q. Xia // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2019. – V. 121. – Is. 5. – No. 1800258.

307. Azar F.A.N. Nanostructured lipid carriers: Promising delivery systems for encapsulation of food ingredients / F.A.N. Azar, A. Pezeshki, B. Ghanbarzadeh, H. Hamishehkar, M. Mohammadi // Journal of Agriculture and Food Research. – 2020. – V. 2. – No. 100084.

308. Bashiri S. Preparation and characterization of chitosan-coated nanostructured lipid carriers (CH-NLC) containing cinnamon essential oil for enriching milk and antioxidant activity / S. Bashiri, B. Ghanbarzadeh, A. Ayaseh, J. Dehghannya, A. Ehsani // Lwt. – 2020. – V. 119. – No. 108836.

309. Wang J. Physicochemical characterization, photostability and cytotoxicity of coenzyme Q10-loading nanostructured lipid carrier / J. Wang, H. Wang, X. Zhou, Z. Tang, G. Liu, G. Liu, Q. Xia // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2012. – V. 12. – Is. 3. – P. 2136-2148.

310. Junyaprasert V.B. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and in vitro skin permeation / V.B. Junyaprasert, V. Teeranachaideekul, E.B. Souto, P. Boonme, R.H. Müller // Int. J. Pharm. – 2009. – V. 377. – Is. 1-2. – P. 207-214.

311. Korkmaz E. Development and evaluation of coenzyme Q10 loaded solid
lipid nanoparticle hydrogel for enhanced dermal delivery / E. Korkmaz, E.H. Gokce,
O. Ozer // Acta Pharmaceutica. – 2013. – V. 63. – Is. 4. – P. 517-529.

312. Chen S. Preparation of Coenzyme Q10 nanostructured lipid carriers for epidermal targeting with high-pressure microfluidics technique / S. Chen, W. Liu, J. Wan, X. Cheng, C. Gu, H. Zhou, S. Chen, X. Zhao, Y. Tang, X. Yang // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2013. – V. 39. – Is. 1. – P. 20-28.

313. Lacatusu I. Design of soft lipid nanocarriers based on bioactive vegetable
oils with multiple health benefits / I. Lacatusu, G. Niculae, N. Badea, R. Stan,
O. Popa, O. Oprea, A. Meghea // Chem. Eng. J. – 2014. – V. 246. – P. 311-321.

314. Rincón M. Development of pranoprofen loaded nanostructured lipid carriers to improve its release and therapeutic efficacy in skin inflammatory disorders / M. Rincón, A.C. Calpena, M.J. Fabrega, M.L. Garduño-Ramírez, M. Espina, M.J.Rodríguez-Lagunas, M.L. García, G. Abrego // Nanomaterials. – 2018. – V. 8. – Is. 12. – No. 1022.

315. Puupponen S. Preparation of paraffin and fatty acid phase changing nanoemulsions for heat transfer / S. Puupponen, A. Seppälä, O. Vartia, K. Saari, T. Ala-Nissilä // Thermochim. acta. – 2015. – V. 601. – P. 33-38.

316. Koroleva M. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms / M. Koroleva, T. Nagovitsina, E. Yurtov // PCCP. – 2018. – V. 20. – Is. 15. – P. 10369-10377.

317. Мищенко Е.В. Разработка способов получения и изучение свойств липидных наночастиц для доставки лекарственных соединений : дис... канд.

хим. наук : 2.6.6. / Мищенко Екатерина Валерьевна : науч. рук. М.Ю. Королёва : РХТУ им. Д.И. Менделеева. – Москва, 2023. – 161 с.

318. Широких А.Д. Липидные наночастицы для инкапсулирования и доставки лютеина / А.Д. Широких, Ю.А. Гурулева, Е.А. Маринец, М.Ю. Королёва // Коллоидный журнал. –2023. – Т. 85. – № 5. – С. 705–714.

319. Xiong Z. Zwitterionic modification of nanomaterials for improved diagnosis of cancer cells / Z. Xiong, M. Shen, X. Shi // Bioconjugate Chem. – 2019. – V. 30. – Is. 10. – P. 2519-2527.

320. Гурулева Ю.И. Агрегативная устойчивость наноразмерных липидных частиц с углеводородным маслом и стеариновой кислотой / Ю.И. Гурулёва, Е.А. Маринец, А.Д. Широких, М.Ю. Королёва // Успехи в химии и химической технологии. – 2023. – Т. 37, № 13 (275). – С. 28-30.

321. Mirmehrabi M. Measurement and prediction of the solubility of stearic acid polymorphs by the UNIQUAC equation / M. Mirmehrabi, S. Rohani // Can. J. Chem. Eng. – 2004. – V. 82. – Is. 2. – P. 335-342.

322. Blázquez-Blázquez E. Synchrotron and Raman study of the rotator phases and polymorphism in tricosane paraffin / E. Blázquez-Blázquez, R. Barranco-García, M.L. Cerrada, J.C. Martínez, E. Pérez // Polymers. – 2020. – V. 12. – Is. 6. – No. 1341.

323. Aquilano D. Solid lipospheres obtained from hot microemulsions in the presence of different concentrations of cosurfactant: the crystallization of stearic acid polymorphs / D. Aquilano, R. Cavalli, M.R. Gasco // Thermochim. acta. – 1993. – V. 230. – P. 29-37.

324. Григорьева У.А. Фазовое состояние смесей на основе масла какао, парафина и пчелиного воска для мягких лекарственных форм / У.А. Григорьева, О.А. Миняева, Н.П. Куприянова // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – №. 6. – С. 38-43.

325. Bunjes H. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering / H. Bunjes, T. Unruh // Advanced drug delivery reviews. – 2007. – V. 59. – Is. 6. – P. 379-402.

326. Маринец Е.А. Влияние лиофилизации на дисперсность наноструктурированных липидных частиц / Е.А. Маринец, Ю.И. Гурулёва, А.Д. Широких, М.Ю. Королёва // Успехи в химии и химической технологии. – 2023. – Т. 37, № 13 (275). – С. 40-42.

327. Svilenov H. Solid lipid nanoparticles — A promising drug delivery system / H. Svilenov, C. Tzachev // Nanomedicine. – 2018. – V. 8. – P. 188–237.

328. Sahiner B. Deep learning in medical imaging and radiation therapy / B. Sahiner, A. Pezeshk, L.M. Hadjiiski, X. Wang, K. Drukker, K.H. Cha, R.M. Summers, M.L. Giger // Medical physics. – 2019. – V. 46. – Is. 1. – P. 1-36.

329. Pijeira M.S.O. Radiolabeled nanomaterials for biomedical applications: Radiopharmacy in the era of nanotechnology / M.S.O. Pijeira, H. Viltres, J. Kozempel, M. Sakmár, M. Vlk, D. İlem-Özdemir, M. Ekinci, S. Srinivasan, A.R. Rajabzadeh, E. Ricci-Junior, L.M.R. Alencar, M. Al Qahtani, R. Santos-Oliveira // EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry. – 2022. – V. 7. – Is. 1. – P. 8-43.

330. Volchok H.L. Half-life of yttrium-90 / H.L. Volchok, J.L. Kulp // Phys. Rev. - 1955. - V. 97. - Is. 1. - P. 102.

331. Patil D.S. Synthesis of nanocrystalline 8 mol% yttria stabilized zirconia by the oleate complex route / D.S. Patil, K. Prabhakaran, C. Durgaprasad, N.M. Go-khale, A.B. Samui, S.C. Sharma // Ceram. Int. – 2009. – V. 35. – Is. 1. – P. 515-519.

332. Shirokikh A.D. Lipid Particles as Promising Carriers of Radioactive Pharmaceuticles / A.D. Shirokikh, A.A. Fenin, M.Yu. Koroleva // Russian Journal of Physical Chemistry A. – 2024. – V. 98(12). – P. 2842-2848.

333. Hickey R. Chemoradiation of hepatic malignancies: prospective, phase 1 study of full-dose capecitabine with escalating doses of yttrium-90 radioembolization / R. Hickey, M.F. Mulcahy, R.J. Lewandowski, V.L. Gates, M. Vouche, A. Habib, S. Kircher, S. Newman, H. Nimeiri, A.B. Benson, R. Salem // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2014. – V. 88. – Is. 5. – P. 1025-1031.

334. ГОСТ ISO 11137-2-2011. Стерилизация медицинской продукции. Радиационная стерилизация. Ч. 2. Установление стерилизующей дозы : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 1279-ст : введен впервые : дата введения 2013-01-01 / разработан Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт стандартизации и сертификации в машиностроении» (ВНИИНМАШ). – М: Стандартинформ, 2013. – 56 с.

335. Becerra M.O. Lutein as a functional food ingredient: Sta-bility and bioavailability / M.O. Becerra, L.M. Contreras, M.H. Lo, J.M. Díaz, G.C. Herrera // J. Funct. Foods. – 2020. – V. 66. – No. 103771.

336. Ahn Y.J. Lutein as a modulator of oxidative stress-mediated inflammatory diseases / Y.J. Ahn, H. Kim // Antioxidants. – 2021. – V. 10. – Is. 9. – No. 1448.

337. Ozawa Y. Neuroprotective effects of lutein in the retina / Y. Ozawa,
M. Sasaki, N. Takahashi, M. Kamoshita, S. Miyake, K. Tsubota // Curr. Pharm. Des.
2012. - V. 18. - Is. 1. - P. 51-56.

338. Pereira C. P. M. Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases / C. P. M. Pereira, A.C.R. Souza, A.R. Vasconcelos, P.S. Prado // Int. J. Mol. Med. – 2021. – V. 47. – Is. 1. – P. 37-48.

339. Ivanova O.S. One-stage synthesis of ceria colloid solutions for biomedical use / O.S. Ivanova, T.O. Shekunova, V.K. Ivanov, A.B. Shcherbakov, A.L. Popov, G.A. Davydova, I.I. Selezneva, G.P. Kopitsa, Y.D. Tret'yakov // Dokl. Chem. - 2011. - V. 437. - Is. 2. - P. 103–106.

340. Koroleva M. Pickering emulsions: structure, properties and the use as colloidosomes and stimuli-responsive emulsions / M. Koroleva, E. Yurtov // Russian Chem. Rev. – 2022. – V. 91. – Is. 5. – No. RCR5024.

341. Koroleva M. Pickering emulsions stabilized with magnetite, gold, and silica nanoparticles: Mathematical modeling and experimental study / M. Koroleva, E. Yurtov // Colloids Surf., A. – 2020. – V. 601. – No. 125001.