

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический
университет
имени Д.И. Менделеева»**

На правах рукописи

Мищенко Екатерина Валерьевна

**Разработка способов получения и изучение свойств липидных
наночастиц для доставки лекарственных соединений**

2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

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

Москва – 2023

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
1.1. Липидные наночастицы. Общая характеристика.....	13
1.2. Методы получения липидных наночастиц.....	16
1.2.1. Получение липидных наночастиц гомогенизацией под действием высокого давления.....	16
1.2.2. Получение липидных наночастиц диспергированием под действием ультразвука.....	21
1.2.3. Получение липидных наночастиц с помощью метода мембранного эмульгирования.....	22
1.2.4. Получение липидных наночастиц методом температурной инверсии фаз.....	25
1.2.5. Методы получения липидных наночастиц с применением органических растворителей.....	29
1.3. Стабильность липидных наночастиц.....	31
1.3.1. Процессы, приводящие к расщеплению наноэмульсий.....	35
1.3.2. Процессы дестабилизации дисперсий твёрдых липидных наночастиц	38
1.4. Области применения липидных наночастиц.....	41
1.4.1. Применение наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц в фармацевтической отрасли.....	41

1.4.2. Применение наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц в других отраслях.....	47
ГЛАВА 2. МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ.....	50
2.1. Реактивы и материалы.....	50
2.2. Методы исследования.....	51
2.2.1. Метод динамического светорассеяния для определения размеров капель дисперсной фазы в наноэмульсиях и твёрдых липидных наночастиц.....	52
2.2.2. Определение ζ -потенциала капель дисперсной фазы в наноэмульсиях и твёрдых липидных наночастиц.....	52
2.2.3. Кондуктометрический метод для определения температуры инверсии фаз в липидных системах.....	54
2.2.4. Метод дифференциально-сканирующей калориметрии для определения фазовых переходов в липидных частицах.....	54
2.2.5. Метод просвечивающей электронной микроскопии для визуализации наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц.....	54
2.2.6. Оптические методы для анализа агрегативной и седиментационной стабильности наноэмульсий и дисперсий твёрдых липидных наночастиц.....	55
2.2.7. Метод висящей капли для определения межфазного натяжения на границе вода / масло.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.1. Свойства наноэмульсий с неполярным и полярным ядром.....	58

3.1.1. Определение температуры инверсии фаз в наноэмульсиях.....	59
3.1.2. Дисперсность и структура наноэмульсий с неполярным и полярным ядром.....	60
3.1.3. Стабильность наноэмульсий к агрегации и обратной седиментации	63
3.1.4. Устойчивость наноэмульсий с полярным и неполярным ядром при повышенных температурах.....	70
3.2. Свойства твёрдых липидных наночастиц с полярным и неполярным ядром.....	71
3.2.1. Определение температуры инверсии фаз в дисперсиях твёрдых липидных наночастиц.....	72
3.2.2. Влияние концентрации поверхностно-активных веществ на дисперсность твердых липидных наночастиц.....	74
3.2.3. Стабильность дисперсий твёрдых липидных наночастиц к агрегации и обратной седиментации.....	77
3.2.4. Устойчивость дисперсий твёрдых липидных наночастиц при повышенных температурах.....	85
3.2.5. Стабильность дисперсий твёрдых липидных наночастиц из природного воска к агрегации и обратной седиментации.....	86
3.3. Определение температуры фазовых переходов в наноэмульсиях и твёрдых липидных наночастицах.....	89
3.3.1. Фазовые переходы в наноэмульсиях с дисперсной фазой из парафинового масла или олеиновой кислоты.....	89
3.3.2. Фазовые переходы в твёрдых липидных наночастицах из стеариновой кислоты или парафина.....	94

3.3.3. Температурные характеристики наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц с инкапсулированными лекарственными соединениями.....	102
3.3.4 Определение возможности встраивания лекарственных соединений в адсорбционный слой поверхностно-активных веществ.....	106
3.4. Потенциальные области применения липидных наночастиц.....	105
3.4.1. Изучение проникновения липидных частиц в раковые клетки <i>in vitro</i> и определение зон их локализации.....	105
3.4.2. Исследование цитотоксичности ненагруженных и нагруженных лекарственным соединением наноэмульсий и твердых липидных наночастиц <i>in vitro</i>	110
3.4.3. Исследование цитотоксичности нагруженных тимохиноном твёрдых липидных наночастиц и наноэмульсий <i>in vitro</i> на опухолевых сфероидах.	117
3.4.4. Исследование свойств и противовоспалительной активности наноэмульсий, содержащих индометацин и модифицированных катионами поверхностно-активными веществами.....	118
3.4.5. Применение водных дисперсий наночастиц пчелиного воска и минеральных пигментов в качестве аналогов темперных красок.....	127
Благодарности.....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	137
Список сокращений и обозначений.....	139
Список литературы.....	140

Введение

Актуальность и степень разработанности темы

Наноэмульсии (НЭ) и твёрдые липидные наночастицы (ТЛН) интенсивно исследуются в последние десятилетия как перспективные средства доставки лекарственных соединений (ЛС) [1-3]. Достоинством данных систем является их способность инкапсулировать в липидном ядре и доставлять плохо растворимые в воде липофильные биологически-активные вещества [4]. При этом липидные наночастицы должны состоять из биосовместимых соединений, чтобы не вызывать побочных эффектов. Кроме того, они должны иметь достаточно длительный срок хранения и быть устойчивой к перепадам температур [5].

Размер капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН не превышает 100 нм, что способствует проникновению инкапсулированного ЛС через клеточные барьеры [6]. Дисперсность НЭ и ТЛН зависит от состава и способа их получения [7]. Получение липидных наночастиц возможно с помощью высоко- и низкоэнергетических методов [8-9]. Среди высокоэнергетических методов можно выделить гомогенизация под давлением, ультразвуковое воздействие, механическое диспергирование и др. Достоинствами низкоэнергетических методов при получении НЭ и ТЛН по сравнению с высокоэнергетическими являются низкие энергозатраты и более простое аппаратное оформление. Также при использовании «мягких» низкоэнергетических методов не происходит разрушения инкапсулированных в каплях дисперсной фазы ЛС [8, 10]. Поэтому в данной работе для получения липидных наночастиц использовался метод инверсии фаз при изменении температуры (ТИФ).

НЭ и ТЛН перспективны для применения в различных областях, однако их применение ограничено из-за термодинамической неустойчивости. Для стабилизации НЭ и ТЛН обычно используют неионогенные поверхностно-активные вещества (ПАВ) из-за их меньшей токсичности в сравнении с ионогенными. Однако из-за низкого поверхностного заряда липидные

наночастицы могут быть нестабильны к агрегации. Также для эффективного взаимодействия липидных наночастиц с клетками или для пролонгированного высвобождения ЛС из частиц в организме может быть необходимо целенаправленно варьировать поверхностный заряд носителей. При этом поверхностный заряд липидных частиц может быть, как отрицательным, так и положительным в зависимости от области применения, но не должен быть очень высоким по абсолютной величине, т.к. с увеличением поверхностного заряда происходит ускорение клиренса *in vivo* [11].

В состав липидных наночастиц могут быть включены плохо растворимые в воде соединения, эффективность инкапсулирования которых зависит от агрегатного состояния носителя [12-14]. Стабильность дисперсий липидных наночастиц увеличивается, однако при этом снижается эффективность включения ЛС в липидные наночастицы в следующем порядке: жидкость < переохлажденный расплав < кристаллический липид [15]. В то же время плотность твердых липидов обычно выше плотности жидких липидов, что может предотвращать гравитационное разделение [16]. Кроме того, инкапсулирование ЛС в твердые частицы способствует более длительному сохранению активности этих соединений [17]. Также интерес представляет вопрос распределения ЛС внутри капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН.

Поэтому актуальной задачей является получение устойчивых к агрегации и седиментации НЭ и дисперсий ТЛН, изучение структуры липидных наночастиц и фазовых переходов. Это позволит создать на их основе нанокапсулы, предназначенные для доставки ЛС, например, доксорубицина и тимохинона.

Цель и основные задачи исследования

Получение высокоустойчивых липидных наночастиц с инкапсулированными ЛС методом температурной инверсии фаз, исследование их структуры и свойств.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить высокоустойчивые НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла (неполярное ядро) или олеиновой кислоты (полярное ядро), с оболочкой, представляющей собой твердообразный адсорбционный слой Tween 60 и Span 60 или жидкообразный адсорбционный слой Tween 80 и Span 80, методом температурной инверсии фаз.
2. Получить высокоустойчивые ТЛН из стеариновой кислоты (полярное ядро) или парафина (неполярное ядро) с оболочкой, представляющей собой твердообразный адсорбционный слой Tween 60 и Span 60 или жидкообразный адсорбционный слой Tween 80 и Span 80, методом температурной инверсии фаз.
3. Определить влияние полярности ядра и фазового состояния поверхностного слоя ПАВ и липидного ядра на агрегативную и седиментационную устойчивость липидных наночастиц.
4. На основе анализа данных о фазовых переходах определить строение липидных наночастиц.
5. Определить цитотоксичность и скорость проникновения ненагруженных и нагруженных ЛС липидных наночастиц в раковые клетки.

Научная новизна

- Установлены условия получения высокоустойчивых НЭ и дисперсий ТЛН с полярным и неполярным ядром и твердообразной оболочкой ПАВ с размером частиц менее 100 нм.
- Показано, что при образовании жидкообразного адсорбционного слоя при стабилизации смесью Tween 80 и Span 80 НЭ неустойчивы. На начальном

этапе укрупнение капель дисперсной фазы из олеиновой кислоты (также, как и парафинового масла) происходит преимущественно из-за коалесценции, на последующих этапах протекает как коалесценция, так и оствальдово созревание.

- На основании данных термического анализа сделано предположение о строении капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН, стабилизированных Tween 60 и Span 60. Капли НЭ состоят из жидкого ядра из парафинового масла или олеиновой кислоты и твердообразной оболочки, образованной адсорбированными молекулами ПАВ. ТЛН покрыты твердообразной оболочкой ПАВ, при этом ядро состоит из переохлажденного расплава стеариновой кислоты или твердообразного парафина.
- На основании анализа данных о поверхностной активности ЛС: доксорубицина и тимохинона и фазовых переходах в липидных наночастицах показано, что тимохинон преимущественно растворяется в липидном ядре, растворимость доксорубицина в ядре существенно ниже. При этом данные ЛС проявляют поверхностную активность и встраиваются в адсорбционный слой ПАВ на поверхности липидных наночастиц.
- Установлено, что ненагруженные НЭ из парафинового масла и ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированные Tween 60 и Span 60, проявляют низкую цитотоксичность. При загрузке липидных наночастиц доксорубицином и тимохинном их цитотоксичность резко возрастает, что делает их перспективными системами доставки данных ЛС.

Теоретическая и практическая значимость

- Разработаны составы и установлены условия получения высокоустойчивых НЭ и дисперсий ТЛН.
- Показана возможность инкапсулирования доксорубицина и тимохинона в липидные наночастицы. Исследования *in vitro* продемонстрировали высокую цитотоксичность липидных наночастиц, загруженных

доксорубицином и тимохиноном, что показывает перспективность их использования в качестве носителей для доставки противораковых ЛС.

- Исследования *in vivo* показали, что НЭ из олеиновой кислоты, стабилизированные смесью Tween 80, Span 80 и катионногенного ПАВ ЦТАБ или УР-16, с инкапсулированным индометацином обладают эффективным противоотечным действием и могут быть использованы в противовоспалительной терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Влияние полярности ядра, типа и концентрации ПАВ на дисперсность НЭ и ТЛН, полученных методом температурной инверсией фаз.
2. Структура капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН в зависимости от полярности липидного ядра и типа ПАВ, предложенная на основании данных о фазовых переходах в дисперсиях липидных наночастиц.
3. Температурные диапазоны устойчивости НЭ и дисперсий ТЛН с полярным и неполярным ядром, с жидкообразным и твердообразным слоем ПАВ на поверхности.
4. Цитотоксичность *in vitro* НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла, и ТЛН из стеариновой кислоты нагруженных ЛС доксорубицином и тимохиноном.
5. Влияние инкапсулированного индометацина в НЭ из олеиновой кислоты, стабилизированных смесью Tween 80, Span 80 и катионногенного ПАВ ЦТАБ или УР-16, на противовоспалительные свойства *in vivo*.

Методология и методы исследования

Для определения средних размеров липидных наночастиц использовался метод динамического рассеяния света, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и крио-ПЭМ. Для определения температуры инверсии фаз использовался метод кондуктометрии. Для исследования устойчивости НЭ и дисперсий ТЛН к седиментации

использовались оптические методы, основанные на пропускании и обратном светорассеянии. Для определения структуры липидных наночастиц были определены температуры фазовых переходов с использованием метода дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) и микрокалориметрии.

Интерпретация результатов исследования основана на современных представлениях о физико-химических свойствах НЭ и ТЛН. Полученные закономерности согласуются с результатами других авторов, изучающих свойства липидных наночастиц.

Личный вклад автора

На всех этапах работы автор принимал непосредственное участие в разработке и планировании исследования, выполнении экспериментов, анализе и интерпретации результатов, формулировании выводов. Подготовка материалов для публикации проводилась совместно с научным руководителем.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса взаимодополняющих современных апробированных методов исследования (метод динамического свето-рассеяния, просвечивающая электронная микроскопия, оптическая микроскопия, ДСК, мик-рокалориметрия, измерение электрофоретической подвижности капель, кондуктометрия, оптические методы, основанные на пропускании и обратном светорассеянии), воспроизводимостью результатов экспериментов.

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на:

33rd Conference of the European Colloid and Interface Society (Бельгия, 2019), на II Школе-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные

стратегии в химии, биологии и ме-дицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2020), на XI и XII ежегодных конференциях Нанотехнологического общества России (Москва, 2020, 2021), на бизнес-форуме «С.Т.А.Р.Т.-2020» (Москва, 2020), на Международ-ных конгрессах молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ- 2020, 2021, 2022», (Москва, 2020-2022), на конференции «Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ» (Москва, 2020), XV Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых, специалистов и студентов вузов «Научно-практические про-блемы в области химии и химических технологий» (Апатиты, 2021), на I и III конференци-ях Школы молодых ученых «Химия и технология биологически активных веществ для ме-дицины и фармации» (Москва, 2021, 2023).

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Липидные наночастицы. Общая характеристика

Липидные составы для доставки ЛС обычно состоят из ЛС, растворённого в одном или нескольких эксципиентов, которые могут представлять собой сложные эфиры спиртов и жирных кислот, триглицериды, фосфолипиды и др. Основным достоинством липидных систем является возможность растворения липофильных ЛС для адресной доставки в организм, которое увеличивает их биодоступность.

Разработка нано- и микрокапсул в качестве систем доставки ЛС является актуальной задачей в последние десятилетия [1-3]. Благодаря использованию НЭ и ТЛН возможно адресно доставлять труднорастворимые в воде биологически активные вещества. Главными требованиями при разработке липидных наноносителей является то, что они должны состоять из биосовместимых соединений и оставаться стабильными к агрегации и седиментации в течение длительного времени, в том числе при хранении и при изменении температуры.

НЭ - лиофобные дисперсные системы с диаметром капель до 100 нм. Представляют собой термодинамически нестабильные, гетерогенные системы из двух несмешивающихся жидкостей и ПАВ. НЭ разделяют на 3 типа: масло-в-воде (М/В), вода-в-масле (В/М) (рисунок 1.1) и множественные эмульсии.

НЭ обладают физическими свойствами, которые отличают их от макроэмульсий. Например, макроэмульсии обычно демонстрируют сильное многократное рассеяние видимого света и в результате имеют белый цвет. Многократное рассеяние через капли, пленки и границы происходит при условии, что существует значительный контраст показателя преломления n между дисперсной фазой и дисперсионной средой. Т.к. капли дисперсной фазы в НЭ намного меньше длин волн видимого света, большинство из них выглядят опалесцирующими.

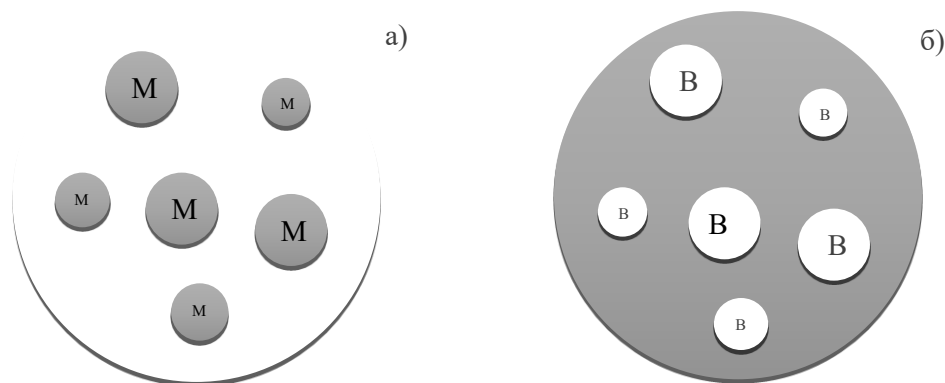


Рисунок 1.1 - Схематическое изображение прямой (а) и обратной НЭ (б)

НЭ являются термодинамически нестабильными системами из-за того, что свободная энергия их образования (ΔG_f) больше нуля.

$$\Delta G_f = \sigma \Delta F - T \Delta S_f \quad (1)$$

где σ - межфазное натяжение на границе раздела капля дисперсной фазы / дисперсионная среда, ΔF – изменение площади межфазной поверхности, T - температура, ΔS_f – изменение энтропии.

Физическая дестабилизация эмульсий связана с избыточной поверхностной энергией и тенденцией системы к уменьшению площади поверхности раздела между двумя несмешивающимися фазами. Уменьшение межфазной поверхности может достигаться посредством: коагуляции, коалесценции капель дисперсной фазы и оствальдова созревания. В результате коагуляции происходит объединение капель дисперсной фазы в агрегаты. При коалесценции две и более капель объединяются в одну с образованием капли большего размера. Оствальдово созревание (или изотермическая перегонка) приводит к увеличению размеров капель дисперсной фазы из-за более высокой растворимости мелких капель по сравнению с более крупными. В случае отсутствия коагуляции или оствальдова созревания, НЭ обладают кинетической стабильностью, т.к. капли дисперсной фазы вовлечены в броуновское движение молекул дисперсионной среды.

ТЛН представляют собой наночастицы, полученные на основе твёрдых при комнатной температуре липидов. Первые патенты на способы производства ТЛН были выданы в 1993 и 1996 годах [18-19].

Физические свойства липидов влияют на размер частиц и стабильность дисперсий. Молекулярная структура липидов оказывает влияние на полиморфную структуру липидных частиц и соответственно на скорость высвобождения инкапсулированных ЛС, а также на стабильность дисперсий.

В литературе представлено множество работ по получению ТЛН, в которых используются различные эмульгаторы, где было показано, что комбинирование различных ПАВ приводит к увеличению агрегативной устойчивости систем. К примеру, ТЛН, стабилизированные смесями ПАВ Lipoid S 75/ полоксамер 188 [20] или тилоксапол / лецитин [21], имеют меньший размер частиц и более высокую стабильность при хранении по сравнению с ТЛН, стабилизированными только с одним из этих ПАВ. Помимо ПАВ на размер ТЛН могут оказывать такие параметры, как температура плавления и скорость кристаллизации липидного ядра [20], гидрофильность липидов [22] и форма кристаллов [23], а также инкапсулирование ЛС и другие факторы.

ТЛН и НЭ являются похожими системами в отношении их состава и методов получения, однако ТЛН нельзя рассматривать как коллоидные дисперсии с затвердевшими каплями. Чаще всего липидное ядро представлено переохлаждённым расплавом, что даёт возможность инкапсулировать в наночастицы большее количество ЛС. Однако в процессе хранения может происходить перекристаллизация липидного ядра в более стабильную конфигурацию, что влияет как на стабильность системы, так и приводит к преждевременному высвобождению ЛС.

НЭ и ТЛН остаются перспективными и широко исследуемыми системами доставки липофильных ЛС. Однако основными проблемами их использования является получение капель и частиц нанометрового размера и устойчивых к агрегации в течение длительного времени

1.2. Методы получения липидных наночастиц

Наиболее распространённые методы получения липидных наночастиц применимы как для НЭ, так и ТЛН. Современные методы получения НЭ и ТЛН можно разделить на высокоэнергетические (горячая и холодная гомогенизация под высоким давлением, диспергирование под действием ультразвука) и низкоэнергетические (температурная инверсия фаз, инверсия фаз при изменении состава, микроэмульсионный метод). Низкоэнергетические методы являются более перспективными, т.к. они не требуют больших затрат энергии и времени на проведение эмульгирования. При инкапсулировании ЛС не происходит разрушения активного компонента при механическом воздействии, а размер капель дисперсной фазы образующихся эмульсий, как правило меньше, чем при использовании высокоэнергетических методов.

1.2.1. Получение липидных наночастиц гомогенизацией под действием высокого давления

Гомогенизация под высоким давлением - это наиболее распространённый высокоэнергетический метод, используемый для получения НЭ и ТЛН [24]. Существуют методы горячей и холодной гомогенизации. В методе горячей гомогенизации ЛС растворяют в расплавленном липиде (температуру выбирают на 5-10 °С выше $T_{пл}$ липидной фазы) с последующим образованием грубой эмульсии путем смешивания горячей липидной фазы и горячего водного раствора ПАВ. Затем грубая горячая эмульсия обрабатывается в гомогенизаторе высокого давления, обычно достаточно 3-5 циклов гомогенизации при 500-1000 атм для получения капель дисперсной фазы нанометрового размера с узким распределением по размерам [25]. Затвердевание липидов проводится путём контролируемого охлаждения [26]. Средний диаметр капель дисперсной фазы при использовании метода горячей гомогенизации под высоким

давлением составляет 80–400 нм, в зависимости от химического состава, количества ПАВ и липидной фазы, а также от температуры, давления и количества циклов гомогенизации [26]. Более крупные частицы образуются при использовании липидов с более высокой $T_{пл}$ и при более высокой концентрации липидов [27-28]. Повышение температуры гомогенизации в данном методе может уменьшить размер частиц, поскольку пониженная вязкость дисперсной фазы способствует лучшему диспергированию капель дисперсной фазы [29]. Однако при повышении температуры, как правило, уменьшается адсорбция ПАВ на поверхности частиц.

Авторами [30] было проведено исследование влияния количества циклов горячей гомогенизации на размер ТЛН из моностеарата глицерина, стабилизированных Span 60. Смесь компонентов пропускали через гомогенизатор (Panda 2K, Gea Niro Soavi) при 75 °С при 300-1500 бар с количеством циклом от 1 до 6. Было показано, что давление сильно влияло на размер ТЛН: при увеличении давления от 300 до 1500 бар средний размер частиц уменьшался от 3 мкм до 90 нм (рисунок 1.2а). При этом увеличение количества циклов гомогенизации приводило как к уменьшению размеров частиц, так и к изменению распределения частиц по размерам от бимодального к мономодальному (рисунок 1.2б).

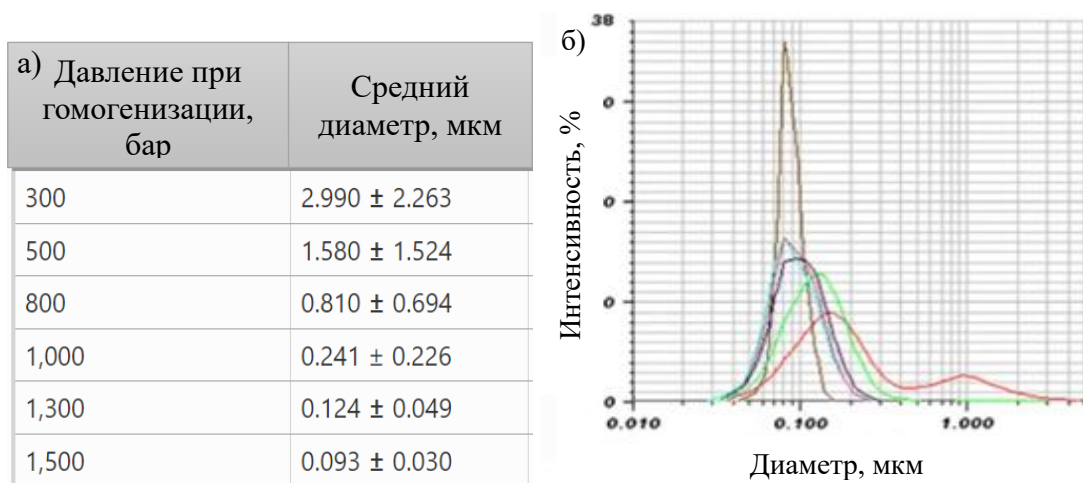


Рисунок 1.2 - а) Влияние давления в гомогенизаторе на размер получаемых ТЛН; б) распределение ТЛН, полученных при давлении 1500 бар, после: красный – один, зеленый – два, темно-синий – три,

фиолетовый - четыре, голубой - пять, коричневый - шесть циклов
гомогенизации [30]

В работе [31] было исследовано влияние давления на размер капель дисперсной фазы при получении НЭ методом горячей гомогенизации. НЭ с дисперсной фазой, состоящей из эфирного масла корицы, стабилизированную модифицированным крахмалом, подвергали гомогенизацией под давлением от 300 до 1200 бар. С увеличением давления средний диаметр капель дисперсной фазы НЭ уменьшался и при давлении 800 бар составлял 100 ± 7 нм (рисунок 1.3). При дальнейшем увеличении давления происходило существенное увеличение размеров капель, что авторы объяснили увеличением температуры в аппарате, которое приводило к коалесценции капель.

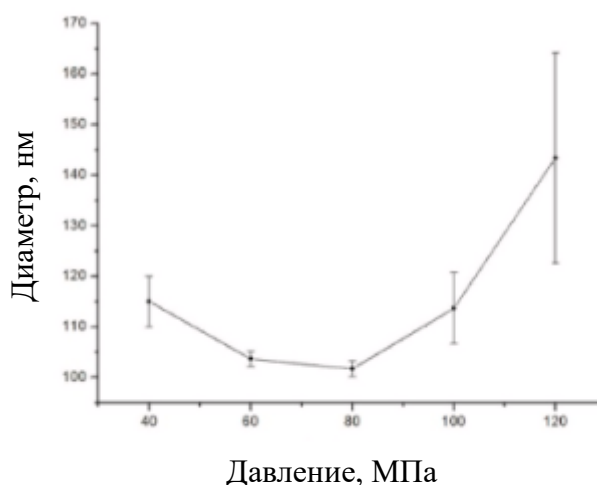


Рисунок 1.3 – Влияние давления на размер капель дисперсной фазы в НЭ, полученных методом горячей гомогенизацией [31]

Для получения ТЛН с ЛС, которые могут разрушаться под воздействием высоких температур, в качестве альтернативного метода был разработан метод холодной гомогенизации под высоким давлением [32]. В данном методе липидный расплав с растворённым в нем ЛС сначала замораживают в жидком азоте или сухом льду, а затем замороженную смесь измельчают

механически до размеров 50–100 мкм (рисунок 1.4). Воздействие низких температур приводит к увеличивают хрупкости липидов и, следовательно, способствуют более глубокому измельчению частиц. Далее смесь диспергируют в растворе ПАВ с температурой 0–4 °С с получением первичной суспензии [26]. Суспензия подвергается гомогенизации под высоким давлением при комнатной температуре или немного ниже, с давлением достаточным, чтобы измельчить твердые микрочастицы до частиц нанометрового размера. При использовании данного метода снижается время теплового воздействия на ЛС, однако, по сравнению с методом горячей гомогенизации, образуются частицы большего размера с большей полидисперсностью [26]. Стоит отметить, что количество работ, связанных с получением ТЛН методом холодной гомогенизацией под давлением незначительно, причем средний размер частиц в большинстве случаев >180 нм.

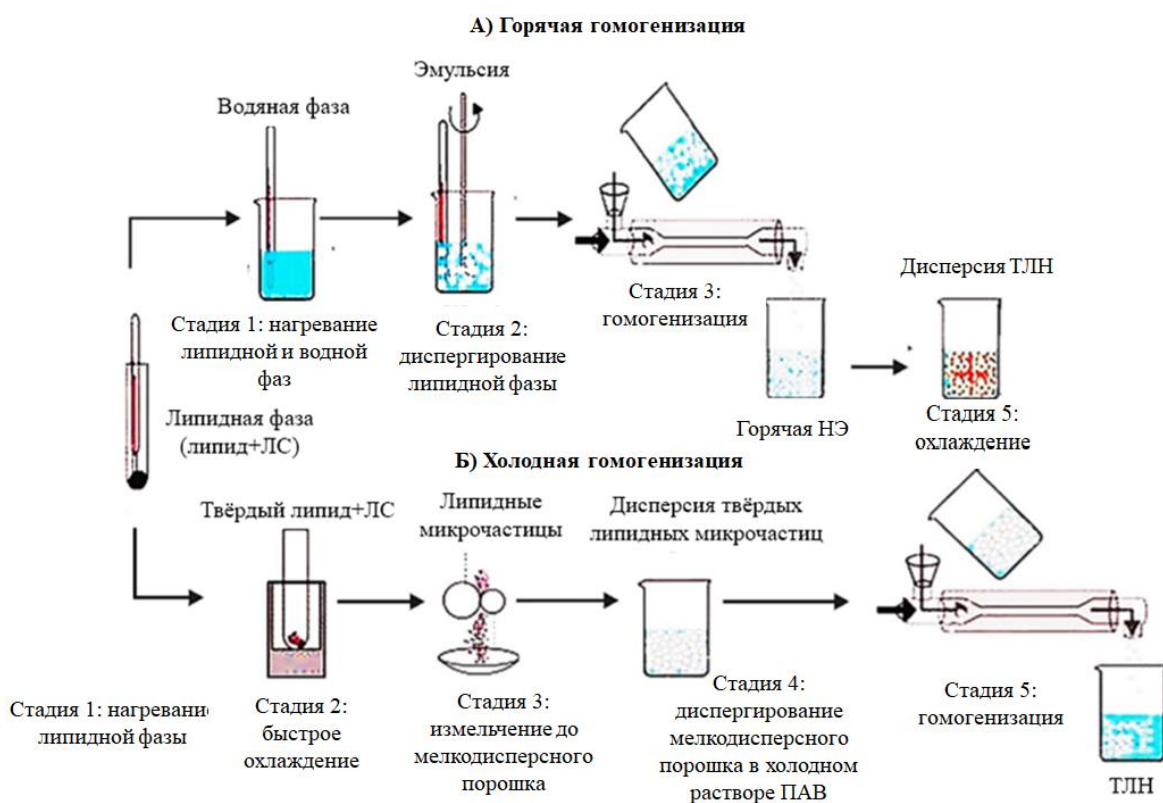


Рисунок 1.4 - Получение липидных наночастиц гомогенизацией под действием высокого давления [33]

Т.к. при нагреве происходит деструкция малой интерферирующей РНК, авторы работы [34] использовали метод холодной гомогенизации под давлением для получения ТЛН из стеариновой кислоты и Compritol® 888 с инкапсулированной РНК. Смесь липидов нагревали до температуры, превышающей температуру плавления компонентов, смешивали с РНК и резко охлаждали в жидком азоте. Затвердевшую смесь измельчали ступкой и диспергировали в водном растворе ПАВ: PEG 600, Poloxamer 188 и Phospholipon® 90G. Полученную грубую дисперсию подвергали 6 циклам гомогенизации под высоким давлением (Emulsiflex C3-15711, Avestin) при комнатной температуре. Средний размер ТЛН составлял 100 ± 7 нм, и было показано, что малая интерферирующая РНК сохраняла свои обезболивающие свойства при трансдермальной доставке.

Основное влияние на размер, форму и полидисперсность липидных частиц, получаемых методом гомогенизации под высоким давлением, оказывают тип гомогенизатора, приложенное давление, количество циклов гомогенизации и температура [35]. Применение данного метода ограничено, если образуются эмульсии с высокой долей дисперсной фазы и вязкостью, т.к. это приводит к образованию частиц большого размера.

Метод гомогенизации под высоким давлением легко масштабируется, но основными недостатками метода являются энергоёмкость процесса. Если используется метод горячей гомогенизации так же возможно разрушение ЛС при воздействии высокой температуры, однако данная проблема решается при использовании метода холодной гомогенизации.

1.2.2. Получение липидных наночастиц диспергированием под действием ультразвука

Ультразвуковой метод получения липидных наночастиц является вторым по популярности высокоэнергетическим методом, используемым для получения липидных наночастиц. Первым этапом данного метода является

нагревание твердых липидов до температуры на 5–10 °С выше их температуры плавления (рисунок 1.5). Далее расплав липидов диспергируют в водном растворе ПАВ при той же температуре и при высокой скорости перемешивания с образованием первичной эмульсии. Далее систему подвергают обработке ультразвуком, в результате чего происходит уменьшение размера капель дисперсной фазы. В случае получения ТЛН следующим шагом является охлаждение горячей эмульсии ниже температуры затвердевания липида.

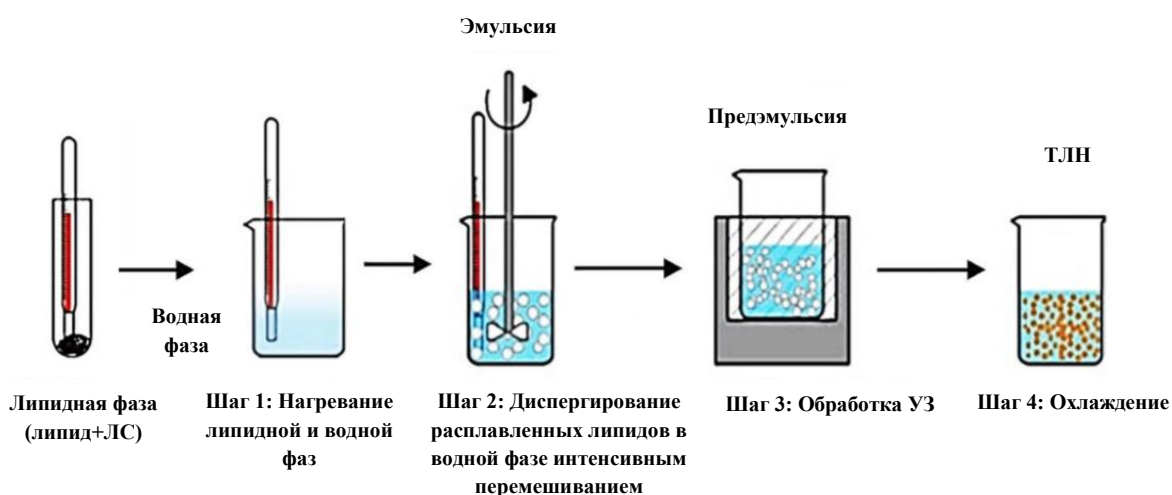


Рисунок 1.5 - Получение липидных наночастиц диспергированием под действием ультразвука [33]

Для получения ТЛН ультразвуковым диспергированием в работе [36] твёрдый липид моностеарат глицерина нагревали выше его температуры плавления на 10 °С. После чего добавляли ЛС рисперидон, а также эфиры жирных кислот ПЭГ и дезоксихолат натрия в качестве ПАВ, нагретых до той же температуры и перемешивали с образованием грубой эмульсии. Далее эмульсию подвергали ультразвуковому диспергированию (VCX130 Sonics) в течение 20 мин. Образовавшуюся НЭ охлаждали до комнатной температуры с получением ТЛН с размером 90 ± 5 нм.

Опубликованы исследования, в которых с помощью ультразвукового метода удалось получить частицы размером 30-180 нм [36, 37], однако чаще

диспергирование ультразвуком недостаточно эффективно, и средний размер частиц превышал 400 нм [38, 39]. Другой проблемой может являться загрязнение суспензии липидных частиц микрочастицами металла волновода-излучателя во время обработки ультразвуком, что не допустимо в системах доставки ЛС. Также недостатком является то, что масштабируемость данного метода ограничена.

1.2.3. Получение липидных наночастиц с помощью метода мембранного эмульгирования

Метод мембранного эмульгирования - это метод, получения капель НЭ на границе раздела мембрана/непрерывная фаза. Капли обычно получают путём продавливания дисперсной фазы под давлением через мембрану или впрыскивания через канал в перпендикулярно-текущий поток жидкости или при принудительном протекании коаксиальной струи двух несмешивающихся жидкостей через узкое отверстие (рисунок 1.6). Для получения эмульсии с более мелкими каплями дисперсной фазы мембранное эмульгирование проводят с предварительным диспергированием с помощью пропускания грубой эмульсии через мембрану с размерами пор, значительно меньше, чем размер капель грубой эмульсии [40].

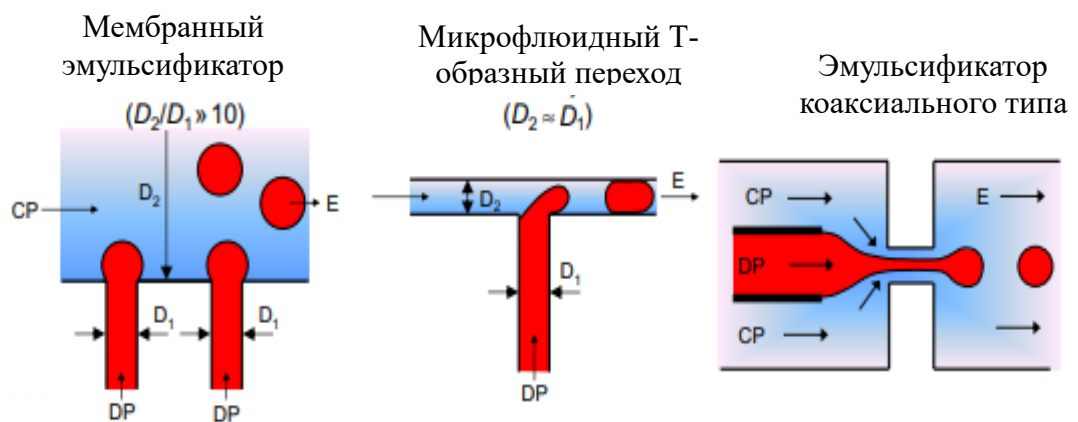


Рисунок 1.6- Варианты принципиальной схемы проведения процесса мембранного эмульгирования [41]

При использовании мембраны с гидрофильной поверхностью возможно получение капель прямой эмульсии нанометрового размера или эмульсии В/М/В, а при использовании с гидрофобной поверхностью происходит инверсия фаз с образованием мелкодисперсной обратной эмульсии или эмульсии М/В/М [42]. Предварительная эмульсия проталкивается под давлением через мембрану или уплотнённый слой однородных частиц, для уменьшения размеров капель дисперсной фазы. Этот метод масштабируем, а размер капель можно регулировать с помощью мембран с различным размером пор.

В работе [43] были получены НЭ типа М/В с дисперсной фазой, состоящей из среднецепочных триглицеридов и стабилизированных Tween 80 и Brij 35 для доставки витамина Е. НЭ получали пропусканием предварительной грубой эмульсии через пористую стеклянную мембрану с размером пор 0,9 мкм. Средний размер капель составлял 78 нм.

Несмотря на то, что в литературе присутствуют работы по получению НЭ с размером капель дисперсной фазы до 100 нм, чаще всего получение наноклапел невозможно. В работе [44] для получения НЭ были использованы поликарбонатные мембраны с размером пор 50, 100 и 200 нм. В качестве дисперсной фазы выступали среднецепочные триглицериды или соевое масло, а в качестве дисперсионной среды использовали водные растворы додецилсульфата натрия (ДСН), полаксомера 188 или полиглицерида. Масляную фазу предварительно диспергировали в растворе ПАВ с помощью гомогенизатора, после чего грубую эмульсию под давлением пропускали через мембраны с размером пор 200 нм, 100 нм и 50 нм. НЭ имели размер от 100 до 200 нм в зависимости от состава эмульсии.

При получении ТЛН первым этапом в методе мембранного эмульгирования является получение горячей грубой эмульсии путём диспергирования нагретых выше температуры плавления липидов в воде с ПАВ. Водная фаза при этом имеет температуру выше температуры плавления

липидов для предотвращения закупорки пор частицами кристаллизовавшегося липида. Полученные капли после этого быстро охлаждаются на ледяной бане с образованием дисперсии наночастиц. Данным методом получали ТЛН Compritol 888 и Gelucire 44/14 со средним диаметром от 50 до 750 нм с использованием пористого стекла с размером пор 0,2 мкм [45]. В работе предварительно гомогенизированную нагретую эмульсию, состоящую из глицерилбегената и додецил сульфата натрия, лаурата сахарозы или полаксомера 188, пропускали через стеклянную пористую мембрану с размером пор 0,2 мкм. При стабилизации с помощью додецилсульфата натрия, средний размер ТЛН составлял 80 нм, при полаксомере 188 188- 950 нм и при лаурате сахарозы- 72 нм.

Метод мембранного эмульгирования является более мягким методом получения НЭ и ТЛН, относительно гомогенизации под высоким давлением, однако основным недостатком мембранных методов является получение липидных наночастиц размером более 100 нм, а также их низкая производительность, т.к. скорость продавливания дисперсной фазы должна быть достаточно низкой, что бы не происходило образования непрерывно вытекающих струй из пор мембраны [46].

1.2.4. Получение липидных наночастиц методом температурной инверсии фаз

Метод температурной инверсии фаз основан на специфическом свойстве этоксилированных ПАВ изменять аффинность к воде и маслу в зависимости от температуры (рисунок 1.8). При низких температурах гидрофильные части этоксилированных ПАВ частично гидратируются. При этом занимаемая ими площадь больше площади, занимаемой гидрофобной частью молекул. Изгиб монослоя ПАВ способствует образованию прямых эмульсий. При повышении температуры происходит дегидратация этиленоксидных групп и площадь, занимаемая углеводородными цепями, становится больше площади, занимаемой полярными группами. В результате этого становится

предпочтительным образование обратной эмульсии. Система проходит через ТИФ, при этом сродство ПАВ к водной и масляной фазам становится равно. При температуре близкой к ТИФ происходит формирование мелких капель из-за низкого межфазного натяжения, однако увеличивается интенсивность их коалесценции [10]. Если в этот момент резко охладить систему, можно получить кинетически стабильные НЭ или ТЛН с узким распределением капель по размерам.

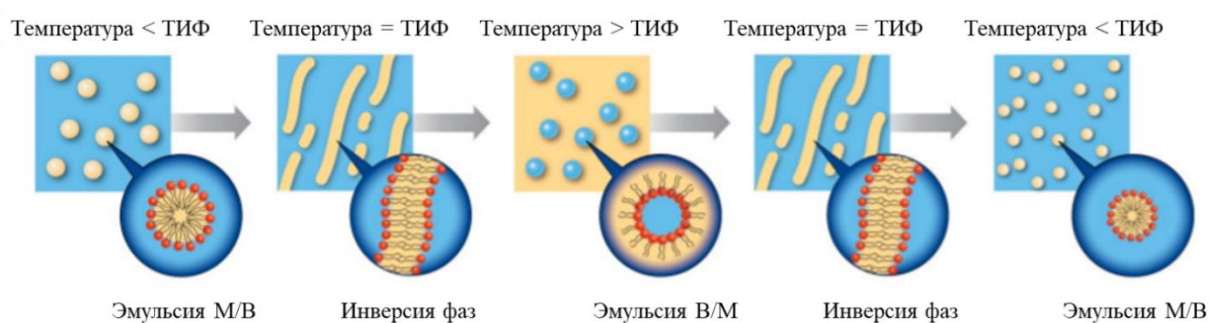


Рисунок 1.8 - Схематическое изображение трансформации капель при протекании ТИФ [47]

ТИФ возможно определить кондуктометрическим методом. Авторы [48] исследовали влияние концентрации ПАВ на температуру инверсии фаз в системе гексадекан / $C_{12}EO_4$ / водный раствор NaCl. Смесь нагревали до 70 °С, затем систему постепенно охлаждали при постоянном перемешивании с измерением электропроводности. На рисунке 1.9 показано изменение электропроводности эмульсий с концентрацией гексадекана 20 мас.% и различными концентрациями $C_{12}EO_4$.

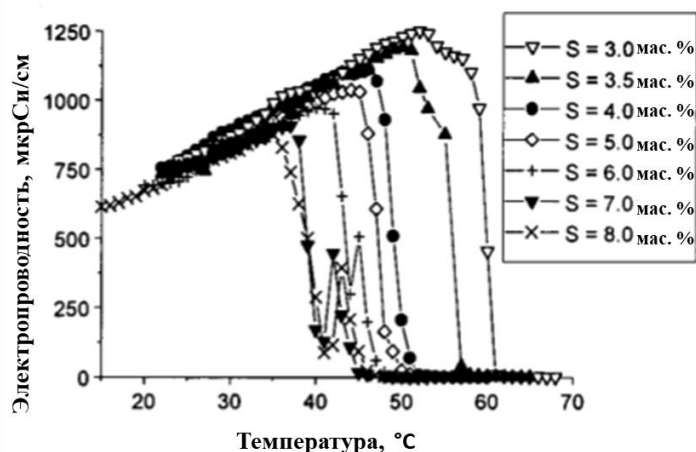


Рисунок 1.9 - Зависимости электропроводности системы от температуры. Концентрация гексадекана 20 мас.%, S - концентрация $C_{12}EO_4$ 3-8 мас.% [48]

При всех концентрациях ПАВ электропроводность эмульсии сначала увеличивалась с повышением температуры, достигая максимума, а затем резко уменьшалась. Это связано с тем, что до достижения ТИФ эмульсия являлась прямой и дисперсионная среда, состоящая из раствора NaCl, обладала высокой электропроводностью. При увеличении температуры электропроводность возрастала, что связано с увеличением подвижности ионов соли в растворе. После достижения ТИФ происходила инверсия фаз и эмульсия становилась обратной. При этом наблюдалось резкое уменьшение электропроводности, которое связано с изменением типа дисперсионной среды.

При концентрациях ПАВ 3-5 мас.% наблюдалось резкое снижение электропроводности при дальнейшем повышении температуры. При концентрациях ПАВ 6, 7 и 8 мас.% снижение проводимости после достижения максимума не было неравномерным и можно было наблюдать еще один явно выраженный максимум. Наличие второго пика на кривых при высокой концентрации ПАВ авторы связывали с наличием жидкокристаллических фаз. В данном случае переход от систем М/В к

системам В/М проходило через L_{α} (ламеллярную жидкокристаллическую) и L_3 (бинепрерывную) фазы.

В работе [49] были получены ТЛН методом температурной инверсии фаз (рисунок 1.10). Триглицериды каприловой и каприновой кислот смешивали с экстрактом кофеина в качестве ЛС при температуре 85 °С. После этого в систему добавляли ПАВ: Kolliphor® HS 15 и Phospholipon® 90G и водный раствор NaCl. Смесь компонентов нагревали выше температуры плавления и охлаждали путём добавления водной фазы с температурой 0–2 °С при интенсивном перемешивании. Средний размер полученных ТЛН составлял 50-60 нм.

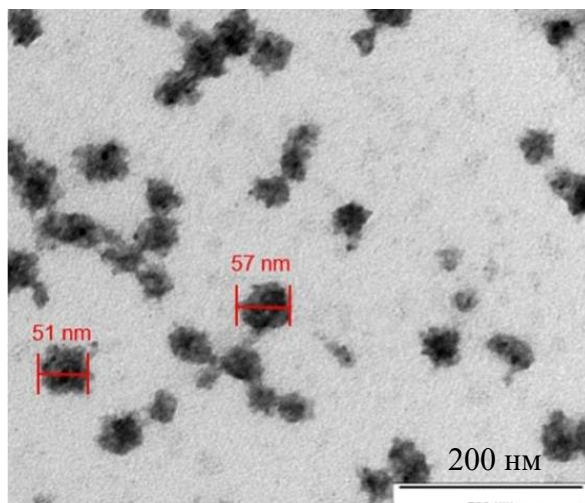


Рисунок 1.10 - ТЭМ-микротография ТЛН с инкапсулированным экстрактом кофеина, полученных методом температурной инверсии фаз [49]

Размер получаемых методом температурной инверсией фаз капель зависело от того, до какой температуры происходило охлаждение. В работах [50] [51] показано, что при резком охлаждении системы на 20-30 °С ниже ТИФ происходит образование капель дисперсной фазы НЭ меньшего размера и с меньшей полидисперсностью, чем при медленном охлаждении системы.

В настоящее время метод температурной инверсии фаз широко применим, однако при использовании ионогенных и неионогенных ПАВ, ГЛБ которых слабо зависит от температуры данный метод не применим.

1.2.5. Методы получения липидных наночастиц с применением органических растворителей

Существует несколько методов получения НЭ и ТЛН с использованием органических растворителей: эмульгирование-испарение растворителя и эмульгирование с диффузией растворителя.

Метод *эмульгирования-испарения растворителя* основан на кристаллизации липидов из эмульсий типа М/В. Липид и ЛС растворяют в органическом не смешивающемся с водой растворителе, например, хлороформе. Органический раствор перемешивают в водной фазе с ПАВ на магнитной мешалке с образованием эмульсии типа М/В. Затем органический растворитель из этой эмульсии выпаривают при низком давлении. Это вызывает кристаллизацию липидов с ЛС в форме ТЛН (рисунок 1.11). Данным методом можно получить частицы диаметром 25-100 нм с узким распределением по размерам. Основными недостатками являются возможность получения НЭ и ТЛН с небольшой концентрацией дисперсной фазы в органическом растворителе и использование органических растворителей как таковых. Этот метод подходит для инкапсулировании термочувствительных ЛС из-за отсутствия температурного воздействия.

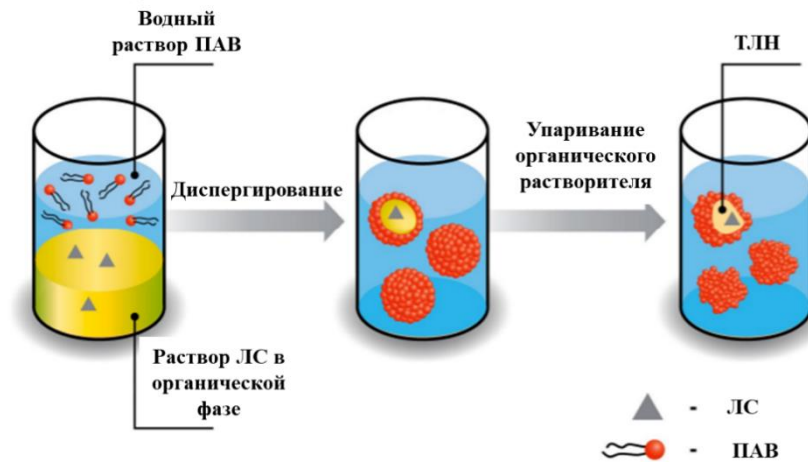


Рисунок 1.11 - Получение липидных наночастиц методом эмульгирования-испарения растворителя [47]

Авторы [52] получали ТЛН из трипальмитина и смеси ПАВ (соевый лецитин, Tween 20 и натрий дезоксихолат) методом эмульгирования-испарения растворителя для адресной доставки ЛС. Трипальмитин, лецитин и ЛС растворяли в дихлорметане, а затем добавляли к водной фазе, содержащей Tween 20 и дезоксихолат натрия. Затем дисперсию гомогенизировали и выдерживали при перемешивании в течение 4 ч при комнатной температуре до полного испарения дихлорметана. Средний размер частиц составлял 110 ± 8 нм (индекс полидисперсности $< 0,2$) и ζ -потенциал -35 мВ.

Метод *эмульгирования с диффузией растворителя* основан на эмульгировании частично смешивающегося с органическим растворителем (например, бутиллактат, бензиловый спирт) твердого липида и ПАВ в водном растворе. Насыщенный водой органический растворитель смешивают с липидом и диспергируют в водной фазе при непрерывном перемешивании, что приводит к затвердеванию дисперсной фазы с образованием ТЛН из-за диффузии органического растворителя под действием градиента концентрации из капель в дисперсионную среду.

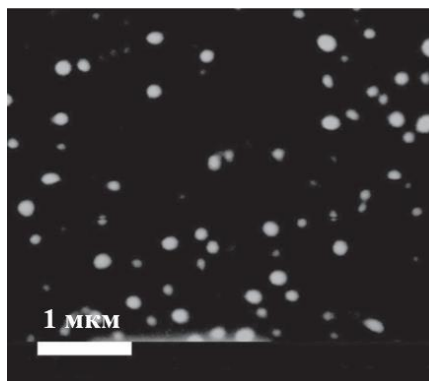


Рисунок 1.12 – СЭМ-микрофотография липидных частиц Gelucire ® 44/14 [53]

В работе [53] были получены ТЛН, содержащие циклоспорин, методом эмульгирования с диффузией растворителя. Этилацетат с растворённым в нем Gelucire ® 44/14 и циклоспорином, смешивался с водой и поливиниловым спиртом, в качестве ПАВ. Систему интенсивно перемешивали на магнитной мешалке. Затем добавляли воду, чтобы растворитель диффундировал во внешнюю фазу, вызывая тем самым кристаллизацию липида и последующее образование ТЛН. Растворитель из дисперсионной среды удаляли вакуумной перегонкой. В результате были получены липидные частицы из Gelucire ® 44/14 диаметром 240-310 нм с узким распределением по размерам (рисунок 1.12). Эффективность инкапсулирования циклоспорина превышала 92%.

1.3. Стабильность липидных наночастиц

При получении НЭ и ТЛН для фармацевтического применения важной задачей является получение устойчивых к агрегации и седиментации в течении длительного времени систем с нанометровым размером частиц и низким индексом полидисперсности.

В том случае, если силы притяжения между каплями дисперсной фазы или частицами в НЭ или ТЛН превышают силы отталкивания, наблюдается коагуляция. Исследования поверхностных сил, которые действуют в

прослойках дисперсионной среды между каплями НЭ или ТЛН, могут оценить устойчивость систем к коагуляции.

В зависимости от используемого типа ПАВ различают стерическую и электростатическую стабилизацию НЭ и ТЛН. При адсорбции на поверхности каплей дисперсной фазы или частиц ионогенных ПАВ реализуется электростатическая стабилизация, неионогенных - стерическая [54, 56]. Сочетание двух механизмов стабилизации может быть более полезным для получения стабильной НЭ или коллоидной дисперсии [54] [57]. Стабилизация за счёт электростатического отталкивания может быть описана классической теорией Дерягина – Ландау – Фервея – Овербека (ДЛФО) [58, 59]. Однако ионогенные ПАВ являются более токсичными, что необходимо учитывать при получении липидных наночастиц для медицинского применения.

В работе [60] исследовалось влияние неионогенных ПАВ на размер каплей дисперсной фазы НЭ. В качестве дисперсной фазы использовались масла природного происхождения, а в качестве стабилизаторов Tween 20, Tween 80 и Tween 85. Показано, что при увеличении соотношения ПАВ : М от 0,65 до 2,5 происходит уменьшение размеров каплей дисперсной фазы. При этом к образованию более мелких каплей приводило использование смеси ПАВ Tween 20 + Tween 80 + Tween 85.

Было показано, что при использовании Eumulgin O10 и Carbopol 940 в качестве ПАВ в диапазоне концентраций от 0,05 до 0,33 мас.%, происходит образование ТЛН из парафина, размером 190 нм [61]. При этом использование только Eumulgin O10 с концентрацией 0,5 мас.%. в качестве стабилизаторов приводит к образованию частиц размером 460 нм. Уменьшение или увеличение концентрации данной смеси ПАВ в диапазоне от 0,2 до 0,7 мас.% приводит к получению частиц размером более 2 мкм, что вероятно связано с недостаточным количеством стабилизатора в первом случае и образованием мостиковой флокуляции, приводящей к коалесценции

во втором. В работе [62] также было показано, что применение комбинации эмульгаторов приводит к более эффективной стабилизации дисперсии ТЛН.

В работе были получены НЭ с олеиновой кислотой, со средним диаметром капель дисперсной фазы 72 нм. При соотношении Tween 80 : олеиновая кислота 2:1 и доле дисперсной фазы 7 мас.% НЭ были стабильны более года [63].

На эффективность стабилизации при использовании ионогенных ПАВ могут влиять рН и концентрации электролита в дисперсионной среде, что делает их применение более ограниченным в системах доставки ЛС, в отличие от неионогенных ПАВ. В работе [64] были получены НЭ методом температурной инверсии фаз с дисперсной фазой из изопропилмиристата, стабилизированные лаурет-11-карбоновой и лауриновой кислотой с размером капель дисперсной фазы 20 нм. Показано, что изменение рН дисперсионной среды существенно влияет на агрегативную устойчивость НЭ. Увеличение рН способствовало дестабилизации НЭ, тогда как исходная НЭ, полученная при рН 2,5 оставалась стабильной. Вероятнее всего увеличение рН приводило к депротонированию карбоксильной группы ПАВ, в результате чего происходило изменение первоначальной упаковки молекул ПАВ в адсорбционном слое и обращение неоионогенного стабилизатора ($\zeta=0$ при низком рН) в анионогенный ($\zeta<0$ при увеличении рН).

Проведено исследование влияния рН дисперсионной среды на стабильность и ζ -потенциал ТЛН из гидрогенизированного соевого масла, стабилизированных неионогенными ПАВ Tween 20 [65]. Показано, что средний размер ТЛН и ζ -потенциал оставались постоянными при изменении рН в диапазоне от 2 до 12. При этом при рН 2 наблюдалось увеличение размеров частиц, что может быть связано с протонированием эфирной связи в полиоксиэтиленовых цепях Tween 20 в кислой среде, что вызывает снижение адсорбции ПАВ на поверхности наночастиц.

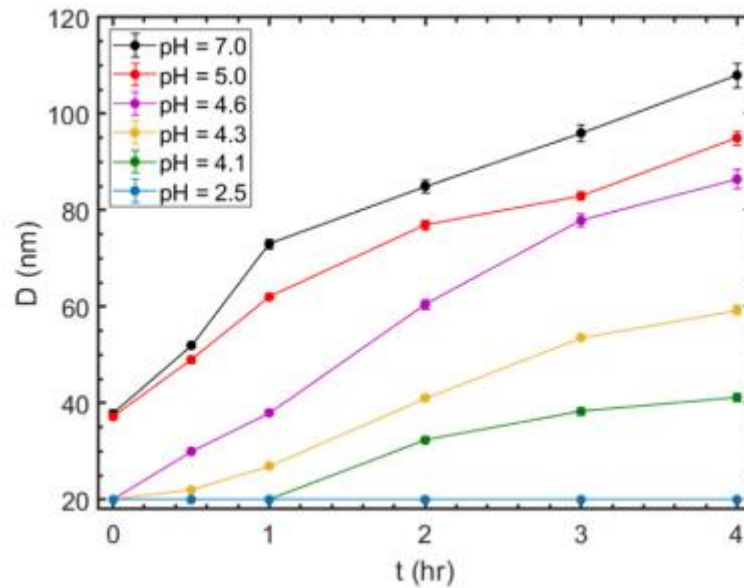


Рисунок 1.13- Стабильность НЭ при комнатной температуре в зависимости от рН дисперсионной среды [64]

При коагуляции системы липидных наночастиц может происходить седиментация. Если плотность капель дисперсной фазы или частиц ниже плотности дисперсионной среды, то происходит прямая седиментация и всплывание агрегатов на поверхность, если больше- обратная седиментация и осаждение. В случае, когда системы НЭ или ТЛН обладают агрегативной устойчивостью, седиментация отсутствует, т.к. капли/частицы вовлечены в броуновское движение молекул дисперсионной среды.

1.3.1. Процессы, приводящие к расслаиванию наноэмульсий

НЭ – термодинамически нестабильные дисперсные системы, для которых характерно укрупнение капель дисперсной фазы с течением времени. Однако время существования НЭ может значительно варьироваться от минут до нескольких лет, в зависимости от природы ПАВ и природы обеих фаз.

После получения укрупнение капель дисперсной фазы НЭ может происходить по двум механизмам. Первый механизм остwaldово созревание [66], обусловлен различием химических потенциалов веществ внутри капель

дисперсной фазы, имеющих разный радиус. С уменьшением диаметра капель растворимость дисперсной фазы в дисперсионной среде увеличивается. При этом в НЭ всегда существует распределение капель по размерам, а значит более мелкие капли дисперсной фазы будут менее устойчивы к оствальдову созреванию.

Скорость роста капель может определяться молекулярной диффузией через непрерывную фазу и/или проникновением через пленки ПАВ. Скорость роста капель из-за оствальдова созревания была впервые описана Лифшицем, Слёзовым и Вагнером [67, 68]. Изначально теория предполагала бесконечное разбавление систем, при котором капли (капли имели сферическую форму) не участвуют в броуновском движении. Однако в реальных дисперсных системах концентрация дисперсной фазы не равна нулю, поэтому, происходит перекрывание диффузионных слоев, и скорость оствальдова созревания увеличивается. В более поздних уточнениях теории Лифшица-Слёзова-Вагнера с учетом совместного влияния капель на скорость оствальдова созревания было показано, что при $\phi < 0,05$ скорость можно считать постоянной, что подтверждается экспериментально [69, 70].

Снижение скорости оствальдова созревания возможно за счет использования в качестве дисперсной фазы веществ с низкой растворимостью в дисперсионной среде. В работе [71] было показано, что с увеличением длины цепи n-алкана, использованного в качестве дисперсной фазы при получении НЭ, снижалась скорость оствальдова созревания. Другой метод- добавление второго компонента в дисперсную фазу, который обладает меньшей растворимостью в дисперсионной среде, в сравнении с основным. При этом при растворении и переходе в более крупные капли основного компонента, второй будет концентрироваться в мелких каплях. В результате этого, когда разность химических потенциалов между каплями разного размера будет сбалансирована, установится равновесие.

Второй механизм укрупнения капель НЭ- коалесценция. Коалесценция- это слияние двух и более капель дисперсной фазы с образованием единой

капли. Коалесценция может происходить при недостаточной стабилизации, когда при сближении капель дисперсной фазы происходит истощение межкапельной плёнки дисперсионной среды с последующим разрывом адсорбционного слоя и слиянием капель. Показано, что если распределение капель НЭ по размерам после получения и в последующие моменты времени описывается гауссовским распределением, то при протекании процессов коалесценции зависимость обратной величины площади поверхности от времени будет иметь линейный характер [72].

1.3.2. Процессы дестабилизации дисперсий твёрдых липидных наночастиц

Физическая нестабильность ТЛН может быть связана с кристаллическим состоянием липидного ядра. Повышение стабильности липидного ядра и уменьшение включения ЛС в липидные наночастицы наблюдается при увеличении степени кристалличности [15]. ТЛН с разной модификацией липидного ядра проявляют разные физические свойства, представленные в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Свойства липидных наночастиц в зависимости от фазового состояния липидного ядра [47]

Состояние липида	Загрузка ЛС	Агрегативная стабильность	Форма частиц
Жидкий переохлажденный расплав	Самая высокая	Самая низкая	Сферические
α -модификация	Высокая	Низкая	Сферические
β' -модификация	Низкая	Высокая	Сферические
β -модификация	Самая высокая	Самая высокая	Дискообразные и игольчатые

При быстром охлаждении системы липиды кристаллизуются в α -модификации или образуют переохлажденный расплав. Во время хранения

происходит переход от менее стабильных кристаллических модификаций или переохлажденного состояния к более стабильным β' - и β -модификациям [73]. Это приводит к образованию более упорядоченных и стабильных кристаллических структур в липидах. Т.к. ТЛН с ядром, которое находится в более стабильной модификации, обладают более низким уровнем загрузки ЛС, после перекристаллизации может происходить высвобождение ЛС. Более того, преобразование в более упорядоченные кристаллические структуры вызывает изменение формы частицы со сферической на пластинчатую или игольчатую. Преобразование формы приводит к увеличению общей площади поверхности, недостаточности ПАВ и агрегации частиц (рисунок 1.17).

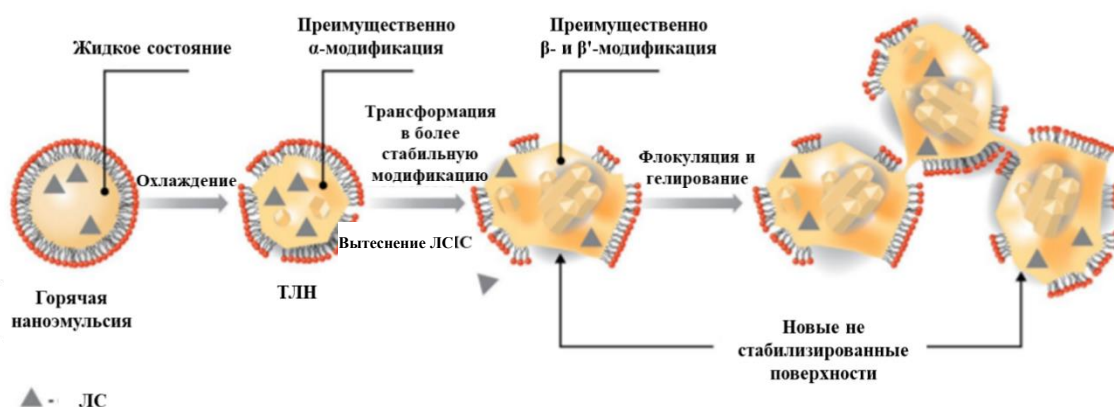


Рисунок 1.17 - Возможные изменения модификации липидов и, как следствие, процессы дестабилизация ТЛН во время хранения [47]

Причины и скорость перехода одной модификации в другую изучено не до конца. Иногда переход может быть быстрым при контакте с различными поверхностями, при изменении условий хранения или при испарении дисперсионной среды [74, 75].

При переходе одной модификации в другую и изменении формы частиц может происходить гелеобразование систем ТЛН - переход маловязкой коллоидной суспензии в вязкий гель. Образование новой формы частиц способствует флокуляции за счёт гидрофобного притяжения липидов на

участках без ПАВ и постепенному формированию сетки геля из наночастиц сохраняющих при этом свою целостность [76, 77]. Этот эффект может вызвать существенное увеличение вязкости дисперсий.

Авторы [74] исследовали влияние температуры хранения и освещения на процесс гелеобразования. Также было исследование влияние встряхивания на процесс агрегации и гелеобразования в системах с разной концентрацией липидных наночастиц. ТЛН получали методом горячей гомогенизацией под высоким давлением из 10 мас.% Compritol 888 (смесь 12–18% моно-, 52–54% ди- и 28–32% триглицеридов), 1,2 мас.% Pluronic F68 (полосамер 188) и воды. Часть образцов разбавляли до 2 и 5 мас.% липида и определяли размер и степень кристалличности липидных ядер.

Для определения кинетики гелеобразования ТЛН подвергали встряхиванию в шейкере, чтобы вызвать гелеобразование в течение короткого времени. Чтобы вызвать ТЛН хранили в шейкере при 20°C и с частотой качания 70 об/мин. Размер частиц и степень кристалличности определяли каждые сутки в течение 2 недель (рисунок 1.18).

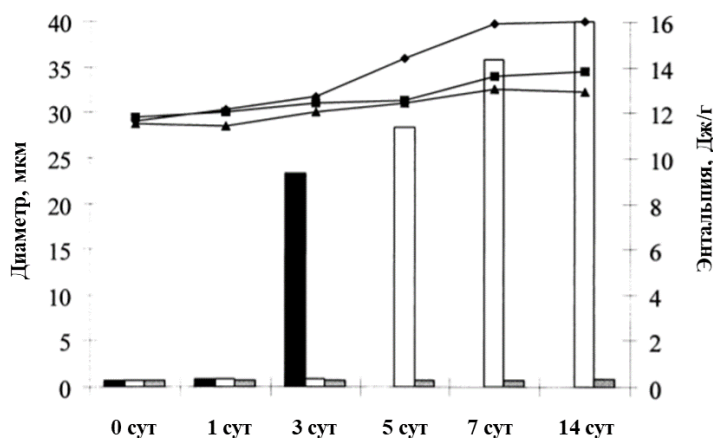


Рисунок 1.18 – Изменение размера и энтальпии плавления ТЛН при хранении с непрерывным качанием со скоростью 70 об/мин. Диаметр (столбцы) и энтальпия фазового перехода липидного ядра (линии) 10 мас.% (черный, \blacklozenge), 5 мас.% (белый, \blacksquare) и 2 мас.% (серый, \blacktriangle) ТЛН [74]

В более концентрированных образцах с течением времени происходила перекристаллизация липидного ядра, при этом более концентрированные образцы быстрее агрегировали при постоянном перемешивании, чем менее концентрированные: в образцах, содержащих 10 мас.% ТЛН на 5 сут наблюдалось образование видимых хлопьев. Это можно объяснить изменением формы частиц в результате перекристаллизации. Авторы предположили, что при более низкой концентрации частиц вероятность столкновения ниже, что снижает скорость агрегации во время процесса встряхивания.

Также были установлены следующие закономерности: во-первых, скорость гелеобразования зависит от интенсивности воздействия света при хранении - чем выше интенсивность, тем выше скорость. Во-вторых, увеличение температуры хранения образцов способствовало увеличению скорости гелеобразования. При хранении при 50 °С в темноте образцы образовывали плотные гели в течение 1 недели, при комнатной температуре - в течение 3 месяцев. Образцы, хранившиеся при 8°С оставались стабильными 3 года. Вероятнее всего любой ввод энергии дестабилизирует систему и приводит к образованию сетки геля.

Добавление избыточного количества ПАВ может решить проблему агрегации и гелеобразования в процессе полиморфного перехода, за счет его адсорбции на образованных поверхностях [78]. Однако для этого требуется использование высоких концентраций ПАВ, что нежелательно из-за возрастающей токсичности при медицинском применении ТЛН. В работах [79-81] было показано, что использование насыщенных и ненасыщенных фосфолипидов может снижать скорость полиморфного перехода и, следовательно, увеличивать физическую стабильность липидных наночастиц. Однако в процессе получения ТЛН, стабилизированных фосфолипидами зачастую происходило образование везикул. В работе [82] были получены устойчивые к полиморфным переходам ТЛН трипальмитина, стабилизированные фосфолипидами и солями желчных кислот, к примеру,

гликохолатом натрия, которые способны разрушать везикулы. Недостатком данных систем является дороговизна солей желчных кислот и их горький вкус, что ограничивает их применение при пероральном способе введения.

Добавление электролитов в дисперсионную среду может также привести к агрегации и гелеобразованию [74]. $AlCl_3$, $CaCl_2$, $NaCl$ в различных концентрациях добавляли к ТЛН из Compritol, что приводило к дестабилизации дисперсии. Выраженный дестабилизирующий эффект наблюдался при увеличении концентрации электролита и повышении валентности катиона, т.е. в ряду $Al^{3+} > Ca^{2+} > Na^+$. Вероятно, добавление электролита в дисперсионную среду приводило к сжиманию диффузных слоёв ДЭС и снижению электростатического отталкивания, что способствовало полиморфному переходу в ядре ТЛН и агрегации.

1.4. Области применения липидных наночастиц

1.4.1. Применение наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц в фармацевтической отрасли

Для получения НЭ используют триглицериды с разной длиной цепи: реэтерифицированные фракции, полученные из соевого [83], кунжутного [84], хлопкового [85], сафлорового масел [86] и др. В качестве дисперсной фазы может быть также использованы D- α -токоферол (витамин E) [87], олеиновая кислота и этилолеат [88]. Были предприняты попытки получить НЭ с рыбными жирами (лососевое масло) в качестве липидной фазы [89]. В работе [90] исследовали влияние размера капель на биодоступность НЭ с инкапсулированным куркумином. Было показано, что более высокая степень инкапсулирования ЛС достигалась в НЭ, полученных из триглицеридов с длинной и средней длиной цепи, в отличие от триглицеридов с короткими цепями. Липиды, используемые для получения ТЛН, включают простые липиды, такие как жирные кислоты, моноглицериды и диглицериды жирных кислот, триацилглицерины, смеси глицеридов и воски [26].

Таблица 1.2 - Применение НЭ и ТЛН для доставки ЛС

Система доставки	Дисперсная фаза	ПАВ	Доставляемое лекарственное соединение	Размер, нм	Ссылка
НЭ	Парафиновое масло	Tween 80, Span 80	-	20-280	[58]
НЭ	Парафиновое масло	Tween 80, Span 80, Tween 60	-	22-34	[112]
НЭ	Олеиновая кислота, олеат натрия	Tween 80	Карвакрол	19-177	[113]
НЭ	Олеиновая кислота	Полиоксиэтиленлауриловый эфир	-	15-246	[114]
НЭ	Касторовое масло, эвкалиптовое масло, олеиновая кислота	Tween 20, Tween 60, Tween 80	Дугастерид	20–200	[88]
НЭ	Олеиновая и линолевая кислоты	Tween 20	Лютеин	110	[115]

Продолжение таблицы 1.2

НЭ	Транскутол, Олеиновая кислота	Tween 80, Span 20, Пропиленгликоль	Целекоксиб	7-26	[116]
НЭ	Олеиновая кислота	Tween 80, маннид моноолеат,	Монофосфориллипид А,	154	[117]
НЭ	Олеиновая кислота,	Яичный лецитин, стеарил амин	Доцетаксел	190-230	[118]
НЭ	Кунжутное масло	Tween 20, Tween 80	Эвгенол	13	[84]
НЭ	Кунжутное и соевое масла, олеиновая кислота, изопропилмиристат	Лабразол, Span 80, Tween 80	Пироксикам	10-200	[119]
НЭ	Олеиновая кислота	Полаксомер 188, поли-L-аргинин, Span 80	Инсулин, панкреатин	233-310	[119]
НЭ	Соевое масло	Лецитин, ПЭГ	Доксорубицин	44-126	[83]
ТЛН	Стеариновая кислота	Tween 80, Span 80, Span 60	Спинолактон	88-535	[120]

Продолжение таблицы 1.2

ТЛН	Парафин	Tween 80, додецилсульфат натрия	Растительные липиды	128	[121]
ТЛН	Моностеарат глицерина, стеариновая кислота	Tween 80, полаксамер 188	Эмодин	29	[122]
ТЛН	Стеариновая кислота, трипальмитин	Erikuron 200, таурохолат натрия	Доксорубицин	80	[123]
ТЛН	Стеариновая кислота	Лецитин, Myrj59	Фосфосулиндак	55	[124]
ТЛН	Стеариновая кислота	Erikuron 200	Гидрокортизон и прогестерон	70	[125]
ТЛН	Стеариновая кислота	Лецитин	Паклитаксел и танеспимицин	80	[126]
ТЛН	Стеариновая кислота	Моностеарат глицерина и полаксомер 188	Цират тамоксифена	130-224	[127]
ТЛН	Стеариновая кислота	Соевый лецитин, полаксамер 407	Ресвератрол	137-166	[128]

Продолжение таблицы 1.2

ТЛН	Стеариновая кислота	Полаксомер 188, гидрохлорид натрия	Хлорамбуцил	146	[129]
ТЛН	Стеариновая кислота	Tween 80, дезоксихолатом натрия	Левифлоксацин	229-241	[98]
ТЛН	Стеариновая кислота	Полаксомер 188, лецитин	Паклитаксел	250	[130]
ТЛН	Стеариновая кислота	ПВС	Рифампицин, изониазид и пиразинамид	300	[131]
ТЛН	Стеариновая кислота	Полаксомер 188, Tween 80	Люмефантрин	350-760	[132]

При сравнении ТЛН из воска и глицерида показано, что суспензия наночастиц воска обладает большей агрегативной и седиментационной устойчивостью [133]. Однако лекарственная нагрузка ТЛН из глицерида была на порядок выше.

ТЛН из стеариновой кислоты и ПВС исследовались *in vivo* на морских свинках для бронхоальвеолярной доставки ЛС против туберкулёза [131]. После однократного применения терапевтические концентрации препарата сохранялись в плазме крови в течение 5 сут и в органах (легких, печени и селезенке) в течение 7 дней, тогда как свободные препараты выводились через 1-2 дня. Сходный фармакокинетический профиль наблюдался у морских свинок, инфицированных микобактериями туберкулеза. При применении ТЛН с ЛС инфицированным морским свинкам туберкулезные бактерии не обнаруживались в легких/селезенке после 7 ежедневных доз лечения, тогда как для получения эквивалентного терапевтического эффекта при использовании свободного ЛС) требовалось 46 ежедневных доз перорально вводимых лекарств.

Липидные наночастицы защищают инкапсулированные ЛС от разложения при пероральном использовании, а также способствуют улучшенному всасыванию слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта [134]. При этом показано, что уменьшение размеров частиц приводит к усилению всасывания через монослойные клетки желудка [135]. Существуют исследования, показывающие, что глицериды и жирные кислоты, входящие в состав ТЛН улучшают всасывание ЛС микроскладчатыми клетками эпителия кишечника, что снижает метаболизм первого прохождения [136].

Авторами [127] были получены ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированные моностеаратом глицерина и полаксомером 188, с инкапсулированным циратом тамоксифена, который является

противоопухолевым препаратом, тормозящим развитие эстрогензависимых опухолей. Средний размер частиц составлял 130 ± 9 нм (Рисунок 1.19а). ТЛН проявляли улучшенную цитотоксичность в отношении клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7 в сравнении со свободным ЛС. Также было показано, что пероральная биодоступность суспензий, нагруженных цитратом тамоксифена увеличивается на 160,61% по сравнению с аптечным препаратом.

В работе [126] также были получены ТЛН из стеариновой кислоты (Рисунок 1.19б) и лецитина с инкапсулированными паклитакселом и танеспимицином, которые являются противораковыми соединениями и антибиотиком соответственно. Показано, что нагруженные ТЛН индуцируют апоптоз в различных раковых клеточных линиях, при этом комбинированное введение ЛС приводило к синергетическому противораковому эффекту, вероятно за счёт повышения уровня окислительного стресса.

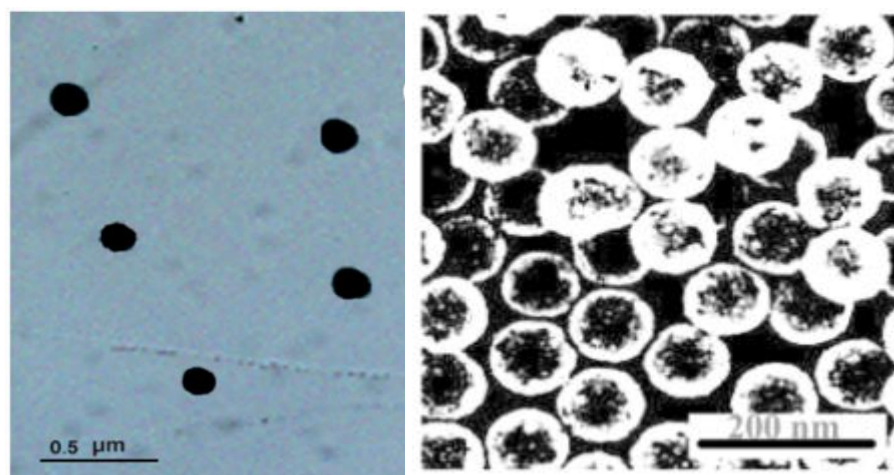


Рисунок 1.19 – СЭМ-изображения [127] [126]

В работе [16] были получены НЭ, содержащие в дисперсной фазе смесь масла мирры и олеиновой кислоты, загруженные аторвастатином, применяемым для снижения концентрации холестерина в крови. Для защиты инсулина от разложения в кислой среде желудка были исследованы НЭ из олеиновой кислоты, покрытые поли-L-аргинином [137].

Инкупсулирование нестероидного противовоспалительного препарата пироксикама в НЭ с дисперсной фазой, состоящей из смеси кунжутного и соевого масел, олеиновой кислоты, изопропилмиристата и ПАВ (лабразол, Span 80 и Tween 80) приводило к снижению нежелательных побочных эффектов на желудок и почки [119].

При трансдермальной доставке ЛС НЭ и ТЛН имеют ряд преимуществ: они действуют как окклюзионные повязки, уменьшая трансэпидермальную потерю воды и способствуя гидратации слоя кожи, что полезно при лечении кожных инфекций, например, длительно протекающей атопической экземы [138]. НЭ и ТЛН могут быть использованы в виде крема, мази, паст или в составе пропитки пластырей [139]. Помимо этого, липидные наночастицы могут взаимодействовать с липидами рогового слоя кожи, что приводит к их псевдооживлению и увеличению коэффициента диффузии ЛС [140]. К примеру, для улучшения проницаемости в слой дермы кожи в НЭ могут быть инкапсулированы такие соединения как капсоцин [141] или глицерил моностеарат [142].

В работе [143] было исследовано трансдермальное проникновение НЭ с инкапсулированным родамином В *in vivo*. Средний диаметр капель составлял 53 ± 5 нм. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия выявила усиленное проникновение родамина В в более глубокие слои кожи. Показано, что использование НЭ значительно увеличивает биодоступность (в 1,23 раза) ЛС по сравнению с пероральной лекарственной формой благодаря лучшему проникновению через кожу крыс.

В зависимости от строения, в липидных наночастицах может быть реализован взрывной эффект высвобождения ЛС, обеспечивающий быстрое проникновение ЛС в нижние слои эпидермиса, или же пролонгированное высвобождение, при котором снижаются побочные эффекты и раздражающее действие активных соединений [144]. Авторами [145] было исследовано влияние ПАВ на механизм высвобождения ЛС из ТЛН стеариновой кислоты. Показано, что стабилизация наночастиц с помощью

цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) приводило к пролонгированному высвобождению гидрохинона, который используется для лечения гиперпигментации. При стабилизации ТЛН лаурилсульфатом натрия происходило взрывное высвобождение ЛС, что вероятно связано с быстрой перекристаллизацией липидного ядра.

Было показано, что ТЛН из стеариновой кислоты и EpiKuron 200 со средним размером 70 нм способствуют пролонгированному высвобождению гидрокортизона и прогестерона в течении долгого времени [125].

Использование липидных наночастиц для лечения офтальмологических заболеваний решает такие проблемы, как низкая биодоступность ЛС и малое время пребывания ЛС во внутриглазной области [146] [147]. Авторами [98] были получены суспензии ТЛН стеариновой кислоты, стабилизированные Tween 80 и дезоксихолатом натрия, для внутриглазной доставки левофлоксацина. Показана антимикробная активность наночастиц в отношении *S.aureus* и *E.coli* и пролонгированное высвобождение ЛС внутри глаза.

Липидные наночастицы являются хорошими носителями для липофильных лекарств, однако возможно их использование и в качестве доставки гидрофильных ЛС. На сегодняшний день опубликовано мало работ, посвященных липидным наночастицам как носителям водорастворимых молекул ЛС [148] [149] [150] [151].

Таким образом НЭ и ТЛН являются перспективными для инкапсулирования ЛС и биологически-активных веществ. Однако медицина является не единственной областью их применения.

1.4.2 Применение наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц в других отраслях

НЭ и ТЛН предлагается использовать в пищевой промышленности для инкапсулирования консервантов, красителей, отдушек, антибактериальных веществ [152] [153] [154]. Например, инкапсулирование ароматизатора

мальтола в ТЛН, состоящих из смеси стеариновой кислоты и этилцеллюлозы, исследовалось для осуществления пролонгированного высвобождения аромата из пищевых продуктов [155].

Предлагается использование НЭ и ТЛН в косметических продуктах [156] [157] [158] [159]. При применении НЭ из масла рисовых отрубей, касторового масла, ПЭГ-30, Span 80 у добровольцев с атопическим дерматитом или псориазом проявилась повышенное увлажнение верхних слоев эпидермиса в первые 30 минут с сохранением полученного результата до 90 минут после нанесения.

Для решения проблемы окисления и фотодеградациии куркуминоидов, которые являются антиоксидантами и способны ингибировать перекисное окисление липидов, что приводит к замедлению старения кожи, были разработаны ТЛН из стеариновой кислоты и моностеарата глицерида [160]. Показано, что инкапсулированные в липидные наночастицы куркуминоиды оставались стабильными в течении 6 месяцев хранения при комнатной температуре.

При применении в агрохимической промышленности предлагается использование НЭ и ТЛН в качестве доставки удобрений, пестицидов и инсектицидов. В работе [161] были разработаны ТЛН для доставки летучих органических соединений в растения для стимуляции роста и корнеобразования.

Были получены НЭ с инкапсулированным норкантаридином для инсектицидного применения против *Plutella xylostella*. Было показано, что использование липидных носителей повышает смертность насекомых в сравнении с распылением свободного соединения [162].

Таким образом, НЭ и ТЛН являются перспективными системами для применения в разных областях медицины и промышленности. Для стабилизации наиболее часто используются неионогенные ПАВ группы Tween и Span. Однако стоит отметить, что в большинстве работ средний

размер частиц превышает 250 нм. К тому же в литературе уделяется большее внимание применению липидных носителей, а не изучению физико-химических свойств. Поэтому актуальной задачей стоит изучение влияния состава липидного ядра и ПАВ и их концентраций на дисперсность и устойчивость НЭ и ТЛН.

Для получения НЭ и ТЛН используют высоко- и низкоэнергетические методы. Низкоэнергетические методы являются менее экономически затратными и не требуют использования дорогого оборудования. Кроме того, при получении липидных наночастиц низкоэнергетическими методами отсутствует долговременный нагрев, который может привести к деградации инкапсулируемого соединения. Поэтому в данной работе для получения НЭ и ТЛН был использован метод ТИФ.

Разработка носителей для направленной доставки ЛС в организм человека является интенсивно развивающейся областью. Поэтому актуальной задачей состоит разработка высокоустойчивых НЭ и ТЛН с инкапсулированным противораковыми и противовоспалительными ЛС и исследование их цитотоксичности, скорости и области локализации в клетках, а также скорости высвобождения.

ГЛАВА 2. МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ

2.1. Реактивы и материалы

Для получения липидных частиц были использованы следующие реактивы, представленные в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Реактивы, использованные в работе

№	Наименование	Изготовитель	Примечание
2	Парафиновое масло (Bristol 20)	USP, Канада	«ХЧ»
1	Стеариновая кислота	Sigma-Aldrich, Германия	95 мас.% основного вещества
3	Олеиновая кислота	Stanchem Sp. z o.o. Przedsiębiorstwo Chemiczne, Польша	95 мас.% основного вещества
	Парафин	ОАО «Славнефть- Ярославнефтеоргс интез», Россия	П-2 ГОСТ 23683-89
4	Полиэтиленгликоль сорбитан моностеарат (Tween 60)	Sigma-Aldrich, США	95 мас.% основного вещества
5	Сорбитан моностеарат (Span 60)	Sigma-Aldrich, США	95 мас.% основного вещества
6	Полиэтиленгликоль сорбитан моноолеат (Tween 80)	Sigma-Aldrich, Франция	95 мас.% основного вещества
7	Сорбитан моноолеат (Span 80)	Sigma-Aldrich, США	95 мас.% основного вещества
8	Цетилтриметиламмони й бромид (СТАВ)	Sigma-Aldrich, США	98 мас.% основного вещества

Продолжение таблицы 2.1

9	Додецил сульфат натрия	Sigma-Aldrich, США	95 мас.% основного вещества
10	Н-[2-((бутилкарбамоил)-окси)-этил]н-н,диметилгексадеканамония бромид	Предоставлен ИОФХ им. А.Е.Арбузова, г. Казань, Россия	Катионогенное ПАВ
11	Доксорубицин	Фармахемии Б.В., Нидерланды	Противораковое соединение
12	Тимохинон	Sigma-Aldrich, США	98 мас.% основного вещества
13	Индометацин	Sigma-Aldrich, США	98 мас.% основного вещества
14	Хлорид натрия (NaCl)	Химмед, Россия	ХЧ

В работе реактивы дополнительной очистке не подвергались.

2.2. Методы исследования

Исследование частиц осуществлялось такими методами, как кондуктометрия, динамическое светорассеяние, дифференциально-сканирующая калориметрия, микрокалориметрия, просвечивающая электронная микроскопия, криогенная просвечивающей электронная микроскопия.

2.2.1. Метод динамического светорассеяния для определения размеров капель дисперсной фазы в наноземлях и твёрдых липидных наночастиц

Диаметры частиц дисперсной фазы определяли методом динамического светорассеяния на лазерном анализаторе характеристик частиц субмикронного диапазона Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) с

углом рассеяния 173° с использованием гелий-неонового лазера ($\lambda = 633$ нм). Прибор измеряет интенсивность света, рассеянного частицами. По полученным результатам строится корреляционная кривая изменения интенсивности света за определенные возрастающие временные интервалы.

Измерения проводили следующим образом: в кювету DTS0012 из полистирола помещали исследуемый образец объемом ± 1 мл. Кювету закрывали термоизолирующей крышкой и помещали в кюветное отделение. Измерения проводились при температуре 25°C . Для каждого образца снимали серию из трех измерений с ± 16 прогонами в каждом в режиме Multiple Narrow Modes. В каждой серии изменений рассчитывали среднее значение.

2.2.2. Определение ζ -потенциала капель дисперсной фазы в наноземлях и твердых липидных наночастиц

Электрокинетический потенциал капель НЭ и ТЛН измеряли при помощи лазерного анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Вычисление ζ -потенциала основано на измерении электрофоретической подвижности частиц в жидкости под действием приложенного электрического поля и последующего применения уравнения Генри. При этом, скорость движения частицы зависит от следующих факторов:

- сила электрического поля или градиент напряжения;
- диэлектрическая проницаемость среды;
- вязкость среды;

Скорость движения частицы в электрическом поле обычно называют ее электрофоретической подвижностью. Значения ζ -потенциала частицы можно рассчитать, применяя уравнение Генри:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta}, \quad (3.1)$$

где ζ - дзета потенциал частицы (мВ), U_E - электрофоретическая подвижность ($\text{м}^2/\text{Вс}$), ε - диэлектрическая постоянная (Ф/м), η - динамическая вязкость дисперсионной среды ($\text{Па}\cdot\text{с}$), $f(Ka)$ - функция Генри, которая зависит от размера частиц дисперсной фазы и концентрации электролита. Для наноразмерных систем $<10^{-2}$ М $f(Ka)$ равна 1,5.

Методика измерения ζ -потенциала: полистирольную кювету DTS1060С заполняли при помощи шприца 1 мл образца, устанавливали кювету в кюветное отделение анализатора, и проводили измерения при 25 °С. Для каждого образца снимали серию из пяти измерений, и рассчитывали среднее значение.

2.2.3. Кондуктометрический метод для определения температуры инверсии фаз в липидных системах

Электропроводность липидных частиц была исследована с помощью портативного кондуктометра HI 8733 N (Hanna Instruments, Германия). Характеристики прибора: диапазоны измерений (0 - 199,9 мкСм/см; 0 - 1999 мкСм/см; 0 - 19,99 мСм/см; 0 - 199,9 мСм/см); автоматическая компенсация температурных изменений. Измерения проводились при температурах от 25 °С до 98 °С с шагом 2 °С.

2.2.4. Метод дифференциально-сканирующей калориметрии для определения фазовых переходов в липидных частицах

Температуру плавления ПАВ и твёрдых компонентов ТЛН определяли методом дифференциально сканирующей калориметрии с термогравиметрическим анализом (ДСК-ТГА) на приборе STA 449 F5 Jupiter (NETZSCH-Gerätebau GmbH). Измерение проводилось следующим образом: помещали небольшое количество вещества в алюминиевый тигель с крышкой. Устанавливали температурный диапазон нагрева, скорость подачи воздуха – 100 мл/мин. Скорость нагрева всех образцов была равной 1 °С/мин.

Термограммы кристаллизации и плавления ядра и поверхностного слоя в ТЛН и поверхностного слоя в НЭ строили по результатам измерений с использованием микрокалориметра VP-DSC (MicroCal Inc., США) в ячейке из танталового сплава. Образцы разбавляли в 10 раз 0,15 М раствором NaCl, помещали в измерительную ячейку и проводили дегазацию. В качестве образца сравнения использовался 0,15 М раствор NaCl. Термограммы ДСК записывали при скорости сканирования 1 °С/мин. Образцы подвергались двум циклам нагрева и охлаждения от 5 до 60 °С и обратно. Третий нагрев проводился от 5 до 95 °С. Между циклами нагрева и охлаждения время выдержки составляло 15 мин. Калориметрический анализ данных проводили с помощью программы Origin 7.0.

2.2.5. Метод просвечивающей электронной микроскопии для визуализации наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц

Визуализация капель НЭ и ТЛН проводилась с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ПЭМ). В работе использовался прибор Tecnai T12 G2 TEM (FEI, Нидерланды). Изображения регистрировали при облучении в малых дозах с помощью DigitalMicrograph (Gatan, Великобритания) в охлаждаемой ПЗС-камере высокого разрешения Gatan US1000 2kx2k. Данные исследования проводились в лаборатории Факультета биотехнологического инжиниринга, Технион в г. Хайфа, Израиль.

2.2.6. Оптические методы для анализа седиментационной стабильности наноэмульсий и дисперсий твёрдых липидных наночастиц

Исследования стабильности к агрегации и седиментации образцов во времени проводилось на проборе Multiscan MS 20 (DataPhysics, Германия). Кювета заполнялась НЭ или дисперсией ТЛН так, чтобы высота образца составляла от 15 до 55 мм, плотно закручивалась крышкой и аккуратно, без

перемешивания опускалась в измерительную башню. Определялось пропускание и обратное рассеяние монохроматического излучения ближней инфракрасной области спектра при длине волны 880 нм.

Измерения интенсивности проходящего света и обратного светорассеяния проводили при сканировании образца по высоте с шагом 20 мкм, скорость сканирования составляла 12,5 мм/с. На основе полученных данных были построены зависимости обратного светорассеяния от высоты образца, на которых высота образца НЭ или дисперсии ТЛН обозначена, как расстояние от дна сосуда и выражена в относительных величинах - от 0 до 1. Измерения проводились от 1 до 3 раз в неделю более 1 месяца.

2.2.7. Метод висящей капли для определения межфазного натяжения на границе вода / масло

Исследование межфазного натяжения на границе вода / масло проводилось с помощью прибора EasyDrop (KRUSS, Германия). В шприц с диаметром капилляра 1,85 мм отбиралась водная фаза как более плотная, а в кювету масляная, как менее плотная. В качестве масляной фазы использовалось парафиновое масло с плотностью 0,85 г/см. С помощью программа «EasyDrop» производилось дозирование капли, фокусировка объектива на капле и измерение межфазного натяжения. Средний объём капли составлял ~ 35 мкл. Изменение межфазного натяжения после дозирования капли производилось каждые 10 сек в течении 20 мин для установления межфазного равновесия.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были изучены свойства липидных наночастиц для адресной доставки ЛС. Для получения таких наночастиц целесообразным является применение низкоэнергетических методов, т.к. при их использовании не происходит разрушения инкапсулированных молекул. Также данные методы являются менее энергозатратными в случае крупномасштабного промышленного производства [8].

В работе был использован низкоэнергетический способ получения липидных наночастиц - метод температурной инверсии фаз, который основан на специфическом свойстве некоторых ПАВ изменять аффинность к маслу и воде в зависимости от температуры. Если эмульсию типа «вода-в-масле» получить при температуре выше ТИФ, а затем резко охладить, то произойдёт формирование НЭ типа «масло-в-воде». При этом из-за низкого межфазного натяжения при температурах, близких к ТИФ, происходит формирование капель нанометрового размера. Если при охлаждении происходит кристаллизация липидного ядра НЭ, то формируются ТЛН.

Получение НЭ методом ТИФ возможно при использовании оксиэтилированных ПАВ, ГЛБ которых сильно зависит от температуры. Однако данные ПАВ являются относительно токсичными, поэтому их применение в медицине ограничено. Если изменение гидратации молекул ПАВ при варьировании температуры или состава системы невысокое, то возможно использование смеси двух (или более) ПАВ с разными величинами ГЛБ. Такая смесь должна состоять из ПАВ с низким значением ГЛБ для стабилизации обратной эмульсии при высокой температуре и ПАВ с высоким значением ГЛБ для стабилизации прямой НЭ при более низкой температуре. В данной работе для стабилизации липидных наночастиц были использованы смеси ПАВ группы Tween и Span, которые являются биосовместимыми, биоразлагаемыми и разрешены для применения в медицинской, косметической и пищевой промышленности. Используемые ПАВ Tween 80 и Span 80 жидкие при 20 °С. Tween 60 и Span 60 при данной температуре

переходят в твердообразное состояние. Как будет показано далее, при их адсорбции на поверхности капле НЭ и ТЛН формировалась твердая оболочка.

В работе были изучены наночастицы с жидкообразной и твердообразной оболочкой, образованной адсорбированными молекулами ПАВ. Ядро наночастиц находилось в жидкообразном или твердообразном состоянии и состояло из неполярных или полярных веществ (рисунок 3.1):

- НЭ «масло-в-воде» с жидким ядром (парафиновое масло или олеиновая кислота) и твердообразной оболочкой (Tween 60 и Span 60);
- НЭ «масло-в-воде» с жидким ядром (парафиновое масло или олеиновая кислота) и жидкообразной оболочкой (Tween 80 и Span 80);
- наночастицы с твердым ядром (стеариновая кислота или парафин) и твердообразной оболочкой ПАВ (Tween 60 и Span 60).
- наночастицы с твердым ядром (стеариновая кислота или парафин) и жидкообразной оболочкой (Tween 80 и Span 80);

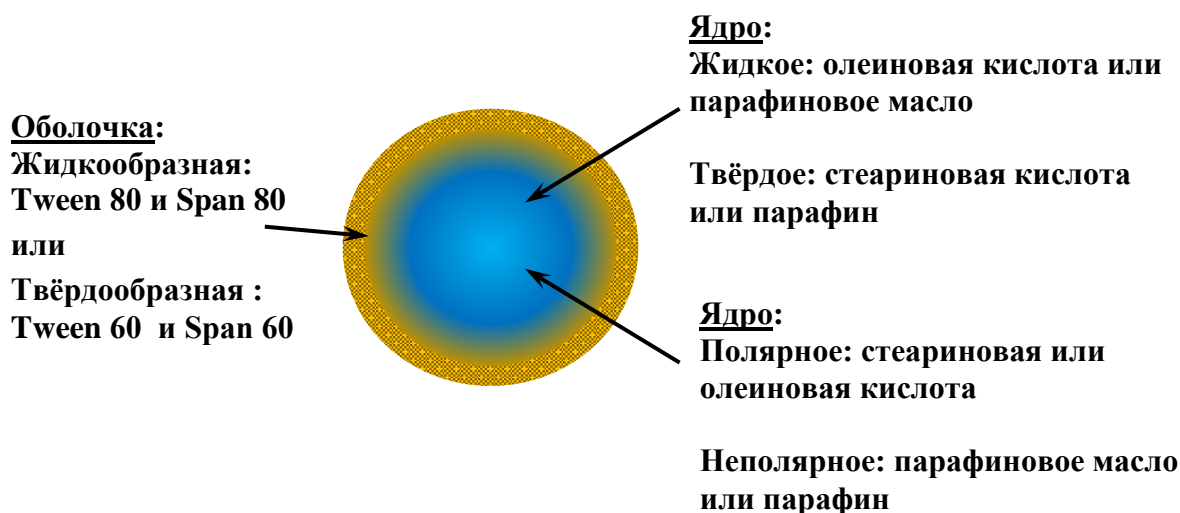


Рисунок 3.1 – Структура исследованных липидных наночастиц

В дальнейшей работе наночастицы с твердым липидным ядром обозначены, как ТЛН, с жидким - НЭ. Фазовое состояние исследованных липидных наночастиц более подробно описано в разделе 3.3.

Как уже было сказано, в работе были исследованы наночастицы с неполярным и полярным липидным ядром. Выбор данных типов веществ обусловлен двумя факторами: с одной стороны, инкапсулирование липофильных ЛС, чаще всего имеющих в составе полярные группы, будет более высокой в полярном ядре липидных наночастиц. С другой стороны, агрегативная устойчивость НЭ и ТЛН будет снижаться при увеличении сродства дисперсной фазы к дисперсионной среде. Поэтому в работе было проведено изучение влияния полярности ядра на дисперсность и устойчивость к агрегации и седиментации липидных наночастиц, как потенциальных носителей для адресной доставки ЛС.

3.1. Свойства наноэмульсий с неполярным и полярным ядром

Для определения влияния полярности липидного ядра на свойства НЭ были проведены исследования НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла (неполярное ядро) или олеиновой кислоты (полярное ядро), полученных методом ТИФ. Для стабилизации НЭ использовалась смесь Tween 80 и Span 80 или Tween 60 и Span 60 в мольном соотношении 0,76, которое было определено в предыдущих работах [163] [164]. Концентрация липидной части составляла 25 об.%, концентрация ПАВ - 12,5 об.%. В качестве дисперсионной среды использовался 0,15 М раствор NaCl. Были определены температуры инверсии фаз в НЭ. Изучена стабильность полученных НЭ к агрегации и обратной седиментации во время хранения при температуре 25 °С и при повышенных температурах.

3.1.1. Определение температуры инверсии фаз в наноэмульсиях

В методе ТИФ смесь компонентов нагревают выше температуры инверсии фаз, при этом происходит формирование эмульсии типа В/М. При охлаждении системы ниже температуры инверсии, образуется НЭ типа М/В. При этом наблюдается резкое изменение электропроводности, связанное с изменением полярности дисперсионной среды.

Для определения температуры инверсии фаз в НЭ был использован кондуктометрический метод. Образцы НЭ термостатировали при 20 °С в течении 20 мин. Затем температуру повышали до 98 °С с шагом 2 °С и измеряли электропроводность системы.

Обычно температурный диапазон инверсии фаз в таких системах определяют при охлаждении для определения максимальной температуры нагрева системы при получении НЭ. Эти температуры для исследуемых систем были определены ранее [165]. В данном случае определялась температура инверсии фаз при увеличении температуры с целью определения температурного диапазона существования прямых НЭ.

На рисунке 3.2 представлены зависимости электропроводности НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла или олеиновой кислоты, стабилизированной Tween 60 и Span 60, от температуры. Резкое уменьшение электропроводности соответствовало началу инверсии фаз.

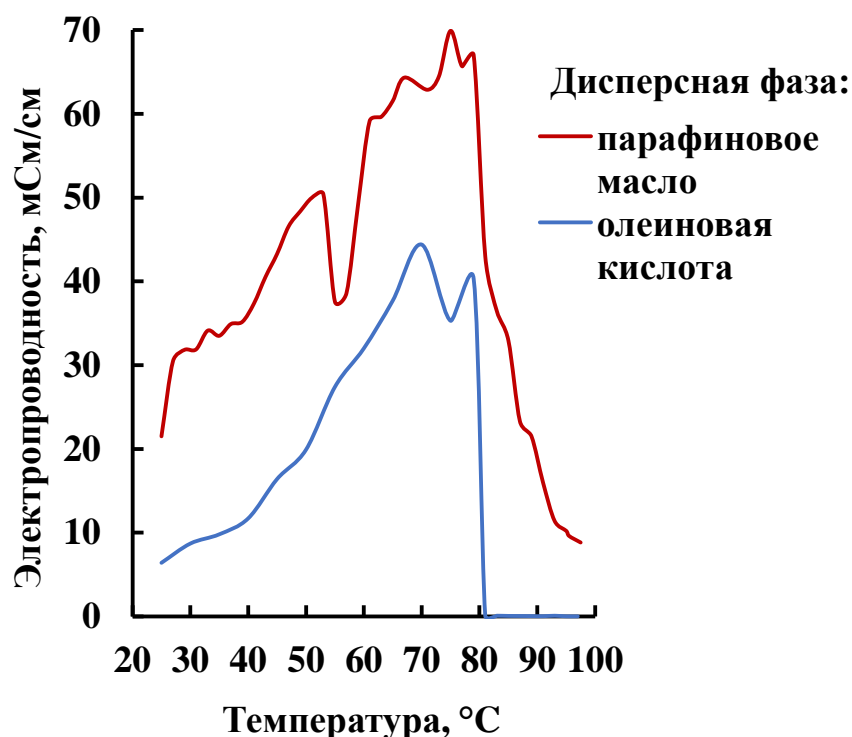


Рисунок 3.2 – Влияние температуры на электропроводность НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла или олеиновой кислоты, стабилизированной Tween 60 и Span 60

Таблица 3.1 – Температуры инверсии фаз в НЭ

Ядро	ПАВ	Диапазон температуры, °С
Парафиновое масло	Tween 60+Span 60	78-90
	Tween 80+Span 80	82-90
Олеиновая кислота	Tween 60+Span 60	76-78
	Tween 80+Span 80	78-82

В таблице 3.1 приведены диапазоны инверсии фаз в разных НЭ. Инверсия фаз в НЭ с неполярным ядром, происходила в более широком диапазоне температур: от 78-82 до 90 °С, что может быть связано со смешанным составом парафинового масла. При этом, начало инверсии фаз НЭ, стабилизированной Tween 80 и Span 80, было немного выше, чем при стабилизации смесью Tween 60 и Span 60. Инверсия фаз в НЭ с полярным ядром из олеиновой кислоты происходила в более узком диапазоне: 76-78 °С в образцах, стабилизированных Tween 60 и Span 60 и 78-82 °С при использовании Tween 80 и Span 80. Возможно, меньший температурный диапазон связан с некоторым включением молекул олеиновой кислоты в адсорбционный слой, что влияло на межфазное натяжение и, как следствие, на скорость протекания ТИФ.

3.1.2. Дисперсность и структура наноэмульсий с неполярным и полярным ядром

Были проведено исследование влияние полярности липидного ядра на свойства прямых НЭ с парафиновым маслом или олеиновой кислотой.

На рисунке 3.3 представлены распределения капель дисперсной фазы НЭ по размерам. Средний диаметр капель в НЭ с неполярным ядром составлял 55 ± 3 нм при стабилизации смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 и 40 ± 2 нм в НЭ с Tween 80 и Span 80. Средний диаметр капель в НЭ с полярным ядром составлял 25 ± 1 нм при стабилизации Tween 60 и Span 60 и 40 ± 2 нм в НЭ с Tween 80 и Span 80.

Следует отметить, что при стабилизации смесью Tween 60 и Span 60 распределение капель по размерам было мономодальным. В НЭ с Tween 80 и Span 80 распределения капель по размерам было бимодальным, на гистограммах присутствовал второй пик при 300 ± 30 нм, который соответствовал более крупным каплям или агрегатам (флокулам) [164].

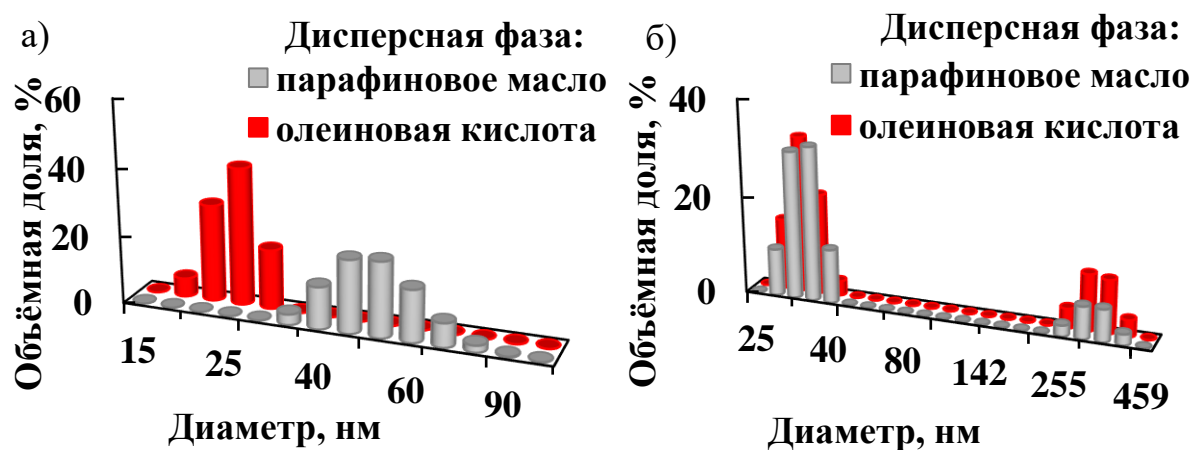


Рисунок 3.3 – Распределения капель в НЭ по размерам. Дисперсная фаза - парафиновое масло и олеиновая кислота. НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 (а) или Tween 80 и Span 80 (б) с суммарной концентрацией ПАВ 12,5 об.%. Температура - 25 °С

Наличие второго пика на гистограммах свидетельствует о невысокой устойчивости данных НЭ к агрегации, т.к. они были стабилизированы жидкообразными неионогенными ПАВ. ζ -потенциал капель дисперсной фазы в НЭ был отрицательным и не превышал ~ 8 мВ по абсолютной величине (Таблица 3.2). ζ -потенциал капель с полярным ядром был немного выше по абсолютной величине, чем в НЭ с неполярным ядром, что может быть связано с встраиванием олеиновой кислоты, обладающей поверхностной активностью, в адсорбционный слой ПАВ.

Таблица 3.2 - Значения ζ -потенциала капель дисперсной фазы в НЭ

Вещество внутренней фазы НЭ	Состав поверхностного слоя ПАВ	ζ -потенциал, мВ
Парафиновое масло	Tween 60+Span 60	-3,4±0,7
	Tween 80+Span 80	-4,9±0,8
Олеиновая кислота	Tween 60+Span 60	-7,9±1,5
	Tween 80+Span 80	-5,6±0,9

На рисунке 3.4 приведены микрофотографии исследуемых образцов НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла или олеиновой кислоты, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60.

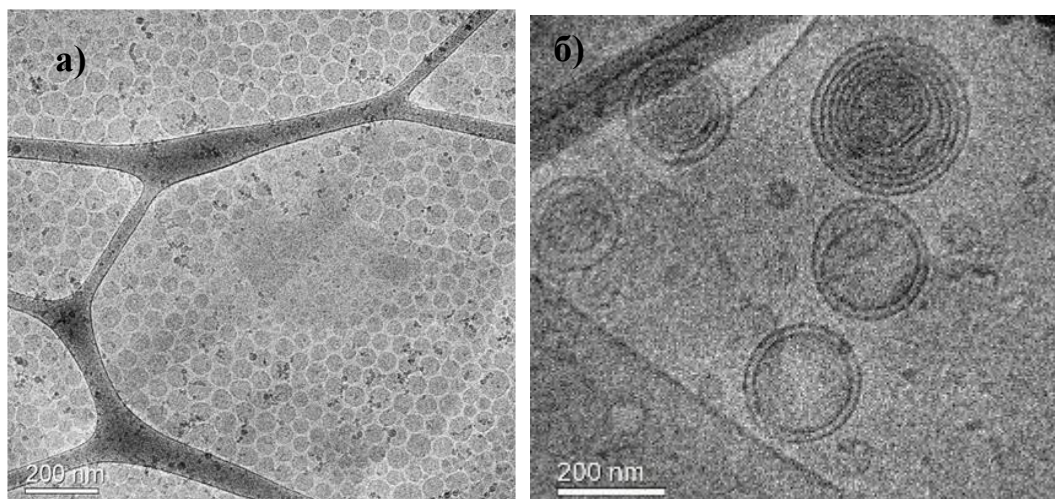


Рисунок 3.4 - Крио-ПЭМ-микрофотографии НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла (а) или олеиновой кислоты (б), стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 об.%

Размер капель в НЭ с дисперсной фазой из парафинового составлял 30-50 нм, что согласуется с данными, полученными методом динамического светорассеяния. На рисунке 3.4б показана крио-ПЭМ микрофотография липидных частиц с олеиновой кислотой, на которой видны как более мелкие капли размером несколько десятков нанометров, так и более крупные с

ламеллярной структурой размером 300 ± 30 нм. Следует отметить, что имелись микрофотографиях, на которых присутствовало много мелких нанок капель, аналогичных изображенным на рис. 3.4а. Изображенные на рис. 3.4б ламеллярные структуры присутствовали образцах в значительно меньшем количестве, чем мелкие капли. Возможно, что с течением времени протекала коалесценция мелких капель с образованием таких структур. Однако для подтверждения этого требуются дополнительные исследования.

3.1.3. Стабильность наноэмульсий к агрегации и обратной седиментации

Для определения возможности долгосрочного хранения НЭ была изучена устойчивость систем к агрегации и седиментации при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Были исследованы НЭ с полярным и неполярным ядром, состоящим из олеиновой кислоты или парафинового масла соответственно, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 или Tween 80 и Span 80.

На рисунке 3.5 представлены зависимости среднего диаметра капель дисперсной фазы НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 суммарной концентрацией 12,5 об.% от времени. В обеих системах средний диаметр капель дисперсной фазы НЭ изменялся в пределах погрешности измерений. Системы оставались стабильными к агрегации более 30 сут. Средний диаметр капель в НЭ с неполярным ядром составлял 55 ± 3 нм, с полярным 25 ± 2 нм.

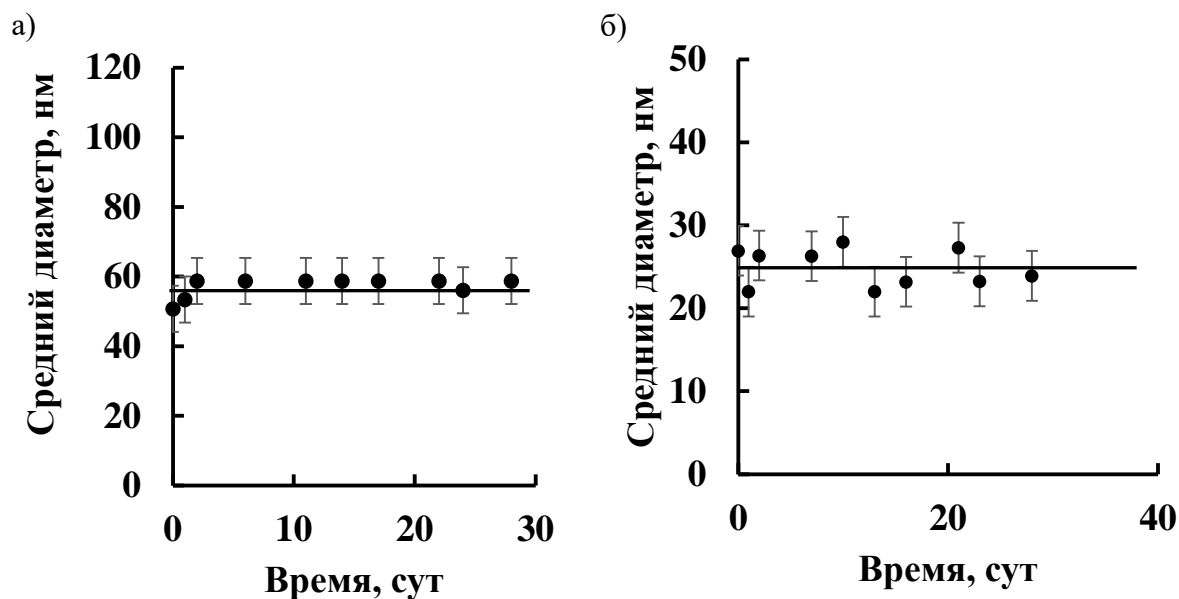


Рисунок 3.5 - Зависимости среднего диаметра капель в НЭ, стабилизированных Tween 60 и Span 60, от времени. Дисперсная фаза - парафиновое масло (а) и олеиновая кислота (б). НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 об.%. Температура - 25 °С

Температура - 25 °С

Для определения устойчивости как к агрегации, так и седиментации было исследовано изменение профилей светорассеяния в НЭ с течением времени (рисунок 3.6). Обратное рассеяние света в образцах НЭ, как с полярным, так и неполярным ядром, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, практически не изменялось более 28 сут и оставалось постоянным по высоте столба НЭ. Однородность структуры говорит о высокой агрегативной и седиментационной устойчивости полученных НЭ.

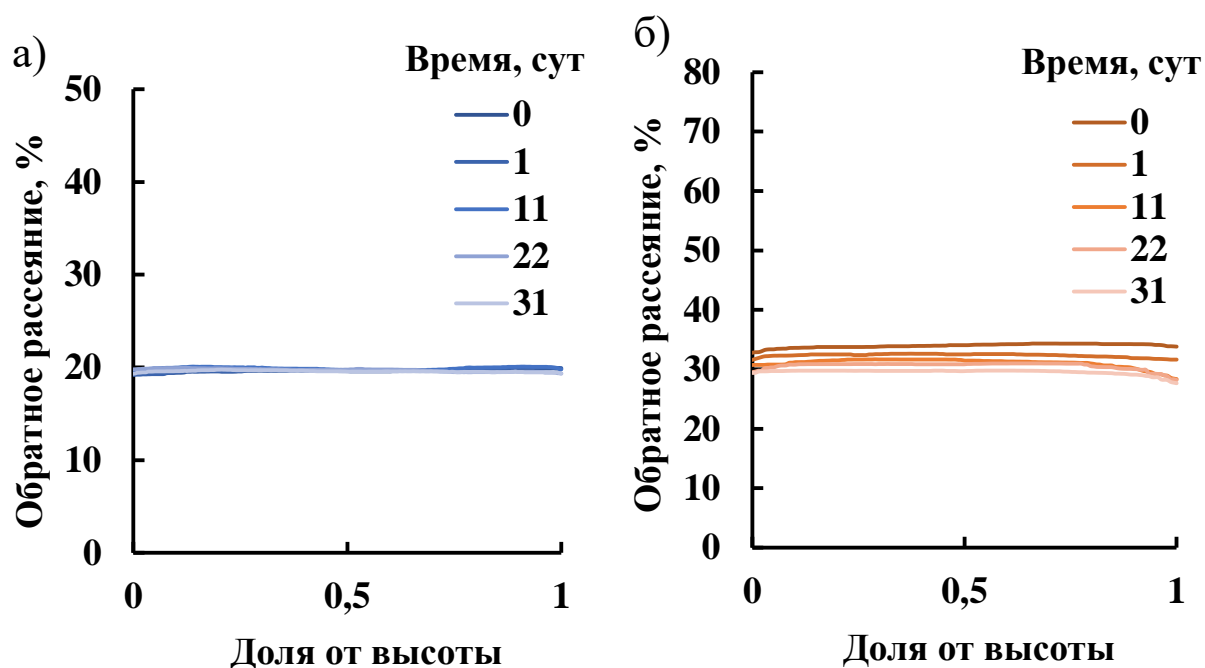


Рисунок 3.6 - Профили обратного рассеяния света в НЭ. Дисперсная фаза - парафиновое масло (а) и олеиновая кислота (б). НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 об.%. Температура - 25 °С

В работе также были предприняты попытки получить НЭ с суммарной концентрацией ПАВ Tween 60 и Span 60 15 об.%. Однако получить устойчивые системы не удалось - образцы агрегировали и расслаивались в течение первых минут после получения. Уменьшение суммарной концентрации ПАВ в пределах 5-10 об.% приводило к росту размеров капель дисперсной фазы.

В отличие от НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, НЭ, стабилизированные смесью ПАВ Tween 80 и Span 80, были неустойчивыми к агрегации при температуре 25 °С. На рисунке 3.7 представлены распределения по размерам капель в НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80. Сразу же после получения средний диаметр капель дисперсной фазы в НЭ с неполярным ядром составлял 45 ± 2 нм, однако распределение капель по размерам было бимодальным (рисунок 3.7а). Второй максимум 300 ± 30 нм, наиболее вероятно был обусловлен

образованием флоккул капле дисперсной фазы. С течением времени высота второго пика увеличивалась, что говорит о дальнейшей коагуляции капле дисперсной фазы.

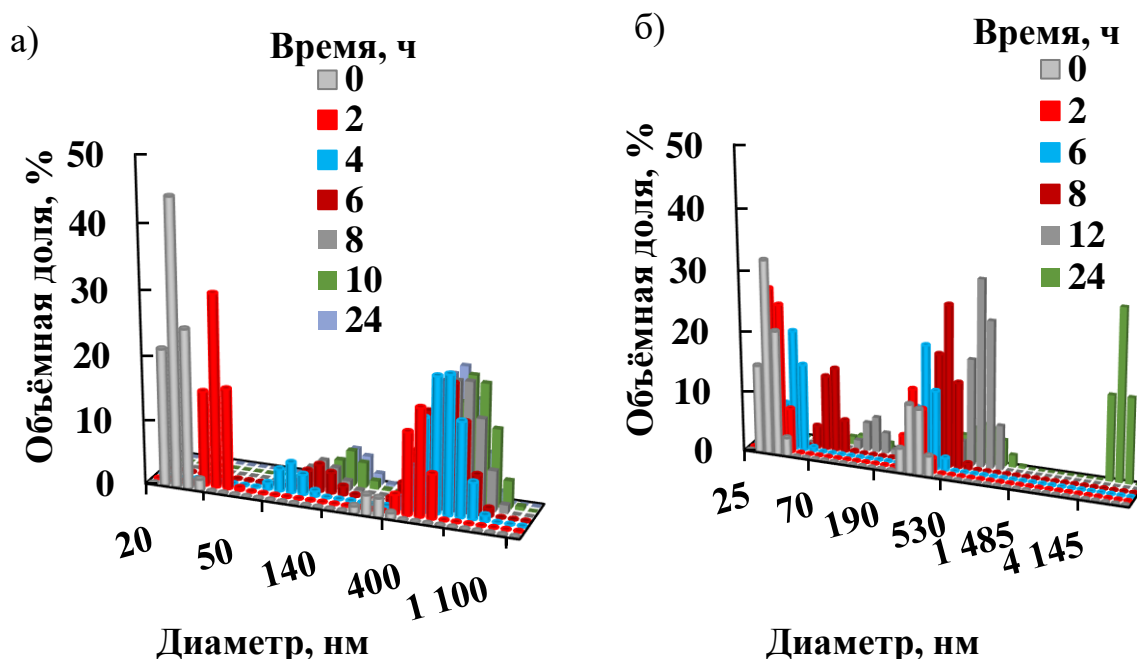


Рисунок 3.7 - Распределения капле дисперсной фазы НЭ по размерам. Дисперсная фаза - парафиновое масло (а) и олеиновая кислота (б). НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с суммарной концентрацией 12,5 об.%. Температура - 25 °С

Аналогичная ситуация наблюдалась в НЭ с полярным ядром - сразу же после получения средний размер капле в НЭ составлял 28 ± 2 нм, однако присутствовал второй пик, высота которого увеличивалась с течением времени (рисунок 3.7б).

На рисунке 3.8 представлены профили светорассеяния в НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80. В течение суток в обоих образцах наблюдалось скачкообразное изменение обратного рассеяния света. Это связано с тем, что флоккулы нанокapель и более крупные капли всплывали, и соответственно в верхней части наблюдалось увеличение оптической плотности образца и возрастание рассеивания света. Частично

отслоившаяся водная фаза находилась в нижней части, что приводило к уменьшению обратного рассеяния света.

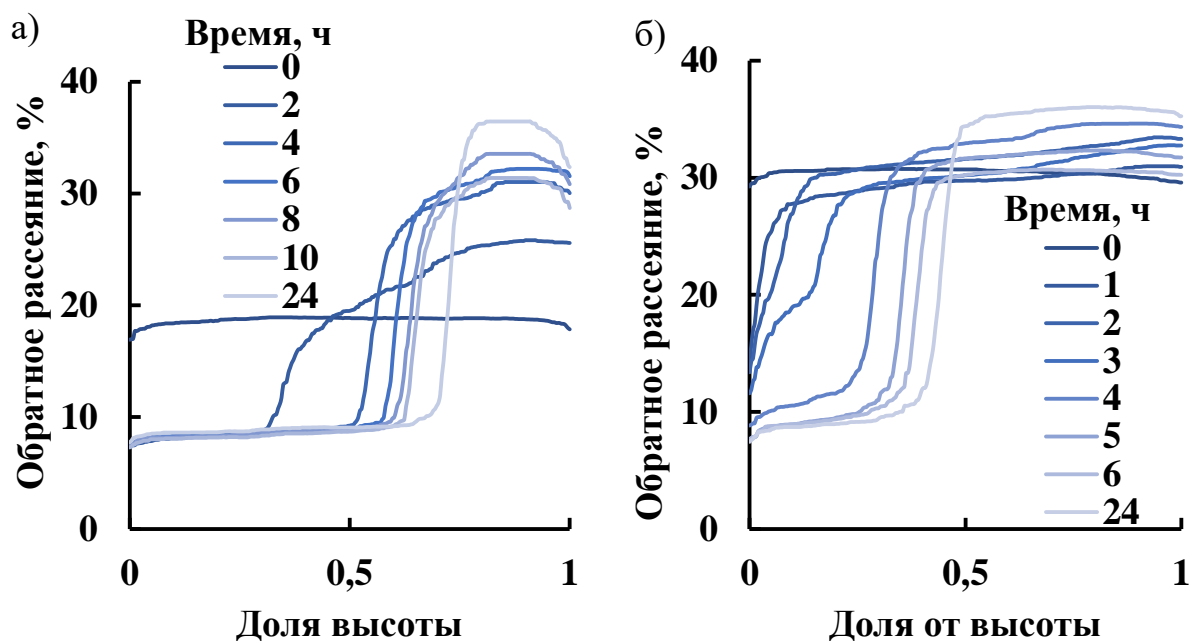


Рисунок 3.8 - Профили обратного рассеяния света в НЭ. Дисперсная фаза - парафиновое масло (а) и олеиновая кислота (б). НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с суммарной концентрацией 12,5 об.%.
Температура - 25 °С

Температура - 25 °С

Как уже было сказано ранее, НЭ - термодинамически нестабильные системы. Укрупнение капель дисперсной фазы со временем может происходить из-за протекания остальдова созревания, коагуляции и коалесценции, которые протекают одновременно. Однако скорости этих процессов различаются в разные моменты времени. Скорость остальдова созревания описывается уравнением Лившица-Слезова-Вагнера [166]:

$$v = \frac{dr_{кр}^3}{dt} = \frac{8DC_b^\infty \sigma M}{9\rho^2 RT} \quad (3.2)$$

где v – скорость остальдова созревания, $r_{кр}$ – критический радиус капель НЭ, t – время, D – коэффициент диффузии вещества дисперсной фазы в дисперсионной среде, C_b^∞ - концентрация насыщенного раствора (растворимость) вещества дисперсной фазы в макрообъёме вещества дисперсионной среды, σ – межфазное натяжение, M – молекулярная масса

вещества дисперсной фазы, ρ – плотность вещества дисперсной фазы, R – универсальная газовая постоянная, T – температура.

Если построенная по экспериментальным данным зависимость куба среднего радиуса капель от времени является линейной, то можно сказать, что оствальдово созревание является преобладающим фактором неустойчивости системы.

Изменение средних размеров капель в эмульсии в результате коалесценции описывается следующей зависимостью [167]:

$$\frac{1}{r^2} = \frac{1}{r_0^2} - \frac{8\pi\omega}{3} t \quad (3.3)$$

где ω – вероятность разрыва межфазной пленки на единицу площади поверхности. r_0 – начальный радиус капель дисперсной фазы.

Линейная зависимость обратного квадрата радиуса от времени свидетельствует о том, основной вклад в увеличение размеров капель вносит коалесценция. Для определения доминирующего процесса, происходящего в НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80, были построены зависимости, представленные на рисунке 3.9.

В начальные моменты времени r^3 незначительно возрастал с течением времени, как в НЭ с парафиновым маслом, так и с олеиновой кислотой. Через 2 ч зависимости стали практически линейными. Изменения величин $1/r^2$ от времени в первые 4 ч линейны для обеих НЭ. Это свидетельствует о том, что в первые часы после получения НЭ, стабилизированных Tween 80 и Span 80 с суммарной концентрацией 12,5 об.%, укрупнение капель дисперсной фазы происходило преимущественно из-за коалесценции. Затем уменьшение дисперсности было обусловлено протеканием, как коалесценции, так и оствальдова созревания.

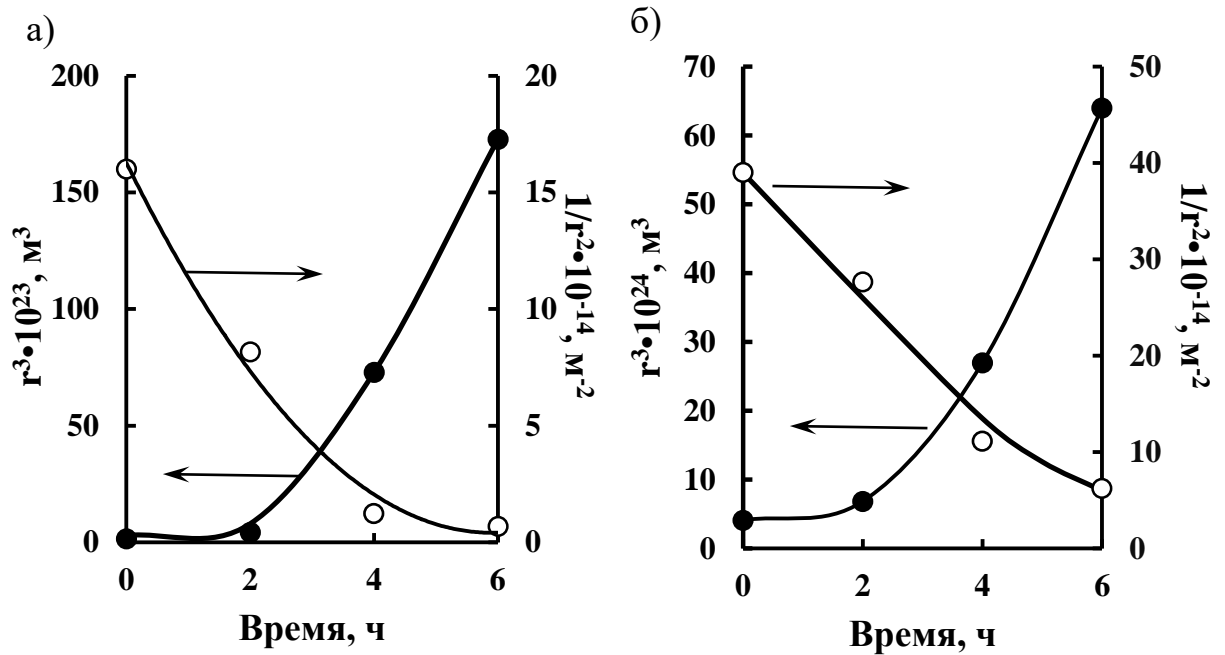


Рисунок 3.9 - Зависимости r^3 и $1/r^2$ от времени. Дисперсная фаза - парафиновое масло (а) и олеиновая кислота (б). НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 80 и Span 80. Температура - 25 °С

Низкая устойчивость к коалесценции капель в НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80, вероятнее всего связана с низким поверхностным зарядом (Таблица 3.2) и жидкообразным поверхностным слоем ПАВ (Раздел 3.3). Столкновения капель, участвующих в броуновском движении, были эффективными и приводили к их коагуляции и последующей коалесценции.

Проведенные исследования показывают, что агрегативно и седиментационно устойчивыми в течение длительного времени являются НЭ, состоящие из парафинового масла или олеиновой кислоты и стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, с суммарной концентрацией 12,5 об. %.

3.1.4. Устойчивость наноэмульсий с полярным и неполярным ядром при повышенных температурах

Для оценки стабильности НЭ к агрегации при повышенных температурах было проведено измерение размеров капель дисперсной фазы при нагревании системы. НЭ с олеиновой кислотой или парафиновым маслом, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, разбавляли в 10 раз 0,15 М водным раствором NaCl. Полученные эмульсии нагревали до 60 °С, а затем охлаждали до 25 °С. Проводили два цикла нагрева и охлаждения с шагом 5 °С. На рисунке 3.10 приведены зависимости среднего диаметра капель в НЭ от температуры.

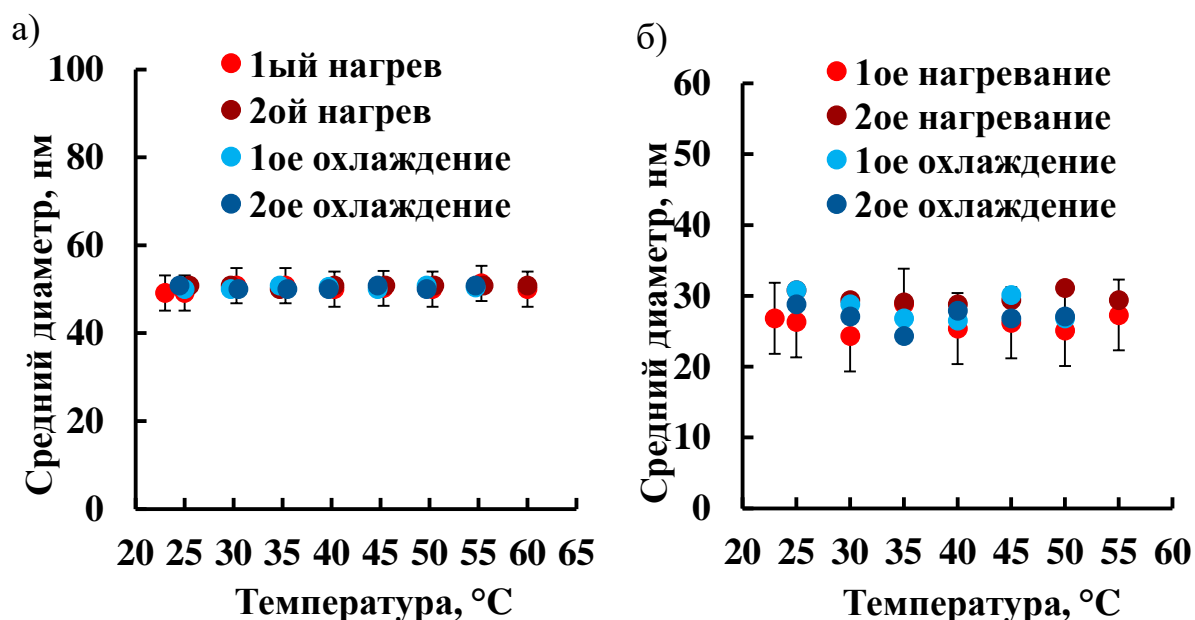


Рисунок 3.10 - Зависимости среднего диаметра капель в НЭ от температуры.

Дисперсная фаза - парафиновое масло (а) и олеиновая кислота (б).

НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60

В обоих случаях средние диаметры капель НЭ практически не изменялись. Средний диаметр капель дисперсной фазы с неполярным ядром составлял 50 ± 3 нм на протяжении двух циклов нагревания-охлаждения. Средний диаметр капель дисперсной фазы с полярным ядром составлял 28 ± 2 нм. Стоит отметить, что НЭ с полярным ядром из олеиновой кислоты сохраняла устойчивость при нагреве только до 55 °С, при более высоких

температурах капли дисперсной фазы агрегировали. Это можно объяснить плавлением твердообразного поверхностного слоя ПАВ и встраиванием в него большего количества олеиновой кислоты, что приводило к дестабилизации системы.

Таким образом можно сделать вывод, что полярность вещества, составляющего ядро, влияет как на размер, так и на агрегативную и седиментационную устойчивость НЭ. Полярное вещество наиболее вероятно частично встраивается в адсорбционный слой, что приводит к уменьшению диаметра капель, однако при этом уменьшается устойчивость системы. Если ядро капель дисперсной фазы неполярное, то формируются капли большего размера с более высокой устойчивостью.

3.2. Свойства твёрдых липидных наночастиц с полярным и неполярным ядром

Для определения влияния полярности липидного ядра на свойства ТЛН были проведены исследования стабильности к агрегации и седиментации наночастиц, состоящих из парафина (неполярное ядро) или стеариновой кислоты (полярное ядро), полученных методом ТИФ. ТЛН были стабилизированы смесью ПАВ: Tween 80 и Span 80 или Tween 60 и Span 60 в мольном соотношении 0,76. Данное мольное соотношение было взято таким же, как в НЭ. Концентрация липидной части составляла 25 об.% [164]. В качестве дисперсионной среды использовался 0,15 М раствор NaCl. Были определены температуры инверсии фаз, оценено влияние состава ядра и концентрации ПАВ на размер получаемых частиц. Изучена стабильность полученных суспензий наночастиц к агрегации и обратной седиментации при 25 °С и при повышенных температурах.

3.2.1. Определение температуры инверсии фаз в дисперсиях твёрдых липидных наночастиц

Определение ТИФ в дисперсиях ТЛН и соответственно температурного диапазона существования данных дисперсных систем проводили кондуктометрическим методом. Методика эксперимента описана в разделе 3.1.1.

Инверсия фаз в дисперсиях ТЛН со стеариновой кислотой протекала в узком диапазоне температур 68-72 °С (Рисунок 3.11). Увеличение концентрации Tween 60 и Span 60 в ТЛН из стеариновой кислоты незначительно влияло на температурный интервал инверсии фаз (Таблица 3.5).

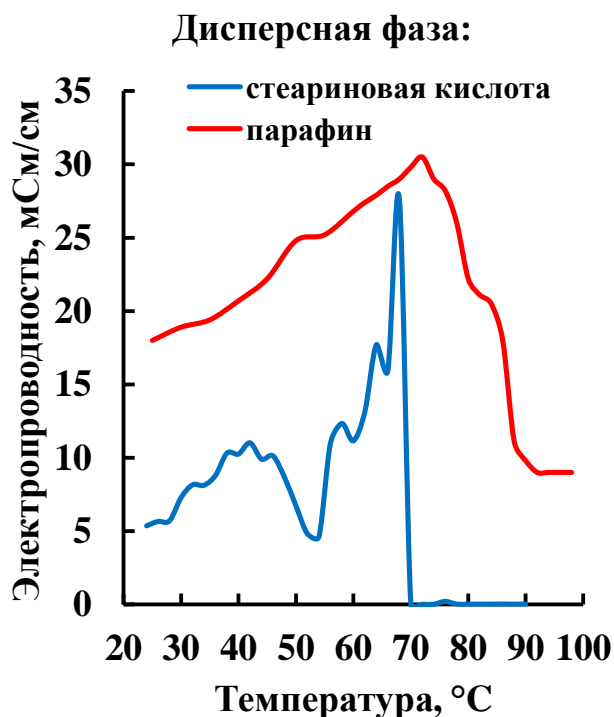


Рисунок 3.11 - Зависимости электропроводности дисперсий ТЛН из стеариновой кислоты или парафина от температуры. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15 об.%

Таблица 3.5 - Температурные диапазоны инверсии фаз в водных дисперсиях ТЛН

Ядро	ПАВ	Концентрация ПАВ, об. %	Температурный диапазон, °С
Стеариновая кислота	Tween 60 + Span 60	12,5	68÷72
		15,0	68÷70
	Tween 80 + Span 80	12,5	68÷72
Парафин	Tween 60 + Span 60	15	72÷82
	Tween 80 + Span 80	12,5	82÷92

В дисперсиях ТЛН с парафином инверсия фаз протекала при более высокой температуре, что может быть связано с тем, что парафин является смесью углеводородов, преимущественно нормального строения с 18-35 атомами углерода.

3.2.2. Влияние концентрации поверхностно-активных веществ на дисперсность твердых липидных наночастиц

Как показали предыдущие исследования, наиболее устойчивые НЭ с наиболее мелкими каплями дисперсной фазы образуются при стабилизации 12,5 мас.% Tween 60 и Span 60 или Tween 80 и Span 80. Для определения концентрации ПАВ, необходимой для получения стабильных ТЛН были исследованы ТЛН с полярным или неполярным твёрдым ядром из стеариновой кислоты или парафина соответственно, стабилизированные Tween 60 и Span 60 или Tween 80 и Span 80. Концентрация стеариновой кислоты или парафина в ТЛН составляла 25 об.%. Распределения ТЛН по размерам представлены на рисунках 3.12 и 3.13.

Распределение по размерам ТЛН со стеариновой кислотой при стабилизации смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией ПАВ 12,5 об.% было бимодальным (рисунок 3.12а) и мономодальным у ТЛН с парафином. Размер отдельных ТЛН со стеариновой кислотой составлял 15 ± 1 нм, с парафином 90 ± 7 нм. При этом в системе со стеариновой кислотой присутствовало небольшое количество флокул или более крупных частиц размером 220 ± 20 нм. При увеличении концентрации ПАВ до 15 об.% средний размер ТЛН со стеариновой кислотой изменялся незначительно и составлял 20 ± 2 нм. Увеличение суммарной концентрации ПАВ в дисперсиях с ТЛН из парафина приводило к образованию частиц размером 60 ± 4 нм. Распределения частиц по размерам в обеих системах были мономодальными. Вероятно, концентрации ПАВ 12,5 об.% было не достаточно, поэтому наряду с образованием наночастиц происходило образование флокул или более крупных частиц.

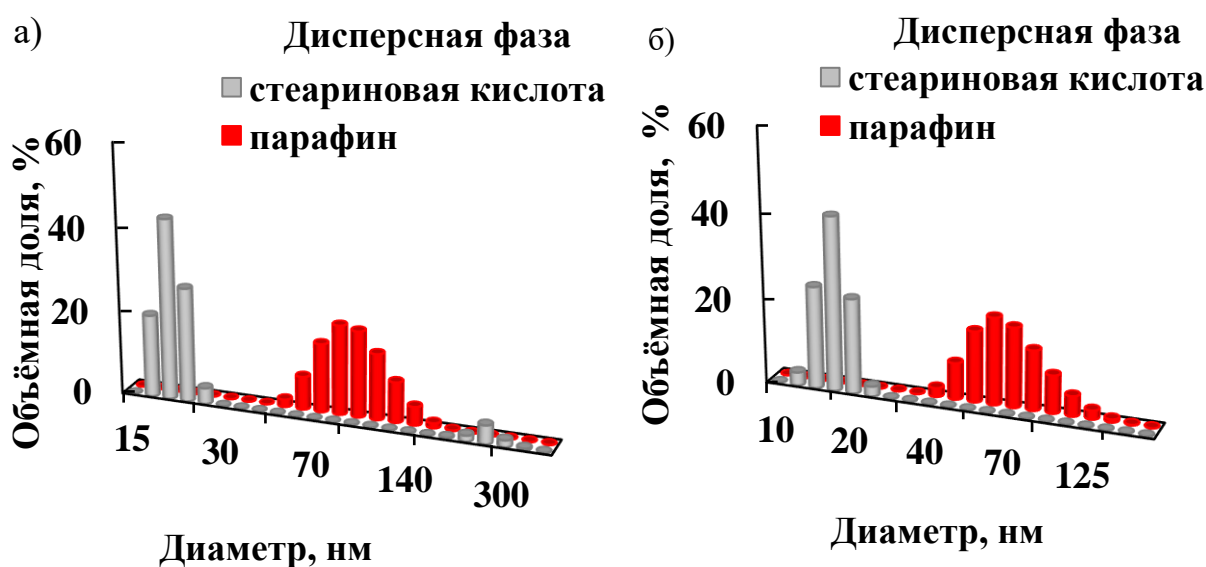


Рисунок 3.12 – Распределения по размерам ТЛН из стеариновой кислоты или парафина. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 12,5 (а) или 15,0 об.% (б). Температура - 25 °С

Визуализация ТЛН проводилась с помощью крио-ПЭМ и ПЭМ. На рисунке 3.13 приведены микрофотографии образцов.

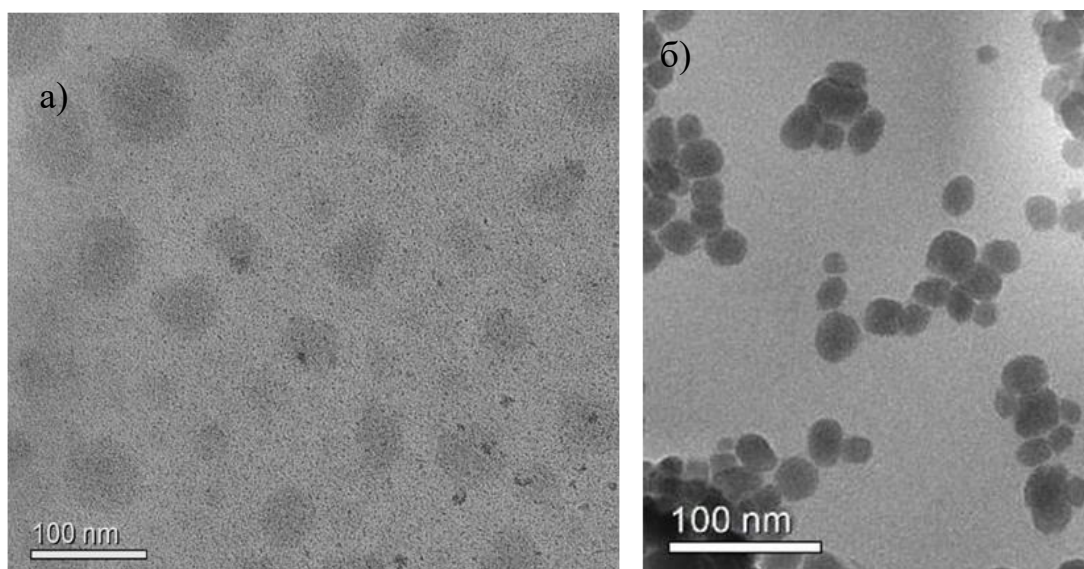


Рисунок 3.13 - Крио-ПЭМ (а) и ПЭМ (б) микрофотографии наночастиц стеариновой кислоты. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 (а) и 15,0 об. % (б)

Средний диаметр ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 об.%, составлял 60 ± 4 нм. При увеличении концентрации ПАВ до 15 об.% размер частиц уменьшался до 20 ± 2 нм (рисунок 3.13б). Стоит отметить, что размеры наночастиц, полученные с помощью ПЭМ и крио-ПЭМ согласуются с данными, полученными с помощью метода динамического рассеяния света.

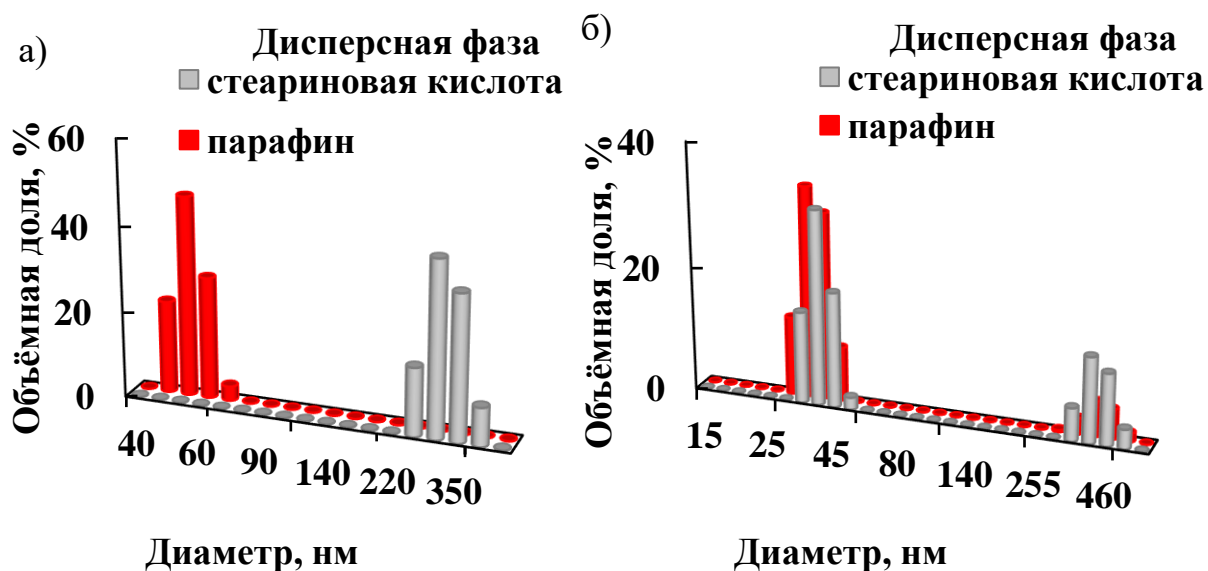


Рисунок 3.14 – Распределения по размерам ТЛН из стеариновой кислоты или парафина. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с концентрацией 12,5 (а) или 15,0 об.% (б). Температура - 25 °С

При стабилизации ТЛН смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 средний диаметр ТЛН с парафином практически не зависел от концентрации ПАВ в данном диапазоне и составлял 40 ± 3 нм (рисунок 3.14).. Средний диаметр ТЛН со стеариновой кислотой составлял 300 ± 30 нм при концентрации ПАВ 12,5 об.% и 40 ± 3 нм при концентрации 15,0 об.%. Следует отметить, что при увеличении суммарной концентрации ПАВ до 15 об.% как в системе с парафином, так и со стеариновой кислотой распределение по размерам становилось бимодальным, присутствовали агрегаты или крупные частицы размером 400 ± 40 нм. Наиболее вероятно, это связано с тем, что, как будет показано в разделе 3.3, при 25 °С адсорбционный слой из Tween 80 и Span 80 на поверхности ТЛН находился в жидкообразном состоянии. Поэтому, столкновения таких наночастиц, участвующих в броуновском движении, были эффективными, что приводило к их происходила их агрегация.

3.2.3. Стабильность дисперсий твёрдых липидных наночастиц к агрегации и обратной седиментации

Для определения устойчивости ТЛН к агрегации и седиментации проводилось измерение размеров частиц в течение 30 сут. Исследованы ТЛН с полярным и неполярным ядром, состоящим из стеариновой кислоты и парафина соответственно, стабилизированные Tween 60 и Span 60 или Tween 80 и Span 80, суммарной концентрацией 12,5 или 15,0 об.%.

На рисунке 3.15 представлены зависимости изменения размеров ТЛН, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 15,0 об.%, от времени.

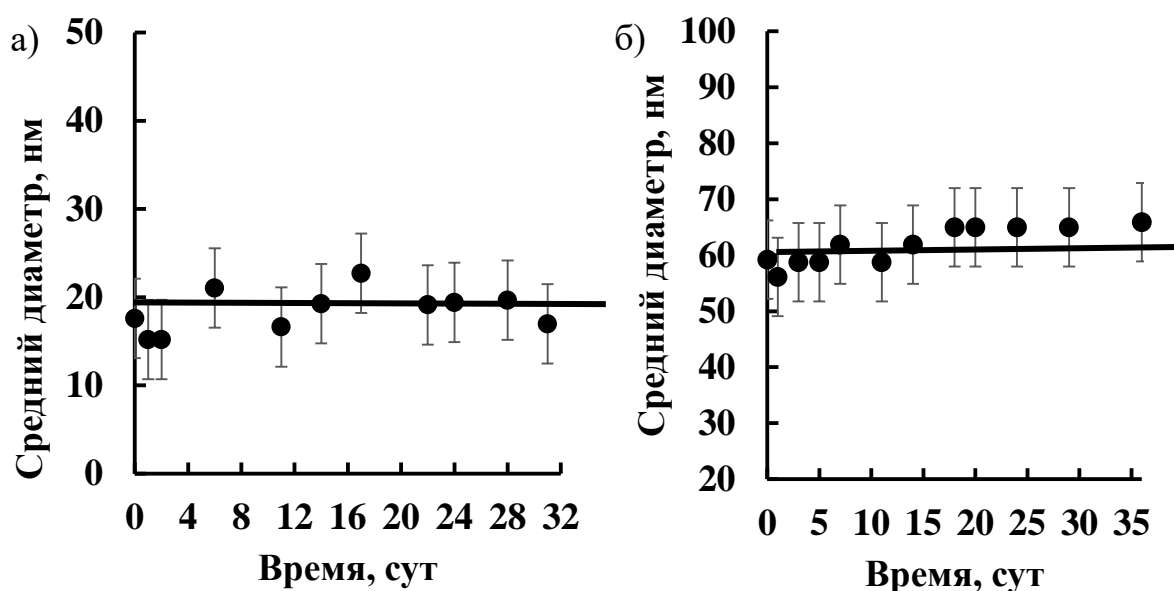


Рисунок 3.15 - Зависимости среднего диаметра ТЛН со стеариновой кислотой (а) или парафином (б) от времени. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15,0 об.%. Температура - 25 °С

Средний диаметр ТЛН из стеариновой кислоты составлял 20 ± 1 нм. При этом в течение 32 сут размер частиц изменялся в пределах погрешности измерений. Средний диаметр ТЛН из парафина составлял 60 ± 4 нм, и также оставался практически постоянным в течение этого периода времени. Данные системы также показали устойчивость к седиментации во времени. На рисунке 3.16 приведены профили обратного рассеяния света в суспензиях

ТЛН, стабилизированных ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 15,0 об. %.

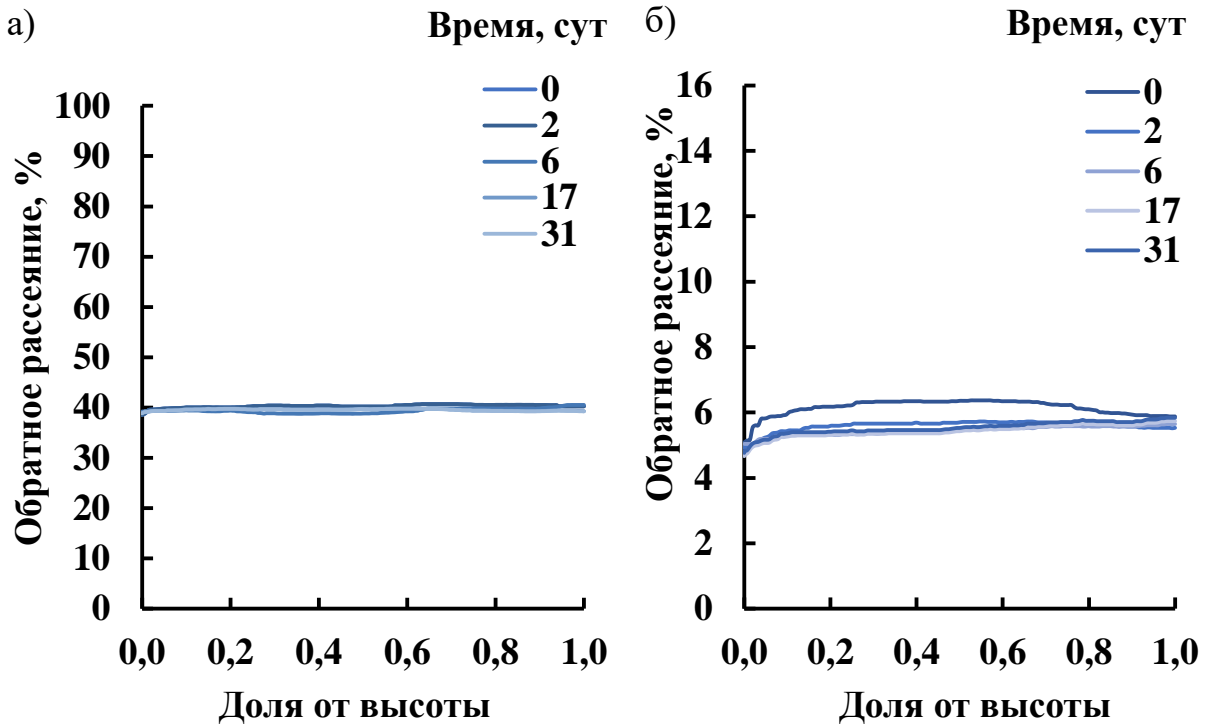


Рисунок 3.16 - Профили обратного рассеяния света в дисперсиях ТЛН из стеариновой кислоты (а) или парафина (б). ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15,0 об.%. Температура - 25 °С

Профили обратного рассеяния света в обоих образцах оставались практически неизменными в течение времени исследования, что говорит об стабильности данных систем к агрегации и последующей седиментации.

На рисунке 3.17 представлены распределения по размерам ТЛН состоящих из стеариновой кислоты или парафина, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 об. %.

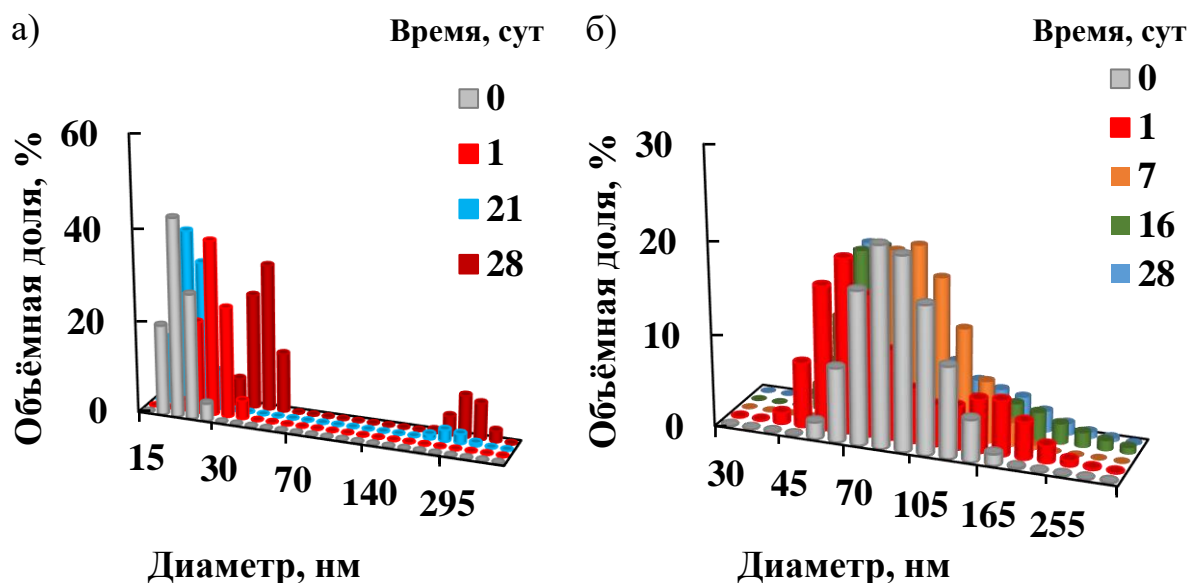


Рисунок 3.17 - Распределения ТЛН из стеариновой кислоты (а) или парафина (б) по размерам в зависимости от времени. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 12,5 об.%. Температура - 25 °С

Размер ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 об. %, оставался практически постоянным в течение 8 сут, однако на 11 сут появился второй пик, соответствующий агрегатам размером 300 ± 30 нм. По-видимому, данной концентрации ПАВ не хватало для образования сплошного слоя на поверхности наночастицах, поэтому в системе с течением времени протекала медленная агрегации.

Размер ТЛН из парафина оставался постоянным до 17 сут. Однако распределение частиц по размерам было значительно шире, чем при стабилизации Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15 об. %.

На рисунке 3.18 представлены профили обратного рассеяния света от высоты столба суспензии ТЛН из стеариновой кислоты и парафина, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 об. %. Профиль обратного светорассеяния в исходной суспензии ТЛН из стеариновой кислоты (рисунок 3.18а) представлял собой

практически ровную линию, что говорит об однородности структуры суспензии. Через 1 сут происходило уменьшение обратного рассеяния света, что свидетельствует об агрегации липидных наночастиц. В дальнейшем наблюдалось скачкообразное изменение обратного светорассеяния, которое связано с обратной седиментацией агрегатов. При этом происходило частичное отслаивание водной фазы, что приводило к снижению оптической плотности и уменьшению обратного рассеяния света в нижней части суспензии. Однако следует отметить, что отслаивание водной фазы было незначительным в течение 28 сут.

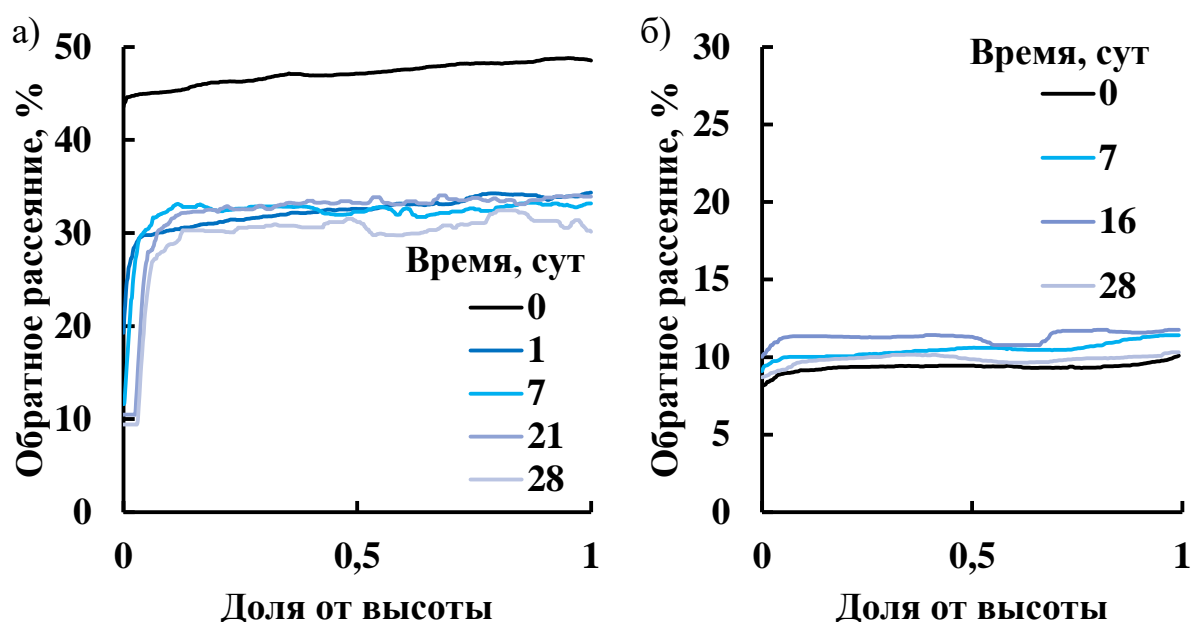


Рисунок 3.18 – Профили обратного рассеяния света в дисперсии ТЛН из стеариновой кислоты (а) или парафина (б). ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 12,5 об.%. Температура - 25 °С

Профили обратного светорассеяния в дисперсии ТЛН из парафина оставались неизменными в течение 28 сут, что свидетельствует об устойчивости данной системы к процессам агрегации и седиментации.

Можно заключить, что при стабилизации Tween 60 и Span 60 дисперсии ТЛН с неполярным ядром характеризуются более высокой агрегативной и

седиментационной устойчивостью при более низкой концентрации ПАВ, чем дисперсии ТЛН с полярным ядром.

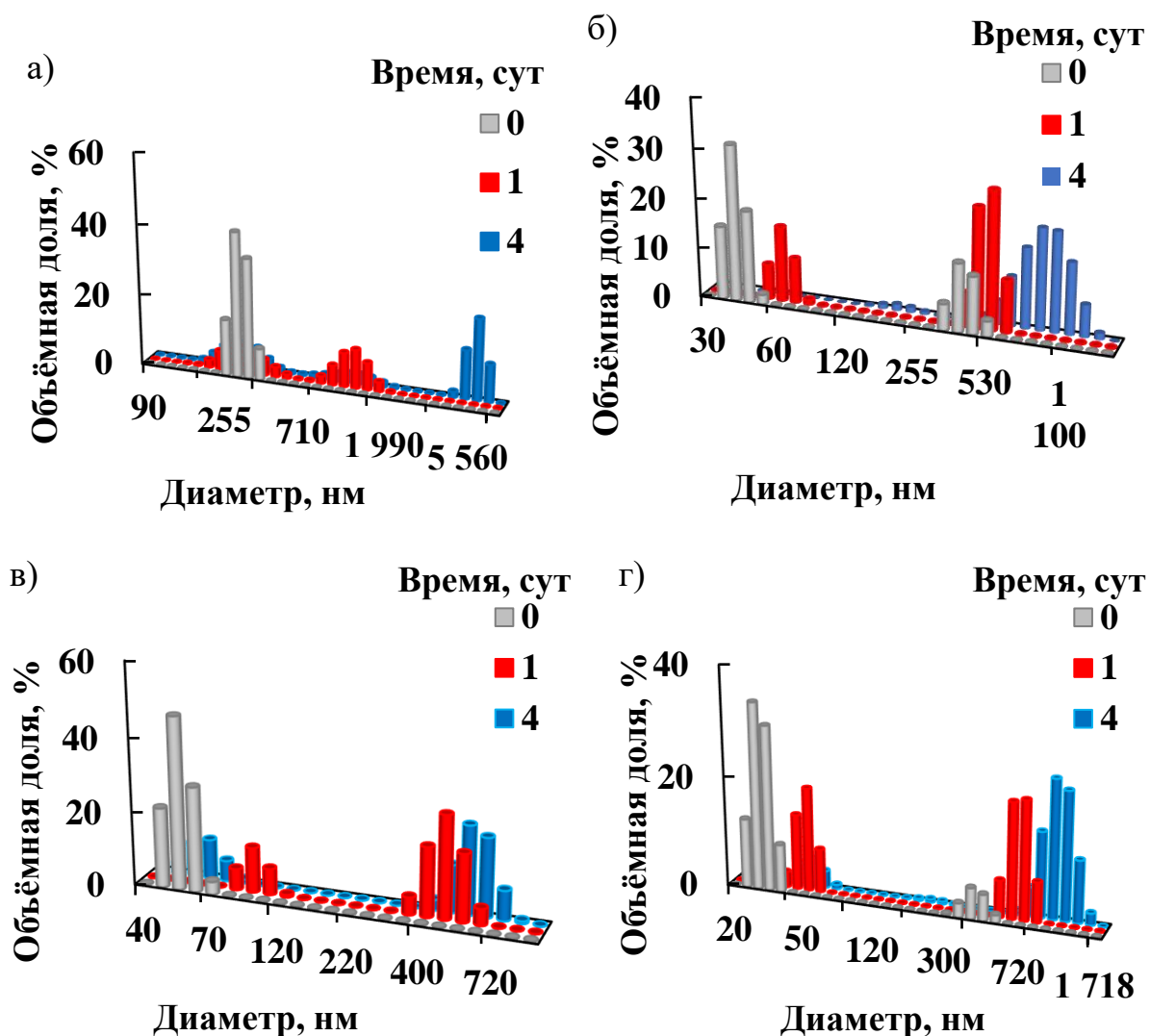


Рисунок 3.19 - Распределения по размерам в зависимости от времени после получения ТЛН из стеариновой кислоты (а, в) или парафина (б, г). ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с концентрацией 12,5 об. % (а, б) и 15,0 об. % (в, г). Температура - 25 °С

На рисунке 3.19 представлены распределения по размерам в зависимости от времени после получения ТЛН из стеариновой кислоты или парафина, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с суммарной концентрацией 12,5 об. % и 15,0 об. %.

Все образцы ТЛН, стабилизированные смесью ПАВ Tween 80 и Span 80, были нестабильны и агрегировали через 1-4 сут. Вероятно, это связано с тем, что также, как и в случае НЭ, адсорбционный слой на поверхности ТЛН находился в жидкообразном состоянии, и столкновения наночастиц, участвующих в броуновском движении, приводили к их агрегации.

Средний диаметр ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированных смесью Tween 80 и Span 80 с концентрацией 12,5 об.%, после получения составлял 255 ± 20 нм (рисунок 3.19а). Данная дисперсия частиц стеариновой кислоты была очень неустойчива к агрегации. Доля одинарных наночастиц быстро уменьшалась, доля агрегатов возрастала. На рисунке 3.20а показана гистограмма, построенная по микрофотографиям, полученным с помощью оптической микроскопии. По сути это продолжение правой ветви второго максимума на гистограмме, приведенной на рисунке 3.19а, которую не удалось точно определить с помощью метода динамического светорассеяния. На вставке приведена фотография образца, разбавленного в 10 раз, через 30 сут после получения, на которой видно, что произошла седиментация крупных агрегатов наночастиц. При этом жидкость над осадком достаточно мутная, как показали результаты динамического светорассеяния, в ней содержались частицы размером 180 ± 15 нм и агрегаты - 550-650 нм. На рис. 3.20б приведена крио-ПЭМ фотография частиц стеариновой кислоты, стабилизированных Tween 80 и Span 80, на которой видны как одинарные наночастицы, так и ламелярные образования, природа которых пока недостаточно понятна. Возможно, что структура частиц стеариновой кислоты была многослойной с некоторыми включениями ПАВ, содержание которого убывало от внешних слоев к внутренним. По-видимому, если ядро полярное, то образуются липидные частицы со слоистой структурой, как и в случае с олеиновой кислотой.

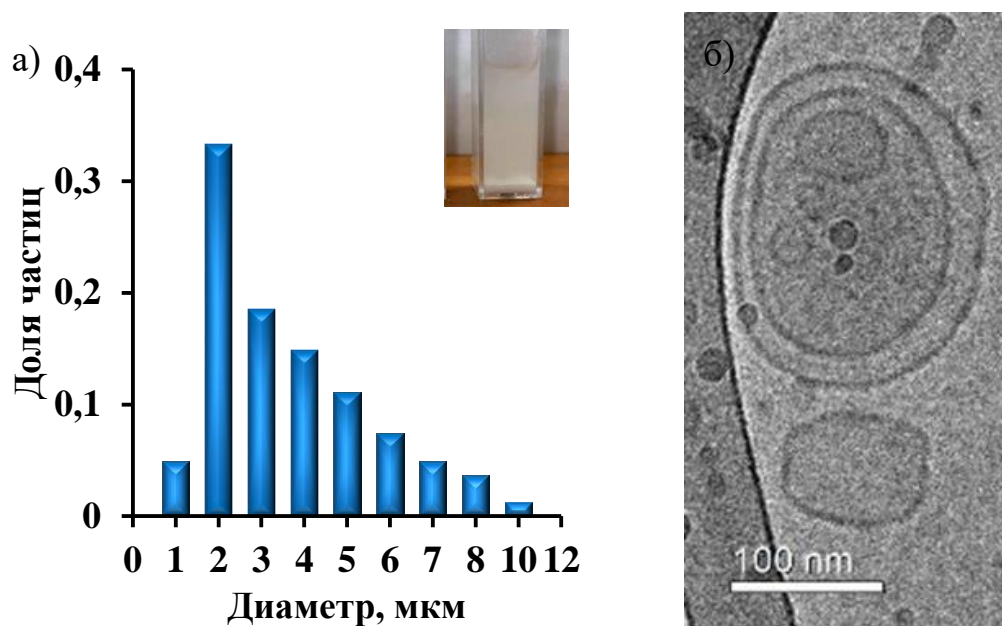


Рисунок 3.20 - Распределение по размерам ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с суммарной концентрацией 12,5 об. %, полученное по результатам оптической микроскопии; на вставке фотография дисперсии частиц стеариновой кислоты, разбавленной в 10 раз, через 30 сут (а). Крио-ПЭМ изображение наночастиц стеариновой кислоты (б)

Средний размер наночастиц в дисперсии ТЛН из парафина, стабилизированных смесью Tween 80 и Span 80 с концентрацией 12,5 об.%, сразу же после получения был равен 45 ± 3 нм, агрегатов наночастиц не было. Однако система была неустойчивой к агрегации, и с течением времени на гистограммах появился второй максимум, соответствующий агрегатам. На гистограмме, построенной по данным оптической микроскопии, имелся максимум, соответствующий крупным частицам парафина размером ~ 4 мкм (рисунок 3.21а), которые всплывали с течением времени (вставка на рисунке 3.21а). Можно заключить, что при получении частиц парафина методом ТИФ получается суспензия, содержащая две фракции: как наночастицы, так и микрочастицы.

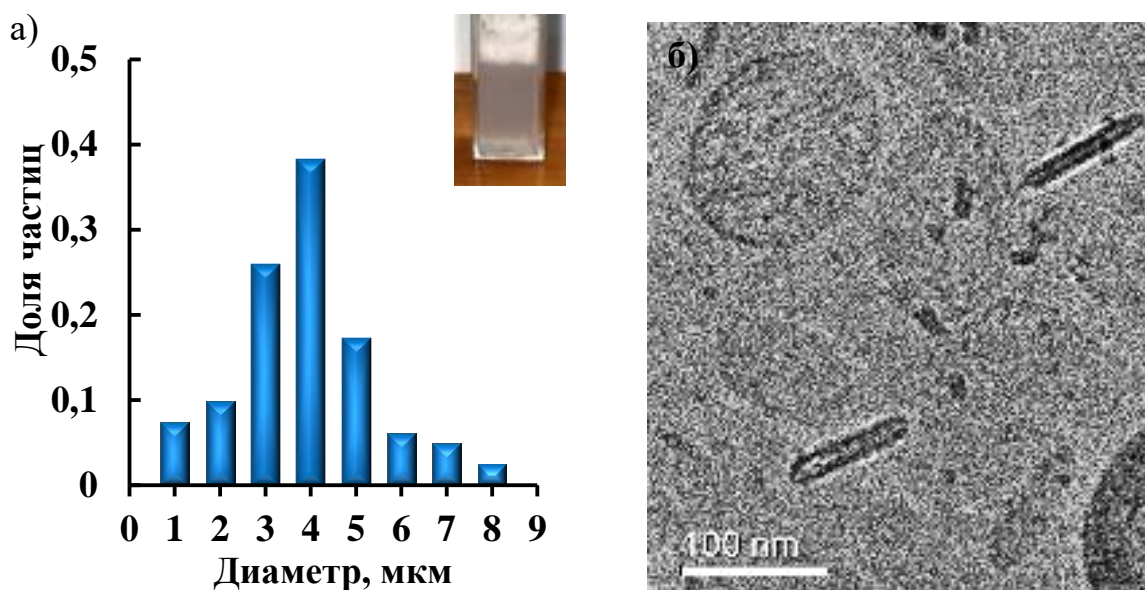


Рисунок 3.21 - Распределение по размерам ТЛН из парафина, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с суммарной концентрацией 12,5 об. %, полученное по результатам оптической микроскопии; на вставке фотография дисперсии частиц стеариновой кислоты, разбавленной в 10 раз, через 30 сут (а). Крио-ПЭМ изображение наночастиц парафина (б)

На рисунке 3.21б приведена крио-ПЭМ фотография нанометровой фракции частиц парафина, на которой видно, что в системе присутствуют как сфероидальные наночастицы, так и палочкообразной формы. Возможно, что формирование микрометровой фракции частиц парафина в таких системах обусловлено известным механизмом необратимого срастания агрегатов частиц при возникновении иглообразных кристаллов, проникающих в соприкасающиеся частицы [168].

Таким образом, для получения ТЛН, устойчивых к агрегации и седиментации, необходимо использовать смесь ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 15 об.%. В этом случае образуются устойчивые к агрегации и седиментации ТЛН как с полярным, так и неполярным ядром.

3.2.4. Устойчивость дисперсий твёрдых липидных наночастиц при повышенных температурах

Для оценки стабильности ТЛН к агрегации при повышенных температурах было проведено измерение размеров наночастиц при нагревании системы. ТЛН из стеариновой кислоты или парафина, стабилизированные Tween 60 и Span 60, разбавляли в 10 раз 0,15 М водным раствором NaCl. Полученные суспензии нагревали до 60 °С и охлаждали до 25 °С. Проводили два цикла нагрева и охлаждения с шагом 5 °С. На рисунке 3.22 приведены зависимости среднего диаметра ТЛН от температуры.

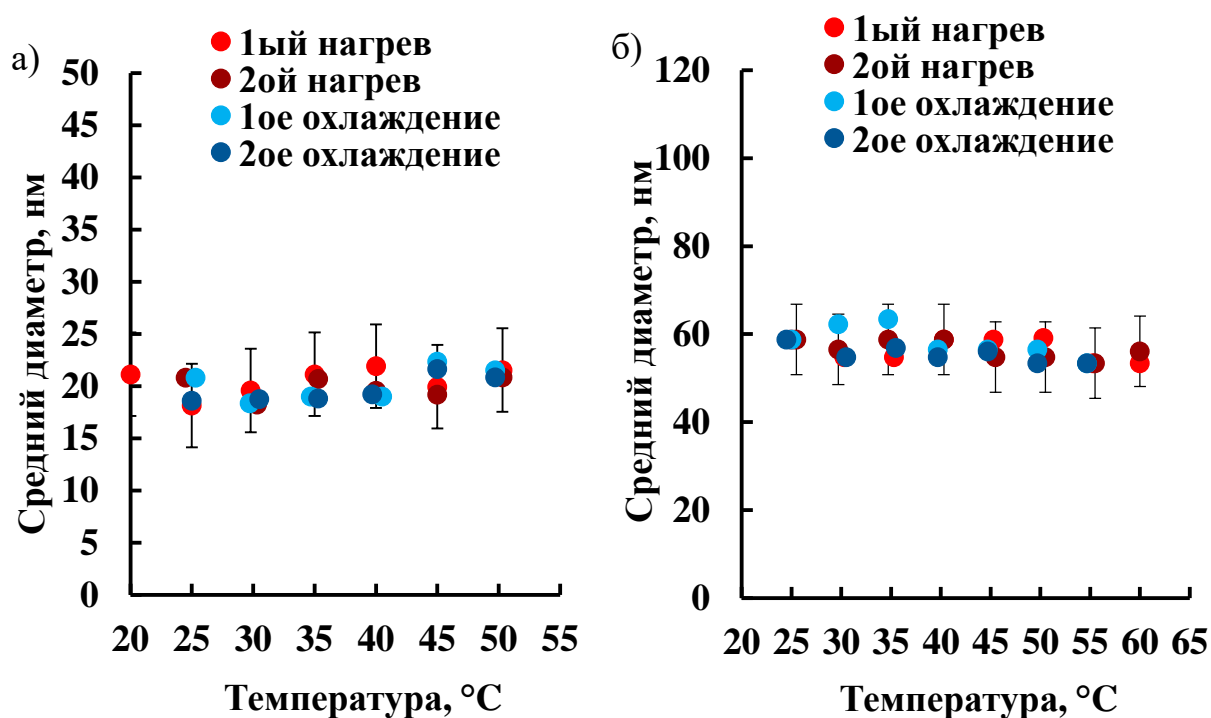


Рисунок 3.22 - Зависимости среднего диаметра ТЛН из стеариновой кислоты (а) и парафина (б) от времени. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15 об.%

Средние диаметры ТЛН изменялись в пределах погрешности измерений в обоих случаях. Средний диаметр ТЛН из стеариновой кислоты составлял 20 ± 1 нм на протяжении двух циклов нагревания-охлаждения. Средний диаметр ТЛН из парафина составлял 60 ± 4 нм. При этом ТЛН с полярным ядром сохраняла устойчивость только до 50 °С, при дальнейшем

увеличении температуры происходила агрегация частиц. Это можно объяснить плавлением твердообразного поверхностного слоя ПАВ, со встроенной в него стеариновой кислотой, что приводило к снижению стабильности системы к агрегации.

3.2.5. Стабильность дисперсий твёрдых липидных наночастиц из природного воска к агрегации и обратной седиментации

В работе было проведено исследование устойчивости ТЛН из природного воска смешанного состава. В качестве липидной фазы был использован пчелиный воск, т.к. он имеет низкие температуры плавления и смешанный состав из сложных эфиров, насыщенных углеводородов и жирных кислот [169]. ТЛН стабилизированы смесью Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15 об.% и Tween 80 и Span 80 с концентрацией 12,5 об.%. Концентрация липида в дисперсиях ТЛН составляла 25 об.%.

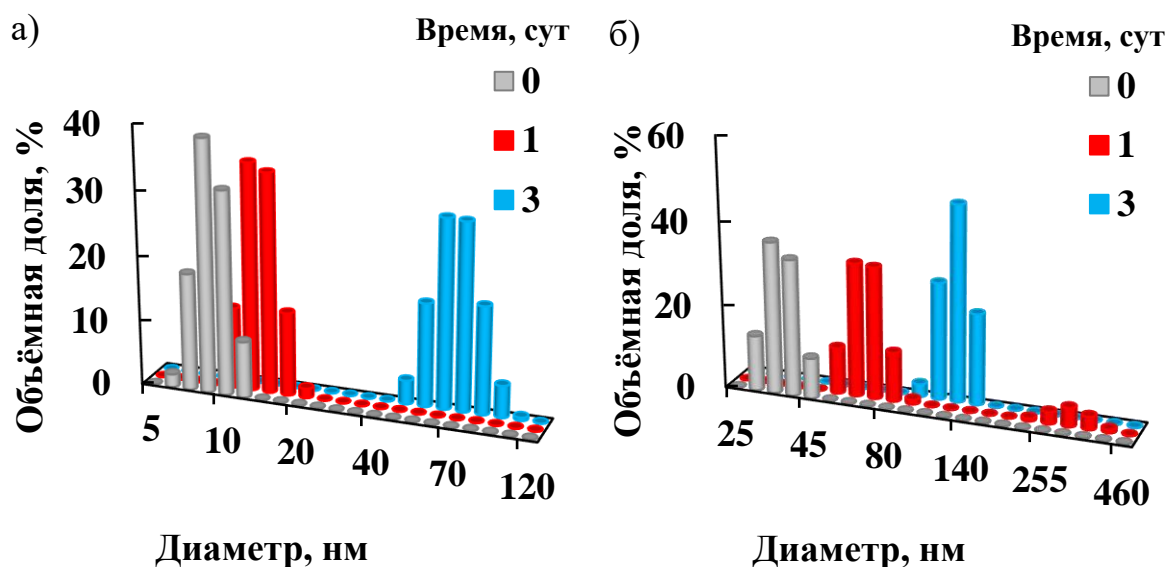


Рисунок 3.23 - Распределения ТЛН из пчелиного воска по размерам в зависимости от времени. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15,0 об.% (а) или Tween 80 и Span 80 с концентрацией 12,5 об.%. Температура - 25 °С

Распределения ТЛН из пчелиного воска по размерам представлены на рисунке 3.23. Размер ТЛН, стабилизированных смесью Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 15,0 об. % составлял 12 ± 3 нм после получения, однако частицы агрегировали через 3 сут. Средний диаметр ТЛН из пчелиного воска, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 суммарной концентрацией 12,5 об. % составлял 36 ± 5 нм после получения, но в течении суток частицы также агрегировали.

Вероятнее всего низкая устойчивость ТЛН из пчелиного воска к агрегации связана с со смешанным составом воска, в котором присутствуют как полярные, так и неполярные соединения. В результате этого, некоторые компоненты воска могла встраиваться в поверхностный слой и снижать агрегативную устойчивость системы.

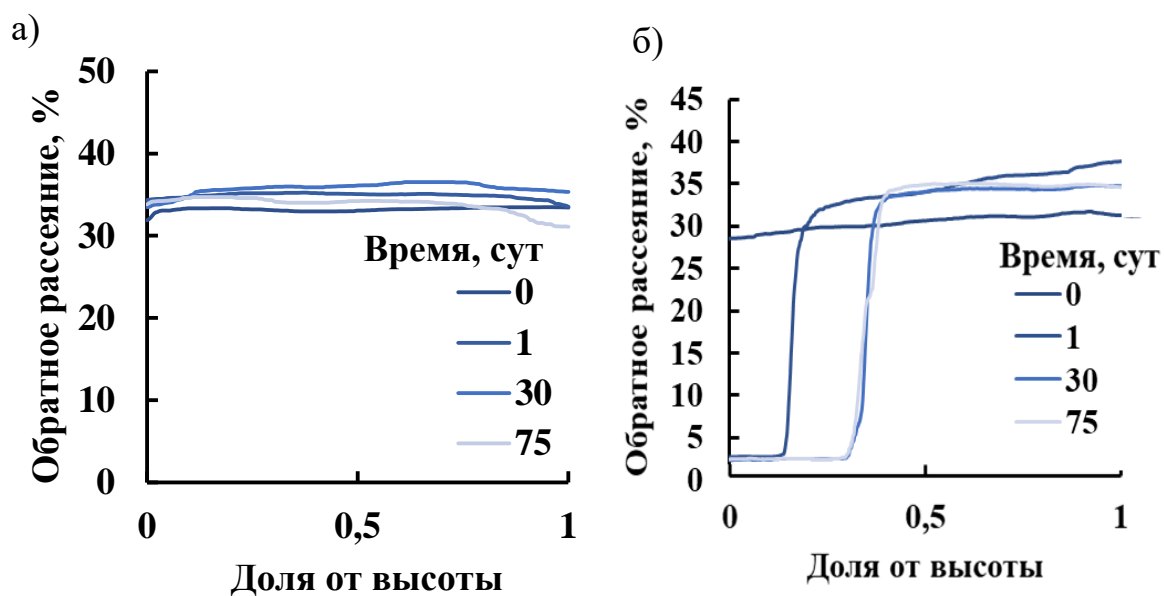


Рисунок 3.24 - Профили обратного рассеяния света в водных дисперсиях ТЛН из пчелиного воска. ТЛН стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15,0 об.%(а) или Tween 80 и Span 80 с концентрацией 12,5 об.%. Температура - 25 °С

Профили обратного рассеяния света в дисперсиях ТЛН из пчелиного воска представлены на рисунке 3.24. Профили обратного рассеяния для ТЛН, стабилизированных Tween 60 и Span 60 с концентрацией 15,0 об.%

устойчивость системы. В случае неполярного ядра, формируются липидные наночастицы немного большего размера, но с более высокой устойчивостью к агрегации и седиментации.

3.3. Определение температуры фазовых переходов в наноэмульсиях и твёрдых липидных наночастицах

При создании адресных систем доставки, в том числе для понимания механизмов проникновения частиц в клетки, важным параметром является структура частиц и их фазовое состояние. Для исследования структуры и свойств НЭ и ТЛН, как ненагруженных, так и нагруженных ЛС, были получены термограммы нагревания и охлаждения систем разного состава.

3.3.1. Фазовые переходы в наноэмульсиях с дисперсной фазой из парафинового масла или олеиновой кислоты

Температуры фазовых переходов в НЭ определяли с помощью микрокалориметрического анализа. Для идентификации пиков были определены температуры плавления отдельных компонентов, входящих в состав НЭ в объёмном и переохлажденном объёмном состоянии, методом ДСК (Рисунок 3.26 и Таблица 3.6). Переохлаждённые образцы получали в тех же условиях, как и НЭ: компоненты нагревали выше температуры плавления и резко охлаждали до 0 °С.

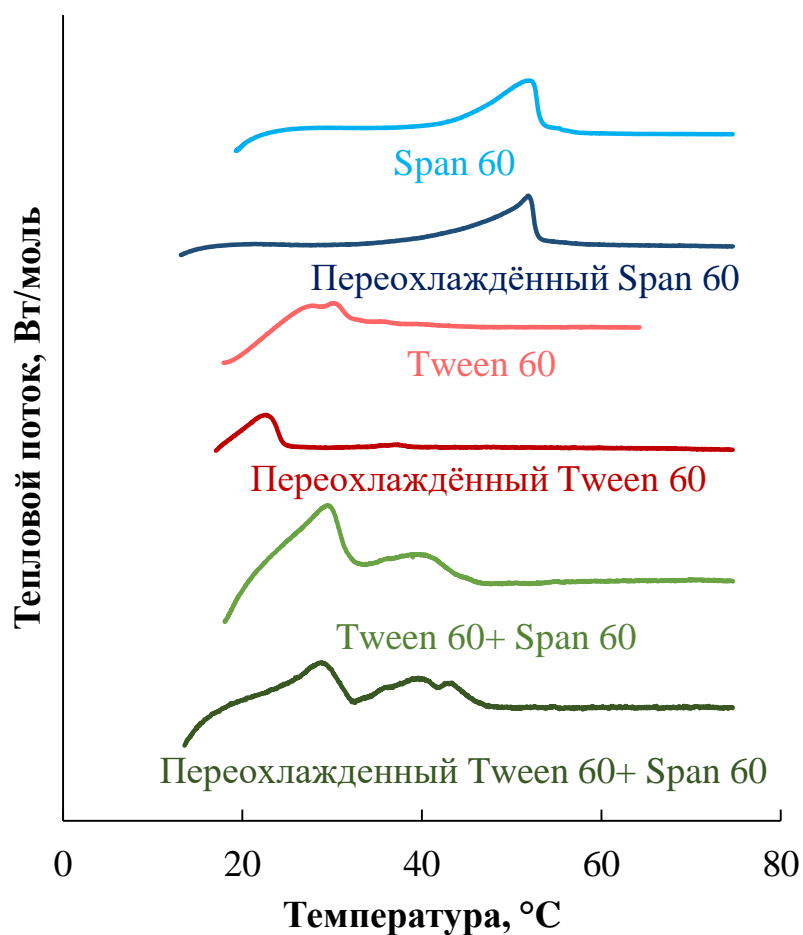


Рисунок 3.26 - Термограммы ПАВ, полученные при скорости нагрева 1 °С/мин

Таблица 3.6 - Температуры плавления компонентов, входящих в состав НЭ

Вещество	Температура плавления, °С	
	Объёмное состояние	Переохлаждённое объёмное состояние
Парафиновое масло	-15,0	-
Олеиновая кислота	13,0-14,0	-
Span 60	51,9 ± 0,8	51,9 ± 0,8
Tween 60	24,5 ± 0,5 21,6 ± 0,5	22,8 ± 0,5
Tween 60/Span 60	29,5 ± 0,5 44,4 ± 0,7	29,1 ± 0,5 38,7 ± 0,5 43,3 ± 0,7

*Температуры плавления взяты из паспортов безопасности реактивов

На термограммах Tween 60 в объёмном состоянии присутствовало 2 пика: основной при 24,5 °С и второй при 21,6 °С. Наличие второго пика возможно связано с некоторым структурным переходом при нагревании вещества, которое отсутствовало на термограмме переохлаждённого Tween 60. В обоих случаях на термограммах Span 60 присутствовал только один эндотермический пик при 51,9 °С.

На термограммах смеси ПАВ Tween 60 и Span 60 присутствовало два пика: первый явный пик при 29,5 °С и второй, более размытый, при 44,4 °С. Положение первого пика находилось выше температуры плавления Tween 60, положение второго пика немного ниже температуры плавления Span 60. Скорее всего смесь ПАВ разделилась на две фракции с более высоким и более низким содержанием Tween 60. На термограммах смеси ПАВ Tween 60 и Span 60 в переохлаждённом объёмном состоянии положение пиков практически не изменялось.

Методом микрокалориметрии исследовались образцы НЭ с дисперсной фазой из парафинового масла или олеиновой кислоты и смеси ПАВ Tween 60 и Span 60 с концентрацией 12,5 об.%. НЭ разбавляли в 10 раз 0,15 М водным раствором NaCl. Каждый из образцов подвергался двум циклам нагрева до 60 °С - охлаждения до 5 °С, затем был проведен третий нагрев образца от 5 °С до 95 °С.

В НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла, при 5 °С твёрдыми являлись только ПАВ, поэтому на термограммах нагрева и охлаждения пики соответствовали плавлению адсорбционного поверхностного слоя. На термограммах нагрева присутствовали два эндотермических пика: слабовыраженный при ~30 °С и явно выраженный при ~37 °С (рисунок 3.27а). На кривых охлаждения экзотермические пики смещались в область более низких температур: ~23 °С и ~22 °С соответственно. Эти пики соответствовали плавлению и затвердеванию оболочки ПАВ на поверхности капель. Вероятно, молекулы ПАВ в основном

образовывали смешанный адсорбционный слой на поверхности капель НЭ с температурой плавления ~ 37 °С, но в нём присутствовали небольшие зоны с повышенным содержанием Tween 60, с более низкой температурой плавления. Следует отметить, что в обоих циклах нагревания-охлаждения положение пиков практически совпадало, что свидетельствует об устойчивости НЭ с дисперсной фазой из парафинового масла в данном температурном интервале. Причем система оставалась устойчивой даже при температуре нагрева выше температуры плавления оболочки ПАВ. Резкий подъем на кривой третьего нагрева при температуре ~ 80 °С приблизительно соответствует началу инверсии фаз в НЭ.

На рисунке 3.27б приведены термограммы, полученные в двух циклах нагревания и охлаждения НЭ с дисперсной фазой, состоящей из олеиновой кислоты.

На кривой первого нагрева присутствовало два эндотермических пика: при температурах ~ 14 и ~ 41 °С. Первый пик соответствовал плавлению олеиновой кислоты, второй – плавлению смешанного адсорбционного слоя ПАВ Tween 60 и Span 60. При втором нагревании положения пиков сохранялись, однако их форма была менее чётко выражена. Первый пик становился более протяженным от ~ 17 до ~ 27 °С. Второй пик сдвигался в сторону меньших температур ~ 38 °С.

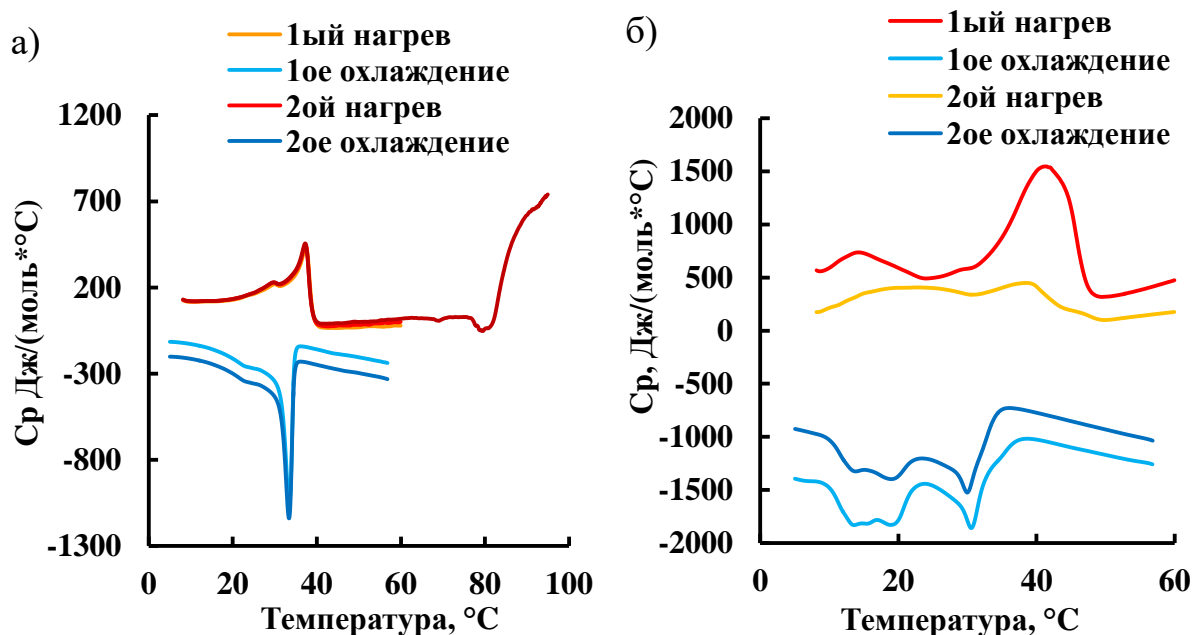


Рисунок 3.27 - Термограммы, полученные в двух циклах нагревания и охлаждения НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла (а) и олеиновой кислоты (б) в диапазоне 5-60°C. Третий цикл нагрева для НЭ с дисперсной фазой из парафинового масла проводился в диапазоне 5-95 °С.

Скорость нагрева и охлаждения 1 °С/мин

На кривой первого охлаждения присутствовало два экзотермических пика. Первый пик раздваивался на две части: начинался при ~14 °С и заканчивался более выраженным пиком при ~19 °С. Второй пик чётко выражен при температуре ~30 °С. Пики при втором охлаждении оставались той же формы и находились в пределах погрешности измерений.

При получении НЭ с дисперсной фазой, состоящей из олеиновой кислоты, образовывался твёрдый адсорбционный слой ПАВ Tween 60 и Span 60. Олеиновая кислота обладает поверхностно-активными свойствами, но из-за резкого охлаждения системы при инверсии фаз, не успевала встроиться в адсорбционный слой и переходила в твёрдообразное состояние в ядре капель. При первом нагреве достигалась температура выше температуры плавления поверхностного слоя ПАВ, а последующее охлаждение протекало достаточно медленно (1°С/мин), полярная олеиновая

кислота частично встраивалась в адсорбционный слой, а небольшое количество ПАВ переходило в ядро капель дисперсной фазы в НЭ. В результате при втором нагревании первый пик стал более размытым и сместился в область более высоких температур. Второй пик, сместился в область более низких температур.

Стоит отметить, что такое перераспределение компонентов в НЭ мало отразилось на кривых кристаллизации. Сходство кривых при первом и втором охлаждении свидетельствует от устойчивости НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты и с оболочкой из смеси ПАВ Tween 60 и Span 60 в исследованном диапазоне температур.

Таким образом, можно сказать, что полярность ядра незначительно влияет на структуру капель дисперсной фазы: жидкое ядро из парафинового масла или олеиновой кислоты и твёрдой оболочки, образованной ПАВ: Tween 60 и Span 60. Однако при медленном нагревании выше температуры плавления оболочки ПАВ и последующем медленном охлаждении, в случае с НЭ с полярным ядром из олеиновой кислоты происходит некоторое перераспределение компонентов между ядром и оболочкой, что может влиять на свойства системы.

3.3.2. Фазовые переходы в твёрдых липидных наночастицах из стеариновой кислоты или парафина

В работе были исследованы ТЛН из стеариновой кислоты или парафина с концентрацией 25 об.%, ПАВ Tween 60 и Span 60 или Tween 80 и Span 80 с суммарной концентрацией 15,0 об.%. Для идентификации пиков на термограммах ТЛН были получены термограммы компонентов данных липидных систем в объемном и переохлажденном объемном состоянии (рисунок 3.28). Переохлажденные объемные образцы получали в тех же условиях, как и ТЛН: компоненты нагревали выше температуры плавления и резко охлаждали до 0 °С.

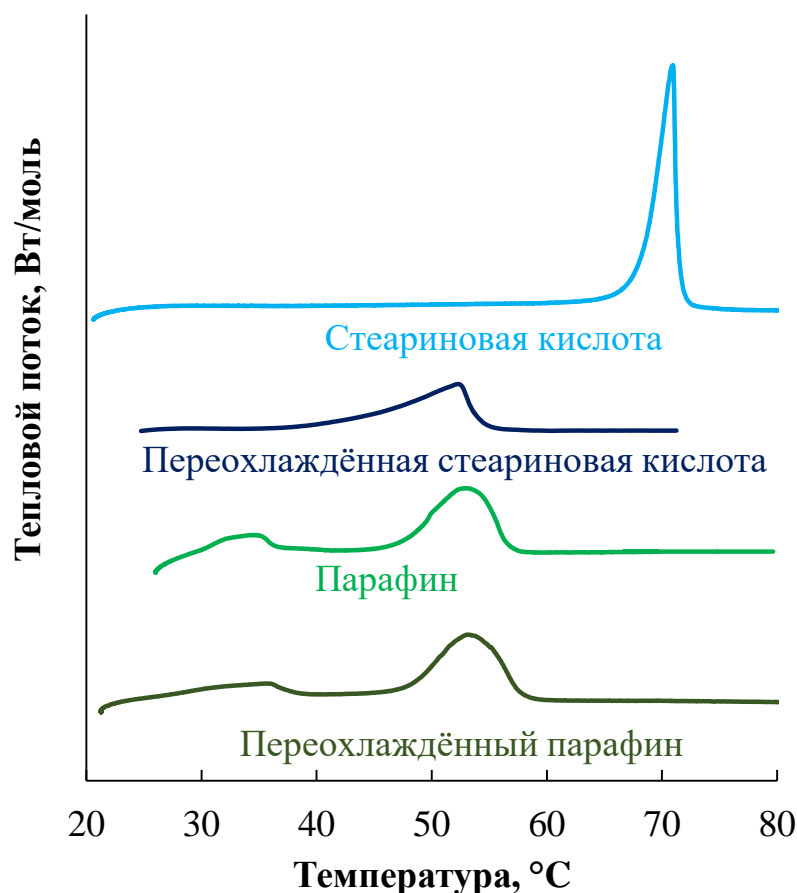


Рисунок 3.28 - Термограммы компонентов ТЛН, полученные при скорости нагревания 1 °С/мин

На термограмме плавления объемной стеариновой кислоты присутствовал эндотермический пик при 70,9 °С с началом плавления при 67,9 °С (рисунок 3.28б). В переохлаждённом состоянии положение пика смещалось в область более низких значений: начало при 42,4 °С и пик при 52,3 °С (таблица 3.7). Это связано с тем, что при резком охлаждении стеариновая кислота находится в состоянии переохлаждённого расплава.

На термограммах парафина присутствовало 2 пика: при 31,6 и 53,1 °С. Наличие двух пиков вероятно связано со смешанным составом парафина: с большим содержанием высокотемпературной фракции и небольшим содержанием низкотемпературной фракции. На кривых переохлаждённого парафина положение пиков оставалось практически без изменений.

Таблица 3.7 – Температуры плавления компонентов ТЛН

Вещество	Температуры плавления, °С	
	Объемное состояние	Переохлажденное объемное состояние
Стеариновая кислота	$70,9 \pm 1,0$	$52,3 \pm 0,8$
Парафин	$35,5 \pm 0,5$	$35,5 \pm 0,5$
	$53,1 \pm 0,7$	$53,1 \pm 0,7$
Span 80	$-(24,0-25,0)^*$	-
Tween 80	$-(20,0-21,0)^*$	-

*Температуры плавления взяты из паспортов безопасности реактивов

Для проведения микрокалориметрического анализа образцы разбавляли в 10 раз 0,15 М раствором NaCl. Каждый из образцов дважды нагревали до 60 °С и охлаждали до 5 °С. Для ТЛН из стеариновой кислоты был проведен третий нагрев от 5 °С до 95 °С.

На рисунке 3.29а представлены термограммы ТЛН из стеариновой кислоты с концентрацией ПАВ 15 об.%. Кривая первого нагрева ТЛН характеризовалась одним четким эндотермическим пиком при ~43 °С. На этой кривой также присутствовал слабо выраженный пик при 52-55 °С. Кривые, соответствующие второму и третьему нагреву, характеризовались двумя эндотермическими пиками при ~42,5 °С и ~53 °С. Первая и вторая кривые охлаждения ТЛН имели экзотермический пик при 50,4-50,7 °С. На этих кривых также присутствовал второй экзотермический пик ~37 °С.

Пики при ~43° С на кривых нагрева ТЛН из стеариновой кислоты соответствовали температуре плавления смешанного слоя молекул ПАВ на поверхности ТЛН. Увеличение теплоёмкости при 52-55 °С при первом нагреве соответствовало структурному переходу стеариновой кислоты в ядре ТЛН. Отсутствия максимума может быть связано с тем, что ТЛН резко

охлаждались на ледяной бане во время получения, и кристаллическая структура не сформировалась. Наиболее вероятно, что стеариновая кислота в ядре частицы находилась в состоянии переохлажденного расплава после получения ТЛН. Это явление типично для липидных эмульсий: медленное охлаждение способствует образованию стабильных кристаллических структур, в то время как высокие скорости охлаждения приводят к образованию менее стабильных кристаллических структур [47].

Последующее охлаждение происходило со скоростью 1 °С/мин, т.е. достаточно медленно, поэтому стеариновая кислота частично кристаллизовалась в ядре наночастиц. Соответственно, более четкий эндотермический пик при ~53 °С во время второго и третьего нагревания появлялся из-за плавления ядра стеариновой кислоты. Температура этого фазового перехода практически совпадает с температурой плавления переохлажденной объемной стеариновой кислоты, равной ~52 °С. Таким образом, пик при более низких температурах связан с плавлением или кристаллизацией оболочки ПАВ Tween 60 и Span 60, а пик при более высоких температурах связан с плавлением или затвердеванием стеариновой кислоты. Резкое увеличение теплоёмкости при 65 °С на третьей кривой нагрева от 5 до 95 °С можно объяснить инверсией фаз в суспензии ТЛН.

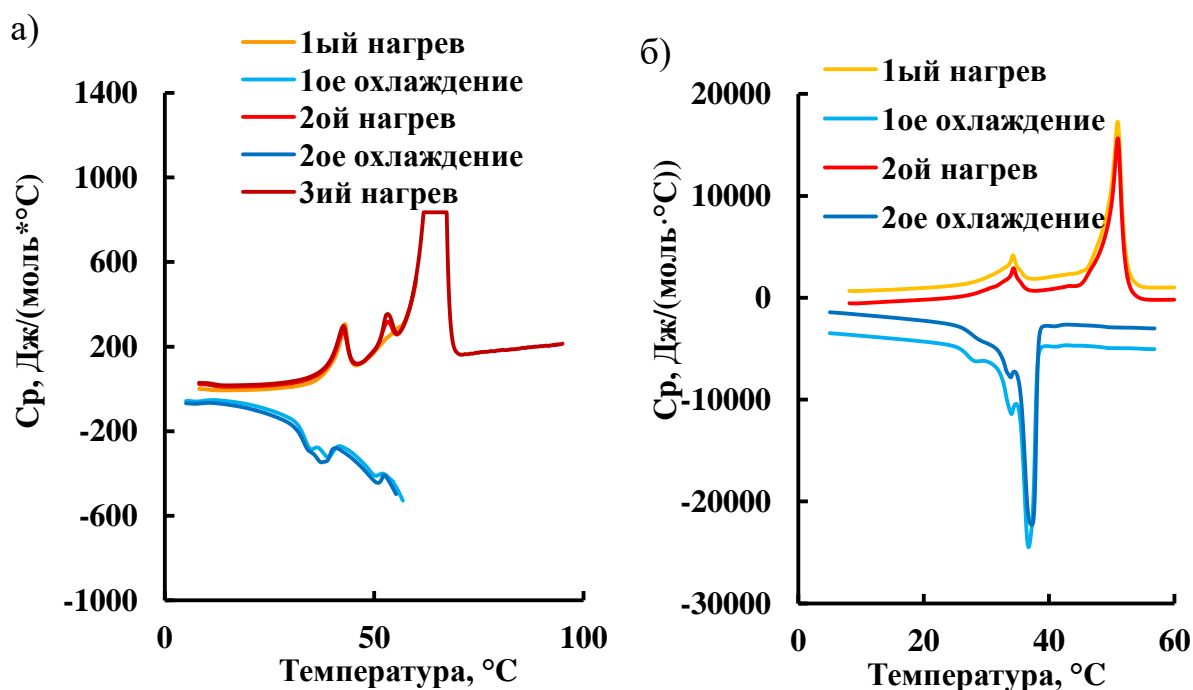


Рисунок 3.29 – Термограммы, полученные при двух циклах нагревание-охлаждение ТЛЧ из стеариновой кислоты (а) и парафина (б) с концентрацией ПАВ Tween 60 и Span 60 15 об.% в диапазоне температур 5-60 °С. Третий цикл нагрева для ТЛН из стеариновой кислоты проводился в диапазоне 5-95 °С. Скорость нагрева и охлаждения 1 °С/мин.

На рисунке 3.29б представлены термограммы для ТЛН из парафина с концентрацией ПАВ Tween 60 и Span 60 15 об.%. На кривых нагрева присутствовало два четких эндотермических пика при ~35 и 50 °С. Кривые охлаждения характеризовались одним явно выраженным пиком при ~38 °С. При этом присутствовал небольшой пик при ~34 °С. Пики при ~35 °С на кривых нагрева соответствовали плавлению низкотемпературной фракции парафина и оболочки, образованной Tween 60 и Span 60. Второй максимум соответствовал плавлению фракции парафина с более высокой температурой плавления. Эти температуры были ниже температур плавления и затвердевания переохлажденного объемного образца, т.к. парафин находился в наноразмерном состоянии.

Стоит отметить, что кривые нагрева и охлаждения, соответствующие первому и второму циклам нагрева и охлаждения, практически совпадают. Это свидетельствует о высокой устойчивости наночастиц парафина, стабилизированных Tween 60 и Span 60, даже при температурах, превышающих температуру плавления ядра и оболочки.

В таблице 3.9 показаны энтальпии плавления и кристаллизации ТЛН. Энтальпия плавления стеариновой кислоты в диспергированном состоянии была намного ниже, чем в переохлажденном объемном и объемном состоянии. Такие низкие значения указывают на то, что структура стеариновой кислоты в ядре ТЛН была плохо упорядоченной и, наиболее вероятно, находилась в состоянии переохлажденного расплава. Кроме того, такие низкие значения энтальпии можно объяснить нанометровым размером частиц. Энтальпия плавления парафина в переохлажденном объемном и

объемном состоянии оставалась практически постоянной, однако в диспергированном состоянии также была значительно ниже, что также свидетельствует о неупорядоченной кристаллической структуре парафина в ядре липидных наночастиц

Таблица 3.9 – Энтальпии (Дж/г) фазовых переходов в НЭ и ТЛН и их компонентах

Состояние Вещество	Объёмное состояние	Переохлаждённое объёмное состояние	Липидные наночастицы
Стеариновая кислота	217,8±4,3	83,4±1,7	21,3±0,4
Парафин	191,4±3,8	191,1±3,8	27,4±0,5

Основываясь на термическом поведении липидных наночастиц сделано предположение, что после получения ТЛН на стеариновой кислоте состоят из липидного ядра, образованного переохлажденным расплавом стеариновой кислоты, и покрыты твердообразным адсорбционным слоем ПАВ с небольшими включениями стеариновой кислоты (рисунок 3.30).

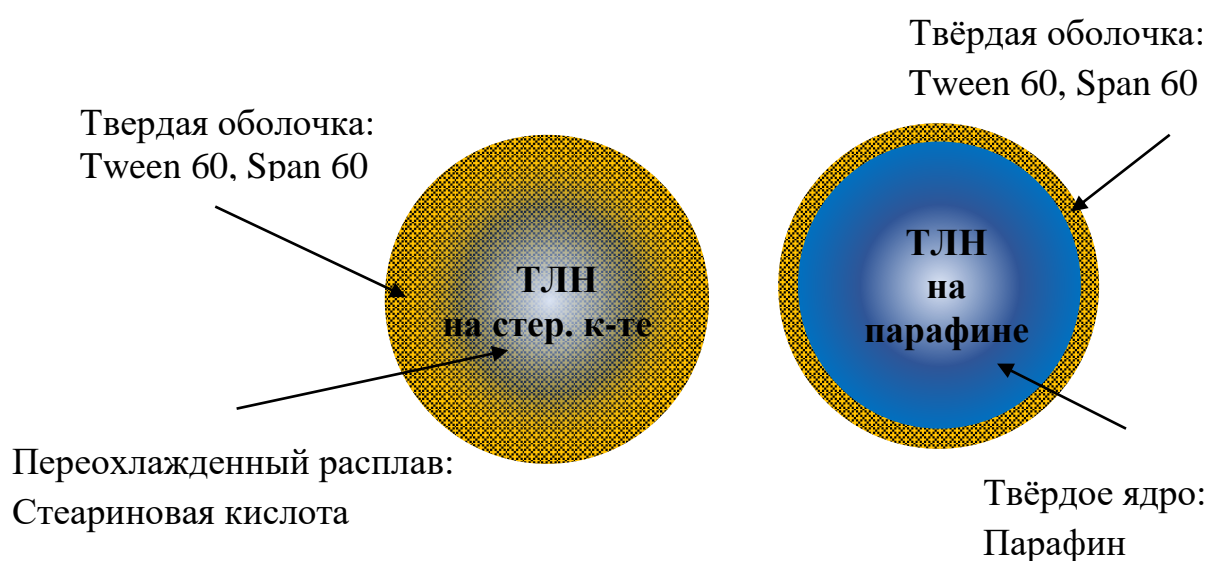


Рисунок 3.30 - Схематическое изображение ТЛН из стеариновой кислоты или парафина

ТЛН из парафина состоят из твёрдообразного парафинового ядра и твёрдообразной оболочки смеси ПАВ Tween 60 и Span 60 (рисунок 3.30б).

3.3.3. Температурные характеристики наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц с инкапсулированными лекарственными соединениями

Для определения распределения ЛС в НЭ и ТЛН были определены температуры плавления смесей липид/ЛС и ПАВ/ЛС в массовом соотношении 1,6/1 и 1/1 (в мольном соотношении 10,7/1 и 2/1 для тимохинона или 36/1 и 6,7/1 для доксорубина соответственно) (таблица 3.10).

На термограммах плавления смеси стеариновой кислоты и тимохинона присутствовало два пика: первый при 43,8 °С, второй при 60,3 °С. Исходя из температур плавления отдельно взятых компонентов, можно предположить, что пик с более высокой температурой относился к плавлению стеариновой кислоты с растворенным в ней тимохином, при этом в смеси присутствовала фракция нерастворённого ЛС с температурой плавления 43,8 °С. При плавлении смеси парафинового масла и тимохинона на термограмме наблюдался один пик при 39,4 °С. Уменьшение температуры плавления по сравнению с индивидуальным тимохином может быть связано либо с тем, что парафиновое масло частично растворялось в тимохиноне, снижая его температуру плавления.

На термограммах плавления смеси ПАВ и тимохинона присутствовало три пика: первые два - при температурах, немного выше, чем соответствующие пики в смеси Tween 60 и Span 60 без тимохинона, и третий пик при 47,8 °С, приблизительно соответствующий как третьему пику в смеси ПАВ без тимохинона, так температуре плавления индивидуального тимохинона. Наиболее вероятно, что тимохинон растворялся в смеси Tween 60 и Span 60. Оставался ли нерастворенный тимохинон на основании этих данных однозначно утверждать нельзя.

Таблица 3.10 - Температуры плавления компонентов НЭ и ТЛН с
ТИМОХИНОНОМ

Вещества в переохлажденном состоянии	Температура плавления, °С
Стеариновая кислота	70,9 ± 1,0
Тимохинон	46,1 ± 0,7
Стеариновая кислота + Тимохинон	43,8 ± 0,7
	60,3 ± 0,9
Парафиновое масло + Тимохинон	39,4 ± 0,5
Tween 60 + Span 60	29,5 ± 0,5
	44,4 ± 0,7
Tween 60 + Span 60 + Тимохинон	30,1 ± 0,5
	41,5 ± 0,7
	47,8 ± 0,7

В работе также были определены температуры фазовых переходов в ТЛН и НЭ, нагруженных ЛС тимохиноном или доксорубицином с помощью микрокалориметрического анализа (таблице 3.11). На термограммах нагрева НЭ с дисперсной фазой из парафинового масла с инкапсулированным тимохиноном присутствовал один эндотермический пик при 41,6 °С. На кривых охлаждения пик смещался до 37,5 °С. При этом положение пиков смещалось в область более высоких температур, чем положение пиков на термограммах плавления и охлаждения НЭ без ЛС. Вероятно, это связано с тем, что тимохинон, имеющий более высокую температуру плавления, растворялся как в липидном ядре НЭ, так и частично в адсорбционном слое ПАВ.

Таблица 3.11 - Температуры фазовых переходов в НЭ и ТЛН с инкапсулированными ЛС

Тип сканирования	Температура фазового перехода, °С	
НЭ		
Нагревание	$37,4 \pm 0,2$	
Охлаждение	$33,5 \pm 0,1$	
НЭ + тимохинон		
Нагревание	$41,6 \pm 0,2$	
Охлаждение	$37,5 \pm 0,2$	
ТЛН		
	1-й пик	2-й пик
Нагревание	$42,7 \pm 0,2$	-
Охлаждение	$39,0 \pm 0,2$	$50,5 \pm 0,3$
ТЛН + тимохинон		
	1-й пик	2-й пик
Нагревание	$32,1 \pm 0,1$	$42,2 \pm 0,2$
Охлаждение	$26,8 \pm 0,1$	$39,0 \pm 0,2$
ТЛН + доксорубицин		
	1-й пик	2-й пик
Нагревание	$41,4 \pm 0,2$	-
Охлаждение	$33,2 \pm 0,1$ и $36,6 \pm 0,2$	$48,3 \pm 0,2$

На термограмме плавления ТЛН из стеариновой кислоты с инкапсулированным тимохиноном при нагревании присутствовали два пика: более расплывчатый при $32,1$ °С и явно выраженный при $42,2$ °С. Вероятнее всего, пик при более низкой температуре соответствовал плавлению слоя ПАВ с частично растворённым в нём тимохиноном. Второй пик, по-видимому, относится к плавлению переохлаждённого ядра из стеариновой

кислоты с растворённым в нём тимохиноном. При охлаждении пики сдвигаются до 26,8 и 39,0 °С.

При нагревании ТЛН с доксорубицином на термограммах присутствовал один пик при 41,4 °С, который, вероятно, принадлежит плавлению слоя ПАВ. Кривая охлаждения характеризуется 2 пиками: раздвоенному при 33,2 и 36,6 °С, а также при 48,3 °С.

Пик с более высокой температурой плавления соответствовал фазовому переходу стеариновой кислоты. Т.к. этот переход происходил при более низкой температуре, чем в ТЛН без ЛС, можно сделать предположение о некотором встраивании доксорубицина в ядро. Изменение температур плавления слоя ПАВ на термограммах охлаждения ТЛН с доксорубицином, по-видимому, также связано с встраиванием доксорубицина в адсорбционный слой ПАВ.

3.3.4 Определение возможности встраивания лекарственных соединений в адсорбционный слой поверхностно-активных веществ

Для определения возможности встраивания тимохинона и доксорубицина в адсорбционный слой ПАВ было проведено изучение их поверхностно-активных свойств. Проведено исследование влияния концентрации ЛС тимохинона и доксорубицина на межфазное натяжение в системе вода / парафиновое масло с помощью метода висящей капли (рисунок 3.31). Доксорубицин растворяли в водной фазе, а тимохинон в масляной. Каплю водной фазы выдерживали в масляной фазе в течение 20 мин для установления равновесия.

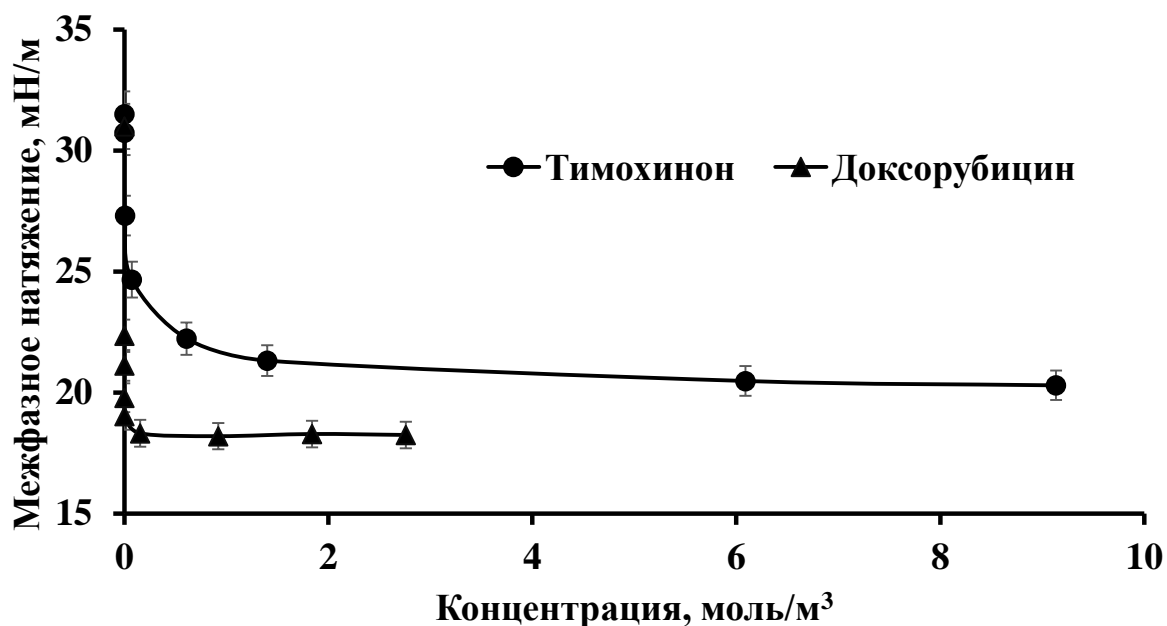


Рисунок 3.31 – Влияние концентрации ЛС на межфазное натяжение в системе вода / парафиновое масло. Температура 25 °С

Межфазное натяжение на границе раздела вода / парафиновое масло составляло 31 ± 1 мН/м. При увеличении концентрации тимохинона в диапазоне 0-0,0014 моль/л межфазное натяжение снижалось до 21 ± 1 мН/м. При увеличении концентрации доксорубицина от 0 до 0,00015 моль/л межфазное натяжение на границе раздела вода / парафиновое масло снижалось до 18 ± 1 мН/м и не изменялось при дальнейшем увеличении концентрации ЛС. Т.к. в присутствии тимохинона и доксорубицин наблюдалось снижение межфазного натяжения на границе раздела вода / парафиновое масло, можно сделать вывод, что данные ЛС обладают поверхностной активностью и могут встраиваться в адсорбционный слой ПАВ во время получения липидных наночастиц. При этом тимохинон в большей степени, а доксорубицин в меньшей степени растворяются в липидном ядре.

3.4. Потенциальные области применения липидных наночастиц

3.4.1. Изучение проникновения липидных частиц в раковые клетки *in vitro* и определение зон их локализации

Применение липофильных ЛС ограничено из-за их низкой растворимости в воде. Решением данной проблемы является использование специальных носителей, которые способны растворять гидрофобные ЛС и адресно оставлять их к органам-мишеням. Применение липидных наночастиц в качестве адресных систем доставки решает также проблему токсического воздействия ЛС на здоровые органы и ткани, и позволяет снизить концентрацию ЛС за счёт эффективного проникновения наночастиц в клетки. Скорость проникновения носителей ЛС в клетки зависит размера и строения частиц [170], поэтому в данной работе были проведены исследования частиц разного размера с разным ядром: НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла, с размером капель 50 нм и липидных частиц из стеариновой кислоты с размером 200 нм, стабилизированные Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 и 15,0 об.% соответственно. Стоит отметить, что обе системы имели одинаковую структуру и состав поверхности (как было показано в Главе 3.3), но разный размер частиц.

Совместно с д.б.н., г.н.с. Марквичевой Е.А. и м.н.с. Гилёвой А.М. из Лаборатории биомедицинских материалов ИБХ РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова были исследованы эффективности накопления и локализации НЭ и ТЛН в раковых клетках *in vitro* с использованием конфокального микроскопа Nikon TE-2000 (Япония), снабженном конфокальной лазерной системой С1, лазерами Kr (408), Ar (488), G-NeHe (543). Проникновение и накопление исследовались на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), глиомы головного мозга крысы (С6) и рака толстой кишки человека (НСТ-116) через 15 мин и 1 ч после начала инкубирования.

Через 15 мин после начала инкубирования капли НЭ проникали в клетки С6, накапливались в цитоплазме и внутриклеточных органоидах, предположительно в эндосомах, лизосомах, за исключением ядра (рисунок 3.31). При этом липидные частицы за 15 мин лишь адсорбировались на поверхности клеточной мембраны или распределялись во внеклеточном матриксе.

Полученные данные также согласуются с вертикальными z-срезами, на которых видно, что через 15 мин после начала эксперимента НЭ накапливались внутри клеток, а липидных частиц внутри клеток не было (рисунок 3.28).

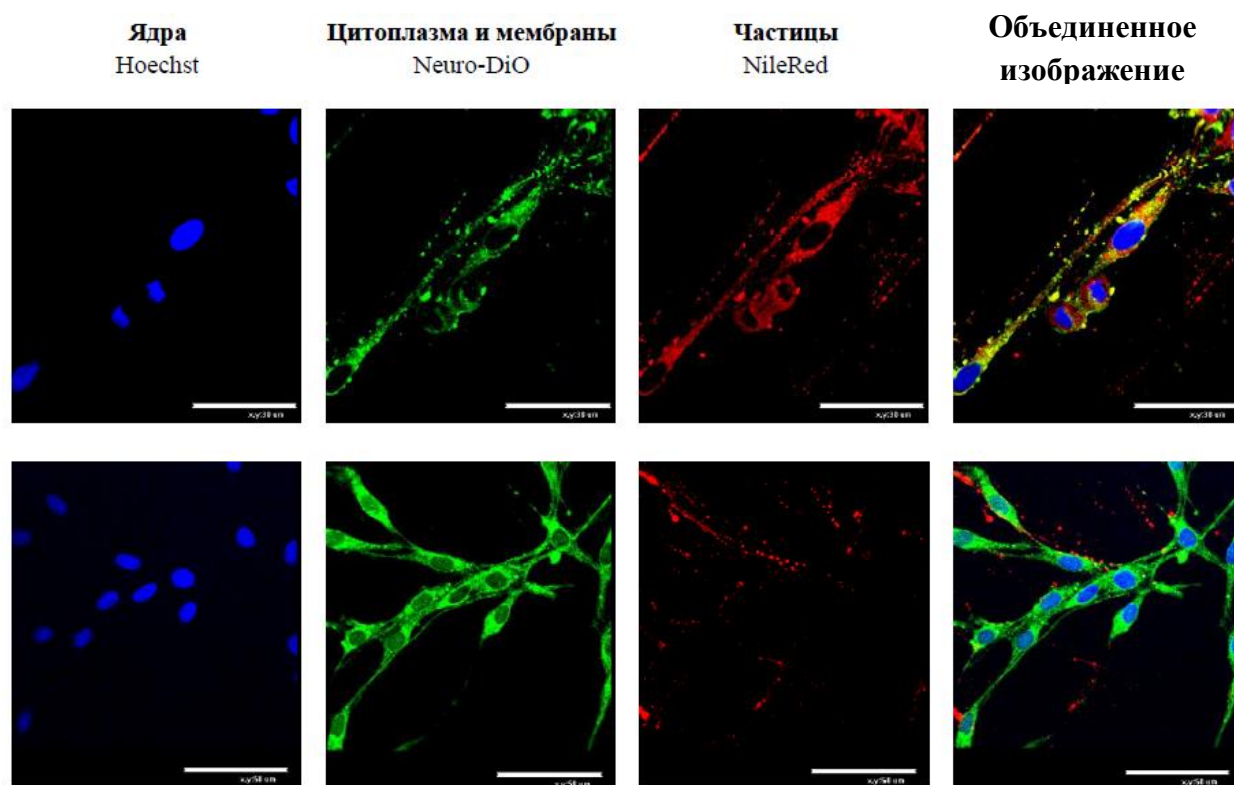


Рисунок 3.31 - Клетки С6 после 15 мин инкубирования с НЭ (верхний ряд) и липидными частицами (нижний ряд). Липидные частицы были окрашены в красный цвет NileRed, цитоплазма и внутриклеточные мембраны окрашены в зеленый цвет Neuro-DiO, ядра - в синий цвет Hoechst 33258

Через 1 ч инкубирования липидные частицы из стеариновой кислоты проникали в раковые клетки, распределяясь во внутриклеточном матриксе, исключая ядро. К этому моменту НЭ распределялись внутри клеток, в том числе и в ядре (рисунок 3.32). Различие в скорости проникновения можно объяснить различием размеров капель НЭ и липидных частиц. Т.к. размер капель НЭ был меньше, чем размер липидных частиц, то скорость их проникновения в клетки была выше.

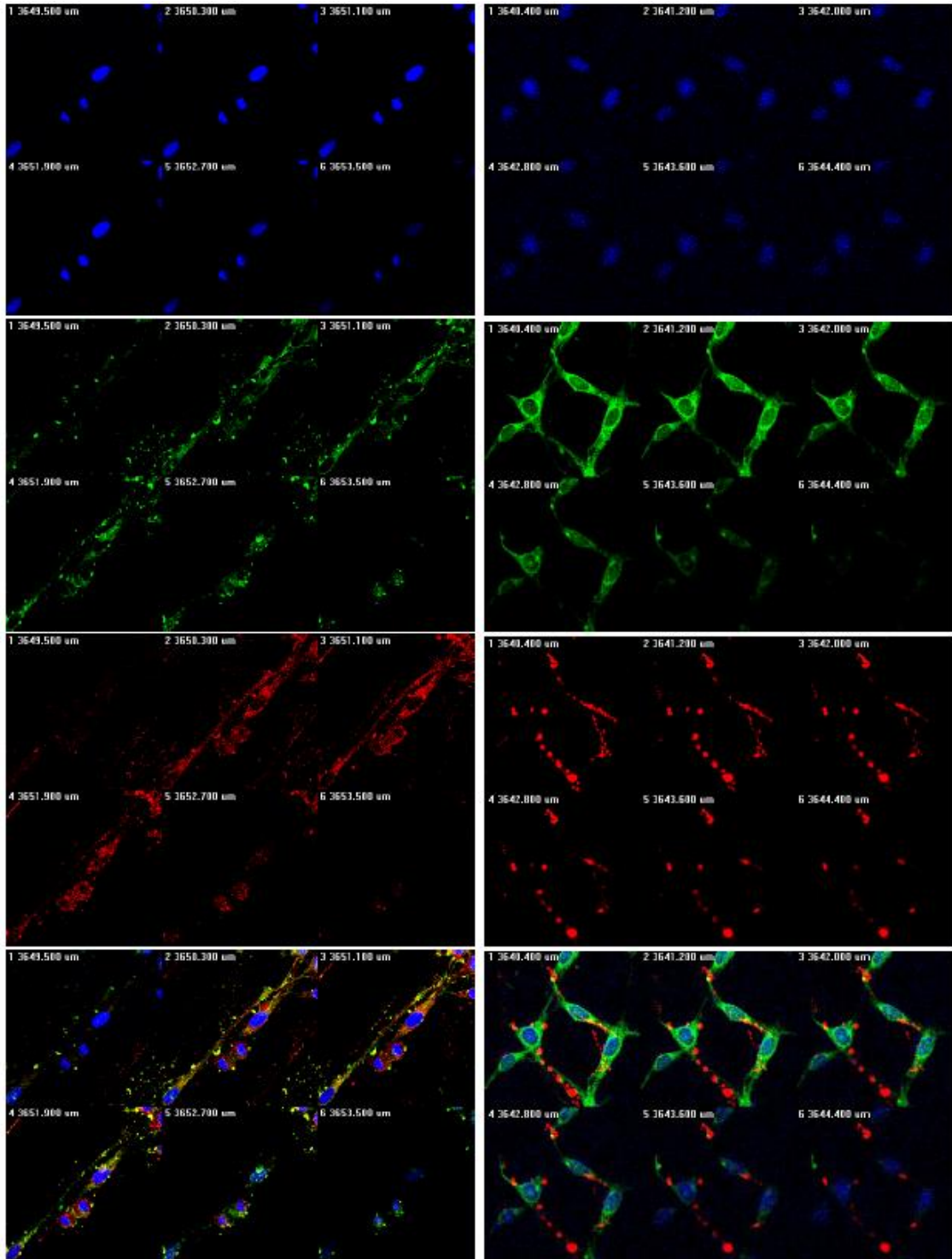
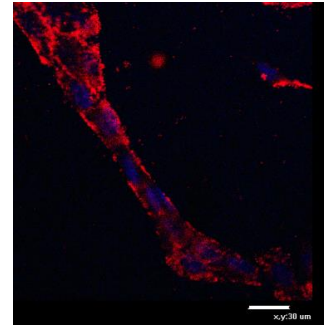
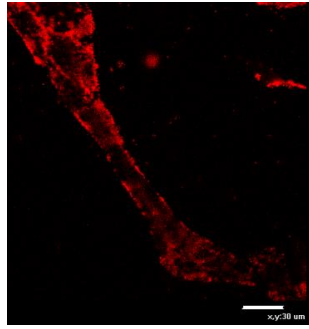
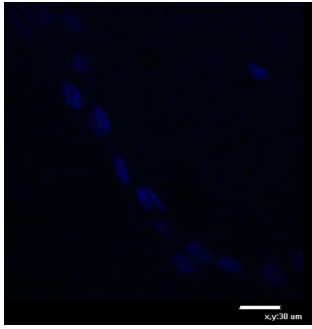
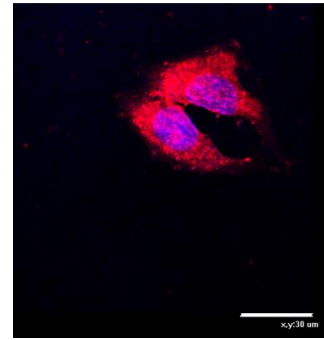
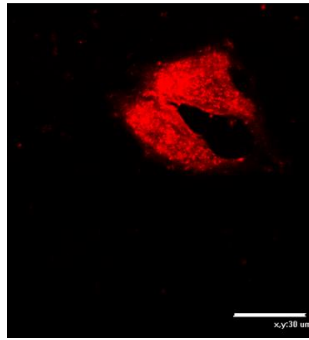
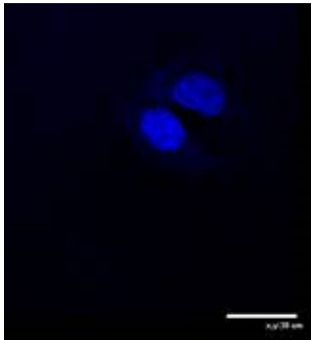


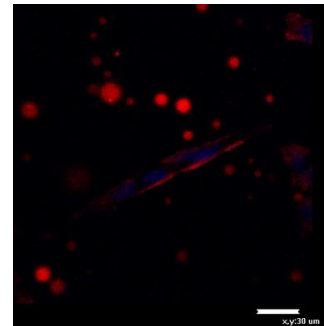
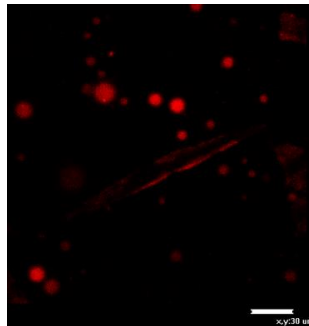
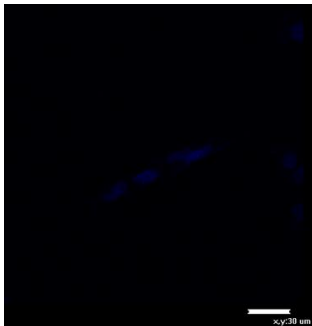
Рисунок 3.32 - Клетки С6 после 15 мин инкубирования с НЭ (левый столбец) и ТЛЧ (правый столбец). Липидные частицы были окрашены в красный цвет NileRed, цитоплазма и внутриклеточные мембраны окрашены в зеленый цвет Neuro-DiO, ядра - в синий цвет Hoechst 33258

Ядра (Hoechst 33258)**Частицы (NileRed)****Merged**

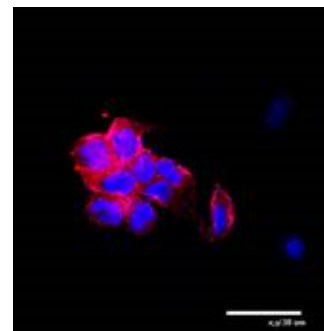
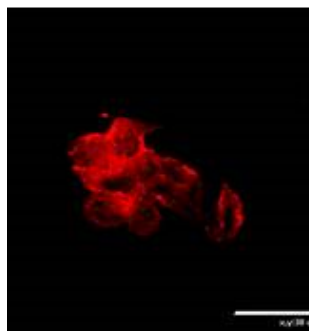
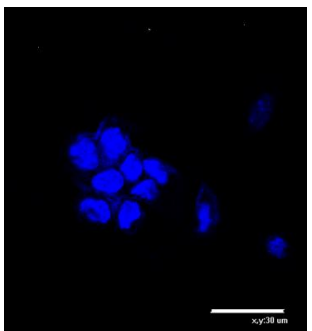
НЭ - 15 мин



НЭ - 1 ч



ТЛЧ - 15 мин



ТЛЧ - 1 ч

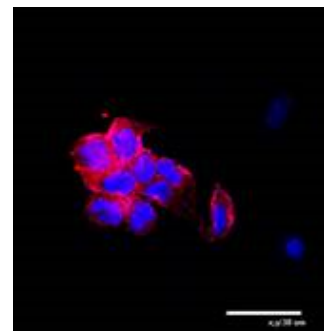
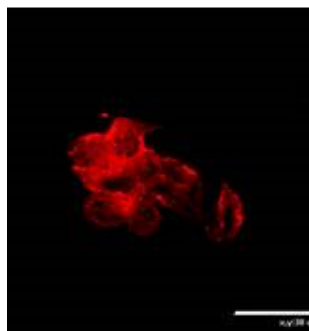
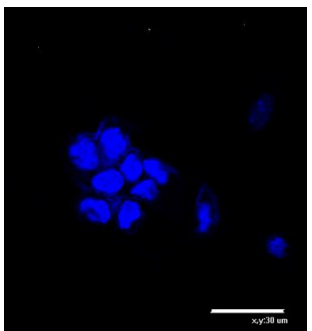


Рисунок 3.33 - Клетки MCF-7 после 15 мин и 1 ч инкубирования с НЭ и ТЛЧ. НЭ и ТЛН окрашены NileRed, цитоплазма и внутриклеточные мембраны - Neuro-DiO, ядра - Hoechst 33258

Накопление липидных наночастиц в ядрах клеток является достоинством при использовании противораковых ЛС, т.к. для лечения может быть необходимо останавливать процесс репликации ДНК, что будет приводить к апоптозу клеток [171] [172].

В случае инкубирования липидных частиц с клетками MCF-7 через 1 ч после начала инкубирования капли дисперсной фазы НЭ проникали в клетки и распределялись внутри клеточного матрикса. Липидные частицы находились в органеллах, но отсутствовали в ядрах клеток (рисунок 3.33).

Таким образом можно сделать вывод, что скорость проникновения липидных наночастиц в раковые клетки в значительной степени зависит от размеров частиц: НЭ с размером капель дисперсной фазы 50 нм проникали в клетки уже через 15 мин после инкубирования и через 1 ч концентрировались в ядре и клеточном матриксе. Липидные частицы размером 200 нм проникали внутрь клетки только через 1 ч, и распределяясь в цитоплазме. Т.к. скорость проникновения липидных наночастиц с размером 50 нм была значительно выше, чем частиц с размером 200 нм, дальнейшие исследования проводили с НЭ и ТЛН с размером до 100 нм.

3.4.2. Исследование цитотоксичности пустых и нагруженных лекарственным соединением наноземulsion и твердых липидных наночастиц и *in vitro*

Оценку цитотоксичности НЭ и ТЛН проводили с использованием МТТ-теста. Исследовались НЭ с парафиновым маслом с диаметром капель дисперсной фазы 50 нм и ТЛН из стеариновой кислоты с диаметром 30 нм, стабилизированные Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией 12,5 и 15,0 об.% соответственно. В каждой лунке 96-луночного планшета помещали ± 7500 клеток, затем планшет помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 ч среду в лунках заменяли средой, смешанной с дисперсией частиц с разной степенью разбавления (в 40, 50, 80, 100, 160, 320, 640 раз). В присутствии НЭ или ТЛН клетки инкубировали в течение 24 и 48 ч.

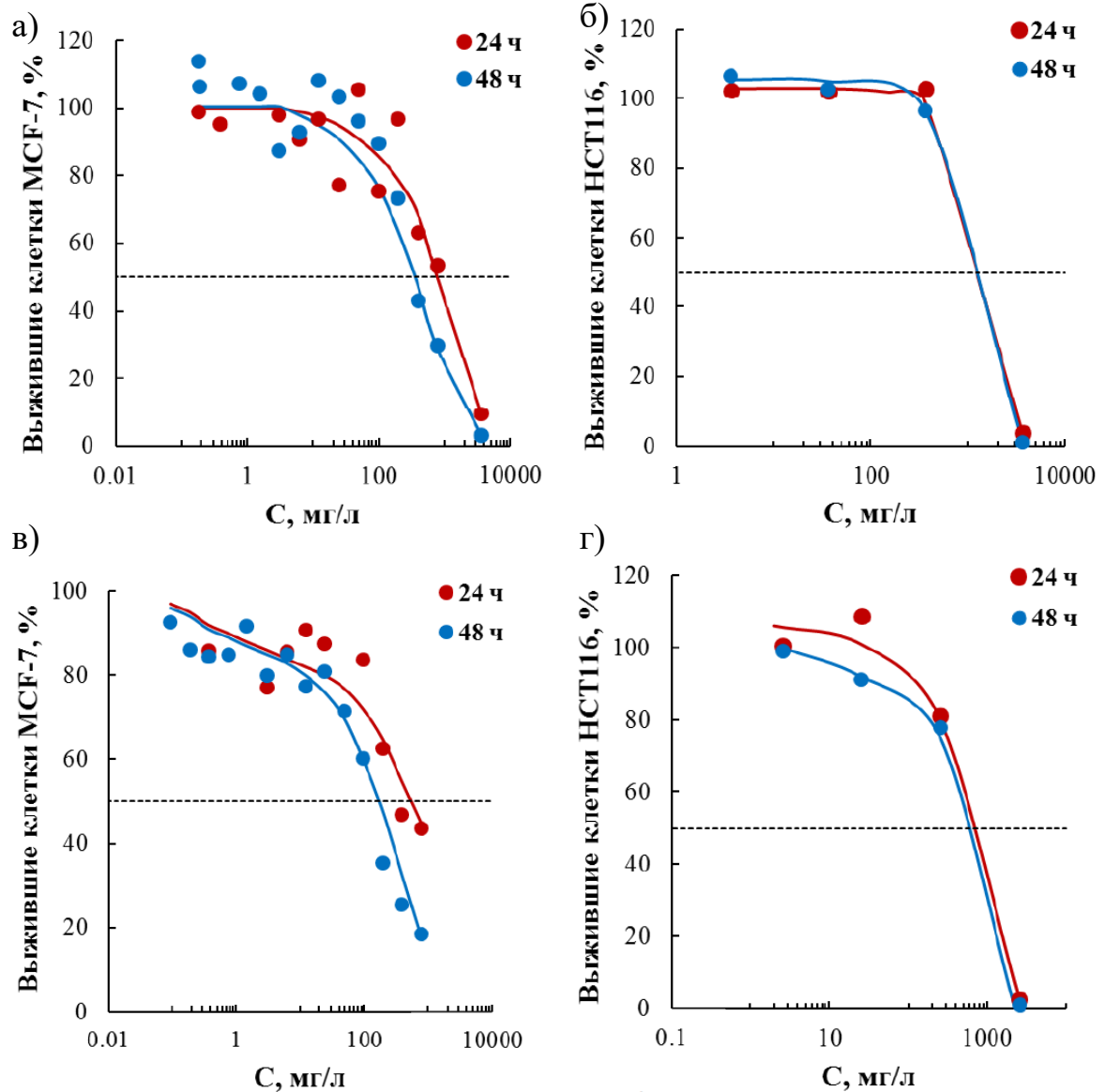


Рисунок 3.34 - Зависимости доли выживших клеток MCF-7 (а и в) и НТС-116 (б и г) от концентрации НЭ (а и б), ТЛН (в и г)

На рисунке 3.34 представлены дозозависимые кривые НЭ и ТЛН в отношении клеток MCF-7 и НТС-116. По зависимостям доли выживших клеток были определены IC_{50} - концентрации липидных наночастиц, при которой выживает 50% раковых клеток (таблице 3.12).

Таблица 3.12 - IC₅₀ при инкубировании НЭ и ТЛН с раковыми клетками

Тип наночастиц	Время инкубирования, ч	Тип раковых клеток	IC ₅₀ , мг/л
НЭ	24	МCF-7	760
		HTC-116	~1200
	48	МCF-7	380
		HTC-116	~1200
ТЛН	24	МCF-7	525
		HTC-116	655
	48	МCF-7	157
		HTC-116	590

Токсичность частиц зависела от их размера: ТЛН с размером 30 нм проявляли немного большую токсичность, чем НЭ с размером капель 50 нм. Ненагруженные НЭ и ТЛН проявляли низкую цитотоксичность, поэтому данные частицы могут быть использованы как носители ЛС в диапазоне их концентраций ниже IC₅₀.

Оценку цитотоксичности загруженных доксорубицин и тимохинон НЭ и ТЛН проводили с использованием МТТ-теста. По литературным данным октанольное число доксорубицина составляет от 0,04 до 1,85 [173, 174] [175] [176], т.е. вероятнее всего данное соединение является амфифильным и распределяется между органической и водной фазой в дисперсиях липидных НЧ.

Для сравнения цитотоксичности раствора доксорубицина с его цитотоксичностью при инкапсулировании в липидные носители, были получены дозозависимые кривые для доксорубицина, растворённого в 0,15 М водном растворе NaCl и для НЭ и ТЛН с инкапсулированным доксорубицином. Оценку цитотоксичности проводили на клеточных линиях МCF-7 и HTC-116.

IC_{50} для клеточных линий MCF-7 и HTC-116 при инкубировании с раствором доксорубицина в течение 24 ч составила $1,30 \pm 0,06$ и $0,60 \pm 0,03$ мг/л соответственно. При инкубировании 48 ч IC_{50} доксорубицина уменьшался до $0,17 \pm 0,01$ мг/л для клеточных линий MCF-7 и до $0,14 \pm 0,01$ мг/л для HTC-116 соответственно (таблица 3.13).

Таблица 3.13 - IC_{50} при инкубировании клеток с доксорубицином

Тип ЛС	Время инкубирования, ч	Тип раковых клеток	IC_{50} , мг/л
Доксорубицин	24	MCF-7	$1,30 \pm 0,06$
		HTC-116	$0,60 \pm 0,03$
	48	MCF-7	$0,17 \pm 0,01$
		HTC-116	$0,14 \pm 0,01$

Т.к. для МТТ-теста необходимо использовать водные растворы, а тимохинон является липофильным ЛС, то получение данных об IC_{50} для индивидуального тимохинона невозможно. При этом в литературе имеются данные об IC_{50} тимохинона для клеточной линии MCF-7, которая составляла $16,43$ мг/л при инкубировании в течение 24 ч и $6,77$ мг/л для 48 ч [112] [177]. Однако достоверность этих величин вызывает сомнения, т.к. данные концентрации существенно превышают растворимость тимохинона в воде [178].

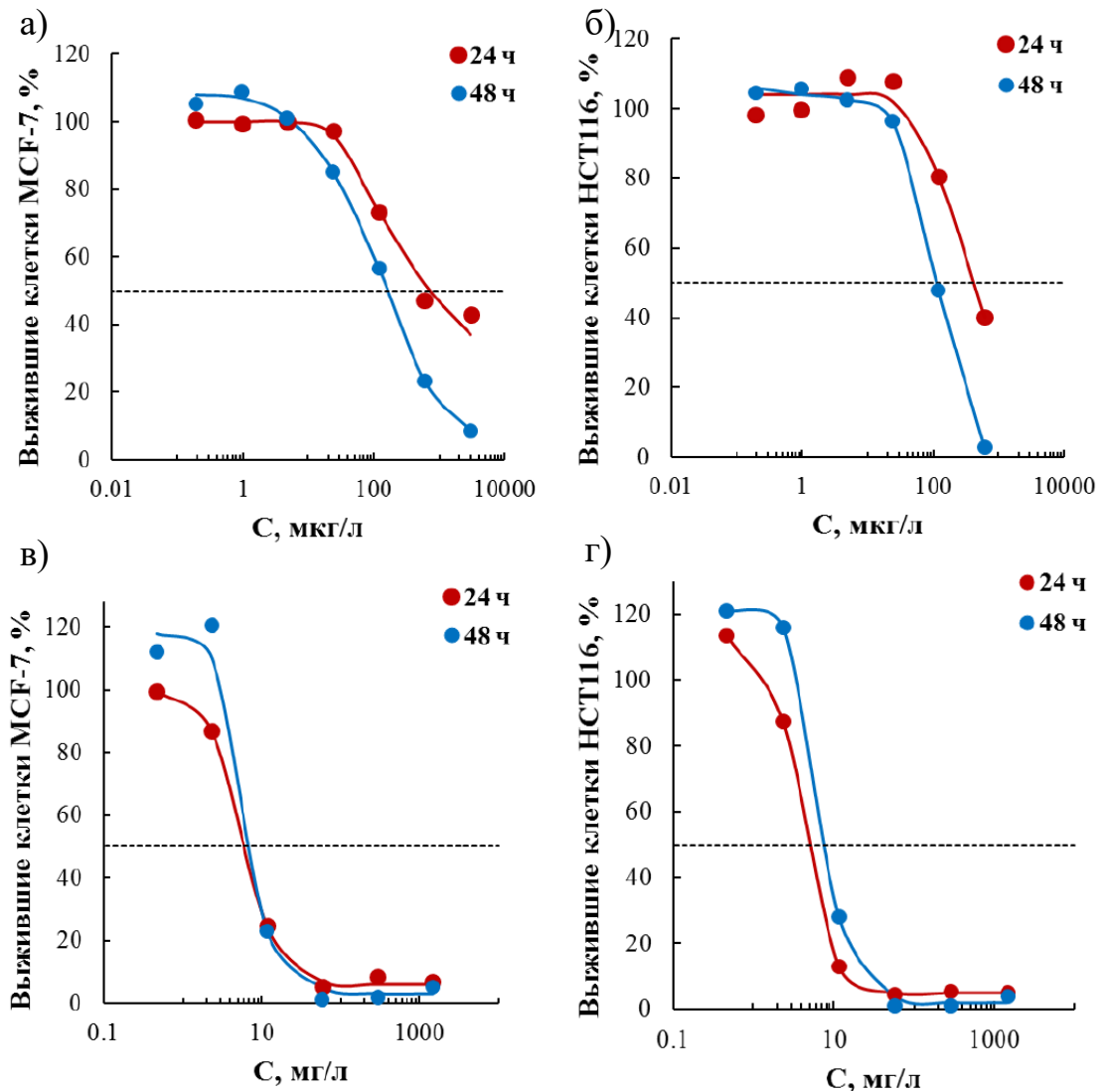


Рисунок 3.35 - Зависимости доли выживших клеток MCF-7 (а, в) и HCT116 (б, г) от концентрации НЭ, нагруженных доксорубицином (а и б) или тимохиноном (в и г)

Оценку цитотоксичности НЭ и ТЛН, нагруженных ЛС, проводили на монослойных культурах клеток MCF-7 и HCT116 (рисунки 3.35 и 3.36). В присутствии НЭ и ТЛН, нагруженных доксорубицином или тимохиноном, или НЭ и ТЛН без ЛС клетки инкубировали в течение 24 или 48 ч.

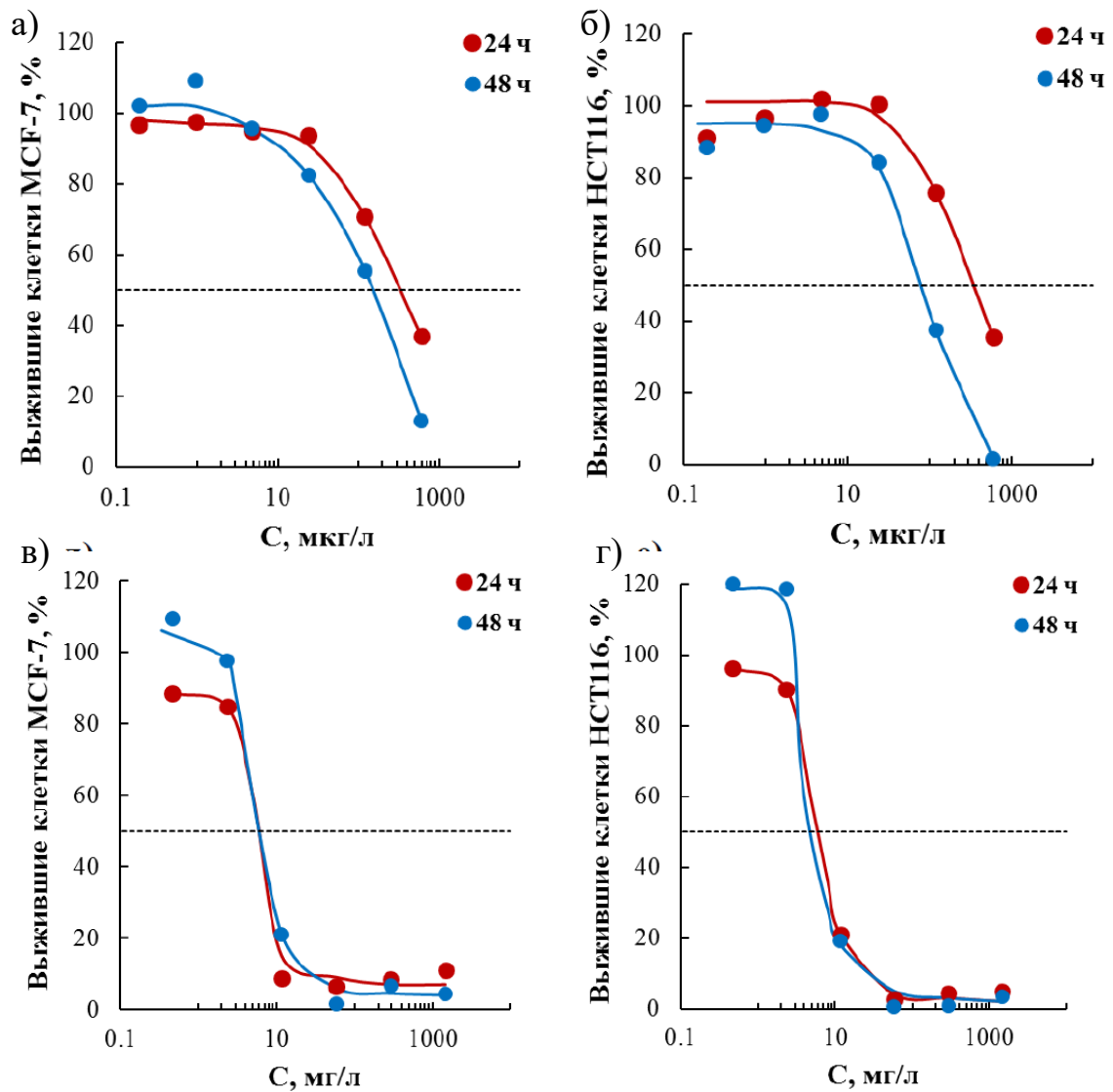


Рисунок 3.36 - Зависимости доли выживших клеток MCF-7 (а, в) и HCT116 (б, г) от концентрации ТЛН, нагруженных доксорубицином (а и б) или тимохиноном (в и г)

Цитотоксичность липидных наночастиц, нагруженных доксорубицином, резко возростала, причём для гибели раковых клеток требовались более низкие концентрации доксорубицина по сравнению с доксорубицином, растворенным в водной среде (таблица 3.14). В связи с тем, что октанольное число доксорубицина невелико, т.е. он растворяется и в водной, и в липидной фазе, полученные результаты косвенно подтверждают, что доксорубицин находится в том числе в липидных наночастицах.

Таблица 3.14 - IC₅₀ при инкубировании НЭ и ТЛН, нагруженных доксорубицином или тимохиноном, с раковыми клетками

Тип наночастиц	Время инкубирования, ч	Тип раковых клеток	IC ₅₀ , мг/л
НЭ + Доксорубицин	24	МСF-7	0,52±0,03
		НТС-116	0,39±0,02
	48	МСF-7	0,16±0,01
		НТС-116	0,10±0,01
НЭ + Тимохинон	24	МСF-7	7,00±0,50
		НТС-116	7,00±0,50
	48	МСF-7	6,00±0,50
		НТС-116	5,00±0,40
ТЛН + Доксорубицин	24	МСF-7	0,35±0,02
		НТС-116	0,34±0,02
	48	МСF-7	0,14±0,01
		НТС-116	0,08±0,01
ТЛН + Тимохинон	24	МСF-7	5,00±0,40
		НТС-116	5,00±0,50
	48	МСF-7	6,00±0,50
		НТС-116	5,00±0,40

Как уже было отмечено, тимохинон является маслорастворимыми соединением и может быть доставлен к клеткам только с помощью липидных носителей. Цитотоксичность НЭ и ТЛН, нагруженных тимохиноном по сравнению с ненагруженными носителями значительно увеличивалась. Стоит отметить, что цитотоксичность носителей с нагруженным тимохиноном была ниже, чем с доксорубицином, что подтверждает с литературными данными о разной цитотоксичности этих ЛС.

3.4.3. Исследование цитотоксичности нагруженных тимохиноном твёрдых липидных наночастиц и наноэмульсий *in vitro* на опухолевых сфероиды

Результаты, полученные на 2D монослойных клеточных культурах *in vitro* не всегда адекватно отражают процессы, происходящие *in vivo*. 3D модели, называемые опухолевыми клеточными сфероиды или тумороидами, наиболее приближены по структуре и свойствам к естественной опухолевой системе [179]. Опухолевые сфероиды представляют собой многоклеточные округлые микроагрегаты опухолевых клеток спонтанно формирующихся в суспензиях клеток. Изучение цитотоксического действия НЭ и ТЛН, нагруженных тимохиноном, проводилось на опухолевых клеточных сфероиды состоящих из культуры клеток С6. В таблице 3.15 представлены IC₅₀ для ненагруженных и нагруженных тимохиноном НЭ и ТЛН в отношении опухолевых сфероидов из клеток С6.

Таблица 3.15 – Цитотоксичность НЭ и ТЛН, нагруженных тимохиноном, при воздействии на опухолевые сфероиды из клеток С6

	IC ₅₀ , мкМ	
	24 ч	48 ч
НЭ	>200	>200
НЭ + тимохинон	>200	114±6
ТЛН	>200	>200
ТЛН + тимохинон	>200	90±5

При воздействии НЭ и ТЛН на опухолевые сфероиды, в отличие от монослойных клеточных культур, требовались более высокие концентрации тимохинона, т.к. их накопление внутри плотного клеточного агрегата было более медленным. Ненагруженные носители практически не проявляли цитотоксичность. В целом, поведение липидных носителей в случае опухолевых сфероидов было таким же, как и в случае монослойных культур клеток. Для достижения цитотоксического эффекта требовалось 48 ч

инкубирования с клеточными сфероидными. При этом ТЛН, нагруженные тимохиноном, проявляли более высокую цитотоксичность по сравнению с НЭ, нагруженными аналогичными ЛС, так как размер капель дисперсной фазы был больше размеров наночастиц дисперсии.

Таким образом можно сделать вывод, что НЭ и ТЛН могут быть использованы в качестве носителей липофильных ЛС. Стоит отметить, что при инкапсулировании доксорубина и тимохинона в НЭ и ТЛН требуются более низкие концентрации ЛС для достижения требуемого эффекта, что способствует уменьшению побочных эффектов от их действия.

3.4.4. Исследование свойств и противовоспалительной активности наноземульсий, содержащих индометацин и модифицированных катионными поверхностно-активными веществами

С точки зрения биосовместимости и нетоксичности НЭ и ТЛН, предназначенные для применения в медицине и фармацевтике, обычно стабилизируются неионогенными ПАВ [180], однако эти соединения часто уступают по эффективности стабилизации более токсичным ионогенным ПАВ [181] [182]. При этом создание положительного заряда на поверхности частиц может способствовать их взаимодействию с отрицательно заряженными областями мембран клеток и способствовать более быстрому проникновению. Показано, что модификация поверхности катионными ПАВ обеспечивает высокую эффективность при наружном применении противовоспалительных офтальмологических и трансдермальных препаратов [183] [184].

Исследованные в данной работе НЭ были стабилизированы неионогенными ПАВ, поэтому они характеризовались низким поверхностным зарядом. ζ -потенциал капель НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты не превышал 6 мВ по абсолютной величине (Таблица 3.2). Для увеличения устойчивости НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80, были исследованы НЭ, стабилизированные

дополнительно катионными ПАВ цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) или *n*-[2-((бутилкарбамоил)окси)этил]-*n,n*-диметилгексадекан бромид аммония (УР-16), который был предоставлен лабораторией высокоорганизованных сред Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, г. Казань.

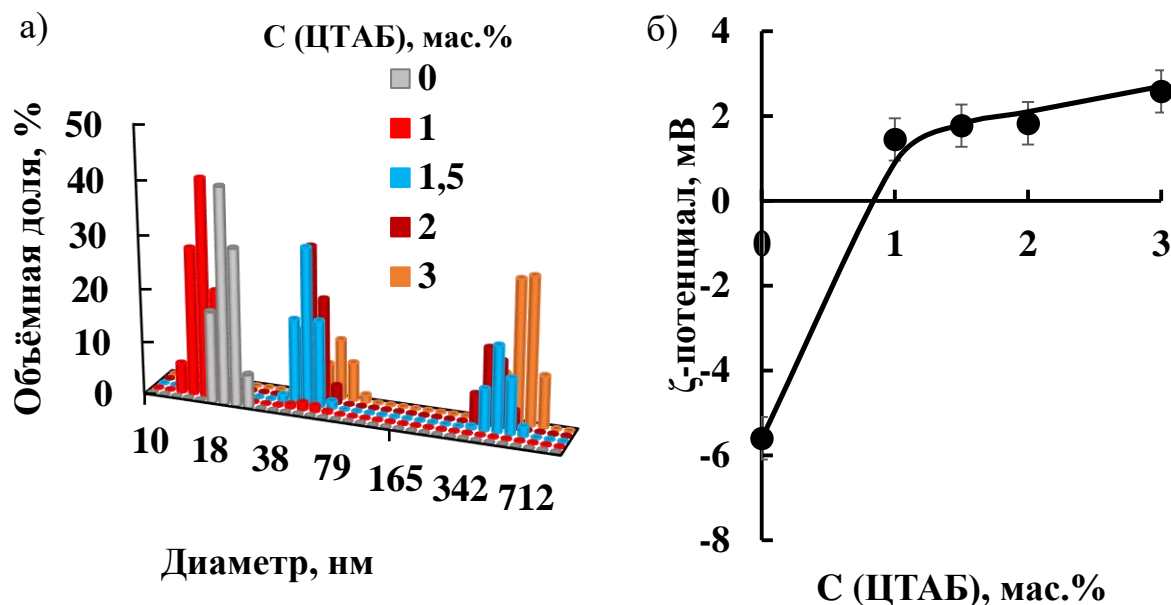


Рисунок 3.37 – Распределения капель дисперсной фазы НЭ по размерам (а) и зависимость ζ -потенциала капель в НЭ от концентрации ЦТАБ (б).

Дисперсная фаза - олеиновая кислота. НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с концентрацией 12,5 об.%. Температура - 25 °

На рисунке 3.37 представлены распределения по размерам капель в НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты, стабилизированные смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 и зависимость ζ -потенциала капель от концентрации ЦТАБ. При добавлении 1 мас.% ЦТАБ происходила перезарядка поверхности. ζ -потенциал капель НЭ становился положительным и равным ~1,4 мВ. При этом средний диаметр капель изменялся в пределах погрешности измерений и составлял 15 ± 2 нм. Дальнейшее увеличение концентрации ЦТАБ приводило к небольшому увеличению заряда до 2,5 мВ

и росту размера капель до 50 ± 3 нм. Так же на гистограммах появляется второй пик, соответствующий агрегатам.

В НЭ с олеиновой кислотой с добавлением 1 мас.% ЦТАБ наблюдалось мономодальное распределение капель дисперсной фазы по размерам и положительный заряд капель.

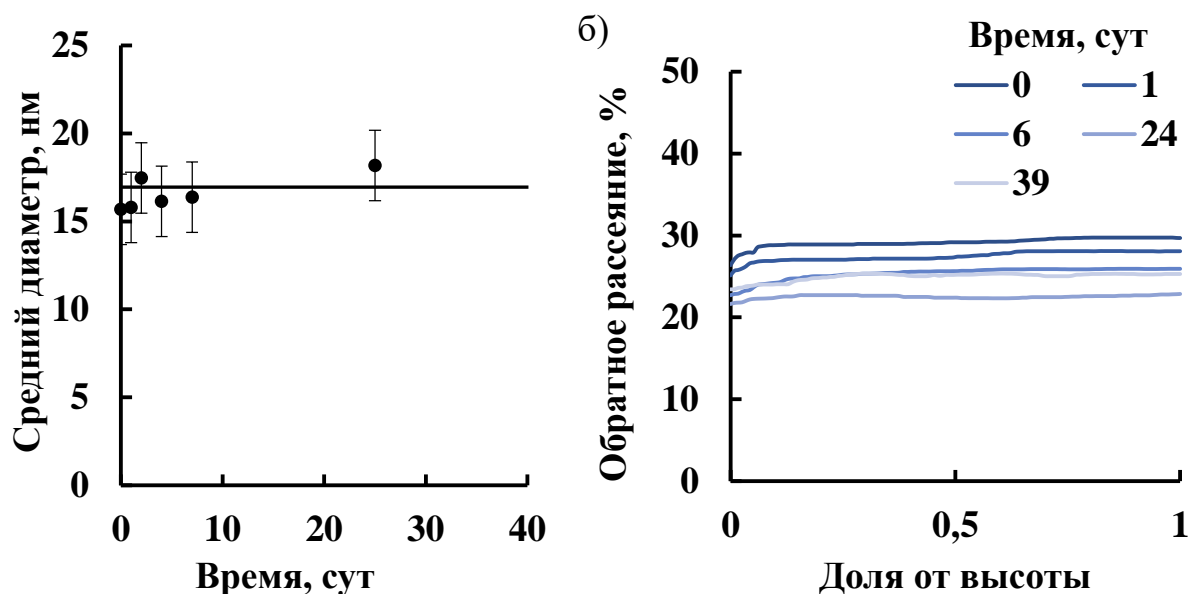


Рисунок 3.38 - Зависимость среднего диаметра капель дисперсной фазы НЭ от времени (а) и профили обратного рассеяния света в НЭ. Дисперсная фаза - олеиновая кислота. НЭ стабилизирована смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с добавлением 1 мас.% ЦТАБ. Температура - 25 °С

Средний диаметр капель НЭ составлял 17 ± 2 нм и оставался приблизительно постоянным в течение 39 сут (рисунок 3.38а). Изменения кривых обратного рассеяния в течение 39 сут оставались в пределах погрешности измерений, что свидетельствует об агрегативной и седиментационной устойчивости системы.

Таким образом НЭ, полученная с добавлением 1 мас.% ЦТАБ проявляла как агрегативную, так и седиментационную устойчивость в течение более 30 сут.

Выбирая стабилизаторы из ряда катионных ПАВ важное внимание уделяется их токсичности. Несмотря на то, что ЦТАБ традиционно

используют для стабилизации прямых эмульсий, карбаматные ПАВ обладают более низкой токсичностью. Индекс острой токсичности при внутримышечном введении мышам для УР-16 составляет 82 мг/кг и 24 мг/кг для ЦТАБ [185]. В связи с этим было исследование влияние катионного ПАВ УР-16 на размер, ζ -потенциал и устойчивость НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты.

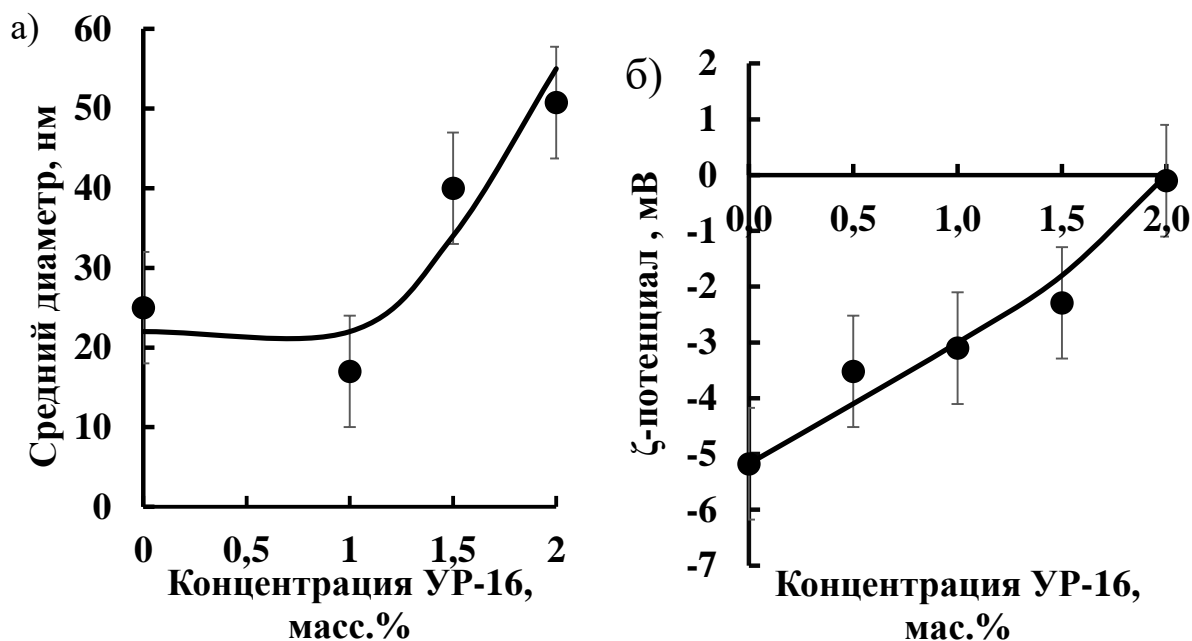


Рисунок 3.39 - Зависимости среднего диаметра (а) и ζ -потенциала (б) капель НЭ от концентрации УР-16. Дисперсная фаза олеиновая кислота. НЭ стабилизирована смесью ПАВ Tween 80 и Span 80. Температура - 25 °С

На рисунке 3.39 представлены зависимости среднего диаметра и ζ -потенциала капель в НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты, стабилизированных Tween 80 и Span 80 от концентрации УР-16. Добавление 1 мас.% УР-16 приводило к уменьшению среднего диаметра капель НЭ до 17 ± 2 нм. Увеличение концентрации ПАВ до 1,5 и 2 мас.% сопровождалось увеличением размера капель до 40 ± 2 и 50 ± 3 нм соответственно. При этом ζ -потенциал капель НЭ увеличивался от -5 до 0 мВ. Наиболее устойчивым к агрегации и седиментации были НЭ с добавлением 1 мас.% УР-16.

Средний диаметр капель в НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты, стабилизированной и ПАВ Tween 80 и Span 80 с добавлением 1 мас.% УР-16, оставался постоянным и равным 14 ± 2 нм в течение 17 сут (рисунок 3.40а). Высокую седиментационную устойчивость подтверждают профили обратного светорассеяния системы с течением времени. Обратное рассеяние света в НЭ практически не изменялось течение 19 сут.

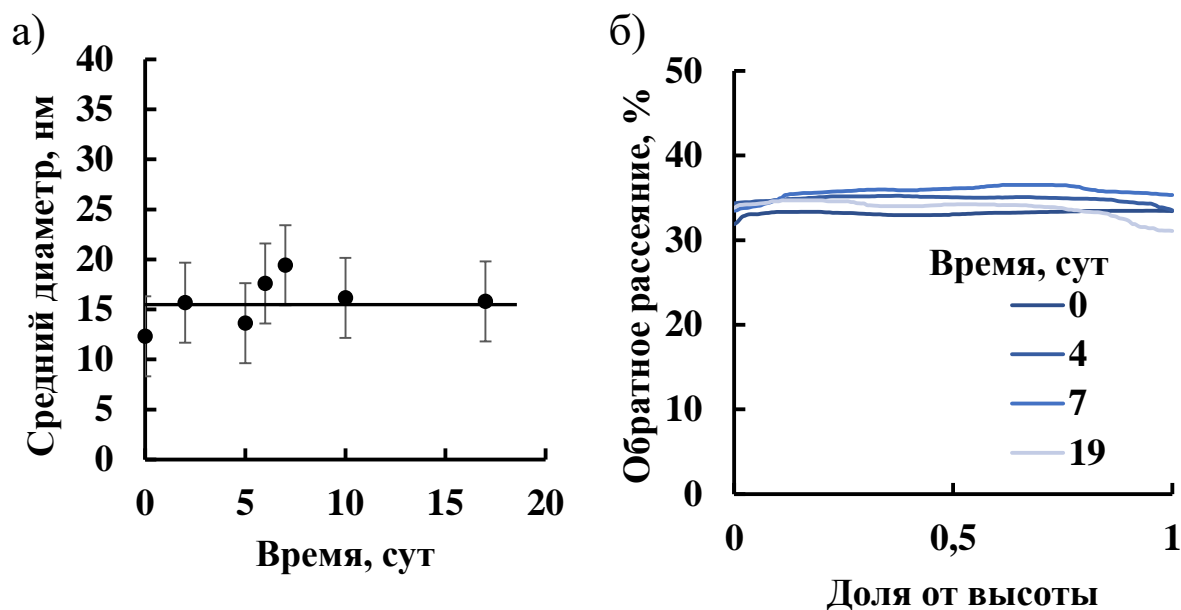


Рисунок 3.40 - Зависимость среднего диаметра капель от времени (а) и профили обратного рассеяния света (б) в НЭ. Дисперсная фаза - олеиновая кислота. НЭ стабилизированы смесью ПАВ Tween 80 и Span 80 с добавлением 1 мас.% УР-16. Температура - 25 °С

Одним из важных свойств систем доставки ЛС является их способность постепенно высвобождать инкапсулированные соединения для обеспечения пролонгированного действия. Исследования по высвобождению ЛС из НЭ проводились совместно г.н.с., д.х.н. Захаровой Л.Я. и с.н.с., к.х.н. Миргородской А.Б. из лаборатории высокоорганизованных сред Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, г. Казань. Были исследованы профили высвобождения ЛС индометацина из НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты, стабилизированной Tween 80 и Span 80 с добавлением 1 мас.% ЦТАБ или УР-16, методом диализа. Начальная

концентрация индометацина в НЭ составляла 0,5 мас.%. Стоит отметить, что данная концентрация существенно превышает растворимость идометацина в воде (0,937 мг/л при температуре 25 °С), что свидетельствует о его инкапсулировании в липидные наночастицы.

НЭ с инкапсулированным индометацином и для сравнения 0,5 мас.% раствор идометацина в 50 % водно-спиртовой среде помещали в диализный мешок с размером пор 3,5 кДа. Мешок погружали в 50 мл фосфатный буферный раствор с рН 6,86. Температуру поддерживали равной 37 °С. Через определенные промежутки времени отбирали пробы фосфатного буферного раствора и определяли концентрацию индометацина по поглощению при 320 нм. Поглощение растворов регистрировали в кварцевых кюветах на спектрофотометре Specord 250 Plus (Analytik Jena).

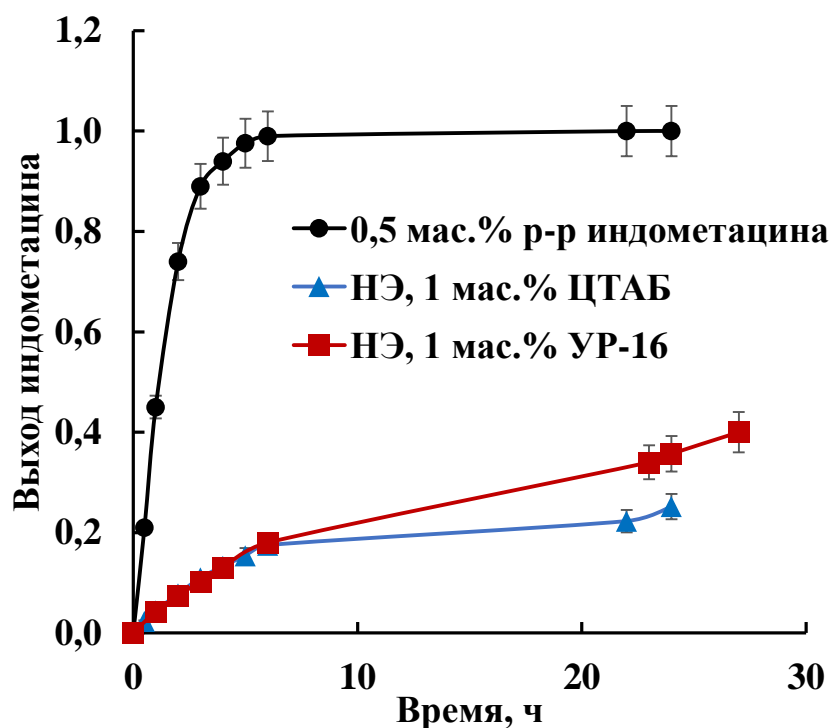


Рисунок 3.41 - Выход идометацина во внешний фосфатный буферный раствор из диализного мешка, содержащего индометацин в виде раствора и в составе НЭ. Температура 37 °С

Если диализный мешок содержал 0,5 мас.% раствор идометацина в 50 % водно-спиртовой среде, то более 98% индометацина проникало во

внешний раствор примерно через 5 ч. (рисунок 3.41). За это время из НЭ, содержащих ЦТАБ или УР-16, диффундировало только 10-15% ЛС. Выход индометацина из обеих НЭ не превышал 30% от его загрузки через 1 сут. Скорость высвобождения индометацина незначительно зависела от типа катионного ПАВ в составе НЭ и находилась в пределах погрешности измерения в течение первых 6 ч. Однако через 24 ч концентрация высвобожденного индометацина из НЭ, стабилизированной УР-16, превысила его концентрацию в сравнении с НЭ, содержащей ЦТАБ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что процесс диффузии индометацина инкапсулированного в НЭ протекал значительно медленнее, чем при использовании раствора индометацина.

Противовоспалительную активность НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты с инкапсулированным индометацином тестировали на модели каррагинанового отека лапы крыс *in vivo*. В качестве тест-систем были взяты: коммерческая индометациновая мазь на основе вазелина, содержащая 5% индометацина, НЭ, загруженные 0,5 мас.% индометацина содержащие 1 мас.% ЦТАБ или УР-16. Индометациновую мазь перед нанесением на повязку разбавляли вазелином в 10 раз, чтобы выровнять концентрацию индометацина в НЭ и образце на основе коммерческой мази. Через 30 мин после введения каррагинана в мышцу лапы крысы на место отека накладывали повязки, пропитанные физиологическим раствором (контрольная группа), индометациновой мазью или НЭ с индометацином и ЦТАБ или Ур-16. Изменение отека с течением времени определяли, измеряя объем лапы.

Таблица 3.17 – Влияние НЭ, загруженных индометацином, на развитие отека, индуцированного каррагинаном, на лапах крыс

Группа лечения	Время, ч						
	0	1	2	3	4	5	24
	Объём лапы, мл						
Контроль	1,05±0 ,06	1,42±0 ,05	1,48±0 ,08	1,60±0 ,08	1,66±0 ,1	1,55±0 ,1	1,05±0 ,06
НЭ, 1мас.% УР-16	1,00±0 ,06	1,12±0 ,06	1,09±0 ,1	1,05±0 ,08	1,06±0 ,08	1,0±0, 05	1,0±0, 04
НЭ, 1 мас.% ЦТАБ	0,98±0 ,06	1,05±0 ,04	1,12±0 ,05	1,09±0 ,05	1,14±0 ,06	1,12±0 ,06	0,98±0 ,04
Индометаци новая мазь	0,98±0 ,03	1,07±0 ,02	1,12±0 ,03	1,16±0 ,02	1,19±0 ,04	1,23±0 ,04	1,03±0 ,03

В контрольной группе размер отека достигал максимальной величины в 58% через 4 ч после введения каррагинана (рисунок 3.42а). Максимальное увеличение объема лапы на 25% после применения коммерческой мази наблюдалось через 5 ч. Полное снятие отёка было достигнуто примерно через 24 ч после иницирования (таблица 3.17).

Наличие в повязке НЭ, содержащей 1 мас.% ЦТАБ, приводило к более быстрому снижению скорости развития отека и более быстрому его уменьшению по сравнению с контролем. Отек сохранялся на уровне 10-16% через 4 ч (рисунок 3.42б) после введения каррагинана, что ниже, чем в контрольной группе.

Максимальный противовоспалительный эффект наблюдался у НЭ с добавлением 1 мас.% УР-16. Объем лап увеличился только на 12% по сравнению с 58% в контрольной группе и на 5 ч происходило полное снятие отёка (рисунок 3.42в).



Рисунок 3.42 - Фотографии лап крыс, с отёком индуцированным каррагинаном, через 4 ч. Тест- системы: индометациновая мазь (а), НЭ с 1 мас.% ЦТАБ (б) и 1 мас.% УР-16 (в)

Стоит отметить, что противовоспалительный эффект индометациновой мази, наблюдаемый через 4 ч, был ниже по сравнению с лечением НЭ, содержащими ЦТАБ И Ур-16 (таблица 3.16). Особенно эффективными были НЭ с карбаматным ПАВ Ур-16. Вероятно, способность этого соединения преодолевать клеточные барьеры [186] способствовала проникновению солюбилизированного в НЭ индометацина в очаг воспаления, что приводило к усилению терапевтического эффекта.

Таким образом можно сделать вывод, что НЭ и ТЛН могут быть использованы как системы доставки в том числе и противовоспалительных ЛС. При этом доставка ЛС может происходить как через водную фазу, т.е. при выходе частично растворимого в воде ЛС из состава НЭ или ТЛН, так и при непосредственном проникновении капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН в клетки. В первом случае для обеспечения эффективной диффузии ЛС необходимо использовать НЭ с жидкообразной оболочкой, т.е. стабилизированные смесью Tween 80 и Span 80. В случае, когда доставка происходит за счет проникновения носителя в клетку, возможно использование НЭ и ТЛН как с жидкообразной, так и твердообразной оболочкой из Tween 60 и Span 60. Так же стоит отметить, что в качестве ЛС

могут выступать не только липофильные вещества, например, тимохинон, но и амфифильные, такие как доксорубицин и индометацин.

3.4.5. Применение водных дисперсий наночастиц пчелиного воска и минеральных пигментов в качестве аналогов темперных красок

Смешанные суспензии липидов и неорганических частиц используются в самых разных областях, в том числе и красках. Техника рисования красками на основе воска, также известная как энкаустика, использовалась художниками в античности [187]. В Средние века от рецепта энкаустических красок постепенно отказались изобретение масляных красок, и эта формула в конце концов была утеряна. Техника холодной энкаустики из пчелиного воска и мыла была разработана в 1961 году испанским художником Хосе Куни [188]. При добавлении водорастворимого мыла к расплавленному пчелиному воску образуется стабильная эмульсия М/В. При смешении с пигментами образуется краска на водной основе, называемая темперной краской, которую можно наносить при комнатной температуре на различные материалы: стены, дерево или бумагу.

В данной работе был создан аналог темперных красок на основе водных дисперсий ТЛН с дисперсной фазой из пчелиного воска и минеральных пигментов. В качестве минеральных пигментов были использованы ультрамарин, английская красная, глауконит тёмно-зелёный, золотистая охра, боллос армянский и шунгит. СЭМ-изображения пигментов, представлены на рисунке 3.43.

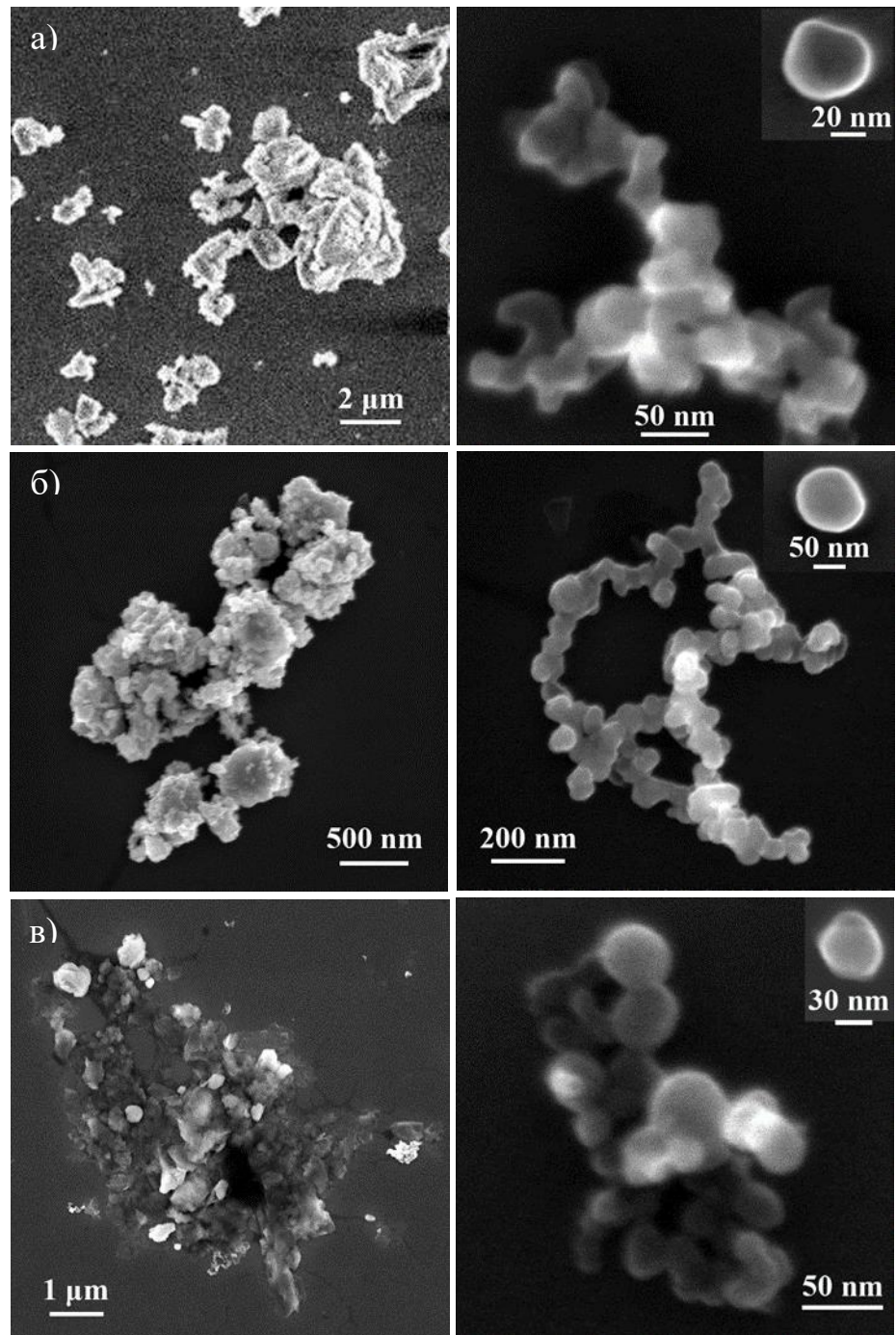


Рисунок 3.43 - СЭМ-микрофотографии минеральных пигментов:
ультрамарин (а), английская красная (б), глауконит (в)

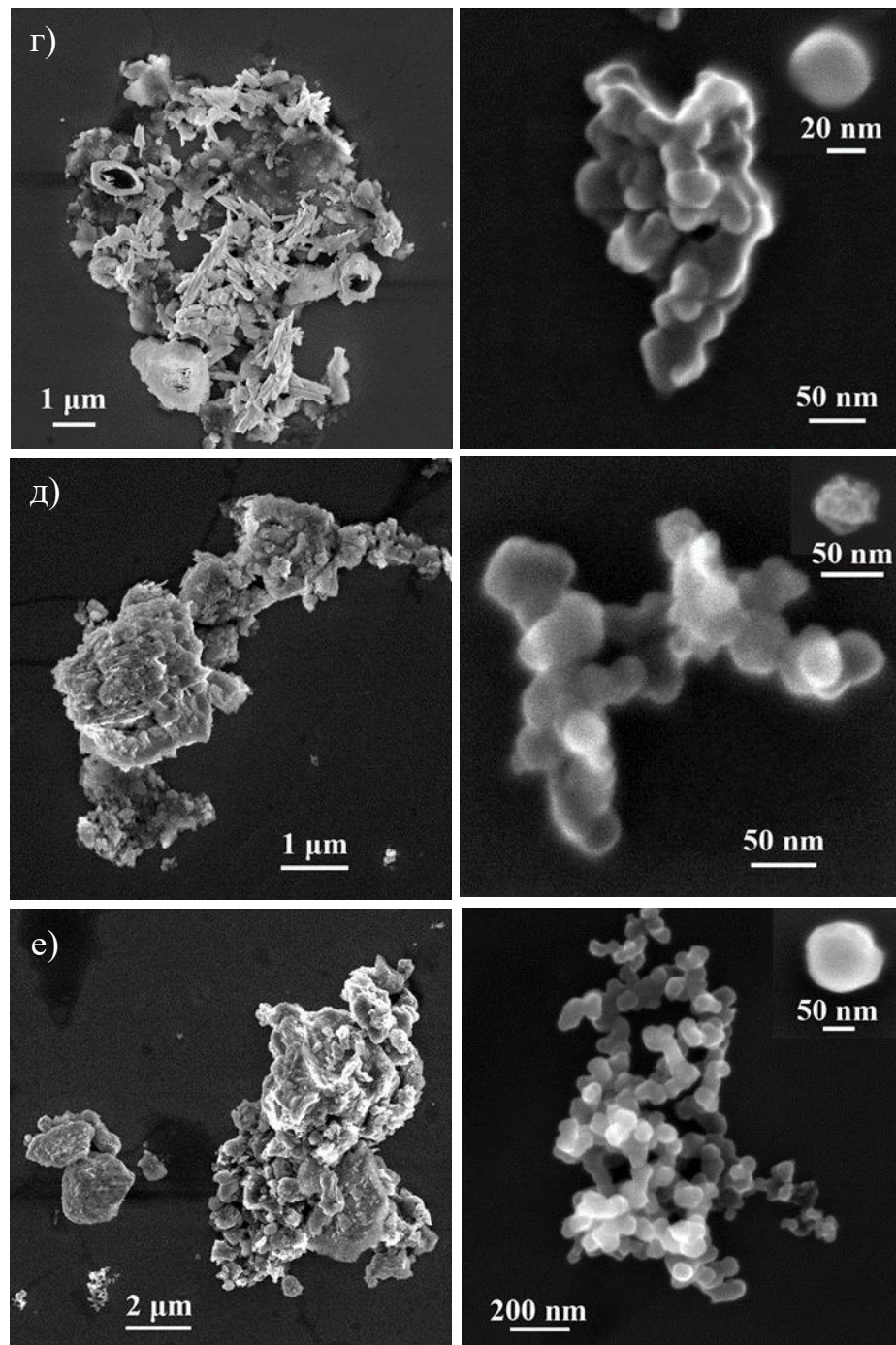


Рисунок 3.43 - (продолжение). СЭМ-микрофотографии минеральных пигментов: золотистая охра (г), болнос армянский (д), шунгит (е)

Все образцы природных пигментов представляли собой сросшиеся агрегаты частиц размером 2 мкм и более, причем в большинстве это были агрегаты частиц нанометрового размера. Средний размер отдельных наночастиц ультрамарина, глауконита, золотистой охры и болюса армянского составлял ≈ 50 нм, английской красной и шунгита - 80-100 нм.

Для оценки агрегативной устойчивости был измерен ζ -потенциал наночастиц пигментов, значения которого представлены в таблице 3.18.

Таблица 3.18 – ζ -потенциал наночастиц минеральных пигментов

Пигмент	ζ -потенциал, мВ
Ультрамарин	$-(37,8 \pm 3,3)$
Английская красная	$-(16,3 \pm 1,4)$
Глауконит темно – зеленый	$-(29,9 \pm 2,8)$
Охра золотистая	$-(30,0 \pm 2,8)$
Болюс армянский	$-(24,9 \pm 2,3)$
Шунгит	$-(19,8 \pm 1,8)$

У всех пигментов ζ -потенциал был отрицательным и превышал 16 мВ по абсолютной величине, что говорит об относительной устойчивости данных коллоидных суспензий. Это можно объяснить наличием полярных групп в составе пигментов: основными компонентами ультрамарина являются алюмосиликат натрия $(\text{Na,Ca})_8(\text{AlSiO}_4)_6(\text{S,SO}_4,\text{Cl})_{1-2}$, содалит, кальцит, пирит; глауконит - железисто-калиевый филосиликатный минерал $((\text{K,Na})(\text{Fe(III),Al,Mg})_2(\text{Si,Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2)$; охра золотистая представляет собой гидратированный гидроксид железа ($\alpha\text{-FeOOH}\cdot n\text{H}_2\text{O}$); болюс армянский содержит водные силикаты алюминия и магния и оксид железа. В отличие от них, шунгит, состоящий более чем на 98 мас. % из углерода, и английская красная, представляющая собой гематит (Fe_2O_3), имеют более низкий ζ -потенциал.

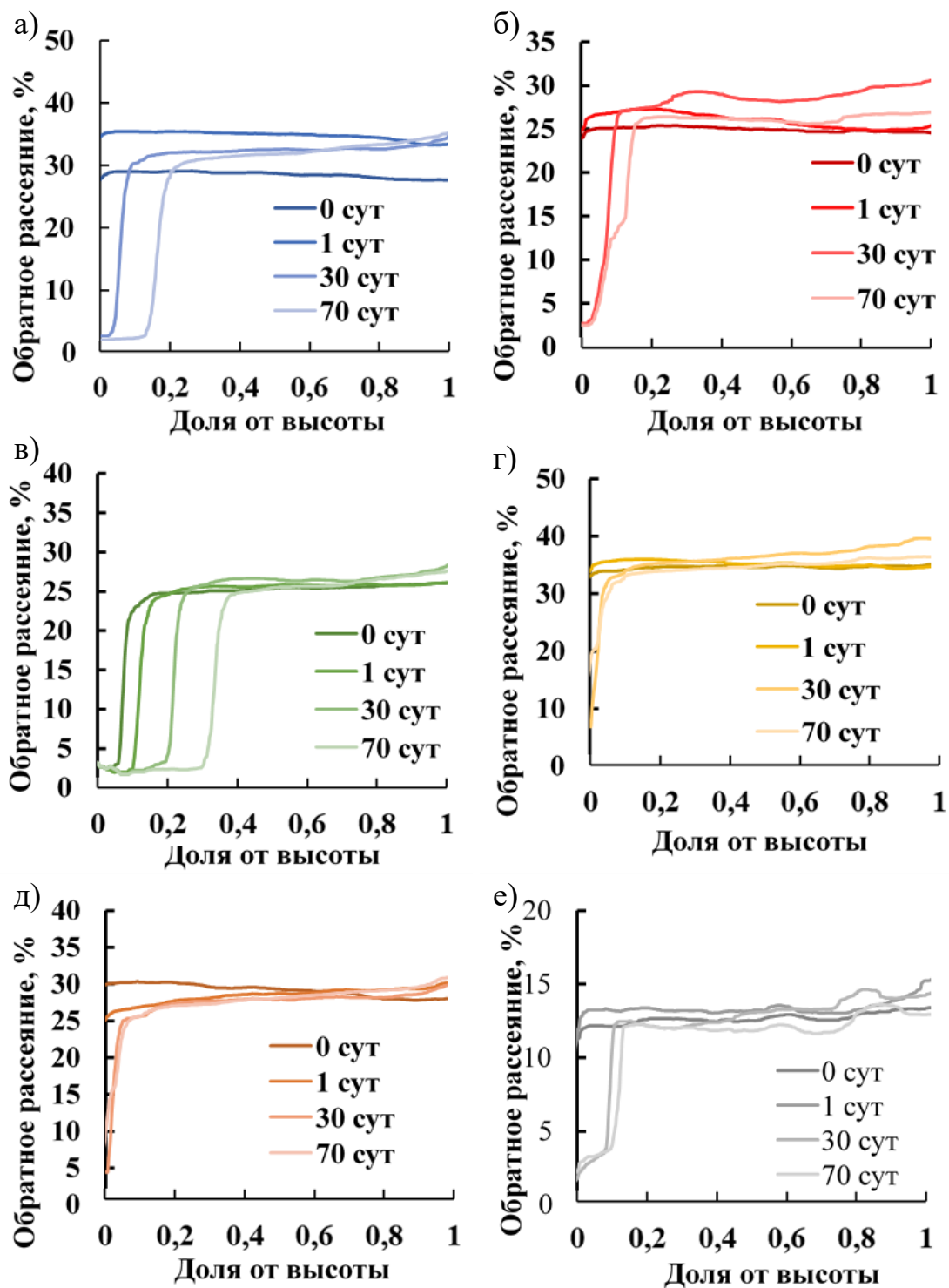


Рисунок 3.44 – Профили обратного рассеяния света в суспензиях ТЛН с добавлением минеральных пигментов: ультрамарин (а), английская красная (б), глауконит тёмно-зелёный (в), золотистая охра (г), боллос армянский (д), шунгит (е)

В качестве основы для темперных красок была получена суспензия ТЛН из пчелиного воска, стабилизированная Tween 80 и Span 80 с суммарной концентрацией 12,5 об.%, (раздел 3.2.7). К 10 мл суспензии ТЛН добавляли 0,1 г минерального пигмента и перемешивали на магнитной мешалке со скоростью 1000 об/мин до образования однородной по цвету суспензии. Полученные краски исследовались на седиментационную устойчивость (рисунок 3.44).

Как видно из профилей обратного рассеяния света во всех образцах наблюдалось частичное отслаивание водной фазы через 1 сут после получения-(рисунок 3.45).



Рисунок 3.45 - Фотография суспензий ТЛН из пчелиного воска и пигментов через 30 сут после получения: 1 – ультрамарин, 2 – английская красная, 3 – глауконит темно – зеленый, 4 – охра золотистая, 5 – боллос армянский, 6 – шунгит

Для увеличения устойчивости суспензий к седиментации в дисперсионной среде суспензий ба создана гелеобразная сетка из редкосшитого полимерного гелеобразователя Carbopol 940. После смешивания водной суспензии ТЛН с минеральными пигментами, в систему добавлялся Carbopol 940 в концентрации 1 мас.% от водной фазы. Для образования геля в дисперсионной среде суспензии рН доводился до 7.

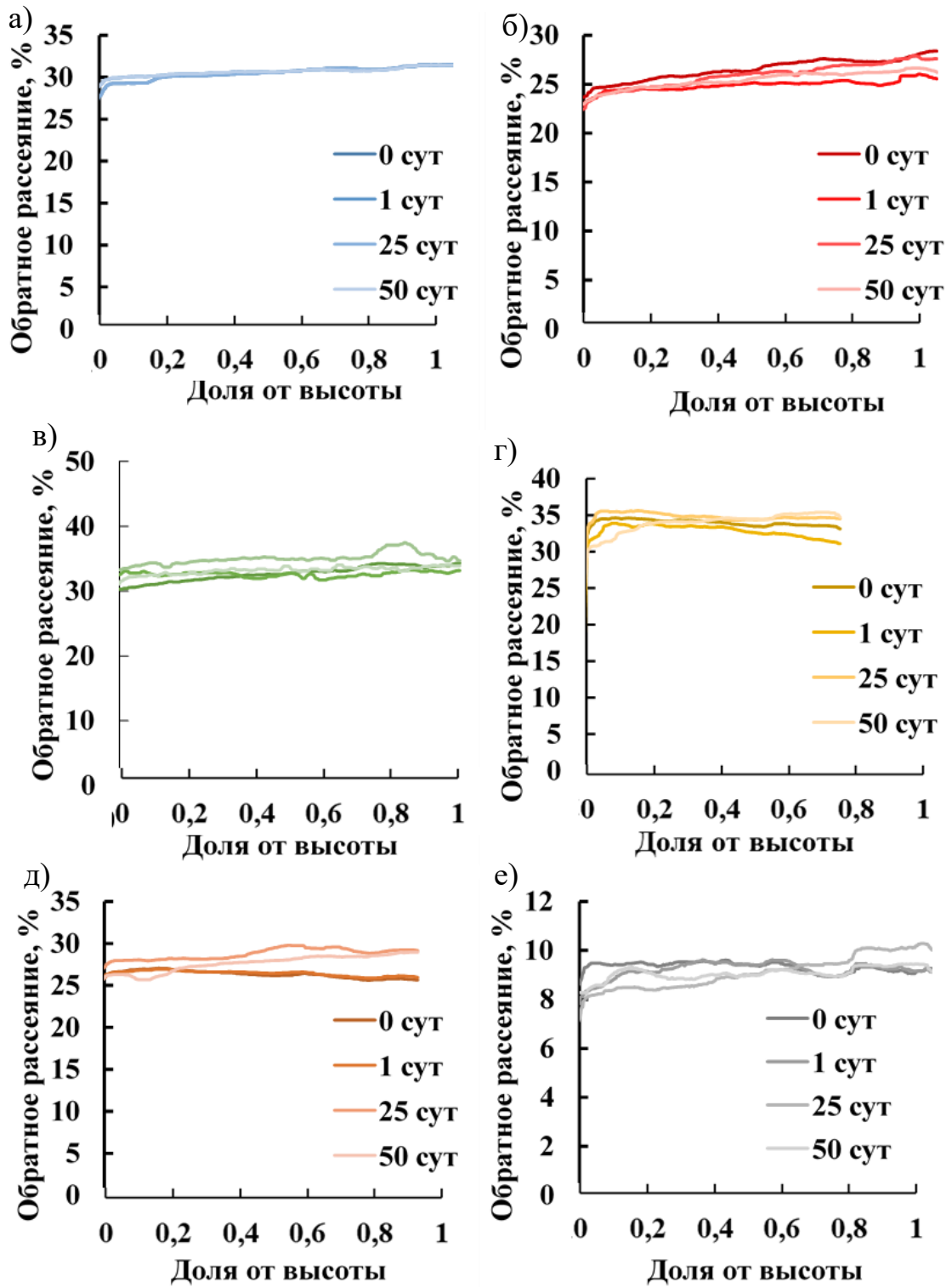


Рисунок 3.46 - Профили обратного рассеяния света в суспензиях ТЛН с минеральными пигментами и 1 мас. % Carbopol 940: ультрамарин (а), английская красная (б), глауконит тёмно-зелёный (в), золотистая охра (г), болюс армянский (д), шунгит (е)



Рисунок 3.47 - Фотография дисперсий ТЛН из пчелиного воска с минеральными пигментами и 1 мас.% Carbopol 940 через 50 сут после получения: 1) ультрамарин; 2) английская красная; 3) охра золотистая; 4) глауконит темно – зелёный; 5) шунгит; 6) болюс армянский



Рисунок 3.48 - Рисунок, сделанный с использованием красок с ТЛН из пчелиного воска и минеральными пигментами

На рисунке 3.47 представлены профили обратного рассеяния света в суспензии ТЛН из пчелиного воска с минеральными пигментами и с 1 мас. % Carbopol 940. Устойчивость ТЛН с добавлением 1 мас.% Carbopol 940

возросла - все суспензии оставались стабильными более 50 сут (рисунок 3.46). Стоит отметить, что данные системы не повторяют потерянный рецепт темперных красок, и тем не менее они могут быть использованы в качестве красок наряду с имеющимися в настоящее время коммерческими аналогами. Так с использованием разработанных аналогов красок, содержащих липидные наночастицы и природные пигменты, было сделано изображение, приведенное на рисунке 3.48.

Таким образом НЭ и ТЛН могут быть использованы в разных областях. Наиболее исследуемым и перспективным является применение липидных наночастиц в медицине для адресной доставки противораковых и противовоспалительных ЛС. При этом возможен разный механизм выхода ЛС из липидных наночастиц. Также, как показано, потенциал использования данных систем не ограничен только лишь медицинским применением.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность:

- Prof. D. Danino, Dr. I. Portnaya, Dr. I. Abutbul-Ionita, CryoEM Laboratory of Soft Matter, Faculty of Biotechnology and Food Engineering, Technion-Israel Institute of Technology (Haifa, Israel) за проведение крио-ПЭМ исследований и микрокалориметрический анализ;
- д.х.н. Марквичевой Е.А. и инж.-исс. Гилёвой А. М из лаборатории биомедицинских материалов ИБХ РАН им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (г. Москва) за совместную работу по изучению проникновения липидных наночастиц в раковые клетки *in vitro*;
- г.н.с., д.х.н. Захаровой Л.Я. и с.н.с., к.х.н. Миргородской А.Б. из лаборатории высокоорганизованных сред Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (г. Казань) за предоставление ПАВ УР-16, исследование высвобождения индометацина из НЭ и исследования противовоспалительной активности НЭ *in vivo*;
- Центру коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлены условия получения высокоустойчивых НЭ и дисперсий ТЛН с полярным и неполярным ядром и твердообразной оболочкой размером менее 100 нм.
2. Установлено, что наиболее устойчивые НЭ с дисперсной фазой из парафинового масла (неполярное ядро) или олеиновой кислоты (полярное ядро) и ТЛН из стеариновой кислоты (полярное ядро) или парафина (неполярное ядро) образуются при стабилизации смесью ПАВ Tween 60 и Span 60. При доле дисперсной фазы 25 об.% для стабилизации НЭ требуется концентрация ПАВ 12,5 об.%, ТЛН – 15 об.%.
3. На основании результатов термического анализа сделано предположение о структуре капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН, стабилизированных Tween 60 и Span 60. Капли НЭ состоят из жидкого ядра и твердообразной оболочки, образованной адсорбированными молекулами ПАВ. В ТЛН ядро включает в себя переохлажденный расплав стеариновой кислоты или твердообразный парафин. В случае полярного ядра молекулы олеиновой или стеариновой кислоты частично встраиваются в адсорбционный слой, изменяя температуру его плавления.
4. При образовании жидкообразного адсорбционного слоя при стабилизации смесью Tween 80 и Span 80 образуются менее устойчивые НЭ. На начальном этапе укрупнение капель дисперсной фазы из олеиновой кислоты и парафинового масла происходит преимущественно из-за коалесценции, на последующих этапах протекает как коалесценция, так и оствальдово созревание.
5. Продемонстрировано, что цитотоксичность и скорость проникновения липидных наночастиц в раковые клетки зависит от их размера. Липидные частицы размером менее 50 нм проникали в раковые клетки в течение 15 мин, и накапливались в ядре в течение 1ч. При этом цитотоксичность НЭ и дисперсий ТЛН, загруженных доксорубицином и тимохинон, была на два порядка выше, чем незагруженных липидных наночастиц.

6. НЭ и ТЛН могут быть использованы в качестве носителей ЛС к биологическим тканям. При этом доставка ЛС может происходить как через водную фазу, т.е. при выходе частично растворимого в воде ЛС из состава НЭ или ТЛН, так и при непосредственном проникновении капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН в клетки. В качестве ЛС могут выступать не только липофильные вещества, например, тимохинон, но и амфифильные, такие как доксорубицин и индометацин.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

К основным научным перспективам развития темы можно отнести исследование распределения ЛС в структуре липидных носителей и более детальное изучение распределения НЭ и ТЛН в раковых клетках. Основными технологическими перспективами развития темы является разработка липидных носителей с модифицированной транспортными белками поверхностью для адресной доставки к органам.

Список сокращений и обозначений

- ГЛБ – гидрофильно–липофильный баланс,
 ДСК – дифференциальная-сканирующая калориметрия,
 ЛС – лекарственное соединение,
 НЭ – наноэмульсия,
 ПАВ – поверхностно–активное вещество,
 ПЭМ – просвечивающий электронный микроскопия,
 ТИФ – температура инверсии фаз,
 ТЛН – твёрдые липидные наночастицы,
 ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид,
 C^∞ – растворимость вещества дисперсной фазы в дисперсионной среде,
 D – коэффициент диффузии вещества дисперсной фазы в дисперсионной среде,
 F – площадь межфазной поверхности,
 $f(Ka)$ – функция Генри,
 ΔG – изменение энергии Гиббса,
 M – молекулярная масса вещества дисперсной фазы,
 R – универсальная газовая постоянная,
 $r_{кр}$ – критический радиус капель НЭ,
 ΔS – изменение энтропии,
 T – температура,
 t – время,
 U_E – электрофоретическая подвижность,
 ν – скорость оствальдова созревания,
 ρ – плотность вещества дисперсной фазы,
 ε – диэлектрическая постоянная,
 η – динамическая вязкость,
 σ – межфазное натяжение,
 φ – доля дисперсной фазы,
 ω – вероятность разрыва межфазной пленки на единицу площади поверхности.

Список литературы

1. Loomis K. P. Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic / K. P. Loomis, B. Smith, J. H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman, R. Blumenthal. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* – 2009. – V. 26. – P. 523-580.
2. McClements D.J. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components / D.J. McClements, Y. Li. // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2010. – V. 159. – P. 213-228.
3. 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.
4. Gonçalves A. Production, properties, and applications of solid self-emulsifying delivery systems (S-SEDS) in the food and pharmaceutical industries / A. Gonçalves, N. Nikmaram, S. Roohinejad, B.N. Estevinho, F. Rocha, R. Greiner, D.J. McClements // *Colloids Surf., A.* – 2018. – V. 538. – P. 108-126.
5. 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.
6. Wim H. J. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards / H.J. Wim, P. J. Borm // *Int. J. Nanomedicine.* – 2008. – V. – 2. – P. 133–149.
7. Mason T.J. Nanoemulsions: formation, structure and physical properties / T.J. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, C.B. Chang, S.M. Graves // *J. Condens. Matter Phys.* – 2006. – V. 18. – P. 635-666.
8. Королёва М.Ю. Наноэмульсии: свойства, методы получения и перспективные области применения / М.Ю. Королёва, Е.В. Юртов // *Успехи химии.* – 2012. – Т. 1(81). – С.– 21-43.
9. Solans C. Nanoemulsions / C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, M.J. Garcia-Celma. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2005. – V. 10. – P. 102-110.

10. Forgiarini A. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature / A. Forgiarini, J. Esquena, C. González, C. Solans // *Langmuir*. – 2001. – V. 17. – P. 2076-2083.
11. Jinwei D. Size, shape, charge and “stealthy” surface: Carrier properties affect the drug circulation time in vivo / D. Jinwei, G. Xiang, D. Yimeng, Z. Hui, G. Jing, Z. Aiping // *Asian J. Pharm. Sci.* – 2021. – V. 16(4). – P. 444-458.
12. Müller R.H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of art / R.H. Müller, K. Mäder, S. Gohla. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2000. – V. 50. – P. 161-177.
13. Karamchedu S. Pooja. Morin hydrate loaded solid lipid nanoparticles: Characterization, stability, anticancer activity, and bioavailability / S. Karamchedu, L. Tunki, H. Kulhari // *Chem. Phys. Lipids*. – 2020. – V. 233. – P. 104988.
14. Zhang T. Ketotifen loaded solid lipid nanoparticles laden contact lens to manage allergic conjunctivitis / T. Zhang, T. Zhu, F. Wang, L. Peng, M. Lai. // *J. Drug Delivery Sci. Technol.* – 2020. – V. 60. – P. 101949.
15. Mehnert W. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications / W. Mehnert, K. Mäder // *Drug Delivery Rev.* – 2012. – V. 64. – P. 83-101.
16. McClements D.J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles / D.J. McClements // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2012. – V. 17. – P. 235-245.
17. Friedl J.D. Bernkop-Schnürch. Solidification of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): Impact on storage stability of a therapeutic protein / J.D. Friedl, A.M. Jörgensen, B. Le Vinh, D. E. Braun, M. Tribus. // *J. Colloid Interface Sci.* – 2021. – V. 584. – P. 684-697.
18. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution : No. 5250236 United States / M.R. Gasco. – 1993.
19. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanosphaären (SLN) : No. EP 0605497 European Patent Office / R.H. Müller. – 1996.

20. Muhlen A.Z. Feste Lipid-Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation: Herstellung, Langzeitstabilitat, Charakterisierung, Freisetungsverhalten und mechanism : Ph.D Thesis : 1996 / Annette zur Mühlen. – Free University of Berlin.
21. Bunjes H. Emulsions of supercooled melts - a novel drug delivery system, in: S. Benita / H. Bunjes, B. Siekmann, K. Westesen. // Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery. – 1998. – P. 175-204.
22. Siekmann A. Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids/ A. Siekmann, K. Westesen. // Pharm. Pharmacol. Lett. – 1992. – V. 1. – P. 123-126.
23. Sato K. Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acid/ K. Sato // Marcel Dekker Inc. – 1988. – P. 227–266.
24. Schultz S. High-pressure homogenization as a process for emulsion formation/ S. Schultz, G. Wagner, K. Urban, J. Ulrich // Chem. Eng. Technol. – 2004. – V. 27(4). – P. 361 - 368.
25. Jahnke S. Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs / S. Jahnke // Int. J. Pharm. – 1998. – V. 212(1). – P. 177–200.
26. Mehnert W. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications/ W. Mehnert, K. Mäder. // Ad. Drug Delivery Rev. – 2001. –V. 47– P. 165-196.
27. Westesen K. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential/ K. Westesen, H. Bunjes, M.H.J. Koch. // J. Controlled Release. – 1997. – V. 48. – P. 223-236.
28. Labouret A. Application of an Original process for Obtaining Colloidal Dispersions of Some Coating Polymers. Preparation, Characterization, Industrial Scale-Up / A. Labouret, O. Thioune, H. Fessi,J., P. Devissaguet, F. Puisieux. // Drug Dev. Ind. Pharm. – 1995. – V. 21. – P. 229-241.

29. Lander R. Homogenization: A Mechanistic Study / R. Lander, W. Manger, M. Scouloudis, A. Ku, C. Davis, A. L. Gaulin // *Biotechnol. Progr.* – 2008. – V. 16(1). – P. 80-85.
30. Durán-Lobato M. Statistical analysis of solid lipid nanoparticles produced by high-pressure homogenization: a practical prediction approach / M. Durán-Lobato, A. Enguix-González, M. Fernández-Arévalo, L.Martín-Banderas // *J. Nanopart. Res.* – 2013. – V. 15. – P. 1443.
31. Xiaoli L. Cinnamon essential oil nanoemulsions by high-pressure homogenization: Formulation, stability, and antimicrobial activity/ L. Xiaoli, C. Liuqing, K. Yanan, H. Dong, Y. Bingxin, W.Kegang. // *Lebensmittel-Wissenschaft und Techno Technol.* – 2021. – V. 147. – 111660.
32. Almeida J. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters / J. Almeida, S. Runge, R. H.Müller. // *Int. J. Pharm.* – 1997. – V. 149. – P. 255-265.
33. Ganesan P. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery / P.Ganesan, D Narayanasamy. // *Sustainable Chem. Pharm.* – 2017. – V. 6. – P. 37–56.
34. Sharma, G. Topical delivery of TRPsiRNA-loaded solid lipid nanoparticles confer reduced pain sensation via TRPV1 silencing, in rats / G. Sharma, K. Chopra, S. Puri, M. Bishnoi, P. Rishi, I. P. Kaur // *J. Drug Target.* – 2018. – V. 26(2). – P. 135-149.
35. Liedtke S. Influence of highpressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics / S. Liedtke, S. Wissing, R. H. Müller, K. Mäder // *Int. J. Pharm.*– 2000. – V. 196(2). – P. 183-185.
36. Silva A.C. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound / A.C. Silva, E. González-Mira, M.L. García, M.A. Ege, J. Fonseca, R. Silva, D. Santos, E.B. Souto // *Colloids Surf., B* – 2011. – V. 86(1). – P. 158-165.

37. Subedi R.K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin / R.K. Subedi, K.W. Kang, H.K. Choi. // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2009. – V. 37. – P. 508-513.
38. Zhao D. Structure and stability characterization of pea protein isolate-xylan conjugate-stabilized nanoemulsions prepared using ultrasound homogenization / D. Zhao, Y. Ge, X. Xiang, H. Dong, W. Qin, Q. Zhang // *Ultrason. Sonochem.* – 2022. – V. 90. – 106195.
39. Puglia M.G. Development, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of benzocaine-and lidocaine-loaded nanostructured lipid carriers/ M.G. Puglia, S. F. arpietro, F. Bonina, M. Castelli, S. Zammataro // *J. Pharm. Sci.* – 2011. – V. 100. – P. 1892-1899.
40. Vladisavljević, G. T. Fabrication of Nanoemulsions by Membrane Emulsification / G. T. Vladisavljević // *Nanoemulsions.* – 2018. – P. 287–346.
41. Charcosset C. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor/ C. Charcosset, A. El-Harati, H. Fessi // *J. Controlled Release.* – 2005. – V. 108(1). – P. 112-120.
42. Toorisaka E. Hypoglycemic effect of surfactant-coated insulin solubilized in a novel solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion/ E. Toorisaka, H. Ono, K. Arimori, N. Kamiya, M. Goto // *Int. J. Pharm.* – 2013. – V. 252(1-2). – P. 271-274.
43. Laouini A. Membrane emulsification: A promising alternative for vitamin E encapsulation within nano-emulsion / A. Laouini, H. Fessi, C. Charcosset // *J. Membr. Sci.* – 2012. – V. 423–424. – P. 85-96.
44. Sonja J. Preparation of Nanoemulsions and Solid Lipid Nanoparticles by Premix Membrane Emulsification / J. Sonja, Heike B. // *J. Pharm. Sci.* – 2012. – V. 101(7). – P.2479-2489.
45. D'oria C.A. Preparation of solid lipid particles by membrane emulsification—Influence of process parameters / C. D'oria, C. Charcosset, A.A. Barresi, H. Fessi // *Colloids Surf., A.* – 2009. – V. 338(1-3). – P. 114-118.

46. Graaf S. Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review / S. Graaf, C.G.P.H. Schroën, R.M. Boom. // *J. Membr. Sci.* – 2005. – V. 251(1-2). – P. 7-15.
47. Svilenov H. Solid lipid nanoparticles—A promising drug delivery system / H. Svilenov, C. Tzachev // *Nanomedicine.* – 2018. – P. 187–237.
48. 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(1). – P. 26-30.
49. Kalvodová A. Lipid nanocapsules enhance the transdermal delivery of drugs regardless of their physico-chemical properties / A. Kalvodová, Ja. Zbytovská. // *Int. J. Pharm.* – 2022. – V. 628(25). – 122264.
50. 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(6) – P. 3860-3867.
51. Ee S.L. Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method / S.L. Ee, X. Duan, J. Liew, Q. D. Nguyen // *Chem. Eng. J.* – 2008. – V. 140(1-3). – P. 626-631.
52. Lopes R. Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis / R. Lopes, C. V. Eleutério, L. M. D. Gonçalves, M. E. M. Cruz, A. J. Almeida // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2012. – V. 45(4). – P. 442-450.
53. Urbán-Morlán Z. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method / Z. Urbán-Morlán, A. Ganem-Rondero, L. M. Melgoza-Contreras, J. J. Escobar-Chávez, M. G. Nava-Arzaluz, D. Quintanar-Guerrero // *Int. J. Nanomedicine* – 2010. – V. 5. – P. 611–620.
54. Rabinow B.E. Nanosuspensions in drug delivery / B.E. Rabinow // *Nat. Rev.* – 2004. – V. 3. – P. 785–796.
55. Kim C.J. Surface chemistry and colloids. Advanced pharmaceuticals: physicochemical principles / C.J. Kim. – CRC Press, 2004. – 256 p.

56. Nutan M.T.H. Pharmaceutical suspensions: from formulation development to Manufacturing / M.T.H. Nutan, I.K. Reddy // Springer. – 2009. – P. 39-66.
57. Rosen M.J. Dispersion and aggregation of solid in liquid medium by surfactants / M.J. Rosen // Surfactant Interf. Phenomena. – 2004. – P. 337–362.
58. Derjaguin B.V. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes / B.V. Derjaguin, L. Landau // Acta Phys. Chim.– 1941. – V. 14. – P. 633–662.
59. Verwey E.J.W. Theory of the stability of lyophobic colloids / E.J.W. Verwey // J. Phys. Chem. – 1947. – V. 51. – P. 631–63.
60. Ostertag F. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion / F. Ostertag, J.Weiss, D.J. McClements // J. Colloid Interface Sci. – 2012. – V. 388. – P. 95-102.
61. Koroleva M.Y. Nano- and microcapsules as drug-delivery systems / M.Y. Koroleva, T.Y. Nagovitsina, D.A. Bidanov, O.S. Gorbachevski, E. V. Yurtov. // Resource-Efficient Technol. – 2016. – V. 2(4). – P.233-239.
62. Henostroza M.A.B. Antibiotic-loaded lipid-based nanocarrier: A promising strategy to overcome bacterial infection / M. A. B. Henostroza, G. D. Tavares, M. N. Yukuyama, A. Souza, E.J.Barbosa, V. C. Avino, E. S. Neto, F.R. Lourenço, R.Löbenberg, N. A. Bou-Chacra // Int. J. Pharm. – 2022. – V. 621. – 121782
63. Pérez-González M.L.L. Nanostructured Oleic Acid/Polysorbate 80 Emulsions with Diminished Toxicity In NL-20 Cell Line: Insights of Potential Drug Carriers / M. L. L. Pérez-González, C. H. González, G. Pérez-Hernández, H. I.Beltrán // Colloids Surf., B. – 2020. – V. 187. – 110758.
64. Cheng, L.C. Thermally and pH-Responsive Gelation of Nanoemulsions Stabilized by Weak Acid Surfactants / L.C. Cheng, H.S. Meysam, Zarket, B.S. Muthukrishnan, P.S. Doyle // J. Colloid Interface Sci. – 2019. – V. 563. – P. 229-240.

65. Choi K. Lipid crystallization represents a fundamental issue for the performance of lipid nanoparticles. / K. Choi, N. P. Aditya, S. Ko. // *Food Chem.* – 2014. – V. 147. – P. 239-244.
66. Ostwald W. Die Wissenschaftlichen grundlegen der analytischen Chemie / W. Ostwald – *Analytisch Chem. Leipzig*, 1901. – 221 p.
67. Lifshitz I.M. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions / I.M.Lifshitz, V.V. Slyozov // *J. Phys. Chem. Solids.* – 1961. – V. 19(1). – P. 35-50.
68. Taylor P. Ostwald ripening in emulsions / P.Taylor // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1998. – V. 75(2). – P. 107-163.
69. Kabal'nov A.S. Ostwald ripening in two-component disperse phase systems: Application to emulsion stability / A.S. Kabal'nov, A.V. Pertzov, E.D. Shchukin // *Colloids Surf., A.* – 1987. – V. – 24(1). – P. 19-32.
70. Королева М.Ю. Оствальдово созревание в макро- и наноэмульсиях / М.Ю. Королева, Е.В. Юртов // *Успехи химии.* – 2021. – Т. 90(3). – С. 293–323.
71. Wooster T.J. Sanguansri P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability // T.J.Wooster, M. Golding // *Langmuir.* – 2008. – V. 24. – P. 12758-12765.
72. Taylor P. Ostwald ripening in emulsions / Taylor P. // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1998. – V. 75. – P. 107-163.
73. Westesen K. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles / K. Westesen, B. Siekmann // *Int. J. Pharm.* – 1997. – V. 151(1). – P. 35-45.
74. Freitas C. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN™) and crystallinity of the lipid phase / C. Freitas, R.H. Müller // *Eur. J. of pharm. and biopharm.* – 1999. – V. 47(2). – P. 125-132.
75. Yoshino H. Influence of the fatty acid composition on the properties and polymorphic transition of fatty suppository bases / H. Yoshino, M. Kobayashi, M. Samejima // *Chem. Pharm. Bull.* – 1983. – V. 31(1). – P. 237–246.

76. Yoshino H. Influence of the fatty acid composition on the properties and polymorphic transition of fatty suppository bases / H. Yoshino, M. Kobayashi, M. Samejima // Awad T.S. Effect of cooling and heating rates on polymorphic transformations and gelation of tripalmitin solid lipid nanoparticle (SLN) suspensions / T.S. Awad, T. Helgason, K. Kristbergsson, E.A. Decker, J. Weiss, D.J. McClements // *Food Biophys.* – 2008. – V. 3(2). – P. 155-162.
77. Freitas C. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability n solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions / C. Freitas, R.H. Müller // *Int. J. Pharm.* – 1998. – V. 168(2). – P. 221-229.
78. Helgason T. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN) / T. Helgason, T.S. Awad, K. Kristbergsson, D.J. McClements, J. Weiss // *J. Colloid Interface Sci.* – 2009. – V. 334(1). – P. 75-81.
79. Helgason T. David Julian McClements, and Jochen Weiss. Impact of Surfactant Properties on Oxidative Stability of β -Carotene Encapsulated within Solid Lipid Nanoparticles /. T. Helgason, S. Awad, K. Kristbergsson, E.A. Decker // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – V. 57. – P. 8033–8040.
80. Salminen H. Formation of solid shell nanoparticles with liquid ω -3 fatty acid core / H. Salminen, T.Helgason, B.Kristinsson, K. Kristbergsson, J. Weiss. // *Food Chem.* – 2013. – V. 141(3). – P. 2934-2943.
81. McClements D.J. Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components / D.J. McClements, E.A. Decker, J. Weiss // *J. Food Sci.* – 2007. – V. 72(8). – P. 109-124.
82. Bunjes H. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles / H. Bunjes, M.H. Koch, K. Westesen // *J. Pharm. Sci.* – 2003. – V. 92. – P. 1509-20.
83. Jiang S. Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin / S.Jiang, S.He, Y.Li, D. Feng, X. Lu, Y. Du, H. Yu, F. Hu, H. Yuan // *Int. J. Nanomedicine.* – 2013. – V. 8. – P. 3141–3150.

84. Ghosh V. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage / V. Ghosh, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran // *Colloids Surf., B.* – 2014. – V. 114. – P. 392–397.
85. Abd-Elsalam K.A. Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and phytotoxicity on cottonseeds / K.A. Abd-Elsalam, A.R. Khokhlov // *Appl. Nanoscience.* – 2015. – V. 5. – P. 255–265.
86. Vyas T.K. Improved oral bioavailability and brain transport of saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations / T.K. Vyas, A. Shahiwala, M.M. Amiji //, *Int. J. Pharm.* – 2008. – V. 347. – P. 93–101.
87. Ozturk B. Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural biopolymers: whey protein isolate and gum Arabic / B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, D.J. McClements // *Food Chem.* – 2015. – V.188. – P. 256–263.
88. Ali M.S. Preparation, characterization and stability study of dutasteride loaded nanoemulsion for treatment of benign prostatic hypertrophy / M.S. Ali, M.S. Alam, N. Alam, M.R. // *Iran. J. Pharm. Res.* – 2014. – V. 13. – P. 1125–1140.
89. Belhaj N. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin / N. Belhaj, E. Arab-Tehrany, M. Linder// *Process Biochem.* – 2010. – V.45 – P. 187–195.
90. McClements D.J. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics / D.J. McClements, H. Xiao // *Food Funct.* – 2012. – V. 3. – P. 202–220.
91. Harish V. Unravelling the role of solid lipid nanoparticles in drug delivery: Journey from laboratory to clinical trial / V. Harish, S. Mohd, D. Tewari, N.K. Pandey, S. Vishwas, M.R. Babu, M. A. Salkini, Z.R.T. Alotaibi, R.F. Alotaibi, F. A. Alrashed, P. Prasher, N. Sharma, G.A. Pinto, K. R. Paudel, N. Mittal, T. G. Singh, P.Arora, K. Dua, S. K. Singh // *J. Drug Delivery Sci. Technol.* – 2023. – V. – 27. – P. 104616.

92. Gutierrez J.M. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation / J.M. Gutierrez, C. Gonzalez, A. Maestro, I. Sole, C.M. Pey, J. Nolla // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2008. – V. 13. – P. 245-251.
93. Assefi M. A state-of-the-art review on solid lipid nanoparticles as a nanovaccines delivery system / M. Assefi , M. Ataeinaeini , A. Nazari, A. Gholipour, J. J. Vertiz-Osores, K.M. Calla-Vásquez, B.Z.T. Al-Naqeeb, K.H. Jassim, H.G. Kalajahi , S. Yasamineh, M. Dadas // *J. Drug Delivery Sci. Technol.* – 2023. – 104623.
94. Myc A. Development of immune response that protects mice from viral pneumonitis after a single intranasal immunization with influenza A virus and nanoemulsion / A. Myc, J.F. Kukowska-Latallo, A.U. Bielinska, P.Cao, P.P. Myc, K.Janczak, T.R.Sturm, M.S.Grabinski, J.J.Landers, K.S.Young, J.Chang, T.Hamouda, M.A.Olszewski, J.R. Baker // *Vaccine.* – 2003. – V. 21. – P. 3801-3814.
95. Pandey R. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy / R. Pandey, S. Sharma, G.K. Khuller // *Tuberculosis.* – 2005. – V. 85(5-6). – P. 415-420.
96. Alukda D. Formulation of tenofovir-loaded functionalized solid lipid nanoparticles intended for HIV prevention / D. Alukda, T. Sturgis, B.C. Youan. // *J. Pharm. Sci.* – 2011. – V. 100(8). – P. 3345-3356.
97. Abbas S. Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch / S. Abbas, M. Bashari, W.Akhtar, W.W. Li, X. Zhang // *Ultrason. Sonochem.* – 2014. – V. 21. – P. 1265–1274.
98. Baig M. S. Application of Box–Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Optimization, in vitro release, ocular tolerance, and antibacterial activity / M. S. Baig, A. Ahad, M. Aslam, S. S. Imam, M. Aqil, A. Ali. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – V. 85. – P. 258-270.

99. Shen J. Thiolated nanostructured lipid carriers as a potential ocular drug delivery system for cyclosporine A: Improving in vivo ocular distribution / J.Shen, Y. Deng, X.Jin, Q.Ping, Z.Su, L. Li // *Int. J. Pharm.* – 2010. – V. 402. – P. 248–253.
100. Dong Z. RGD modified and PEGylated lipid nanoparticles loaded with puerarin: Formulation, characterization and protective effects on acute myocardial ischemia model / Z. Dong, J. Guo, X. Xing, X. Zhang, Y. Du, Q.Lu. // *Biomed. Pharmacotherapy.* – 2017. – V. 89. – P.297-304.
101. Prete A.C.L. In Vitro Simultaneous Transfer of Lipids to HDL in Coronary Artery Disease and in Statin Treatment / A.C.L. Prete, C.H. Dina, C.H.Azevedo, C.G.Puk, N.H.M.Lopes, W.A.Hueb, R.C. Maranhao // *Lipids.* – 2009. – V. 44. – P. 917–924.
102. Ye J. Injectable actarit-loaded solid lipid nanoparticles as passive targeting therapeutic agents for rheumatoid arthritis / J. Ye, Q. Wang, X. Zhou, N. Zhang. // *Int. J. Pharm.* – 2008. – V. 352(1-2). – P. 273-279.
103. Maali A. Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade / A. Maali, M.T.H. Mosavian // *J. Dispersion Sci. Technol.* – 2013. – V. 34. – P. 92–105.
104. Primo F.L. Magnetic nanoemulsions as drug delivery systems for Forsan®: skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer / F.L. Primo, L. Michieletto, M. Rodrigues, P. Macaroff, P.C. Morais, Z.G.M. Lacava, M.V. Bentley // *J. Magn. Mater.* – 2007. – V. 311. – P. 354-357.
105. Mussi S.V. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles / S.V. Mussi, R. C. Silva, M.C. Oliveira, C.M. Lucci, R.B. Azevedo, L.A. Miranda Ferreira // *European J. Pharm. Sci.* – 2013. – V. 48(1-2). – P. 282-290.
106. Zheng G. Improving breast cancer therapy using doxorubicin loaded solid lipid nanoparticles: Synthesis of a novel arginine-glycine-aspartic tripeptide conjugated, pH sensitive lipid and evaluation of the nanomedicine in vitro and in

- vivo / G. Zheng, M. Zheng, B. Yang, H. Fu, Y. Li. // *Biomed. Pharmacotherapy*. – 2019. – V. 116. – 109006.
107. Oliveira M.S. Ferreira. α -Tocopherol succinate improves encapsulation and anticancer activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles / M.S. Oliveira, S.V. Mussi, D.A. Gomes, M.I. Yoshida, F.V. M. Frezard, L.A.M. Carregal, // *Colloids Surf., B*. – 2016. – V. 140. – P. 246-253.
108. Melo K.M. Andiroba oil and nanoemulsion (*Carapa guianensis* Aublet) reduce lesion severity caused by the antineoplastic agent doxorubicin in mice / K.M. Melo, L. F.S. Oliveira, R.M. Rocha, M.A.P. Ferreira, M.L. Fascineli, S.S. R. Milhomem-Paixão, C.K. Grisolia, A. S. Santos, H. L.C. Salgado. // *Biomed. Pharmacotherapy*. – 2021. – V. 138. – P. 111505.
109. Rahat I. Sharma. Thymoquinone loaded chitosan - Solid lipid nanoparticles: Formulation optimization to oral bioavailability study / I. Rahat, M. Rizwanullah, S.J. Gilani, M.N. Bin-Jumah, S.S. Imam, C. Kala, M. Asif, S. Alshehri, S.K. Sharma. // *J. Drug Delivery Sci. Technol.* – 2021. – V. 64. – 102565.
110. Ramachandran S. A novel therapeutic application of solid lipid nanoparticles encapsulated thymoquinone (TQ-SLNs) on 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease-like symptoms in wistar rats / S. Ramachandran, S. Thangarajan // *Chem. Biol. Interact.* – 2006. – V. – 256. – P. 25–36.
111. Md S. Protective effect of statistically designed and optimized Icaritin nanoemulsion on doxorubicin-induced cardiotoxicity: Inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis / S. Md, H.A.R. Mahrous, N. A. Alhakamy, R.A. Shaik, B.G. Eid. // *J. Drug Delivery Sci. Technol.* – 2023. – V. 81. – 104297.
112. Masoud J. Aqueous Solubility and Degradation Kinetics of the Phytochemical Anticancer Thymoquinone; Probing the Effects of Solvents, pH and Light / J. Masoud, M. Salmani, S. Asghar, H. Lv, J. Zhou // *Molecules*. – 2014. – V. 19(5). – P. 5925–5939.
113. Esther S. Study of nanoemulsions using carvacrol/MCT-(Oleic acid-potassium oleate)/ Tween 80®- water system by low energy method / S. Esther, M. Alicia, V. Susana, G. Carme. // *Heliyon*. – 2023. – V. 9. – e16967.

114. Solè, I. Optimization of Nano-emulsion Preparation by Low-Energy Methods in an Ionic Surfactant System / I. Solè, A. Maestro, C. González, C. Solans, J. M. Gutiérrez // *Langmuir*. – 2006. – V. 22. – P. 8326–8332.
115. Toragall V. Lutein encapsulated oleic - linoleic acid nanoemulsion boosts oral bioavailability of the eye protective carotenoid lutein in rat model / V. Toragall, P. Srirangam, N. Jayapala, V. Baskaran. // *Mat. Today Com.* – 2021. – V. 28. – 102522.
116. Salimi A. Preparation and evaluation of celecoxib nanoemulsion for ocular drug delivery / A. Salimi. // *Asian J. Pharm.* – 2017. – V. 11. – P. 543-550.
117. Sravanthi V. Oleic acid nanoemulsion for nasal vaccination: Impact on adjuvanticity based immune response / V. Sravanthi, M. C. Preethi, S. R. Bonam, S. Sathyabama, H. M. Sampath. // *J. Drug Delivery Sci. Technol.* – 2015. – V. 28. – P. 56-63.
118. Venkateshwarlu I. Development and in vitro cytotoxic evaluation of parenteral docetaxel lipid nanoemulsions for application in cancer treatment / I. Venkateshwarlu, K. Prabhakar, M. Ali, V. Kishan // *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* – 2010. – V. 64. – P. 233-241.
119. Dhawan B. Enhanced transdermal permeability of piroxicam through novel nanoemulgel formulation / B. Dhawan, G. Aggarwal, S. Harikumar. // *Int. J. Pharm. Investig.* – 2014. – V. 4(2). – P. 65-76.
120. Kelidari H. R. Formulation optimization and in vitro skin penetration of spironolactone loaded solid lipid nanoparticles / H.R. Kelidari, M. Saeedi, J. Akbari, K. Morteza-Semnani, P. Gill, H. Valizadeh, A. Nokhodchi *Colloids Surf., B.* – 2015. – V. 128. – P. 473–479.
121. Silva A. H. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles / A. H. Silva, F.B. FiliPin-Monteiro, B. Mattei, B.G. Zanetti-Ramos, T.B. Creczynski-Pasa // *Sci. Total Environ.* – 2012. – V. 432. – P. 382–388.
122. Wang S. Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies / S. Wang, T. Chen, R. Chen, Y. Hu, M. Chen, Y. Wang // *Int. J. Pharm.* – 2012. – V. 430. – P. 238-246.

123. Miglietta A. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel / A. Miglietta, R. Cavalli, C. Bocca, L. Gabriel, M. Gasco // *Int. J. Pharm.* – 2000. – V. 210. – P. 61-67.
124. Mackenzie G. G. 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 / G.G. Mackenzie, Y. Sun, L. Huang, G. Xie, N. Ouyang, R.C. Gupta, F. Johnson, D. Komninou, L. Kopelovich, B. Rigas // *Pharm. Res.* – 2012. – V. 29. – P. 3090-3101.
125. 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(1). – P. 59-69.
126. Ma L. Co-delivery of paclitaxel and tanespimycin in lipid nanoparticles enhanced anti-gastric-tumor effect in vitro and in vivo / L. Ma, D. Yang, Z. Li, X. Zhang, L. Pu. // *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* – 2018. – V. 46(2). – P. 904-911.
127. Hashem F.M. In vitro cytotoxicity and bioavailability of solid lipid nanoparticles containing tamoxifen citrate / F.M. Hashem, M. Nasr, A. Khairy. // *Pharm. Dev. Technol.* – 2014. – V. 19(7). – P. 824–832.
128. Rigon R. Skin Delivery and in Vitro Biological Evaluation of Trans-Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Skin Disorder Therapies / R. Rigon, N. Fachinetti, P. Severino, M. Santana, M. Chorilli // *Molecules.* – 2016. – V. 22. – E116.
129. Sharma P. Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil. International / P. Sharma, S. Ganta, W.A. Denny, S. Garg. // *J. Pharm.* – 2009. – V. 367. – P. 187–194.
130. Baek J.S. Solid lipid nanoparticles of paclitaxel strengthened by hydroxypropyl- β -cyclodextrin as an oral delivery system / J.S. Baek, J.W. So, S.C. Shin, C.W. Cho. // *Int. J. Mol. Med.* – 2012. – V. 30. – P. 953-959.

131. Pandey R. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis / R. Pandey, G. K. Khuller // *Tuberculosis*. –2005. – V. 85(4). – P. 227-234.
132. Garg A. Title: In-situ single pass intestinal permeability and pharmacokinetic study of developed Lumefantrine loaded solid lipid nanoparticles / A.Garg, K. Bhalala, D.S. Tomar., M. Wahajuddin // *Int. J. Pharm.* – 2016. – V. 516. – P. 120-130.
133. Jenning V. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN®) / V. Jenning, S. Gohla. // *Int. J. Pharm.* – 2000. – V. 196. – P.219-222.
134. Pandey R. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis / R. Pandey, G. K. Khuller // *Tuberculosis*. –2005. – V. 85(4). – P. 227-234.
135. Salaha E. Solid lipid nanoparticles for enhanced oral absorption: A review / E.Salaha, M.M. Abouelfetouh, Y. Pan, D. Chen, S. Xie. // *Colloids Surf., B*. – 2020. – V. 196. – 111305.
136. Hanafy A. Pharmacokinetic evaluation of oral fenofibrate nanosuspensions and SLN in comparison to conventional suspensions of micronized drug / A.Hanafy, H.Spahnlangguth, G.Vergnault, P.Grenier, M.Tubicgrozdanis, T.Lenhard // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2007. – V. 59(6). – P. 419-426.
137. Pouton C.W. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies / C.W. Pouton, C.J.H. Porter. // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2008. – V. 60(6). – P. 625-637.
138. Hashem F.M. In vitro cytotoxicity and bioavailability of solid lipid nanoparticles containing tamoxifen citrate / F.M. Hashem, M. Nasr, A. Khairy. // *Pharm. Dev. Technol.* – 2014. – V. 19(7). – P. 824–832.
139. Ma L. Co-delivery of paclitaxel and tanespimycin in lipid nanoparticles enhanced anti-gastric-tumor effect in vitro and in vivo / L. Ma, D.Yang, Z.Li, X. Zhang, L.Pu // *Artif. Cells, Nanomedicine, and Biotechnol.* – 2018. – V. 46(2). – P. 904-911.

140. Niu Z. Rational design of polyarginine nanocapsules intended to help peptides overcoming intestinal barriers / Z. Niu, E. Tedesco, F. Benetti, A. Mabondzo, I.M. Montagner, I. Marigo, D. Gonzalez-Touceda, S. Tovar, C. Diéguez, M.J. Santander-Ortega, M.J. Alonso // *J. Controlled Release*. – 2017. – V. 263. – P. 4-17.
141. Dhawan B. Enhanced transdermal permeability of piroxicam through novel nanoemulgel formulation / B. Dhawan, G. Aggarwal, S. Harikumar // *J. Pharm. Invest.* – 2014. – V. 4(2). – P. 65-76.
142. Wissing S.A. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study / S.A. Wissing, R. H. Müller // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2003. – V. 56(1). – P. 67-72.
143. Задымова Н.М. Коллоидно–химические аспекты трансдермальной доставки лекарств / Н.М. Задымова // *Коллоидный журнал*. – 2013. – Т. 75. – С. 543-556.
144. Elmowafy M. Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation / M. Elmowafy // *Colloids Surf., B*. – 2021. – V. 230. – 111748.
145. Kim J.H. Preparation of a Capsaicin-Loaded Nanoemulsion for Improving Skin Penetration / J.H. Kim, J.A.Ko, J.T.Kim, D.Su. Cha, J.H. Cho, H.J. Park, G.H. Shin // *J. Agric. Food. Chem.* –2014. – V. 62. – P. 725–732.
146. Задымова Н.М. Ингибирование оствальдова созревания в миниэмульсиях гептан/вода / Н.М. Задымова, Г.А. Аршакян // *Коллоидный журнал*. – 2014. – Т. 76. – С. 28-41.
147. Aqil M. Development of clove oil based nanoemulsion of olmesartan for transdermal delivery: Box–Behnken design optimization and pharmacokinetic evaluation / M. Aqil, M. Kamran, A. Ahad, S.S. Imam // *J. Mol. Liq.* – 2016. – V. 214. – P. 238-248.
148. Castro G.A. Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne / G.A. Castro, L.A. Ferreira // *Expert Opin. Drug Delivery*. – 2008. – V. 5(6). – P. 665-679.

149. 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(1). – P. 59-69.
150. Li J. Preparation and evaluation of charged solid lipid nanoparticles of / J. Li, X. Guo, Z. Liu, C.I. Okeke, N. Li, H. Zhao, M.O. Aggrey, W. Pan, T.Wu. // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 2014. – V. 40(7). – P. 980-987.
151. Hao J. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design / J. Hao, X. Fang, Y. Zhou, J. Wang, F. Guo, F. Li, X.Peng. // *Int. J. Nanomedicine.* – 2011. – V. 6. – P. 683–692.
152. Komaiko J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size / J. Komaiko, D.J. McClements // *J. Food Engineer.* – 2015. – V. 146. – P. 122-128.
153. Rao J. Formation of Flavor Oil Microemulsions, Nanoemulsions and Emulsions: Influence of Composition and Preparation Method / Rao J., McClements D.J. // *J. Agric. Food. Chem.* – 2011. – V. 59. – P. 5026–5035.
154. Patel M.R. Characterization of ergocalciferol loaded solid lipid nanoparticles / M.R. Patel, M.F. San Martin-Gonzalez. // *J. Food Sci.* –2012. – V. 71. – P. 8-13.
155. Eltayeb M. Preparation of solid lipid nanoparticles containing active compound by electrohydrodynamic spraying / M. Eltayeb, P.K. Bakhshi, E. Stride, M. Edirisinghe. // *Food Res. Int.* – 2013. – V. 53. – P. 88-95.
156. Quintão F.J.O. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications / F.J.O. Quintão, R.S.N. Tavares, S.A. Vieira-Filho, G.H.B. Souza, O.D.H. Santos // *Revista Brasileira de Farmacognosia.* – 2013. – V. 23. – P. 101-107.
157. Ngan C.L. Comparison of Box-Behnken and central composite designs in optimization of fullerene loaded palm-based nano-emulsions for cosmeceutical application / C.L. Ngan, M. Basri, F.F. Lye, H. Reza, F. Masoumi, M. Tripathy, R.A. Karjiban, E. Abdul-Malek // *Indust. Crops Prod.* – 2014. – V. 59. – P. 309-317.

158. Souto E.B. A novel approach based on lipid nanoparticles (SLN) for topical delivery of alpha-lipoic acid / E.B. Souto, R.H. Muller, S. Gohla, // *J. Microencapsul.* – 2005. – V. 22. – P. 581–592.
159. Uner M. Skin moisturizing effect and skin penetration of ascorbyl palmitate entrapped in solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) incorporated into hydrogel / M. Uner, S.A. Wissing, G.Yener, R.H. Muller // *Pharmazie.* – 2005. – V. 60. – P. 751–755.
160. Nikolić S. Lipid nanoparticles: nanocarriers for more effective and safer photoprotective product / S. Nikolić, S. Gohla, R.H Müller // *Expert Rev/ Dermatology.* – 2014. – V. 6(5). – P. 501-507.
161. Fincheira P. Plant growth induction by volatile organic compound released from solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers / P. Fincheira , A. Quiroz , C. Medina , G. Tortella, E. Hermosilla, M.C. Diez, O. Rubilar // *Colloids Surf., A.* – 2020. – V. 596. – 124739.
162. Zeng L. Formulation and evaluation of norcanthridin nanoemulsions against the *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) / L. Zeng, Y. Liu, J.Pan, X. Liu. // *BMC Biotechnology.* – 2019. – V. 19(16). – P. 1-11.
163. Наговицина Т.Ю. Прямые наноэмульсии, стабилизированные неионогенными ПАВ, для инкапсулирования лекарственных веществ: Дис. ... канд. хим. наук: 02.00.11 / Наговицина Татьяна Юрьевна. – М., 2015. – 132 с.
164. Koroleva M. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms / M. Koroleva, T. Nagovitsinaa, E. Yurtov // *РССР.* – 2018. – V. 20(15). – P. 10369-10377.
165. Наговицына Т.Ю. Получение прямых наноэмульсий, стабилизированных смесью неионогенных ПАВ / Т.Ю. Наговицына, Е.Ю. Фадеева, М.Ю. Королёва // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2013. – Т. – 27(6). – С. 110-113.

166. Lifshitz I.M. The Kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions / I.M. Lifshitz, V.V. Slyozov // *J. Phys. Chem. Solids.* –1961. –V. 19. – P. 35-50.
167. Deminie`re B. Modern aspects of emulsion science / B. Deminie`re, A. Colin // Cambridge: The R. Soc. Chem. – 1998. – V. 8. – P. 261–291.
168. Cheng Q.E. Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles / Q.E. Cheng, A.D. Hang, X. David, J. McClements // *Food Res. Int.* – 2013. – V. 52(1). – P. 342-349.
169. Bertelli I. Study of thermal behavior and molecular composition of mixtures of resinous materials and beeswax found as adhesives in archaeological finds / I. Bertelli, M. Mattonai, J. Nasa, E. Ribechini // *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* – 2023. – V. 171. – 105936.
170. Joshi M.D. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives / M.D. Joshi, R.H. Muller // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2009. – V. 71. – P. 161-172.
171. Tewey K.M. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II / K.M. Tewey, T.C. Rowe, L. Yang, B.D. Halligan, L.F. Liu // *Sci.* – 1984. – V. 226(4673). – P. 466–468.
172. Cutts S.M. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts / S.M. Cutts, A. Nudelman, A. Rephaeli, D.R. Phillips // *IUBMB Life.* – 2005. – V. 57(2). – P. 73–81.
173. Tian Y. Titration Microcalorimetry Study: Interaction of Drug and Ionic Microgel System / Y. Tian, K.C. Tam, T.A. Hatton, L. Bromberg // *Chemistry.* – 2004. – P. 1-5.
174. Akter H. Biometabolites of *Tamarindus indica* play a remarkable cardioprotective role as a functional food in doxorubicin-induced cardiotoxicity models / H. Akter, Md.M. Rashid, Md. S. Islam, Md.A. Hossen, Md.A. Rahman, R.M. Algheshairy, M.S. Almujoydil, H.F. Alharbi, A.M. Alnajeebi. // *J. Funct. Foods.* – 2022. – V. 96. – 105212

175. Parisi C. Doxorubicin–NO Releaser Molecular Hybrid Activatable by Green Light to Overcome Resistance in Breast Cancer Cells / C. Parisi, F. Moret, A. Fraix, L. Menilli, L. Menilli, M. Failla, F. Sodano, C. Contre. F. Quaglia, E. Reddi, S. Sortino // *ACS Omega*. – 2022. – V. 7(9). – P. 7452–7459.
176. Hansch C. Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and steric constants / C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman. – Washington, DC : American Chemical Society, 1995. – 1190 p.
177. Motaghd M. Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF-7 / M. Motaghd, F.M. Al-Hassan, S.S. Hamid. // *Pharm. Res.* – 2012. – V. 5(3). – P. 200-206.
178. Ahmad A. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb / A. Ahmad, A. Husain, M. Mujeeb, S. A. Khan, A.K. Najmi, N.A. Siddique, Z.A. Damanhour, F. Anwar // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* – 2013. – V. 3(5). – P. 337–352.
179. Costa E.C. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis / E.C. Costa, A.F. Moreira, D.M. Diogo, V.M. Gaspar, M.P. Carvalho, I.J. Correia // *Biotechnol. Adv.* 2016. – V. 34(8). – P. 1427-1441.
180. Pavoni L. An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: formulation, preparation and stability / L. Pavoni, D.R. Perinelli, G. Bonacucina, M. Cespi, G.F. Palmieri // *Nanomaterials*. – 2019. – V. 10. – P. 135.
181. Devínsky F. Cationic amphiphiles: Self-assembling systems for biomedicine and biopharmacy / F. Devínsky, M. Pisárčik, M. Lukáč. – New York: Nova Sci. Publishers, Inc., 2017. – 307 p.
182. Lam H.T. Self-emulsifying drug delivery systems and cationic surfactants: do they potentiate each other in cytotoxicity? / H.T. Lam, Le- B. Vinh, T.N.Q. Phan, A. Bernkop-Schnürch // *J. Pharm. Pharmacol.* 2019. – V. 71(2). – P. 156–166.
183. Al-Lawati H. Nanomedicine for the effective and safe delivery of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review of preclinical research / H. Al-

- Lawati, Z. Binkhathlan, A. Lavasanifar // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2019. – V. 142. – P. 179–94.
184. Ramadan D. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications / D. Ramadan, M.T.C. McCrudden, A.J. Courtenay, R.F. Donnelly // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2021. – V. 12(4) – P. 758-791.
185. Mirgorodskaya A.B. Sinyashin. Carbamate-bearing surfactants: Micellization, solubilization, and biological activity / A.B. Mirgorodskaya, R.A. Kushnazarova, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, O.A. Lenina, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *J. Mol. Liq.* – 2018. – V. 269. – P. 203–210.
186. Kushnazarova R.A. Novel cationic surfactants bearing cleavable carbamate fragment: tunable morphological behavior, solubilization of hydrophobic drugs and cellular uptake study / R.A. Kushnazarova, A.B. Mirgorodskaya, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, A.S. Sapunova, I.R. Nizameev, M.K. Kadirov, L.Ya. Zakharova // *J. Mol. Liq.* – 2020. – V. 318. – 113894.
187. Хвостенко Т.В. Энкаустика: Искусство, пережившее тысячелетия / Т.В. Хвостенко. – Москва: М.: Олимпия Пресс, 2005. – 808 с.
188. Cuni J. Characterization of the binding medium used in Roman encaustic paintings on wall and wood / J. Cuni, P. Cuni, B. Eisen, R. Savizkyc, J.Bove. // *Anal. Meth.* – 2011. – V. 4(3). –P. 659-669.