

**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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Королёва Марина Юрьевна,
РХТУ им. Д.И. Менделеева, профессор кафедры наноматериалов и нанотехнологии

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор РАН
Калинина Мария Александровна,
Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии

доктор химических наук
Шкинёв Валерий Михайлович,
Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории концентрирования

кандидат химических наук
Соболева Оксана Анатольевна,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, доцент на кафедре коллоидной химии

Защита состоится 30 августа 2023 г., в 10 часов на заседании диссертационного совета РХТУ.2.6.03 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева».

(125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9, ауд. 443 Конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте https://muctr.ru/university/departments/ods/inhouse/inhouse_announcements федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева».

Автореферат разослан « ___ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета РХТУ.2.6.03
к.х.н., доцент



Мурадова А.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы

Наноэмульсии (НЭ) и твёрдые липидные наночастицы (ТЛН) интенсивно исследуются в последние десятилетия как перспективные средства доставки лекарственных соединений (ЛС). Достоинством данных систем является их способность инкапсулировать в липидном ядре и доставлять плохо растворимые в воде липофильные биологически-активные вещества. 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.

Размер капель дисперсной фазы НЭ и ТЛН не превышает 100 нм, что способствует проникновению инкапсулированного ЛС через клеточные барьеры. Дисперсность НЭ и ТЛН зависит от состава и способа их получения. Получение липидных наночастиц возможно с помощью высоко- и низкоэнергетических методов. 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. 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*.

В состав липидных наночастиц могут быть включены плохо растворимые в воде соединения, эффективность инкапсулирования которых зависит от агрегатного состояния носителя. Стабильность дисперсий липидных наночастиц увеличивается, однако при этом снижается эффективность включения ЛС в липидные наночастицы в следующем порядке: жидкость < переохлажденный расплав < кристаллический липид. В то же время плотность твердых липидов обычно выше плотности жидких

липидов, что может предотвращать гравитационное разделение. Кроме того, инкапсулирование ЛС в твердые частицы способствует более длительному сохранению активности этих соединений. 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 тимохинном, 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 тимохинном.

5. Влияние инкапсулированного индометацина в НЭ из олеиновой кислоты, стабилизированных смесью Tween 80, Span 80 и катионогенного 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.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса взаимодополняющих современных апробированных методов исследования (метод динамического светорассеяния, просвечивающая электронная микроскопия, оптическая микроскопия, ДСК, микрокалориметрия, 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 медицине: 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 Международных 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 проблемы в области химии и химических технологий» (Апатиты, 2021), на I и III конференциях Школы молодых ученых «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (Москва, 2021, 2023).

Публикации

По материалам исследований, обобщенных автором в диссертации, опубликовано 17 научных работ, в том числе 3 статьи представлены в научных журналах

из списка ВАК РФ и 14 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

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.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 161 странице, содержит 67 рисунков и 21 таблиц, введение, 3 главы, заключение и список используемых источников (188 наименований).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована ее цель и основные задачи, описана научная новизна и практическая значимость работы.

В **первой главе** проводится литературный обзор, в котором даются общие представления о НЭ и ТЛН и методах их получения. Особое внимание уделяется процессам, приводящим к расслаиванию НЭ и дестабилизации суспензий ТЛН. Приводятся сведения о потенциальных областях применения НЭ и ТЛН.

Во **второй главе** приводится описание реактивов, использованных для получения НЭ и ТЛН. Описаны методы исследования полученных систем.

Третья глава посвящена изучению влияния полярности липидного ядра и типа ПАВ на агрегативную и седиментационную устойчивость НЭ и дисперсий ТЛН; изучению термического поведения НЭ и ТЛН ненагруженных и нагруженных ЛС; исследованию цитотоксичности и возможного применения НЭ и ТЛН для доставки ЛС.

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:

- 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).

Свойства наноэмульсий и твердых липидных наночастиц с неполярным и полярным ядром

Для определения влияния полярности липидного ядра на свойства липидных наночастиц были проведены исследования НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла (неполярное ядро) или олеиновой кислоты (полярное ядро), и ТЛН из стеариновой кислоты (полярное ядро) или парафина (неполярное ядро), полученных методом ТИФ. Для стабилизации НЭ и ТЛН использовалась смесь Tween 60 и Span 60 или Tween 80 и Span 80 в мольном соотношении 0,76, с суммарной концентрацией 12,5 об.% для НЭ и 15,0 об.% для ТЛН. При данном содержании ПАВ происходило образование липидных наночастиц минимального размера. Концентрация липидной части составляла 25 об.%. В качестве дисперсионной среды использовался 0,15 М раствор NaCl.

Средний диаметр капель в НЭ с углеводородным маслом 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 олеиновой кислотой составлял 25 ± 1 нм при стабилизации Tween 60 и Span 60 и 40 ± 2 нм в НЭ с Tween 80 и Span 80. При этом НЭ, стабилизированные Tween 60 и Span 60, имели мономодальное распределение капель по размерам, стабилизированные - Tween 80 и Span 80 - бимодальное.

Средний размер ТЛН со стеариновой кислотой, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, составлял 20 ± 2 нм, размер ТЛН из парафина составлял 60 ± 4 нм. Распределение частиц по размерам было мономодальным в обеих системах.

На рисунке 1 в качестве примера приведены микрофотографии НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла, и ТЛН из стеариновой кислоты, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60.

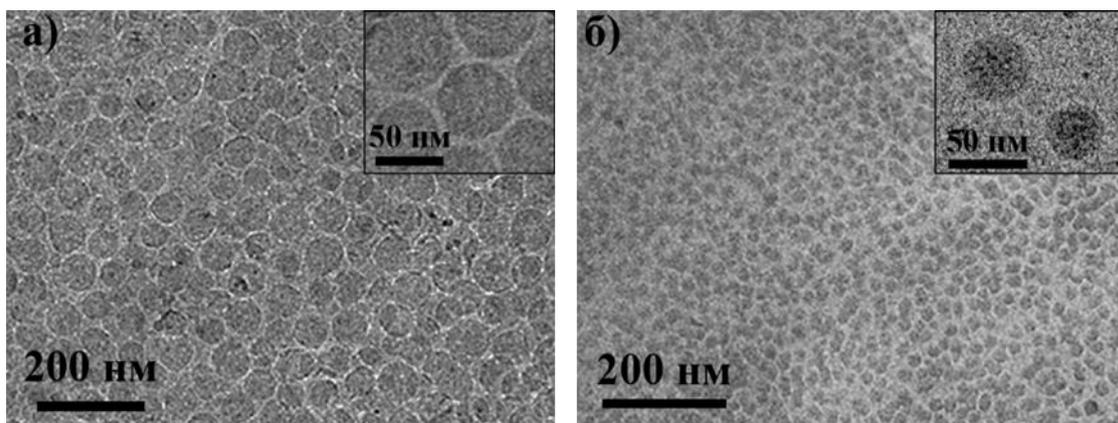


Рисунок 1 - Крио-ПЭМ микрофотографии НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла (а), и ТЛН из стеариновой кислоты (б).

Для определения стабильности НЭ и ТЛН была изучена устойчивость систем к агрегации и седиментации при 25 °С (Рисунок 2). В НЭ с дисперсной фазой, состоящий из олеиновой кислоты или парафинового масла, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, средний диаметр капель дисперсной фазы оставался практически постоянным более 30 сут.

В отличие от НЭ, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, НЭ, стабилизированные Tween 80 и Span 80, были неустойчивыми к агрегации при температуре 25 °С. Было показано, что в начальный период после получения укрупнение капель дисперсной фазы в данных НЭ происходило преимущественно из-за коалесценции. Затем уменьшение дисперсности было обусловлено протеканием, как коалесценции, так и оствальдова созревания.

Размер ТЛН из стеариновой кислоты или парафина, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, также изменялся в пределах погрешности измерений в течение 30 сут, что говорит о их высокой агрегативной устойчивости (Рисунок 2б).

Обратное рассеяние света в НЭ и суспензиях ТЛН, стабилизированных смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, практически не изменялось более 30 сут и оставалось постоянным по высоте столба системы, что также свидетельствует о высокой агрегативной и седиментационной устойчивости полученных НЭ и ТЛН.

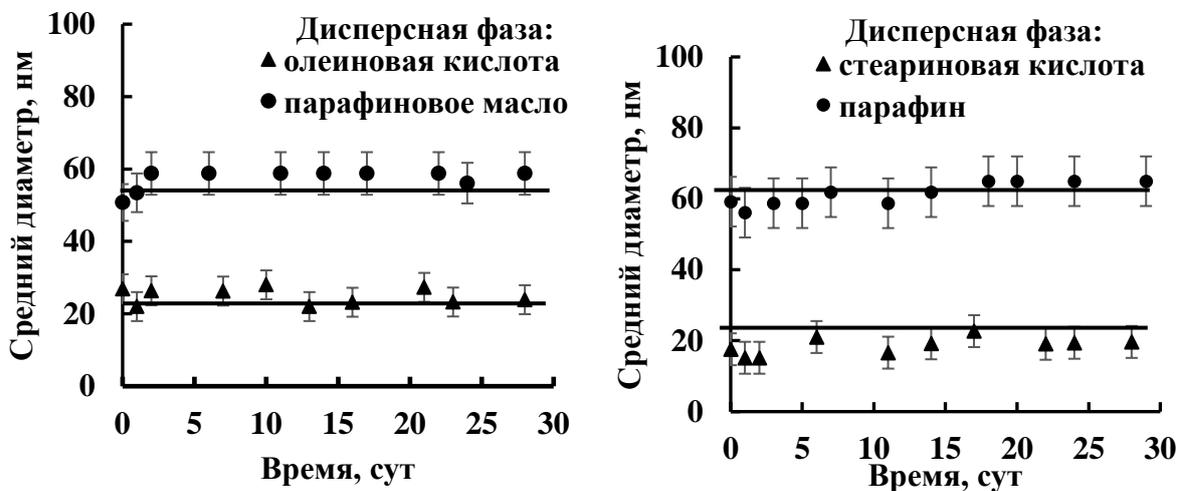


Рисунок 2 - Зависимости среднего диаметра капель в НЭ (а) и ТЛН (б) от времени.

Липидные наночастицы стабилизированы смесью ПАВ Tween 60 и Span 60 с суммарной концентрацией: НЭ - 12,5 , ТЛН - 15 об.% . Температура - 25 °С

Таким образом, исследованные НЭ с полярным ядром из олеиновой кислоты и неполярным из парафинового масла и ТЛН с полярным ядром из стеариновой кислоты и неполярным из парафина, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, характеризовались высокой устойчивостью к агрегации и последующей седиментации.

Для оценки стабильности НЭ и дисперсий ТЛН к агрегации при повышенных температурах было проведено два цикла их нагрева и охлаждения. Средние диаметры капель дисперсной фазы в НЭ с парафиновым маслом или олеиновой кислотой и ТЛН из стеариновой кислоты или парафина, стабилизированные смесью ПАВ Tween 60 и Span 60, изменялись в пределах погрешности измерений в двух циклах нагрева и охлаждения в диапазонах температур: НЭ с парафиновым маслом – 25-60 °С, НЭ с олеиновой кислотой - 25-55 °С, ТЛН из стеариновой кислоты – 25-50 °С, ТЛН из парафина - 25-60 °С. При этом липидные наночастицы с полярным ядром сохраняли устойчивость до меньших температур, при нагревании до более высокой температуры происходила агрегация частиц.

Таким образом полярность вещества, составляющего ядро, влияла как на размер, так и на агрегативную устойчивость НЭ и дисперсий ТЛН. Полярное вещество наиболее вероятно частично встраивалось в адсорбционный слой, что приводило к уменьшению диаметра липидных частиц, однако при этом уменьшалась устойчивость систем. Если ядро дисперсной фазы было неполярным, то формировались липидные частицы большего размера. Агрегативная устойчивость таких дисперсных систем была более высокой.

Фазовые переходы и предполагаемая структура капель в наноэмульсиях и твёрдых липидных наночастиц

При создании систем доставки ЛС, в том числе для понимания механизмов проникновения частиц в клетки, важным параметром является структура липидных 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. Для идентификации пиков на термограммах НЭ и ТЛН были определены температуры плавления отдельных компонентов в объёмном и переохлажденном объёмном состоянии, методом ДСК (Таблица 1). Переохлаждённые объёмные образцы получали в сходных условиях, что и липидные наночастицы: компоненты нагревали до температур, превышающих температуры инверсии фаз в НЭ или ТЛН, и резко охлаждали до 0 °С. Температуры фазовых переходов в НЭ и ТЛН определяли с помощью микрокалориметрического анализа.

На термограммах нагрева НЭ с парафиновым маслом, присутствовал один эндотермический пика при ~37 °С. Так как температура плавления парафинового масла была -15 °С, то этот пик соответствовал плавлению адсорбционного слоя ПАВ на поверхности капель дисперсной фазы в НЭ (Рисунок 4).

Таблица 1 - Температуры плавления компонентов, входящих в состав НЭ и ТЛН

| Вещества | 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 43,3 ± 0,7 |
| Стеариновая кислота | 70,9 ± 1,0 | 52,3 ± 0,8 |
| Парафин | 35,5±0,5 | 35,5±0,5 |
| | 53,1±0,7 | 53,1±0,7 |

*Температуры плавления взяты из паспортов безопасности реактивов

На кривых охлаждения экзотермический пик смещался в область более низких температур: ~23 °С. Эти пики соответствовали плавлению и затвердеванию оболочки ПАВ на поверхности капель. 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. Подъем на кривой третьего нагрева при температуре ~80 °С соответствовал началу инверсии фаз в НЭ.

На кривой первого нагрева НЭ с дисперсной фазой, состоящей из олеиновой кислоты, 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.

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. Так же на кривой имелся второй четко выраженный пик при температуре ~30 °С. Пики при втором охлаждении оставались той же формы, что и при первом нагреве, их положения изменялись в пределах погрешности измерений.

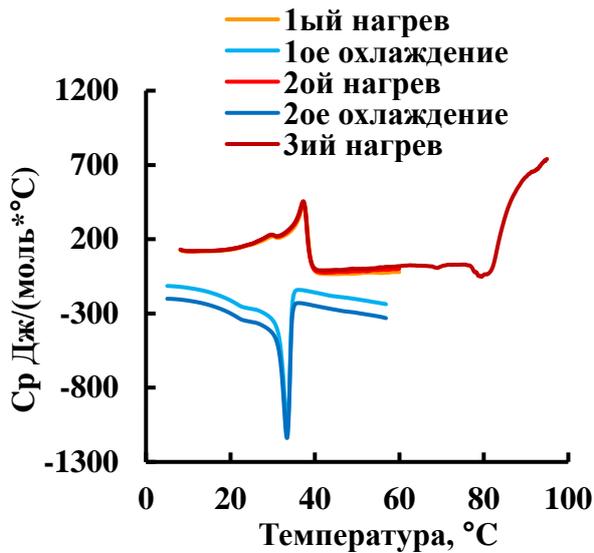


Рисунок 4 - Термограммы, полученные в двух циклах нагревания и охлаждения НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла в диапазоне 5-60°C. Третий цикл нагрева проводился в диапазоне 5-95 °С. Скорость нагрева и охлаждения - 1 °С/мин.

втором нагревании пики стали более размытыми.

Кривая первого нагрева ТЛН из стеариновой кислоты характеризовалась одним четким эндотермическим пиком при ~43 °С (рисунок 5). На этой кривой также присутствовал слабо выраженный перегиб 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 ~50,5 °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

Изменение формы пиков в первом и втором циклах нагрева-охлаждения НЭ с олеиновой кислотой может быть связано с тем, что при получении НЭ, при резком охлаждении происходило образование твёрдого адсорбционного слоя ПАВ Tween 60 и Span 60. При этом олеиновая кислота, обладающая поверхностно-активными свойствами, не успевала встроиться в адсорбционный слой и переходила в твёрдообразное состояние в ядре капле. При первом нагреве достигалась температура выше температуры плавления поверхностного слоя ПАВ, а последующее охлаждение протекало достаточно медленно (1°С/мин), и полярная олеиновая кислота частично встраивалась в адсорбционный слой. Поэтому при

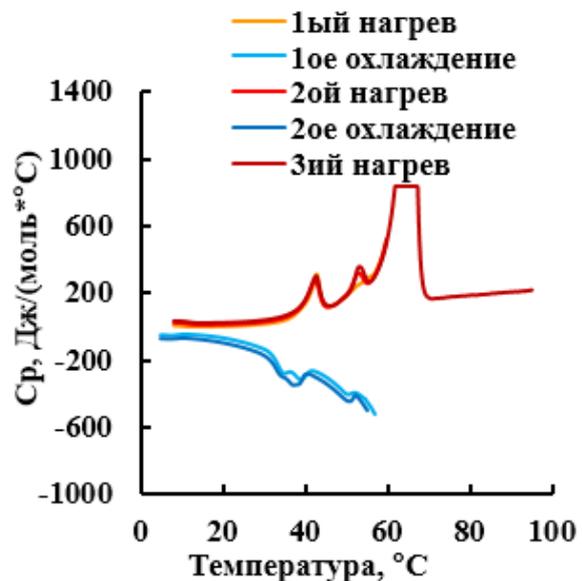


Рисунок 5 - Термограммы, полученные в двух циклах нагревания и охлаждения ТЛН из стеариновой кислоты в диапазоне 5-50°C. Третий цикл нагрева проводился в диапазоне 5-95 °С. Скорость нагрева и охлаждения - 1 °С/мин.

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 сразу же после получения липидных наночастиц стеариновая кислота находилась в ядре в состоянии переохлажденного расплава. Это явление типично для липидных дисперсий: медленное охлаждение способствует образованию стабильных кристаллических структур, в то время как высокие скорости охлаждения приводят к образованию менее стабильных кристаллических структур.

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 циклов нагревания появлялся из-за плавления ядра из стеариновой кислоты. Температура этого фазового перехода практически совпадает с температурой плавления переохлажденной объемной стеариновой кислоты, равной ~52 °С (Таблица 1). Таким образом, пики при более низких температурах связаны с плавлением или кристаллизацией оболочки ПАВ Tween 60 и Span 60, а пики при более высоких температурах наиболее вероятно связаны с плавлением и 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.

На кривых нагрева ТЛН из парафина присутствовало два эндотермических пика: первый при ~35 °С, который соответствовал плавлению низкотемпературной фракции парафина и оболочки из Tween 60 и Span 60, и второй при ~50 °С, соответствующий плавлению фракции парафина с более высокой температурой плавления. Кривые охлаждения характеризовались одним явно выраженным пиком при ~38 °С и одним слабовыраженным при ~34 °С.

Стоит отметить, что у НЭ и ТЛН с неполярным ядром кривые в двух циклах нагрева и охлаждения, практически совпадали, что свидетельствует об их высокой устойчивости, даже при температурах, превышающих температуру плавления ядра и оболочки.

Таким образом, можно сказать, что в случае НЭ, полярность ядра незначительно влияла на структуру капель дисперсной фазы: жидкообразное ядро из парафинового масла или олеиновой кислоты и твёрдообразная оболочка из Tween 60 и Span 60. Наиболее вероятно, что ТЛН из стеариновой кислоты после получения имели следующее строение: ядро, образованное переохлажденным расплавом стеариновой кислоты, и твёрдообразный адсорбционный слой ПАВ с небольшими включениями стеариновой кислоты. ТЛН из парафина состояли из твёрдообразного парафинового ядра и твёрдообразной оболочки из смеси ПАВ Tween 60 и Span 60.

При получении НЭ и ТЛН с полярным ядром, молекулы олеиновой или стеариновой кислот, обладая поверхностно-активными свойствами, частично встраивались в адсорбционный слой ПАВ, что приводило к смещению пиков, соответствующих плавлению данного слоя на поверхности липидных наночастиц. В НЭ с олеиновой кислотой при колебаниях температуры выше температуры плавления оболочки ПАВ это перераспределение скорее всего было существенным, так как пики на термограммах становились размытыми.

Температурные характеристики наноэмульсий и твёрдых липидных наночастиц с инкапсулированными лекарственными соединениями

Для установления 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 с тимохиноном или 36/1 и 6,7/1 с доксорубицином, соответственно) методом ДСК и температуры фазовых переходов в ТЛН и НЭ, нагруженных ЛС тимохиноном или доксорубицином, с помощью микрокалориметрического анализа (Таблица 2).

На термограммах нагрева НЭ с дисперсной фазой из парафинового масла с инкапсулированным тимохиноном присутствовал один эндотермический пик при 41,6 °С (Таблица 3). На кривых охлаждения пик смещался до 37,5 °С. При этом положения пиков находились в области более высоких температур, чем положения 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 находился в адсорбционном слое ПАВ.

Таблица 2 - Температуры плавления компонентов НЭ и ТЛН с тимохиноном

| Вещества в объёмном 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 |

На термограмме плавления ТЛН из стеариновой кислоты с инкапсулированным тимохином 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 тимохином. Второй пик, по-видимому, относится к плавлению переохлаждённого ядра из стеариновой кислоты с растворённым в нём тимохином. При охлаждении пики сдвигались до 26,8 и 39,0 °С.

Таблица 4 – Влияние концентрации ЛС на межфазное натяжение в системе вода / парафиновое масло

| ЛС | Концентрация ЛС, ммоль/м ³ | Межфазное натяжение, мН/м |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Доксорубицин | 0,00 | 31±1 |
| | 0,15 | 18±1 |
| Тимохин | 0,00 | 31±1 |
| | 1,40 | 21±1 |

При нагревании ТЛН со стеариновой кислотой и доксорубицином на термограммах присутствовал один пик при 41,4 °С, который, вероятно, относился к плавлению слоя ПАВ (Таблица 3). Кривая охлаждения характеризовалась 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 частичном встраивании доксорубицина в липидное ядро. Изменение температур плавления слоя ПАВ на термограммах охлаждения ТЛН с доксорубицином, по-видимому, также связано с встраиванием доксорубицина в адсорбционный слой ПАВ. Изучение поверхностно-активных свойств доксорубицина и тимохина показало, что в системе парафиновое масло / вода / ЛС в диапазоне концентраций от 0 до 0,15 и 1,40 ммоль/м³ соответственно, происходило снижение межфазного натяжения (Таблица 4).

Таблица 3 – Температуры фазовых переходов в НЭ и ТЛН с инкапсулированными ЛС

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

Это подтверждает, что данные ЛС обладают поверхностной активностью и могут встраиваться в адсорбционный слой ПАВ на поверхности липидных наночастиц. При этом тимохинон в большей степени, а доксорубин в меньшей степени растворялись в липидном ядре.

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

Скорость проникновения носителей ЛС в клетки зависит размера и строения частиц, поэтому в данной работе были проведены исследования липидных частиц разного размера, но с одинаковым поверхностным слоем, образованным адсорбированными молекулами ПАВ Tween 60 и Span 60. Исследовались НЭ с дисперсной фазой, состоящей из парафинового масла, с размером капель 50 нм и липидные частицы из стеариновой кислоты размером 200 нм. Так как капли НЭ состояли из жидкого ядра и были покрыты твердообразным слоем ПАВ, то их можно рассматривать, как нанокapsулы.

Совместно с 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*. Проникновение и накопление исследовались на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), глиомы головного мозга крысы (C6) и рака толстой кишки человека (HCT-116) через 15 мин и 1 ч после начала инкубирования.

Через 15 мин после начала инкубирования капли НЭ проникали в клетки, накапливались в цитоплазме и внутриклеточных органоидах, предположительно в эндосомах, лизосомах, за исключением ядра. При этом более крупные липидные частицы из стеариновой кислоты за 15 мин лишь адсорбировались на поверхности клеточной мембраны или распределялись во внеклеточном матриксе.

Через 1 ч инкубирования НЭ локализовались внутри клеток и накапливались в ядрах. Липидные частицы из стеариновой кислоты к этому времени проникали в раковые клетки, распределяясь во внутриклеточном матриксе, но отсутствовали в ядрах.

Таким образом, данные результаты демонстрируют размерный эффект, который проявлялся в том, что более мелкие липидные наночастицы быстрее проникали внутрь клеток и накапливались в ядрах. Это является неоспоримым преимуществом данных систем, т.к. доставка ЛС непосредственно в ядра раковых клеток будет приводить к их апоптозу.

Таблица 5 - IC₅₀ при инкубировании клеток с ЛС и НЭ и ТЛН

| Тип наночастиц | Время инкубирования, ч | Тип раковых клеток | IC ₅₀ , мг/л |
|-----------------------|------------------------|--------------------|-------------------------|
| НЭ | 24 | МCF-7 | 760±38 |
| | | HTC-116 | ~1200 |
| | 48 | МCF-7 | 380±19 |
| | | HTC-116 | ~1200 |
| ТЛН | 24 | МCF-7 | 525±21 |
| | | HTC-116 | 655±33 |
| | 48 | МCF-7 | 157±7 |
| | | HTC-116 | 590±37 |
| Доксорубицин | 24 | МCF-7 | 1,30±0,06 |
| | | HTC-116 | 0,60±0,03 |
| | 48 | МCF-7 | 0,17±0,01 |
| | | HTC-116 | 0,14±0,01 |
| НЭ + Доксорубицин | 24 | МCF-7 | 0,52±0,03 |
| | | HTC-116 | 0,39±0,02 |
| | 48 | МCF-7 | 0,16±0,01 |
| | | HTC-116 | 0,10±0,01 |
| НЭ + Тимохинон | 24 | МCF-7 | 7,00±0,50 |
| | | HTC-116 | 7,00±0,50 |
| | 48 | МCF-7 | 6,00±0,50 |
| | | HTC-116 | 5,00±0,40 |
| ТЛН + Доксорубицин | 24 | МCF-7 | 0,35±0,02 |
| | | HTC-116 | 0,34±0,02 |
| | 48 | МCF-7 | 0,14±0,01 |
| | | HTC-116 | 0,08±0,01 |
| ТЛН + Тимохинон | 24 | МCF-7 | 5,00±0,40 |
| | | HTC-116 | 5,00±0,540 |
| | 48 | МCF-7 | 6,00±0,50 |
| | | HTC-116 | 5,00±0,40 |

Оценку цитотоксичности НЭ, размером 50 нм, и ТЛН, размером 30 нм, проводили с использованием МТТ-теста. В присутствии НЭ или ТЛЧ клетки MCF-7 и НТС-116 инкубировали в течение 24 и 48 ч. Октанольное число доксорубицина близко к 1, т.е. он растворяется и в водной, и в липидной фазе, поэтому были определены IC_{50} водных растворов доксорубицина (Таблица 5). Т.к. для МТТ-теста необходимо использовать водные растворы, а тимохинон является липофильным ЛС и нерастворим в воде, то определение его цитотоксичности в индивидуальном виде не представлялось возможным.

Ненагруженные НЭ и ТЛН проявляли низкую цитотоксичность (Таблица 3). Цитотоксичность липидных наночастиц, нагруженных доксорубицином, резко возросла по сравнению с ненагруженными, причём для гибели раковых клеток требовались более низкие концентрации доксорубицина по сравнению с доксорубицином, растворённым в водной среде. Так как доксорубицин является амфифильным ЛС, основываясь на полученных данных о цитотоксичности, температурах фазовых переходов и снижении межфазного натяжения можно сделать вывод, что доксорубицин вероятно встраивается в липидные наночастицы, в том числе в адсорбционный слой ПАВ.

Как уже было отмечено, тимохинон является маслорастворимыми соединением и может быть доставлен в клетки только с помощью липидных носителей. Цитотоксичность НЭ и ТЛН, нагруженных тимохиноном, по сравнению с ненагруженными носителями была значительно более высокой.

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

Исследование свойств и противовоспалительной активности наноэмульсий, содержащих индометацин и модифицированных катионогенными ПАВ

Для создания положительного заряда на поверхности НЭ с олеиновой кислотой, стабилизированных смесью ПАВ Tween 80 и Span 80, и увеличения их устойчивости, были исследованы НЭ, содержащие дополнительно катионогенные ПАВ цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) или n -[2-((бутилкарбамоил)окси)этил]- n , n -диметилгексадекан бромид аммония (УР-16). При включении в состав катионогенного ПАВ ЦТАБ или УР-16 в концентрации 1 мас.% в состав НЭ с дисперсной фазой из олеиновой кислоты, происходило существенное увеличение агрегативной и седиментационной устойчивости НЭ до ~20 сут.

Совместно с Институтом органической и физической химии им. А.Е. Арбузова были исследованы профили высвобождения ЛС индометацина из НЭ с дисперсной

фазой из олеиновой кислоты, стабилизированных Tween 80 и Span 80 с добавлением 1 мас.% ЦТАБ или УР-16, методом диализа. Процесс диффузии из диализного мешка индометацина, инкапсулированного в НЭ, протекал значительно медленнее, чем из водного раствора индометацина. Выход индометацина из обеих НЭ не превышал 30% от его загрузки через 1 сут. В течение этого периода скорость высвобождения индометацина незначительно зависела от типа катионогенного ПАВ в составе НЭ.

Противовоспалительную активность НЭ 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. Наличие в повязке НЭ, содержащих 1 мас.% ЦТАБ или УР-16, приводило к более быстрому снижению скорости развития отека и более быстрому его уменьшению по сравнению с контролем и коммерческой индометациновой мазью. Максимальный противовоспалительный эффект наблюдался при использовании НЭ с добавлением 1 мас.% УР-16.

Таким образом можно сделать вывод, что НЭ и ТЛН могут быть использованы как системы доставки разных типов 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 качестве ЛС могут выступать не только липофильные вещества, например, тимохинон, но и амфифильные, такие как доксорубин и индометацин.

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 остальдово 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 1 ч. 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 распределение 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.

Основное содержание работы изложено в следующих статьях:

В научных статьях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science:

1. Koroleva M. Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability / M. Koroleva, I. Portnaya, E. Mischenko, I. Abutbul–Ionita, L. Kolik–Shmuel, D. Danino // *J. Colloid Interface Sci.* 2022. – V. 610(3). – P. 61–69.
2. Mishchenko, E.V. Nanoemulsions and Nanocapsules with Oleic Acid / E.V. Mishchenko, E.E. Timofeeva, A.S. Artamonov, I.B. Portnaya, M.Y. Koroleva // *Colloid J.* – 2022. – V.84. – P. 67–73.
3. Mirgorodskaya A. B. Microemulsions and nanoemulsions modified with cationic surfactants for improving the solubility and therapeutic efficacy of loaded drug indomethacin / A.B. Mirgorodskaya, M.Yu. Koroleva, R.A. Kushnazarova, E.V. Mishchenko, K.A. Petrov, O.A. Lenina, A.B. Vyshtakalyuk, A.D. Voloshina, L.Ya. Zakharova // *Nanotechnology.* – 2022. – V. 33. – 155103.

...в статьях, в сборниках научных трудов и в тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях:

4. Koroleva M. Nanocapsules for anticancer drug delivery: preparation and *in vitro* evaluation / M. Koroleva, E. Mishchenko, A. Sapach, L. Kurbanova, A. Gileva, E. Markvicheva // *Book of abstracts of 33rd Conf. of the Eur. Colloid and Interface Soc.* – 2019. – P. 159.
5. Мищенко Е.В. Изучение стабильности наноэмульсии, стабилизированных TWEEN 60 И SPAN 60 / Е.В. Мищенко, М.Ю. Королёва, Е.В. Юртов // *Сборник актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ.* – 2020. – Т.191. – С. 83–84.
6. Мищенко Е.В. Положительно и отрицательно заряженные твердые липидные частицы, как носители лекарственных веществ / Е.В. Мищенко, Н.П. Паламарчук, М.Ю. Королёва // *Сборник тезисов II школы–конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы»* – 2020. – С. 33.
7. Mischenko E. Thermal properties of solid lipid nanoparticles / E. Mischenko, I. Portnaya, D. Danino, M. Koroleva // *Сборник тезисов II школы–конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы»* – 2020. – С. 54.
8. Мищенко Е.В. Биосовместимые нано– и микроэмульсии, модифицированные добавками катионного пав, в качестве носителей противовоспалительного препарата индометацин / Е.В. Мищенко, Р.А. Кушназарова, А.Б. Миргородская, М.Ю. Королёва // *Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр.* – 2020. – Т. 8 – С. 92–94.

9. Мищенко Е.В. Изучение стабильности твёрдых липидных наночастиц, образованных стеариновой кислотой / Е.В. Мищенко, М.Ю. Королёва, Е.В. Юртов // Сборник тезисов XI ежегодной конференции Нанотехнологического общества России. – 2020. – С. 47–49.
10. Артамонов А.С. Исследование стабильности наноэмульсий на основе олеиновой кислоты, Tween 80 И Span 80 / А.С. Артамонов, Е.Е. Тимофеева, Е.В. Мищенко, М.Ю. Королёва // Сборник тезисов XI ежегодной конференции Нанотехнологического общества России. – 2021. – С. 62–63.
11. Тимофеева Е.Е. Изучение стабильности наноэмульсий на основе олеиновой кислоты, стабилизированных смесью ПАВ– Tween 60 И Span 60 / Е.Е. Тимофеева, А.С. Артамонов, Е.В. Мищенко, М.Ю. Королёва // Сборник тезисов XI ежегодной конференции Нанотехнологического общества России. – 2021. – С. 86–87.
12. Мищенко Е.В. Исследование свойств твёрдых липидных наночастиц на основе стеариновой кислоты / Е.В. Мищенко, А.М. Гилёва, Л.А. Курбанова, Е.А. Марквичева, М.Ю. Королёва // Тез. докл. Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации. – 2021. – С. 61.
13. Мищенко Е.В. Изучение фазовых переходов в наноэмульсиях и твердых липидных наночастицах методом дифференциальной сканирующей калориметрии / Е.В. Мищенко, М.Ю. Королёва, I. Portnaya, D. Danino // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. – 2021. – Т. 35.– С. 38–40.
14. Мищенко Е.В. Модификация твердых липидных наночастиц коллоидными частицами SiO₂ / Е.В. Мищенко, Н.П. Паламарчук, М.Ю. Королёва, А.И. Inbal, D. Danino // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. – 2021. – Т. 35. – С. 41–43.
15. Мищенко Е. В. Изучение стабильности липидных наноэмульсий на основе олеиновой кислоты / Е. В. Мищенко, Е. Е. Тимофеева, А. С. Артамонов, М. Ю. Королёва // XV Всероссийской научно–технической конференции молодых ученых, специалистов и студентов вузов «Научно–практические проблемы в области химии и химических технологий». – 2021.– Т. 11.– С. 174–176.
16. Мищенко Е.В. Изучение влияния ионогенных пав на размер и ζ–потенциал наночастиц парафина / Е.В. Мищенко, Ю.А. Данилова, Д.А. Буянова, М.Ю. Королёва // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. – 2022. – Т. 36– С. 138–140.
17. Мищенко Е.В. Изучение влияния сезамола на размер липидных частиц / Е.В. Мищенко, Д. Д. Агамова, М.Ю. Королёва // Тез. докл. Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации. – 2023. – С. 50.