

УДК 57.085.23;544.774.3

НАНОЭМУЛЬСИИ И ТВЕРДЫЕ ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ ДОКСОРУБИЦИНОМ И ТИМОХИНОНОМ

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

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

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

*e-mail: mishchenkoek@list.ru,

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

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После доработки 30.07.2023 г.

Принята к публикации 04.08.2023 г.

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

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

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

1. ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

ночастиц их устойчивость к агрегации существенно повышается.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Реактивы и материалы

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

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

2.2. Получение НЭ и ТЛН

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

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

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

2.3. Определение размеров капель НЭ и ТЛН

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

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

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

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

2.5. Исследование цитотоксичности НЭ и ТЛН in vitro

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

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

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Дисперсность и устойчивость НЭ и суспензий ТЛН

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

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

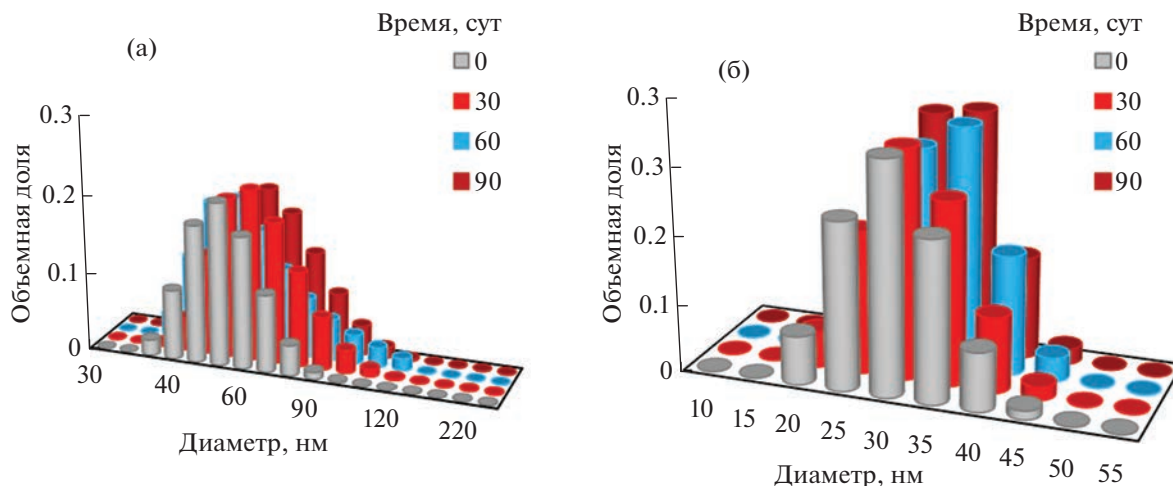


Рис. 1. Распределения по размерам капель дисперсной фазы в НЭ (а) и ТЛН (б) в зависимости от времени.

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

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

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

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

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

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

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

3.3. Цитотоксичность НЭ и ТЛН

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

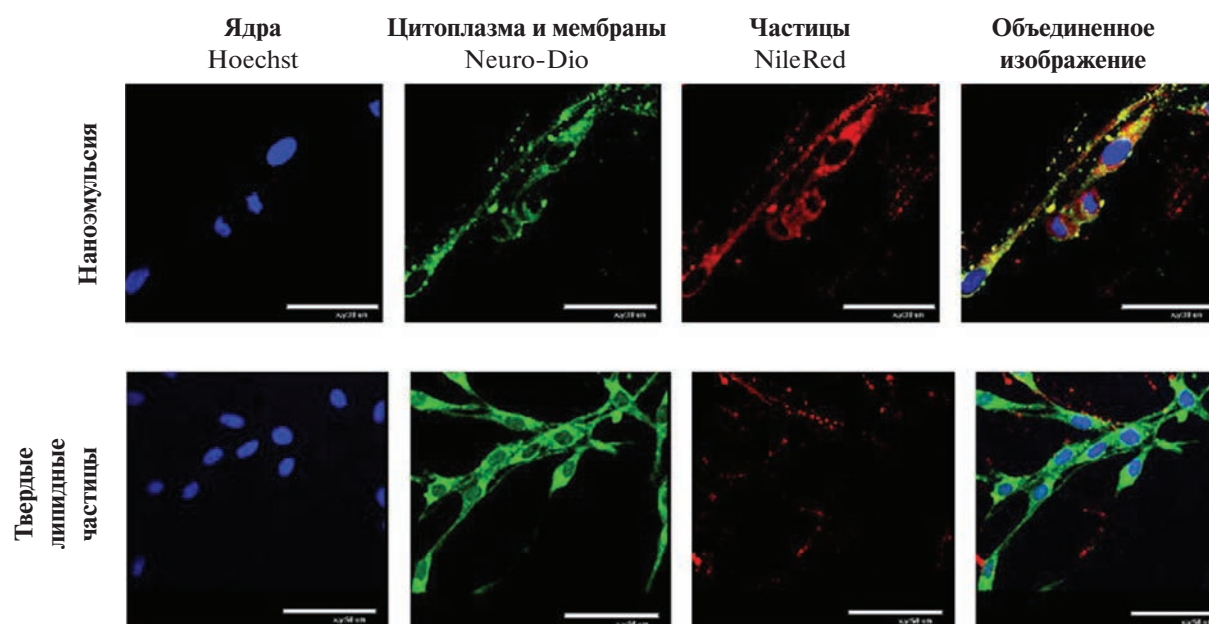


Рис. 2. Клетки С6 после 15 мин инкубирования с НЭ (верхний ряд) и твердыми липидными частицами (нижний ряд). Диаметр капель в НЭ – 50 нм, размер твердых липидных частиц – 200 нм. НЭ и твердые липидные частицы окрашены в красный цвет NileRed, цитоплазма и внутриклеточные мембраны окрашены в зеленый цвет Neuro-DiO, ядра окрашены в синий цвет Hoechst 33258.

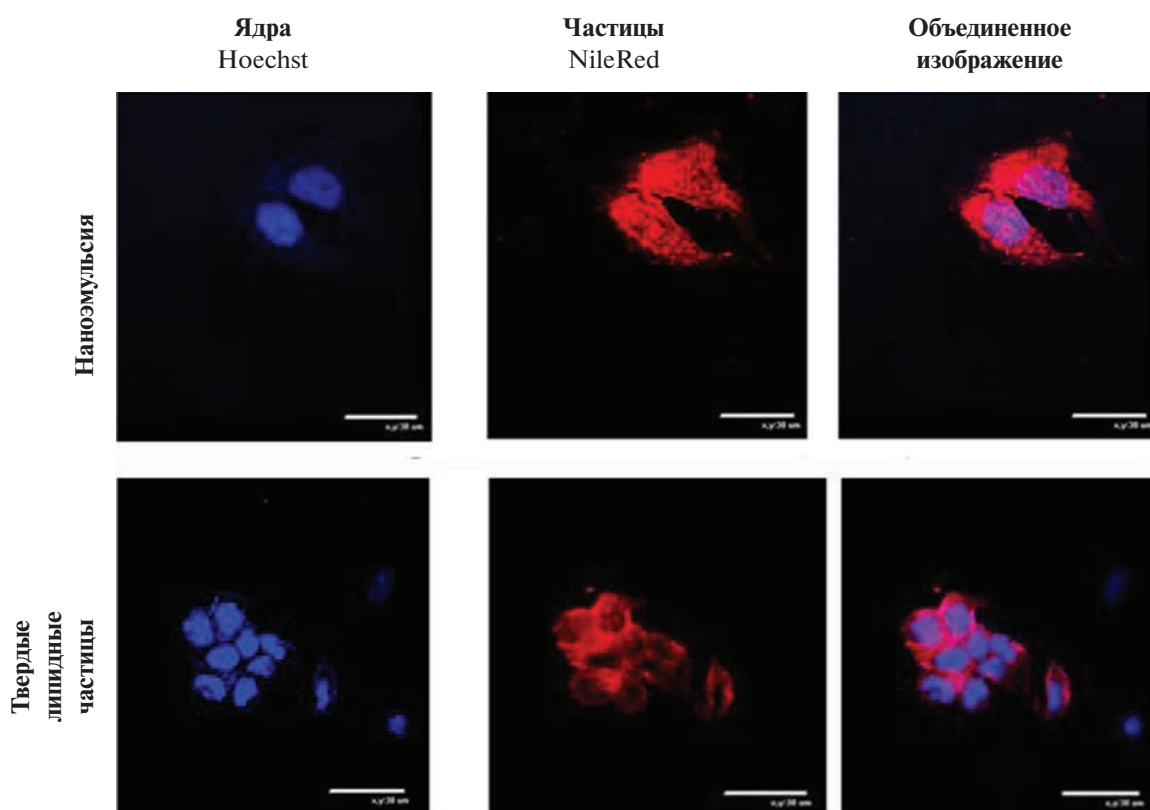


Рис. 3. Клетки MCF-7 после 1 ч инкубирования с НЭ и твердыми липидными частицами. Диаметр капель в НЭ – 50 нм, размер твердых липидных частиц – 200 нм. НЭ и твердые липидные частицы окрашены NileRed, ядра окрашены Hoechst 33258.

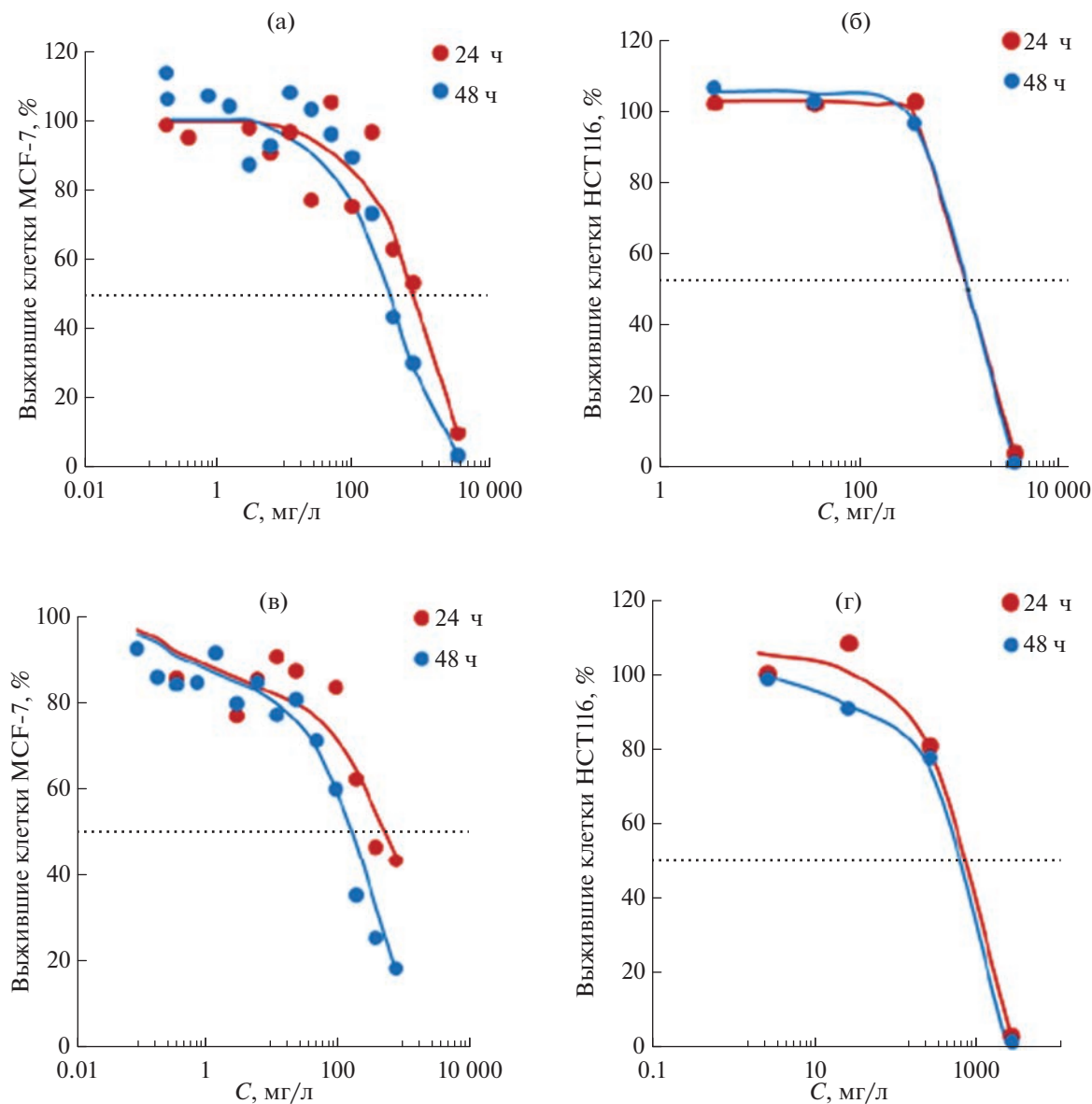


Рис. 4. Зависимости доли выживших клеток MCF-7 (а, в) и HTS 116 (б, г) от концентрации НЭ (а, б) и ТЛН (в, г). Диаметр капель в НЭ – 50 нм, ТЛН – 30 нм.

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

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

ночастиц практически не изменялся и различался в пределах погрешности измерений.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

будет приводить к остановке репликации ДНК и последующему апоптозу клеток.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

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