

Химия

Научная статья
УДК 544.77.03

БИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ ДИКАРБАМАТНОЕ ПАВ – ТВИН 80: АГРЕГАЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ, АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕМБРАНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА

Р. А. Кушназарова*, А. Б. Миргородская, А. Д. Волошина, А. П. Любина,
Д. М. Кузнецов, О. А. Ленина, Л. Я. Захарова

*Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова,
ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия*

ИНФОРМАЦИЯ

История статьи:

Поступила 8.04.2022
Одобрена 29.04.2022
Принята 4.05.2022

Ключевые слова:

дикарбаматные ПАВ,
смешанные агрегаты,
мицеллообразование,
антимикробная активность,
мембранотропные свойства

АННОТАЦИЯ

Получены количественные данные, характеризующие агрегационное поведение, антимикробную активность и токсичность катионных гексадецильных ПАВ с двумя карбаматными фрагментами в головной группе (КБ- n,n -16; где n – число углеродных атомов в алкильном радикале карбаматного фрагмента). Установлено, что эти соединения проявляют высокую бактерицидную и фунгицидную активность по отношению к широкому спектру патогенных микроорганизмов, включая их резистентные формы. Сформированы и исследованы бинарные системы КБ-2,2-16/Твин 80. В условиях варьирования соотношения компонентов определены значения критической концентрации мицеллообразования, свидетельствующие об их отрицательном отклонении от модели идеального смешивания (синергетический эффект). Мембранотропные свойства дикарбаматных ПАВ и их бинарных композиций с Твин 80 изучены с использованием в качестве модели клеточной мембраны липосом дипальмитоилфосфатидилхолина. Турбидиметрическим методом определено влияние ПАВ на температуру главного фазового перехода липидного бислоя, характеризующего его превращение из жидкокристаллического в гелеобразное состояние.

DOI:

10.18083/LCApp1.2022.2.6

Для цитирования:

Кушназарова Р. А., Миргородская А. Б., Волошина А. Д., Любина А. П., Кузнецов Д. М., Ленина О. А., Захарова Л. Я. Бинарные системы дикарбаматное ПАВ – Твин 80: агрегационное поведение, антимикробная активность и мембранотропные свойства // *Жидк. крист. и их практич. использ.* 2022. Т. 22, № 2. С. 6–18.

*Адрес для переписки: guwana1994@mail.ru

© Кушназарова Р. А., Миргородская А. Б., Волошина А. Д., Любина А. П., Кузнецов Д. М., Ленина О. А., Захарова Л. Я., 2022

Chemistry

Research Article

DICARBAMATE SURFACTANT – TWEEN 80 BINARY SYSTEMS: AGGREGATION,
ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND MEMBRANOTROPIC PROPERTIES

R. A. Kushnazarova*, A. B. Mirgorodskaya, A. D. Voloshina, A. P. Lyubina,
D. M. Kuznetsov, O. A. Lenina, L. Ya. Zakharova

Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry,
FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russian Federation

ARTICLE INFO:

ABSTRACT

Article history:

Received 8 April 2022
Approved 29 April 2022
Accepted 4 May 2022

Key words:

dicarbamate surfactants,
mixed aggregates,
micellization,
antimicrobial activity,
membranotropic properties

Quantitative data characterizing the aggregation behavior, antimicrobial activity and toxicity of hexadecyl cationic surfactants with two carbamate fragments in the head group (CB- n,n -16; where n is the number of carbon atoms in alkyl group of carbamate fragment) have been obtained. It has been established that these compounds exhibit high bactericidal and fungicidal activity against a wide range of pathogenic microorganisms, including their resistant forms. Binary systems CB-2,2-16/Tween 80 have been prepared and investigated. Under the varying the ratio of components, the critical micelle concentration values were determined, which indicated their negative deviation from the model of ideal mixing (synergistic effect). Membranotropic properties of dicarbamate surfactants and their binary compositions with Tween 80 were studied using dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes as a cell membrane model. The effect of surfactants on the main phase transition temperature of lipid bilayer characterizing its transition from liquid crystalline to gel state was determined by the turbidimetric method.

DOI:

10.18083/LCAppl.2022.2.6

For citation:

Kushnazarova R. A., Mirgorodskaya A. B., Voloshina A. D., Lyubina A. P., Kuznetsov D. M., Lenina O. A., Zakharova L. Ya. Dicarbamate surfactant – Tween 80 binary systems: aggregation, antimicrobial activity and membranotropic properties. *Liq. Cryst. and their Appl.*, 2022, **22** (2), 6–18 (in Russ.).

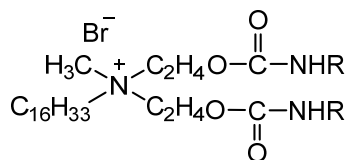
*Corresponding author: ruwana1994@mail.ru

© Kushnazarova R. A., Mirgorodskaya A. B., Voloshina A. D., Lyubina A. P., Kuznetsov D. M., Lenina O. A., Zakharova L. Ya., 2022

Введение

Соединения, несущие карбаматный (уретановый) фрагмент, входят в состав многих одобренных лекарственных препаратов, действующих как химиотерапевтические средства (Митомицин С, Иринотекан), ингибиторы холинэстеразы при лечении нейродегенеративных заболеваний (Ривастигмин, Неостигмин), ингибиторы протеазы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (Ритонавир, Ампренавир, Атазанавир), противосудорожные вещества (Фелбамат, Ретигабин, Ценобамат) и т.д. [1–3]. Их широкая применимость связана не только с высоким терапевтическим действием, но и с такими свойствами, как биосовместимость, способность к преодолению биологических барьеров, биоразлагаемость [4–6]. Этими свойствами можно управлять, изменяя структуру молекул, содержащих карбаматный фрагмент, в частности, придавая им амфифильный характер путем введения гидрофобных заместителей. Среди работ, которые в настоящее время ведутся в этом направлении, можно отметить исследования по созданию липидоподобных соединений с карбаматным фрагментом, выступающим в качестве линкера между неионной или катионной головной группой и длинноцепочечным алкильным радикалом [7–9]. Получаемые соединения имеют свойства ПАВ, способных к агрегации в растворах и имеют тенденцию к нековалентному взаимодействию с биообъектами. Некоторые из них проявили себя как эффективные невирусные векторы, предназначенные для доставки генного материала [9, 10], а для ряда производных (например, содержащих холестеринный остаток в качестве гидрофобной составляющей) отмечено противоопухолевое дей-

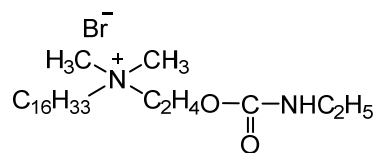
ствие [11]. В работах нашего исследовательского коллектива также в последние годы уделяется значительное внимание синтезу и изучению новых катионных карбаматсодержащих амфифильных соединений. Было показано, что ПАВ этого типа выгодно отличаются от своих триалкиламмониевых аналогов тем, что имеют более низкие температурный и концентрационный диапазоны мицеллообразования, проявляют меньшую токсичность и характеризуются большим солубилизационным действием [12, 13]. Было установлено, что карбаматсодержащие ПАВ обладают значительной фунгицидной и бактерицидной активностью. Их способность проникать через клеточные мембраны и осуществлять транспорт солубилизованных веществ была обнаружена с помощью флуоресцентной микроскопии на клетках печени [13], а также в экспериментах *in vivo* при испытании противовоспалительного действия препарата индометацина, иммобилизованного в наноконтейнеры, в рецептуру которых входят карбаматные ПАВ [14]. Полученные результаты инициировали проведение синтеза и исследование новых соединений, несущих два карбаматных фрагмента и отличающихся длинной углеводородной заместителем в головной группе. Предполагалось, что такая модификация приведет к улучшению их агрегационных характеристик и антимикробных свойств. Дополнительный акцент в работе сделан на изучении смешанных растворов карбаматсодержащих ПАВ и Твин 80. Было сделано допущение, что добавление этого неионного ПАВ, широко применяемого в медицине и фармакологии, позволит снизить токсичность и концентрационный порог мицеллообразования в системе. Строение исследуемых в работе карбаматных ПАВ представлено ниже.



R = C₂H₅ – КБ-2,2-16

R = C₄H₁₀ – КБ-4,4-16

R = C₆H₁₃ – КБ-6,6-16



КБ-2-16

Эксперимент

В работе применяли коммерческие образцы Твин 80, дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), реагенты для биохимических исследований производства фирмы *Sigma Aldrich* (Штайнхайм, Германия). Для приготовления растворов использовали воду, очищенную на установке *Direct-Q 5 UV* (рН = 6,8–7,0, $\chi = 2\text{--}3$ мкСм/см).

Исследуемые карбаматсодержащие ПАВ получали по методике [12] путем взаимодействия метил-ди-(2-гидроксиэтил)гексадециламмоний бромида с соответствующим алкилизотиоцианатом с применением диазобисциклооктана в качестве катализатора. Структуру соединений подтверждали методами ИК-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, а также данными элементного анализа. Полученные характеристики приведены ниже.

Гексадецил-метил-бис(2-(этилкарбамоилокси)-этил) аммоний бромид, КБ-2,2-16

Т. пл. 88–90 °С. ИК-спектр (KBr), ν см⁻¹: 3504, 3368, 3225, 3036, 2922, 2852, 2770, 1717, 1538, 1453, 1356, 1328, 1259, 1141, 1099, 1046, 1033, 1003, 955, 910, 882, 774, 721, 663, 585. Найдено, %: С, 57.38; Н, 9.75; Br, 13.91; N, 7.53. Вычислено для C₂₇H₅₆BrN₃O₄ %: С, 57.23; Н, 9.96; Br, 14.10; N, 7.42. Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 0.87 т (H²⁴, 3H, ³J_{HH} 6.7); 1.16 т (H⁸, 6H, ³J_{HH} 7.2); 1.36–1.25 два м (H¹¹⁻²³, 26H); 1.75 м (H¹⁰, 2H); 3.20 к (H⁷, 4H, ³J_{HH} 7.1); 3.43 уш. с (H²⁵, 3H); 3.56 м (H⁹, 2H); 3.94 м (H², 4H); 4.58 м (H³, 4H); 5.50 м (H⁶, 2H). Масс-спектр МАЛДИ, m/z = [M-Br]⁺ 486,8 (рассч. m/z для C₂₇H₅₆BrN₃O₄ 566,7).

Гексадецил-метил-бис(2-бутилкарбамоилокси)-этил) аммоний бромид, КБ-4,4-16

Т. пл. 102–104 °С. ИК-спектр (KBr), ν см⁻¹: 3503, 3369, 3233, 3040, 2959, 2924, 2852, 1713, 1697, 1619, 1532, 1483, 1468, 1449, 1377, 1350, 1311, 1292, 1236, 1181, 1148, 1124, 1062, 1006, 962, 894, 829, 776, 736, 721, 635. Найдено, %: С, 59.62; Н, 10.27; Br, 13.00; N, 6.69. Вычислено для C₃₁H₆₄BrN₃O₄ %: С, 59.79; Н, 10.36; Br, 12.83; N, 6.75. Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 0.87 т (H²⁶, 3H, ³J_{HH} 6.8); 0.91 т (H¹⁰, 6H, ³J_{HH} 7.3); 1.25 м (H¹⁴⁻²⁴, 22H); 1.35 м (H^{9, 13, 25}, 8H); 1.50 м (H⁸, 4H); 1.74 м (H¹², 2H); 3.14 т (H⁷, 4H, ³J_{HH} 7.1); 3.44 уш. с (H²⁷, 3H); 3.56 м (H¹¹, 2H); 3.94 м (H², 4H); 4.57 м (H³, 4H); 5.47 м (H⁶, 2H). Масс-спектр

МАЛДИ, m/z = [M-Br]⁺ 542,9 (рассч. m/z для C₃₁H₆₄BrN₃O₄ 622,8).

Гексадецил-метил-бис(2-(гексилкарбамоилокси)-этил) аммоний бромид, КБ-6,6-16

Т. пл. 90–92 °С. ИК-спектр (KBr), ν см⁻¹: 3388, 3216, 3037, 2957, 2923, 2850, 1712, 1698, 1525, 1483, 1466, 1449, 1365, 1343, 1299, 1250, 1227, 1180, 1149, 1127, 1061, 1011, 987, 969, 894, 877, 828, 778, 725, 640, 552. Найдено, %: С, 61.84; Н, 10.72; Br, 11.85; N, 6.08. Вычислено для C₃₅H₇₂BrN₃O₄ %: С, 61.92; Н, 10.69; Br, 11.77; N, 6.19. Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 0.88 м (H^{12,28}, 9H); 1.37–1.26 м (H^{9-11, 15-27}, 38H); 1.52 м (H⁸, 4H); 1.75 м (H¹⁴, 2H); 3.14 т (H⁷, 4H, ³J_{HH} 7.2); 3.42 уш. с (H²⁹, 3H); 3.55 м (H¹³, 2H); 3.92 м (H², 4H); 4.57 м (H³, 4H). Масс-спектр ЭСИ, m/z = [M-Br]⁺ 598,7 (рассч. m/z для C₃₅H₇₂BrN₃O₄ 678,9).

Измерение поверхностного натяжения проводили на приборе *KRÜSS K6* (Гамбург, Германия) путем отрыва платино-иридиевого кольца, помещенного на поверхность раствора при температуре 25 °С. Кольцо перед каждым измерением обезжиривали в этаноле, затем промывали ультрачистой водой.

Антимикробную активность определяли методом серийных разведений в бульоне Мюллера – Хинтона для культивирования бактерий и в бульоне Сабуро для грибных патогенов. Для эксперимента использовали индикаторные (эталонные) тест-штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus ATCC 6538 P FDA 209P (Sa)*, *Bacillus cereus ATCC 10702 NCTC 8035 (Bc)*, *Enterococcus faecalis ATCC 29212 (Ef)*, *Escherichia coli ATCC 25922 (Ec)*, *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027(Pa)* и *Candida albicans ATCC 10231 (Ca)* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Метициллин-резистентные штаммы *Sa (MRSA)* были выделены из организма больных хроническим тонзиллитом (*MRSA-1*) и синуситом (*MRSA-2*) в бактериологической лаборатории Республиканской клинической больницы (Казань, Россия). Концентрация бактерий в опыте составляла $3,0 \times 10^5$ КОЕ/мл, грибов – $2,0 \times 10^3$ КОЕ/мл. Культуры бактерий и грибов инкубировали при 37 и 25 °С соответственно. Результаты регистрировали каждые 24 часа в течение 5 дней.

Гемолитическую активность соединений оценивали с использованием микропланшетного ридера *Invitrologic* (Россия), сравнивая значения оптической плотности при $\lambda = 540$ нм для 10 % суспензии эритроцитов в дистиллированной воде и в растворах ПАВ по методике, описанной в [15].

Цитотоксическую активность карбаматсодержащих ПАВ в отношении здоровой клеточной линии гепатоцитов человека (*Chang liver*) определяли с помощью многофункциональной системы визуализации клеток *Cytell* (*GE Health Care Life Science*, Швеция) по аналогии с [15].

Исследование острой токсичности проводили согласно [16]. Каждую дозу вводили внутри-брюшинно шести мышам (массой 22–24 г). В качестве значения токсичности использовали ЛД₅₀, которое было рассчитано графически по Беренсу. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с инструкциями, изложенными в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU от 22 сентября 2010 года.

Липосомы на основе дипальмитоилфосфатидилхолина для турбидиметрического метода готовили согласно методике [12]. Фазовые переходы в смесях ПАВ/ДПФХ изучали с помощью спектрофотометра *Specord Plus 250* фирмы «*Analytik Jena*». Перед измерением образец ДПФХ разбавляли до концентрации $7 \cdot 10^{-4}$ М. Измерения проводили при длине волны 350 нм и варьировании температуры в диапазоне от 35 до 45 °С, включающем фазовый переход мембран жидкие кристаллы-гель (скорость нагревания составляла 0,1 °С/мин), следя за изменением оптической плотности растворов. Далее к дисперсии липосом ДПФХ добавляли аликвоту раствора ПАВ и проводили аналогичные измерения. Подобные измерения выполняли для нескольких аликвот ПАВ. Турбидиметрические кривые математически обрабатывали с использованием уравнения Вант-Гоффа для двух состояний, согласно которому температура фазового перехода липидного бислоя соответствует точке перегиба на соответствующей турбидиметрической зависимости.

Результаты и их обсуждение

Агрегационное поведение карбаматных ПАВ

Методом тензиометрии была определена критическая концентрация мицеллообразования

(ККМ) исследуемых ПАВ в водных растворах. На рис. 1 приведены изотермы поверхностного натяжения систем на основе дикарбаматных ПАВ, отличающихся длиной алкильного заместителя в головной группе, из которых следует, что при переходе от диэтильного производного к дибутильному аналогу наблюдается уменьшение ККМ в 5 раз, (0,45 мМ и 0,09 мМ для КБ-2,2-16 и КБ-4,4-16, соответственно), что, вероятно, обусловлено усилением гидрофобного эффекта. Об этом же свидетельствует и тот факт, что значения ККМ у дикарбаматных ПАВ приблизительно в два-три раза ниже, чем у соответствующих монопроизводных аналогов: например, для КБ-2-16 это значение составляет 0,70 мМ [12]. Для соединения КБ-6,6-16 из-за его ограниченной растворимости в воде не удалось достоверно определить значение ККМ. Нужно отметить, что для всех карбаматсодержащих ПАВ величина ККМ существенно ниже, чем у цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ), который часто используется в коллоидной химии в качестве соединения сравнения – 1,0 мМ. Это позволяет предполагать, что наличие карбаматного фрагмента облегчает процессы самоорганизации ПАВ в водных растворах за счет вклада водородных связей или может быть обусловлено уменьшением положительного заряда на четвертичном атоме азота (т.е. уменьшением негативного влияния электростатического отталкивания молекул).

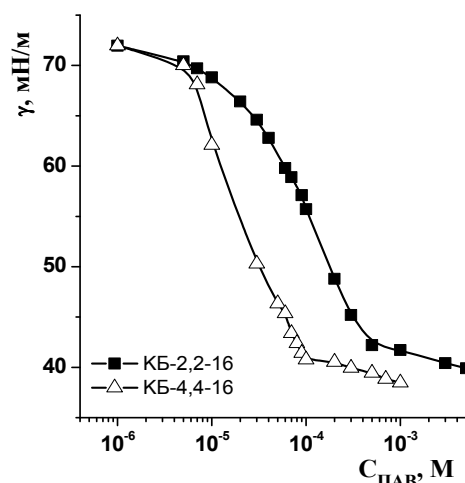


Рис. 1. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов дикарбаматных ПАВ при 25 °С

Fig. 1. Surface tension isotherms of dicarbamate surfactants at 25 °С

Антимикробная активность дикарбаматных ПАВ

Катионные ПАВ представляют собой класс соединений, обладающих выраженными антимикробными свойствами. Положительный заряд головных групп обеспечивает взаимодействие этих соединений с отрицательно заряженными составляющими бактериальной клетки, а присутствие гидрофобного заместителя облегчает встраивание в клеточную мембрану и приводит к нарушению ее целостности. Природа и заряд полярной головной группы, длина гидрофобного радикала в молекуле являются структурными характеристиками ПАВ, которые способны определять их антимикробную активность [17–20].

Ранее нами было установлено, что монокарбаматные ПАВ проявляют выраженные антимикробные свойства, при этом наилучшие показатели имели соединения с гексадецильным заместителем [12]. В настоящей работе антимикробную активность синтезированных дикарбаматных ПАВ определяли в отношении патогенных грамположительных (*Staphylococcus aureus* (*Sa*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Enterococcus faecalis* (*Ef*)), грамотрицательных (*Escherichia coli* (*Ec*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*)) бактерий и грибов (*Candida albicans* (*Ca*)). Ряд исследуемых объектов был дополнен метициллин-резистентными штаммами *Staphylococcus aureus*,

которые приобрели устойчивость к известным антимикробным препаратам, что усложняет процесс борьбы с возбудителем инфекции и представляет серьезную угрозу для здоровья населения. Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что дикарбаматные ПАВ проявили значительную антимикробную активность против широкого круга бактерий, которая зависит от строения ПАВ. При этом наблюдается не только ингибирующее действие, характеризующееся значением минимальной ингибирующей концентрации (МИК), но и бактерицидная (или фунгицидная) активность. Наилучшую активность проявило соединение КБ-2,2-16 на всех тестируемых микроорганизмах. Его бактериостатическое действие в отношении грамположительных бактерий сопоставимо с действием применяемых антибиотиков. Особого внимания заслуживает и высокая противогрибковая активность этого ПАВ в отношении *Ca*, которая может конкурировать с эффективностью лекарственного стандарта – фунгицидного препарата кетоконазола. По мере удлинения алкильного заместителя в карбаматном фрагменте антимикробное действие ПАВ уменьшается. Следует отметить, что антимикробные свойства КБ-2,2-16 несколько превышают активность его монокарбаматного аналога КБ-2-16.

Таблица 1. Антимикробная активность карбаматсодержащих ПАВ

Table 1. Antimicrobial activity of carbamate-containing surfactants

ПАВ	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК), мкг/мл							
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ef</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>MRSA-1</i>	<i>MRSA-2</i>	<i>Ca</i>
КБ-2,2-16	0,9±0,07	0,9±0,07	0,9±0,08	7,8±0,7	31,3±2,5	0,5±0,04	0,5±0,04	1,9±0,1
КБ-4,4-16	1,9±0,1	3,9±0,2	1,9±0,1	125±10	125±11	0,9±0,04	1,9±0,1	250±21
КБ-6,6-16	62,5±5,5	–	62,5±5,5	< 500	< 500	–	–	< 500
КБ-2-16*	1,9±0,2	1,9±0,1	–	15,6±1,2	–	–	–	7,8±0,4
Ципрофлоксацин	0,5±0,03	0,9±0,06	3,9±0,2	0,5±0,04	0,5±0,04	340±29	2,7±0,2	–
Амоксициллин	0,3±0,02	–	–	–	–	31,3±2,6	31,3±2,5	–
Кетоконазол	–	–	–	–	–	–	–	3,9±0,2
Бактерицидная (МБК) и фунгицидная (МФК) активность, мкг/мл								
КБ-2,2-16	3,9±0,2	62,5±5,4	15,6±1,4	7,8±0,6	–	0,9±0,1	15,6±1,2	3,9±0,2
КБ-4,4-16	31,3±2,4	31,3±2,5	31,3±2,5	125±11	< 500	3,9±0,2	62,5±5,4	250±21
КБ-6,6-16	–	–	62,5±5,7	< 500	< 500	–	–	< 500
КБ-2-16*	3,9±0,2	62,5±5,4	–	15,6±1,3	–	–	–	7,8±0,5
Ципрофлоксацин	0,5±0,04	0,9±0,06	3,9±0,3	0,5±0,04	0,5±0,04	340±29	2,7±0,2	–
Амоксициллин	0,9±0,06	–	–	–	–	31,3±2,5	31,3±2,7	–
Кетоконазол	–	–	–	–	–	–	–	3,9±0,3

Примечание: *Значения МИК, МБК и МФК по данным работы [12]; МИК, МБК и МФК >500 мкг/мл

Примечательно, что КБ-2,2-16 и КБ-4,4-16 ингибировали рост метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA-1 и MRSA-2), на которые не влияет применение бета-лактамов антибиотиков. При этом MRSA-1 также выработал устойчивость к антибиотикам фторхинолонового ряда. Поэтому КБ-2,2-16 и КБ-4,4-16 оказались значительно эффективнее, чем коммерческие антибактериальные препараты ципрофлоксацин и амоксициллин.

Следует отметить, что значения минимальной бактерицидной и фунгицидной концентрации (МБК и МФК) для КБ-2,2-16 и КБ-4,4-16 ниже, чем значения их ККМ. Это позволяет предполагать, что они взаимодействуют с бактериальной клеткой в неагрегированном состоянии.

Гемолитическая и цитотоксическая активность дикарбаматных ПАВ

Возможности использования ПАВ в биомедицинских приложениях во многом зависят от их цитотоксичности. Наиболее часто для оценки этого показателя у новых соединений в качестве объектов исследования применяются эритроциты, чья

клеточная мембрана чувствительна к воздействию амфифильных добавок. Способность изучаемого соединения вызывать разрушение эритроцитов крови человека иллюстрирует его токсическое действие на внутреннюю среду организма. Исследование гемолиза является простым скрининг-тестом, результаты которого могут помочь при изучении цитотоксичности на более сложных моделях. В настоящей работе дикарбаматные ПАВ были испытаны на цитотоксичность в отношении эритроцитов крови и клеток печени человека (клеточная линия *Chang liver*). Оценку цитотоксического действия проводили, анализируя значение концентрации ПАВ, при которой происходит гемолиз 50 % эритроцитов (HC_{50}) или наблюдается гибель 50 % клеток печени (IC_{50}). Полученные данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что дикарбаматные ПАВ существенно менее токсичны, чем их триалкиламмониевый аналог ЦТАБ. Их гемолитическая активность практически не меняется при переходе от КБ-2,2-16 к КБ-6,6-16, тогда как цитотоксичность в отношении клеток печени в этом ряду возрастает.

Таблица 2. Оценка цитотоксического действия дикарбаматных ПАВ в отношении эритроцитов крови и клеток печени (*Chang liver*) и их селективность действия против *Sa*

Table 2. Evaluation of the cytotoxic effect of dicarbamate surfactants on erythrocytes and liver cells (*Chang liver*) and their selectivity against *Sa*

Соединения	HC_{50} , мкг/мл	IC_{50} , мкг/мл	$HC_{50}/МИК_{Sa}$	$IC_{50}/МИК_{Sa}$
КБ-2,2-16	27,8±2,3	100±9	31,0	111
КБ-4,4-16	26,8±2,1	48±5,3	14,1	25,3
КБ-6,6-16	33,6±2,6	39,0±3,0	0,5	0,6
ЦТАБ*	2,6±0,3	3,5±0,6	5,2	7,0

Примечание: *Значения для ЦТАБ приведены по данным работы [15]

Сопоставление данных табл. 1 и 2 позволяет говорить, что в диапазоне концентраций, останавливающих рост бактерий и грибов, соединения КБ-2,2-16 и КБ-4,4-16 не проявляют высоких цитотоксических свойств по отношению к эритроцитам крови человека и культуре клеток печени. Для количественного описания такого поведения можно воспользоваться индексом селективности (SI), который рассчитывается как отношение между значением HC_{50} для эритроцитов (или IC_{50} для эукариотических клеток) и значением МИК для микробных клеток. Самой высокой селективностью к штамму *Sa* и низкой токсичностью по отношению к здоро-

вым клеткам человека обладает дикарбаматное ПАВ КБ-2,2-16 (табл. 2), что является предпосылкой для его успешного использования при разработке антимикробных агентов.

Смешанные системы на основе КБ-2,2-16 и Твин 80

Следующий этап работы был посвящен исследованию бинарных композиций на основе КБ-2,2-16 и Твин 80. В смешанных системах гидрофильные фрагменты неионогенного ПАВ могут встраиваться между заряженными головными группами катионного ПАВ, снижая электростатическое отталкивание между ними и облегчая процесс

мицеллообразования. С учетом данных, полученных для смешанных систем на основе монокарбаматных ПАВ [21], мы предполагали, что добавление неионного ПАВ Твин 80, которое широко используется в медицине и фармакологии в качестве нетоксичного солюбилизатора, улучшит свойства системы на основе дикарбаматного ПАВ КБ-2,2-16, уменьшив значение ККМ, увеличив безопасность системы, не ухудшая при этом ее антимикробные свойства. Предварительно в экспериментах *in vivo* было показано, что острая токсичность смешанных систем падает по мере увеличения в них содержания Твин 80. Так, ЛД₅₀ (мыши, внутривенно) для КБ-2,2-16 составляет 55 мг/кг. Смешанные системы характеризуются значениями ЛД₅₀ 367, 240 и 139 мг/кг при мольной доле катионного ПАВ α₁, равной 0,3; 0,5 и 0,7, соответственно.

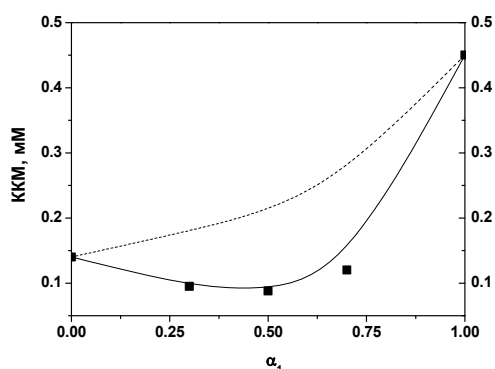


Рис. 2. Зависимость ККМ растворов смесей ПАВ от мольной доли КБ-2,2-16: пунктирная линия – идеальная система; непрерывная линия – экспериментальная зависимость

Fig. 2. Dependence of the CMC of solutions of surfactant mixtures on the molar fraction of CB-2,2-16: the dashed line corresponds to an ideal system, the symbols and solid line correspond to the experimental dependence

Методом тензиометрии были определены значения ККМ смешанных систем в условиях изменения соотношения ионного и неионного ПАВ, которые представлены на рис. 2 вместе со значениями, рассчитанными по модели идеального смешивания [22]:

$$\frac{1}{C^*} = \frac{\alpha_1}{C_1} + \frac{\alpha_2}{C_2}, \quad (1),$$

где α₁ и α₂ – мольная доля ионного и неионного ПАВ в растворе, C*, C₁ и C₂ – величины ККМ для смешанной системы, ионного и неионного ПАВ, соответственно.

Из полученных результатов следует, что смешанные системы ведут себя неидеально: экспериментальные значения ККМ оказались ниже рассчитанных по уравнению (1), это указывает на наличие взаимного притяжения между КБ-2,2-16 и Твин 80 в смешанных мицеллах и говорит о синергизме.

Было сделано предположение, что синергическое действие ПАВ в исследуемой смешанной системе может проявиться и в ее антимикробной активности. Проверку этого предположения провели на нескольких патогенных штаммах для ряда бинарных систем, в которых варьировали соотношение КБ-2,2-16 и Твин 80. Полученные результаты представлены на рис. 3 и в табл. 3. Сразу следует подчеркнуть, что Твин 80 не обладает антимикробным действием (МИК >500 мкг/мл для всех испытанных штаммов), и активность смешанных систем связана с наличием в них дикарбаматных катионных ПАВ.

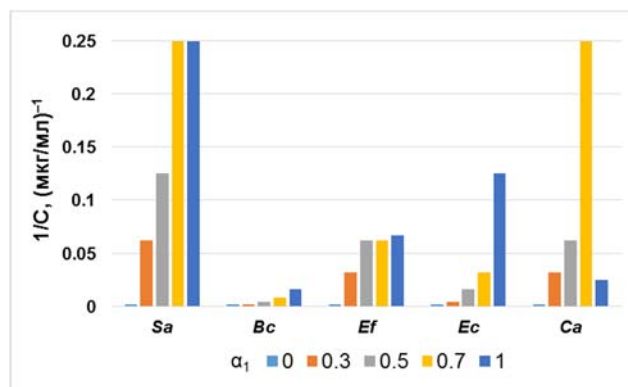


Рис. 3. Антимикробная активность (МБК и МФК) смешанных систем КБ-2,2-16 и Твин 80 в зависимости от соотношения компонентов

Fig. 3. Antimicrobial activity (MBC and MFC) of mixed systems based on CB-2,2-16 and Tween 80 depending on the ratio of the components

Таблица 3. Антимикробная активность смешанных систем на основе КБ-2,2-16 и Твин 80

Table 3. Antimicrobial activity of mixed systems based on CB-2,2-16 and Tween 80

Доля КБ-2,2-16 (α_1)	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК), мкг/мл*				
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ef</i>	<i>Ec</i>	<i>Ca</i>
0,3	1,2±0,1	2,3±0,2	1,2±0,1	75±6,1	2,3±0,2
0,5	0,98±0,08	1,9±0,1	0,98±0,07	31,3±2,5	1,9±0,1
0,7	0,68±0,05	1,4±0,1	1,4±0,1	21,9±1,8	1,4±0,1
1,0	0,9±0,07	0,9±0,07	0,9±0,08	7,8±0,7	1,9±0,1
Бактерицидная (МБК) и фунгицидная (МФК) активность, мкг/мл					
0,3	4,7±0,4	150±12	9,4±0,8	75±5,8	9,4±0,8
0,5	3,9±0,3	125±10	7,8±0,6	31,3±2,4	7,8±0,7
0,7	2,7±0,2	87,5±7,2	11,0±0,9	21,9±1,8	2,7±0,3
1,0	3,9±0,2	62,5±5,4	15,6±1,4	7,8±0,6	3,9±0,2

Примечание: *Значения приведены в расчете на дикарбаматное ПАВ

Это наглядно демонстрирует диаграмма (рис. 3), отражающая изменение антимикробных свойств системы в зависимости от соотношения ее компонентов. Данные, приведенные в табл. 4, позволяют судить о том, как сказывается присутствие Твин 80 на поведении КБ-2,2-16 в бинарной системе: в ней указана действующая концентрация катионного ПАВ. Оказалось, что Твин 80 мало влияет на антимикробные свойства КБ-2,2-16: значения МИК и МБК оставались на том же уровне, что и в случае индивидуального ПАВ (табл. 3). Следует еще раз отметить, что антимикробное действие исследуемой бинарной системы проявляется при концентрации, не достигающей значения ККМ, то есть ниже того уровня, при котором происходит значительное взаимодействие ПАВ разного типа, образуются смешанные мицеллы и в результате чего часто проявляется синергетический эффект. Некоторое ухудшение активности КБ-2,2-16 проявилось в случае грамотрицательных бактерий *Ec*, что можно связать с особенностями их строения. Эти бактерии имеют дополнительную внешнюю мембрану, которая затрудняет доступ в клетку посторонних мембранотропных соединений и повышает их устойчивость к антимикробным агентам [23].

Существуют различные механизмы действия катионных ПАВ на микроорганизмы, но на начальной стадии они адсорбируются на клеточной поверхности, уменьшают ее заряд, в результате чего может происходить удлинение, утолщение и искривление бактериальных клеток. За счет своей гидрофобности ПАВ впоследствии интеркалируют в липидные бислои, открывая каналы, пронизывающие мембрану, провоцируя потерю основ-

ных клеточных компонентов. Конечным результатом действия ПАВ является разрушение клеточной оболочки, приводящее к гибели клетки [18–20].

В представленной работе для изучения мембранотропных свойств дикарбаматных ПАВ и их смешанных систем были использованы липосомы на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), широко применяемые в исследовательской практике в качестве простейшей модели биомембран. В ходе эксперимента для определения изменения температуры главного фазового перехода ($T_{ФП}$) липида проводили турбидиметрическое титрование дисперсии липосом раствором ПАВ. $T_{ФП}$ – характеристический показатель липида, отражающий температуру его перехода из текучего жидкокристаллического состояния в жесткий гель; для ДПФХ это значение составляет $41 \pm 0,2$ °C [24]. Обычно введение немезогенных добавок как в лиотропные, так и в термотропные жидкие кристаллы вызывает нарушение жидкокристаллического упорядочения, что отражается в снижении температур фазовых переходов. В случае липидных бислоев введение молекул ПАВ может оказывать как структурирующее действие, инициирующее переход к более упорядоченному гелеобразному состоянию, так и способствовать разупорядочению системы, вызывая фазовый переход гель – жидкие кристаллы [25]. Вероятно, это зависит от соотношения длины алкильного радикала ПАВ и липида.

Турбидиметрические зависимости, полученные в ходе эксперимента для индивидуальных и бинарных композиций, и результаты их математической обработки в рамках модели двух состояний представлены на рис. 4 и 5.

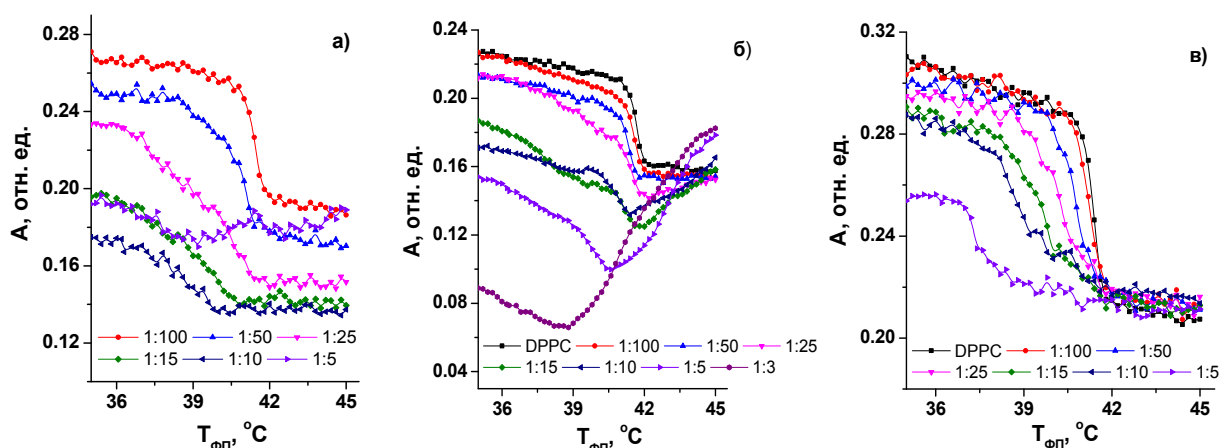


Рис. 4. Кривые изменения оптической плотности при длине волны 350 нм образцов суспензии липосом из ДПФХ в условиях варьирования добавок: КБ-2,2-16 (а), Твин 80 (б) и их смешевой композиции при $\alpha_1 = 0,5$ (в)

Fig. 4. Changes in optical density at wavelength of 350 nm for the suspension of DPPC liposomes under conditions of varying additives: CB-2,2-16 (a), Tween 80 (b) and their mixed composition at $\alpha_1 = 0,5$ (c)

Характер зависимостей при использовании в качестве добавки КБ-2,2-16 (рис. 4, а) типичен для систем катионное ПАВ-липид. При малом содержании ПАВ происходит его встраивание в липидный бислои, что приводит к снижению значений температуры фазового перехода. По мере увеличения доли ПАВ в системе структура бислоя становится все более разрыхленной и разупорядоченной и при некотором критическом соотношении происходит ее разрушение, что отражается в резком снижении значения $T_{ФП}$. В случае КБ-2,2-16 это происходит при соотношении ПАВ/ДПФХ ниже 1:50. Отметим, что содержание ПАВ в этом случае одного порядка со значением МБК для ряда микроорганизмов (табл. 1 и 4). Это позволяет говорить о том, что антимикробное действие КБ-2,2-16 в значительной мере связано с разрушением клеточной мембраны бактерий.

В случае Твин 80 резкого снижения $T_{ФП}$ не наблюдается, а турбодиметрические зависимости (рис. 4, б) отличаются от тех, которые представлены на рис. 4, а для систем КБ-2,2-16/ДПФХ. По аналогии с трактовкой взаимодействия липосом и неионного ПАВ, выдвинутой в работах [26, 27], можно предположить, что при малых концентрациях неионное ПАВ распределяется между водной фазой и липидными бислоями, не разрыхляя их. При соотношении Твин 80/ДПФХ 1:10 нетипичное изменение оптической плотности суспензии липо-

сом, вероятнее всего, связано с их сольubilизацией мицеллами неионных ПАВ.

В случае бинарных систем их взаимодействие с липидным бислоем отражается в турбодиметрических зависимостях, носящих промежуточный характер: в качестве иллюстрации на рис. 4, в представлены данные для системы с одинаковой долей КБ-2,2-16 и Твин 80.

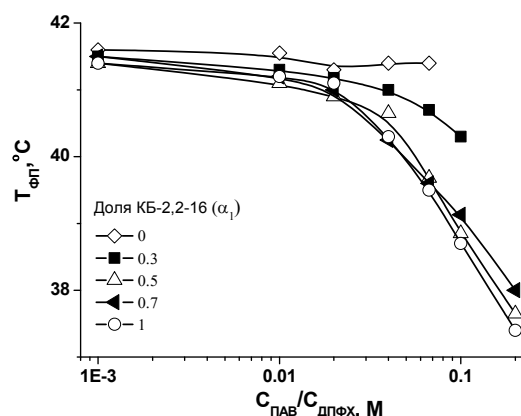


Рис. 5. Зависимость температуры главного фазового перехода «мезофаза → гель» от мольного соотношения ПАВ/ДПФХ

Fig. 5. Temperature dependence of the main phase transition «mesophase → gel» on the surfactant/DPPC molar ratio

Рисунок 5 позволяет сопоставить степень влияния тестируемых индивидуальных и смешанных систем на свойства липидного бислоя, а также оценить соотношение ПАВ/ДПФХ, при котором происходит его разрушение. Можно отметить, что по мере увеличения содержания КБ-2,2-16 влияние системы на температуру фазового перехода усиливается: при небольших добавках ПАВ происходит его интеркаляция в бислой, не вызывающая изменения жидкокристаллического состояния, а затем наблюдаются процессы деструкции и солюбилизации мембран. В этой же последовательности усиливается антимикробная активность исследуемых систем, что позволяет говорить о том, что действие ПАВ в значительной степени связано с разрушением клеточной мембраны микроорганизмов.

Выводы

Таким образом, в ходе работы впервые получены количественные данные, характеризующие агрегационное поведение, антимикробную активность и цитотоксическое действие катионных ПАВ с двумя карбаматными фрагментами в головной группе. Среди тестируемых соединений лучшие показатели выявлены для КБ-2,2-16: это ПАВ проявило наибольший антимикробный эффект, сопоставимый с действием применяемых антибиотиков, при этом оно оказалось менее токсичным в отношении эритроцитов крови и клеток печени человека. Исследование мембранотропных свойств КБ-2,2-16 позволило предположить, что антимикробное действие может быть вызвано способностью ПАВ к интегрированию в липидный бислой клеточной мембраны, приводящей к ее разупорядочению, нарушению проницаемости и даже разрушению. Показано, что в бинарных композициях КБ-2,2-16/Твин 80 наблюдается синергетический эффект, проявляющийся в снижении ККМ смешанной системы по сравнению с расчетными значениями для идеального смешивания. Переход к смешанным системам дает возможность существенно увеличить безопасность системы, сохраняя антимикробные свойства катионного ПАВ, что позволяет говорить о высоком потенциале их практического использования.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-73-30012).

Acknowledgments. This work is supported by the Russian Science Foundation (grant No. 19-73-30012).

Список источников / References

1. Matošević A., Bosak A. Carbamate group as structural motif in drugs: A review of carbamate derivatives used as therapeutic agents. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2020, **71** (4), 285–299. DOI: 10.2478/aiht-2020-71-3466.
2. Ghosh A.K., Brindisi M. Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. *J. Med.Chem.*, 2015, **58** (7), 2895–2940. DOI: 10.1021/jm501371s.
3. Liu D., Zhang H., Wang Y., Liu W., Yin G., Wang D., Li J., Shi T., Wang Z. Design, synthesis, and biological evaluation of carbamate derivatives of N-salicyloyl tryptamine as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, **229**, 114044. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.114044.
4. Hou Z., Teng J., Wei J., Hao T., Liu Z. Preparation and characterization of highly pH-sensitive biodegradable poly(ether-ester-urethane) and its potential application for drug delivery. *Mater. Today Commun.*, 2021, **28**, 102527. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2021.102527.
5. Peng Z., Zhou P., Zhang F., Peng X. Preparation and properties of polyurethane hydrogels based on hexamethylene Diisocyanate/Polycaprolactonepolyethylene glycol. *J. Macromol. Sci. Part B Phys.*, 2018, **57** (3), 187–95. DOI: 10.1080/00222348.2018.1439223.
6. Faccia P.A., Pardini F.M., Agnello A.C., Amalvy J.I., Del Panno M.T. Degradability of poly(ether-urethanes) and poly(ether-urethane)/acrylic hybrids by bacterial consortia of soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2021, **160**, 105205. DOI: 10.1016/j.ibiod.2021.105205.
7. Zhi D., Bai Y., Yang J., Cui Sh., Zhao Y., Chen H., Zhang Sh. A review on cationic lipids with different linkers for gene delivery. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2018, **253**, 117–140. DOI: 10.1016/j.cis.2017.12.006.
8. Zhi D., Zhang Sh., Qureshi F., Zhao Y., Cui Sh., Wang B., Chen H., Wang Y., Zhao D., Synthesis and biological activity of carbamate-linked cationic lipids for gene delivery in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22** (11), 3837–3841. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.01.097.
9. Zhou H., Yang J., Du Y., Fu Sh., Song Ch., Zhi D., Zhao Y., Chen H., Zhang Sh., Zhang Sh. Novel carbamate-linked quaternary ammonium lipids containing unsaturated hydrophobic chains for gene delivery. *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, **26** (12), 3535–3540. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.05.029.

10. Hattori Y., Nakamura M., Takeuchi N., Tamaki K., Shimizu S., Yoshiike Y., Taguchi M., Ohno H., Ozaki K.-I., Onishi H. Effect of cationic lipid in cationic liposomes on siRNA delivery into the lung by intravenous injection of cationic lipoplex. *J. Drug Targeting*, 2019, **27** (2), 217–227. DOI: 10.1080/1061186X.2018.1502775.
 11. Hattori Y., Shimizu S., Ozaki K.-I., Onishi H. Effect of cationic lipid type in folate-PEG-modified cationic liposomes on folate receptor-mediated siRNA transfection in tumor cells. *Pharmaceutics*, 2019, **11** (4), 181. DOI: 10.3390/pharmaceutics11040181.
 12. Mirgorodskaya A.B., Kushnazarova R.A., Lukashenko S.S., Voloshina A.D., Lenina O.A., Zakharova L.Ya., Sinyashin O.G. Carbamate-bearing surfactants: Micellization, solubilization, and biological activity. *J. Mol. Liq.*, 2018, **269**, 203–210. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.08.007.
 13. Kushnazarova R.A., Mirgorodskaya A.B., Lukashenko S.S., Voloshina A.D., Sapunova A.S., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Zakharova L.Y. Novel cationic surfactants with cleavable carbamate fragment: Tunable morphological behavior, solubilization of hydrophobic drugs and cellular uptake study. *J. Mol. Liq.*, 2020, **318**, 113894. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.113894.
 14. 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. *Nanotechnol.*, 2022, **33** (15), 155103. DOI: 10.1088/1361-6528/ac467d.
 15. Amerkhanova S.K., Voloshina A.D., Mirgorodskaya A.B., Lyubina A.P., Kuznetsova D.A., Kushnazarova R.A., Mikhailov V.A., Zakharova L.Y. Antimicrobial properties and cytotoxic effect of imidazolium geminis with tunable hydrophobicity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22** (23), 13148. DOI: 10.3390/ijms222313148.
 16. Berezovskaya I.V. Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration. *Pharm. Chem. J.*, 2003, **37**, 139–141. DOI: 10.1023/A:1024586630954.
 17. Zhou C., Wang Y. Structure–activity relationship of cationic surfactants as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.*, 2020, **45**, 28–43. DOI: 10.1016/j.cocis.2019.11.009.
 18. Gerba C.P. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, **81**, 464–469. DOI: 10.1128/AEM.02633-14.
 19. Ayala-Torres C., Hernández N., Galeano A., Novoa-Aponte L., Soto C.-Y. Zeta potential as a measure of the surface charge of mycobacterial cells. *Ann. Microbiol.*, 2014, **64**, 1189–1195. DOI: 10.1007/s13213-013-0758-y.
 20. Falk N.A. Surfactants as antimicrobials: a brief overview of microbial interfacial chemistry and surfactant antimicrobial activity. *J. Surfactants Deterg.*, 2019, **22** (5), 1119–1127. DOI: 10.1002/jsde.12293.
 21. Mirgorodskaya A.B., Kushnazarova R.A., Lukashenko S.S., Zakharova L.Ya. Self-assembly of mixed systems based on nonionic and carbamate-bearing cationic surfactants as a tool for fabrication of biocompatible nanocontainers. *J. Mol. Liq.*, 2019, **292**, 111407. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111407.
 22. Clint J.H. Micellization of mixed nonionic surface active agents. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1975, **251**, 1327–1334. DOI: 10.1039/f19757101327.
 23. Salton M.R.J., Kim K.S. Structure. *Medical Microbiology* / Ed. by S. Baron. Galveston (TX): Univ of Texas Medical Branch, 1996. Ch. 2, 1–20.
 24. Biltonen R., Lichtenberg D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chem. Phys. Lipids*, 1993, **64**, 129–142. DOI: 10.1016/0009-3084(93)90062-8.
 25. Samarkina D.A., Gabdrakhmanov D.R., Lukashenko S.S., Khamatgalimov A.R., Kovalenko V.I., Zakharova L.Ya. Cationic amphiphiles bearing imidazole fragment: From aggregation properties to potential in biotechnologies. *Colloids Surf., A*, 2017, **529**, 990–997. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.07.018.
 26. Aguirre-Ramírez M., Silva-Jiménez H., Banat I.M., Díaz De Rienzo M.A. Surfactants: Physicochemical interactions with biological macromolecules. *Biotechnol. Lett.*, 2021, **43** (3), 523–535. DOI: 10.1007/s10529-020-03054-1.
 27. Pizzirusso A., De Nicola A., Sevink G.J.A., Correa A., Cascella M., Kawakatsu T., Rocco M., Zhao Y., Celino M., Milano G. Biomembrane solubilization mechanism by triton X-100: A computational study of the three stage model. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19** (44), 29780–29794. DOI: 10.1039/C7CP03 871B.
- Вклад авторов:**
- ¹Кушназарова Р. А. – проведение исследований, подготовка иллюстраций, написание текста статьи.
²Миргородская А. Б. – разработка концепции научной работы, анализ данных, написание текста статьи.
³Волошина А. Д. – проведение биологических исследований, участие в обсуждении результатов.
⁴Любина А. П. – проведение биологических исследований, обработка результатов.
⁵Кузнецов Д. М. – проведение синтеза катионных ПАВ, редактирование текста статьи.
⁶Ленина О. А. – проведение биологических исследований, обработка результатов.
⁷Захарова Л. Я. – руководство работой, анализ теоретического материала, редактирование текста статьи.

Contribution of the authors:

¹**Kushnazarova R. A.** – conducting research, preparing illustrations, writing the text of the article.

²**Mirgorodskaya A. B.** – development of the concept of scientific work, data analyzing, writing the text of the article.

³**Voloshina A. D.** – conducting biological research, participating in the discussion of the results.

⁴**Lyubina A. P.** – conducting biological research, processing the results.

⁵**Kuznetsov D. M.** – synthesis of cationic surfactants, editing the text of the article.

⁶**Lenina O. A.** – conducting biological research, processing the results.

⁷**Zakharova L. Ya.** – work management, analysis of theoretical material, editing the text of the article.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

¹<https://orcid.org/0000-0003-2111-2530>

²<https://orcid.org/0000-0002-5594-0679>

³<https://orcid.org/0000-0002-3540-8554>

⁴<https://orcid.org/0000-0002-2816-8142>

⁵<https://orcid.org/0000-0002-9572-3708>

⁶<https://orcid.org/0000-0002-3831-7367>

⁷<https://orcid.org/0000-0002-2981-445X>

Поступила 8.04.2022, одобрена 29.04.2022, принята 4.05.2022
Received 8.04.2022, approved 29.04.2022, accepted 4.05.2022