

Лусс Анна Леонидовна

**Наноразмерные агрегаты амфифильного
поли-N-винилпирролидона, как носители
лекарственных веществ**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Москва - 2018

Работа выполнена на кафедре биоматериалов ФГБОУ ВО «Российском химико-технологическом университете имени Д. И. Менделеева»

Научный руководитель профессор, доктор химических наук
Штильман Михаил Исаакович
заведующий кафедрой биоматериалов
РХТУ им. Менделеева

Официальные оппоненты профессор, доктор химических наук
Ямсков Игорь Александрович
главный научный сотрудник
ИНЭОС им. Несмеянова РАН

профессор, доктор химических наук
Валуев Лев Иванович
главный научный сотрудник
ИНХС им. А.В.Топчиева РАН

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт химической
физики им. Н.Н. Семенова Российской
академии наук.

Защита состоится «20» декабря 2018 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д212.204.01 при Российском химико-технологическом университете им. Д.И.Менделеева (125047 Москва, Миусская площадь, д.9) в аудитории 443 (коференц-зал)

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И.Менделеева и на сайте РХТУ им. Менделеева (<http://diss.muctr.ru/author/248/>)

Автореферат разослан _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 212.204.01,
к. х. н., доцент

Биличенко Ю.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Наноразмерные полимерные носители представляют интерес как компоненты лекарственных систем, позволяющих реализовать направленный транспорт биологически активных веществ (БАВ), пролонгировать их действие, предотвратить побочное расходование, снизить токсичность. Их использование является перспективным во многих случаях, в том числе, в терапии заболеваний, связанных с генетически обусловленными нарушениями, онкологическими заболеваниями, в терапии туберкулеза и ряде других заболеваний.

Наиболее хорошо из наноразмерных носителей изучены липосомы, способные доставлять БАВ в клетки по различным механизмам, в частности, за счет слияния липосом с клеточными мембранами, что сопровождается попаданием БАВ в цитоплазму, за счет адсорбции липосом на поверхности клеток, наконец, за счет эндоцитоза различного типа, когда липосома попадает в первичную эндосому клетки.

С другой стороны, разработанные в последние десятилетия наноразмерные мицеллоподобные агрегаты синтетических амфифильных полимеров, в первую очередь поли-N-винилпирролидона, в отношении механизма доставки включенных в них БАВ изучены явно недостаточно. В то же время, значительные преимущества наноразмерных агрегатов амфифильных полимеров перед липосомами - устойчивость к различным разрушающим факторам, в частности, воздействию поликатионов, отсутствие побочного биоразрушения, их высокая стойкость к окислению по сравнению с липидами, низкая токсичность, наконец, значительно большая технологическая доступность амфифильных полимеров, образующих агрегаты в водных средах, определяют необходимость оптимизации их синтеза и требуют выяснения механизмов взаимодействия с живыми клетками.

Целью работы является исследование одностадийного метода синтеза полимерных наноразмерных носителей БАВ на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона с одной концевой длинноцепной алкильной группой, способных к проникновению в живые клетки, а также выявление особенностей этого процесса.

Достижение поставленной цели потребовало **решения следующих задач:**

- исследование метода синтеза амфифильных полимеров N-винилпирролидона с концевыми тиаalkильными группами радикальной полимеризацией, проводимой в присутствии алкилмеркаптанов в качестве передатчиков цепи;
- установление влияния условий проведения полимеризации на химическое строение, среднечисловые молекулярные массы образующихся амфифильных полимеров N-винилпирролидона с концевыми тиаalkильными группами;
- исследование агрегации амфифильных полимеров N-винилпирролидона с концевыми тиаalkильными группами и выявление влияния их строения на критические концентрации мицеллообразования и размер образующихся мицеллоподобных агрегатов;
- исследование процесса включения в такие агрегаты БАВ на примере полифенола куркумина;
- определение влияния размера куркумин-содержащих частиц на механизм их проникновения внутрь живых клеток и характер перераспределения куркумина между клеточными компартментами с использованием различных клеточных культур, а также ингибиторов рецептор-опосредованного и динамин-зависимого эндоцитоза.

Научная новизна:

- впервые исследовано влияние химического строения амфифильных полимеров, получаемых полимеризацией N-винилпирролидона в присутствии н-алкилмеркаптанов содержащих одну концевую тиаalkильную группу, на их критические концентраций мицеллообразования (ККМ) и их молекулярно-массовые характеристики;
- впервые получены мицеллоподобные системы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащие в качестве модельного БАВ полифенол куркумин;
- на примере нефагоцитирующих клеток глиобластомы и фагоцитирующих фибробластов человека в опытах *in vitro* показано что механизм

поглощения куркумина живыми клетками критическим образом зависит от значения среднего размера частиц носителя. Для носителей со средним диаметром большим 50 нм поглощение куркумина происходит вследствие эндоцитоза с попаданием куркумина в фагосомы, тогда как при использовании носителей меньшего размера возможно реализуется механизм слияния с мембраной с проникновением куркумина в цито- и нуклеоплазму.

Практическая значимость результатов диссертации. Разработан подход, определяющий целенаправленную доставку БАВ в цитоплазму и нуклеоплазму путем регулирования размера мицеллоподобных агрегатов амфифильных полимеров N-винилпирролидона, используемых в качестве носителей, что открывает новые перспективы в терапии ряда заболеваний.

Используемые методы исследования. В настоящей работе использованы следующие основные методы исследований полимеров и наноразмерных объектов: ЯМР ^{13}C и ^1H , ИК, УФ спектроскопия, атомно-силовая микроскопия, обратное йодометрическое титрование, осмометрия, анализ траекторий наночастиц (NTA), конфокальная микроскопия, флуоресцентный анализ, *in vitro* тесты на культурах клеток глиобластомы и фибробластов человека.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты исследования синтеза амфифильных полимеров, содержащих одну концевую н-тиоалкильную группу, радикальной полимеризацией N-винилпирролидона в присутствии н-алкилмеркаптанов различного строения, и изучения их строения и физических свойств;

- результаты исследования образования наноразмерных агрегатов амфифильных полимеров N-винилпирролидона путем их самоорганизации в водной среде, и исследование свойств получаемых агрегатов;

- результаты исследования иммобилизации в полученных агрегатах куркумина, как модельного БАВ;

- результаты исследования механизмов проникновения куркумина в клетки фибробластов и глиобластомы человека в опытах *in vitro* при использовании его иммобилизованных форм в носителях различного диаметра.

Личный вклад автора состоит в формулировке целей и задач исследования, постановке эксперимента, обработке и интерпретации полученных результатов, написании публикаций по материалам диссертации, формулировке научных выводов.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечивается применением комплекса современных методов исследования адекватных поставленным задачам. Основные результаты и положения работы были представлены в виде докладов на VIII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2015), Научно-практической конференции "Современные проблемы химической технологии биологически активных веществ" (Москва, 2016), 8-ой и 9-й международной конференциях "BIONANOTOX" (Ираклион, 2017, 2018), МКХТ-2017: Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано одиннадцать печатных работ, три из которых, в изданиях входящих в перечень ВАК и индексируемых Web of Science и Scopus.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 2), обсуждения результатов (глава 3), экспериментальной части (глава 4), выводов, списка литературы и приложения. Общий объем диссертации составляет 121 страницу, включая 33 рисунка и 6 таблиц. Список цитируемой литературы включает 112 библиографических ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

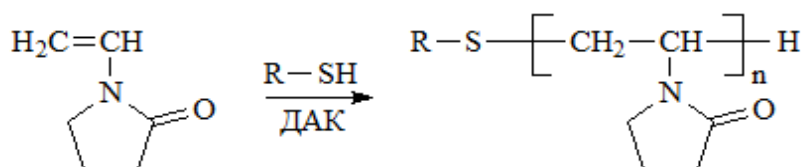
Во введении обоснована актуальность исследования, обозначена цель работы, охарактеризована ее научная новизна и практическая значимость. В обзоре литературы проведен систематический анализ данных литературы по методам синтеза амфифильных полимеров, получению частиц на их основе, а также условиям их проникновения в клеточные культуры. Отмечены основные направления исследований в области полимерных носителей лекарственных средств. В обсуждении результатов представлена интерпретация полученных экспериментальных зависимостей. В экспериментальной части приведены физико-химические характеристики исходных веществ и способы их очистки,

описаны методики получения амфифильных полимеров и наноразмерных частиц на их основе, методы исследования строения и свойств синтезированных полученных объектов и методики работ с клеточными культурами, использованными в настоящей работе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение амфифильных полимеров N-винилпирролидона радикальной полимеризацией в присутствии длинноцепных меркаптанов

Амфифильные полимеры N-винилпирролидона, способные к мицеллообразованию, получали радикальной полимеризацией N-винил-2-пирролидона, используя азобисизобутиронитрил (ДАК) в качестве инициатора и алифатические меркаптаны в качестве передатчиков цепи. В работе были использованы три длинноцепочечных меркаптана – децилмеркаптан, гексадецилмеркаптан и октадецилмеркаптан (схема 1).



Где R = C₁₀H₂₁, C₁₆H₃₃, C₁₈H₃₇

Схема 1. Радикальная полимеризация N-винилпирролидона в присутствии передатчика цепи меркаптана.

Молекулярную массу получаемых продуктов контролировали, изменяя соотношение мономера и передатчика цепи в реакционной системе. Это позволяет регулировать её в интервале от 40000 до 1000 Да.

При этом было установлено, что при низком содержании агента передачи цепи в реакции снижение молекулярной массы в значительной мере зависит от длины алифатического радикала меркаптана.

Введение в реакцию длинноцепочечного октадецилмеркаптана в количестве 0,01 %мольн. позволяет получать высокомолекулярный полимер (M_n=40 кДа), в то время как использование более высокого мольного количества более короткого децилмеркаптана приводит к снижению молекулярной массы до 16 кДа. Гексадецилмеркаптан занимает промежуточное положение и позволяет при низком количестве передатчика цепи получать полимер с молекулярной массой 20 кДа (рисунок 1).

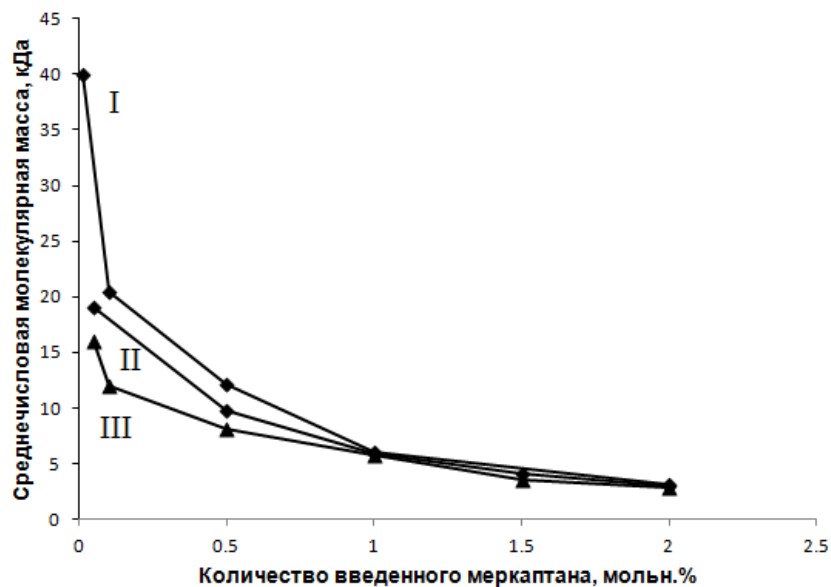


Рисунок 1. Зависимость среднечисловой молекулярной массы амфифильного поли-N-винилпирролидона от количества введенного в систему I - октадецилмеркаптана; II - гексадецилмеркаптана; III - децилмеркаптана.

Наблюдаемый эффект указывает на диффузионный контроль взаимодействия между радикалом роста и меркаптаном. Очевидно, что с ростом молекулярной массы меркаптана его коэффициент диффузии должен убывать, что, по всей видимости, приводит к замедлению акта передачи цепи, и следовательно к увеличению молекулярной массы образующегося теломера. С увеличением концентрации меркаптана в системе снижается длина радикалов роста, взаимодействующих с меркаптаном, что способствует переходу реакции ограничения материальной цепи в кинетическую область и вырождению отмеченного эффекта. Строение полученных полимеров исследовано методами ЯМР ^1H , ^{13}C и ИК спектроскопии и подробно описано в диссертации на примере теломера с концевой тиооктадецильной группой. Так как синтезированные полимеры являются эндкепированными и содержат, как гидрофильный построенный остатками N-винилпирролидона, так и гидрофобный (алифатический) фрагменты, то при концентрации выше определенного значения (ККМ) они образуют агрегаты полимерных молекул (мицеллярные структуры) в водных растворах.

2. Исследование агрегации амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих одну концевую тиоалкильную группу

ККМ полученных полимеров зависит как от длины введенного алифатического радикала, так и от среднечисловой молекулярной массы поливинилпирролидинового фрагмента молекулы (таблица 1). Введение гидрофобных заместителей возрастающей длины в полимеры с приблизительно одинаковой молекулярной массой приводит к закономерному уменьшению ККМ.

Таблица 1.

Критическая концентрация мицеллообразования семителехелевых полимеров N-винилпирролидона.

Строение полимера	Молекулярная масса полимерного фрагмента	Код Полимера	Критическая концентрация агрегации, ммоль/л
ПВП-S-C ₁₈ H ₃₇	1000	ПВП-ОД 1000	0,044
ПВП-S-C ₁₈ H ₃₇	3100	ПВП-ОД 3500	0,054
ПВП-S-C ₁₈ H ₃₇	6050	ПВП-ОД 6000	0,065
ПВП-S-C ₁₈ H ₃₇	12100	ПВП-ОД 12000	0,175
ПВП-S-C ₁₈ H ₃₇	20500	ПВП-ОД 20000	0,339
ПВП-S-C ₁₈ H ₃₇	40000	ПВП-ОД 40000	0,764
ПВП-S-C ₁₀ H ₂₁	3500	ПВП-ДО 4000	1,000
ПВП-S-C ₁₆ H ₃₃	3500	ПВП-ГД 4000	0.242

Так присутствие концевого тиооктадецильного радикала в полимере со среднечисленной молекулярной массой $M_n=3,5$ кДа позволяет получать продукт с ККМ = 0,054 ммоль/л, в то время как аналогичный продукт с тиогексадецильным терминальным заместителем имеет ККМ в 4 раза более высокий (0,242 ммоль/л), а с тиодецильным в 20 раза выше (1,000 ммоль/л). У всех исследованных образцов, независимо от длины тиоалифатического терминального радикала, ККМ возрастает с увеличением среднечисловой молекулярной массы поливинилпирролидинового фрагмента, однако зависимость носит сложный характер (рисунок 2). Вплоть до $M_n = 6$ кДа критическая концентрация мицеллообразования линейно зависит от молекулярной массы, дальнейшее увеличение M_n приводит к более резкому возрастанию ККМ, на графике

наблюдается перегиб, дальнейшее увеличение молекулярной массы вплоть до $M_n = 40$ кДа приводит к значительному возрастанию ККМ.

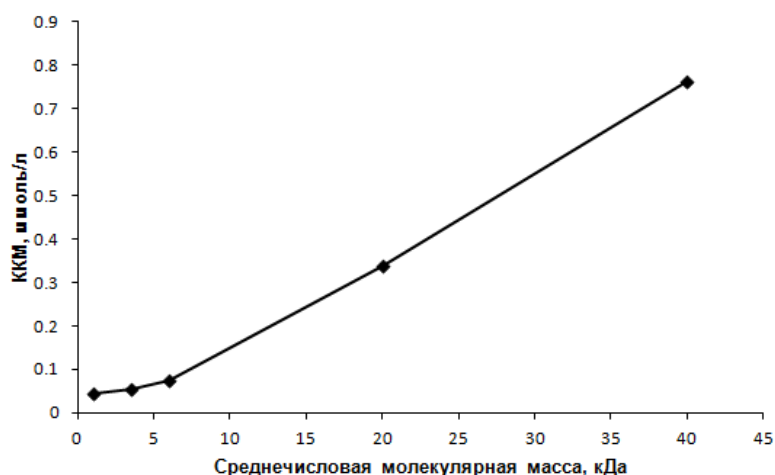


Рисунок 2. Зависимость ККМ амфифильных полимеров от их среднечисловой молекулярной массы (для полимера с концевой теооктадецильной группой).

Это указывает на резкое снижение способности к мицеллообразованию с увеличением молекулярной массы полимеров выше приблизительно 7,0 кДа.

В дальнейшем в работе использовали поли-N-винилпирролидон с концевой теооктадецильной группой. Он имеет наилучшие поверхностно-активные свойства, сочетающие в себе низкую ККМ и линейную зависимость ККМ от молекулярной массы поливинилпирролидинового фрагмента.

3. Получение мицеллоподобных агрегатов на основе поли-N-винилпирролидона с концевой октадецильной группой

Наноразмерные носители с включенным куркумином получали несколькими способами, основными из которых являются суспензионный и эмульсионный методы. При этом использовали теломеры N-винилпирролидона с концевой теооктадецильной группой (ПВП-ОД) различных молекулярных масс (таблица 2). Было выявлено, что молекулярная масса используемых сополимеров мало влияет на ζ -потенциал, который находится в пределах от -2 до -5 мВ и мало отличается от ζ -потенциала плазмолеммы, который может колебаться от -2 до -40 мВ в зависимости от типа клеток.

Основные характеристики носителей нагруженных куркумином.

ПВП-ОД-	Способ получения	Средний гидродинамический диаметр, нм	Мода, нм	Содержание иммобилизованного куркумина, % масс.	ζ -потенциал, мВ
1000	Суспензия	160	89	6,1	-2.76
3500	Суспензия	63	21	8,4	-3.47
6000	Суспензия	73	30	8,5	-4
12000	Суспензия	110	34	8,3	-4.32
6000	Эмульсия	202	167	8,7	-4

Форму полученных наночастиц изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ). Во всех случаях синтезированные частицы имели форму близкую к сферической и сплошное не просвечивающее ядро (рисунок 3).

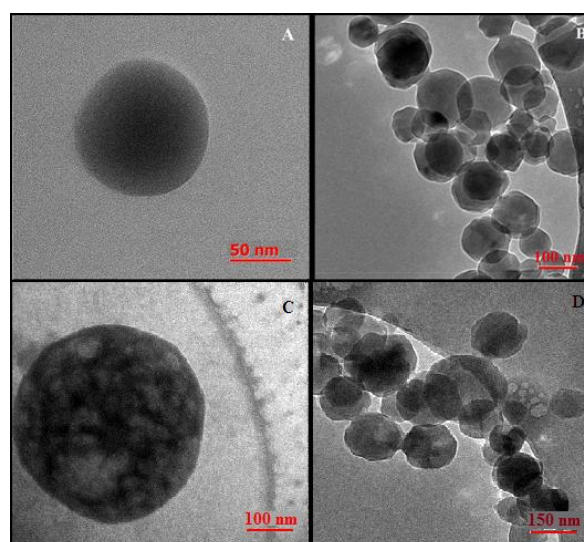


Рисунок 3. ТЭМ микрофотографии наночастиц ПВП-ОД-6000, нагруженных куркумином, полученных суспензионным (А и В) и эмульсионным (С и D) методами.

Определение размера частиц методом АСМ проводили после их нанесения на поверхность слюды. Средние размеры, регистрируемые этими методами, несколько отличаются от приведенных выше (таблица 2), поскольку они основаны не на определении гидродинамического диаметра, а на определении диаметра твердой высушенной частицы распластанной по поверхности слюды. Главным достоинством метода является возможность отличить полые частицы

носителя от наполненных. На рисунке 4 приведены АСМ изображения носителей, полученных суспензионным и эмульсионным методами, которые свидетельствуют о включении куркумина в ядро агрегатов.

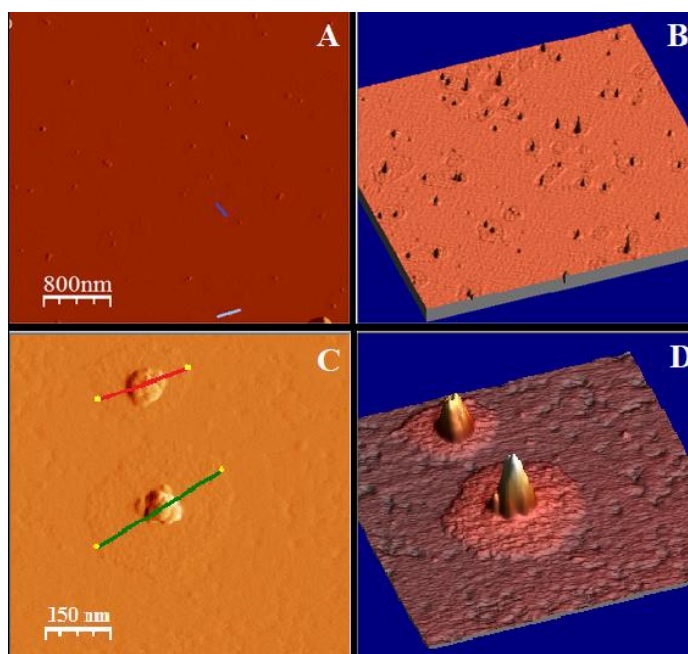


Рисунок 4. Микрофотографии АСМ агрегатов ПВП-ОД-6000, с включенным куркумином, полученных суспензионным (А и В) и эмульсионным методами (С и D): А и С - 2D изображение частиц; В и D - 3D изображение частиц.

В результате проведенных исследований были отобраны носители, содержащие иммобилизованный куркумин для проведения дальнейших биологических испытаний *in vitro* с использованием культур клеток (Табл.3)

В дальнейшем исследовали следующие образцы:

- Суспензию крупных частиц полученных эмульсионным методом (образец А).
- Суспензию мелких частиц полученную суспензионным методом (образец Б).
- Суспензию крупных частиц полученную суспензионным методом и очищенную мембранным центрифугированием от мелких фракций (образец В).

Такой выбор образцов для биологических испытаний позволил во-первых выявить влияние размера частиц носителя на проникновение в клетку на примере образцов большого и малого диаметров, полученных одним и тем же способом (образцы Б и В) а во-вторых, исследовать влияет ли на проникновение в клетку способ получения частиц, когда они имеют практически идентичные

характеристики (образцы А и В). Основные характеристики образцов отобранных для биологических испытаний приведены в таблице 3.

Таблица 3

Препараты на основе ПВП-ОД 6000, использовавшиеся в биологических исследованиях

	Способ получения	Средний гидродинамический диаметр, нм	Мода, нм	Содержание иммобилизованного куркумина, % масс.	ζ -потенциал, мВ
А	Эмульсия	202	167	8,7	-4.00
Б	Суспензия	73	30	8,5	-4.00
В	Суспензия	200	170	7,8	-

В - * Образец (Б) после центрифугирования

3. Исследования проникновения частиц в клеточные культуры *in vitro*

Исследования проникновения наночастиц нагруженных куркумином в живые клетки проводили с использованием двух различных клеточных культур различающихся по их способности к эндоцитозу твердых частиц.

Культура клеток глиобластомы U87 способна преимущественно к рецепторно-опосредованному фагоцитозу. Обычный фагоцитоз сильно замедлен.

Вторая клеточная культура фибробластов человека CRL2429 напротив способна к интенсивному обычному фагоцитозу и не требует для поглощения частиц предварительной маркировки их поверхности белками. Однако в не меньшей степени эта культура способна поглощать маркированные частицы с использованием механизма обычного клатрин-зависимого фагоцитоза.

Вследствие способности куркумина флуоресцировать, оказалось возможным непосредственное наблюдение за его поглощением клеточными культурами. В качестве ингибиторов эндоцитоза использовали Дайнасор, блокирующий динамин-зависимый эндоцитоз путем срезания везикул, образующихся при эндоцитозе и Вортманин – ингибитор рецептор-опосредованного эндоцитоза, действующий как специфический ингибитор клеточных фосфоинозитид-3-киназ (PI3Ks).

При использовании частиц А в отсутствии ингибиторов эндоцитоза, наблюдалось медленное увеличение относительной флуоресценции куркумина во времени, в то время как в клеточных культурах обработанных дайнасором

относительная флуоресценция оставалась постоянной. Так как используемые наночастицы не имеют никаких специфических рецептор-направленных лигандов, то никакого эффекта ингибирования в присутствии вортманнина, который блокирует рецептор-опосредованный эндоцитоз, не наблюдалось. Поскольку время поглощения составляло около 60 минут хорошо виден блокирующий эффект дайносора для обеих клеточных культур (рисунок 5). Таким образом, присутствие дайносора во многом блокирует поглощение куркумин-нагруженных мицелл А для обеих клеточных культур. Эти результаты говорят о том, что механизм поглощения частиц А, главным образом, протекает через динамин-зависимый эндоцитозный путь. Последнее обстоятельство также подтверждается наличием значительного количества куркумина во внутреннем цитозольном компартменте клеток U87 и CRL 2429 в то время как в ядре отсутствует свечение в куркуминовом канале, что свидетельствует об отсутствии проникновения куркумина в ядро клеток (рисунок 6).

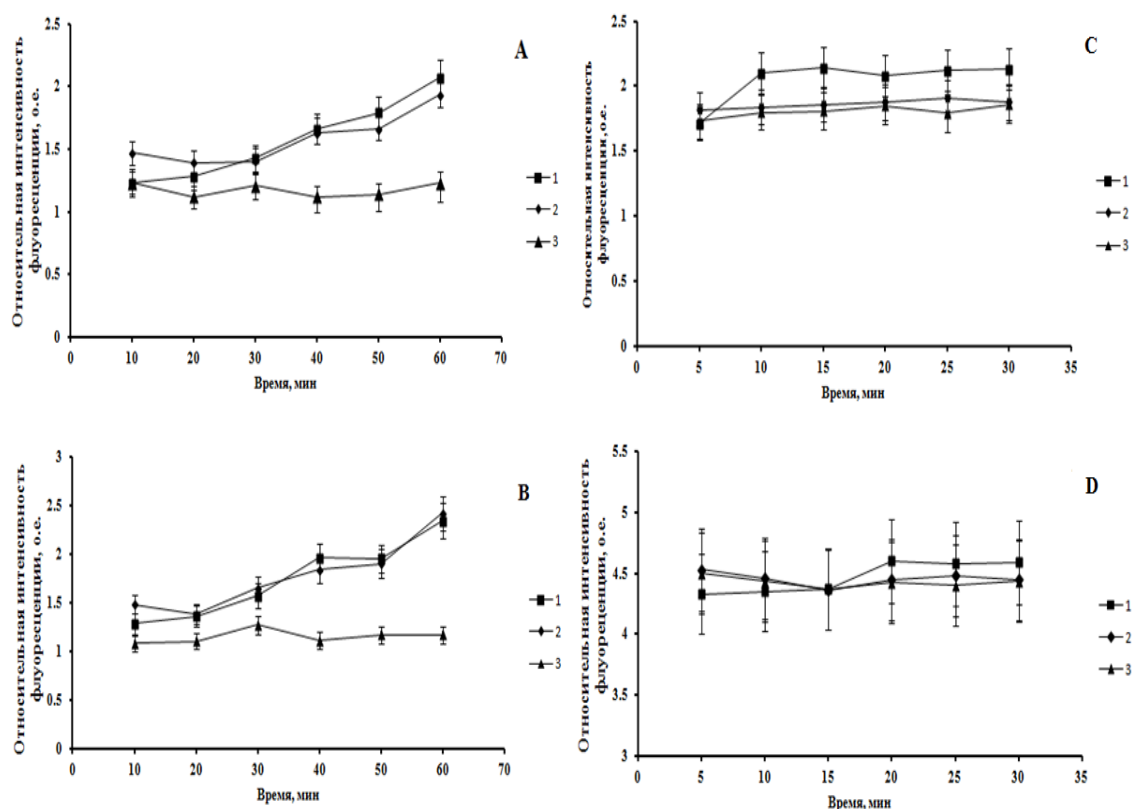


Рисунок 5. Динамика *in vitro* поглощения содержащих включенный куркумин наночастиц клеточными линиями U87 (А и В) и CRL 2429 (С и D). А и С показывают поглощение наночастиц А; В и D соответствуют наночастицам Б. 1 - поглощение без ингибиторов эндоцитоза; 2 - поглощение в присутствии Вортманнина; 3 - поглощение в присутствии дайносора.

С другой стороны, при использовании носителей Б со средним диаметром 73 нм, куркумин поглощается U87 и CRL 2429 клеточными линиями независимо от наличия ингибиторов. Также следует заметить, что максимум относительной флуоресценции достигается очень быстро, в течение 5 минут для обеих клеточных культур, как в присутствии дайнасора, так и вортманнина. К тому же, в этом случае куркумин гомогенно распределен по всей клетке, включая ядро (рис. 6). Такое поведение означает изменение механизма поглощения куркумина клеточными культурами.

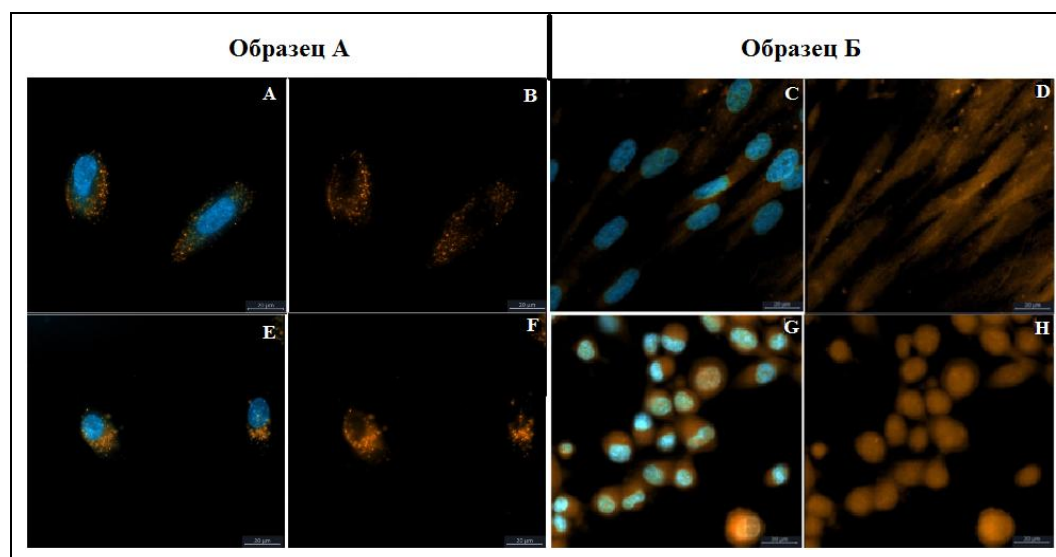


Рисунок 6. Флуоресцентные фотографии, показывающие CRL 2429(A - D) и U 87 (E - H) клетки после инкубации с куркумин-нагруженным ПВП-ОД-6000 частицами.

Для однозначного подтверждения предположения о том, что частицы носителя малого диаметра содержащие куркумин проникают во все компартменты клеток, включая ядро, фракцию частиц Б с диаметром более 50 нм отфильтровывали, используя центрифужные фильтры с отсечением по молекулярной массе 30 кДа.

Агрегаты с диаметром более 50 нм (образец В), полученные после фильтрации, были использованы в экспериментах *in vitro* на клеточных культурах U87 и CRL 2429 без использования ингибиторов эндоцитоза. Динамика поглощения таких частиц оказалась схожей с наблюдаемой для частиц А. При этом куркумин больше не проникает в ядра клеток CRL 2429 фибробластов и U87 глиобластомы, а захватываются везикулами (рисунок 7).

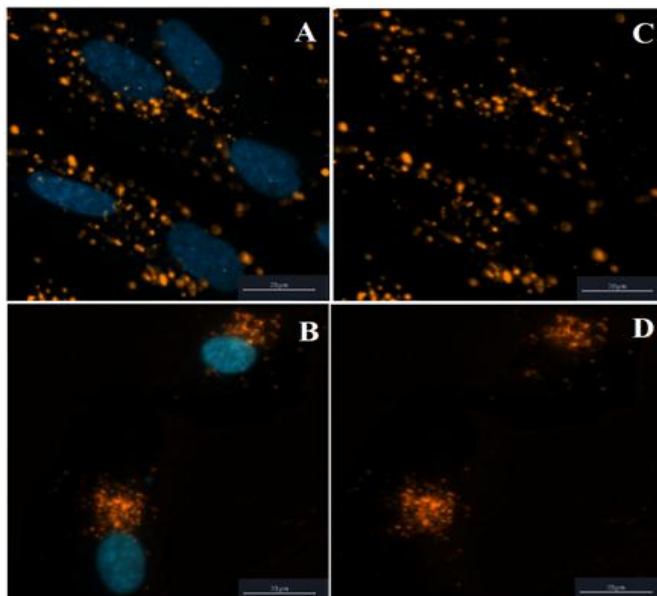


Рисунок 7. Флуоресцентные фотографии CRL 2429 (А и С) и U87 (В и D) клеточных культур после инкубации с куркумин-нагруженными ПВП-ОД-6000 частицам (образец В).

В качестве возможных механизмов проникновения частиц малого диаметра можно предположить следующие: проникновение за счет диффузии, слияние полимерной оболочки с мембраной клетки или образование пор. Вероятно также, что несколько механизмов могут реализовываться одновременно.

Вместе с тем, сам факт проникновения куркумина в ядра клеток обеих исследованных клеточных культур U87 и CRL 2429 представляет принципиальный результат, обеспечивающий значительные перспективы использования разработанного подхода в лечении генетически обусловленных заболеваний. Кроме того, открывается возможность доставки БАВ без ферментативной деструкции в лизосомах во все компартменты клетки.

ВЫВОДЫ

1. Радикальной полимеризацией N-винилпирролидона с использованием насыщенных меркаптанов нормального строения в качестве передатчиков цепи получены амфифильные полимеры с молекулярной массой от 1 до 40 кДа, содержащие одну концевую тиоалкильную группу, проявляющие поверхностно-активные свойства и перспективные для получения наноразмерных носителей лекарственных средств,.

2. Выявлены условия получения и фракционирования по размерам наноносителей на основе поверхностно-активных производных поли-N-винилпирролидона с концевой тиооктадецильной группой, содержащих внутри

модельное физиологически активное соединение куркумин. Они характеризующиеся узким распределением по размерам и получены двух основных типов: носители среднего диаметра 200-50 нм и носители малого диаметра (50-20 нм).

3. Определены основные характеристики наноносителей с использованием оптических и физических методов визуализации формы и размера, а также с помощью анализа траекторий их движения в жидкости. Выявлено, что независимо от среднего размера и способа получения они, имеют форму близкую к сферической и характеризуются малым по величине отрицательным значением ζ -потенциала.

4. В экспериментах на двух культурах клеток изучено взаимодействие синтезированных наноразмерных носителей с живыми клетками организма человека с использованием куркумина и Hoechst33258 в качестве флуоресцентных меток, вортманнина и дайносола в качестве ингибиторов фагоцитоза. Выявлена зависимость механизма и скорости проникновения внутрь клеток и органелл от размера частиц носителя. Показано, что наноразмерные системы со средним диаметром от 200 до 50 нм поглощаются клетками культур тканей за счет фагоцитоза и проникают через плазмолемму внутри фагосом. Внутри большинства органелл они не проникают. Носители малого гидродинамического радиуса от 20 до 50 нм проникают через плазмолемму значительно быстрее, минуя механизм фагоцитоза. Они проникают внутрь большинства органелл, включая ядро живой клетки.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Кусков А.Н., Куликов П.П., Лусс А.Л., Горячая А.В., Штильман М.И. Получение полимерных наночастиц самоорганизацией производных амфифильного поли-N-винилпирролидона в водной среде // Журнал прикладной химии. 2016. Т.89. №9. С. 1461-1468.

2. Luss A.L., Andersen C.L., Benito I.G., Marzo R.C., Medina Z.H., Rosenlund M.B., Romme S.B., Kulikov P.P., Pennisi C.P., Shtilman M.I., Gurevich L. Drug Delivery Platform Based on Amphiphilic Poly-N-Vinyl-2-Pyrrolidone: The Role of Size Distribution in Cellular Uptake// Biophysical Journal. 2018. V. 114, I. 3. P. 278-279.

3. Luss A.L., Kulikov P.P., Romme S.B., Andersen C.L., Pennisi C.P., Docea A.O., Kuskov A.N., Velonia K., Mezhev Ya.O., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M., Gurevich L. Nanosized carriers based on amphiphilic poly-N-vinyl-2-pyrrolidone for intranuclear drug delivery // Nanomedicine.2018. V. 13, I. 7, P 703-715.

4. Лусс А.Л., Куликов П.П., Кусков А.Н., Штильман М.И. Амфифильные полимерные наночастицы для генного транспорта на основе сополимеров N-

винилпирролидона // Успехи в химии и химической технологии, Т. 31, № 11(192), С. 64-66

5. Куликов П.П., Кусков А.Н., Лусс А.Л., Штильман М.И. Наноразмерная система доставки лекарственных препаратов на основе полигидроксиалканоатов и амфифильных полимеров поли(N-винил-2-пирролидона) // Тез. докл. VIII Московский международный конгресс «Биотехнология. Состояние и перспективы развития». Москва, 2015. С. 242-243.

6. Лусс А.Л., Куликов П.П., Кусков А.Н., Штильман М.И. Получение наноразмерных частиц на основе амфифильного поли-N-винилпирролидона // Тез. докл. Научно-практическая конференция «Современные проблемы химической технологии биологически активных веществ». Москва, 2016. С. 137-139

7. Luss A.L., Kulikov P.P., Romme S.B., Pennisi C.P., Goryachaya A.V., Kuskov A.N., Fojan P., Gurevich L., Shtilman M.I. Polymeric nanoparticles based on amphiphilic PVP for delivery of active substances into the cell's nuclei // Materials of the 8th International Conference "Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues". Heraklion, Greece, 2017. P05.

8. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Luss A.L., Gromov A.S., Goryachaya A.V., Shtilman M.I. N-Vinylpyrrolidone amphiphilic polymers: self-assembly in aqueous media and interaction with blood components // Materials of the 8th International Conference "Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues". Heraklion, Greece, 2017. P10.

9. Лусс А.Л., Куликов П.П., Кусков А.Н., Штильман М.И. Амфифильные полимерные наночастицы для генного транспорта на основе сополимеров N-винилпирролидона // Тез. докл. МКХТ-2017: XIII Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии. Москва, 2017.

10. Luss A.L., Kulikov P.P., Goryachaya A.V., Kuskov A.N., Gurevich L., Pennisi C.P., Shtilman M.I., Mezhev Ya.O. In vitro uptake study nanoparticles based on amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone by different types of cell cultures. // Materials of the 9th International Conference "Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues". Heraklion, Greece, 2018. P30.

11. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Luss A.L., Goryachaya A.V., Shtilman M.I. Development of self-assembled amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as a stable drug delivery system // Materials of the 9th International Conference "Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues". Heraklion, Greece, 2018. P25.