

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Кусков Андрей Николаевич

**Амфифильные полимеры N-винилпирролидона
и наноразмерные лекарственные формы на их
основе**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени

доктора химических наук

Научный консультант
доктор химических наук, профессор
Штильман М.И.

Москва – 2017 год

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	10
ВВЕДЕНИЕ.....	12
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1 Наноразмерные частицы.....	18
1.2 Амфифильные полимеры и их роль в создании наночастиц.....	19
1.3 Агрегация амфифильных полимеров в водных средах.....	21
1.4 Типичное строение блоков амфифильных полимеров.....	25
1.5 Методы синтеза амфифильных полимеров.....	26
1.5.1 Ионная полимеризация.....	28
1.5.1.1 Анионная полимеризация.....	28
1.5.1.2 Катионная полимеризация.....	28
1.5.2 Радикальные процессы.....	29
1.5.2.1 Использование нитроксидных свободных радикалов.....	29
1.5.2.2 Использование функциональных инициаторов.....	29
1.5.2.3 Радикальная полимеризация с использованием передатчиков цепи.....	30
1.6 Методы получения полимерных наночастиц.....	31
1.6.1 Методы получения наночастиц из предварительно синтезированных полимеров.....	32
1.6.1.1 Метод выпаривания растворителя.....	33
1.6.1.2 Метод эмульгирования / диффузии растворителя.....	35
1.6.1.3 Метод высаливания.....	36
1.6.1.4 Диализный метод.....	37
1.6.1.5 Использование сверхкритических жидкостей.....	37
1.6.1.6 Сшивание водорастворимых полимеров.....	38
1.6.2 Методы получения наночастиц полимеризацией мономеров.....	38
1.6.2.1 Эмульсионная полимеризация.....	39
1.6.2.2 Межфазная полимеризация.....	40

1.7	Применение полимерных наночастиц в медицине, фармацевтике и биотехнологии.....	41
1.7.1	Общие требования к полимерам, входящим в состав наночастиц биомедицинского применения.....	41
1.7.1.1	Биосовместимость полимеров.....	42
1.7.1.2	Выводимость полимера из организма.....	43
1.7.1.3	Особенности строения полимеров.....	44
1.7.2	Требования, предъявляемые к полимерным наночастицам.....	46
1.7.2.1	Заряд и гидрофильность.....	47
1.7.2.2	Размер полимерных систем доставки.....	47
1.7.2.3	Скорость выделения активного вещества из полимерных наночастиц.....	49
1.7.3	Области применения полимерных наночастиц в качестве систем доставки биологически-активных веществ.....	50
1.7.3.1	Противоопухолевая терапия.....	52
1.7.3.2	Доставка и защита белковых молекул.....	53
1.7.3.3	Препараты для лечения бактериальных и грибковых заболеваний.....	55
1.7.3.4	Иммобилизация других лекарственных веществ.....	55
1.7.3.5	Биомедицинская диагностика.....	56
2	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	60
2.1	Обоснование выбранных методов.....	60
2.2	Получение и исследование амфифильных полимеров N-винилпирролидона.....	65
2.2.1	Двухстадийный метод получения амфифильных полимеров N-винилпирролидона.....	65
2.2.1.1	Изучение механизма полимеризации N-винилпирролидона в присутствии меркаптанов.....	65
2.2.1.2	Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии меркаптанов.....	76

2.2.1.3	Синтез амфифильных производных полимеров N-винилпирролидона.....	80
2.2.1.4	Исследование строения амфифильных полимеров N-винилпирролидона, полученных двухстадийным методом	83
2.2.2	Двухстадийный метод получения амфифильных сополимеров N-винилпирролидона, содержащих дополнительные функциональные группы.....	87
2.2.2.1	Сополимеризация N-винилпирролидона с п-аллилоксибензальдегидом.....	88
2.2.2.2	Синтез амфифильных производных сополимеров N-винилпирролидона с боковыми альдегидными группами.....	98
2.2.2.3	Исследование водных растворов сополимеров N-винилпирролидона с боковыми альдегидными группами и их амфифильных производных.....	100
2.2.3	Одностадийный метод получения амфифильных полимеров N-винилпирролидона.....	102
2.2.3.1	Изучение механизма полимеризации N-винилпирролидона в присутствии хлорангидридов карбоновых кислот.....	103
2.2.3.2	Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии хлорангидридов карбоновых кислот.....	116
2.2.3.3	Исследование строения амфифильных полимеров N-винилпирролидона, полученных с использованием хлорангидридов.....	121
2.2.4	Получение функциональных производных амфифильных полимеров N-винилпирролидона, синтезированных с использованием одностадийного метода.....	124
2.2.4.1	Синтез амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих эпоксидные группы.....	125
2.2.4.2	Синтез амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих аминокислотные группы.....	127

2.3	Получение и исследование наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона.....	131
2.3.1	Изучение растворимости амфифильных полимеров.....	131
2.3.2	Исследование поведения амфифильных полимеров в водных средах.....	133
2.3.3	Определение критической концентрации агрегации амфифильных полимеров N-винилпирролидона.....	136
2.3.4	Получение и характеристика полимерных наночастиц.....	141
2.3.5	Исследование свойств полимерных наночастиц.....	150
2.3.5.1	Изучение структурной организации полимерных наночастиц	150
2.3.5.2	Изучение механической устойчивости полимерных наночастиц.....	152
2.3.5.3	Изучение термической устойчивости полимерных наночастиц.....	153
2.4	Исследование биосовместимости амфифильных полимеров N-винилпирролидона и наночастиц на их основе.....	156
2.4.1	Изучение взаимодействия амфифильных полимеров N-винилпирролидона с компонентами крови.....	156
2.4.1.1	Исследование устойчивости полимерных наночастиц в присутствии компонентов крови.....	157
2.4.1.2	Изучение литического действия амфифильных полимеров на компоненты крови.....	158
2.4.1.3	Изучение активации системы комплемента в присутствии амфифильных полимеров.....	159
2.4.1.4	Изучение влияния амфифильных полимеров N-винилпирролидона на реологические свойства крови.....	160
2.4.2	Исследование цитотоксичности амфифильных полимеров N-винилпирролидона.....	164
2.4.3	Исследование токсичности амфифильных полимеров N-винилпирролидона.....	166

2.5	Разработка и исследование наноразмерных полимерных форм биологически активных и лекарственных веществ.....	172
2.5.1	Разработка и исследование модифицированных амфифильными полимерами N-винилпирролидона липосомальных форм биологически активных веществ.....	173
2.5.1.1	Получение модифицированных амфифильными полимерами N-винилпирролидона липосом.....	176
2.5.1.2	Исследование влияния амфифильных полимеров на свойства модифицированных липосом.....	178
2.5.1.3	Изучение стабильности липосом, модифицированных амфифильными полимерами.....	183
2.5.1.4	Исследование поведения липосом, модифицированных амфифильными полимерами, в условиях <i>in vitro</i>	186
2.5.1.5	Исследование поведения липосом, модифицированных амфифильными полимерами, в условиях <i>in vivo</i>	188
2.5.1.6	Получение и исследование модифицированной липосомальной формы противогрибковых антибиотиков.....	191
2.5.2	Разработка и исследование наносомальных полимерных форм биологически активных веществ.....	198
2.5.2.1	Получение и исследование наноразмерных полимерных форм биологически активных белков.....	199
2.5.2.2	Получение и исследование наносомальной стабилизированной формы фактора свертывания крови IX.....	209
2.5.2.3	Получение и исследование наноразмерных полимерных форм противовоспалительных лекарственных веществ	221
3	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	254
3.1	Материалы.....	254
3.2	Методы.....	256
3.2.1	Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии меркаптосоединений.....	256

3.2.2	Изучение кинетики полимеризации N винилпирролидона в присутствии меркаптосоединений.....	256
3.2.3	Синтез амфифильных производных полимеров, содержащих концевую карбоксильную группу.....	258
3.2.4	Синтез амфифильных производных полимеров, содержащих концевую аминогруппу.....	259
3.2.5	Синтез п-аллилоксибензальдегида.....	259
3.2.6	Сополимеризация N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида.....	260
3.2.7	Синтез амфифильных производных сополимеров N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида.....	260
3.2.8	Измерение мутности растворов сополимеров N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида.....	261
3.2.9	Синтез хлорангидрида стеариновой кислоты.....	261
3.2.10	Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты.....	261
3.2.11	Изучение кинетики полимеризации N винилпирролидона в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты.....	262
3.2.12	Эпоксидирование амфифильных полимеров N-винилпирролидона.....	263
3.2.13	Модификация эпоксидированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона аминокислотами.....	264
3.2.14	Анализ полимеров и сополимеров N-винилпирролидона и их амфифильных и функциональных производных.....	264
3.2.14.1	Определение содержания карбоксильных групп и молекулярной массы полимеров.....	264
3.2.14.2	Определение содержания аминогрупп и молекулярной массы полимеров.....	265
3.2.14.3	Определение содержания кетонных групп и молекулярной массы полимеров.....	265

3.2.14.4	Определение молекулярной массы полимеров методом паровой осмометрии.....	266
3.2.14.5	Определение содержания альдегидных групп в сополимерах.....	266
3.2.14.6	Определение содержания эпоксидных групп в эпоксидированных полимерах.....	267
3.2.14.7	Определение содержания аминогрупп в модифицированных аминокислотами полимерах.....	267
3.2.14.8	Определение содержания карбоксильных групп в модифицированных аминокислотами полимерах.....	268
3.2.14.9	Спектральные методы исследования строения полимеров....	268
3.2.15	Определение критической концентрации агрегации амфифильных полимеров.....	269
3.2.16	Получение полимерных наночастиц методом прямого растворения.....	270
3.2.17	Получение полимерных наночастиц диализным методом.....	270
3.2.18	Получение полимерных наночастиц эмульсионным методом....	271
3.2.19	Получение полимерных наночастиц суспензионным методом....	271
3.2.20	Измерение размеров полимерных наночастиц.....	272
3.2.21	Измерение ζ -потенциала полимерных наночастиц.....	273
3.2.22	Определение морфологии и визуализация полимерных наночастиц.....	273
3.2.23	Изучение механической устойчивости полимерных наночастиц.....	274
3.2.24	Исследование структурной организации смешанных полимер-липидных мембран.....	274
3.2.25	Получение липосом, модифицированных амфифильными полимерами N-винилпирролидона.....	274
3.2.26	Исследование стабильности модифицированных липосом.....	275
3.2.27	Включение фунгицидов в липосомы, модифицированные амфифильными полимерами.....	276

3.2.28	Исследование стабильности модифицированных липосом с фунгицидами.....	277
3.2.29	Количественное определение включенного в полимерные наночастицы биологически активного вещества.....	277
3.2.30	Изучение кумулятивной кинетики выделения БАВ из полимерных наночастиц.....	278
3.2.31	Изучение устойчивости полимерных наночастиц в присутствии сыворотки крови.....	278
3.2.32	Исследование литического действия амфифильных полимеров на компоненты крови.....	279
3.2.33	Исследование активации системы комплемента в присутствии амфифильных полимеров.....	280
3.2.34	Исследование влияния амфифильных полимеров на реологические свойства крови.....	281
3.2.35	Оценка цитотоксичности полимеров и полимерных наночастиц.....	283
3.2.36	Оценка острой токсичности амфифильных полимеров и полимерных наночастиц.....	285
3.2.37	Определение специфической активности фактора IX свертывания крови в виде его полимерной наноразмерной формы.....	286
3.2.38	Исследование влияния полимерной наносомальной формы фактора IX на его выработку организмом в условиях <i>in vivo</i>	289
3.2.39	Оценка биораспределения и биодоступности наносомальной полимерной формы индометацина.....	290
3.2.40	Оценка противовоспалительного действия лекарственной формы индометацина на основе полимерных наночастиц.....	291
3.2.41	Оценка ульцерогенности полимерной наноформы индометацина.....	292
	ВЫВОДЫ.....	294
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	296

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАВ – биологически активное вещество

ПН – полимерная наночастица

НЧ – наноразмерные частицы (наночастицы)

ВП – N-винилпирролидон

ПВП – поли-N-винилпирролидон

Амф-ПВП – амфифильное производное поли-N-винилпирролидона

ЭПВП – эпоксицианированный поли-N-винилпирролидон

ПЭО – полиэтиленоксид

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПВС – поливиниловый спирт

ППО – полипропиленоксид

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ККА – критическая концентрация агрегации

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДАК – динитрил азоизомасляной кислоты

МУК – меркаптоуксусная кислота

МПК – меркаптопропионовая кислота

МЭА – 2-меркаптоэтиламин

ДЦГК – N,N'-дициклогексилкарбодиимид

ДЦГМ – N,N'-дициклогексилмочевина

ИК – инфракрасный

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

м.д. – миллионная доля

ММ – молекулярная масса

M_n – среднечисловая молекулярная масса

M_w – средневесовая молекулярная масса

ОД – октадецил

ГД – гексадецил
ДД – додецил
Окт – октил
Гек – гексил
Гек₂ – дигексил
Окт₂ – диоктил
ОД₂ – дикотадецил
Ст – стеарил
Гли – глицин
пАОБА – пара-аллилоксибензальдегид
ХАСК – хлорангидрид стеариновой кислоты
АК – аминокислота
ДФГТ – дифенилгексатриен
ДМСО – диметилсульфоксид
ДМФА – диметилформамид
ТГФ – тетрагидрофуран
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
КПК – классический путь активации системы комплемента
АПК – альтернативный путь активации системы комплемента
ГЕК – гемолитическая емкость комплемента
ИНФ – интерферон
ЛД – смертельная доза
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
Л – липосома
ПК – поликатион
Нис – нистатин
АмфВ – амфотерицин В
ВВИ - соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк
Инд – индометацин
ПАФ – полный адъювант Фрейнда

ВВЕДЕНИЕ

Наноразмерные системы в последнее время привлекают широкое внимание в качестве препаратов, используемых в различных областях медицины и биотехнологии.

Особую актуальность при этом представляет использование в качестве носителей и модификаторов биологически активных веществ (БАВ) наноразмерных систем, получаемых на основе полимеров. В том числе это относится к таким средствам доставки БАВ, содержащим полимерные компоненты, как липосомы, модифицированные амфифильными полимерами, и полимерные наночастицы (ПН).

В настоящее время медицина располагает широким арсеналом лекарственных субстанций, однако в большом количестве случаев их потенциальная эффективность значительно снижается при применении. Наиболее часто для повышения эффективности лечения используют повышенные дозы БАВ. Это приводит к повышению неспецифической токсичности БАВ, а в случаях с сильнодействующими БАВ, побочные эффекты могут превышать терапевтическую эффективность препарата. Создание новых полимерных наноразмерных форм БАВ является перспективным решением данной проблемы.

Благодаря особенностям физико-химических свойств и строения макромолекул полимерные наноносители позволяют обеспечить пролонгированное действие и контролируемое выделение БАВ, и повысить локальную концентрацию терапевтического агента в очаге поражения.

Тем не менее, общим недостатком используемых в медико-биологических областях полимеров остается низкая биосовместимость и избирательность действия лекарственных форм на их основе, а также сложность регулирования процесса иммобилизации биологически активных веществ.

Это подтверждает необходимость и актуальность создания новых амфифильных полимеров, обладающих более высокой степенью безвредности и биосовместимостью, и способных в мягких условиях формировать наночастицы и иммобилизовать БАВ. В том числе это относится к производным

низкомолекулярных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона (ВП), широко используемых в составе различных медицинских изделий и препаратов.

Общая цель настоящей работы состояла в создании научных основ и методологических подходов к получению амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона с контролируемым строением гидрофильной и гидрофобной частей, и к формированию на их основе безвредных, биосовместимых наноразмерных носителей для применения в биомедицинских областях. Для достижения данной цели в работе необходимо было решить следующие основные задачи:

– разработать и оптимизировать методы синтеза амфифильных полимеров ВП, содержащих одну концевую алифатическую гидрофобную группу различного строения и отличающихся молекулярной массой полимерного фрагмента.

– разработать и оптимизировать способы получения наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона (ПВП), в том числе содержащих функциональные группы различной природы, и липосом, модифицированных амфифильными полимерами.

– исследовать взаимодействие амфифильных полимеров N-винилпирролидона, наночастиц на их основе, и липосом, модифицированных полимерами, с различными биологическими объектами, клеточными системами и опытными животными в условиях *in vitro* и *in vivo*, определить их биосовместимость и токсикологические характеристики.

– исследовать взаимодействие амфифильных полимеров N-винилпирролидона разного строения с низкомолекулярными (нистатин, амфотерицин В, индометацин) и высокомолекулярными (соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк, фактор крови IX) биологически активными соединениями. Изучить влияние строения амфифильных полимеров ВП, методов и условий иммобилизации различных биологически активных и лекарственных субстанций на степень и эффективность их включения.

– выявить влияние иммобилизации биологически активных и лекарственных веществ в наноразмерные формы на основе амфифильных

полимеров N-винилпирролидона на их биосовместимость, параметры токсичности, и эффективность действия в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна представленной работы в рамках специальности «Высокомолекулярные соединения» состоит в разработке стратегии получения новых амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона, включающей пути регулирования молекулярной массы гидрофильного фрагмента полимера, природы алифатического гидрофобного фрагмента и массового соотношения гидрофобной и гидрофильной частей синтезируемых полимеров для оптимизации свойств лекарственных форм, созданных на их основе.

Разработаны методы синтеза новых функциональных амфифильных полимеров, содержащих эпоксидные, альдегидные, аминокислотные и другие группы и показана возможность их использования для получения полимерных наночастиц и для модификации липосомальных мембран.

Установлено, что синтезированные амфифильные производные N-винилпирролидона при определенных концентрациях самопроизвольно образуют в водных средах организованные наноразмерные структуры. Показано, что размеры образующихся ассоциатов полимерных молекул находятся в нанометровом диапазоне и имеют сферическую форму.

Научная новизна данной работы в рамках специальности «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» заключается в получении на основе синтезированных амфифильных полимеров новых наноразмерных иммобилизованных форм БАВ – полимерных наночастиц и липосом, модифицированных амфифильными полимерами.

Впервые проведено всестороннее исследование липосом, модифицированных амфифильными производными поли-N-винилпирролидона. Установлено, что модификация липосомальных мембран амфифильными полимерами ведет к увеличению стабильности модифицированных липосом при хранении и против воздействия различных дестабилизирующих факторов (циклы заморозки-разморозки, поликатионы, детергенты), увеличению времени их циркуляции в крови и уменьшению накопления в печени экспериментальных

животных, а также к повышению эффективности включенных в них противогрибковых антибиотиков нистатина и амфотерицина В в условиях *in vitro*.

Впервые получены наноразмерные полимерные частицы из амфифильных полимеров N-винилпирролидона с высокой стабильностью при хранении, лиофилизации и при взаимодействии с биологическими объектами, компонентами крови, клетками и тканями организма в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Показано, что наноразмерные частицы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона могут быть использованы в качестве носителей БАВ различной природы с высокой эффективностью. Получены полимерные наноносители, содержащие соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк и его производные (препараты, обладающие антиканцерогенным действием), фактор крови IX, противовоспалительный препарат индометацин.

В работе проведено исследование цитотоксичности, гемотоксичности и острой токсичности полученных амфифильных полимеров ВП и наночастиц на их основе в условиях *in vitro* и *in vivo* и показана их высокая биосовместимость.

В условиях *in vitro* и *in vivo* установлены преимущества новых полимерных наноразмерных форм с иммобилизованными БАВ по сравнению с неиммобилизованными БАВ, заключающиеся в повышенной или сравнимой эффективности, пролонгированном профиле выделения и пониженной токсичности по отношению к культурам клеток или в организме экспериментальных животных.

Результаты работы являются теоретической и практической основой для дальнейших разработок в области фармакологии, биотехнологии и полимерной химии с использованием амфифильных полимеров ВП контролируемого строения в качестве основы новых систем доставки БАВ и лекарственных форм.

Практическая значимость работы заключается в создании и подтверждении возможности применения простого и доступного способа получения наноразмерных суспензионных лекарственных форм и систем доставки БАВ, где в качестве носителей выступают самоорганизующиеся системы на основе новых амфифильных полимеров ВП различного контролируемого строения.

Показана возможность повышения специфической активности, снижения терапевтических доз и достижение пролонгированного действия новых полимерных систем доставки на основе амфифильного ПВП с иммобилизованными биологически активными веществами по сравнению с неиммобилизованными формами этих же БАВ.

Применение водных суспензий наночастиц амфифильного ПВП дает возможность создавать инъекционные, трансмукозальные, и парентеральные формы введения для плохорастворимых и нерастворимых БАВ.

Исходя из выше изложенного, на защиту выносятся следующие положения:

– методы получения новых амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона, в том числе функциональных, с контролируемым массовым соотношением гидрофильной и гидрофобной частей.

– формирование монодисперсных полимерных наночастиц из амфифильных полимеров ВП и липосом, модифицированных амфифильными полимерами, методами самопроизвольной ассоциации молекул полимера в водных средах.

– научные подходы, позволяющие с помощью полимерных наночастиц и липосом, модифицированных полимерами, эффективно иммобилизовать различные биологически активные вещества, повышая их стабильность и биосовместимость в организме, эффективность их действия и снижая их токсичность.

– регулирование свойств полимерных лекарственных форм, таких как размер наночастиц и распределение их по размерам, эффективность иммобилизации БАВ, путем изменения строения амфифильных полимеров, их концентрации, массового соотношения с БАВ и метода получения наноразмерных частиц-носителей (эмульсионный метод, диализ, прямое растворение).

– пути реализации процессов включения низкомолекулярных и высокомолекулярный биологически активных и лекарственных веществ различной природы в полимерные наноносители, обеспечивающие высокую степень включения, уровень безвредности, биосовместимость и биологическую активность получаемой системы доставки БАВ.

Основные положения диссертации докладывались на международных и всероссийских научных конференциях и семинарах (с опубликованием тезисов), в их числе: Международная конференция молодых ученых «От фундаментальной науки – к новым технологиям. Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок» (Москва-Тверь, 2001); IX International Symposium on Biomedical Science and Technology (Antalya, Turkey, 2002); 6th International Conference “Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery” (London, England, 2003); European Material Research Society Fall Meeting (Warsaw, Poland, 2003, 2004); European Polymer Congress (Москва, 2005); 3rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (Vienna, Austria, 2006); International Conference “New Polymers and Radioprotectors for Biology and Medicine”, (Yerevan, Republic of Armenia, 2007); 35th Annual Meeting of Controlled Release Society (New York, USA, 2008); XVI International conference on bioencapsulation (Dublin, Ireland, 2008); International Symposium “Euro-Eco-2008” (Hanover, Germany, 2008); XVI Региональные Каргинские чтения (Тверь, 2009); International symposium “Biopharma-2009. From science to industry” (Antalya, Turkey, 2009); 6th International Discussion Meeting on Relaxations in Complex Systems (Rome, Italy, 2009); 5-ая Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры – 2010» (Москва, 2010); Международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина» (Московская область, 2010, 2011); 76th Prague Meeting on Macromolecules «Polymers in Medicine» (Prague, Czech Republic, 2012); Научно-практическая конференция «Новые химико-фармацевтические технологии» (Москва, 2014); 51st Congress of the European Societies of Toxicology (Porto, Portugal, 2015); International conference «Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues (Bionanotox)» (Heraklion, Crete, Greece, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016); Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005, 2006, 2007, 2010, 2015, 2016); Научно-практическая конференция «Современные проблемы химической технологии биологически активных веществ» (Москва, 2016).

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Наноразмерные частицы

Наноразмерные частицы (наночастицы) (НЧ) в последние десятилетия привлекают широкое внимание целого ряда наук и технологий, в том числе связанных с медико-биологическими направлениями.

Известные в настоящее время НЧ имеют различное строение и химическую природу. В частности, к ним относят природные образования (например, вирусы, клеточные оболочки, везикулы), различные структуры неорганического происхождения (НЧ золота, кремния, фосфата кальция, нанокристаллы, обладающие свойствами т.н. «квантовых точек»), системы на основе углерода (углеродные нанотрубки, фуллерены), полимерные системы (наносферы, нанокапсулы, дендримеры).

Особое место среди НЧ занимают ассоциаты различных соединений, имеющих амфифильное (бифильное) строение, что придает им способность к самопроизвольной организации с образованием различных структур.

Бифильные (амфифильные) молекулы играют важнейшую роль в жизни живых организмов. Так, клеточная мембрана состоит более чем из ста амфифильных молекул, относимых к жирам (липидам) различного строения, которые самоорганизуются с образованием бислоя, отделяющего клетку от окружающей среды и поддерживающего в ней необходимый для жизни баланс питательных элементов [1].

Искусственно полученные ассоциаты липидов (липосомы) нашли широкое применение в качестве систем доставки биологически активных и лекарственных веществ, чему посвящено большое количество исследований (например, [2-6]).

С другой стороны, синтетические амфифильные молекулы, часто обладающие поверхностной активностью, широко используются в качестве компонентов самых разных химических продуктов от моторных масел и буровых растворов при добыче нефти до бытовых чистящих средств и косметики [7].

Отдельную группу НЧ составляют ассоциаты амфифильных полимеров, макромолекулы которых содержат полярные и неполярные блоки.

Широкие возможности варьирования строения молекул таких полимеров при синтезе позволяют обеспечивать их заданный уровень растворимости, контролировать и управлять процессами их самосборки с образованием НЧ, и наконец, регулировать включение в образованные ими агрегаты молекул других веществ различного строения.

Полимеры, строение которых можно легко изменять и варьировать, являются удобным материалом для получения на их основе НЧ с различной структурой, в зависимости от планируемого медико-биологического применения [8].

Поэтому, разработка новых амфифильных полимерных систем, для которых возможно регулирование размер и морфологию в нанометровом диапазоне является весьма перспективной [9].

1.2 Амфифильные полимеры и их роль в создании наночастиц

Амфифильными характеристиками, в первую очередь, как указано выше, способностью к самопроизвольной ассоциации с образованием организованных структур, обладают полимеры, содержащие достаточно крупные гидрофильные (полярные) и гидрофобные (неполярные) фрагменты макромолекулы [10].

Полимерные НЧ, образуемые агрегацией простейших амфифильных полимеров, обычно имеют размер от 10 до 1000 нм.

Простейший вариант строения макромолекулы амфифильного полимера показан на рисунке 1.1.

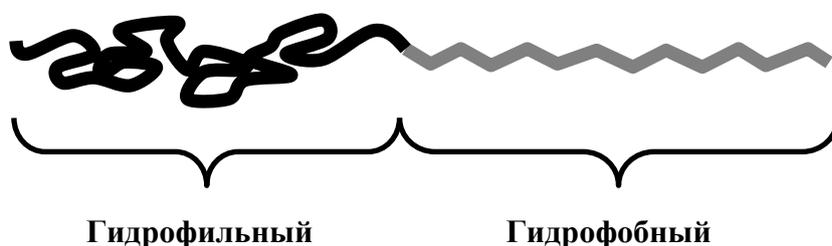


Рисунок 1.1 – Строение простейшей амфифильной макромолекулы

Чаще всего в качестве амфифильных полимеров рассматривают различные блок- и привитые сополимерные структуры, в которых один из блоков

представляет собой фрагмент гидрофильного гомополимера, а другой – гидрофобного гомополимера [11-13]. Такие фрагменты в макромолекуле могут быть сформированы в виде блок- и привитых сополимеров [14,15].

В настоящее время получено большое количество блок- и привитых сополимеров с самой разнообразной архитектурой (рисунок 1.2).

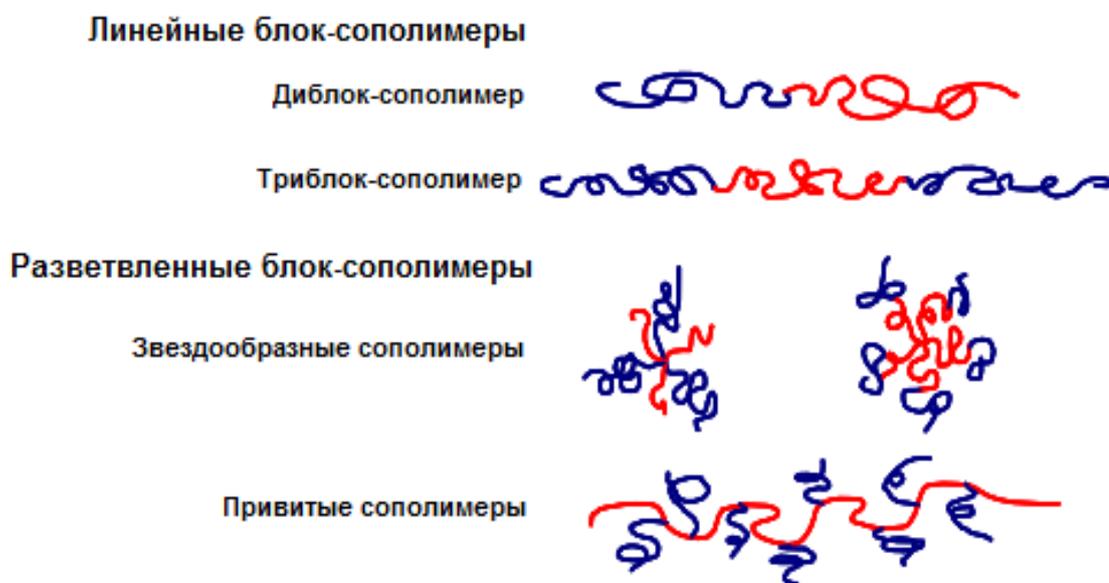


Рисунок 1.2 – Примеры строения амфифильных блок- и привитых сополимеров. Разными цветами обозначены гидрофильный и гидрофобный блоки

Такие структуры реализованы при создании многих амфифильных полимеров [16]. Так, примерами таких амфифильных блок-сополимеров являются, например, со-[полиэтиленоксид (ПЭО) - полилактид] [17], со-[ПЭО - поли(β -бензил-L-аспартат)] [18], со-[ПЭО - поли- ϵ -капролактон] [19], [ПЭО - полипропиленоксид (ППО)] [20].

Другой тип амфифильных полимеров представляют полимеры, в которых гидрофобный блок имеет неполимерную природу, например, длинноцепной алкильный радикал или остаток липида. Примером имеющих такое строение амфифильных полимеров могут служить ПЭО-фосфатидилэтаноламин и ПЭО-диациллипид конъюгаты [21]. Эти полимерные молекулы, которые содержат присоединенные остатки жирных кислот, являются амфифильными, поскольку имеют и гидрофильную, и гидрофобную части [22].

1.3 Агрегация амфифильных полимеров в водных средах

Ассоциаты амфифильных полимеров, в зависимости от полярности окружающей среды, содержат на поверхности фрагменты лиофильные к данной среде. Поскольку в большинстве случаев амфифильные полимеры находят применение в медико-биологических областях, когда такой средой является вода, чаще всего такие ассоциаты образуются за счет межмолекулярного, в данном случае гидрофобного взаимодействия, когда именно гидрофобные фрагменты являются лиофобными по отношению к воде, а гидрофильные фрагменты формируют внешнюю оболочку ассоциатов.

Следует отметить, что такая ассоциация возможна только при достаточных размерах блоков, образующих макромолекулу амфифильного полимера.

Амфифильные полимеры, которые содержат гидрофильные и гидрофобные фрагменты могут рассматриваться как макромолекулярные аналоги низкомолекулярных поверхностно активных веществ (ПАВ). Также их часто называют суперамфифилами [23,24]. Для таких соединений соотношение между полярными и неполярными частями будет значительно влиять на их поведение и самоорганизацию в различных растворителях [25-29].

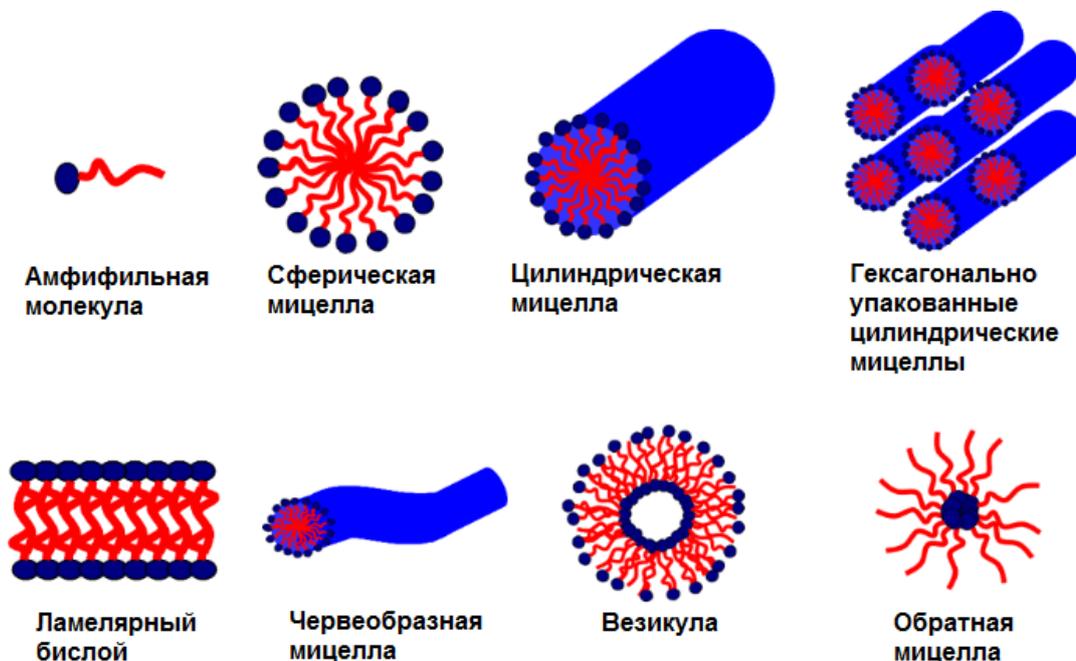


Рисунок 1.3 – Схематическое изображение морфологии агрегатов на основе амфифильных полимеров

Одно из важных преимуществ химии амфифильных полимеров заключается в том, что изменяя химическую структуру, строение и сочетание гидрофильных и гидрофобных фрагментов можно эффективно влиять на процессы самоассоциации и на морфологию образующихся агрегатов (рисунок 1.3).

Показано, что морфология формирующихся структур зависит от общей и относительной величин разнополярных частей молекулы, температуры, химического строения, концентрации полимера и ряда других параметров [30,31].

Более того, изменяя строение и регулируя концентрацию амфифильного полимера, можно получать различные мезофазы. При низких концентрациях растворов полимеров можно получать сферические мицеллы, палочкообразные мицеллы и полимерные везикулы, в то время как в растворах с высокой концентрацией будет формироваться лиотропная жидкокристаллическая фаза.

Хотя полагают, что наличие водной среды является необходимым условием для самоагрегации низкомолекулярных ПАВ в надструктуры, это совсем не обязательно для амфифильных полимеров [32]. В целом ряде экспериментов показано, что агрегация может протекать не только в воде, но и в других растворителях [33,34]. Тем не менее, именно агрегаты, образующиеся в водных средах, вызывают наибольший интерес, так как они наиболее близки к биологическим системам.

С точки зрения создания наноразмерных носителей ПАВ наиболее перспективными надструктурами, образующимися в растворах амфифильных полимеров, являются мицеллы и везикулы. При этом отдельные молекулы амфифильных полимеров, образующие такие агрегаты, называют юнимерами [26]. С точки зрения термодинамики в растворе юнимеры находятся в равновесии с агрегатами, и образование агрегатов происходит только при концентрации раствора выше критической концентрации агрегации (ККА), в случае мицелл называемой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ) [35]. Кроме того, исходя из их термодинамики, самоорганизованные системы чаще всего

стабилизированы и могут быть устойчивы в форме, отличающейся от равновесной при данных условиях [35].

Простые мицеллы представляют собой агрегаты, состоящие из «ядра» и «короны», существующие в определенном диапазоне концентраций. В водных средах образование мицелл обусловлено избирательной солюбилизацией образующего внешнюю оболочку гидрофильного фрагмента амфифильного полимера, одновременно с формированием ядра мицеллы гидрофобными фрагментами полимера.

Полимерные мицеллы по свойствам часто сравнивают с наноразмерными частицами, образующимися из природных соединений - липидов и липопротеинов. Эти носители имеют схожую структуру «ядро-оболочка».

Более медленная динамика составных фрагментов амфифильных полимеров [36,37] делает мицеллы на их основе более стабильными системами по сравнению с липидными мицеллами.

Внутримицеллярное взаимодействие между молекулами полимера зависит от относительной полярности его фрагментов, общей молекулярной массы полимера, массового соотношения гидрофобной и гидрофильной частей и может быть гораздо сильнее, чем в липидных мицеллах, в первую очередь при использовании полимеров с низкой температурой стеклования (T_g) [36, 38-40]. Кроме того, по сравнению с агрегатами из низкомолекулярных ПАВ, самоорганизующиеся системы на основе амфифильных полимеров имеют более высокую стабильность и гораздо более низкие значения ККА.

В зависимости от строения молекул амфифильных полимеров, образуемые ими мицеллярные агрегаты можно разделить на звездообразные и гребенчатые [30, 36, 401-43] (рисунок 1.4).

В гребенчатых мицеллах относительно длинные гидрофобные фрагменты образуют ядро, а более короткие гидрофильную корону, тогда как в звездообразных мицеллах, наоборот, ядро заполнено короткими гидрофобными фрагментами, а корона формируется длинными гидрофильными цепями.

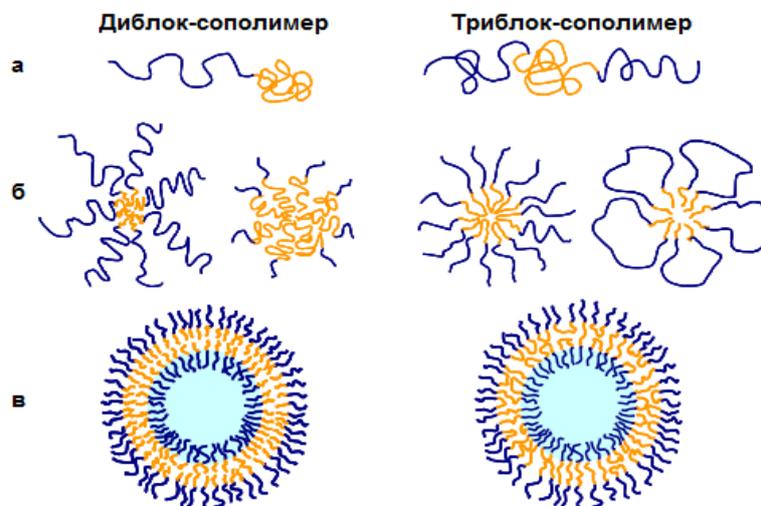


Рисунок 1.4 – Схематическое изображение: а) юнимеров в растворе диблок- и триблок-сополимера соответственно; б) звездообразной и гребенчатой мицеллы для диблок-сополимера и обычной мицеллы и мицеллы в конформации «цветка» для триблок-сополимера; в) двухслойной везикулы для диблок- и триблок-сополимера соответственно

В случае триблок-сополимеров с гидрофобным центральным блоком образуются обычные мицеллы, а в случае с триблок-сополимерами с двумя концевыми гидрофобными блоками образуются мицеллы в виде «цветка», в которых ядро состоит из гидрофобных блоков сополимера и окружено короной из петель гидрофильного блока.

Диблок-сополимеры с длинными гидрофильными цепями образуют мицеллярные агрегаты. С ростом длины нерастворимого блока кривизна поверхности уменьшается и происходит переход к палочкообразным (цилиндрическим) мицеллам. При дальнейшем увеличении длины нерастворимого блока образуются еще более крупные ламеллярные структуры. При этом, в зависимости от концентрации полимера, могут образовываться как сложенные ламеллы, так и везикулы.

Везикулы, так же как и мицеллы представляют интерес в качестве потенциальных носителей для инкапсуляции и доставки БАВ. В случае использования липидов везикулы представляют собой замкнутую сферическую бислойную структуру [44]. Диблок-сополимеры также способны образовывать

закрытые полые сферические агрегаты с оболочкой из двойного слоя полимера [28]. В отличие от них триблок-сополимеры самоагрегируют в везикулы более сложного строения, мембрана которых состоит из бислоя скрученных и вытянутых молекул триблок-сополимера [45] (рисунок 1.4). Процессы образования везикул из разных блок сополимеров в настоящее время широко изучаются [24, 27-29].

По сравнению с липосомами, полимерные везикулы обладают более высокой стабильностью и прочностью [35]. Для липосом утечка инкапсулированного вещества определяется текучестью липидного бислоя. Полимерные же везикулы более универсальны, так как их текучесть может контролироваться подбором нужной структуры полимерного блока.

1.4 Типичное строение блоков амфифильных полимеров

Чаще всего в настоящее время в качестве гидрофильных фрагментов амфифильных полимеров, образующих при самосборке внешнюю корону мицеллярных агрегатов, используют полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой от 1 до 15 кДа, в который для обеспечения агрегации водят концевые гидрофобные фрагменты, или его блок-сополимеры с пропиленоксидом (плюроники или полиоксамеры), блоки которого выполняют роль гидрофобных фрагментов [46].

Этот полимер достаточно дешев и прост в получении, обеспечивает эффективную стерическую защиту ряду биологически активных веществ [47-51], может формировать в растворах частицы для систем доставки [52-54], а так же допущен в ряде стран для применения в организме человека [51, 55].

Кроме ПЭГ, проявляющего в ряде случаев токсичные свойства [56], в качестве гидрофильных фрагментов может использоваться целый ряд водорастворимых полимеров [57]. Поли-N-винилпирролидон (ПВП) является одной из наиболее подходящих альтернатив ПЭГ [58, 59]. Этот полимер обладает высокой биосовместимостью [60] и макромолекулы, содержащие его гидрофильные блоки, используются при получении таких носителей БАВ как

модифицированные липосомы [61], наночастицы [62], микросферы [63], полимерные мицеллы [64].

Другим гидрофильным полимером, которые можно использовать с этой целью, является поливиниловый спирт (ПВС). Например, известно использование ПВС для получения мицелл для чрескожного введения в организм ретинил пальмитата [65]. Поливиниловый спирт, частично замещенный олеиновой кислотой, также использовался в качестве носителя гидрофобных лекарственных веществ [66].

Кроме перечисленных случаев также описано применение блок сополимера, содержавшего в качестве гидрофильного фрагмента низкомолекулярный полиэтиленимин массой [67]. Поэтому интерес представляет получение и изучение свойств других водорастворимых полимеров с высокой биосовместимостью.

В качестве мономеров для гидрофобных фрагментов, формирующих ядро полимерных агрегатов, в отдельных работах используют пропилен оксид [68, 69], L-лизин [70, 71], аспарагиновую кислоту [72, 73], β -бензоил-L-аспартат [74, 75], γ -бензил-L-глутамат [76], капролактон [77, 78], D,L-молочную кислоту [79, 80], спермин [81] и ряд других мономеров.

Некоторые из этих мономеров образуют гидрофобные полимерные фрагменты, которые непосредственно формируют гидрофобное ядро мицеллярных агрегатов, в то время как другие мономеры (например, лизин, спермин) образуют гидрофильные полимерные цепи, которые вначале электростатически комплексуют гидрофобные БАВ, и только затем уже формируют гидрофобное ядро наночастицы.

1.5 Методы синтеза амфифильных полимеров

Как было отмечено выше, амфифильными характеристиками могут обладать ди- и поли-блочные макромолекулярные системы, в которых составляющие их блоки, обладают лиофобными и лиофильными (гидрофобными и гидрофильными) свойствами.

При этом блоки, образующие полимер могут входить в одну цепь (истинные блок-сополимеры) или образовывать привитые системы.

Основной подход к синтезу блочных амфифильных полимеров основан на формировании цепи макро- или олигомолекулы, образующей один из блоков в целевом продукте, с введением на одном или двух ее концах (соответственно, семителехелевые полимеры и телехелевые полимеры) функциональных групп, по которым протекает связывание второго блока.

Конечно, этот подход является общим для синтеза блок-сополимеров вообще. Однако в случае амфифильных полимеров вводимые блоки должны иметь различную лиофильность.

При образовании привитых полимеров функциональные группы формируют в основной макромолекуле в местах последующих прививаемых ответвлений другой лиофильности.

Известен целый ряд методов введения таких функциональных групп при образовании ди- и полиблочных макромолекулярных амфифильных систем.

Для этого могут использоваться все основные типы полимеризации исходных мономеров. При этом, применение получаемых амфифильных полимеров в медицине предъявляет определенные требования к строению синтезируемых полимеров, а, следовательно, и к методам их синтеза.

В первую очередь, для обеспечения технологичности получения полимерных систем доставки, их биодоступности и биосовместимости, постоянности их свойств, особенно важным является синтез полимеров с близкой и контролируемой молекулярной массой.

В идеальном случае это должна быть полимеризация, при которой не происходит нежелательных побочных реакций, а в результате процесса образуются полимеры с насколько возможно более узким распределением.

В частности, при использовании цепных процессов полимерообразования растущие полимерные цепи должны оставаться активными на протяжении всего процесса полимеризации, что позволяет образовывать на их основе полиблочные системы [82,83].

Хотя такая «идеальная» схема протекания реакций полимерообразования в реальных условиях реализуется с определенными отклонениями, ее используют для получения полимеров с регулярной структурой.

Далее, в этом обзоре будут рассмотрены некоторые из таких методов полимеризации, используемых для получения амфифильных полимеров.

1.5.1 Ионная полимеризация

1.5.1.1 Анионная полимеризация

Анионная полимеризация может быть использована для любого мономера, содержащего рядом с двойной связью соседнюю функциональную группу, способную стабилизировать анион, образующийся после нуклеофильной атаки растущей полимерной молекулы. Анионная полимеризация в присутствии нафталида натрия в качестве инициатора может быть использована для синтеза триблок-сополимеров. Для получения данным методом гомополимеров и диблок-сополимеров используют *n*-бутилат лития.

С точки зрения получения амфифильных полимеров эту разновидность полимеризации используют для получения термопластичных эластомеров и блок-сополимеров полиэтиленоксида и полипропиленоксида (плюроники) [84]. В работе [85] показаны способы получения с помощью контролируемой анионной полимеризации амфифильных блок-сополимеров, например диблок-сополимера 2-винилпиридина и диметиламиноэтилметакрилата, диблок-сополимера бутадиена и этиленоксида.

1.5.1.2 Катионная полимеризация

Реакционные системы, обеспечивающие протекание реакцией катионной полимеризации, в первую очередь, применяются для полимеризации изобутилена, бутилкаучука, стирола и его производных (в основном пара-замещенных) [86]. Катионная полимеризация может быть использована для полимеризации мономеров, способных стабилизировать образующийся в процессе реакции активный катион (третичный или стирольный карбокатион). Известно получение

звездообразных блочных амфифильных сополимеров с гидрофобными гибкими фрагментами из виниловых эфиров и гидрофильными жесткими фрагментами полистирола [87].

1.5.2 Радикальные процессы

Возможности радикальной полимеризации позволяют использовать ее для введения в полимер, образующий один из блоков синтезируемой амфифильной системы, концевых функциональных групп, которые могут быть использованы для связывания с блоком противоположной гидрофобности. В этом случае используется ряд подходов.

1.5.2.1 Использование нитроксидных свободных радикалов

Радикальная полимеризация, проводимая в присутствии низкомолекулярных свободных радикалов нитроксидного типа, взаимодействующих с концевым радикалом растущей полимерной цепи по механизму рекомбинации, позволяет ввести функциональные группы, содержащиеся в молекуле нитроксидного радикала, в конце полимерной цепи, что дает возможность использовать их для связывания с блоками противоположной полярности [88, 89].

Такой путь синтеза позволяет вводить в полимер различные функциональные группы - такие как amino, карбоксильные, глицидилловые. Нитроксид-опосредованная полимеризация использовалась для создания целого ряда амфифильных полимерных структур, таких как звездообразные, привитые полимеры и дендримеры [90, 91].

1.5.2.2 Использование функциональных инициаторов

В принципе, требуемые функциональные группы могут быть введены в качестве концевых в состав макромолекулярной цепи при использовании инициаторов, содержащих эти группы [92,93].

Этот метод достаточно эффективен, однако, он не получил широкого технологического освоения ввиду необходимости проведения специального синтеза таких инициаторов.

1.5.2.3 Радикальная полимеризация с использованием передатчиков цепи

Проведение цепных процессов в присутствии передатчика цепи, содержащего требуемые функциональные группы, позволяет ввести их на конце цепи, что дает возможность на второй стадии процесса присоединить к ним блоки другой полярности.

Кроме того, проведение радикальной полимеризации в присутствии передатчиков цепи позволяет контролировать молекулярную массу и полидисперсность получаемых полимеров.

Как известно, в принципе к передаче цепи способны соединения с подвижными атомами, отщепление которых под действием радикала инициатора или фрагмента растущей цепи образует другой радикал, начинающий рост другой цепи.

Чаще всего такими подвижными атомами являются атомы водорода или галоида, а используемыми в таких реакциях соединениями являются галоидные производные метана (как например, четыреххлористый углерод в реакции теломеризации) или серосодержащие соединения – меркаптаны и дисульфиды [94, 95].

В этих случаях образуется полимер, являющийся первым блоком и содержащий на конце функциональную группу, перешедшую от передатчика цепи, которая на второй стадии процесса может быть использована для связывания второго блока.

При этом условия проведения реакции свободнорадикальной полимеризации в присутствии передатчика цепи должны выбираться так, чтобы обеспечить подавляющему большинству образующихся полимерных цепей наличие остатка передатчика цепи в качестве концевой функциональной группы при обеспечении синтеза полимера требуемой молекулярной массы.

Этого можно достичь, когда основной реакцией обрыва цепи при полимеризации является передача цепи на радикал передатчика цепи, но в то же время, когда образование макромолекулярной цепи протекает с достаточной эффективностью для получения высокого выхода целевого продукта.

Эти факторы обязательно необходимо учитывать, особенно когда передатчик цепи используется не только для регулирования молекулярной массы полимера, но и с целью введения в состав полимера концевых функциональных групп.

В принципе, если передатчик цепи содержит группировку пригодную для создания в полимере блочного фрагмента, реакция образования целевого продукта может быть проведена в одну стадию.

Именно эти методы были использованы для получения амфифильных полимеров в данной работе.

В заключение данного подраздела можно предположить, что методы синтеза амфифильных водорастворимых полимеров, будут в ближайшие годы дополнены другими подходами, использующими другие пути проведения регулируемых радикальных процессов, интенсивно развиваемых в последнее время, например такими, как процессы обратимой рекомбинации, реакции с вырожденной передачей цепи, процессы, сопровождающиеся переносом атома [96].

1.6. Методы получения полимерных наночастиц

Как было отмечено выше, на основе полимеров получают различные типы НЧ, применяемых в медико-биологических областях, в том числе, наносферы, нанокапсулы. Отдельные группы НЧ на основе полимеров составляют дендримеры и рассмотренные в предыдущем разделе агрегаты амфифильных полимеров.

Для создания полимерных НЧ не амфифильного типа используют различные типы высокомолекулярных соединений, которые должны быть биосовместимыми и в требуемых случаях - биodeградируемыми [97]. В этих случаях широко используются как природные, так и синтетические макромолекулы.

Из природных полимеров для получения наночастиц наиболее часто используют хитозан, желатин, альгинат натрия и альбумин [98-101].

Круг используемых для этих же целей синтетических полимеров достаточно широк и включает различные сложные полиэфиры – в первую очередь полимеры и сополимеры гликолевой, молочной, гидроксималяной, гидроксикапроновой кислот, а также полиангидриды, полиортоэфиры, полицианоакрилаты, полиглутаминовую кислоту, полималеиновую кислоту, полиметилметакрилат. В ряде случаев для этих целей использовали сшитые производные водорастворимых полимеров - поли-N-винилпирролидона, поливинилового спирта, акриловых кислот, полиакриламида, полиэтиленгликоля [97, 102-111].

Свойства полимерных НЧ должны быть оптимизированы исходя из их конкретного применения, причем свойства НЧ в значительной степени зависят от способа их получения. Таким образом, становится важным выбор подходящего метода, позволяющего получить НЧ с необходимыми для конкретного применения свойствами.

Среди методов получения полимерных НЧ можно выделить:

- методы получения наночастиц из готовых макромолекул (в частности, амфифильных), в том числе, сопровождающихся сшивкой полимеров за счет ковалентного или ионного взаимодействия, а также за счет сил межмолекулярного взаимодействия;
- методы, которые включают стадию полимеризации мономера с одновременным образованием НЧ.

1.6.1 Методы получения наночастиц из предварительно синтезированных полимеров

Важное место среди наночастиц занимают НЧ, представляющие собой самоорганизующиеся коллоидные системы мицеллярного типа, содержащие полимерный фрагмент, включающие БАВ за счет гидрофобных взаимодействий или комплексования [112,113].

Причем, введение в них биологически активного (лекарственного) вещества часто осуществляется вместе с формированием полимерных НЧ.

Диспергирование лекарственного вещества в растворе готового полимера является распространенным методом для получения биodeградируемых НЧ например, из полилактидов, полигликолидов, их сополимеров и из полицианокрилата. Этот процесс можно осуществлять несколькими способами:

- а) Выпаривание растворителя;
- б) Эмульгирование / диффузия растворителя;
- в) Высаливание;
- г) Диализ;
- д) Технология сверхкритических жидкостей;
- е) Сшивание водорастворимых полимеров.

1.6.1.1 Метод выпаривания растворителя

Выпаривание растворителя было одним из первых методов, разработанных для получения полимерных НЧ. В этом методе готовят растворы полимеров в летучих растворителях с образованием эмульсий. В качестве таких растворителей могут быть использованы дихлорметан или хлороформ [114], которые в последнее время стали все активнее заменять на менее токсичный этилацетат.

Приготовленные эмульсии превращают в суспензии НЧ путем испарения летучего растворителя из фазы раствора полимера. При этом для приготовления эмульсий пользуются двумя основными подходами – получением простых эмульсий (например, масло-в-воде) или двойных эмульсий (например, (вода-в-масле)-в-воде). Эти методы реализуются с использованием высокоскоростной гомогенизации или ультроозвучивания системы с последующим испарением растворителя при длительном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре или при пониженном давлении (например, на роторном испарителе). После этого полученные НЧ отделяют ультрацентрифугированием, промывают дистиллированной водой для удаления посторонних веществ (например, стабилизаторов) и лиофильно сушат [114-117]. В этом случае на

размер частиц влияет тип и концентрация стабилизатора, скорость или интенсивность гомогенизации и концентрация полимера.

Метод замещения растворителя (наноосаждение). Данный метод заключается в осаждении полимера из его раствора в органическом растворителе, сопровождающемся диффузией органического растворителя в водную среду в присутствии или отсутствии поверхностно-активных веществ [118-121]. Полимер добавляют в смешивающийся с водой слабо полярный растворитель, после чего происходит осаждение наносфер. Полученную систему добавляют к перемешиваемому водному раствору, содержащему стабилизатор или ПАВ. Распределение полимера на границе между водой и органическим растворителем, сопровождающее быструю диффузию растворителя, приводит к мгновенному образованию коллоидной суспензии [122].

Для того чтобы облегчить образование коллоидных частиц полимера на первой стадии процесса проводят разделение фаз и отделяют лишний растворитель и не растворившийся полимер [123]. Этот метод также позволяет получать нанокapsулы. Для этого в органическую фазу вводится небольшое количество нетоксичного масла. Образующиеся из масла центральные полости нанокapsул позволяют эффективно загружать их липофильными лекарственными веществами.

Применение этой довольно простой методики ограничено выбором подходящего, смешивающегося с водой растворителя, в котором скорость диффузии достаточна для протекания спонтанной эмульсификации. Кроме того, в некоторых растворителях самопроизвольной эмульсификации не происходит в случае, если скорость слипания образующихся капель в таких растворителях достаточно высока [124]. В используемой в большинстве исследований для растворения и включения лекарственных веществ системе ацетон/дихлорметан, использование дихлорметана ведет к увеличению среднего размера частиц [125].

Метод применяют для получения наночастиц из полилактидов, полигликолидов, поликапролактонов и сополимера метилвинилового эфира и малеинового ангидрида [126, 127]. Данная методика использована для

эффективного включения (до 98 %) циклоспорина А [128]. Также, с помощью метода замещения растворителя получены загруженные наноразмерные системы на основе амфифильных циклодекстринов для парентерального введения плохо растворимых противогрибковых лекарственных веществ Бифоназола и Клотримазола [129].

1.6.1.2 Метод эмульгирования / диффузии растворителя

Данный метод является модифицированной версией метода испарения растворителя [130]. Инкапсулирующий полимер растворяется в частично растворяющемся растворителе, таком как карбонат пропилена, и смешивается с водой для получения начального термодинамического равновесия обеих жидкостей.

Для осаждения полимера с одновременным формированием НЧ необходимо инициировать диффузию растворителя дисперсной фазы разбавлением избытком воды, в случае если органический растворитель частично смешивается с водой или другим растворителем в обратном случае. Затем насыщенную полимером и водой фазу растворителя эмульгируют в водном растворе, содержащем стабилизатор, что приводит к диффузии растворителя во внешнюю фазу и к формированию наносфер или нанокapsул, в зависимости от соотношения масло/полимер. Наконец, растворитель удаляют выпариванием или фильтрацией в зависимости от его температуры кипения.

Этот метод обладает рядом преимуществ, таких как высокая эффективность включения (более 70%) для гидрофобных лекарственных веществ [122], отсутствие необходимости в гомогенизации, высокая производительность, масштабируемость, простота и узкое распределение НЧ по размерам. Недостатками метода являются большие объемы воды, которые необходимо удалять из суспензии и утечка водорастворимых лекарственных веществ во внешнюю водную фазу во время эмульгирования, что снижает эффективность их инкапсулирования [113,115]. Используя данную методику были получены полимерные наночастицы, загруженные различными лекарственными

веществами, например НЧ из сополимера полилактида и полигликолида, содержащие мезотетра(гидроксифенил)порфирин [131, 132], доксорубицин [133], плазмиды ДНК [134], кумарин [135], желатиновые НЧ с включенными индоцианином и циклоспорином [136], НЧ на основе гликолата натрия, наполненные циклоспорином [137].

1.6.1.3 Метод высаливания

Метод высаливания основан на выделении смешиваемого с водой растворителя из водного раствора за счет эффекта высаливания. Этот метод можно также рассматривать как модификацию метода эмульгирования / диффузии растворителя. В начале, полимер и лекарственное вещество растворяют в растворителе, например ацетоне, который эмульгируют с образованием водного геля, содержащего высаливающий агент (например, электролиты – хлорид магния, хлорид кальция, ацетат магния, или неэлектролиты – сахароза) и коллоидный стабилизатор (например, поливинилпирролидон или гидроксиэтилцеллюлоза). Полученную эмульсию масло/вода разбавляют достаточным количеством воды или водного раствора для ускорения диффузии ацетона в водную фазу, сопровождающуюся образованием наносфер [115].

Для данного метода очень важен выбор высаливающего агента, так как он значительно влияет на эффективность включения лекарственного вещества. Растворитель и высаливающий агент удаляют из системы с помощью ультрафильтрации. Данный метод используют для получения наносфер из полилактидов и полиметакриловой кислоты с хорошей масштабируемостью и высокой степенью включения. Основным преимуществом методики является минимальное воздействие на включаемое вещество (особенно это важно для белков) [138]. Высаливание не требует повышенных температур и поэтому может быть использовано для инкапсулирования термически чувствительных биологически активных веществ [139]. Наибольшими недостатками метода являются возможность включения исключительно гидрофобных лекарственных веществ и необходимость долгой и тщательной отмывки полученных НЧ [140].

1.6.1.4 Диализный метод

Диализ является простым и эффективным методом получения полимерных НЧ с узким распределением по размерам [114, 118, 141-143]. Полимер растворяют в органическом растворителе и помещают в диализный мешок или ячейку с подходящим размером пор. Диализ проводят относительно дистиллированной воды. Замещение растворителя внутри диализной мембраны сопровождается одновременной агрегацией молекул дифильного полимера, в связи с потерей ими растворимости, и образованием гомогенной суспензии наночастиц. Механизм формирования полимерных наночастиц диализным методом во многом схож с механизмом наноосаждения [118]. С помощью данного метода получены НЧ на основе целого ряда полимеров и сополимеров [144-153]. Тип растворителя, используемого для приготовления начального раствора полимера значительно влияет на морфологию, размер и распределение по размерам образующихся НЧ.

1.6.1.5 Использование сверхкритических жидкостей

Необходимость разработки новых, более безопасных для живых организмов и окружающей среды методов получения полимерных НЧ привела к попыткам использования для этих целей сверхкритических жидкостей. Потенциально, это может привести к созданию технологий получения полимерных НЧ с высочайшей чистотой и отсутствием даже следовых количеств органических растворителей в готовом продукте [114, 154, 155].

Суть метода заключается в получении раствора полимера в сверхкритической жидкости, с последующим быстрым распылением этого раствора через мелкие отверстия или сопло капилляра в окружающую атмосферу. Высокая степень перенасыщения раствора, сопровождаемая быстрым снижением давления при распылении, обеспечивает гомогенность системы и, как следствие, образование высокодисперсных полимерных частиц [156].

К настоящему времени получены нано- и микрочастицы из перфторполиэфиров быстрым распылением их растворов в сверхкритическом

CO₂. Концентрация полимера при этом является основным фактором, влияющим на размер и морфологию образующихся частиц [157-160].

Технологии применения сверхкритических жидкостей и плотных газов могут стать эффективным методом получения НЧ, лишенным недостатков уже существующих методов.

1.6.1.6 Сшивание водорастворимых полимеров

Этот метод может быть использован для получения НЧ из заранее приготовленных водорастворимых полимеров путем проведения межцепных реакций с участием боковых групп их макромолекул с образованием как ковалентных, так и ионных связей.

Образующаяся система может носить также характер полимер-полимерного межмолекулярного комплекса, образованного за счет кооперативного многоточечного взаимодействия двух полимерных компонентов системы в том числе за счет сил межмолекулярного взаимодействия.

Например, этот метод был использован для получения НЧ из таких природных биodeградируемых водорастворимых полимеров, содержащих противоположно заряженные ионогенные группы, как хитозан и альгиновая кислота, находящихся в водном растворе в виде солевых производных. Образование продукта включает в себя стадию смешения двух водных растворов ингредиентов.

В качестве межцепного сшивателя хитозана может быть также использовано соединение с несколькими анионными группами (например, триполифосфат) [161-163].

1.6.2 Методы получения наночастиц полимеризацией мономеров

Для получения полимерных НЧ с определенным строением и заданными свойствами также могут быть использованы различные методы полимеризации мономеров. Среди этих методов можно выделить:

- а) Эмульсионную полимеризацию;

- б) Межфазную полимеризацию;
- в) Контролируемую (живую) полимеризацию.

1.6.2.1 Эмульсионная полимеризация

Эмульсионная полимеризация является одним из самых быстрых и легко масштабируемых методов получения НЧ. Выделяют две основных разновидности эмульсионной полимеризации в зависимости от использования органической или водной фазы. Как хорошо известно, метод эмульсионной полимеризации включает диспергирование мономера в виде эмульсии типа «вода-масло» или обратной эмульсии или в растворителе, в котором данный мономер не растворяется, с последующим проведением процесса полимеризации [115]. Таким методом получают, в частности, наносферы из полиакриламида [164,165].

Изначально, метод предполагал также использование различных поверхностно-активных веществ и защитных растворимых полимеров на начальной стадии полимеризации. Большинство из этих веществ является токсичным, и их с трудом можно удалить из образовавшихся НЧ.

Поэтому позже были разработаны более подходящие варианты этого метода. Так, НЧ из полиметилметакрилата, полиэтилцианокрилата и полибутилцианокрилата получают диспергированием мономеров в присутствии поверхностно-активных веществ в малотоксичных растворителях, таких как циклогексан, н-пентан или толуол. Возможно также проведение эмульсионной полимеризации в отсутствие эмульгаторов [115,123,166].

Контролируемая полимеризация. Отдельную группу процессов, реализуемых в случае получения НЧ в условиях эмульсионных систем, составляют методы контролируемой полимеризации [114, 167-169]. Основная особенность этих методов заключается в способности контролировать характеристики получаемых полимеров, такие как молекулярная масса, молекулярно-массовое распределение, строение и наличие дополнительных функциональных групп, в первую очередь за счет устранения влияния реакций обрыва цепи, являющихся основным недостатком обычных методов радикальной полимеризации.

Применение методов живой радикальной полимеризации, особенно в водных средах, позволяет получать полимерные НЧ с заданным размером и узким распределением по размерам [170]. Для данной группы методов получения полимерных частиц основными факторами, влияющими на их размер, являются концентрация и природа вводимого в реакцию регулятора роста цепи, мономера и инициатора, а также типа получаемой при полимеризации эмульсии.

1.6.2.2 Межфазная полимеризация

Межфазная полимеризация широко используется при получении НЧ, особенно при необходимости формирования нанокапсул, в том числе содержащих внутри органическую фазу [171-175].

Межфазная полимеризация включает ступенчатую полимеризацию двух реакционноспособных мономеров, которые растворены соответственно в двух разных несмешивающихся фазах, в соответствии с механизмами поликонденсации и полиприсоединения. В этом случае реакция идет преимущественно на границе раздела этих двух несмешивающихся жидкостей [176-179].

Возможно проведение межфазной реакции и с протеканием процесса радикальной полимеризации. При этом полимеризация мономеров происходит на поверхности капель масла образованных в процессе эмульгирования [123, 180-184]. Отмечается, что для получения данным методом нанокапсул используют апротонные растворители, такие как ацетон и ацетонитрил, тогда как для получения сплошных наносфер нужно использовать протонные растворители, такие как этанол, н-бутанол и изопропанол [185].

Нанокапсулы, содержащие внутри водную фазу, предложено получать в системе вода-в-масле. В таких системах полимер образуется на поверхности раздела вода-масло и осаждается с формированием оболочки нанокапсулы [186,187].

Таким образом, в настоящее время разработано значительное число методов получения НЧ в виде мицелл, агрегатов, наносфер и нанокapsул, в том числе загруженных лекарственными веществами. Причем проведенные исследования дают возможность в зависимости от физико-химических свойств лекарственного вещества выбрать оптимальный метод, позволяющий получить наночастицы с необходимым размером и высокой степенью включения активного вещества.

Основными требованиями к получению НЧ можно отнести:

- Использование максимально нетоксичных реагентов;
- Простота процесса для экономически выгодного масштабирования;
- Оптимизация с целью увеличения выхода готового продукта и степени включения биологически-активного вещества.

Однако при этом до сих пор актуальным является решение таких проблем, как недостаточная универсальность каждого метода в отношении различных лекарственных веществ, необходимость дополнительной очистки и консервации готового продукта, недостаточная стабильность некоторых компонентов, в том числе при стерилизации.

Несмотря на это, НЧ являются перспективной основой для разработки систем доставки лекарственных веществ и ряда других применений в медико-биологических областях.

1.7 Применение полимерных наночастиц в медицине, фармацевтике и биотехнологии

1.7.1 Общие требования к полимерам, входящим в состав наночастиц биомедицинского применения

Полимеры, используемые для получения наноразмерных систем, предназначенных для применения в медико-биологических областях, в том числе для доставки биологически-активных и лекарственных веществ, особенно вводимых инъекционно, должны соответствовать ряду важных требований.

Конечно, как это неоднократно указывалось, они должны отличаться высокой чистотой и не должны содержать вредных для организма примесей. Они

должны разлагаться в организме с заданной скоростью, не образуя при биодegradации токсичных веществ, или должны достаточно быстро выводиться из организма [188, 189].

Таким образом, выбор оптимального, подходящего для создания НЧ полимера определяется в основном тремя основными факторами: биосовместимостью, выводимостью из организма полимера и продуктов его распада и физико-химическими свойствами полимера, т.к. именно от этих параметров зависит его влияние на организм и возможность выполнить требуемые функциональные задачи [190].

1.7.1.1 Биосовместимость полимеров

Биосовместимость, т.е. способность обеспечивать выполнение необходимой медико-биологической задачи без негативного влияния на прилегающие ткани и организм в целом, занимает центральное место среди требований, предъявляемых к полимеру, предназначенному для создания вводимых в организм изделий и препаратов, в том числе для НЧ лекарственного назначения [188].

В первую очередь на уровень биосовместимости изделия и препарата, в котором был использован полимер, влияет степень его очистки от вредных примесей, оказывающих токсическое, раздражающее, аллергенное, пирогенное или иное побочное действие, в том числе остатков мономеров, катализаторов и растворителей, не до конца удаленных при очистке материала. При этом должна учитываться возможность образования токсичных веществ при переработке полимера (изготовлении) изделия и при его стерилизации.

Следует отметить, что идеальное удаление низкомолекулярных веществ из макромолекулярной системы крайне затруднительно, даже при применении таких эффективных методов как диализ против воды или физиологического раствора. Поэтому их содержание должно контролироваться и соответствовать имеющимся медико-санитарным требованиям. Кроме того, токсикологическая безвредность должна учитываться по результатам исследований как на острую, так и хроническую активность.

Другой важной составляющей, определяющей биосовместимость вводимых НЧ, является их инертность по отношению к физиологическим процессам, протекающим в организме, например, нейтральность в отношении проявления иммунной активности, инертность в отношении к молекулярным и форменным элементам крови, ее рН, водно-солевому балансу, и т.д. [188].

Наконец, уровень биосовместимости объекта, вводимого в организм, зависит от судьбы последнего в организме, т.е. в первую очередь от метаболизма полимера, из которого он изготовлен. В том числе это относится к скорости выведения полимера и продуктов его биодegradации из организма, их острой и хронической токсичности.

Применительно к полимерам, используемым для получения НЧ, в настоящее время достаточный уровень биосовместимости достигается при применении таких природных полимеров, как полисахариды (хитозан, крахмал, декстран, некоторые полисахариды водорослей), микробные полиэфиры (полигидроксibuтират и сополимеры гидроксibuтирата) и синтетических полимеров – алифатических полиэфиров (гомополимеров и сополимеров гликолевой и молочной кислот, поликапролактона, полиангидридов, полиортоэфиров, полиэфиров фумаровой кислоты), полицианакрилатов, полимеров и сополимеров винилового спирта, N-винилпирролидона, N-(2-гидроксипропил) метакриламида, производных этиленгликоля и его сополимеров, синтетических полимеров аминокислот [188].

1.7.1.2 Выводимость полимера из организма

Как известно [188, 191, 192], биодegradация полимерного изделия под действием окружающей биологической среды протекает по двум принципиальным механизмам – непосредственное выведение полимера из организма, если он растворим в воде и имеет ограниченную молекулярную массу, и выведение из организма продуктов распада полимера.

Примерами полимеров, выводимых из организма без предварительного разложения, являются низкомолекулярные карбоцепные полимеры, используемые

при создании препаратов кровезаменителей-дезинтоксикаторов. В первую очередь это относится к полимерам винилового спирта, N-винилпирролидона, N-(2-гидроксипропил) метакриламида. Выведение из организма производных таких полимеров, достаточно широко используемых при получении полимерных НЧ, может осуществляться через почечные фильтры [188, 191-193].

Во втором случае чаще всего путем распада полимера является его гидролиз, например, под воздействием ферментных систем организма. Поэтому, при необходимости применения для получения НЧ достаточно высокомолекулярного и нерастворимого в воде полимера ключевой задачей является введение в его основную и / или в боковые цепи групп, способных к гидролизу - сложной эфирной, амидной, карбаматной, мочевиной и т.п.

Подвергается гидролизу в организме и гликозидная группа, соединяющая звенья цепи полисахаридов [188, 191, 192]. Следует отметить, что биораспаду с участием ферментных систем в организме подвергаются и такие карбоцепные полимеры как полицианакрилаты и поливиниловый спирт [194-197].

В тоже время продукты биodeградации не должны обладать общей или специфической токсичностью, аллергенностью, канцерогенностью, и т.п. [188].

Описано большое число примеров, описывающих время циркуляции НЧ в организме. Как пример можно отметить, что время жизни полиакрилдекстрановых НЧ составляет 8-10 недель (опыты на мышах), а включенное в них активное вещество обладает повышенной устойчивостью и терапевтической активностью [198].

1.7.1.3 Особенности строения полимеров

Как хорошо известно, использование полимерных форм позволяет пролонгировать действие низкомолекулярного лекарственного вещества, снизить его токсичность, и при наличии в молекуле полимера фрагмента-вектора направить макромолекулярную систему к требуемому органу. Следует отметить, что созданию лекарственных полимеров, их свойствам и особенностям строения, различным аспектам биологической активности было посвящено большое количество работ,

особенно в 1970-1980 – е годы, что отражено в громадном количестве публикаций, в том числе в монографиях отечественных авторов [189, 190, 193, 199, 200].

Поэтому, в данном обзоре лишь коротко остановимся на некоторых аспектах особенностей строения полимеров, влияющих на их эффективность.

Молекулярная масса. При создании полимерных наночастиц важное значение имеет молекулярная масса полимера, поскольку она в значительной мере влияет на формирование наночастицы.

Кроме того, как отмечено выше, молекулярная масса полимера существенно влияет на такие его характеристики, как скорость биораспада, через особенности взаимодействия макромолекулы полимера с макромолекулой фермента, особенности транспорта по внутренним системам организма или аккумуляции в них.

Как отмечалось выше, размер макромолекулярного клубка водорастворимого полимера влияет на прохождение почечных канальцев, что сказывается на эффективности почечной фильтрации («физическая токсичность») [199, 200, 202].

Молекулярно-массовое распределение. Еще один важный параметр полимеров – это распределение по молекулярной массе его макромолекул.

У некоторых природных полимеров, таких как большинство глобулярных белков, молекулы имеют одинаковую молекулярную массу.

С другой стороны, в случае подвергнутых биохимической или химической обработке природных полимеров (например, 2-гидроксиэтилкрахмала, декстрана), или синтетических полимеров, в готовом продукте, в зависимости от способа получения таких полимеров, присутствуют макромолекулы разного размера и молекулярной массы, обладающие разной скоростью выведения из организма [203].

В таком случае точное прогнозирование поведения препарата на основе полимера в организме затруднено. Это еще раз подчеркивает необходимость углубленного исследования влияния молекулярной массы полимеров на их поведение в организме и переход к использованию только полимеров со строго

контролируемыми молекулярно-массовыми характеристиками для получения наноразмерных систем доставки [204].

Строение боковой цепи. Данные, полученные к настоящему времени, свидетельствуют, что строение боковой цепи полимерной макромолекулы играет ключевую роль в итоговой эффективности получаемых систем и определяет особенности взаимодействия реагирующих веществ [199, 204].

Строение боковой цепи, при этом, имеет значение, как в случае использования нерастворимых, так и растворимых полимеров.

Если для присоединяемых блоков с низкой молекулярной массой длина боковой цепи играет второстепенную роль, то при присоединении к носителям высокомолекулярных фрагментов, расстояние между основной цепью полимера-носителя и его боковыми функциональными группами становится весьма существенным фактором [204].

1.7.2 Требования, предъявляемые к полимерным наночастицам

Поискам и изучению свойств полимерных систем доставки биологически активных и лекарственных веществ с использованием НЧ, посвящено большое число исследований во многих странах, что позволило выработать базовые требования к системам на основе НЧ.

Помимо отмеченной выше безвредности, в идеальном случае такие системы, как минимум должны обладать следующими характеристиками:

- А. Высокой степенью однородности, как по составу, так и по размеру частиц.
- Б. Максимальной степенью включения активной субстанции.
- В. Обеспечивать высвобождение активного вещества с определенной, требуемой скоростью.
- Г. Возможностью целевой доставки активного вещества к пораженному органу.

С точки зрения возможности синтетического конструирования НЧ важное влияние оказывают следующие их характеристики.

1.7.2.1 Заряд и гидрофильность

Распределение полимерных НЧ в тканях организма, кинетика и динамика выделения из них активного вещества, зависят от их строения. В частности, влияние на биораспределение оказывают соотношение гидрофильности и гидрофобности компонентов частицы, ее и стабильность поверхностный заряд. Повышение гидрофильности наночастиц приводит к уменьшению их захвата фагоцитозными клетками и макрофагами, к увеличению времени циркуляции в кровеносном русле и уменьшает вероятность их связывания с белками сыворотки крови, и приводит [205, 206]. Изучение влияния на биораспределение наночастиц в организме их заряда показало, что НЧ, обладающие близким к нейтральному поверхностным зарядом, захватываются макрофагами в меньшей степени, чем положительно или отрицательно заряженные частицы [207].

Кроме того продемонстрировано, что, в отличие от нейтральных НЧ, отрицательно заряженные НЧ, более активно захватываются клетками селезенки и печени и быстрее выводятся из кровотока. В тоже время положительно заряженные наночастицы сначала накапливаются в легких, а уже затем переносятся в клетки селезенки и печени [208]. Нейтральные полимерные НЧ обладают промежуточной скоростью выведения. Таким образом, включение в наноразмерные полимерные коллоидные системы с определенным размером частиц биологически активных и лекарственных веществ с низкой полярностью, приводит к увеличению гидрофильности всей системы и является, таким образом, одним из эффективных методов повышения их биодоступности.

1.7.2.2 Размер полимерных наночастиц

Изученные литературные источники свидетельствуют, что распределение коллоидных полимерных систем в организме, во многом зависит от размера образующих их частиц [209]. Размеры получаемых наночастиц могут колебаться в широком диапазоне и составлять от 10-30 нм для амфифильных низкомолекулярных полимеров, до 600 нм и более (три-блок-сополимер ПЭО - полибензил-L-аспартат) [210].

Частицы с диаметром более 1,0 - 8,0 мкм, или частицы меньшего размера, но при этом агрегирующие между собой за счет взаимодействий различного типа с образованием более крупных ассоциатов (примерно от 8,0 мкм), в основном накапливаются, благодаря захвату клетками ретикуло-эндотелиальной системы, в легких.

Частицы, размер которых составляет от 0,01 до 8,0 мкм, особенно активно захватываются моноядерными фагоцитозными клетками ретикуло-эндотелиальной системы костного мозга, печени, и селезенки. При этом показано, что уменьшение размера частиц, значительно увеличивает скорость и степень их захвата клетками костного мозга [211].

В связи с этим, при разработке полимерных НЧ для систем доставки биологически активных и лекарственных веществ стараются сформировать небольшие наночастицы (диаметр менее 200 нм) с узким распределением по размерам, так как уменьшение размера наночастиц имеет целый ряд преимуществ.

За счет уменьшения размера частиц становится возможным внутривенное введение препарата. Внутримышечное и подкожное введение полимерных лекарственных форм также требуют малых размеров частиц. В случае небольшого размера НЧ значительно снижается реакция раздражения в месте их введения. Канцерогенные свойства препаратов также во многом зависят от размера входящих в их состав наночастиц [209, 211].

В большинстве случаев, размер получаемых полимерных НЧ превышает диаметр пор капилляров кровотока, и, следовательно, характер их распределения в организме определяется и ограничивается методом их введения. Например, при внутривенном введении их выход за пределы кровотока затруднен и они плохо проникают в здоровые ткани и органы [212]. При этом снижается токсическое действие активного вещества, загруженного в полимерную НЧ. Этот эффект лежит, например, в основе направленного транспорта химиотерапевтических веществ в большие очаги и воспаления опухоли, так как снабжающие эти области кровью капилляры сильно перфорированы [213]. Описанное явление получило название пассивного нацеливания лекарственного препарата.

1.7.2.3 Скорость выделения активного вещества из полимерных наночастиц

Скорость высвобождения биологически-активных веществ из матричных полимерных НЧ (наносфер), зависит от массового соотношения между полимером и биологически активным веществом и концентрации полимера в исходной смеси. В случае иммобилизации биологически активного вещества в НЧ, полученных на основе полимера, биodeградирующего в физиологических условиях, становится возможным постепенное выделение активного агента в окружающие среды организма, как в свободном виде, так и совместно с фрагментом носителя, перешедшим в раствор.

Скорость выделения лекарственного вещества в этом случае будет определяться скоростью биodeградации материала частицы. Препараты с таким строением. Так, для растворения тромба в бедренной артерии экспериментальных животных использовали наносферы с фибринолизин, стрептокиназой и урокиназой. При этом доставку частиц препарата к месту тромба проводили катетерным методом. Использование носителя, скорость биodeградации которого в физиологических условиях составляла несколько десятков минут, позволило добиться быстрого восстановления нормального кровотока в сосудах [215].

Резюмируя результаты проведенного анализа (Разделы 1.7.1. и 1.7.2), можно отметить, что «идеальная» наноразмерная полимерная система доставки биологически-активных и лекарственных веществ должна технологически просто формироваться из молекул полимера-носителя (например, самоассоциацией амфифильных полимеров), содержать достаточное количество лекарственного вещества для обеспечения его эффективного действия, а также содержать молекулы или функциональные группы, обеспечивающие целевую доставку активного вещества в организме.

При этом размер наночастиц должен быть < 200 нм, в частности, для того, чтобы обеспечить возможность их проникновения через защитные барьеры организма, в органы, в ткани, и даже внутрь некоторых типов клеток [216-218].

Такие полимерные НЧ не должны вызывать каких-либо отрицательных биологических реакций и должны быть устойчивы в организме в течение требуемого интервала времени. При этом, включенный в НЧ лекарственный препарат должен высвобождаться при контакте препарата с мишенью в организме, и конечном счете, все компоненты полимерных НЧ и продуктов их метаболизма должны легко и без побочной токсичности выводиться из организма после выполнения всех их терапевтических функций.

1.7.3 Области применения полимерных наночастиц в качестве систем доставки биологически-активных веществ

Биологически активное (лекарственное) вещество может быть иммобилизовано в полимерных НЧ путем включения в массу НЧ (наносферы), включения во внутреннюю полость НЧ (нанокапсулы) или связано с ее поверхностью (например, неорганические НЧ).

В случае полимерных НЧ они должны быть способны доставлять биологически активное вещество в организме к очагу заболевания и выделять его благодаря одному из четырех основных механизмов:

1. Набуханию полимерных НЧ при взаимодействии с окружающей водной средой и выделению лекарственного вещества за счет диффузии;
2. Биодеградации НЧ, за счет различных механизмов биодеградации, в том числе за счет ферментативной биодеструкции полимера;
3. Разрушению химической или межмолекулярной связи между иммобилизованным биологически активным веществом и полимером НЧ;
4. Диссоциации компонентов полимерной НЧ, сопровождающейся выделением лекарственного вещества.

Полимерные НЧ могут эффективно доставлять лекарственные вещества, белки и нуклеиновые кислоты к клеткам и органам. Их нанометровый размер обеспечивает им достаточную стабильность в кровеносном русле и позволяет эффективно проникать через клеточные мембраны за счет эндоцитоза.

Введение в ПН векторных групп позволяет обеспечить направленный транспорт активного вещества к мишени в организме, что значительно повышает эффективность препарата. Кроме того, НЧ с векторными группами обладают меньшей склонностью к захвату клетками ретикуло-эндотелиальной системы [3].

Таким образом, к преимуществам полимерных наночастиц можно отнести [5,6]:

- увеличение стабильности фармацевтических веществ с использованием набора дешевых и легко масштабируемых методов;

- значительное улучшение свойств и эффективности по сравнению с традиционными пероральными и внутривенными лекарственными формами;

- возможность доставки фармацевтического агента в большей концентрации непосредственно к заданной цели в организме;

- выбор строения исходного полимера и возможность контролировать выделение лекарственного вещества из полимерных НЧ делает их идеальными кандидатами для терапии опухолей, доставки вакцин или адресной доставки антибиотиков;

- полимерные НЧ могут быть включены в различные медицинские изделия и системы для придания им требуемой биологической активности.

В случае агрегатов на основе амфифильных полимеров иммобилизация активного вещества протекает путем связывания в гидрофобной части агрегата за счет гидрофобного взаимодействия или за счет присоединения к полярному фрагменту НЧ.

Как отмечалось выше, такие полимерные системы характеризуются структурой «ядро-оболочка». Эти коллоидные структуры привлекли к себе широкое внимание как потенциальные носители плохо растворимых в воде биологически активных веществ за счет того, что они обладают размером от нескольких десятков до сотен нанометров и могут эффективно солюбилизировать гидрофобные вещества в своем внутреннем ядре, образуя водорастворимые суспензии БАВ.

В этом отношении, как отмечалось выше, НЧ амфифильных полимеров близки по строению и назначению использования наноразмерным частицам на основе липидов – липосомам.

1.7.3.1 Противоопухолевая терапия

Низкомолекулярные лекарственные препараты, используемые в противоопухолевой терапии, после внутривенного введения, как правило, не накапливаются в новообразованиях. Кроме того, такие лекарственные вещества, циркулирующие в организме в свободном виде, часто токсичны для непораженных тканей организма, и непрерывно делящихся кишечных клеток.

Использованию для доставки противоопухолевых агентов полимерных НЧ, в первую очередь на основе амфифильных полимеров, посвящено большое количество публикаций. Среди них следует отметить большие обзоры, касающиеся данной области [216, 217].

Показано, что перспективность применения полимерных НЧ в онкологии заключается в том, что некоторые типы опухолей могут быстро захватывать полимерные НЧ с иммобилизованными цитотоксичными лекарственными веществами, что часто является результатом повышенной проницаемости сосудов, проходящих через область опухоли.

В качестве отдельных примеров можно привести ряд результатов проведенных исследований. Так, проведенные *in vivo* исследования, показали изменения в фармакокинетике и биораспределении противоопухолевых лекарственных агентов, включенных в полимерные НЧ, и уменьшение их токсичности по сравнению с чистыми субстанциями [219].

Большое число исследований было посвящено использованию в качестве наноразмерных носителей для противоопухолевой терапии липосом, модифицированных для повышения устойчивости в кровеносном русле амфифильным полиэтиленгликолем [21, 57].

Кроме того, в работе [220] в липосомы, модифицированные амфифильным полиэтиленгликолем, был успешно инкапсулирован доксорубин. При этом

удалось получить не только хорошие результаты при противоопухолевой терапии, но также и значительное снижение связанных с применением доксорубицина побочных эффектов. Например, введение НЧ из полибутилцианоакрилатов с иммобилизованным доксорубицином (1-4 мг/мл) приводит к уменьшению объема опухоли мозга *in vivo*. Инъекционное введение таких НЧ в концентрации 50-500 мг/кг не вызывает гибель экспериментальных животных [221].

В работе [222], представлены методы получения полимерных НЧ мицеллярного типа на основе блок-сополимера полиэтиленоксида и полиаспарагиновой кислоты. Продемонстрировано, что в полученные наночастицы может быть эффективно инкапсулирован плохо растворимый в воде гидрофобный противоопухолевый антибиотик (адриамицин). Приводятся данные, демонстрирующие, что такие наноразмерные мицеллярные системы обладают пролонгированным действием и повышенной биологической активностью.

1.7.3.2 Доставка и защита белковых молекул

С использованием полимерных НЧ может быть решена проблема создания новых эффективных систем доставки лекарственных веществ белковой природы. Системы доставки биологически активных веществ белковой природы с использованием полимерных носителей разного строения могут, в частности, использоваться для увеличения устойчивости белковых молекул, их стабилизации, повышения терапевтической эффективности, а также для доставки в течение периода лечения по необходимому для лечения пути [223].

Первоначально исследования процессов иммобилизации активных белковых молекул на полимерных наноносителях проводились с целью разработки средств для облегчения протекания наследственных энзимопатий. Такие заболевания (гипертрофические) вызывают недостаток ферментов (например, гидролазы) в тканях организма и приводят к накоплению в лизосомах субстрата, что выражается в значительном увеличении размеров печени или селезенки [199].

Многие из белковых молекул обладают биологической активностью и поэтому могут рассматриваться в качестве потенциальных биоактивных агентов

для иммобилизации в полимерных НЧ. Например, такие белковые ингибиторы, как эндостатин, соевый ингибитор протеиназ и другие, в настоящее время проходят разные стадии клинических испытаний. Несмотря на высокий терапевтический потенциал многих белковых молекул, их применение ограничено быстрым выведением из кровотока, активным захватом клетками ретикулоэндотелиальной системы, а также неспецифическим связыванием и деактивацией в организме [224].

В последнее время разработано достаточно большое количество полимерных НЧ для доставки белковых молекул. Много работ посвящено исследованиям иммобилизации различных типов белков, обладающих собственной биологической активностью, в полимерные НЧ, полученные из амфифильных производных полиэтиленоксида, полигидроксипропирата, полимолочной кислоты [223].

Углубленное изучение включения белковых молекул в НЧ и их свойств в экспериментах *in vitro* и *in vivo* позволило создать модели новых лекарственных форм. Получены результаты успешного применения НЧ на основе блоксополимеров полиэтиленгликоля для транспорта и стабилизации белков [224].

Предложенные как противоопухолевые средства иммобилизованные на носителях из амфифильных производных ПЭГ формы аспарагиназы, уже опробованы в для лечения лимфомы и лейкемии. В работе [225] показано увеличение времени циркуляции аспарагиназы, в виде полимерного ассоциата, в несколько раз по сравнению с нативным, нестабилизированным белком.

Опубликована работа, посвященная разработке биосовместимых полимерных носителей на основе сополимеров акриламида и N-винилпирролидона, и их применению для иммобилизации различных ферментов и белков [204].

Использование полисахаридных носителей типа целлюлозы и ее производных (декстранов, агарозы) в качестве носителей для иммобилизации белковых соединений биомедицинского назначения также представляется весьма перспективным. Так, для декстрана, содержащего ^{13}C -меченые атомы, показано, что он полностью разрушается в организме с образованием воды и углекислоты. Особый интерес в этой связи представляют разработка и исследования лекарственных форм

направленного и пролонгированного действия на основе карбоксиметил- и диальдегид- декстранов [226].

1.7.3.3 Препараты для лечения бактериальных и грибковых заболеваний

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что инкапсулированный противогрибковый препарат амфотерицин В в десять раз менее нефротоксичен и гематотоксичен, чем его свободная субстанция в опытах *in vitro* и *in vivo*. Проведенные модельные эксперименты и опыты на животных показали, что лечение грибкового заболевания кандидоза, когда содержащее активное вещество полимерные наночастицы (поликапролактоновые НЧ, покрытые поллоксамером) вводятся внутривенно, является гораздо более эффективным по сравнению с традиционными формами лечения [227].

1.7.3.4 Иммобилизация других лекарственных веществ

Анализ литературных источников позволяет говорить об успешном включении других лекарственных веществ в полимерные НЧ на основе блок-сополимеров. Так, показано, что иммобилизацией инсулина в полимерных НЧ, сформированных из триблок-сополимера (ПЭО - ППО – ПЭО) под маркой «Pluronic F-127», позволяет значительно повысить его биодоступность [228].

В работе [229] продемонстрировано, что включение субстанции кальцитонина в липосомы, мембраны которых модифицированы для стабилизации амфифильными полимерами, приводит к увеличению биодоступности и к повышению мукоадгезивных свойств данного БАВ. Иммобилизация ДНК в эмульсионных системах, полученных из гидрофильно-модифицированных жирных кислот, ведет к увеличению ее количества, переносимого через клеточную мембрану внутрь клетки, по сравнению с липосомальными формами ДНК [230].

В работе [231] в качестве потенциальной системы доставки лекарственных веществ изучали блок-сополимер с гидрофильным фрагментом полиэтиленоксида и гидрофобным фрагментом полипропиленоксида. Было установлено, что такой

блок-сополимер в водных средах образует полимерные мицеллярные носители, пригодные для иммобилизации таких лекарственных веществ, как галоперидол.

С использованием специально введенной в мицеллярные агрегаты радиоактивной метки (^{111}In) продемонстрировано, что наноразмерная форма на основе дифильного производного полиэтиленоксида может осуществлять перенос биологически активного вещества к лимфатическим системам [232].

Показано, что определенные амфифильные полимеры активно взаимодействуют с живыми тканями и, следовательно, могут доставляться к отдельным органам или тканям, как при использовании полимерных форм доставки на основе этих полимеров, так и при применении материалов, поверхность которых покрыта амфифильными полимерами [233]. Благодаря этим свойствам амфифильные полимеры часто используются при создании систем доставки БАВ в качестве вспомогательных компонентов. При этом даже небольшое количество введенного в систему амфифильного полимера способна значительно увеличить ее эффективность [234].

1.7.3.5 Биомедицинская диагностика

Помимо лекарственных форм, полимерные НЧ также находят широкое применение в качестве носителей контрастирующих агентов для магнитно-резонансной, радио- и электронной томографии, и для других видов исследований в биомедицинской диагностике.

Например, для радиодиагностических исследований часто используют полимерные наночастицы, модифицированные радиоактивными метками изотопов ^{111}In и ^{99}Tc . Так, в работе [235] показано, что наночастицы на основе полицианоакрилатов, меченные изотопами, сохраняли устойчивость в течение всего исследования и позволили получить картину распределение этих наночастиц в организме животных. В исследовании [236] мицеллярные агрегаты на основе метоксиполиэтиленгликоля - полилизина использовали в качестве носителей для иммобилизации йода, а затем успешно применили для проведения компьютерной томографии сосудистой системы у подопытных животных.

Парамагнитные НЧ, содержащие различные неорганические ядра и покрытые оболочкой из полимеров, в настоящее время успешно применяются и хорошо себя зарекомендовали в магнитно-резонансной томографии [237]. Эти препараты выпускаются под различными торговыми наименованиями («Lumirem», «Endorem», «Sinerem»). Например, препарат «Lumirem» представляет собой наночастицы оксида железа, покрытые оболочкой из силикона, размер которых 200-300 нм. Препараты «Endorem» и «Sinerem» состоят из наночастиц оксида железа, покрытых блок-сополимером декстрана. Эти препараты обладают высокой стабильностью в организме и обладают улучшенными контрастирующими свойствами по сравнению с обычными ферромагнитными частицами.

Кроме того, в данной области используется способность НЧ на основе амфифильных полимеров накапливаться за счет повышенной проницаемости сосудов в опухолях и очагах воспаления в организме. Как правило, такие НЧ содержат на своей поверхности антитела или лиганд-связывающие рецепторы. Описано использование такого поведения полимерных НЧ в организме для диагностики развития раковых опухолей [238].

Таким образом, анализ опубликованных литературных данных показывает, что основными преимуществами использования полимерных НЧ в фармацевтике, медицине и биотехнологии являются:

- отсутствие, в отличие от химически иммобилизованных систем, необходимости химически модифицировать доставляемое гидрофобное БАВ для солубилизации. Молекулы активных субстанций в неизменном виде включаются в наночастицы и, таким образом, сохраняют свою функциональную активность;
- защита включенных биологически-активных и лекарственных веществ от энзиматической биодеградациии или иммунного действия организма;
- усиление наблюдаемых терапевтических эффектов. В случае химической связи только ограниченно малое количество молекул БАВ могут быть связаны с антителом или другим носителем, не теряя при этом специфичности молекулы носителя. В свою очередь, полимерные НЧ за счет физической инкапсуляции

могут транспортировать сотни, и даже тысячи молекул активного вещества, чем значительно усиливать терапевтическое воздействие;

- включение активного вещества в полимерные НЧ может снижать его токсическое действие до того, как оно достигнет очага поражения;

- возможность концентрирования полимерных НЧ в предполагаемых местах воздействия препарата. Полимерные ПН с заданными размерами, которые могут поступать в ткани и органы из кровотока через поврежденные капилляры и эндотелиальные мембраны, являются перспективными средствами диагностики или локального лечения заболеваний различной этиологии;

- пролонгированный эффект включенного активного агента, обусловленный более продолжительным временем циркуляции полимерных НЧ в кровеносном русле, по сравнению с большинством традиционных лекарственных форм;

- локальное и селективное выделение активного вещества. Полимерные наночастицы могут контролируемо деградировать в определенных органах и тканях за счет изменения внешних или внутренних физических факторов, таких как рН или температура;

- возможность направленного транспорта полимерных наночастиц селективно к конкретному типу клеток. Такого эффекта можно достичь, используя гормоны, углеводы, антитела и другие лиганды, введенные модификацией на поверхность синтезированных полимерных носителей. Этот подход открывает новые возможности для направленного транспорта биологически активных веществ в организме, сопровождающегося контролируемым выделением БАВ;

- способность доставлять молекулы БАВ, которые не имеют специфических мембранных рецепторов, внутрь клетки. Позволяет транспортировать в организме активные вещества, активизирующиеся только после поглощения их клетками;

- возможность, в зависимости от физико-химических свойств лекарственного вещества, выбрать оптимальный метод получения наночастиц с необходимым размером и высокой степенью включения активного компонента.

Таким образом, полимерные наноразмерные частицы, без сомнения, являются перспективной основой для создания новых носителей, находящих применение в

биомедицинских областях, в первую очередь в качестве систем доставки биологически активных и лекарственных веществ.

Основываясь на данных, приведенных в обзоре, можно говорить о необходимости и перспективности создания новых биосовместимых амфифильных полимеров медико-биологического назначения, как основы для получения наноносителей, систем доставки и новых форм БАВ на их основе.

Данная работа посвящена разработке методов синтеза амфифильных полимеров, в том числе содержащих дополнительные функциональные группы, исследованию физико-химических и биологических характеристик полимеров, созданию принципиальных подходов к получению лекарственных систем на их основе.

В работе в качестве целевых амфифильных структур были выбраны диблочные полимеры, позволяющие достаточно легко получать на их основе устойчивые мицеллярные агрегаты. Для синтеза были использованы доступные одно- и двух-стадийные методы формирования макромолекулярной системы.

При этом, при формировании системы была применена реакция контролируемой полимеризации водорастворимого мономера (N-винилпирролидона), образующего гидрофильный блок, под действием вторичного радикала, получаемого при передаче цепи от инициатора на специально вводимый в реакцию передатчик цепи, и образующего на одном конце цепи синтезируемого в результате этого процесса семителехелевого полимера или функциональную группу, пригодную для последующего введения гидрофобного фрагмента, или вводящего такой фрагмент непосредственно.

До начала данной работы применительно к водорастворимым амфифильным макромолекулярным системам подобные процессы, представляющие интерес как технологически доступный метод получения этой важной группы полимеров медико-биологического назначения, были исследованы недостаточно.

2 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1 Обоснование выбранных методов

Во введении и обзоре литературы уже было отмечено, что разработка и создание новых высокоэффективных форм биологически активных и лекарственных веществ является важнейшей междисциплинарной задачей, решаемой рядом наук и технологий, в первую очередь химией, биотехнологией и медициной, фармакологией.

Как было показано в многочисленных исследованиях последних десятилетий, ряд типичных недостатков биологически активных, в частности, лекарственных, веществ (БАВ) может быть устранен использованием различных средств их доставки в организм.

Наиболее продвинутыми в этом отношении являются различные формы БАВ, предназначенные для перорального и наружного применения – таблетки с полимерными оболочками, трансдермальные системы, макрокапсулы и т.п.

Эти формы получили массовое распространение, и их использование позволяет устранить или значительно снизить такие недостатки БАВ, как побочное расходование активного вещества в результате биоразрушения, устранить его неприятный вкус и запах, снизить уровень токсичности, обеспечить пролонгированное действие препарата.

Наконец, в некоторых случаях такие формы позволяют направить препарат в нужную область организма, например, в требуемую зону желудочно-кишечного тракта, как это достигается при применении таблеток, покрытых ионогенными полимерами группы Eudragit [239].

Значительно сложнее достигаются преимущества от использования полимерных носителей при применении водорастворимых препаратов, вводимых, например, инъекционно.

Разработке водорастворимых полимерных форм различных БАВ в 1960-80 гг. было посвящено громадное количество работ, в частности, отраженных в обзорных монографиях отечественных авторов [189, 200, 204].

В этих макромолекулярных системах в большинстве случаев остаток низкомолекулярного биологически активного вещества был связан с основной цепью полимерного носителя постепенно разрушающейся в организме гидролитически лабильной связью, что обеспечивало пролонгированное действие препарата.

С другой стороны использование его в иммобилизованной форме позволяло устранить другие отмеченные выше недостатки. Кроме того, введение в такую макромолекулу векторных групп потенциально обеспечивало направленный транспорт всей полимерной системы (модель лекарственного полимера Х. Рингсдорфа) [240].

Однако, несмотря на значительные синтетические достижения, такие макромолекулярные системы не получили должного применения, что объясняется значительными синтетическими и технологическими сложностями по их получению и производству.

Следует отметить, что значительный импульс к разработке водосовместимых иммобилизованных лекарственных систем дало открытие их наноразмерных форм, что отражено в вышеприведенном обзоре к данной работе.

В первую очередь это относится к липосомальным формам БАВ, многие из которых выпускаются в настоящее время фармацевтической промышленностью. Получение таких форм технологически было значительно легче синтеза ковалентно или ионно иммобилизованных с использованием полимерных носителей БАВ.

С другой стороны, некоторые недостатки липосом, как например, их недостаточная устойчивость в кровеносном русле устранялась введением в липосомальные мембраны амфифильных полимеров, в качестве которых чаще всего использовались, как отмечено в обзоре литературы, амфифильные производные полиэтиленгликоля. Такие препараты допущены к применению во многих странах и выпускаются промышленностью.

Однако, в последнее время при тщательном исследовании токсических свойств полиэтиленгликоля, в частности, в опытах на животных, в том числе, на

высших приматах, было показано, что ПЭГ обладает антигенными и, возможно, иммуногенными свойствами, может индуцировать образование антител, и вызывает уменьшение выживаемости подопытных животных при введении им ПЭГ-содержащих препаратов [241]. Помимо этого, как было выяснено, обнаруженная способность ПЭГ вызывать активацию комплимента может привести к анафилаксии и сердечнососудистой недостаточности [242].

Обнаруженные в последние годы недостатки этого полимера, в первую очередь относящиеся к его токсикологическим характеристикам, а также сложность его функционализации, заставили искать новые амфифильные полимеры, пригодные для модификации липосомальных мембран, чему и посвящена данная работа, в которой в качестве базового полимера для создания гидрофильного блока в целевом амфифильном полимере был выбран поли-N-винилпирролидон, низкомолекулярные полимеры которого широко применяются в создании лекарственных препаратов, например, кровезаменителей дезинтоксикационного действия, и в качестве компонентов различных лекарственных форм.

К началу данной работы широкого исследования синтеза и свойств амфифильных полимеров N-винилпирролидона не проводилось, не были исследованы их токсикологические характеристики, влияние их строения на особенности образования агрегатов, возможность использования в качестве носителей различных БАВ. И только совместными исследованиями ученых РХТУ им. Д.И. Менделеева (Москва, Россия) и Northeastern University (Бостон, США) было показано, что такие полимеры могут быть использованы для модификации липосом с целью повышения их устойчивости [58].

Повышало интерес к использованию амфифильных полимеров N-винилпирролидона и обнаруженная в ходе выполнения данных исследований их потенциальная способность самостоятельно, в отсутствие липидов, образовывать агрегаты, которые, как было выяснено позже, могут являться весьма технологичными носителями и модификаторами БАВ.

Данная работа представлена для защиты по двум специальностям – 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения. В первой ее части рассмотрены методы синтеза новых амфифильных полимеров N-винилпирролидона их строение и свойства. Вторая часть работы посвящена получению и исследованию на основе этих полимеров наноразмерных агрегатов, исследованию их биологических и токсикологических характеристик и рассмотрению возможности их использования для иммобилизации и модификации различных биологически активных веществ.

При этом для синтеза амфифильных полимеров N-винилпирролидона был использован путь синтеза диблочных семителехелевых полимеров, состоящих из двух блоков – гидрофильного блока полимера этого мономера и одной концевой длинноцепной алифатической группы, выполняющей роль гидрофобного блока.

В качестве синтетического подхода в работе была использована вещественная радикальная полимеризация в присутствии передатчика цепи. В качестве последнего в работе было использовано два типа передатчиков цепи. Или реакцию проводили в присутствии низкомолекулярных меркаптанов, содержащих дополнительные функциональные группы (меркаптоуксусная кислота, меркаптопропионовая кислота, 2-меркаптоэтиламин), позволяющие на второй стадии синтеза ввести в полимер концевую гидрофобную группу, или в реакцию вводили передатчик цепи уже содержащий гидрофобный фрагмент (хлорангидрид длинноцепной карбоновой кислоты). В последнем случае целевой продукт был получен в одну стадию.

Следует отметить, что проведение радикальной полимеризации в присутствии передатчиков цепи позволило решить еще одну важную задачу ограничить и оптимизировать молекулярную массу полимерного фрагмента, что было важно с точки зрения получения амфифильного полимера, легко образующего наноразмерные агрегаты.

С другой стороны, использование процесса радикальной полимеризации позволило за счет введения в реакцию дополнительного сомономера получить в

полимере дополнительные функциональные группы, пригодные для связывания различных лигандов.

Разработанные амфифильные полимеры N-винилпирролидона были использованы для формирования на их основе наноразмерных полимерных частиц и модификации липосомальных мембран с целью повышения их стабильность. Изучены свойства полученных наноносителей в зависимости от строения как амфифильных полимеров, так и самих наночастиц.

Кроме того, для изучения биологической совместимости разработанных полимерных наночастиц и модифицированных полимерами липосом были проведены исследования взаимодействия амфифильных полимеров с компонентами крови, их влияния на реологические свойства крови, их цитотоксичности и острой токсичности в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Разработаны готовые лекарственные формы ряда модельных биологически активных и лекарственных веществ, в числе которых белковые молекулы (соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк), противогрибковые антибиотики (нистатин и амфотерицин В), нестероидные противовоспалительные препараты (индометацин). В данной работе были исследованы свойства полученных наноразмерных форм этих веществ, изучена их биосовместимость, токсичность и биологическая активность.

2.2 Получение и исследование амфифильных полимеров N-винилпирролидона

2.2.1 Двухстадийный метод получения амфифильных полимеров N-винилпирролидона

Как было отмечено, как один из подходов для получения амфифильных полимеров N-винилпирролидона был использован метод, в котором на первой стадии получали семителехелевые полимеры N-винилпирролидона, содержащие одну концевую функциональную группу, а на второй стадии модифицировали полученные полимеры, присоединяя гидрофобный алкильный фрагмент к функциональной группе полимера.

2.2.1.1 Изучение механизма полимеризации N-винилпирролидона в присутствии меркаптанов

Меркаптосоединения приобрели практическое применение в процессах полимеризации в качестве регуляторов роста длины цепи (или передатчиков цепи). Высокая реакционная способность меркаптанов в радикальных процессах хорошо известна [243]. На примере полиметилметакрилата и полистирола была продемонстрирована возможность введения концевых функциональных групп с использованием меркаптанов как передатчиков цепи [244].

В работе [245] изучено влияние меркаптанов на средний молекулярный вес и молекулярно-массовое распределение поли-N-винилпирролидона, полученного при блочной полимеризации в присутствии динитрила азоизомасляной кислоты, и показано, что меркаптаны уменьшают количество высокомолекулярных фракций в полимере, снижая его средний молекулярный вес в следующем порядке:



В данной работе для получения полимеров N-винилпирролидона с регулируемым значением молекулярной массы, содержащих концевые функциональные группы, проводили радикальную полимеризацию мономера в присутствии инициатора – динитрила азоизомасляной кислоты (ДАК) и функционального передатчика цепи (регулятора роста цепи) – меркаптана. В

качестве регулятора роста цепи использовали меркаптоуксусную кислоту (МУК), меркаптопропионовую кислоту (МПК) или 2-меркаптоэтиламин (МЭА). Процесс полимеризации исследовали дилатометрическим методом.

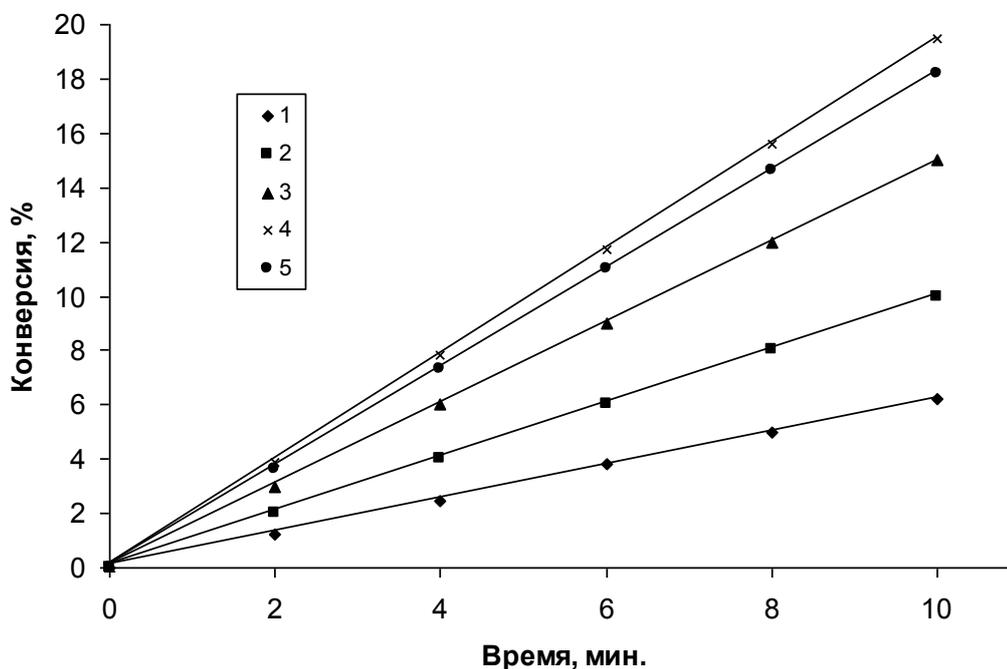


Рисунок 2.1 – Кинетические кривые полимеризации ВП при [МУК] = 0(1); 0.01(2); 0.05(3); 0.15(4); 0.25(5) моль/моль мономера; [ДАК] = 1.0 мас. %; T=343K

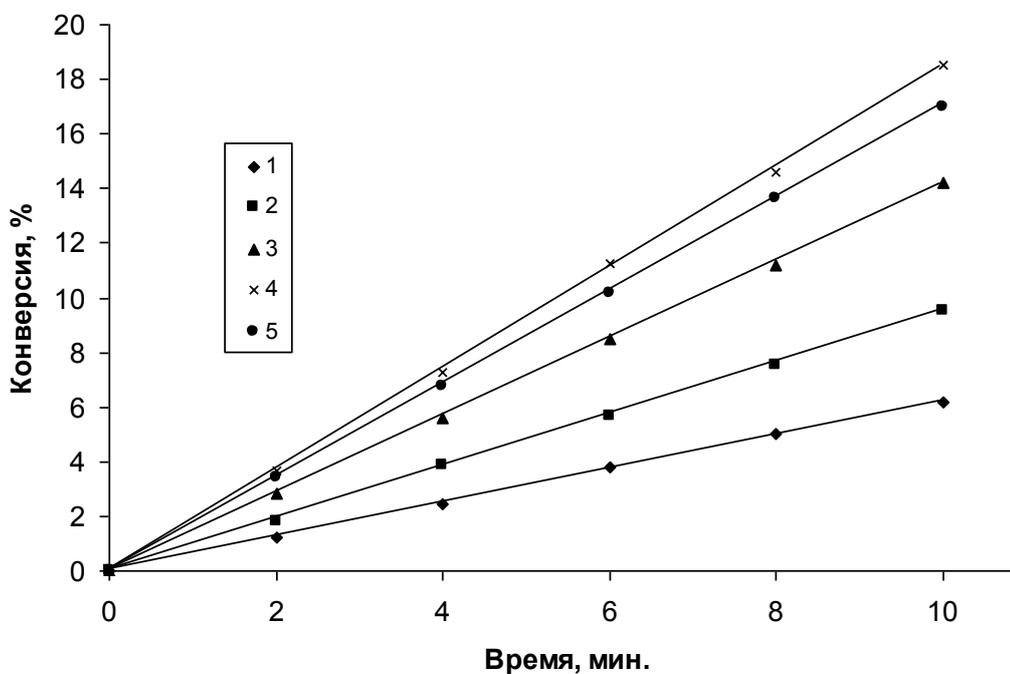


Рисунок 2.2 – Кинетические кривые полимеризации ВП при [МПК] = 0(1); 0.01(2); 0.05(3); 0.15(4); 0.25(5) моль/моль мономера; [ДАК] = 1.0 мас. %; T =343K

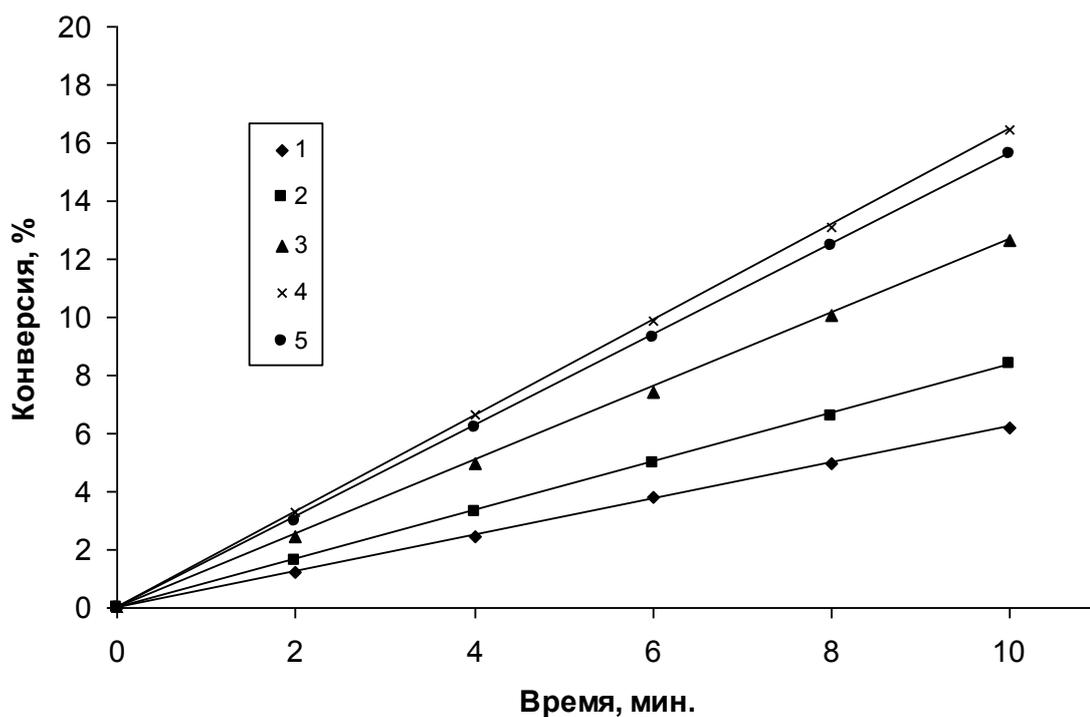
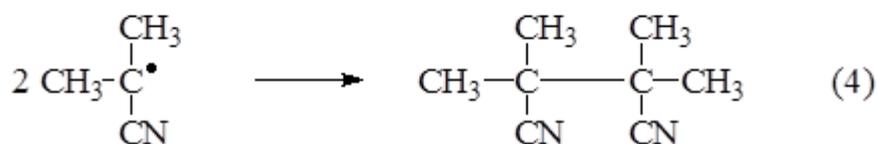
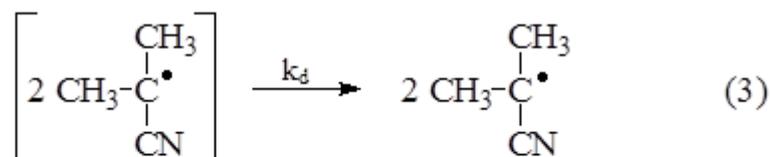
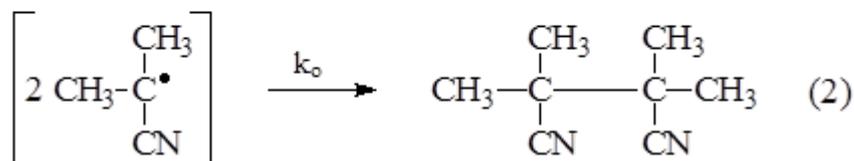
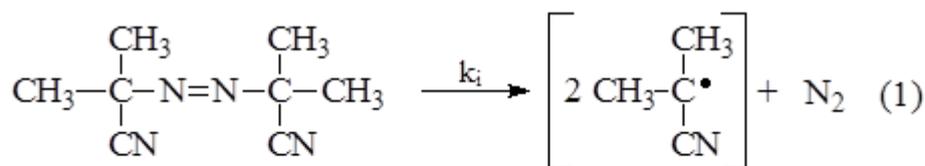


Рисунок 2.3 – Кинетические кривые полимеризации ВП при $[MЭА] = 0(1); 0.01(2); 0.05(3); 0.15(4); 0.25(5)$ моль/моль мономера; $[ДАК] = 1.0$ мас. %; $T = 343K$

Введение в исходные мономерные смеси сравнительно небольших дозировок регулятора – меркаптана – приводит к возрастанию скорости процесса полимеризации (рисунки 2.1-2.3).

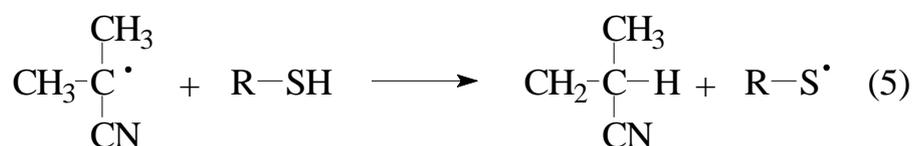
Возможной причиной возрастания скорости реакции является «формальное» увеличение эффективности инициирования, связанное с тем, что в присутствии меркаптосоединений имеет место реакция взаимодействия первичных радикалов (R_0), образующихся при распаде инициатора, с передатчиком цепи (меркаптаном), которая конкурирует с реакцией рекомбинации первичных радикалов.

Для подтверждения наличия такой конкуренции были проведены исследования разложения ДАК в растворах в присутствии и в отсутствии меркаптоуксусной кислоты, меркаптопропионовой кислоты и 2-меркаптоэтиламина. Процесс разложения динитрила азоизомасляной кислоты в растворе под действием температуры может быть представлен следующей схемой, где в квадратные скобки используются для обозначения пар радикалов, находящихся в клетке:



В этом случае основным продуктом разложения ДАК в результате протекания реакций первичной рекомбинации (реакции 2 и 4) является тетраметилсукцинонитрил. В ходе проведенных экспериментов по разложению ДАК в растворителе диоксане при $T=353\text{K}$, выход тетраметилсукцинонитрила в отсутствие меркаптосоединений составлял от 89 до 96 %.

Добавление меркаптанов к растворам ДАК резко снижает выход тетраметилсукцинонитрила (до 7-15 %). Это можно объяснить взаимодействием первичных радикалов с меркаптаном:



Как показано на рисунке 2.4, увеличение концентрации любого из меркаптанов ведет к снижению выхода тетраметилсукцинонитрила, но, даже при самых высоких концентрациях меркаптосоединений, его выход не равен нулю.

При этих концентрациях выход тетраметилсукцинонитрила уже не зависит от концентрации меркаптана, и, следовательно, порядок реакции 5 по меркаптану в этом случае равен нулю. Это означает что все радикалы, диффундирующие в раствор, расходуются на взаимодействие с молекулами меркаптана. Следовательно, при разложении ДАК протекают две реакции образования радикалов. При этом радикалы, образующиеся в ходе первой реакции, переходят в раствор и расходуются на взаимодействие с меркаптаном. Другая же часть радикалов, образующихся в ходе второй реакции, с меркаптанами не взаимодействует, а участвует в реакции первичной рекомбинации с образованием тетраметилсукцинонитрила. Такое протекание разложения ДАК может быть объяснено тем, что скорость реакции 5 достаточно высока, чтобы конкурировать с реакцией 4, но недостаточно высока, чтобы конкурировать с реакциями 2 и 3, которые являются диффузионно-контролируемыми реакциями двух радикалов в клетке.

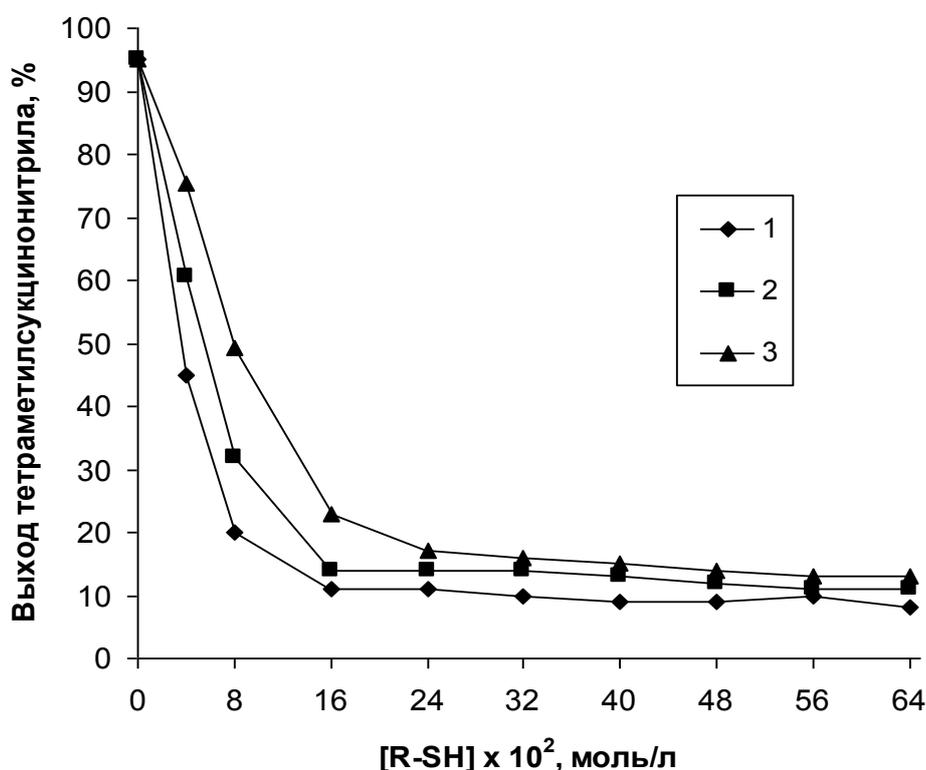


Рисунок 2.4 – Выход тетраметилсукцинонитрила, образующегося при разложении ДАК в диоксане, в присутствии различных количеств меркаптоуксусной кислоты (1), меркаптопропионовой кислоты (2) и меркаптоэтиламина (3); [ДАК] = 0.2 М; T = 353 К

В работе [246] предложено общее уравнение эффективности иницирования в присутствии обрывателя цепи:

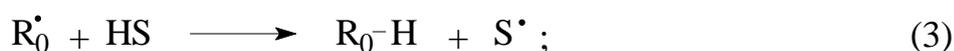
$$f = \frac{D + a(Dk[S])^{1/2}}{ak_o + D + a(Dk[S])^{1/2}},$$

где D – сумма констант диффузии двух радикалов; a – диаметр частицы радикала; k_o – удельная скорость рекомбинации в клетке двух радикалов; k – константа скорости реакции между радикалом и обрывателем, находящимися в паре; $[S]$ – концентрация обрывателя.

Из приведенного уравнения следует, что эффективность иницирования возрастает с увеличением концентрации обрывателя радикалов.

Таким образом, кинетическая схема полимеризации в присутствии регулятора может быть представлена в следующем виде:

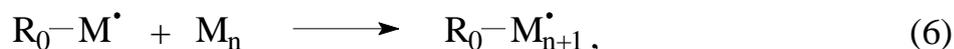
образование иницирующего радикала:



иницирование:



рост цепи:



обрыв цепи:



где: I – инициатор; M – мономер; H-S – молекула регулятора; R_0^\bullet – первичные радикалы, образующиеся при распаде инициатора; S^\bullet – радикал, образовавшийся из меркаптана; $S-M^\bullet$, R_0-M^\bullet , $R_0-M_{n+1}^\bullet$, $S-M_{n+1}^\bullet$ – растущие полимерные радикалы; $S-M_{n+1}-H$, $S-M_{n+1}-M_{n+1}-S$, $S-M_{n+1}-S$, $S-M_{n+1}-R_0$ и $S-M_{n+1}-H$ – инертные молекулы. Квадратные скобки используются для обозначения радикалов, находящихся в клетке.

При достаточном количестве меркаптана инициирование роста цепи может реализоваться не за счет первичного радикала R_0^\bullet , образующегося при распаде инициатора, а за счет радикала S^\bullet , образующегося при отрыве протона от меркаптана, то есть при преобладании реакции 4 над реакцией 5.

Как было установлено, скорость взаимодействия первичных радикалов с меркаптанами на несколько порядков превышает скорость инициирования [247]. Следовательно, первичный радикал R_0^\bullet расходуется предпочтительно в реакции 3. Таким образом, в этих условиях инициирование роста цепи реализуется главным образом за счет радикала S^\bullet с началом цепи с фрагмента меркаптана, содержащего функциональную группу.

Подтверждением того, что эффект повышения скорости связан с образованием из молекул меркаптанов иницирующих радикалов на стадии инициирования (реакция 3) служат данные (рисунки 2.5-2.7), показывающие смещение максимальной скорости с увеличением концентрации ДАК в сторону больших дозировок регулятора.

Постепенное понижение скорости полимеризации при дальнейшем увеличении дозировок меркаптанов (больше 0.15 моль/моль мономера) (рисунки 2.5-2.7) во всех проведенных экспериментах можно объяснить возрастанием роли реакций перекрестного обрыва.

Таким образом, оптимальными являются концентрации добавляемых в систему меркапто соединений в диапазоне от 0,1 до 0,2 моль на 1 моль мономера.

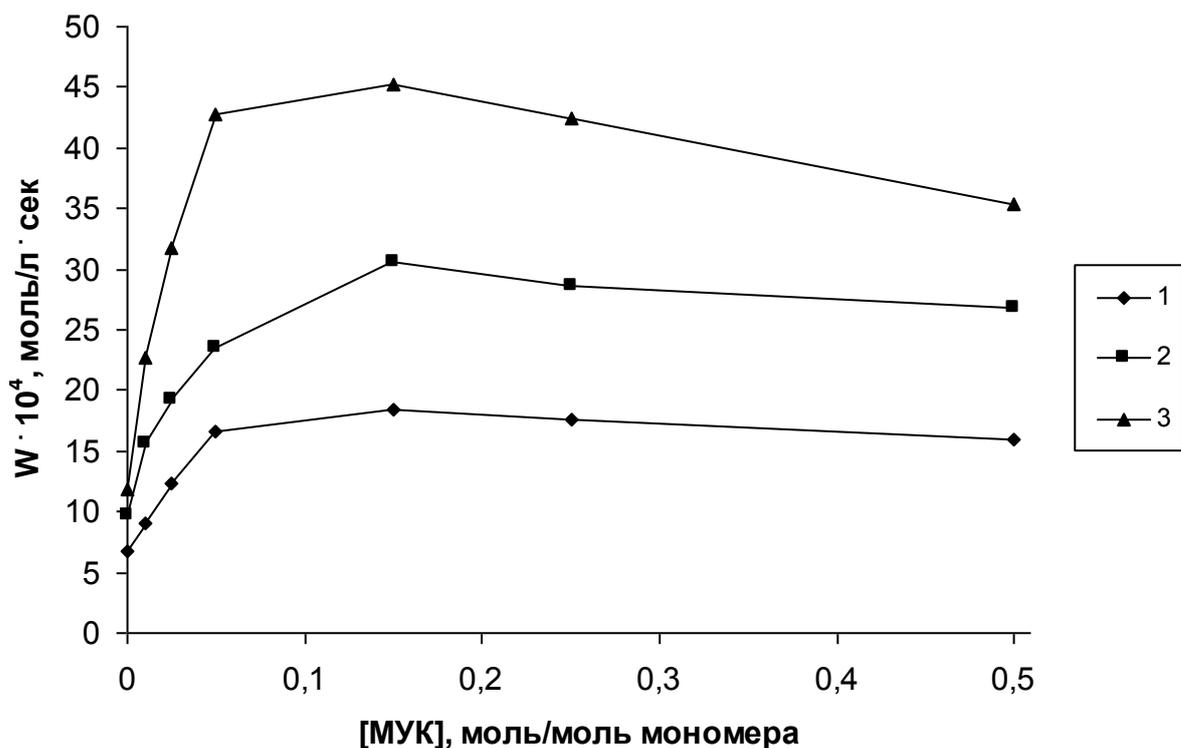


Рисунок 2.5 – Зависимость стационарной скорости W полимеризации ВП от содержания МУК при [ДАК] = 0.5 (1); 1.0 (2) и 1.5 (3) мас. %. $T = 343$ К

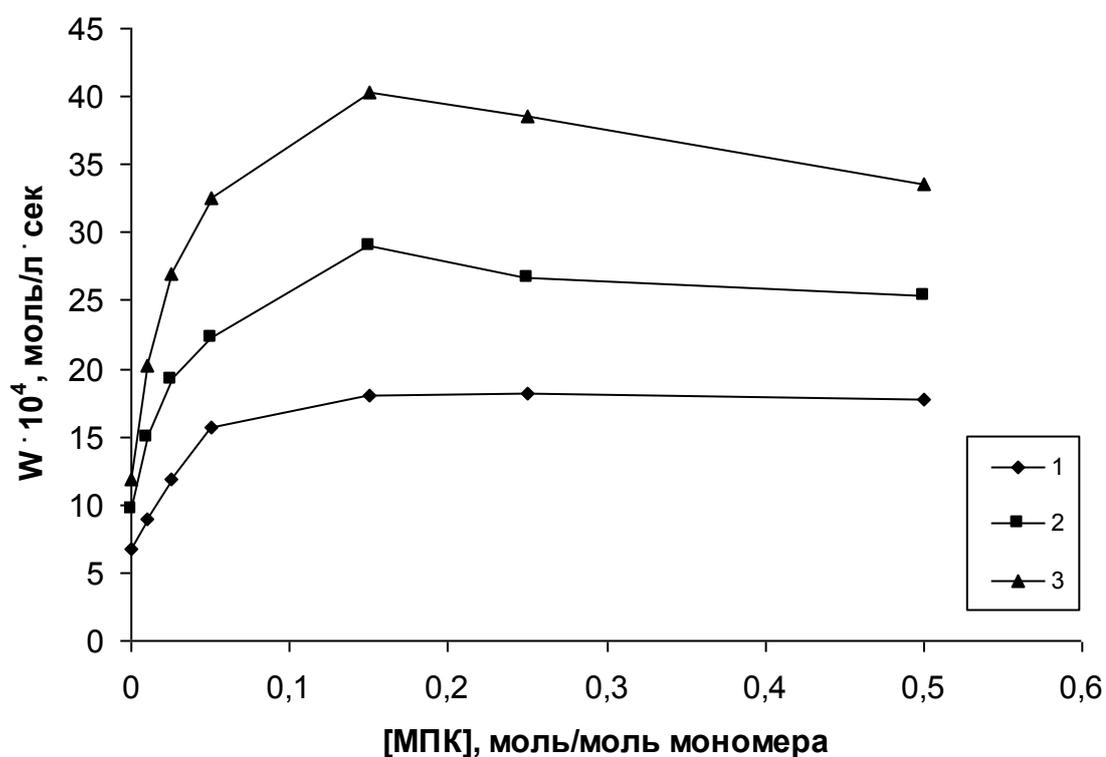


Рисунок 2.6 – Зависимость стационарной скорости W полимеризации ВП от содержания МПК при [ДАК] = 0.5 (1); 1.0 (2) и 1.5 (3) мас. %. $T = 343$ К

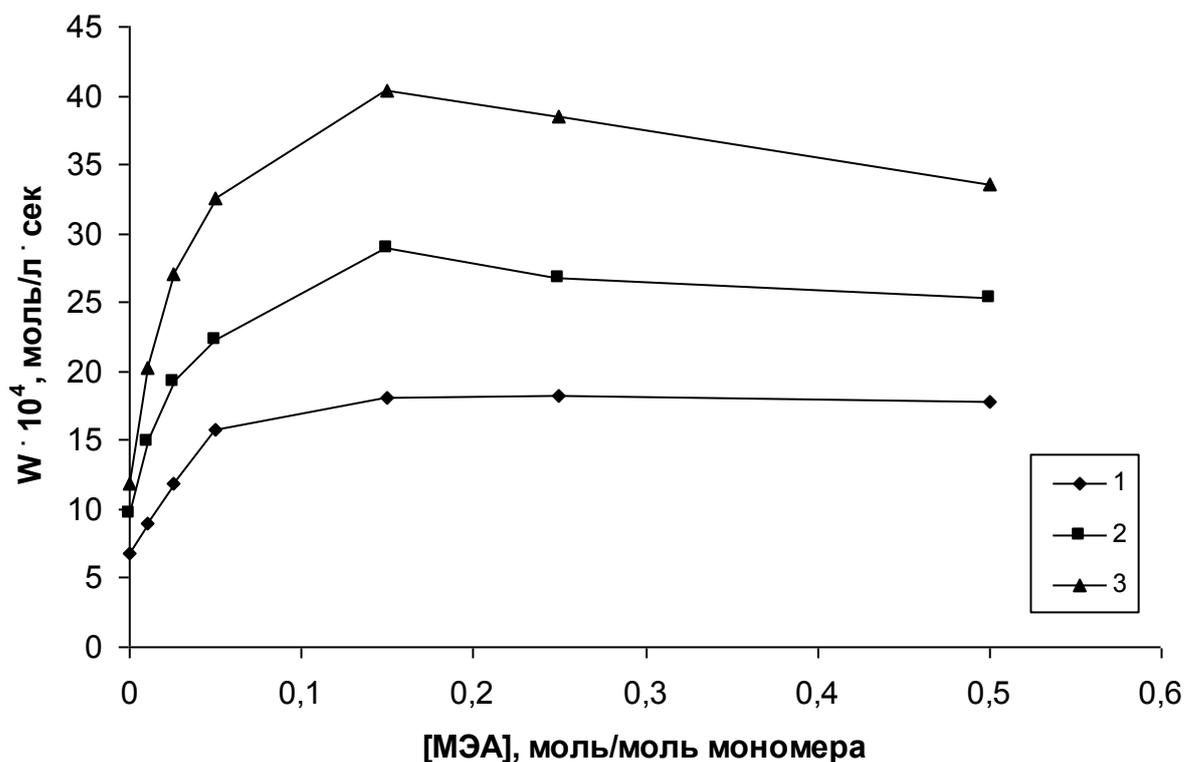


Рисунок 2.7 – Зависимость стационарной скорости W полимеризации ВП от содержания МЭА при [ДАК] = 0.5 (1); 1.0 (2) и 1.5 (3) мас. %. $T = 343$ К

Помимо реакции с первичными радикалами и инициирования процесса полимеризации ВП, в исследуемом способе получения полимеров ВП была использована способность меркаптанов к передаче цепи при радикальной атаке. Поэтому необходимым представлялось исследование процесса передачи цепи на меркаптосоединения при радикальной полимеризации ВП.

Определение константы передачи цепи на регулятор C_s для меркаптоуксусной кислоты, меркаптопропионовой кислоты и меркаптоэтиламина проводили, используя уравнение Майо:

$$\frac{1}{\bar{X}_n} = \frac{1}{\bar{X}_n^0} + C_s \frac{[S]}{[M]},$$

где \bar{X}_n - степень полимеризации в присутствии передатчика цепи; \bar{X}_n^0 - степень полимеризации без передатчика цепи; $[S]$ – концентрация передатчика цепи, моль/л; $[M]$ – концентрация мономера, моль/л.

Найденные графически из зависимости обратной степени полимеризации от концентрации меркаптана (рисунок 2.8) константы передачи цепи на регулятор C_s равны: для меркаптоуксусной кислоты – 441.6, для меркаптопропионовой кислоты – 317.0 и для меркаптоэтиламина – 230.1.

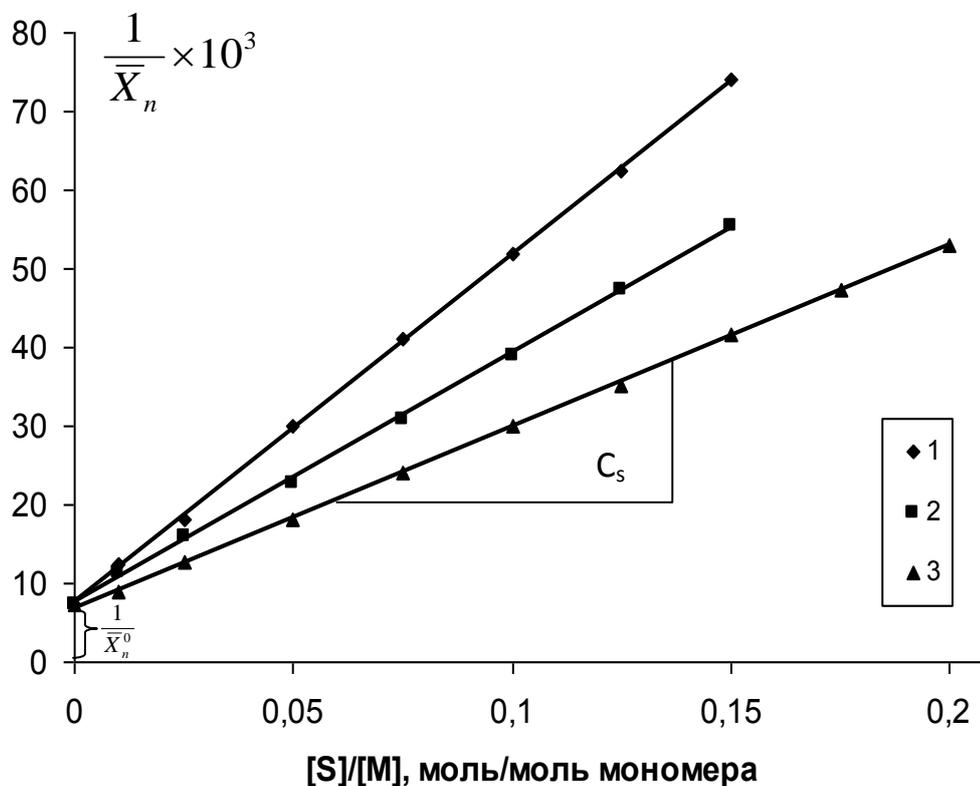


Рисунок 2.8 – Зависимость обратной степени полимеризации ВП от концентрации МУК (1), МПК (2) и МЭА (3). [ДАК] = 1.0 мас. %; T = 343 К

Константа передачи цепи на регулятор описывается следующим уравнением:

$$C_s = k_{ПС}/k_P,$$

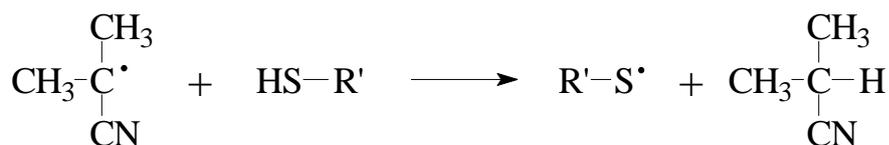
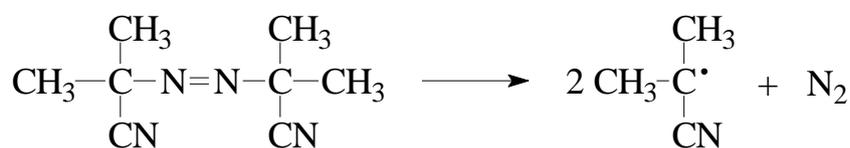
где $k_{ПС}$ – константа скорости передачи цепи на регулятор, а k_P – константа скорости роста цепи.

Полученные значения C_s показывают, что для изучаемых регуляторов роста (МУК, МПК и МЭА) скорость передачи цепи на регулятор во много раз превосходит скорость роста цепи, и, следовательно, в процессе полимеризации ВП на стадии обрыва цепи превалирует реакция отрыва растущим макрорадикалом атома водорода от молекулы меркаптана, с образованием нового

радикала, содержащего функциональную группу, входящую в состав остатка меркаптана, который инициирует полимеризацию.

Таким образом, разработанный в данной работе метод синтеза полимеров ВП, использует способность меркаптанов (МУК, МПК, МЭА) к взаимодействию с первичными радикалами, образующимися при распаде инициатора (ДАК), ведущему к повышению эффективности инициирования полимеризации. При этом радикал меркаптана, образующийся в результате отрыва атома водорода от SH- группы инициирует рост цепи полимера, заканчивающийся передачей цепи на меркаптан (отрывом макрорадикалом атома водорода от SH- группы другой молекулы меркаптана), с образованием нового радикала меркаптана, инициирующего возникновение новой полимерной цепи.

Суммарно, с учетом превалирования скоростей определенных реакций, механизм радикальной полимеризации ВП с использованием в качестве инициатора ДАК, а в качестве регуляторов и передатчиков цепи МУК, МПК и МЭА может быть представлен следующим образом:



где М – молекула или звено мономера; R' = -CH₂COOH, -CH₂CH₂COOH или -CH₂CH₂NH₂.

2.2.1.2 Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии меркаптанов

Изучение полимеризации ВП до глубоких конверсий (рисунке 2.9) показывает, что добавление небольших дозировок меркаптанов приводит к резкому возрастанию скорости полимеризации, и как следствие, полимеризация ВП до конверсий 85÷95 % длится всего 1÷2 часа.

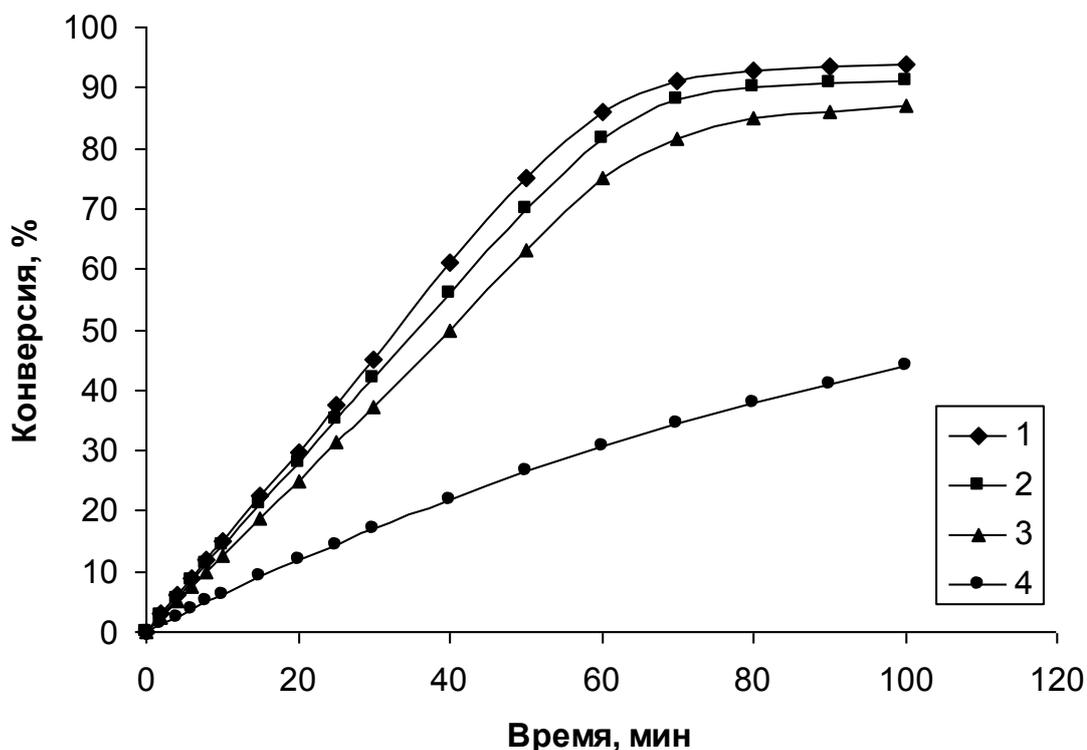


Рисунок 2.9 – Кинетические кривые полимеризации ВП до глубоких конверсий в присутствии регуляторов: 1 – МУК; 2 – МПК; 3 – МЭА; 4 – без регулятора. [ДАК] = 1.0 мас. %; T = 343 К

На рисунках 2.10 и 2.11 представлены зависимости количества выделяемого из реакционной смеси полимера и среднечисловой молекулярной массы M_n поли-N-винилпирролидона от количества введенного в реакцию меркаптана.

Полученные результаты показывают, что при введении в реакционную смесь небольшого количества меркаптанов могут быть получены с высокими выходами низкомолекулярные полимеры с молекулярными массами, требуемыми для создания на их основе полимерных наночастиц для систем доставки биологически активных и лекарственных веществ ($M_n = 1500 \div 15000$).

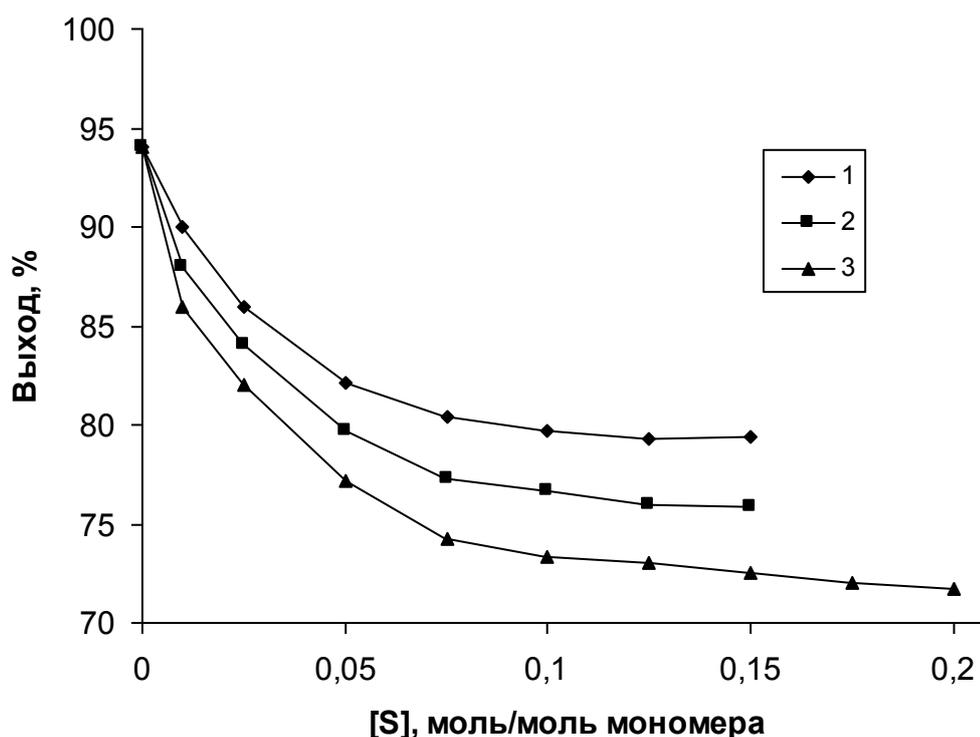


Рисунок 2.10 – Влияние количества введенного меркаптана [S] (1 – МУК, 2 – МПК, 3 – МЭА) на выход выделяемого из реакционной смеси ПВП. [ВП] = 25 % мас.; [ДАК] = 1 % мас.; T = 343 К; растворитель – диоксан

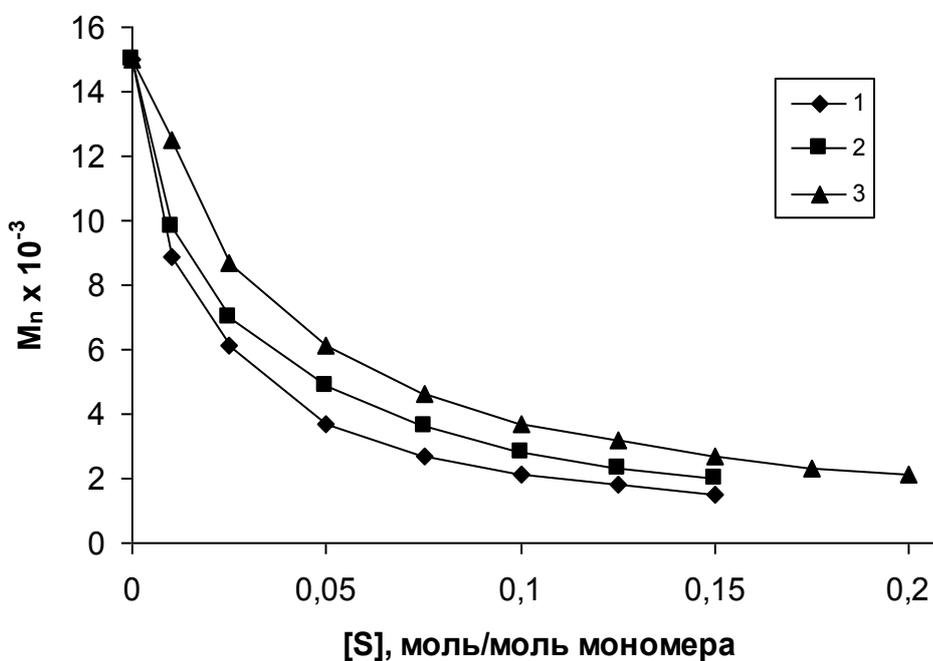
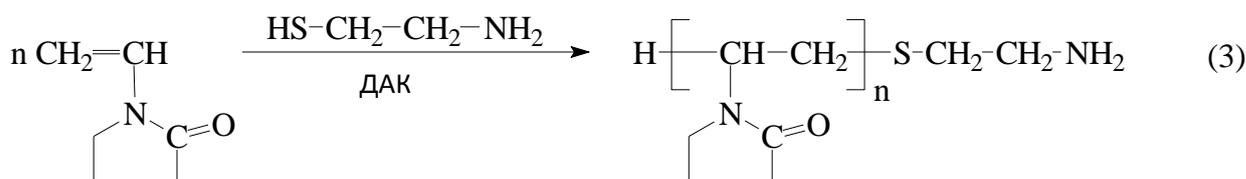
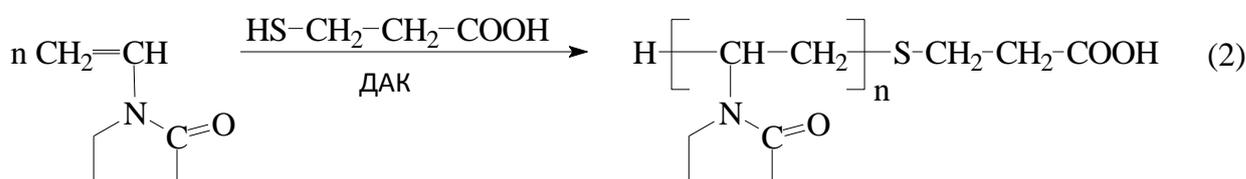
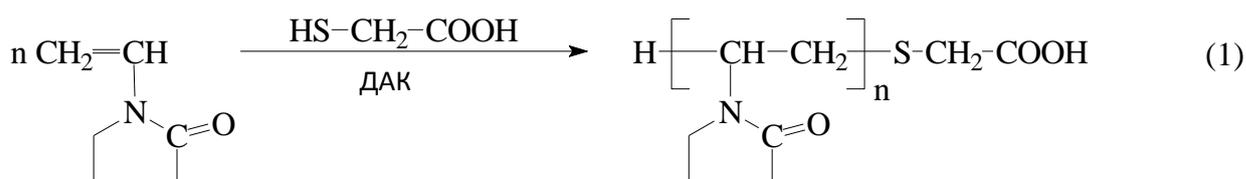


Рисунок 2.11 – Влияние количества введенного меркаптана [S] (1 – МУК, 2 – МПК, 3 – МЭА) на среднечисловую молекулярную массу ПВП. [ВП] = 25 % мас.; [ДАК] = 1 % мас.; T = 343 К; растворитель – диоксан

Полученные для трех исследованных меркаптанов результаты позволяют сделать вывод о том, что активность этих меркаптанов как регуляторов роста и передатчиков цепи уменьшается в следующей последовательности:



В результате проведенных исследований, путем радикальной полимеризации ВП в присутствии инициатора (ДАК) и регулятора роста цепи (МУК, МПК или МЭА) в данной работе были получены серии полимеров с различными (контролируемыми) значениями молекулярной массы, содержащие одну концевую функциональную группу, входящую в состав меркаптана (карбоксильную или аминную). Реакции полимеризации ВП для каждого из меркаптосоединений могут быть представлены в общем виде следующим образом:



В таблице 2.1 представлены все синтезированные семителехелые полимеры N-винилпирролидона. То, что все полученные полимеры содержали одну концевую функциональную группу, было подтверждено совпадением значений молекулярных масс полимеров, определенных методом потенциометрического титрования по содержанию в них концевых функциональных групп, и, альтернативно методом паровой осмометрии.

Из данных, приведенных в таблице 2.1 видно, что молекулярные массы, определенные независимыми методами во всех случаях практически совпадают, что подтверждает наличие только одной концевой функциональной группы в макромолекулах полимеров.

Таблица 2.1 – Семителехелевые полимеры N-винилпирролидона

M_n^* - среднечисловая молекулярная масса, определенная по концевым группам; M_n^{**} - среднечисловая молекулярная масса, определенная, методом паровой осмометрии

Строение полимера	M_n^*	M_n^{**}
$\text{H} \left[\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{C} = \text{O} \end{array} \right]_n \text{S} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	1500	1600
	2000	2200
	2600	2600
	3300	3400
	4000	4000
	6500	6400
	8000	8000
	10000	10300
	12000	11800
$\text{H} \left[\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{C} = \text{O} \end{array} \right]_n \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	2000	2100
	2800	2900
	3500	3500
	4500	4700
	6000	6000
	9800	10000
$\text{H} \left[\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{C} = \text{O} \end{array} \right]_n \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$	2100	2300
	3000	3100
	3800	3800
	5200	5200
	8700	8800
	12500	12400

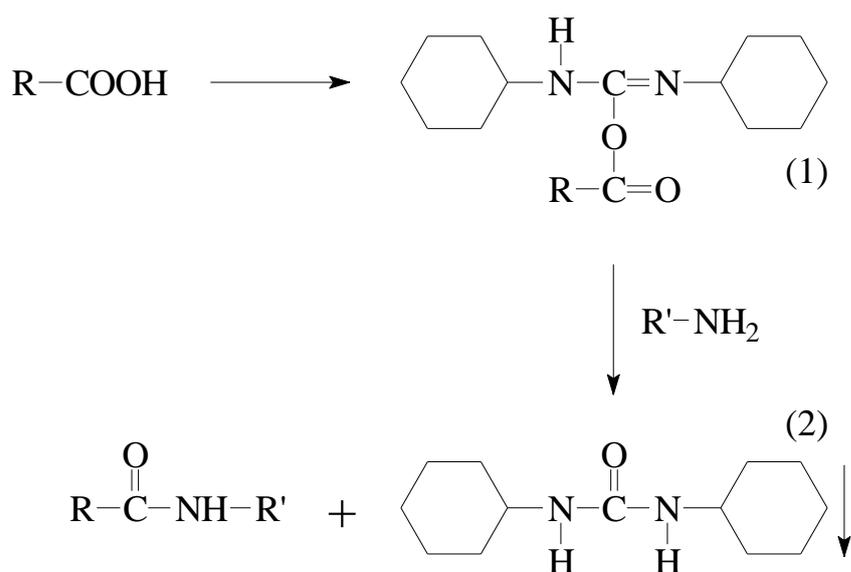
Таким образом, была разработана методика синтеза семителехелевых полимеров N-винилпирролидона, содержащих одну концевую функциональную группу, позволяющая эффективно контролировать молекулярную массу образующихся полимеров и воспроизводимо, быстро и просто получать с большим выходом целевые продукты.

2.2.1.3 Синтез амфифильных производных полимеров N-винилпирролидона

Следующим шагом в данной работе стало получение на основе синтезированных водорастворимых семителехелевых полимеров N-винилпирролидона их амфифильных производных (дифильные полимеры), содержащих водорастворимый полимерный фрагмент и одну концевую гидрофобную группу различного строения.

Введение в полученные на первой стадии полимеры (таблица 2.1) концевой гидрофобной группы проводили обработкой карбоксилсодержащих полимеров (полученных полимеризацией в присутствии меркаптокислот), карбоксильная группа которых была активирована N,N'-дициклогексилкарбодиимидом (ДЦГК), длинноцепными первичными или вторичными алифатическими аминами различного строения (н-гексиламин, н-октиламин, н-додециламин, н-гексадециламин, н-октадециламин, ди(н-гексил)амин, ди(н-октил)амин, ди(н-октадецил)амин, с выделением N,N'-дициклогексилмочевины (ДЦГМ).

С использованием такого подхода карбоксильная группа может быть легко переведена в активированную форму – сложноэфирную, способную легко взаимодействовать со свободной аминогруппой алифатического амина, с образованием амидной группы, в мягких условиях и с высокими выходами:

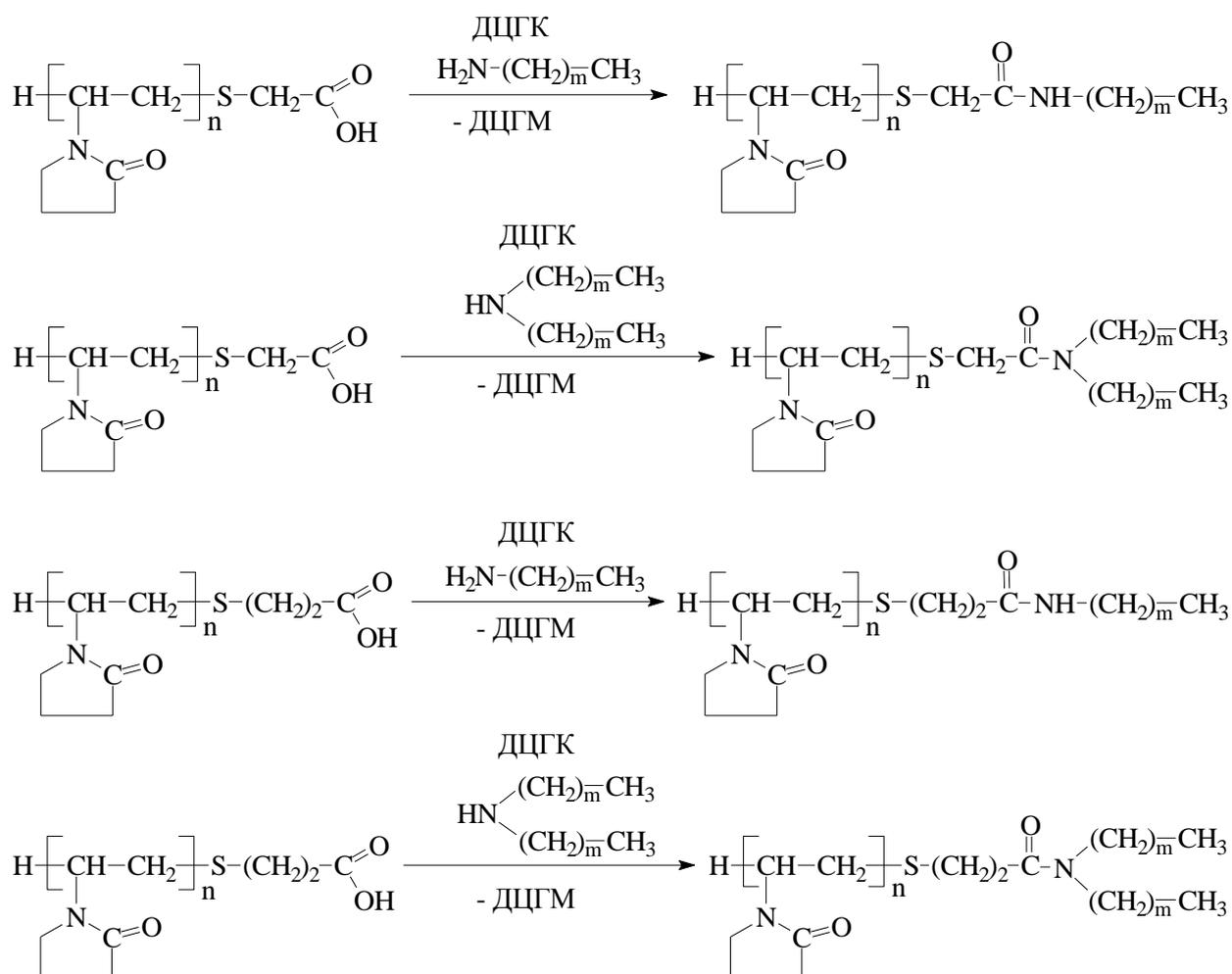


Амины реагируют с карбоновыми кислотами в присутствии ДЦГК при 273 К с образованием амидов с выходом 70÷90 % [248, 249]. Применение ДЦГК заключается в превращении карбоксильной группы в активированный эфир типа

(1), с последующим его взаимодействием с амином, сопровождающимся образованием амида и выпадением осадка ДЦГМ (2).

Известно, что преимуществом данного метода являются хорошие выходы при малом времени реакции и низкая степень рацемизации, что важно для оптически активных карбоновых кислот.

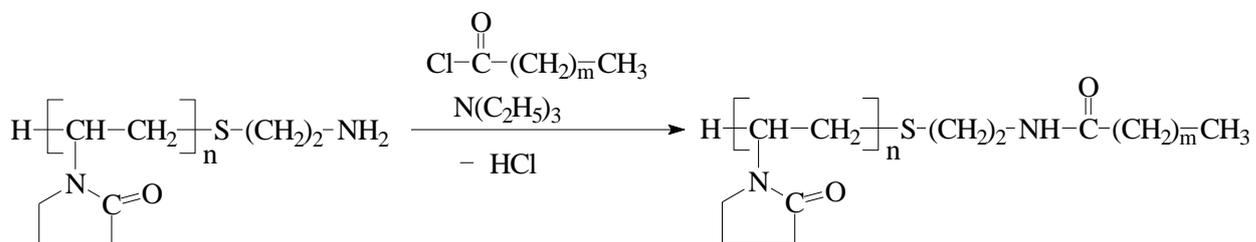
Схема получения амфифильных производных из синтезированных полимеров N-винилпирролидона, содержащих концевую карбоксильную группу (таблица 2.1), может быть представлена следующим образом:



где $m = 5, 7, 11, 15$ или 17 , в зависимости от используемого для модификации первичного или вторичного амина.

Аминосодержащие семителехелевые полимеры (таблица 2.1), для получения амфифильных производных, обрабатывали хлорангидридами длинноцепных алифатических кислот (лауриновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидиновой и бегеновой) с выделением хлористого водорода.

Общая схема модификации синтезированных полимеров N-винилпирролидона, содержащих концевую аминогруппу (таблица 2.1), для получения их амфифильных производных, может быть представлена следующим образом:



где $m = 10, 14, 16, 18$ или 20 в зависимости от используемой для получения амфифильного полимера алифатической карбоновой кислоты.

Во всех реакциях получения амфифильных полимеров из семителехелевых поли-N-винилпирролидонов выход амфифильных полимеров составлял $70 \div 90 \%$.

Определение степени замещения концевых функциональных групп семителехелевых полимеров было проведено методом потенциометрического титрования в тех же условиях, что и при определении этих групп при нахождении молекулярной массы полимеров. При этом во всех образцах полимеров концевые карбоксильные или аминные группы обнаружены не были, что указывает на то, что степень их замещения близка к полной.

Молекулярная масса амфифильных производных поли-N-винилпирролидона, определенная методом паровой осмометрии, во всех случаях совпадала с значениями молекулярной массы исходных амино- и карбоксилсодержащих полимеров N-винилпирролидона.

Таким образом, путем модификации полимеров N-винилпирролидона различной молекулярной массы, содержащих одну концевую карбоксильную или аминную группу, их взаимодействием с длинноцепными алифатическими аминами или хлорангидами алифатических кислот соответственно, были получены амфифильные полимеры, содержащие в качестве гидрофильного фрагмента поли-N-винилпирролидон разной молекулярной массы ($M_n = 1500 \div 14000$), а в качестве гидрофобного блока концевой длинноцепной первичный ($\text{C}_6 \div \text{C}_{22}$) или вторичный ($(\text{C}_6)_2 \div (\text{C}_{18})_2$) алифатический радикал.

2.2.1.4 Исследование строения амфифильных полимеров N-винилпирролидона, полученных двухстадийным методом

Строение синтезированных полимеров N-винилпирролидона и их амфифильных производных было изучено методом ЯМР C^{13} и ЯМР H^1 спектроскопии (400 МГц).

На рисунке 2.12 представлен ^{13}C ЯМР спектр амфифильного поли-N-винилпирролидона с молекулярной массой $M_n=3300$, содержащего концевую гидрофобную октадецильную группу (ПВП-ОД 3300). Проанализировав химические формулы полимеров, синтезированных в ходе работы, были выделены основные типы и виды внутренних взаимодействий в полимерных макромолекулах, и рассчитаны теоретически возможные ЯМР спектры этих соединений. После этого рассчитанные теоретически результаты сравнивали с полученными экспериментально.

На рисунке 2.12 можно выделить пики, которые отвечают атомам углерода - CH_2 - групп гидрофильной части ПВП (химические сдвиги 44.5; 43.2; 41.2 и 31 м.д.); атомам углерода - CH_2 - групп октадецильной концевой группы (химический сдвиг 19 м.д.), а также карбонильным атомам углерода (химический сдвиг 174 м.д.) в молекуле амфифильного полимера. Приведенные химические сдвиги полностью совпадают с химическими сдвигами, рассчитанными теоретически.

Кроме того, получены 1H ЯМР спектры амфифильных полимеров N-винилпирролидона. При этом стоит отметить, что на 1H ЯМР спектрах сигналы протонов помимо химического сдвига характеризовали также формой и интенсивностью. По интенсивности пика сигнала было возможно определить число протонов данного типа в макромолекуле полимера, то есть тех протонов, которые взаимодействуют с внешним полем с одинаковой силой. Для этого интенсивность сигнала измеряли по его площади на ЯМР спектре.

Как можно видеть из 1H ЯМР спектре полимера ПВП-ОД 3300 в ДМСО- d_6 , приведенного на рисунке 2.13, интегралы соответствующие числу протонов в полимере, полностью совпадали с количеством протонов, вычисленным исходя из молекулярной массы и теоретической химической формулы полимера.

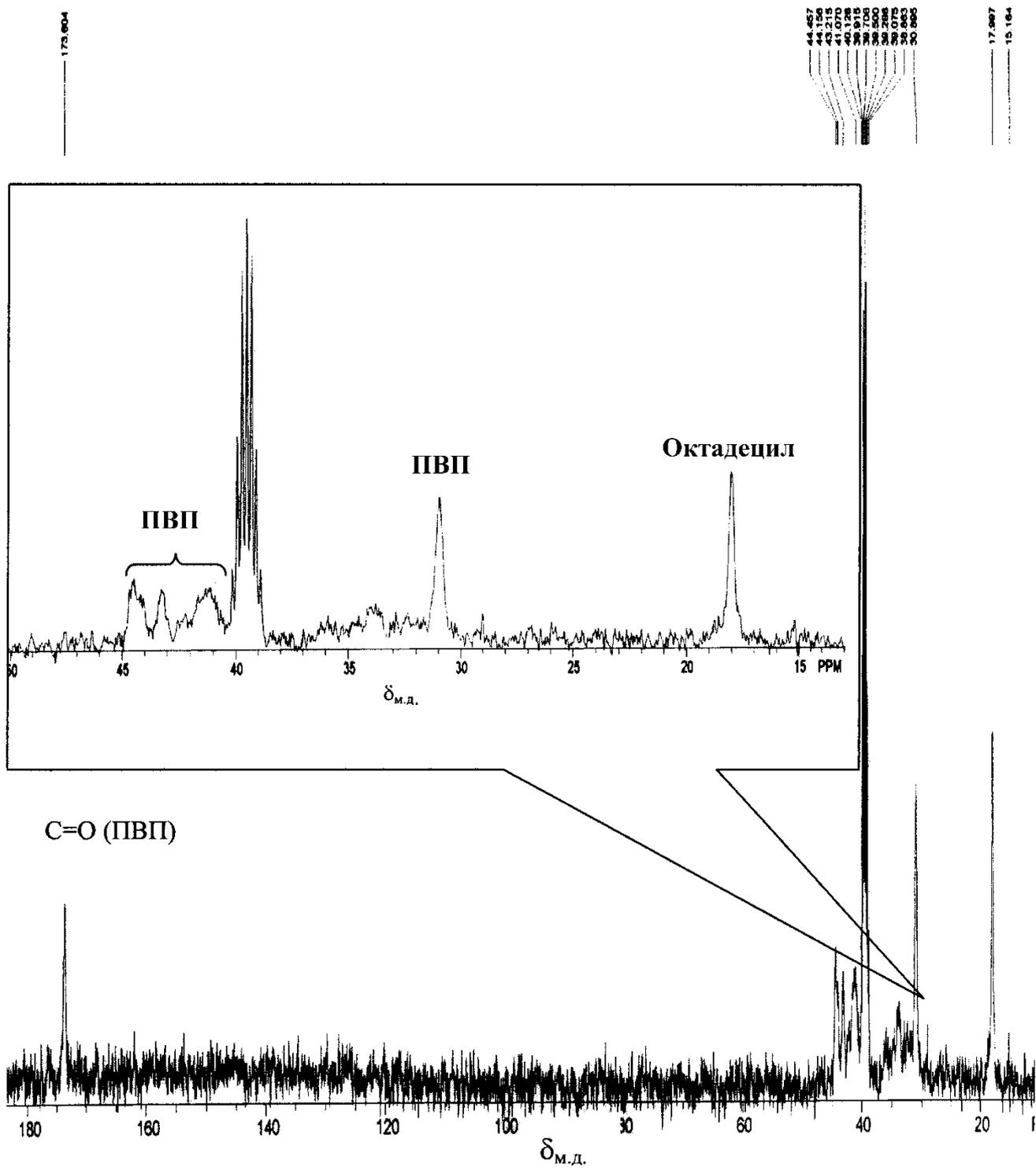


Рисунок 2.12 – ^{13}C -ЯМР спектр амифильного полимера ПВП-ОД 3300

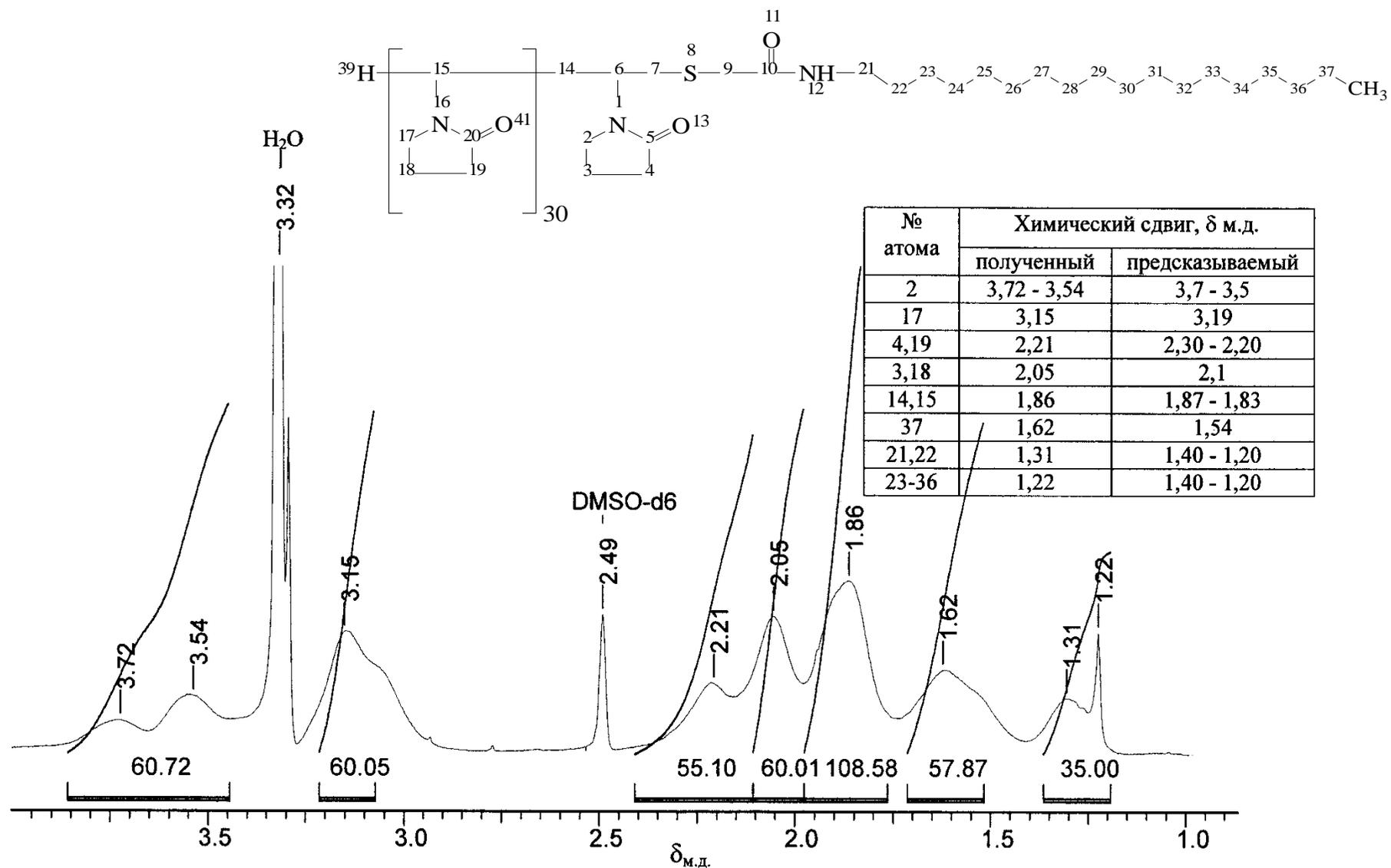


Рисунок 2.13 – $^1\text{H-NMR}$ спектр амфифильного полимера ПВП-ОД 3300 в ДМСО- d_6

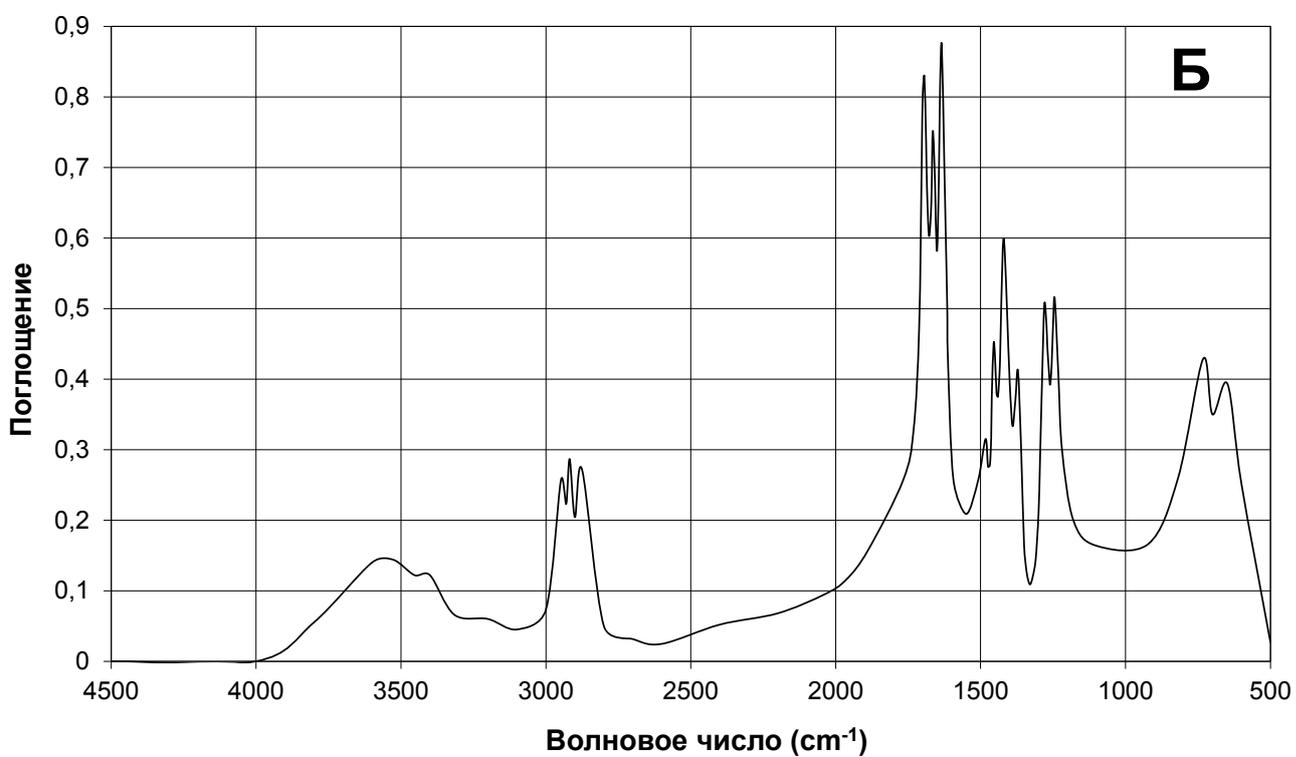
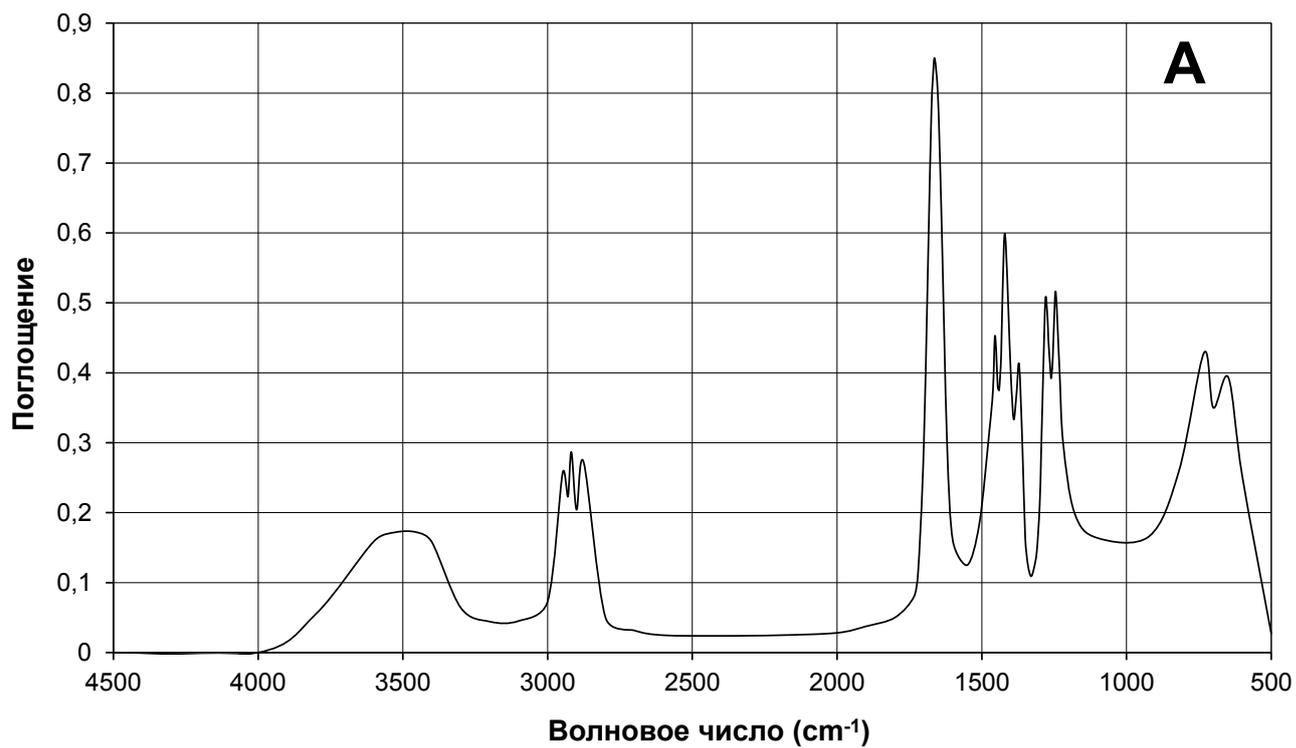


Рисунок 2.14 – ИК-спектры семителехелевого (А) ПВП (ПВП 3300) и амфифильного (Б) ПВП, содержащего концевую октадецильную группу (ПВП-ОД 3300)

Также синтезированные семителехелевые и амфифильные полимеры были исследованы методом ИК-спектроскопии (рисунок 2.14). При этом была установлена разница между ИК-спектрами полимеров без концевой гидрофобной группы (семителехелевых полимеров) и амфифильных полимеров, содержащих концевой алифатический гидрофобный фрагмент. На ИК-спектрах амфифильных полимеров в области поглощения карбонильной группы наблюдалось кроме основного поглощения соответствующего карбонилу полностью замещенного амида пирролидонового кольца ($\sim 1664 \text{ см}^{-1}$) дополнительное поглощение соответствующее монозамещенному амиду концевой группы (~ 1680 и 1640 см^{-1}) (рисунок 2.14Б). При этом интенсивность этого поглощения повышается с уменьшением молекулярной массы полимера. Кроме того, на ИК-спектрах этих полимеров наблюдались увеличения интенсивностей поглощения метиленовых групп, отвечающих концевым длинноцепным алкильным группам ($633, 2850 \text{ см}^{-1}$).

Таким образом, методами ИК- и ЯМР-спектроскопии было подтверждено строение синтезированных семителехелевых и амфифильных полимеров N-винилпирролидона.

2.2.2 Двухстадийный метод получения амфифильных сополимеров N-винилпирролидона, содержащих дополнительные функциональные группы

С целью получения амфифильных полимеров, содержащих дополнительные функциональные группы, которые могут быть использованы для дополнительной функционализации полимерных наночастиц (например, для придания им векторных свойств и способности к направленной, целевой доставки лекарственного или биологически активного вещества в организме), в данной работе разработаны методы получения амфифильных сополимеров N-винилпирролидона, в частности с аллильными мономерами, в качестве которого в работе был использован п-аллилоксибензальдегид.

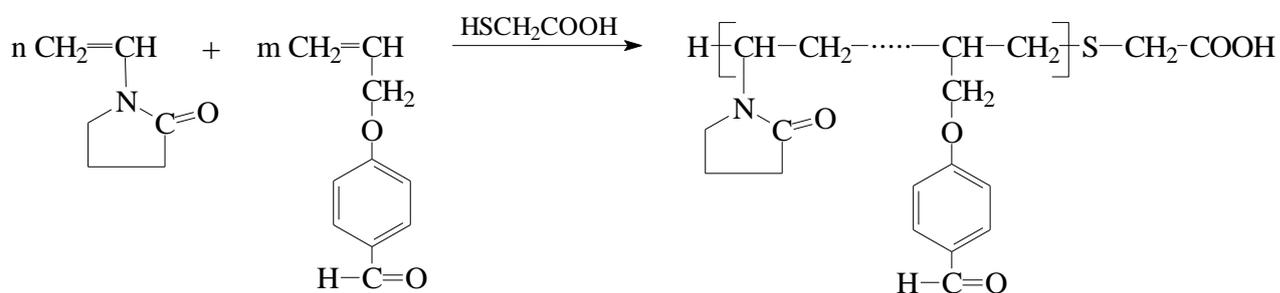
Выбор этого мономера, содержащего важную для различных процессов иммобилизации альдегидную группу, определялся ключевой для получения сополимера с боковыми альдегидными группами особенностью – их

стабильностью в данном процессе, в отличие от сополимеров алифатических альдегидов, таких как акролеин и кротоновый альдегид, легко вступающих в реакции альдольной и кротоновой конденсации, что отражено в литературе [200].

2.2.2.1. Сополимеризация N-винилпирролидона с п-аллилоксибензальдегидом

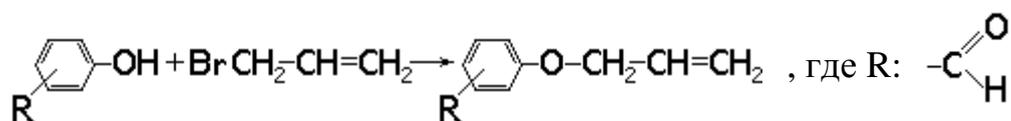
Выбор в качестве второго сомономера для сополимеризации N-винилпирролидона аллильного соединения обусловлен возможностью получения сополимеров с низкой молекулярной массой и с достаточно узким молекулярно-массовым распределением, способствующим их полному выведению из организма. Кроме того, возникает возможность получения полимеров с низкой блочностью по аллильному мономеру, что определяет их пониженную токсичность. В данной работе в качестве такого аллильного мономера был использован п-аллилоксибензальдегид.

Как и в случае с получением поли-N-винилпирролидонов, проводилась радикальная полимеризация мономеров в присутствии инициатора (ДАК) и функционального передатчика цепи – меркаптана. Из всех исследованных меркаптанов для проведения сополимеризации была выбрана меркаптоуксусная кислота (МУК), которая обладает наибольшей активностью в качестве регулятора роста цепи. Общая схема процесса сополимеризации может быть представлена следующим образом:



Мономерный альдегид был получен с использованием реакции нуклеофильного замещения брома в аллилбромиде соответствующими фенольными заместителями. Как известно, реакции такого типа ускоряются в присутствии полярных растворителей, поэтому она проводилась в среде сухого

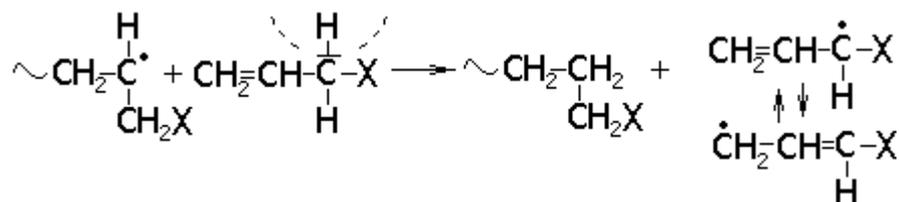
ацетона, а в качестве акцептора выделяющегося бромоводорода использовали K_2CO_3 . Реакция п-бензальдегида с бромистым аллилом протекает по схеме:



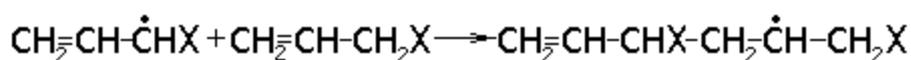
Применявшиеся температурные условия очистки данных аллильных мономеров исключали возможность протекания побочных процессов, например перегруппировки Кляйзена, о чем свидетельствуют отрицательные данные анализов на свободный фенол (качественная реакция с хлорным железом и данные ГЖХ).

Как известно, для сополимеризации аллильных мономеров характерны те же элементарные акты, что и для виниловых соединений, однако скорость их гомогенизации низка и степень полимеризации незначительна [250].

Причиной этого эффекта является то, что передача цепи на аллильный мономер приводит не просто к гибели растущего макрорадикала, но и к полному обрыву кинетической цепи за счет отрыва атома водорода в α -положении к аллильной связи с образованием резонансно стабилизированного аллильного радикала:



Эта так называемая деградиционная передача цепи на мономер или аутоингибирование – главная причина низкой молекулярной массы аллильных полимеров и их ингибирующего действия в процессах сополимеризации, а также низкой блочности получаемых продуктов по аллильному мономеру. Однако, наряду с деградиционной передачей, аллильный радикал может инициировать новую цепь (эффективная передача цепи):



Для определения условий синтеза полимеров с необходимым содержанием реакционноспособных звеньев и определенной молекулярной массой, было

проведено исследование влияния температурно-временных факторов, концентрации инициатора, передатчика цепи, мономеров в исходной реакционной системе на выход и состав получаемых сополимеров. Состав сополимеров N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида (ПВП-пАОБА) определяли методом оксиметрического титрования.

Свободнорадикальная сополимеризация N-винилпирролидона с п-аллилоксибензальдегидом в присутствии инициатора и функционального передатчика цепи протекает по уже приведенной схеме.

В результате предварительных исследований было установлено, что в отсутствие растворителя, сополимеризация приводит к образованию низкомолекулярных продуктов с небольшим содержанием связанного аллильного мономера.

По этому, был выбран способ сополимеризации в растворе. Сополимеры N-винилпирролидона получали в диоксане – апротонном инертном растворителе, малоспособном к реакциям обрыва и передачи цепи. В качестве инициатора использовали ДАК – более эффективный в процессах сополимеризации N-винилпирролидона [251] и легко генерирующий радикалы в более широком температурном интервале.

В качестве функционального передатчика цепи использовался меркаптан – меркаптоуксусная кислота. Использование меркаптана позволило получить сополимеры N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида с контролируемыми значениями молекулярной массы и с одной концевой карбоксильной группой.

Применение меркаптана также позволило ускорить процесс сополимеризации за счет увеличения эффективности инициирования и превалирования процесса передачи цепи на меркаптан.

При рассмотрении влияния различных факторов на процесс сополимеризации необходимо учитывать, что один и тот же фактор может по-разному влиять на реакции инициирования, роста, обрыва и передачи цепи.

Поэтому задачей данного исследования являлось определение оптимальных параметров процесса, согласованное действие которых обеспечит получение продуктов с определенным набором характеристик.

На рисунок 2.15 показаны зависимости состава и выхода сополимеров от состава исходной реакционной смеси.

Как видно, выход сополимеров уменьшается с увеличением мольной доли аллильного мономера в исходной реакционной смеси, что объясняется увеличением вероятности реакций обрыва цепи с участием аллильного соединения и возрастанием доли олигомерных продуктов. Содержание звеньев аллильного мономера в сополимере возрастает с увеличением его мольной доли в исходной смеси. По-видимому, уменьшение выхода продуктов реакции обусловлено не только деградационной передачей цепи на аллильный мономер, но и характером заместителя в нем, с определенной способностью к обрыву и передаче кинетической цепи.

Известно, что фенолы являются передатчиками цепи или слабыми ингибиторами полимеризации. Методом изотопного анализа показано, что отрыв атома Н в гидроксиле является стадией, определяющей скорость реакции передачи цепи.

Достаточно сильными передатчиками цепи являются галогеналкилы и другие галогенсодержащие соединения [252]. Поведение в реакциях передачи цепи ароматических аминов исследовалось Бевингтоном и Тротом [253]. Методом меченых атомов было показано, что отщепление атома Н аминной группы является первичной реакцией.

По-видимому, влияние заместителя связанного с аллильным радикалом сказывается либо в усилении его стабилизации и, как следствие более полного обрыва кинетической цепи, когда наблюдается образование продукта с небольшим содержанием звеньев аллильного мономера, либо в некоторой поляризационной дестабилизации аллильного радикала, приводящей к противоположному эффекту за счет увеличения вероятности эффективной передачи цепи.

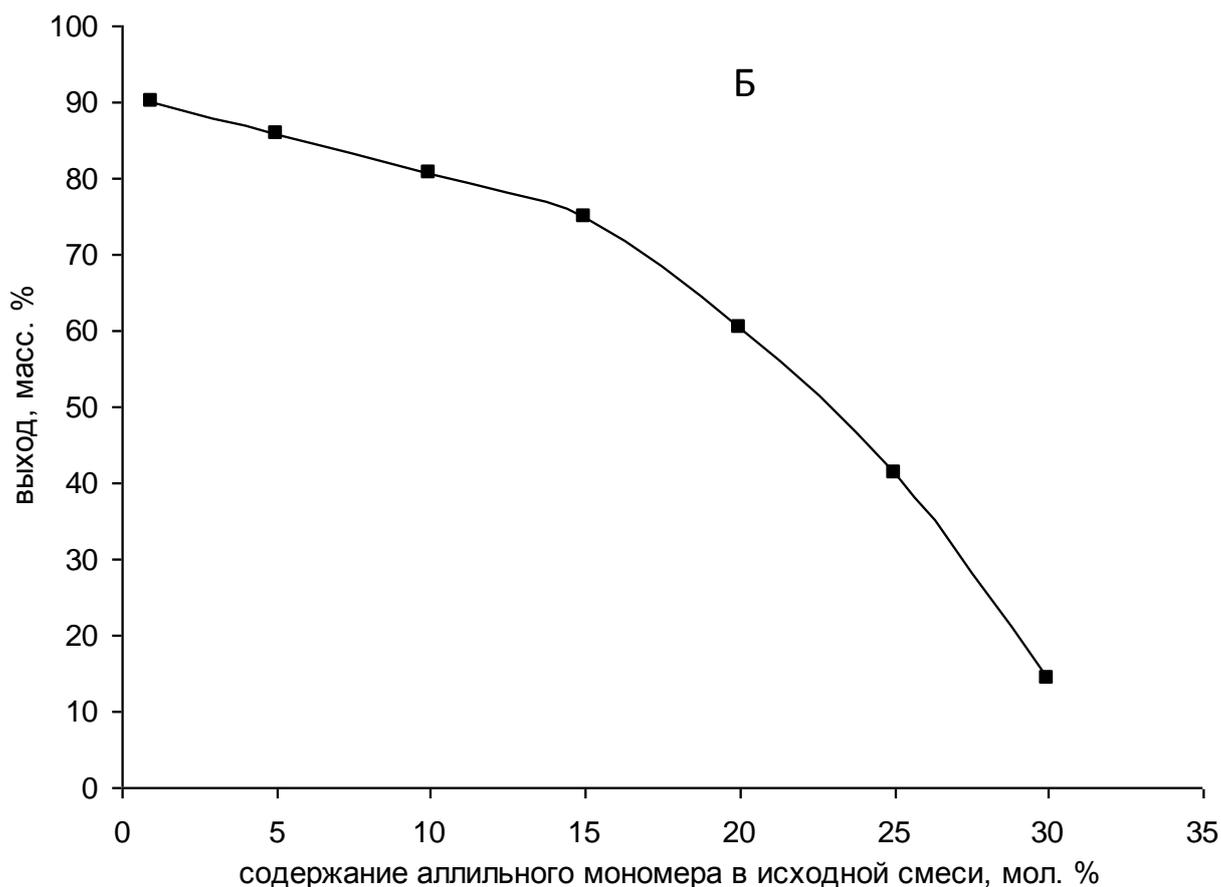
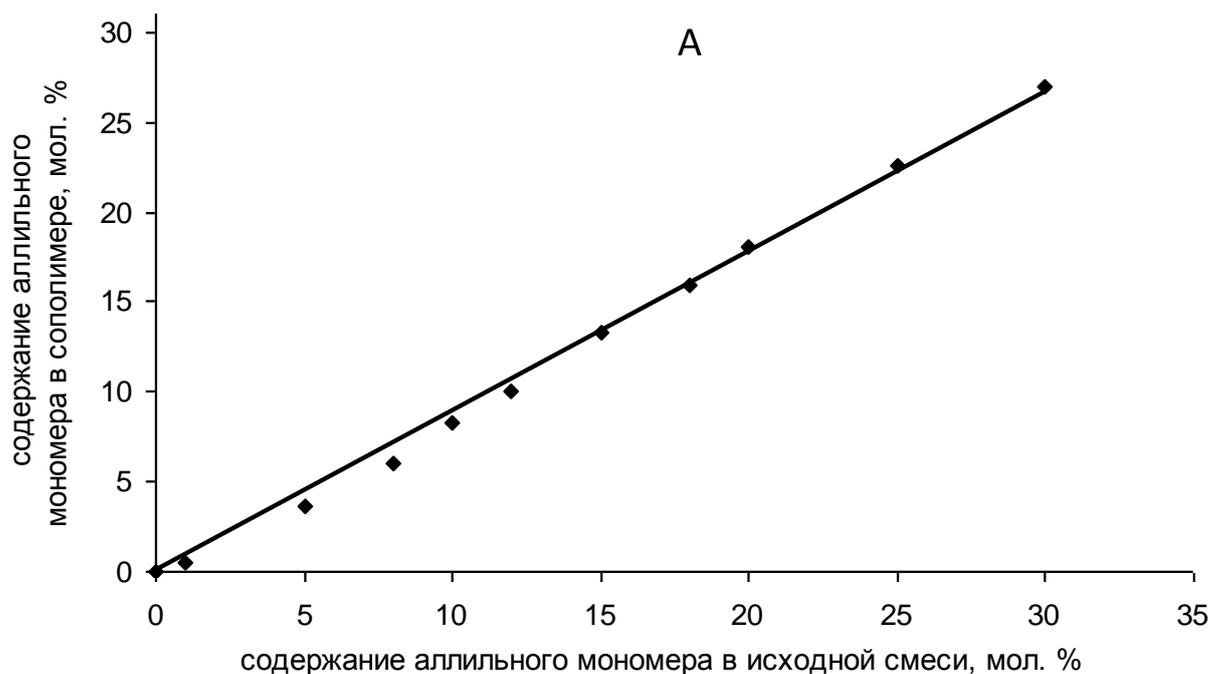


Рисунок 2.15 – Зависимость состава (А) и выхода (Б) сополимеров ПВП-п-АОБА от количества аллильного мономера в исходной смеси (Т - 343К; время реакции - 2 часа; инициатор - ДАК - 1,5 мас.%; передатчик цепи - МУК - 10^{-2} моль; 30%-ный раствор в диоксане)

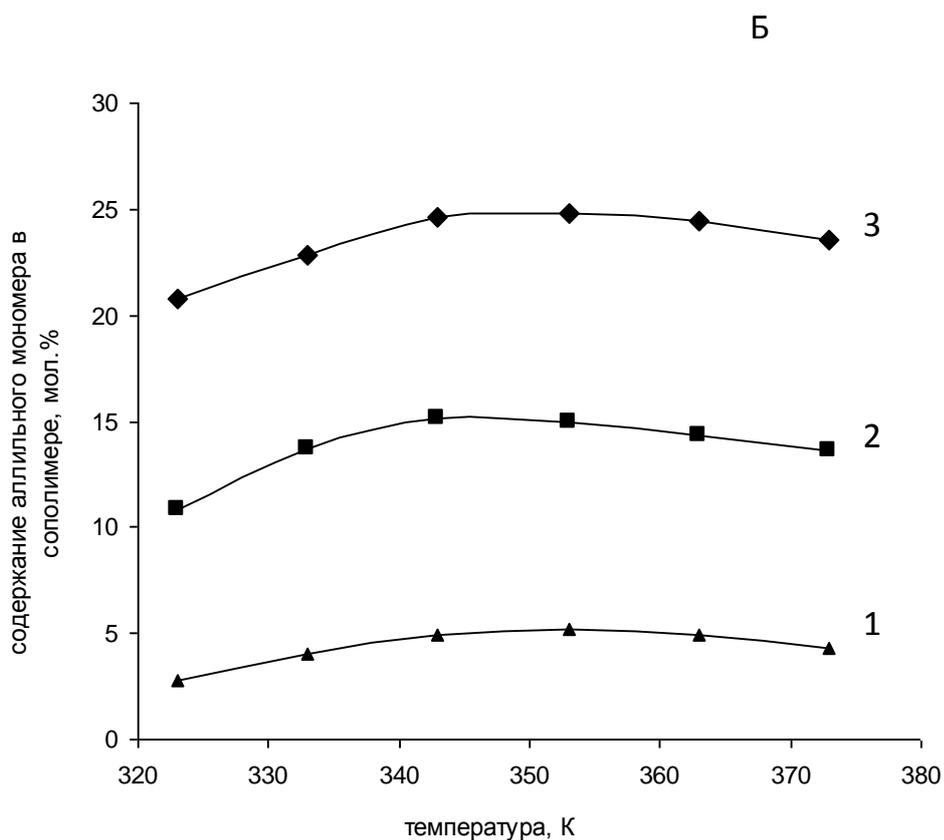
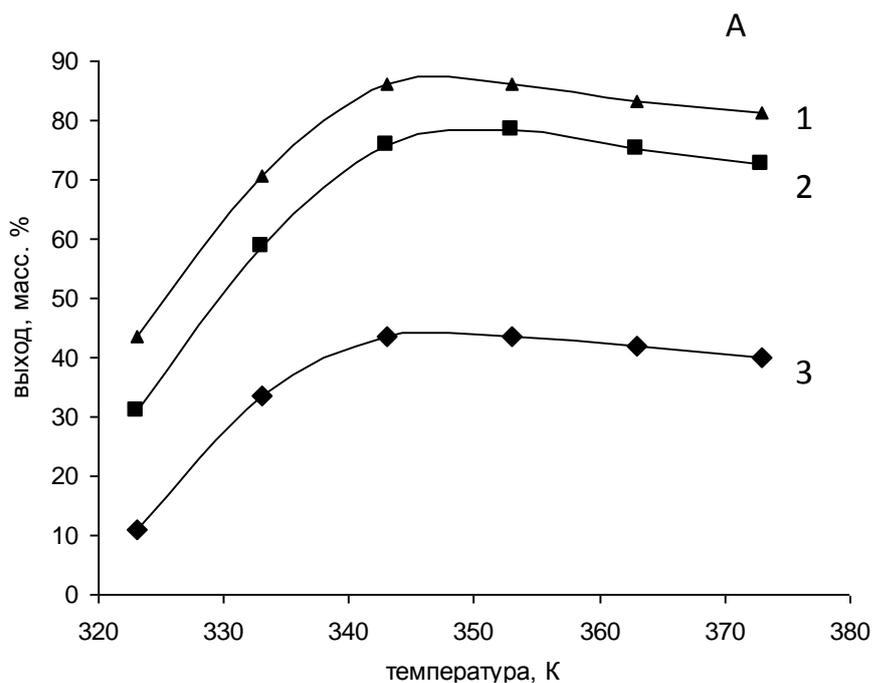


Рисунок 2.16 – Зависимость выхода (А) и состава (Б) сополимеров ПВП-п-АОБА от температуры реакции (Количество аллильного мономера в исходной смеси: 1 – 5 % мольн., 2 – 15 % мольн., 3 – 25 % мольн.; время реакции - 2 часа; инициатор - ДАК - 1,5 мас. %; передатчик цепи - МУК - 10^{-2} моль; 30%-ный раствор в диоксане)

На рисунке 2.16 представлены зависимости выхода и состава сополимеров от температуры при трех составах исходной реакционной смеси с содержанием аллильного мономера 5, 10 и 20 мол %.

Образование сополимеров в заметных количествах отмечалось при температурах выше 333К, что связано с недостаточной эффективностью инициирования ДАК при более низкой температуре. Наблюдавшиеся зависимости выхода и состава сополимеров от температуры имели экстремальный характер.

Как известно, энергия активации инициирования при радикальной полимеризации ($E_{и}$) превосходит энергии активации реакции роста, обрыва и передачи цепи [254]. По этой причине влияние температуры на радикальную сополимеризацию связано, прежде всего, с изменением скорости инициирования ($V_{и}$). Поскольку средняя степень полимеризации (X) обратно пропорциональна $(V_{и})^{1/2}$, сополимеры, образующиеся при более низкой температуре, будут иметь молекулярную массу, близкую к максимально возможной для данных условий. Однако, ввиду низкой скорости всех элементарных стадий процесса (в том числе реакций инициирования и роста), конверсия продукта и содержание в нем единиц менее активного аллильного мономера будут невелики.

Очевидно, что средняя длина кинетической цепи зависит от соотношения скоростей реакций обрыва и роста цепи: чем больше вторая по сравнению с первой, тем больше молекул мономера успевает присоединиться к растущему макрорадикалу до обрыва цепи и тем больше будет ее длина. Вначале, при увеличении температуры превалируют энергетически более выгодные реакции инициирования и роста цепи. При этом наблюдается увеличение выхода сополимера с более высоким содержанием аллильного мономера. Дальнейшее повышение температуры процесса выше 343÷353К усиливает роль побочных реакций, слабо выраженных при более низкой температуре (деструктивные процессы, обрыв цепи, передача цепи на растворитель и аллильный мономер). Все это приводит к увеличению доли олигомерных продуктов, а, следовательно, к снижению выхода сополимеров и содержания в них звеньев аллильного мономера.

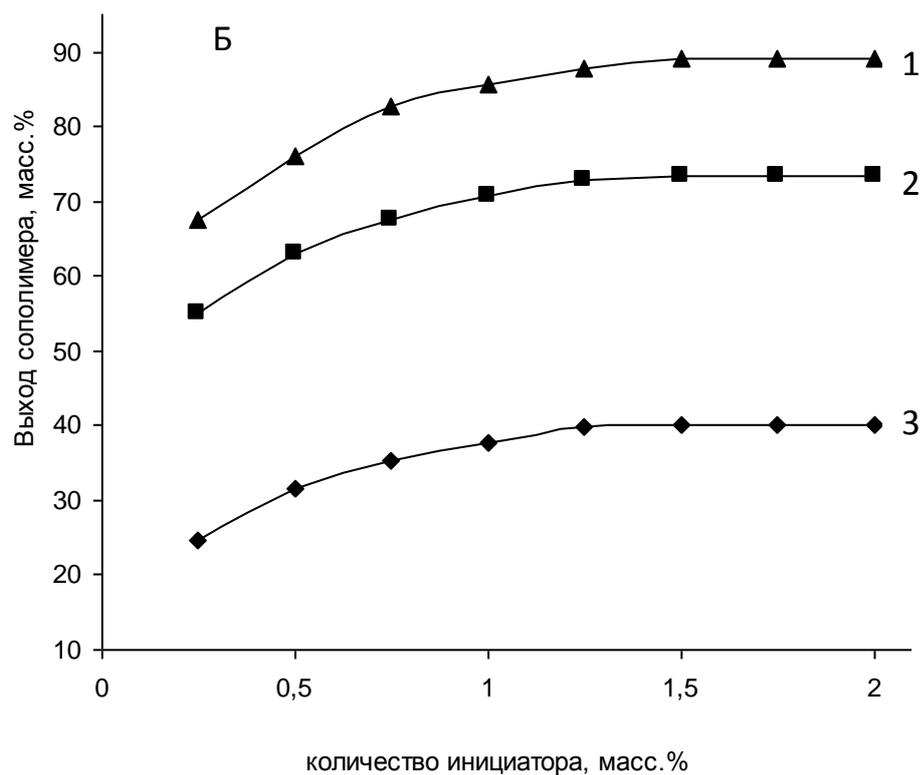
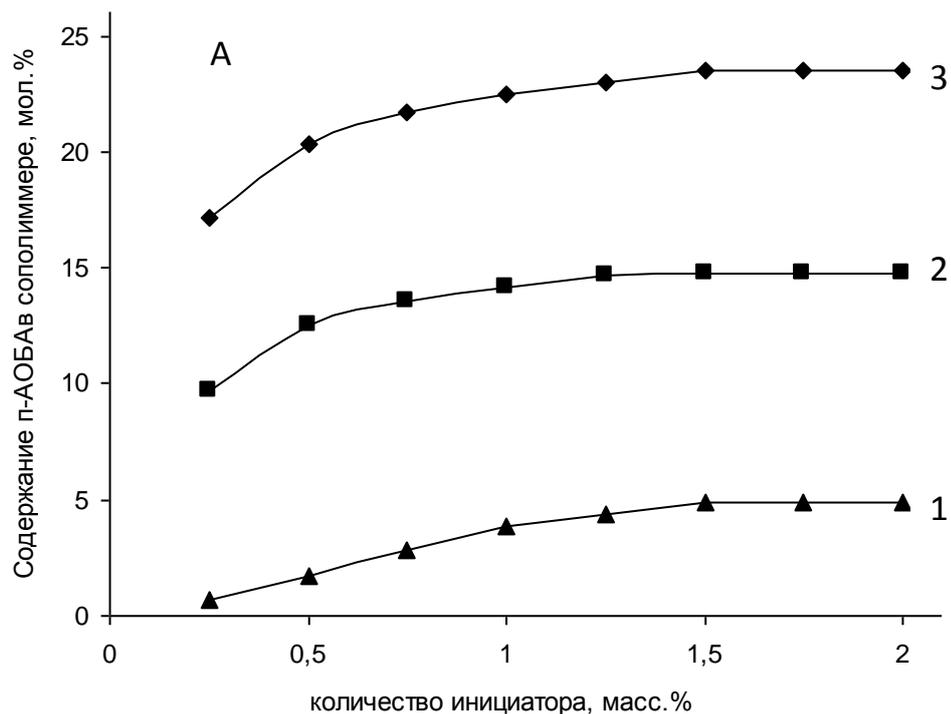


Рисунок 2.17 – Зависимость состава (А) и выхода (Б) сополимеров ПВП-п-АОБА от количества инициатора (Количество аллильного мономера в исходной смеси: 1 – 5 % мольн., 2 – 15 % мольн., 3 – 25 % мольн.; $T=343$ К; время реакции - 2 часа; передатчик цепи - МУК - 10^{-2} моль; 30%-ный раствор в диоксане)

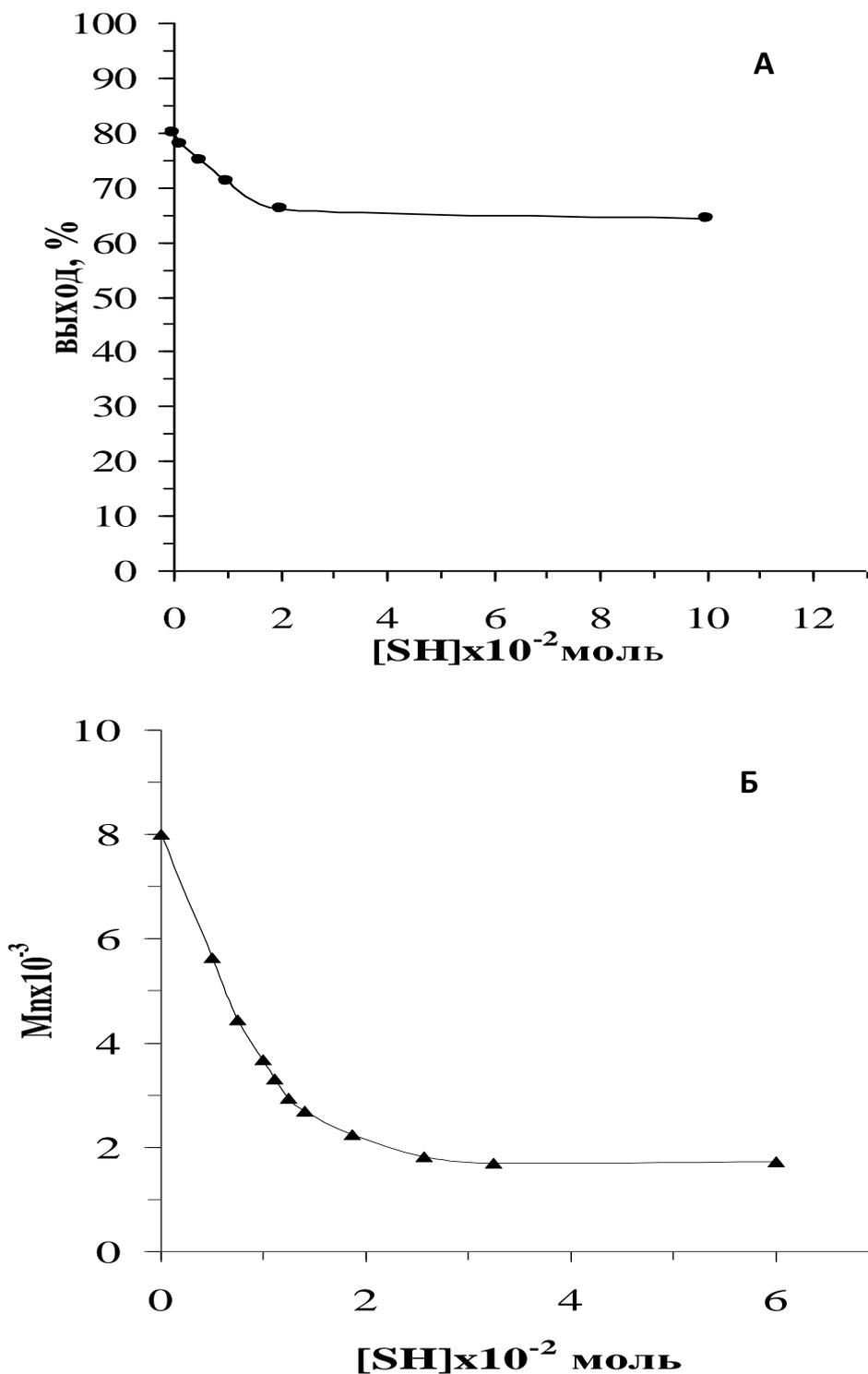


Рисунок 2.18 – Влияние количества введенной меркаптоуксусной кислоты на выход (А) и молекулярную массу (Б) выделяемых из реакционной смеси сополимеров (содержание п-АОБА в исходной смеси 15 мол.%; T=343 К; время реакции - 2 часа; инициатор - ДАК - 1,5 мас. %; 30%-ный раствор в диоксане)

Таким образом, полученные зависимости выхода и состава сополимеров типичны для процессов радикальной сополимеризации систем с выраженной тенденцией к обрыву и передачи цепи и в данном случае имеют максимум около $343 \div 352$ К (рисунок 2.16).

Зависимость состава и выхода сополимеров от количества инициатора в реакционной системе показана на рисунке 2.17. Проведение реакции при невысоких концентрациях инициатора (0,5 мас. %) приводит к образованию продуктов с невысокой конверсией, это обусловлено незначительным содержанием свободных радикалов в системе, которое к тому же резко уменьшается за счет эффекта аутоингибирования аллильных мономеров. Иницируются и входят в макромолекулярную цепь при этом единичные аллильные звенья, а реакция роста осуществляется, в основном, при участии более активных винильных мономеров.

При увеличении концентрации инициатора в растворе возникает значительное количество свободных радикалов, взаимодействующих с молекулами меркаптана с образованием иницирующих радикалов меркаптана, иницирующих зарождение макромолекул сразу во многих активных центрах. Это приводит к существенному повышению скоростей реакций иницирования и роста и как следствие, к увеличению выхода сополимеров и содержания в них аллильных звеньев.

На рисунке 2.18 представлены зависимости количества выделяемых из реакционной смеси сополимеров и их среднечисленной молекулярной массы от количества введенного функционального меркаптана (МУК). Количество МУК, необходимое для получения низкомолекулярных продуктов в данном случае гораздо ниже, чем для полимеризации N-винилпирролидона. Это обусловлено тем, что в процессах обрыва и передачи цепи помимо меркаптоуксусной кислоты участвуют также и молекулы п-аллилоксибензальдегида.

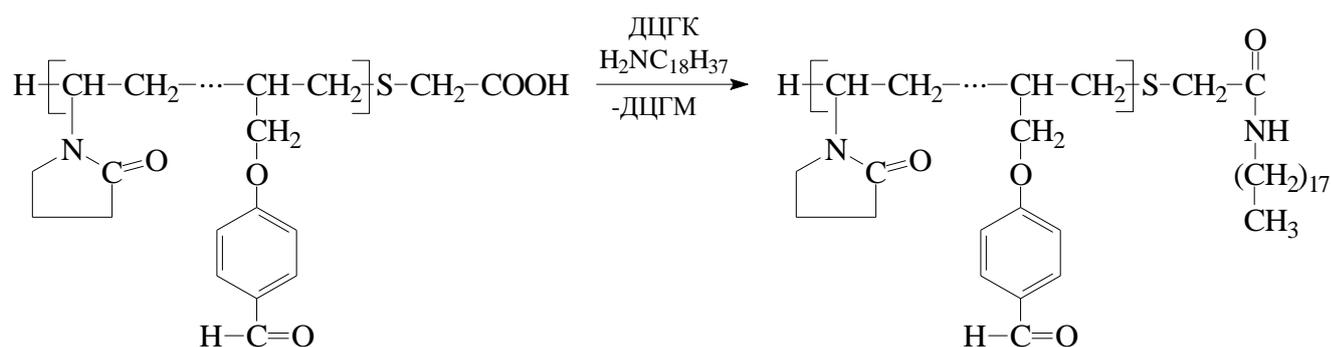
С помощью варьирования условий процесса полимеризации были получены сополимеры N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида (ПВП-п-АОБА) различной молекулярной массы ($M_n = 2000 \div 8000$), с различным содержанием

альдегидных звеньев (5-25%) и содержащих одну концевую карбоксильную группу, что было подтверждено совпадением значений молекулярных масс полимеров, определенных титриметрическим методом, по содержанию в них концевых групп, и, альтернативно, методом паровой осмометрии.

Таким образом, проведенные исследования позволяют не только оценить влияние различных факторов на процесс сополимеризации в данных системах, но и путем подбора соответствующих условий реакции, получить сополимеры определенного состава и молекулярной массы, что особенно важно с точки зрения их дальнейшего использования.

2.2.2.2. Синтез амфифильных производных сополимеров N-винилпирролидона с боковыми альдегидными группами

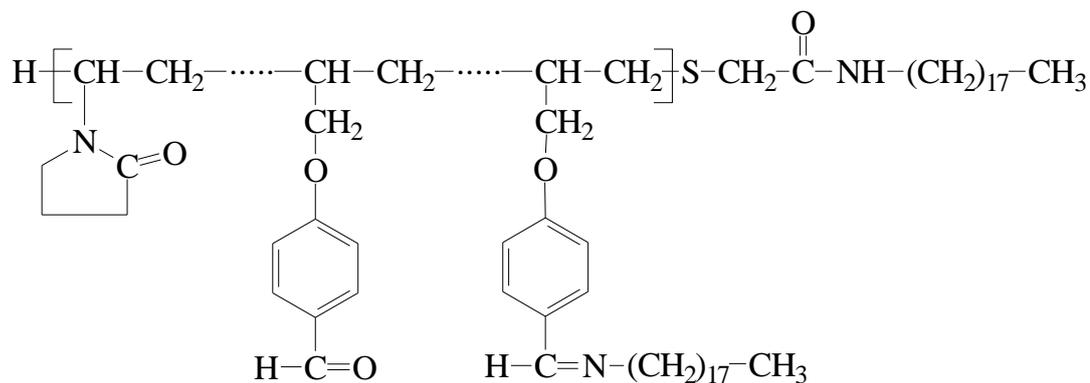
Синтез амфифильных производных полученных сополимеров (ПВП-п-АОБА-ОД) проводился по известной схеме взаимодействия сополимера N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида, содержащего концевую карбоксильную группу со n-октадециламином в присутствии дициклогексилкарбодиимида. Схема данной реакции может быть представлена в общем виде следующим образом:



Замещение всех карбоксильных групп было подтверждено методом потенциометрического титрования в тех же условиях, что и при определении молекулярной массы сополимеров.

Так как полученные сополимеры содержат боковые альдегидные группы, то при взаимодействии с n-октадециламином некоторое количество альдегидных

групп (10-15%) может образовывать так называемые полимерные основания Шиффа:



Поскольку этот процесс ведет к резкому снижению растворимости полимера, то для удаления оснований Шиффа полученные амфифильные сополимеры подвергались гидролизу в слабокислой среде (pH=5), после чего лиофильно сушились в течение нескольких дней. Повторное титрование показало, что гидролизу подвергается подавляющее количество боковых групп, и содержание альдегидных групп в сополимере до и после присоединения н-октадециламина одинаково (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Содержание звеньев п-аллилоксибензальдегида в семителехелевых и амфифильных сополимерах

Содержание аллильного мономера в исходной смеси, %	Содержание аллильного мономера в сополимере, %	Содержание аллильного мономера в амфифильном сополимере до гидролиза, %	Содержание аллильного мономера в амфифильном сополимере после гидролиза, %
30	27	23	27
25	22	20	22
20	17	15	17
15	12	10	12
10	8	7	8
5	4	3,5	4
1	0,8	0,7	0,8

Таким образом, был разработан метод получения амфифильных сополимеров N-винилпирролидона, содержащих в водорастворимой полимерной части дополнительные функциональные (альдегидные группы).

2.2.2.3. Исследование водных растворов сополимеров N-винилпирролидона с боковыми альдегидными группами и их амфифильных производных

В процессе исследования свойств полученных семителехелевых (ПВП-п-АОБА) и амфифильных (ПВП-п-АОБА-ОД) сополимеров была обнаружена и изучена особенность данной группы полимеров – существование нижней критической температуры растворения. Как было установлено, данное свойство сохраняется и при дальнейшей модификации сополимеров.

Обратная растворимость характеризуется выпадением из раствора сополимера непрозрачной взвеси при определенной критической температуре. При дальнейшем нагревании, в пределах 5-10 К мутность раствора достигает своего максимума, а дальнейшее увеличение температуры не вносит в образовавшуюся устойчивую систему никаких изменений. Процесс выпадения сополимеров в осадок при повышении температуры исследовался для водных растворов сополимеров. Для изучения обратной растворимости использовали ряд семителехелевых сополимеров с концевыми карбоксильными группами и амфифильных сополимеров с концевыми гидрофобными октадецильными группами. Полимеры содержали различное количество альдегидных групп.

Исследования проводились на спектрофотометре с использованием обогреваемой ячейки, подключенной к термостату. Нижнюю критическую температуру растворения определяли по резкому увеличению мутности растворов сополимеров при увеличении температуры (рисунок. 2.19). В ходе исследований было установлено, что нижняя критическая температура растворения, как для обычных сополимеров ПВП-п-АОБА, так и для их амфифильных производных ПВП-п-АОБА-ОД одинакова и практически не зависит от молекулярной массы сополимера. Основным фактором, влияющим на критическую температуру растворения, является содержание альдегидных звеньев в цепи сополимеров.

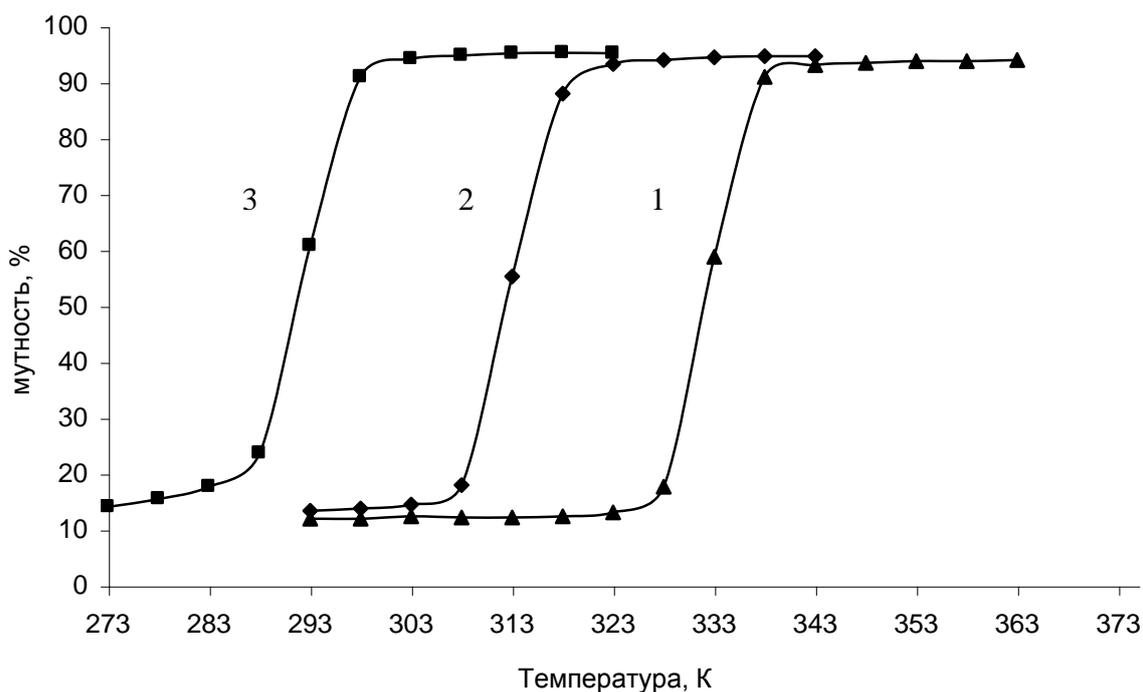


Рисунок 2.19 – Зависимость мутности растворов сополимера ПВП-п-АОБА ($M_n=3500$) от температуры (содержание бензальдегидных групп в полимере: 1 - 10 мольн. %, 2 - 15 мольн. %, 3 - 20 мольн. %)

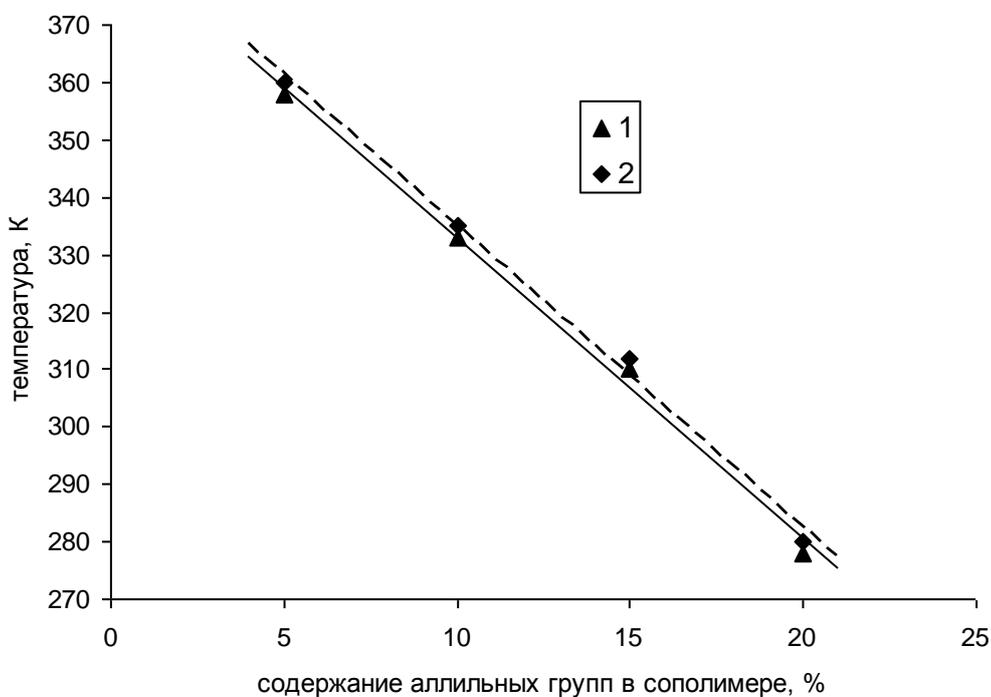


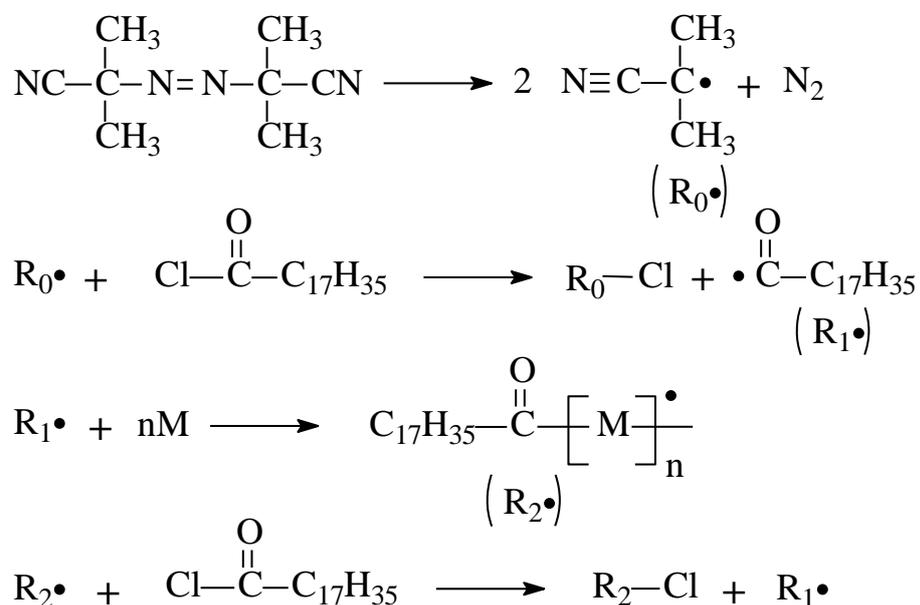
Рисунок 2.20 – Нижняя критическая температура растворения сополимеров (1 - ПВП-п-АОБА ($M_n=3500$); 2 - ПВП-п-АОБА-ОД ($M_n=3500$))

На рисунке 2.20 представлены для сравнения зависимости нижней критической температуры растворения от количества альдегидных групп в цепи сополимера N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида, а также его амфифильного октадецильного производного ($M_n = 3500$). Как видно, значения этой температуры для амфифильных и семителехелевых сополимеров практически совпадают.

Таким образом, результаты проведенных исследований, позволяют, варьируя условия проведения полимеризации, получить амфифильные сополимеры с заданными молекулярной массой, содержанием аллильных звеньев и температурой растворения.

2.2.3 Одностадийный метод получения амфифильных полимеров N-винилпирролидона

С целью создания более простых и эффективных способов получения амфифильных полимеров N-винилпирролидона, пригодных для получения на их основе полимерных наночастиц, в данной работе был разработан и исследован одностадийный метод получения амфифильных полимеров ВП, представляющий собой полимеризацию мономера (N-винилпирролидона) в присутствии инициатора радикальной полимеризации (например, азодиизобутиронитрила) и хлорангидрида алифатической кислоты (например, стеароилхлорида) используемого одновременно в качестве передатчика и обрывателя цепи:



При этом используется высокая способность к передаче цепи хлорорганическими соединениями [247].

В ходе реакции алифатический длинноцепной фрагмент стеариновой кислоты входит в состав образующегося радикала, инициирующего рост цепи полимера при полимеризации по схеме, основными реакциями которой являются:

- распад используемого инициатора (азодиизобутиронитрила) с образованием двух первичных радикалов ($R_0\cdot$);

- взаимодействие радикалов ($R_0\cdot$) с молекулой хлорангидрида, сопровождающееся отрывом атома хлора с образованием вторичного радикала ($R_1\cdot$) и нитрила α -хлоризомаасляной кислоты;

- инициирование радикалами ($R_1\cdot$) полимеризации мономера N-винилпирролидона;

- обрыв цепи полимера за счет отрыва атома хлора от молекулы хлорангидрида концевым радикалом растущей макромолекулы ($R_2\cdot$).

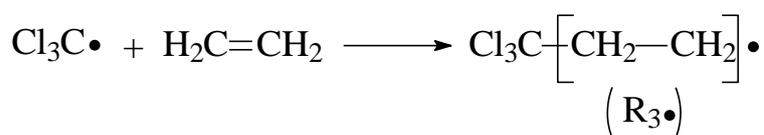
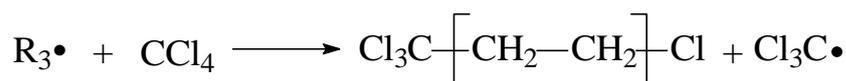
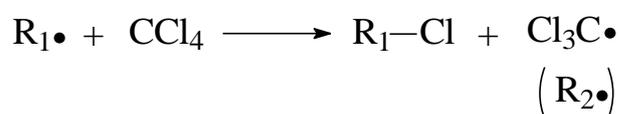
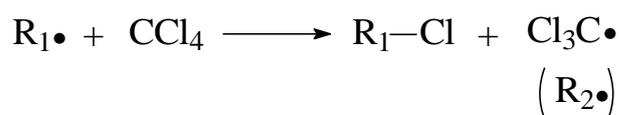
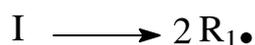
Молекула хлорангидрида, таким образом, в этом случае является одновременно и передатчиком цепи, то есть источником радикалов, которые инициируют рост цепи, и обрывателем цепи. Как результат, атом хлора занимает место в образующемся полимере одной концевой группы. Вторую концевую группу при этом образует алкильный гидрофобный радикал хлорангидрида, который соединен с основной цепью с помощью кетонной группы.

2.2.3.1 Изучения механизма полимеризации N-винилпирролидона в присутствии хлорангидридов карбоновых кислот

Применение ацильных радикалов, образующихся в результате распада групп (X-CO-R) для полимеризации различных мономеров, известно достаточно хорошо. В качестве уходящих групп X при этом могут выступать водород (для альдегидов), хлор (для хлорангидридов), ацил (для дикетонов) [255].

Можно также отметить, что этот процесс близок к хорошо известному методу теломеризации этилена, в котором радикальную полимеризацию этого мономера проводят в присутствии тетрахлорметана [256]. При этом

образующийся первичный радикал отрывает от молекулы тетрахлорметана один из атомов хлора и образуется вторичный радикал ($\text{Cl}_3\text{C}\cdot$), который затем инициирует рост цепи. Обрыв цепи по такой схеме протекает также за счет отрыва атома хлора от молекулы тетрахлорметана. В итоге образуются полимеры с низкой молекулярной массой, которые содержат на одном конце молекулы трихлорметильную группу, а на другом - атом хлора (I – молекула инициатора):



Предложенная в данной работе схема протекания процесса полимеризации в присутствии хлорангидридов была подтверждена рядом исследований. Так, в схеме предполагается инициирование роста цепи образующейся макромолекулы радикалом ($\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{—CO}\cdot$) ($\text{R}_2\cdot$) сопровождающееся введением на один конец цепи кетонной группы между атомом углерода начала основной цепи макромолекулы и α -углеродом алкильного радикала $\text{C}_{17}\text{H}_{35}$. В таком случае, эта кетогруппа должна определяться методами функционального анализа.

В подтверждение, с помощью метода оксимирования получилось не только определить количество кетогрупп в полимерах, но и рассчитать значение среднечисловой молекулярной массы полимера, исходя из предположения, что на одном конце каждой макромолекулы расположена одна кетогруппа.

При этом величина среднечисловой молекулярной массы M_n полученных полимеров, рассчитанная по этой концевой группе полностью совпала с величиной, полученной альтернативным методом – паровой осмометрией.

Также, обрыв цепи с участием хлорангидрида по предложенной схеме реакции вводит на второй конец цепи макромолекул атом хлора.

При определенном соотношении концентраций инициатора (ДАК) и хлорангидрида, можно ожидать, что значения среднечисловой молекулярной массы получаемого полимера, определенные по содержанию концевой кетонной группы и концевого атома хлора в полимере, как и осмометрическим методом должны быть близки. Соответствие этих значений было показано в ходе исследования. Полученные результаты на примере амфифильного полимера ВП с молекулярной массой полимерного фрагмента 3000 Да приведены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Значения среднечисловых молекулярных масс (M_n) образцов амфифильных ПВП, определенные различными методами

Метод определения	Образец	
	Образец №1	Образец №2
Мол. масса по содержанию хлора	2881; 3005 – средняя 2943	-*
(Содержание хлора в образце,%)	1,89, 1,77	-*
Мол. масса, определенная методом оксимирования	3060	8220
Мол. масса, определенная методом мембранной осмометрии	2990	8170

* Содержание хлора в образце менее 1%

В результате, разработанный метод позволяет получать водорастворимые полимеры N-винилпирролидона с необходимой для получения на их основе полимерных наночастиц медицинского применения молекулярной массой (1500-8000 Да) и с одной концевой гидрофобной группой, в одну стадию.

Синтез целевых продуктов проводился в среде диоксана. Продукты, образующиеся в ходе полимеризации N-винилпирролидона, выделяли путем осаждения в диэтиловый эфир, с последующей экстракцией осадителем.

В случае полимеров с более высокими молекулярными массами (6000-10000 Да) определение содержания концевых хлора с помощью элементного анализа не было достаточно точным из-за низкого содержания хлора в полимерах. Но даже в этих случаях, функциональный анализ кетонных групп методом оксимирования позволял определять среднечисленную молекулярную массу анализируемых полимеров ВП, совпадающую с данными паровой осмометрии.

С целью получения более чистых продуктов полимеризации, все образующиеся полимеры на завершающей стадии очищали диализом. Очистка полимеров N-винилпирролидона диализом в случае амфифильных полимеров является возможной благодаря тому, что, как это будет показано далее, в водных средах такие амфифильные молекулы самопроизвольно образуют агрегаты размером от десятков до нескольких сотен нанометров. Такие частицы не проходят через поры диализных мембран и могут быть отделены от неагрегировавших макромолекул полимера и низкомолекулярных примесей.

Даже если при более высокой концентрации динитрила азоизомаляной кислоты по сравнению с концентрацией хлорангидрида, часть радикалов, инициирующих цепь, будут представлять собой первичные радикалы распада инициатора, а обрыв цепи будет протекать не только с участием атомов хлора, но и по простому радикальному механизму, то образующиеся при этом водорастворимые неамфифильные полимеры будут проходить через диализную мембрану, и, следовательно, будут удаляться при очистке.

Молекулярная масса полимеров, оставшихся после очистки диализом в составе ассоциатов, может быть определена с достаточной точностью функциональным анализом кетонной группы или осмометрически.

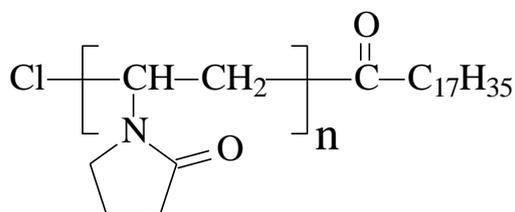
Дополнительно, протекание реакции полимеризации по предлагаемому механизму подтверждали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием масс-спектрометрическим методом.

Для этого проводили анализ модельной системы, состоящей из смеси азодиизобутиронитрила и хлорангидрида стеариновой кислоты в среде диоксана, которую выдерживали в условиях проведения реакции полимеризации.

После этого, смесь отмывали до нейтральной среды дистиллированной водой в присутствии эфирного слоя и проводили анализ. В результате, на хроматограммах получили ряд пиков, которые соответствовали веществам, молекулярные ионы которых, определенные методом масс-спектрометрии, были идентифицированы как стеариновая кислота, образовавшаяся при гидролизе хлорангидрида в результате отмывки водой, динитрил тетраметилантарной кислоты, образовавшийся как результат рекомбинации первичных радикалов и непрореагировавший азодиизобутиронитрил.

Кроме этого, в реакционной смеси обнаружили нитрил α -хлоризопропановой кислоты, образование которого в качестве продукта реакции подтверждает взаимодействие первичных радикалов с молекулами хлористого стеариола.

Таким образом, в отличие от приведённого ранее в Разделе 2.2.1 двухстадийного процесса получения амфифильных полимеров N-винилпирролидона, в данном случае готовый продукт, не содержащий амидной группы между гидрофильным фрагментом поли-N-винилпирролидона и гидрофобной концевой алифатической группой, был синтезирован с использованием одностадийного метода. При этом указанные фрагменты в цепи полимера соединены более прочной, негидролизуемой кетонной группой:



Косвенно, протекание процесса полимеризации N-винилпирролидона с применением хлористого стеариола как передатчика и обрывателя цепи было также подтверждено исследованием реакции полимеризации дилатометрическим

методом, который позволил определить скорость полимеризации по изменению объема реакционной смеси.

Чаще всего dilatометрический метод используется для исследования полимеризации в блоке (массе). Однако часто относительно точные результаты удается получить и при исследовании процессов полимеризации в дисперсиях или в растворах.

Поэтому в данной работе этот метод был использован для исследования полимеризации N-винилпирролидона в присутствии инициатора – азодиизобутиронитрила, и передатчика цепи – хлористого стеариоила.

На рисунке 2.21 представлена зависимость изменения объема реакционной смеси от количества инициатора, в присутствии хлористого стеариоила. Полученные данные показывают, что увеличение количества инициатора, приводит в таких условиях к увеличению скорости образования полимера, как это и предполагалось.

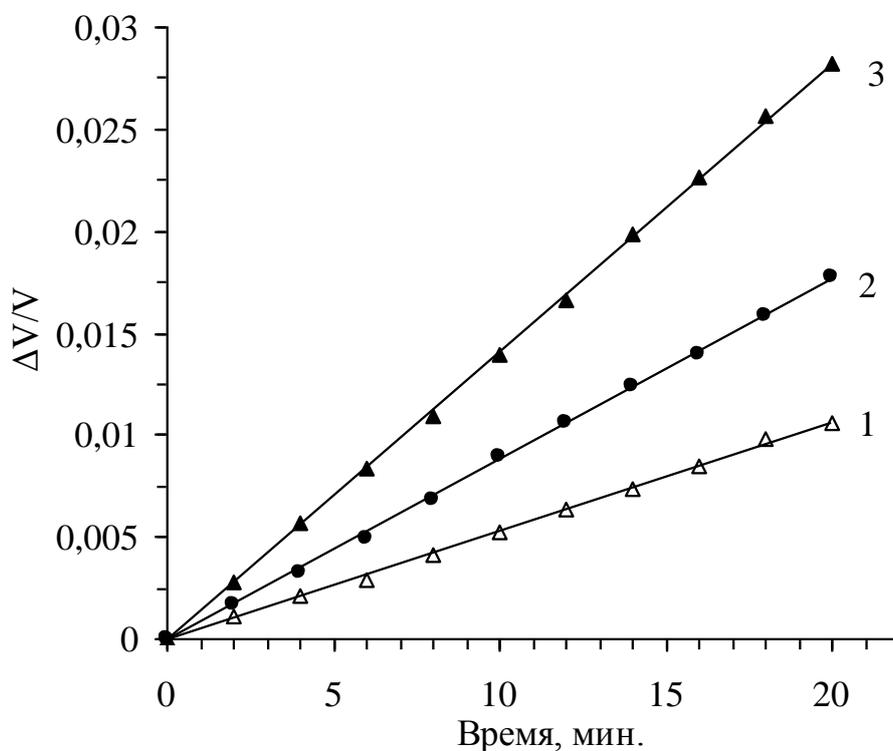


Рисунок 2.21 – Кинетические кривые полимеризации N-винилпирролидона (ВП) в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты (ХАСК). ([ВП]=25 мас.%, [ДАК] = 0,5 (1); 1,0 (2); 1,5 (3) мас. %; [ХАСК]=2 мас.%. T = 343 К, растворитель - диоксан)

В результате изучения влияния количества хлористого стеариола на реакцию полимеризации определено, что после добавления 2,0 мас. % и 5,0 мас. % ХАСК наблюдается более быстрая усадка раствора в капилляре (рисунок 2.22), чем в случае небольшой концентрации введенного хлорангидрида (0,5 мас. %), когда такой эффект практически отсутствует.

Наблюдаемый эффект псевдоускорения полимеризации N-винилпирролидона в присутствии 2,0 мас. % и 5,0 мас. % ХАСК можно объяснить изменением размера статистических клубков макромолекул в растворе в процессе образования молекул амфифильного полимера. Как результат, наблюдаемая скорость превращения мономера имеет повышенные значения. В случае введения в реакцию систему значительного количества ХАСК (от 10 мас. %) начинается, как и ожидалось, значительное торможение процесса полимеризации.

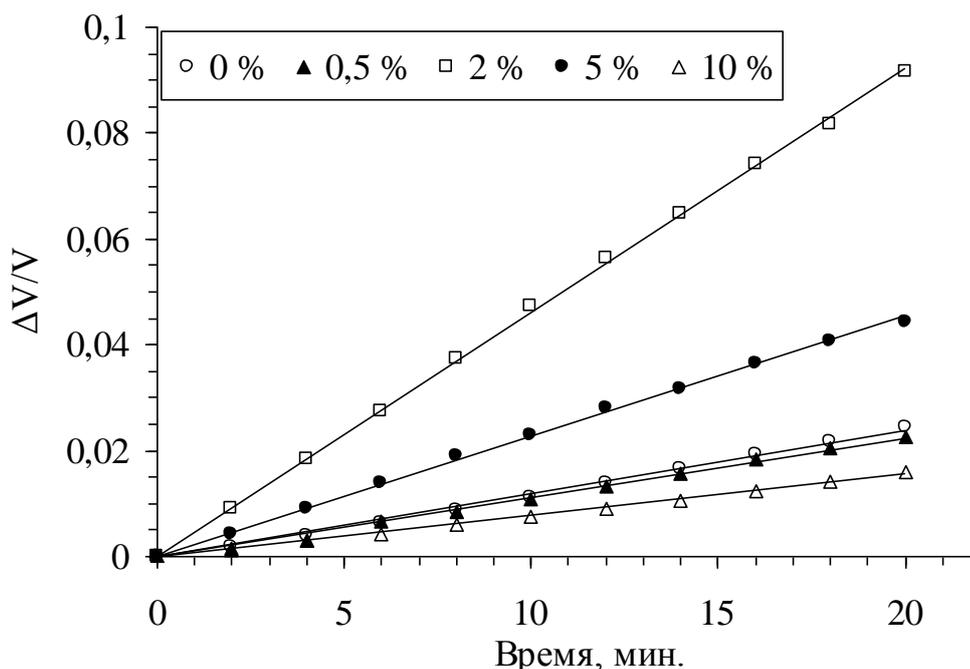
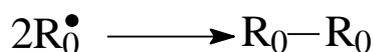


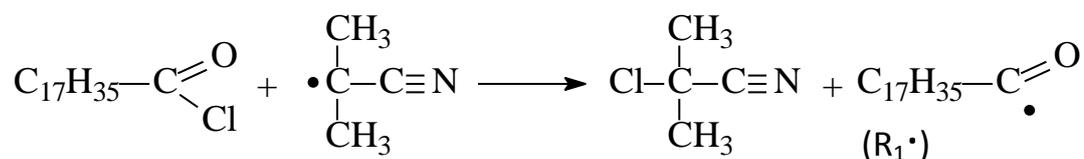
Рисунок 2.22 – Кинетические кривые полимеризации N-винилпирролидона (ВП) в присутствии различных количеств хлорангидрида стеариновой кислоты (ХАСК) ([ВП]= 25 мас.%, [ДАК] = 1.0 мас. %; T = 343К, растворитель - диоксан)

Общая схема реакции полимеризации включает несколько основных стадий. Радикал ($R_0\cdot$), который образуется после распада азодиизобутиронитрила

(ДАК), может вступать в несколько основных реакций. Во-первых, этот радикал, за счет рекомбинации, образует динитрил тетраметилэтантарной кислоты, который был обнаружен масс-спектрометрическим методом:

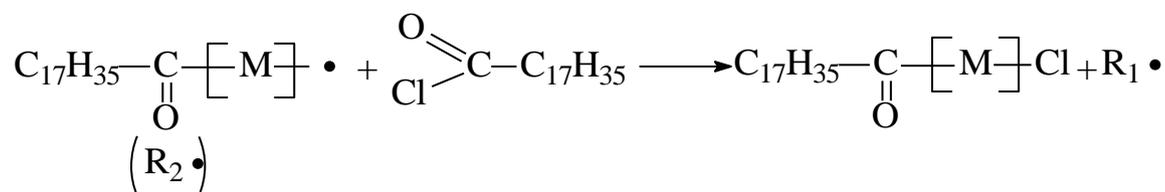


Во-вторых, этот радикал может оторвать атом хлора от хлорангирида с образованием ацильного радикала (R_2^\bullet) и нитрила α -хлоризопрпановой кислоты, который также был обнаружен масс-спектрометрически:



Радикал (R_1^\bullet) может рекомбинировать и взаимодействовать с мономером, при этом конкурируя с первичным радикалом (R_0^\bullet).

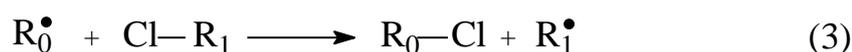
С увеличением количества введенного хлорангирида все большую роль начинает играть его способность обрывать цепь:



Регенерирующийся на этой стадии ацильный радикал (R_1^\bullet) может вступать в реакции приведенные ранее.

В результате, общую схему основных реакций, протекающих при полимеризации в присутствии регулятора, в качестве которого выступает стеароил хлорид, можно представить в следующем виде:

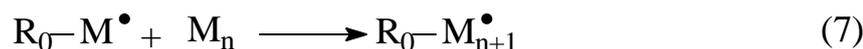
Образование иницирующего радикала



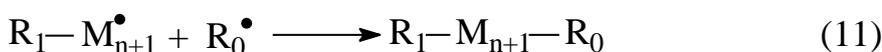
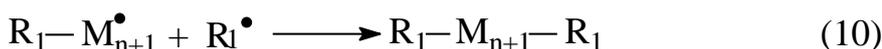
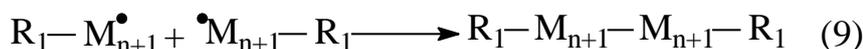
Инициирование



Рост цепи



Обрыв цепи



где I – инициатор; M – мономер, Cl-R₁ – молекула регулятора, R₀[•] – первичные радикалы, образующиеся при распаде инициатора; R₁[•] – радикал, образующийся из хлорангирида; R₁-M[•], R₀-M[•], R₁-M_{n+1}[•] – растущие полимерные радикалы, R₁-M_{n+1}-Cl, R₁-M_{n+1}-M_{n+1}-R₁, R₁-M_{n+1}-R₁, R₁-M_{n+1}-R₀ – инертные молекулы.

Ранее в данной работе было предложено уравнение эффективности инициирования в присутствии обрывателя цепи:

$$f = \frac{D + a(Dk[S])^{1/2}}{ak_o + D + a(Dk[S])^{1/2}},$$

где D – сумма констант диффузии двух радикалов; a – диаметр частицы радикала; k_o – удельная скорость рекомбинации двух радикалов; k – константа скорости реакции между радикалом и обрывателем, находящимися в паре; [S] – концентрация обрывателя.

Из приведенного уравнения следует, что эффективность инициирования реакции возрастает с увеличением концентрации обрывателя радикалов.

Таким образом, при достаточном большом количестве хлорангидрида в реакционной системе инициирование роста цепи может реализоваться не за счет первичного радикала (R_0^\bullet), образуемого при распаде инициатора, а за счет радикала R_1^\bullet , который образуется при отрыве атома хлора от стеароилхлорида, то есть при преобладании реакции 4 над реакцией 5.

Как установлено ранее, скорость взаимодействия первичных радикалов с хлорангидридом на несколько порядков превышает скорость инициирования [247]. В результате, первичный радикал (R_0^\bullet) расходуется в основном в реакции 3. Как следствие, при этих условиях инициирование роста цепи полимера реализуется в первую очередь за счет радикала (R_1^\bullet) и цепь макромолекулы начинается с фрагмента хлорангидрида, содержащего функциональную группу.

Понижение скорости реакции полимеризации при дальнейшем увеличении концентрации вводимого ХАСК можно объяснить возрастанием роли реакций взаимодействия радикалов, имеющихся в системе, а также радикала растущей цепи, что важно для суммарной скорости реакции, с молекулой хлорангидрида, сопровождающихся отрывом атома хлора. Также значительно возрастает и роль реакции перекрестного обрыва с участием радикалов ($R-M_{n+1}^\bullet$) и (R_1^\bullet).

При этом способность хлорангидрида к передаче цепи при радикальной атаке в данном процессе требовала дополнительного исследования.

Для расчета константы передачи цепи на регулятор C_s для стеароилхлорида использовали уравнение Майо:

$$\frac{1}{\bar{X}_n} = \frac{1}{\bar{X}_n^0} + C_s \frac{[S]}{[M]},$$

где \bar{X}_n - степень полимеризации в присутствии передатчика цепи; \bar{X}_n^0 - степень полимеризации без передатчика цепи; $[S]$ – концентрация передатчика цепи, моль/л; $[M]$ – концентрация мономера, моль/л.

В результате проведенного эксперимента найденная графически по тангенсу угла наклона из зависимости обратной степени полимеризации от концентрации ХАСК (рисунок 2.23) константа передачи цепи на регулятор C_s , для хлорангидрида стеариновой кислоты оказалась равной 379.

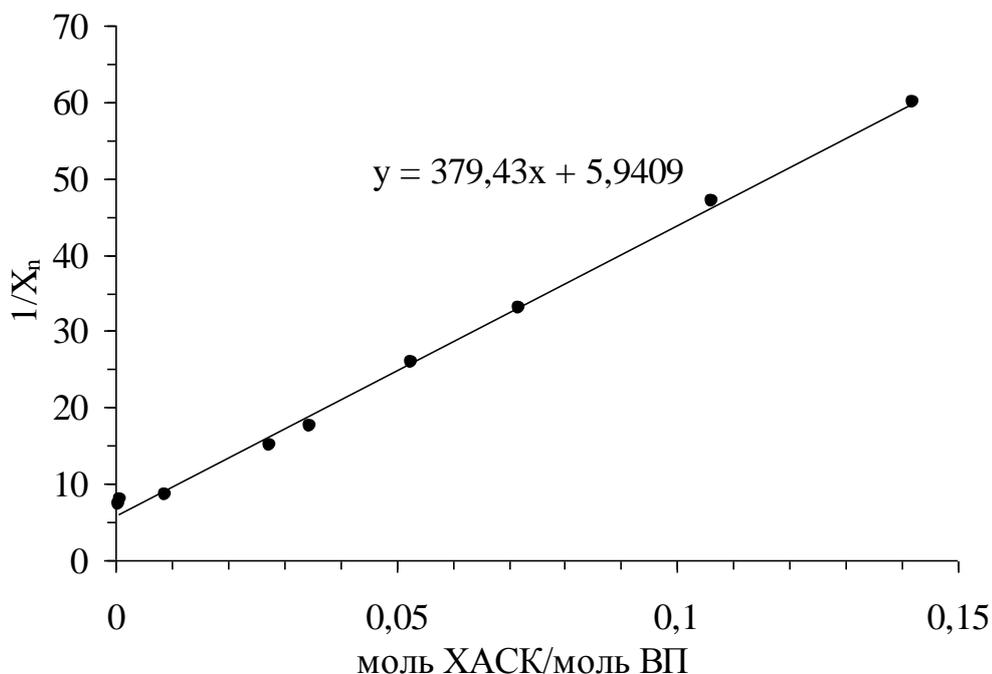


Рисунок 2.23 – Зависимость обратной степени полимеризации N-винилпирролидона (ВП) от концентрации хлорангидрида стеариновой кислоты (ХАСК) ($[ВП] = 25$ мас.%, $[ДАК] = 1,0$ мас. %; $T = 343$ К, растворитель - диоксан)

Так как константа передачи цепи на регулятор выражается уравнением:

$$C_s = k_{ПС}/k_P,$$

где $k_{ПС}$ – константа скорости передачи цепи на регулятор, а k_P – константа скорости роста цепи, то полученные значения C_s показывают, что для стеароил хлорида скорость передачи цепи во много раз больше, чем скорость роста цепи, и, следовательно, в процессе полимеризации N-винилпирролидона на стадии обрыва цепи превалирует реакция отрыва растущим макрорадикалом атома хлора от молекулы хлорангидрида с образованием нового радикала, который содержит группу, входящую в состав хлорангидрида, инициирующего полимеризацию.

Эти выводы также подтверждаются dilatометрическим исследованием полимеризации N-винилпирролидона, проводимой до глубоких степеней конверсии, когда реакцию проводили и в присутствии, и в отсутствии хлорангидрида, взятого в количестве 10 мас. % от количества введенного мономера (рисунок 2.24).

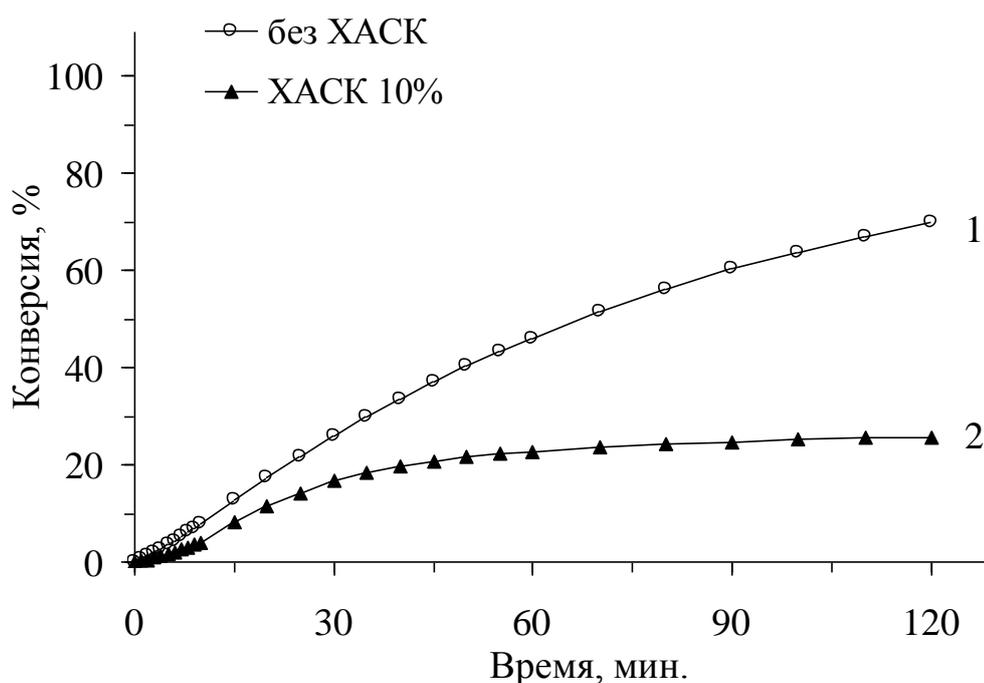
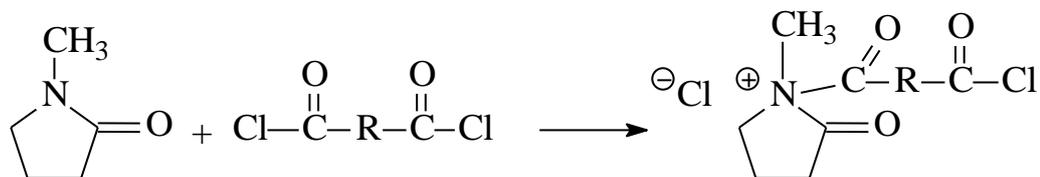


Рисунок 2.24 – Кинетические кривые полимеризации ВП до глубоких конверсий в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты ($[ВП] = 25$ мас. %, $[ДАК] = 1.0$ мас. %; $T = 343$ К, растворитель - диоксан)

При большом количестве введенного ХАСК (10 мас.%) кинетическая кривая имеет вид зависимости с выходом на стационарный режим в течение часа, а процесс полимеризации до степени конверсии ~ 30 % длится около 1,5 часов. В этом случае не удастся добиться большой степени конверсии N-винилпирролидона, поскольку избыток регулятора роста цепи (ХАСК) приводит к тому, что в системе на суммарной скорости процесса начинает в большей мере сказываться роль хлорангидрида как обрывателя цепи.

Следует также отметить, что для полимеризации N-винилпирролидона, и при синтезе других полимеров поликонденсационным методом с участием дихлорангидридов, проводимом в среде N-метилпирролидона, ранее была

отмечена возможность взаимодействия хлорангидридных групп с участием третичного атома азота, в результате которого образуются четвертичные амидоильные структуры [257]:



Известно, что подобные реакции, аналогичные реакции кватернизации третичных аминов, являются типичными реакциями нуклеофильного замещения (в данном случае реакция идет при углероде карбонила хлорангидрида), и значительно ускоряются при повышении полярности среды. С этой точки зрения N-метилпирролидон является более предпочтительным как растворитель, чем диоксан, обладающий меньшей полярностью.

Определение возможности протекания такой реакции в условиях проведения полимеризации N-винилпирролидона была проведена с помощью определения наличия ионогенных групп в получаемых полимерах. Как было установлено с помощью метода потенциометрического титрования, в полученных амфифильных поли-N-винилпирролидонах ионогенные группы отсутствуют. Они не были обнаружены ни щелочным (KOH), ни кислотным (HCl) титрованием.

Следовательно, на основании уровня точности титриметрического метода, можно считать, что такие побочные взаимодействия молекул мономера с хлорангидридом в исследованных процессах, по крайней мере, в рамках точности применения титриметрического анализа, не протекают.

В результате, проведенные исследования показали, что разработанный одностадийный метод синтеза амфифильных полимеров N-винилпирролидона, основывается на способности хлорангидрида стеариновой кислоты (ХАСК) взаимодействовать с первичными радикалами, которые образуются при распаде инициатора – азодиизобутиронитрила (ДАК), что приводит к повышению эффективности иницирования реакции.

При этом ацильный радикал, который образуется в результате отрыва атома хлора от -СОСl группы ангидрида, инициирует рост цепи полимера, который заканчивается передачей цепи на хлорангидрид (отрыв макрорадикалом атома хлора от -СОСl группы другой молекулы ХАСК), с образованием нового хлорангидридного радикала, который инициирует возникновение новой полимерной цепи.

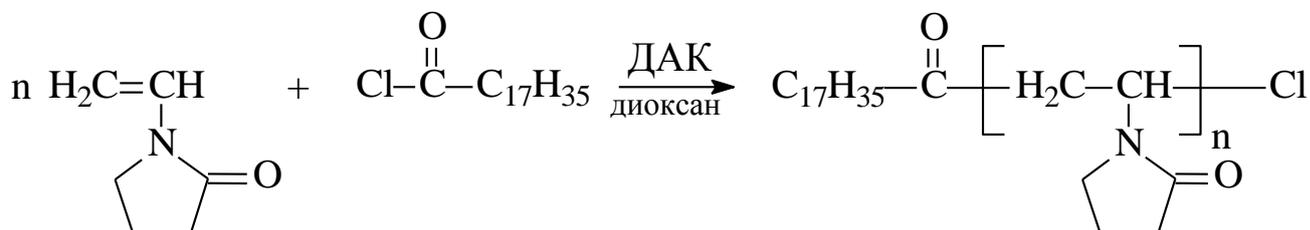
2.2.3.2 Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии хлорангидридов карбоновых кислот

Как было показано ранее, молекулярная масса полимеров, использующихся в медицине, фармацевтике и биотехнологии, является важнейшим условием применения макромолекулярных соединений. Существует два основных метода регулирования молекулярной массы полимеров – фракционирование готового синтезированного полимера и полимеризация мономера в присутствии регуляторов молекулярной массы. Более простым и чаще используемым является последний вариант.

В данной работе для одностадийного получения амфифильных поли-N-винилпирролидонов с регулируемым значением молекулярной массы полимерного фрагмента, содержащих одну концевую гидрофобную группу, проводили радикальную полимеризацию ВП в присутствии инициатора – динитрила азоизомасляной кислоты (ДАК) и регулятора роста (передатчика) цепи – хлорангидрида стеариновой кислоты (ХАСК). Использование ХАСК определялось необходимостью синтеза амфифильных полимеров с достаточно крупными (стеариновыми) гидрофобными фрагментами для придания им способности к самосборке с образованием наноразмерных полимерных агрегатов.

Для определения оптимальных условий синтеза амфифильных полимеров N-винилпирролидона с регулируемыми характеристиками было проведено систематическое изучение полимеризации мономера с варьированием основных условий этого процесса (концентрация инициатора, регулятора и мономеров, температура реакции, растворитель).

Основываясь на полученных результатах и данных, изученных в рамках предыдущего Раздела 2.2.3.1 данной работы, суммарную схему получения полимеров можно представить следующим образом:



Реакции синтеза амфифильного поли-N-винилпирролидона проводили в среде сухого диоксана, в пробирках заполненных аргоном, с притертыми пробками.

Образовавшийся после окончания реакции полимерный продукт осаждали в диэтиловый эфир, отмывали осадителем и сушили в вакууме.

На завершающей стадии дополнительную очистку готового амфифильного полимера проводили диализом относительно дистиллированной воды в течение 24-48 часов. После окончания диализа содержимое диализных кассет или мешков лиофилизировали до получения порошкообразного продукта.

Влияние концентрации мономера (ВП) в растворе на выход и молекулярную массу амфифильного поли-N-винилпирролидона при постоянном соотношении мономера, инициатора (1,0 мас.% от количества мономера) и регулятора (2,0 мас.% от количества мономера) представлено на рисунке 2.25.

Среднечисловую молекулярную массу получаемых амфифильных полимеров определяли методом потенциометрического титрования (реакция оксимирования) по содержанию концевой кетонной группы.

Как видно из рисунка 2.25, зависимость носит экстремальный характер. Возрастание выхода и молекулярной массы полимеров при увеличении исходной концентрации мономера до определенного оптимума определяется большей возможностью соударения растущей полимерной цепи и молекул мономера в условиях наличия конкурирующих процессов обрыва цепи.

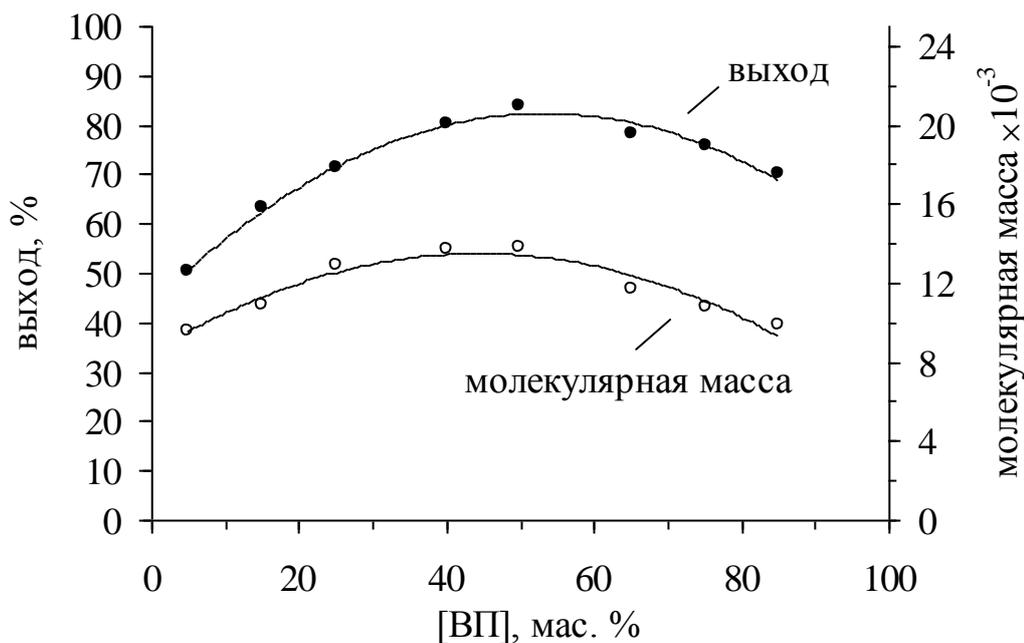


Рисунок 2.25 – Зависимость молекулярной массы и выхода амфифильного поли-N-винилпирролидона от концентрации мономера в реакционной смеси ([ДАК] = 1 мас.%, [ХАСК] = 2 мас.%, температура 70 °С, время – 3 часа, растворитель – диоксан)

Дальнейшее увеличение концентрации мономера ведет к повышению вязкости реакционной среды, снижению подвижности растущих макрорадикалов, затруднению диффузии молекул мономера, а также к возрастанию роли процессов, которые приводят к обрыву цепи. Кроме того, увеличение концентрации мономера нарушает изотермичность процесса полимеризации, затрудняет отвод тепла из реакционной смеси, и приводит к появлению деструкционных процессов из-за локальных перегревов. Все эти факторы снижают молекулярную массу и выход продукта.

Кроме того, возможно, на снижение выхода и молекулярной массы синтезируемого амфифильного полимера при высокой концентрации мономера, влияет еще и увеличение доли рекомбинации первичных радикалов, перемещение которых к молекулам мономера в условиях возрастающей вязкости системы затруднено диффузионно.

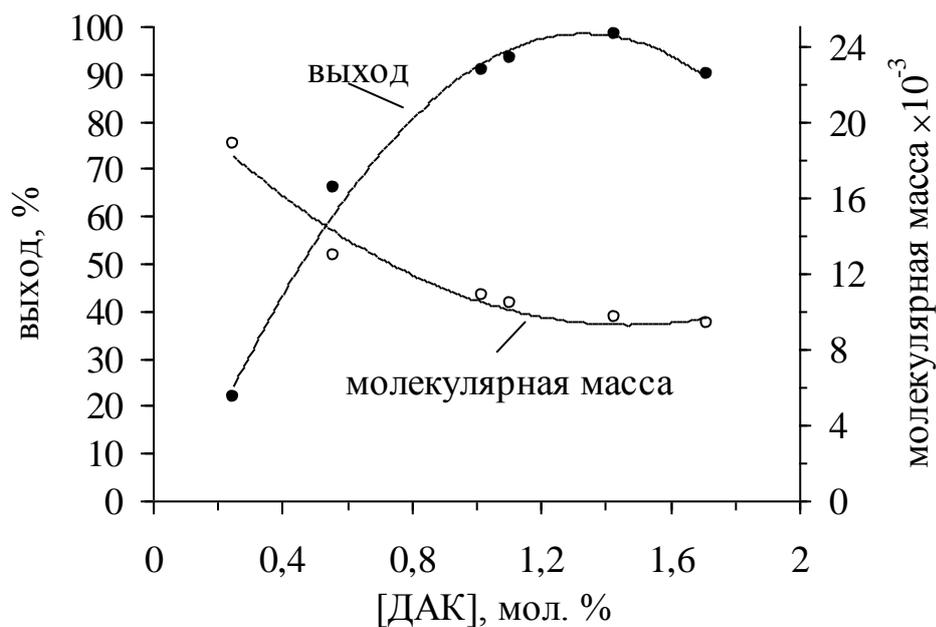


Рисунок 2.26 – Зависимость выхода и молекулярной массы амфифильного поли-N-винилпирролидона от концентрации инициатора ([ВП] = 25 мас.%, [ХАСК] = 2 мас.%, температура 70°С, время – 3 часа, растворитель – диоксан)

Влияние концентрации азодиизобутиронитрила (ДАК) на молекулярную массу и выход полимеров продемонстрировано на рисунке 2.26.

Как видно, увеличение концентрации инициатора (ДАК) ведет к возрастанию выхода готового полимера до определенных, оптимальных количеств инициатора (1-1,5 мол.%). Последующее повышение количества введённого инициатора ведет к уменьшению выхода амфифильного полимера.

Снижение выхода полимера при достаточно высоких концентрациях инициатора, возможно, объясняется образованием в системе некоторого количества неамфифильного полимера, образовавшегося без участия передатчика цепи (ХАСК), который уходит через поры мембран при очистке диализом.

Молекулярная масса образующихся полимеров, как и следовало ожидать, снижается при увеличении количества вводимого инициатора.

Исследование процесса полимеризации при разных температурах (рисунок 2.27) показало, что выход продуктов увеличивается с повышением температуры до 70-90 °С. С другой стороны, молекулярная масса полимеров при этом падает.

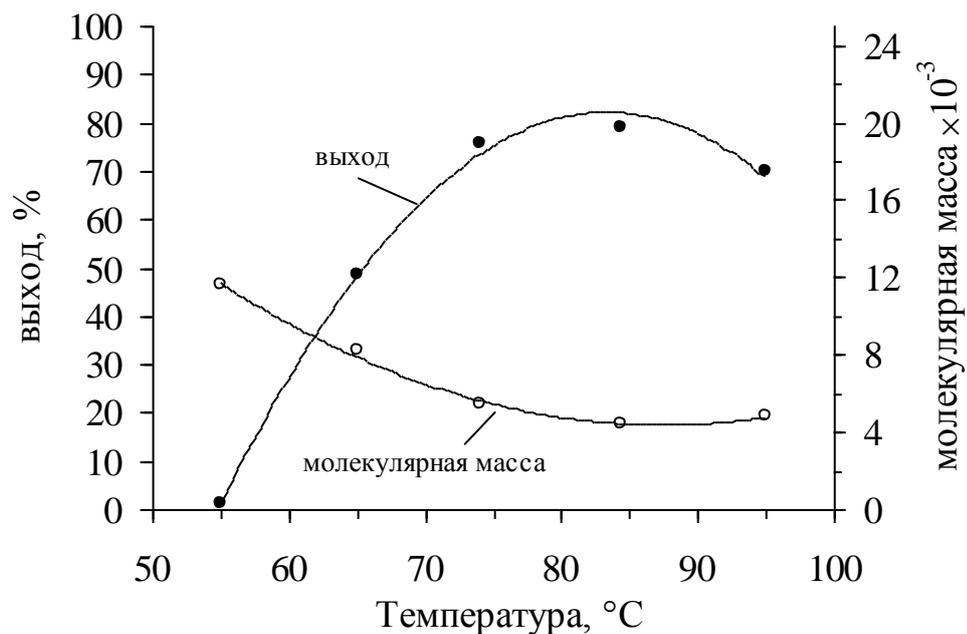


Рисунок 2.27 – Зависимость выхода и молекулярной массы амфифильных полимеров от температуры полимеризации ([ВП] = 25 мас.%, [ХАСК] = 2 мас.%, [ДАК] = 1 мас.%, время – 3 часа, растворитель – диоксан)

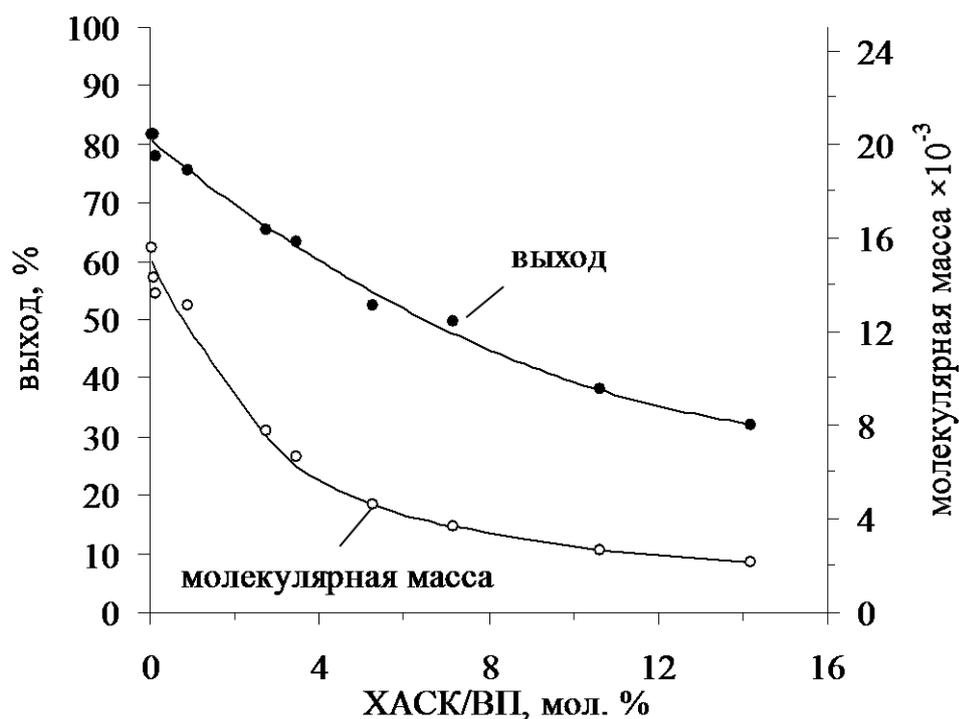


Рисунок 2.28 – Зависимость молекулярной массы и выхода амфифильного полимера от соотношения N-винилпирролидона (ВП) и хлорангидрида стеариновой кислоты (ХАСК) ([ВП]= 25 мас.%, [ДАК] = 1 мас.%, температура 70°C, время – 3 часа растворитель – диоксан)

Повышение выхода полимера при начальном повышении температуры синтеза объясняется стандартными причинами. Так как, по сравнению с энергией активации процессов роста и обрыва цепи, энергия активации процесса инициирования велика, то повышение температуры значительно сильнее влияет на инициирование, чем на рост или обрыв цепи. Поэтому скорость инициирования возрастает. При этом увеличение скорости инициирования сопровождается ростом концентрации свободных радикалов, приводящим к ускорению всех элементарных актов полимеризации, в том числе и к увеличению скоростей обрыва. Кроме того, увеличение температуры ускоряет реакции деструкции и реакции передачи цепи. В результате, это проявляется в увеличении доли низкомолекулярных фракций полимерных продуктов.

Результаты исследования влияния мольного соотношения регулятора роста цепи и мономера на молекулярную массу и выход продуктов приведено рисунке 2.28. В этом случае среднечисленную молекулярную массу полимера в опытах, проведенных при отсутствии регулятора роста цепи и при его небольшом количестве (1 мол.%, эквивалентный примерно 2,7 мас.%) определяли вискозиметрическим методом. Полученные результаты показали, что при увеличении введённого количества ХАСК и выход и молекулярная масса продукта снижаются, что объясняется увеличением скорости обрыва цепи.

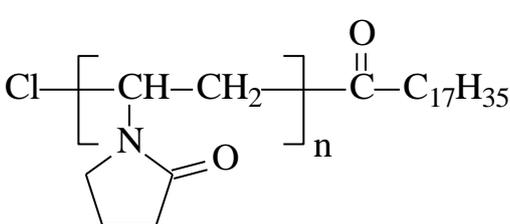
2.2.3.3 Исследование строения амфифильных полимеров N-винилпирролидона, полученных с использованием хлорангидридов

Строение полученных амфифильных полимеров было подтверждено определением молекулярной массы полимерных продуктов методом паровой осмометрии и функциональным анализом концевых групп. Совпадение данных, полученных паровой осмометрией (в некоторых случаях, вискозиметрией) и результатов функционального анализа концевых групп подтвердило, что синтезированные продукты представляют собой относительно низкомолекулярные полимеры, которые содержат на концах каждой макромолекулы две разные функциональные группы, из которых одна является длинноцепным гидрофобным

стеарильным фрагментом (таблица 2.4). Все полученные полимеры были дополнительно очищены диализом, для удаления посторонних продуктов.

Таблица 2.4 – Молекулярные массы амфифильных полимеров

M_n^* - среднечисловая молекулярная масса, определенная методом потенциометрического титрования; M_n^{**} - среднечисловая молекулярная масса, определенная, методом паровой осмометрии

Строение полимера	M_n^*	M_n^{**}
	9700	9500
	6300	6400
	4200	4100
	2150	2100
	2050	1950

Из данных, представленных в таблице 2.4, видно, что молекулярные массы, определенные двумя независимыми методами, для всех исследованных образцов практически совпадают. Эти результаты являются подтверждением того, что во всех случаях образуются амфифильные полимеры, которые содержат только одну концевую гидрофобную группу.

В ходе исследования строение синтезированных амфифильных производных ПВП было исследовано методами ИК-спектроскопии и ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{13}C .

На полученных ИК-спектрах амфифильных полимеров ВП (таблетки в КВг), по сравнению с ПВП без концевой гидрофобной группы, наблюдалось увеличение интенсивности поглощения метиленовых групп вызываемое введением концевого стеарильного фрагмента.

На рисунке 2.29 приведен ^{13}C ЯМР спектр амфифильного ПВП, с молекулярной массой 4000 Да и содержащего концевую стеарильную группу, составляющую гидрофобный концевой фрагмент молекулы.

На данном спектре видны пики, которые соответствуют атомам углерода CH_2 -групп стearильного радикала (химические сдвиги в области 15,43 и 17,59 м.д., которая соответствует алифатическим CH_2 -группам), а также сигналы карбонильных атомов углерода в молекулах амфифильных полимеров N-винилпирролидона (химический сдвиг 178,34 м.д.), атомов углерода CH_2 - групп ПВП, соответствующих пирролидоновому кольцу гидрофильной части молекулы, (химический сдвиг 18,27; 31,66 и 43,18 м.д.) и винильных атомов углерода (химический сдвиг 34,36 и 45,46 м. д.).

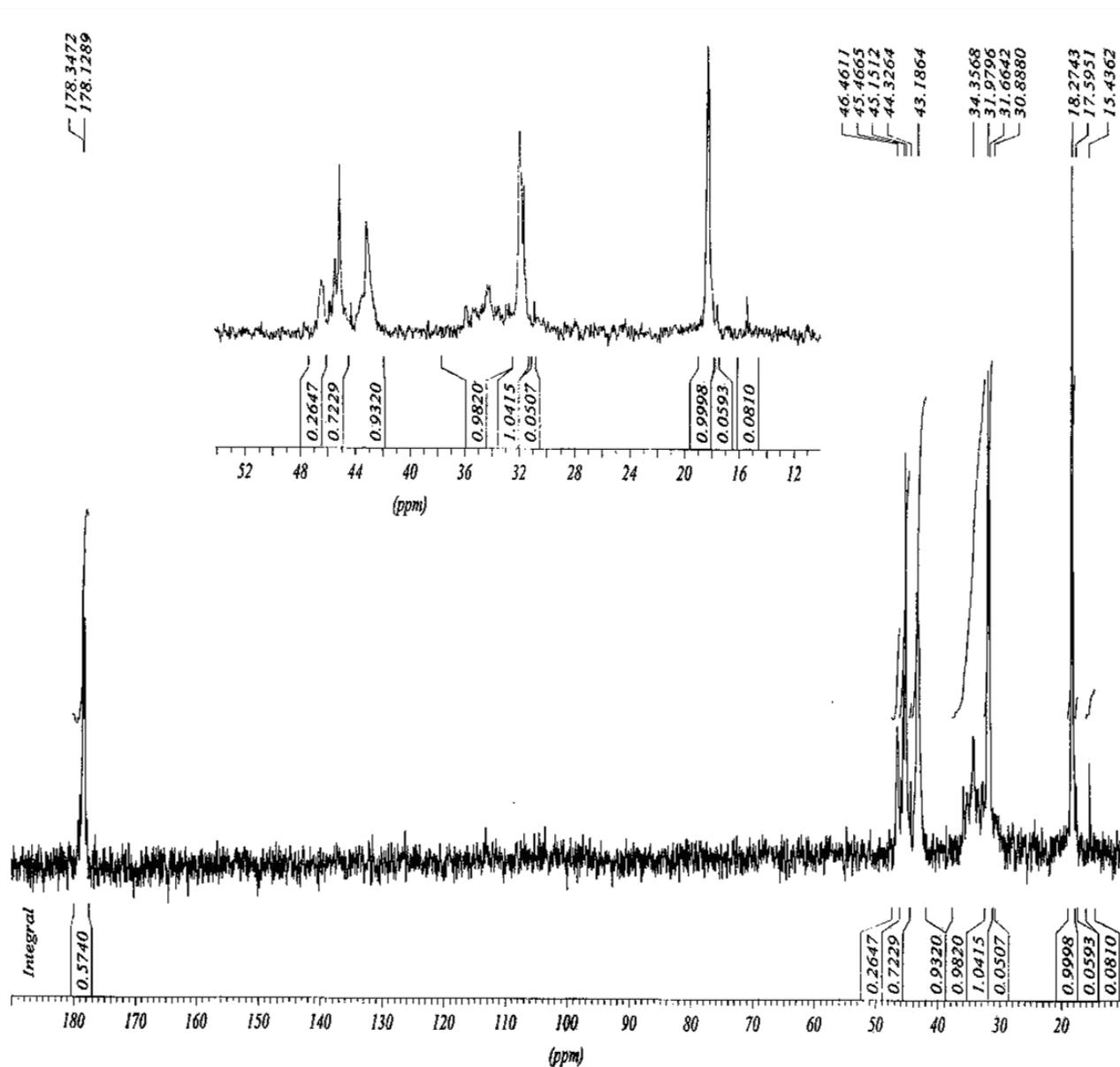


Рисунок 2.29 – ^{13}C -ЯМР спектр амфифильного полимера N-винилпирролидона, полученного в присутствии хлорангида стеариновой кислоты

Кроме того, как уже было упомянуто ранее, для полимеров с небольшими молекулярными массами (до 6000 Да), методами элементного анализа было определено наличие в них атомов хлора. Результаты элементного анализа являются подтверждением кинетической схемы процесса полимеризации, предложенной выше. Также, эти результаты позволили рассчитать молекулярную массу полимеров по массовому содержанию хлора в образце (таблица 2.3).

2.2.4 Получение функциональных производных амфифильных полимеров N-винилпирролидона, синтезированных с использованием одностадийного метода

Разработанная методика одностадийного получения амфифильных полимеров N-винилпирролидона, заключающаяся в радикальной полимеризации мономера в присутствии хлорангидридов карбоновых кислот в качестве регуляторов роста цепи, позволила синтезировать амфифильные полимеры, пригодные для дальнейшего получения их функциональных производных по схеме полимераналогичных превращений [258].

Условия проведения таких химических реакций не позволяют использовать амфифильные полимеры N-винилпирролидона, синтезированные двухстадийным методом, описанным в Разделе 2.2.1, и включающим реакцию амидирования семителехелевого полимера с концевой карбоксильной группой взаимодействием с длинноцепными алифатическими аминами, поскольку в таких полимерах амидная группа, которая связывает концевой гидрофобный алкильный фрагмент с полимерной гидрофильной цепью, распадается в сильнощелочных средах, что приводит к нарушению амфифильной структуры полимеров.

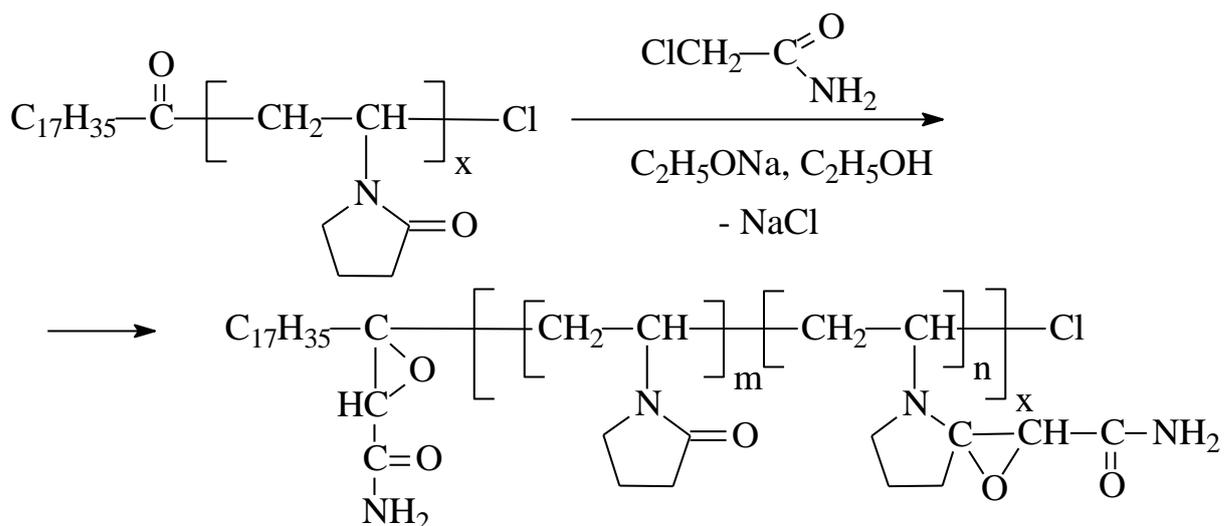
Получение производных амфифильных полимеров, содержащих дополнительные функциональные группы (эпоксидные, карбоксильные, амино) в свою очередь позволит расширить возможности их применения при создании функциональных полимерных наночастиц на их основе, например при связывании биологически активных агентов или при направленной доставке лекарственного вещества в организме [259].

2.2.4.1 Синтез амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих эпоксидные группы

Для функционализации амфифильных полимеров был использован разработанный ранее в УНЦ «Биоматериалы» РХТУ им. Д.И. Менделеева метод введения эпоксидных групп в часть звеньев поли-N-винилпирролидона путем реакции эпоксидирования циклических амидов в условиях, аналогичных реакции Дарзана [258].

Метод введения в поли-N-винилпирролидон эпоксидных групп, использованный в данной работе, заключался во взаимодействии карбонила пирролидонового кольца полимера с хлорацетамидом в присутствии этилата натрия.

Общую схему реакции можно быть представить следующим образом:



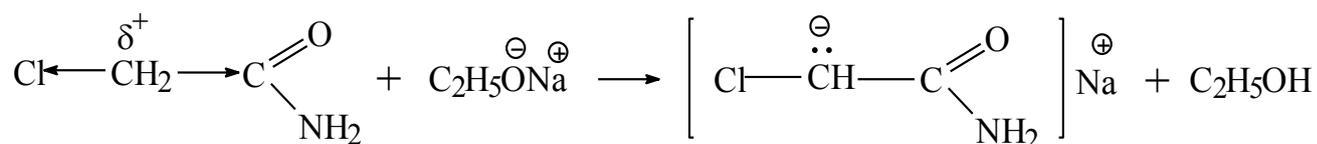
Полученный данной методикой полимер содержит в реакционноспособном звене полярную амидную группу, что, при этом, не снижает общей полярности полимера, как это имеет место в случаях сополимеров N-винилпирролидона с глицидилметакрилатом или аллилглицидиловым эфиром, и дает возможность ввести достаточное количество иммобилизуемого активного вещества в получаемую полимерную систему при сохранении растворимости в воде.

Кроме того, вводимые в полимерный носитель эпоксидные группы обладают высокой реакционной способностью по отношению к различным

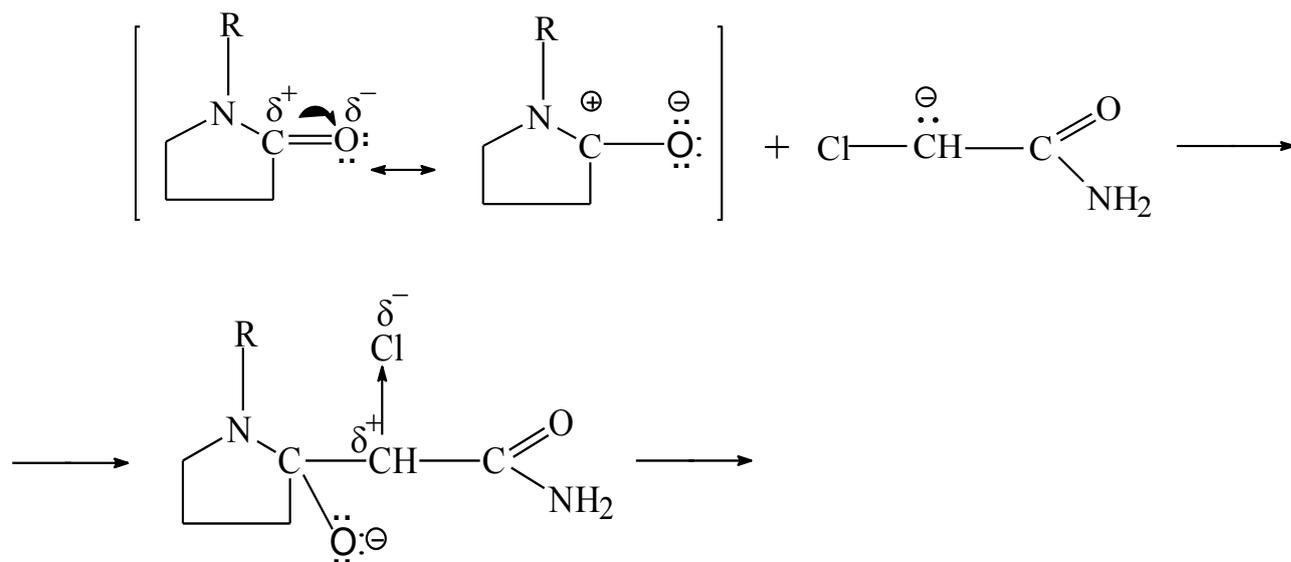
биологическим лигандам, и при этом не требуют дополнительного активирования.

Появление в амфифильных полимерах новых звеньев, которые содержат отличные от пирролидоновой эпоксидные или амидные группы, позволяет предположить, что реакции, протекающие в этом случае, могут быть изображены в виде схемы со следующими стадиями процесса:

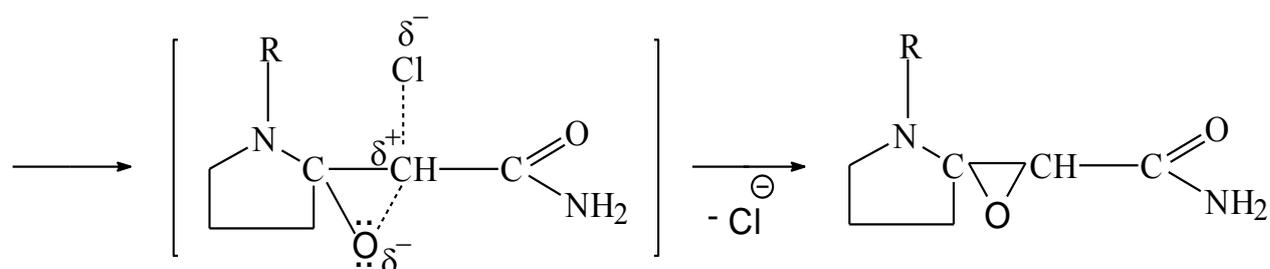
Образование нуклеофила (1)



Нуклеофильное присоединение (A_N) к карбонильной группе (2)



Нуклеофильное внутримолекулярное замещение S_{N2} (3)



Для изучения строения полученного эпоксидсодержащего полимера (ЭПВП-СО-С₁₇Н₃₅) использовали функциональный анализ полимеров (определение количества эпоксидных групп титриметрическим методом).

С использованием разработанной методики были получены амфифильные полимеры N-винилпирролидона, с различным содержанием в водорастворимом полимерном фрагменте звеньев с эпоксидными группами (от 1 до 10 мол. %).

Реакцию модификации проводили при концентрации полимера 15 % мас. в течение 6 часов при температуре 10°C. В качестве растворителя использовался абсолютированный этиловый спирт. Для связывания соляной кислоты HCl, выделяющейся в ходе реакции, использовали раствор метилата натрия или этилата натрия. Выделившийся в результате реакции полимер отделяли центрифугированием, промывали холодным абсолютированным этанолом и сушили при комнатной температуре в вакууме.

2.2.4.2 Синтез амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих аминокислотные группы

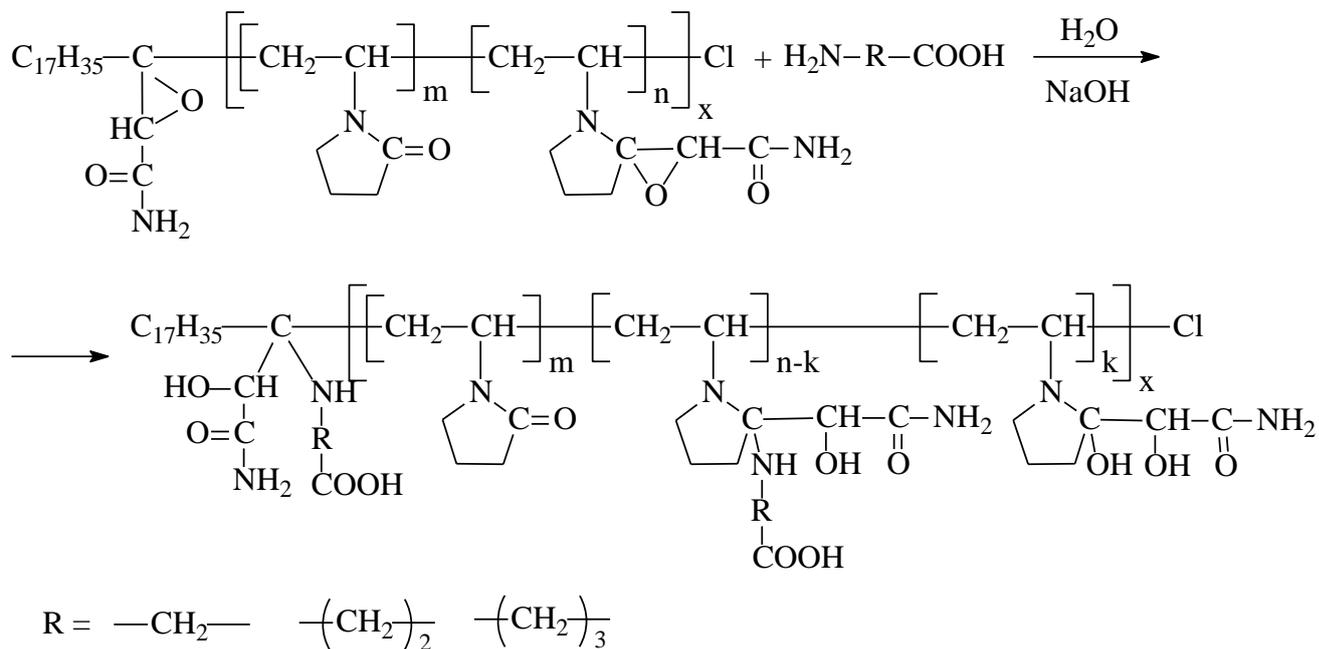
Для получения амфифильных полимеров, содержащих остатки аминокислот, проводили дальнейшую модификацию синтезированных эпоксидсодержащих полимеров аминокислотами различного строения, содержащими между карбоксильной и амино группами n-алкильные радикалы различной длины - γ -аминомасляной кислотой, β -аланином, глицином.

Известно, что соединения, которые содержат эпоксидные группы, взаимодействуют с молекулами, имеющими активный водород, в том числе с аминами, с раскрытием эпоксидного цикла [260, 261]. В таких реакциях для раскрытия эпоксидного кольца применяются катализаторы как основной, так и кислой природы. Так как аминокислоты представляют собой амфотерные соединения, то для получения продуктов, в которых связывание идет с аминной группой, применяют щелочные соли, а реакцию проводят в щелочной среде (pH > 7). Это можно объяснить тем, что при pH > 7 разрушается цвиттер-ионный характер аминокислот и их аминогруппа приобретает свойства основания [262]:



В соответствии с правилом Красуского аминогруппа присоединяется в первую очередь к наиболее гидрогенизированному атому углерода оксиранового цикла [263]. В нашем случае в реакции принимает участие дизамещенный эпексид. Исследования, проведенные ранее с использованием модельной реакции, включавшей введение в процесс N-метилпирролидона, и дальнейший анализ продуктов реакции методом ЯМР спектроскопии показали, что остаток аминокислоты в данном случае присоединяется к полимеру по атому углерода, который входит в состав азотсодержащего цикла [260,264,265].

Таким образом, реакция получения амфифильных полимеров, содержащих остатки аминокислот - γ -аминомасляной кислоты, β -аланина, глицина, может быть представлена следующим образом:



Для синтеза модифицированных амфифильных полимеров использовали методика, по которой эпоксирированный полимер с содержанием эпоксиридных групп от 5 до 10 мол.% и соответствующую аминокислоту (соотношения от 1:10 до 1:20) растворяли в дистиллированной воде и при перемешивании вводили

гидроксида натрия в виде водного раствора. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 4 часов.

Во время взаимодействия эпоксидсодержащих амфифильных полимеров с аминокислотами в водных средах имеет место некоторое ускорение реакции и увеличение степени превращения полимера, объясняемое каталитическим действием образующейся вторичной спиртовой группы, которая обладает достаточно высокой нуклеофильностью.

Реакцию модификации проводили при значительных избытках аминокислот, так как при увеличении количества аминокислоты по отношению к эпоксидной группе увеличивалась степень превращения. Продукты реакции подвергались очистке диализом и лиофильной сушке. Характеристики готовых продуктов (количество аминокислотных остатков) определяли по данным функционального анализа.

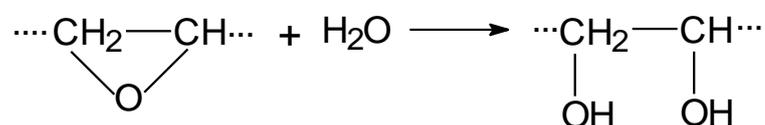
По полученным данным, степень замещения эпоксидных групп на аминокислотные остатки для разных образцов полимеров, составила от 75 до 90 мол.% (таблица 2.5).

Таблица 2.5 – Продукты модификации эпоксидированного амфифильного полимера N-винилпирролидона (Амф-ПВП, $M_n=6000$) аминокислотами (АК) (Температура - 25 °С, [Амф-ПВП] = 5 мас.%, растворитель – вода, соотношение АК/Амф-ПВП = 1,8 моль/осново-моль, содержание эпоксидных групп 8,9 мол.%)

Аминокислота	Содержание в полимере остатков аминокислот, мол.%	Степень превращения эпоксидных групп, мол.%
Глицин	6,9	77,5
β -Аланин	7,5	84,3
γ -Аминомасляная кислота	7,9	88,7

Результаты функционального анализа на эпоксидные группы показал, что модифицированные полимеры после реакции не содержат реакционноспособных

эпоксидных групп. Определенный процент непрореагировавших эпоксидных групп приходился на образовавшиеся гидроксильные группы оксиранового цикла, так как эпоксидные соединения вступают в реакцию с водой при $\text{pH} > 7$ по следующей общей схеме [266]:



По аналогичному пути реагирует с эпоксидными группами в щелочной среде этанол. В условиях проведения полимераналогичных превращений вода конкурирует с аминогруппой аминокислоты при реакции с оксирановыми циклами полимера. Поскольку этанол и вода обладают значительно меньшей, по сравнению с аминогруппой, способностью к нуклеофильной атаке эпоксидной группы, то эпоксидная группа преимущественно взаимодействует с аминогруппой аминокислоты и в незначительной степени с водой.

Таким образом, по схеме полимераналогичных превращений были получены функциональные производные амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащие дополнительные эпоксидные и аминокислотные группы, которые можно использовать в дальнейшем для придания векторных свойств и способности к целевой доставке БАВ наноразмерным носителям на основе таких амфифильных полимеров.

2.3 Получение и исследование наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона

С целью создания новых систем доставки биологически-активных и лекарственных веществ (БАВ) на основе полимерных наночастиц (ПН) из полученных амфифильных полимеров-N-винилпирролидона (Амф-ПВП) в данной работе были исследованы поведение таких амфифильных полимеров в водных средах, процессы их самоассоциации с образованием наноразмерных полимерных агрегатов, и основные свойства образующихся полимерных наночастиц.

2.3.1 Изучение растворимости амфифильных полимеров

Так как новые синтезированные амфифильные полимеры предполагалось использовать как самостоятельно, для получения из них наночастиц, так и для модификации ими уже существующих наноразмерных носителей (например, липосом), а большинство этих процессов проводятся в растворах, представлялось интересным изучение растворимости синтезированных полимеров.

Отношение высокомолекулярных соединений к растворителям является их важной характеристикой. Поведение полимеров в растворителях достаточно разнообразно. Они могут набухать, растворяться с образованием однофазной термодинамической системы или сорбировать растворитель. Одним из основных параметров для описания взаимодействия макромолекул в растворах является параметр растворимости полимеров, который пропорционален квадратному корню из плотности энергии когезии, и впервые был введен в своих работах Гильдебрантом и Скэтчардом [267]. Согласно этим исследованиям растворители можно разделить на три группы: со слабой, средней и сильной тенденцией к образованию водородных связей. Наиболее сильно при этом на процесс растворения полимеров влияет строение звеньев, которые составляют макромолекулярную цепочку полимера.

Структурное звено N-винилпирролидона характеризуется наличием как полярного ($-N-C=O$), так и неполярных фрагментов. Такое строение способствует хорошей растворимости полимеров на основе N-винилпирролидона, и в

апротонных, и в протонных растворителях. Вместе с тем, механизмы конформации и сольватации макромолекул полимера в растворах будут различны, в зависимости от типа используемого растворителя. Наличие в составе амфифильных полимеров концевых гидрофобных фрагментов может несколько ухудшить растворимость этих полимеров в полярных растворителях.

Таблица 2.6 – Растворимость амфифильных полимеров N-винилпирролидона (на примере ПВП-ОД4000 с молекулярной массой гидрофильного фрагмента 4000 Да и октадецильным гидрофобным фрагментом, по сравнению с поли-N-винилпирролидоном ПВП4000 с молекулярной массой 4000 Да)

Растворитель	Параметр растворимости δ , (мДж/м ³) ^{0,5}	Растворимость	
		ПВП-ОД4000, Комнатная температура	ПВП4000, Комнатная температура
1 группа			
Бензол	18,5	Р	Р
Толуол	18,2	НР	НР
Гексан	15,8	НР	НР
Гептан	15,1	НР	НР
Четыреххлористый углерод	17,4	НР	НР
2 группа			
Диэтиловый эфир	15,1	НР	НР
Тетрагидрофуран	20,2	Р	НР
1,4-Диоксан	20,2	Р	Р
Ацетонитрил	24,3	Р	Р
Ацетон	20,1	НР	НР
Диметилформамид	24,8	Р	Р
Метилпирролидон	30,2	Р	Р
Диметилсульфоксид	26,4	Р	Р
3 группа			
Изопропанол	23,5	Р	Р
Этанол	25,4	Р	Р
Вода	48,1	Р	Р

В работе была изучена растворимость синтезированных амфифильных поли-N-винилпирролидонов с разной молекулярной массой полимерного гидрофильного фрагмента и разным строением длинноцепного гидрофобного алкильного фрагмента. На примере полимера с молекулярной массой 4000 Да и октадецильной гидрофобной группой установлено, что полимеры с данным строением растворяются в большом количестве разных растворителей. При этом, в сравнении с растворимостью немодифицированного поли-N-винилпирролидона, содержащего концевую карбоксильную группу, растворимость амфифильных полимеров отличается незначительно (таблица 2.6), что можно объяснить основным вкладом в этот процесс пирролидоновых группировок полимерных макромолекул.

2.3.2 Исследование поведения амфифильных полимеров в водных средах

Так как разработанные амфифильные полимеры N-винилпирролидона содержат достаточно большие гидрофильные полимерные фрагменты по сравнению с гидрофобными алкильными радикалами, можно предположить, что в водных средах гидрофобные фрагменты, для уменьшения контакта с водой, будут самопроизвольно сворачиваться с формированием внутреннего гидрофобного ядра коллоидных структур, оболочку которых будут образовывать гидрофильные полимерные фрагменты. Это должно привести к спонтанному формированию полимерных наноразмерных частиц строения «ядро-оболочка». В этом случае гидрофобные алкильные концевые фрагменты полимеров будут направлены к ядру, а водорастворимые фрагменты поли-N-винилпирролидона будут переплетаться с образованием внешней водосовместимой оболочки наночастиц.

В качестве объектов исследования были выбраны две группы амфифильных полимеров.

Первую группу составили амфифильные полимеры, полученные двухстадийным методом – радикальной полимеризацией N-винилпирролидона в присутствии меркаптоуксусной кислоты в качестве регулятора, с последующим введением в полимеры концевой гидрофобной группы взаимодействием

семителехелевых полимеров с различными первичными или вторичными алифатическими аминами (таблица 2.7).

Применение в качестве регулятора роста цепи при радикальной полимеризации N-винилпирролидона меркаптоуксусной кислоты (МУК) было обусловлено её наибольшей эффективностью среди исследованных меркаптанов, и возможностью воспроизводимо получать с высоким выходом и контролируемым значением молекулярной массы полимеры, содержащие одну концевую карбоксильную группу на макромолекулу полимера.

Помимо этого, реакция модификации карбоксильных групп полимера гораздо проще, менее трудоемка и обеспечивает большие выходы амфифильных полимеров, чем модификация полимеров с концевой аминогруппой.

Вторую группу составили амфифильные полимеры, полученные одностадийным методом - радикальной полимеризацией N-винилпирролидона в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты в качестве регулятора роста цепи (таблица 2.8).

При этом были синтезированы для исследований амфифильные полимеры с разной молекулярной массой полимерного гидрофильного фрагмента. Кроме того, во вторую группу для изучения самосборки в водных средах и свойств образующихся наноразмерных ассоциатов был включен образец модифицированного амфифильного поли-N-винилпирролидона, содержащего в качестве функциональных групп остатки аминокислоты – глицина.

Таким образом, для систематического исследования процессов самоорганизации амфифильных поли-N-винилпирролидонов в водных средах и изучения влияния их строения на процессы образования наночастиц на основе таких амфифилов использовались две группы полимеров, представленные в таблице 2.7 и таблице 2.8.

Кодовое обозначение выбранных для исследования полимеров, представленное в таблице 2.7 и таблице 2.8 будет использовано при описании проведенных исследований и для предоставления и сравнения полученных результатов.

Таблица 2.7 – Исследуемые амфифильные полимеры N-винилпирролидона, полученные двухстадийным методом

Строение полимера	Молекулярная масса полимерного фрагмента	Код полимера	Критическая концентрация агрегации, микромоль/л
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₁₈ H ₃₇	1500	ПВП-ОД 1500	4,2
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₁₈ H ₃₇	2000	ПВП-ОД 2000	5,3
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₁₈ H ₃₇	2500	ПВП-ОД 2500	5,9
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₁₈ H ₃₇	4000	ПВП-ОД 4000	6,6
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₁₈ H ₃₇	6000	ПВП-ОД 6000	7,5
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₁₈ H ₃₇	8000	ПВП-ОД 8000	9,6
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₁₆ H ₃₃	4000	ПВП-ГД 4000	15,4
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₁₂ H ₂₅	4000	ПВП-ДД 4000	18,5
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₈ H ₁₇	4000	ПВП-Окт 4000	22,1
ПВП-S-CH ₂ -CONH-н-C ₆ H ₁₃	4000	ПВП-Гек 4000	-
ПВП-S-CH ₂ -CON-(н-C ₆ H ₁₃) ₂	4000	ПВП-Гек ₂ 4000	12,1
ПВП-S-CH ₂ -CON-(н-C ₈ H ₁₇) ₂	4000	ПВП-Окт ₂ 4000	14,0
ПВП-S-CH ₂ -CON-(н-C ₁₈ H ₃₇) ₂	4000	ПВП-ОД ₂ 4000	25,2

Таблица 2.8 – Исследуемые амфифильные полимеры N-винилпирролидона, полученные одностадийным методом

Строение полимера	Молекулярная масса полимерного фрагмента	Код полимера	Критическая концентрация агрегации, микромоль/л
ПВП-СО-н-C ₁₇ H ₃₅	2000	ПВП-Ст 2000	5,2
ПВП-СО-н-C ₁₇ H ₃₅	4500	ПВП-Ст 4500	7,9
ПВП-СО-н-C ₁₇ H ₃₅	6000	ПВП-Ст 6000	8,6
ЭПВП-СО-н-C ₁₇ H ₃₅ -Глицин	6000	Гли-ЭПВП-Ст	6,7

2.3.3 Определение критической концентрации агрегации амфифильных полимеров N-винилпирролидона

Известно, что амфифильные молекулы способны к самопроизвольной ассоциации при концентрации, превышающей определенную пороговую концентрацию – так называемую критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) (критическую концентрацию агрегации (ККА)). Как было показано в обзоре литературы, при этом в растворах могут образовываться и наблюдаться наноразмерные структуры различной морфологии.

Для всех исследуемых образцов амфифильных полимеров были определены их критические концентрации агрегации (ККА). Для этого использовался метод, основанный на солубилизации амфифильными полимерами гидрофобных плохорастворимых флуоресцентных красителей, в качестве которых использовали пирен и 1,3,5-дифенилгексатриен (ДФГТ), флуоресценция которых увеличивается при переносе из воды в мицеллярную фазу.

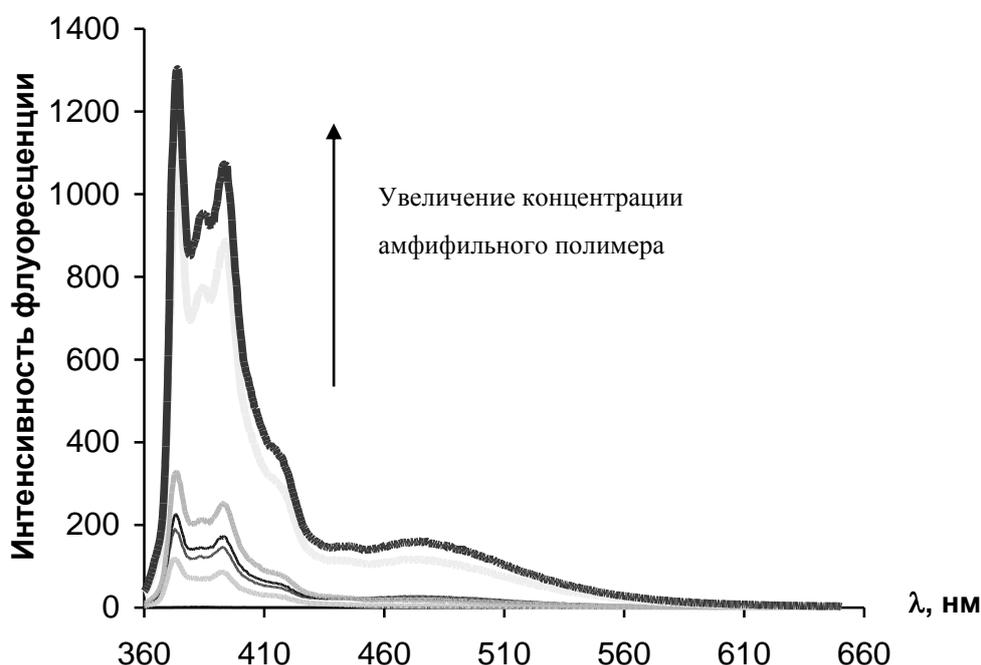


Рисунок 2.30 – Спектры флуоресценции пирена (6×10^{-7} М) в присутствии полимера ПВП-ОД1500 ($[\text{ПВП-ОД1500}] = 0,0025 \div 1$ мг/мл)

Значения ККА были рассчитаны на основе зависимостей интенсивности флуоресценции красителя включенного в полимерные частицы от концентраций

исследованных амфифильных полимеров в растворе после отделения несольюбилизованного красителя (рисунки 2.30-2.33).

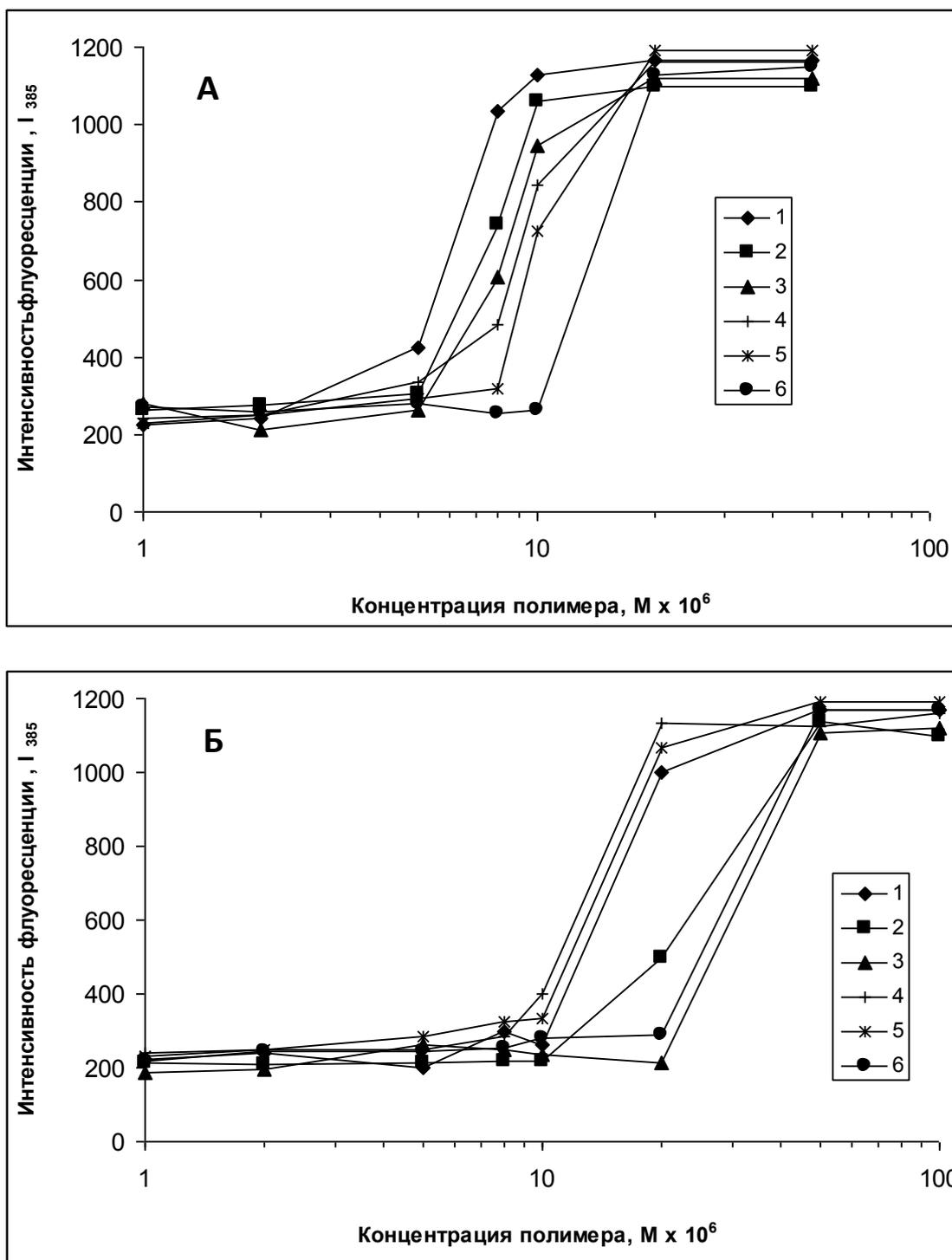


Рисунок 2.31 – Интенсивность флуоресценции пирена в зависимости от концентрации амфифильных полимеров ($\lambda = 385$ нм)

(А): 1 – ПВП-ОД1500; 2 – ПВП-ОД2000; 3 – ПВП-ОД2500; 4 – ПВП ОД4000; 5 – ПВП-ОД6000; 6 – ПВП-ОД8000.

(Б): 1 – ПВП-ГД4000; 2 – ПВП-ДД4000; 3 – ПВП-ОКТ4000; 4 – ПВП-Гек₂4000; 5 – ПВП-ОКТ₂4000; 6 – ПВП-ОД₂4000.

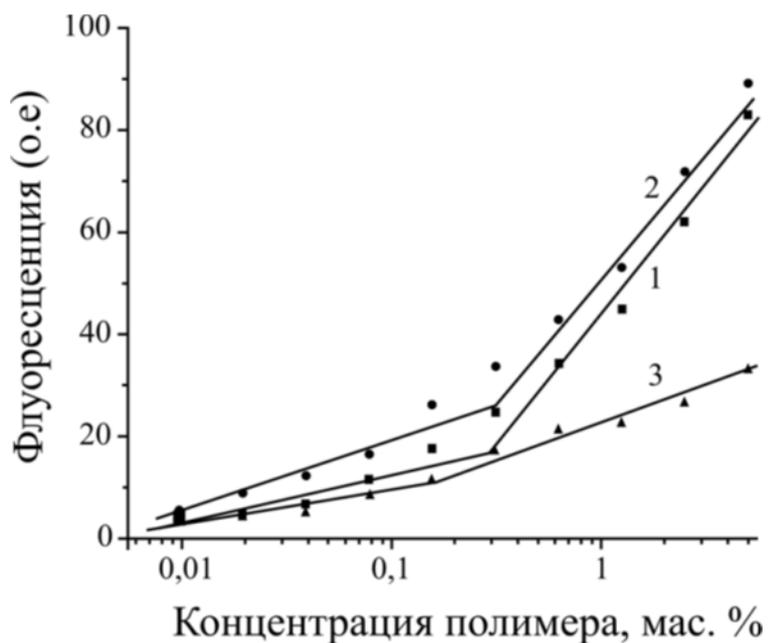


Рисунок 2.32 – Интенсивность флуоресценции ДФГТ в зависимости от концентрации амфифильных полимеров: 1- ПВП-Ст2000, 2- ПВП-Ст4500, 3 - ПВП-Ст6000



Рисунок 2.33 – Интенсивность флуоресценции ДФГТ в зависимости от концентрации амфифильного поли-N-винилпирролидона, содержащего боковые глициновые остатки (Гли-ЭПВП-Ст6000)

Из полученных зависимостей между интенсивностью флуоресценции красителя и концентрацией амфифильного полимера были рассчитаны значения ККА для всех исследуемых полимеров. Полученные значения ККА представлена в таблицах 2.7 и 2.8. Как видно, значения ККА для всех образцов полимеров находятся в микромолярном диапазоне концентраций. Это означает, что такие полимеры формируют агрегаты при относительно невысоких концентрациях.

Склонность амфифильных водорастворимых полимеров к самосборке в водных растворах в первую очередь определяется взаимодействием их гидрофобных блоков. Такие взаимодействия зависят не только от относительной доли гидрофобного блока в макромолекулах полимера, но и от их расположения и пространственной доступности. Поэтому, интересным представлялось изучить, как влияют эти факторы на процессы самоассоциации амфифильных полимерных молекул в группах синтезированных полимеров ВП.

Значения ККА для всех образцов амфифильных полимеров зависят как от молекулярной массы гидрофильного фрагмента ПВП, так и от размера и строения гидрофобного алифатического остатка. Увеличение молекулярной массы гидрофильного блока ПВП при неизменной длине гидрофобного алифатического фрагмента ведет к увеличению значений ККА. Из таблицы 2.7 видно, что значение ККА для ПВП-ОД2500 ниже, чем для ПВП-ОД8000, то есть полимер ПВП-ОД2500 образует более стабильные ассоциаты. Этот результат может быть объяснен разницей между силами свободного движения цепей гидрофильных фрагментов амфифильных макромолекул, образующих внешнюю оболочку и дестабилизирующих полимерную частицу, и силами гидрофобного взаимодействия алкильных фрагментов полимера, формирующих гидрофобное ядро и стабилизирующих полимерную частицу. Исходя из этого, уменьшение молекулярной массы (размера) водорастворимого блока ПВП обеспечивает более эффективное формирование полимерных ассоциатов и более низкие значения ККА. Но при этом, всегда необходимо учитывать, что растворимость полимеров снижается при снижении молекулярной массы гидрофильного фрагмента, что может вызвать затруднения при получении полимерных наночастиц.

Разница в длине гидрофобных фрагментов также существенно влияет на ККА. Это влияние наиболее выражено для полимеров со средней молекулярной массой фрагмента ПВП (3000÷5000), когда октадецильные радикалы обеспечивают самые сильные гидрофобные взаимодействия в ядре мицелл по сравнению со всеми другими n-алкилами. С уменьшением длины гидрофобных фрагментов полимера происходит рост гидрофильности системы. Амфифильные ПВП в этом случае ассоциируются с образованием наночастиц при больших концентрациях (например, значение ККА для ПВП-ГД4000 ниже, чем для ПВП-Окт4000). При этом полимер с концевой n-гексильной группой вообще не образует ассоциатов, так как сил взаимодействия коротких алкильных фрагментов не хватает для формирования ядра устойчивой мицеллы.

В случае концевых гидрофобных ди(n-алкильных) групп, они придают гидрофобность всей полимерной молекуле. В результате гидрофильно/гидрофобный баланс таких полимеров смещен в сторону гидрофобности (особенно для полимера с ди(n-октадецильным) хвостом), что приводит к снижению растворимости таких полимеров в водных средах, и к затруднениям при образовании наночастиц и определении ККА. Поэтому полимер ПВП-ОД₂4000 солюбилизировал пирен только при высоких концентрациях в растворе. Возможно, дополнительную роль сыграл большой объем гидрофобной группы, вызывающий дополнительные стерические затруднения при формировании полимерных агрегатов. Для двух других образцов полимеров с более короткими вторичными гидрофобными группами (ПВП-Гек₂4000 и ПВП-Окт₂4000) значения ККА ниже, чем для ПВП-ОД₂4000, даже, несмотря на меньшую долю гидрофобных фрагментов в макромолекулах.

ККА амфифильного полимера с аминокислотными остатками ниже, чем для немодифицированного образца с близким строением гидрофильного и гидрофобного фрагмента (таблица 2.8). В этом случае наличие дополнительных боковых аминокислотных групп, при близких значениях молекулярных масс обоих полимеров, очевидно, способствует более активной самосборке амфифильных молекул и образованию агрегатов меньшего размера.

2.3.4 Получение и характеристика полимерных наночастиц

Как было показано в обзоре литературы, выбор подходящего оптимального метода получения полимерных наночастиц во многом определяет их свойства и свойства и эффективность применения лекарственных форм на основе наноразмерных носителей. При этом, для разработки наиболее подходящего метода, необходимо учитывать целый ряд различных факторов, таких как концентрация амфифильного полимера, соотношение гидрофильного и гидрофобного фрагментов полимера, природа растворителей, соотношение водной и органической фаз, время ультразвукования или диализа, природа включаемого биологически активного вещества (БАВ), соотношение полимера и включаемого агента и т.д.

В данной работе для синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона были подобраны оптимальные условия и методы, позволяющие получать наночастицы с наименьшим размером, близкой к сферической формой и высокой стабильностью [268]. Определение основных характеристик полимерных наночастиц, в первую очередь размера и морфологии, проводили методами динамического светорассеяния и электронной микроскопии.

Как уже отмечалось, методы получения наночастиц можно разделить на два основных вида – получение наночастиц из уже готовых амфифильных полимерных молекул, и получение наночастиц одновременно с полимеризацией мономера. В данной работе, были использованы заранее синтезированные амфифильные полимеры, поэтому поиск способов получения наноразмерных агрегатов на их основе шел среди методов первой группы.

Среди методов получения наночастиц самопроизвольной агрегацией амфифильных полимеров, в свою очередь можно выделить на три основных группы – эмульсионные методы, методы диализа и методы прямого растворения. Для выбора оптимальных условий, наночастицы на основе синтезированных амфифильных полимеров были получены с использованием всех вышеперечисленных методов.

Для формирования наночастиц с помощью метода прямого растворения амфифильные полимеры ВП непосредственно растворяли в дистиллированной, деионизованной воде или физиологическом растворе 0,15 М NaCl, рН 7,4, при концентрациях, близких к ККА для этих полимеров.

В случае использования для получения полимерных наночастиц диализного метода, амфифильные полимеры растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) или диметилформамиде (ДМФА) и диализовали раствор в специальных кассетах или диализных мешках относительно дистиллированной воды в течение 24÷48 часов. Все полученные образцы амфифильных полимеров N-винилпирролидона были полностью растворимы в указанных растворителях, а использование дейтерированного ДМСО-d₆ позволило контролировать методом ¹³C и ¹H ЯМР спектроскопии момент окончания процесса диализа [269].

Для получения полимерных наночастиц эмульсионным методом синтезированные амфифильные полимеры ВП растворяли в разных органических растворителях, а затем добавляли воду для приготовления эмульсии. Дисперсность эмульсии увеличивали при помощи обработки системы ультразвуком высокой мощности, а органический растворитель удаляли затем под вакуумом при помощи роторного испарителя. Выбор метода получения наночастиц в каждом случае определялся строением полимера, а именно соотношением его гидрофильной и гидрофобной частей [270].

Полученные всеми тремя методами полимерные наночастицы были визуализированы методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

Известно, что морфология самоорганизующихся структур, которые можно получить из амфифильных молекул, довольно многочисленна. Обычно предполагают, что амфифильные полимеры образуют частицы близкой к сферической формы. Однако в ряде публикаций приводятся данные о существовании множества надмицеллярных структур с несферической формой [271]. Это различные ламеллярные структуры, кольца, гексагональные упаковки, трубчатые структуры, палочкообразные формы, ленточные формы. Обычно

такого рода структуры образуются из сополимеров с асимметричным строением, хотя в растворе всегда существует некое равновесие между различными формами.

Полученные данные электронной микроскопии показывают, что вне зависимости от способа получения, путем подбора правильных концентраций полимера, в водных растворах амфифильных поли-N-винилпирролидонов с концентрацией выше близкой к ККА образуются сферические частицы, диаметр которых находится в нанометровом диапазоне (рисунок 2.34).

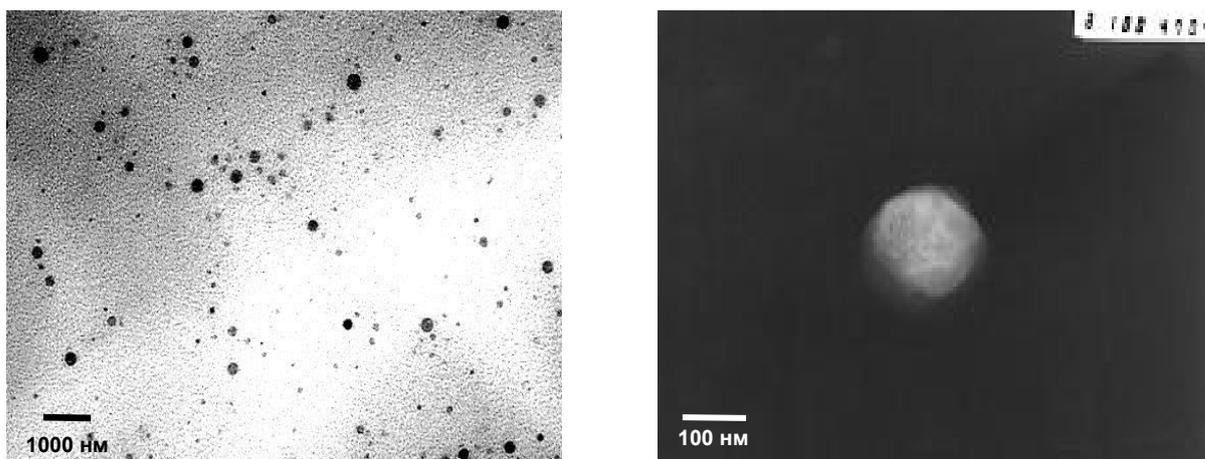


Рисунок 2.34 – Микрофотографии ТЭМ наночастиц ПВП-ОД 3300, полученных методом прямого растворения ($[ПВП-ОД3300] = 1 \text{ мг/мл}$)

Среди способов определения размеров наночастиц и дисперсности полимерных коллоидных систем одними из наиболее информативных методов являются методы светорассеяния, которые позволяют не только определить средний размер наночастиц, но также рассчитать основные характеристики полидисперсности наносистем. Наиболее часто для определения размера полимерных наночастиц используют метод динамического светорассеяния. Но при этом, отсутствие данных о морфологии анализируемой дисперсной системы (подтверждения сферичности изучаемых наночастиц) накладывает серьезные ограничения на использование методов этой группы [272]. В данной работе использование метода динамического светорассеяния для оценки среднего диаметра наночастиц и их распределения по размерам является целесообразным, так как ранее методом электронной микроскопии было установлено, что в

независимости от метода получения, на основе синтезированных амфифильных полимеров ВП удастся получить наночастицы сферической формы.

Основными изученными параметрами, влияющими на размер образующихся полимерных наночастиц, были способы получения агрегатов, концентрация амфифильных полимеров в растворе и строение амфифильных полимеров (их гидрофильные и гидрофобные фрагменты).

Распределение полимерных наночастиц по размерам, полученное методом динамического светорассеяния, показало, что у всех исследованных образцов амфифильных полимеров в водных дисперсиях присутствуют как маленькие частицы размером до 100 нм, так и крупные частицы, размер которых составляет более 250 нм, но в целом распределения частиц носят мономодальный характер (рисунок 2.35).

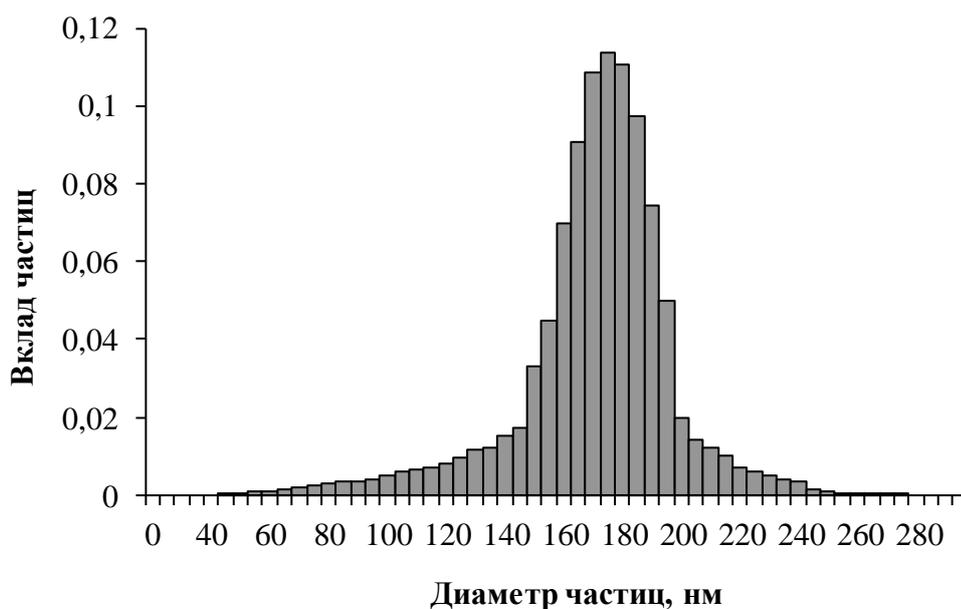


Рисунок 2.35 – Распределение по размерам частиц ПВП-ОД2500 в физиологическом растворе, полученных методом прямого растворения ($[ПВП-ОД2500] = 2,5 \text{ мг/мл}$)

На следующем этапе исследований были определены средние диаметры наночастиц на основе исследуемых полимеров, сформированных методами диализа, растворения, и эмульсионным методом (таблица 2.9). Размер наночастиц, полученных диализным методом, был в 1,5-2,0 раза меньше чем размер частиц,

полученных методом прямого растворения. Такой эффект уменьшения размеров частиц можно объяснить тем, что в процессе диализа, в объеме диализной ячейки устанавливается равновесие, благодаря которому цепи макромолекул полимера занимают более выгодную конформацию, и образуют более компактные полимерные структуры.

Таблица 2.9 – Размеры полимерных наночастиц

*Средняя погрешность определения диаметра частиц ± 3 нм

**Средняя погрешность определения диаметра частиц ± 14 нм

$C_{\text{п}}$ – концентрация полимера в растворе

Код полимера	Средний диаметр частиц, нм				
	Метод прямого растворения			Диализный метод	Эмульсионный метод
	Вода	Физиологический раствор	Вода		
	$C_{\text{п}} \approx$ ККА	$C_{\text{п}} = 5$ мг/мл			
ПВП-ОД1500	28	180	320	150	110
ПВП-ОД2000	26	194	360	190	120
ПВП-ОД2500	30	198	360	180	120
ПВП-ОД4000	30	206	380	210	150
ПВП-ОД6000	32	200	380	200	140
ПВП-ОД8000	35	240	420	220	170
ПВП-ГД4000	32	260	440	240	190
ПВП-ДД4000	30	270	480	250	200
ПВП-ОКТ4000	32	280	490	270	230
ПВП-Гек ₂ 4000	36	300	510	290	250
ПВП-ОКТ ₂ 4000	40	340	600	350	300
ПВП-ОД ₂ 4000	90	800	1460	1100	980

Наноразмерные агрегаты наименьшего размера удалось получить эмульсионным методом, используя систему этилацетат/вода. Кроме того, изменяя продолжительность, мощность и интенсивность обработки системы ультразвуком, удается контролировать размер образующихся частиц и значительно снижать дисперсность системы.

Средний размер частиц, полученных прямым растворением в физиологическом растворе, в среднем в 1,8 раз меньше, чем размер частиц, полученных этим же методом, в воде. Такое уменьшение размера агрегатов можно объяснить усилением гидрофобных взаимодействий фрагментов полимерных макромолекул в среде с более высокой ионной силой, что приводит к образованию более компактных полимерных наноразмерных структур.

Как видно из данных таблицы 2.9, помимо метода получения полимерных наночастиц, еще одним важным фактором, влияющим на размер агрегатов, является строение самого амфифильного полимера. С увеличением молекулярной массы водорастворимого фрагмента полимера, а, следовательно, с увеличением размера полимерных макромолекул, увеличивается и средний размер образующихся из этих макромолекул агрегатов. Также увеличиваются размеры частиц и с уменьшением длины концевой гидрофобной алкильной группы. При этом полимеры с концевой октадецильной группой, которые обладают оптимальным лиофильно-лиофобным балансом и самыми низкими значениями ККА, образуют наиболее стабильные и компактные наночастицы. Амфифильные полимеры с концевой ди(н-алкильной) группой и в этом случае демонстрируют повышенную гидрофобность, худшую растворимость и образуют агрегаты гораздо больших размеров при больших концентрациях в растворе. Особенно это выражено для полимера ПВП-ОД₂ 4000 с концевой ди(н-октадецильной) группой.

Исследование влияние концентрации амфифильных полимеров N-винилпирролидона в растворе на размер полимерных наночастиц (рисунок 2.36), полученных из этих полимеров методом прямого растворения показало, что во всех случаях происходит некоторое увеличение размеров агрегатов с повышением концентрации полимеров в растворе.

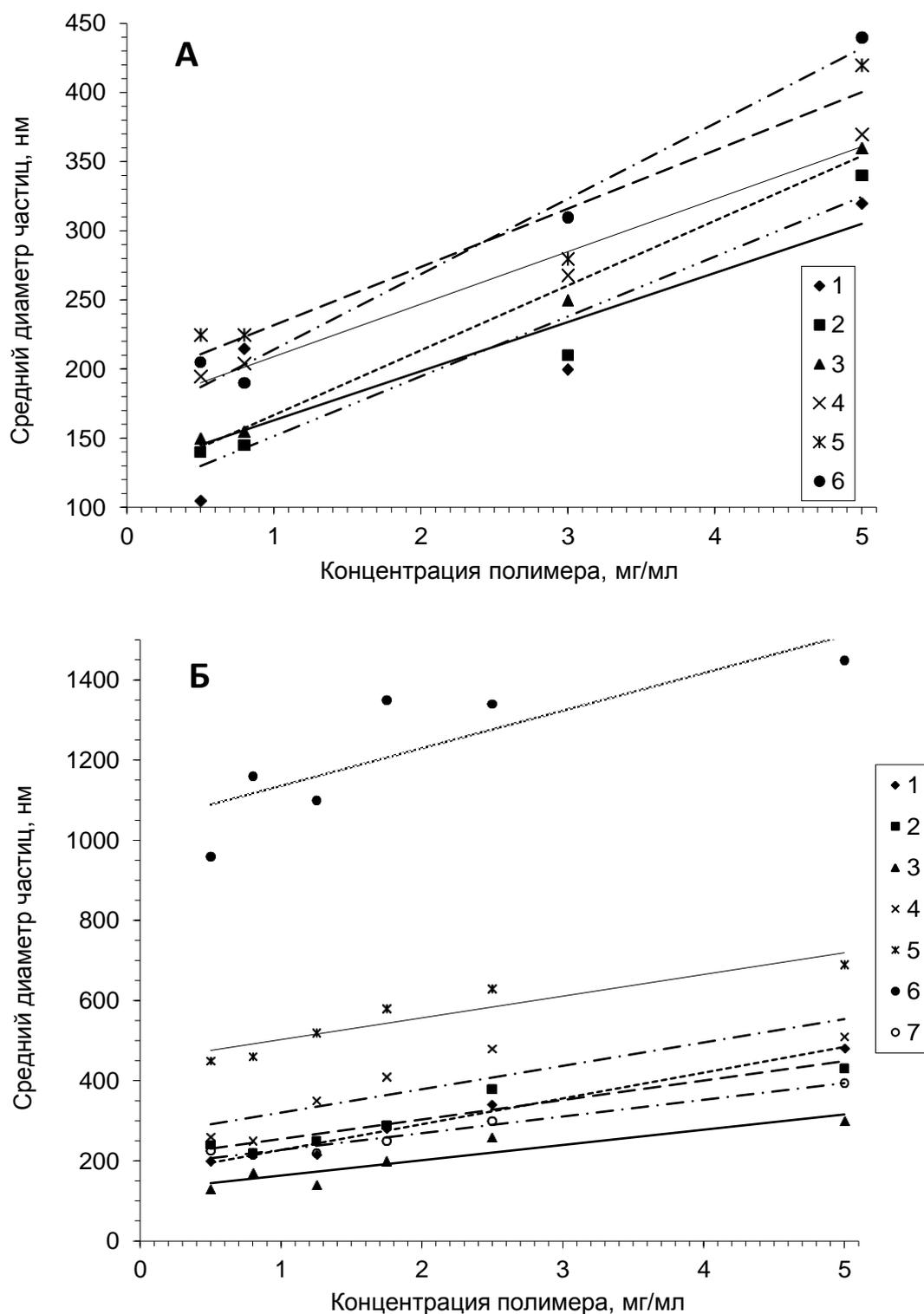


Рисунок 2.36 – Влияние концентрации амфифильных полимеров на размер наночастиц

(А): 1 – ПВП-ОД1500; 2 – ПВП-ОД2000; 3 – ПВП-ОД2500;
4 – ПВП-ОД4000; 5 – ПВП-ОД6000; 6 – ПВП-ОД8000.

(Б): 1 – ПВП-ГД4000; 2 – ПВП-ДД4000; 3 – ПВП-ОКТ4000;
4 – ПВП-Гек₂4000; 5 – ПВП-ОКТ₂4000; 6 – ПВП-ОД₂4000. 7 – ПВП-ОД4000

Как правило, при самосборке амфифильных молекул, предполагается образование сферических мицеллярных структур, размер которых зависит от длины их цепи [273]. Также известно и то, что поведение амфифильных макромолекул в водных средах не всегда является настолько предсказуемым. Так, в ряде работ показано [274], что в водных средах могут образовываться частицы (в том числе сферические) с размерами, большими размера простой мицеллы. Установлено, что такие наноразмерные структуры, могут представлять собой более сложные ассоциаты простых мицелл.

Диаметр наночастиц, полученных прямым растворением в воде амфифильных полимеров N-винилпирролидона, при концентрациях полимера, близких к значению его критической концентрации агрегации (30÷50 нм) совпадает с рассчитанным для этих полимеров теоретическим размером мицелл, если при расчетах исходить из модели линейного строения полимера. Молекула амфифильного ПВП состоит из двух частей: первая часть представляет собой ПВП с концевым фрагментом меркаптана $-S-CH_2-CH_2-CON-$, а вторая часть – длинноцепной первичный или вторичный алкильный радикал. При этом ПВП содержит от 20 до 60 мономерных звеньев. Длина одинарной связи С-С составляет примерно 0,154 нм [275]. Тогда, исходя из модели линейного строения рассматриваемого полимера, максимальный размер его макромолекулы в приближении составляет 15÷25 нм. Тогда теоретически, диаметр мицеллярных структур в этом случае должен быть порядка 30÷50 нм, что согласуется с данными, полученными методом динамического светорассеяния.

Увеличение концентрации амфифильного полимера в растворе до концентраций, на несколько порядков превышающих концентрацию агрегации, ведет к переорганизации, слипанию, агрегации мицеллярных наночастиц с образованием более крупных ассоциатов различной морфологии, в том числе и сферических.

Таким образом, полученные в ходе исследований методами электронной микроскопии и динамического светорассеяния данные показали что:

- средний диаметр наночастиц, сформированных методом диализа и, особенно, эмульсионным методом, был несколько меньше среднего диаметра наночастиц, полученных методом прямого растворения полимеров;

- вне зависимости от метода получения частиц, получаемые коллоидные наносистемы характеризуются узким распределением по размерам;

- существенное влияние на процессы самоорганизации амфифильных полимерных макромолекул оказывают способы получения наночастиц, концентрация амфифильного полимера в растворе, строение амфифильного полимера (их гидрофильно-гидрофобный баланс), а также ионная сила раствора.

Полученные результаты исследований [276] позволили сделать вывод, что, среди использованных методов получения наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона в водных средах, наибольший практический интерес представляет эмульсионный метод.

Данный простой, быстрый метод позволяет контролировать свойства и характеристики получаемых наночастиц за счет большего количества регулирующих факторов (объемное соотношение водной и органической фазы, концентрация амфифильного полимера, мощность и время ультразвукового воздействия на эмульсию, природа используемого растворителя). Важным преимуществом этого способа является то, что органический растворитель, используемый для получения наноразмерных носителей, в отличие от метода диализа, удаётся практически полностью удалять из системы. Помимо этого, эмульсионный метод применим к более широкому кругу полимеров и БАВ, обладающих как сильно, так и слабо выраженными гидрофобными свойствами.

Диализный же метод, в первую очередь, применим, когда есть риск повреждения молекул включаемого биологически активного вещества ультразвуковым воздействием (например, при иммобилизации белков). Исходя из вышеперечисленных доводов, в ходе дальнейших исследований, преимущественно использовали для получения наноразмерных полимерных носителей именно эмульсионный метод с последующим выпариванием растворителя под вакуумом.

2.3.5 Исследование свойств полимерных наночастиц

2.3.5.1 Изучение структурной организации полимерных наночастиц

Одним из новых подходов к изучению типов структурной организации амфифильных полимеров в самопроизвольно образуемых ими наноразмерных агрегатах является метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Метод ЯМР пока не нашел еще достаточно широкого применения в данной области, но уже в настоящее время существует ряд работ по исследованию структуры полимерных наночастиц с помощью ЯМР спектроскопии [277, 278]. Например, в исследовании [279] методом ЯМР анализируется структура наночастиц, образованных по типу «ядро-оболочка» амфифильными производными полиэтиленгликоля.

В данной работе с помощью метода ^1H -ЯМР спектроскопии высокого разрешения была изучена структура наноразмерных агрегатов из синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона (рисунок 2.37). Сравнивая спектры полимера ПВП-ОД4000 при его концентрации ниже ККА (рисунок 2.37А) и наночастиц этого же полимера в D_2O при концентрации выше ККА (рисунок 2.37Б), можно увидеть исчезновение пиков, которые относятся к октадецильной концевой группе (1,22–1,33) на спектре наночастиц полимера ПВП-ОД4000. Для наночастиц в воде пики, соответствующие поли-N-винилпирролидоновому фрагменту, становятся меньше (например, отвечающий $-\text{CH}_2-$ (15) химический сдвиг (1,96–1,94), см. рисунок 2.13). Это может быть свидетельством достаточно полного экранирования гидрофобного алифатического фрагмента цепи макромолекул поли-N-винилпирролидона. С другой стороны смещение в сторону увеличения сдвигов, отвечающих $-\text{CH}_2-$ (21) и (22), а также сравнение их интенсивности с пиками протонов гидрофильного полимерного фрагмента амфифильного ПВП, может свидетельствовать о том, что полимерная, гидрофильная часть молекулы становится более подвижной.

Важным результатом анализа наночастиц методом ^1H ЯМР спектроскопии является отсутствие существенных различий между спектрами наночастиц, полученных разными методами. Следовательно, способ получения наночастиц не влияет на их структуру, а только определяет их размеры и полидисперсность.

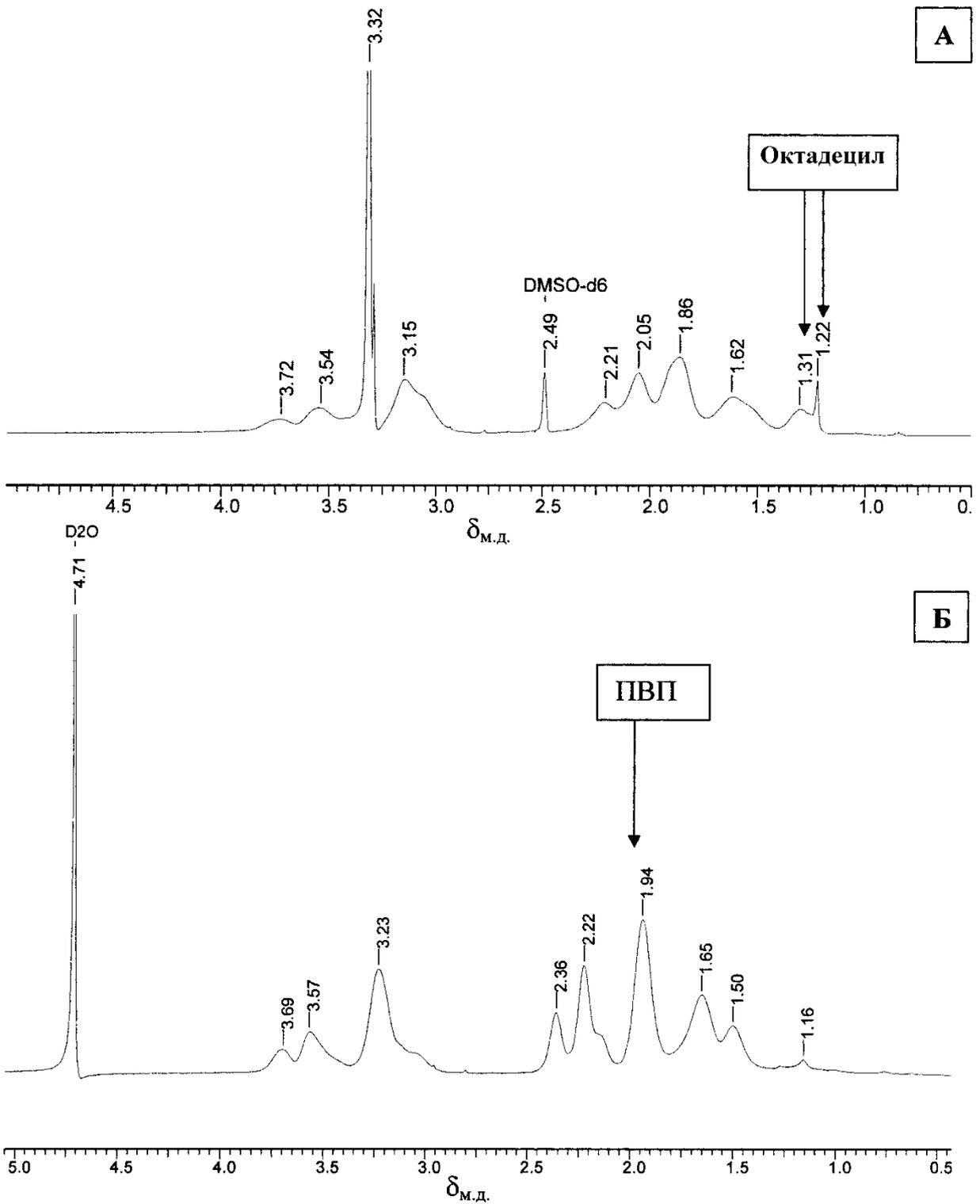


Рисунок 2.37 – ^1H -ЯМР спектр ПВП-ОД4000 в ДМСО-d6 (А) и наночастиц, полученных из этого же полимера в D_2O (Б)

2.3.5.2 Изучение механической устойчивости полимерных наночастиц

Одним из важных свойств полимерных наночастиц является их стабильность. Для изучения устойчивости полимерных наночастиц при механическом воздействии были оценены диаметры частиц на основе амфифильных полимеров (концентрация полимера составляла 5 мг/мл) методом динамического светорассеяния до и после фильтрации суспензий НЧ на 0,22 мкм фильтре Millipore (рисунок 2.38).

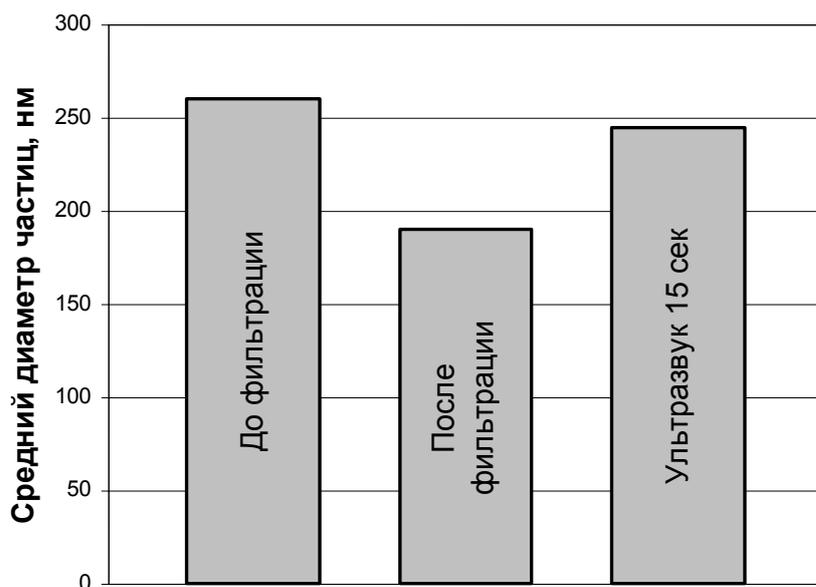


Рисунок 2.38 – Размер наночастиц ПВП-ОД4000 (5мг/мл) до и после внешнего воздействия

Под действием прилагаемого внешнего механического воздействия диаметр наночастиц после фильтрации был равен приблизительно 200 нм, то есть он был сопоставим с размером пор фильтра. В тоже время, концентрация амфифильного ПВП в растворе после фильтрации не изменялась. После этого наночастицы, полученные после фильтрации, обрабатывали ультразвуком на максимальной мощности в течение 30 секунд. До начала эксперимента ожидалось, в этом случае произойдет разрушение наночастиц, сопровождающееся уменьшением их размера. Однако, после ультразвукования размер частиц стал таким, каким был изначально. Из литературы известно, что избыток свободной энергии, который обуславливается высокоразвитой поверхностью раздела между дисперсионной

средой и дисперсной фазой, стимулирует те процессы, которые приводят к уменьшению свободной энергии Гельмгольца F [280]. Можно предположить, что диаметр частиц около 250 нм для данного типа полимера (ПВП-ОД4000) при исследуемой концентрации в водной среде, является наиболее выгодным. Отметим также, и в отсутствие ультразвукования, система самопроизвольно приходила к равновесию. Спустя 1-2 часа размер наночастиц становился таким, каким он был до фильтрации.

Из приведенных данных исследования можно сделать вывод, что при высоких концентрациях полимера, значительно превышающих ККА, образующиеся полимерные частицы представляют собой более крупные, чем простые мицеллы, ассоциаты, и имеют более сложное строение.

2.3.5.3 Изучение термической устойчивости полимерных наночастиц

Одним из важных параметров, влияющих на процессы, протекающие в дисперсиях наноразмерных частиц, является температура системы. Образование наночастиц и диспергирование системы, может происходить, как известно, только выше некоторой определенной температуры, которая называется точкой Крафта (T_K). Ниже этой температуры T_K растворы амфифильные полимеры представляют собой отдельные молекулы, тогда как выше этой температуры в растворе существуют и отдельные молекулы, и их ассоциаты. Изучение зависимости стабильности размеров наночастиц от температуры, позволяет изучить термодинамические параметры исследуемой системы [281].

Увеличение температуры раствора наночастиц амфифильного ПВП, приводило к уменьшению их диаметра (рисунок 2.39). В тоже время, этот процесс являлся обратимым. Результаты эксперимента подтверждают предположение о том, что рассматриваемые частицы амфифильного ПВП и при высоких концентрациях полимера представляют собой ассоциаты сложного строения, тогда как при низких концентрациях образуются мицеллярные структуры. При повышении температуры до 343 К средний диаметр наночастиц приближается к теоретически рассчитанному размеру мицелл данного полимера.

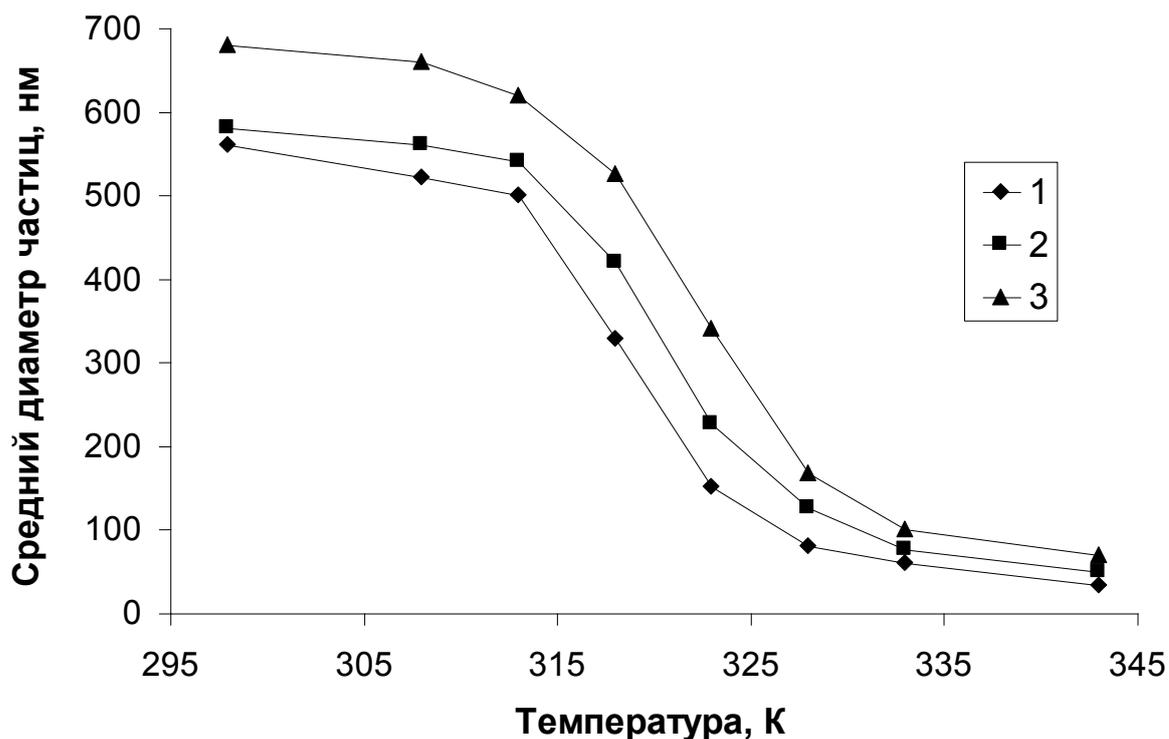


Рисунок 2.39 – Температурная зависимость размера полимерных наночастиц в воде (концентрация полимера 5 мг/мл). 1 – ПВП-ОД2000; 2 – ПВП-ОД4000; 3 – ПВП-ДД4000

С помощью ^1H ЯМР спектроскопии было проанализировано изменение структуры наночастиц на основе синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона при повышении температуры образцов до 343 К. Влияние температуры на вид ЯМР спектров может выражаться в прочности водородных связей и изменении степени ассоциации молекул полимера. В ходе исследования изменения вида ^1H ЯМР спектров при увеличении температуры до 343 К практически не наблюдалось. Таким образом, не удалось получить данных, показывающих, что структура анализируемых наночастиц существенно меняется с увеличением температуры раствора. Можно предположить, что при самосборке амфифильного ПВП в водных средах плотно упакованные гидрофобные алкильные радикалы составляют устойчивое к умеренному нагреванию ядро мицеллярных частиц.

Таким образом, на основе полученных результатов исследования, можно заключить, что синтезированные в данной работе амфифильные полимеры N-винилпирролидона различного строения могут быть использованы для создания наноразмерных полимерных частиц.

Для полученных полимерных наночастиц изучены их важнейшие физико-химические характеристики (критическая концентрация агрегации, морфология, размер, распределение частиц по размерам, устойчивость). Эти параметры способны значительно влиять на поведение полученных нанодисперсных систем в водных и биологических средах и в организме.

Разработанные методики получения наночастиц позволили варьировать размеры частиц и их распределение по размерам. Установлено, что полученные полимерные наночастицы в водных средах в физиологических условиях являются устойчивыми коллоидными образованиями. Использование большого числа новейших методов исследования позволило сделать предположение о структуре таких частиц.

Полимерные частицы из амфифильных полимеров N-винилпирролидона при концентрациях, выше ККА представляют собой агрегаты, состоящие из ассоциированных более мелких мицеллярных структур. Определено влияние методов получения частиц и строения амфифильных полимеров на размер получаемых наноразмерных агрегатов и их свойства.

Наиболее перспективными для получения полимерных наночастиц являются амфифильные полимеры N-винилпирролидона с молекулярной массой полимерного водорастворимого фрагмента $M_n=2000\div 6000$ Да и одной концевой октадецильной группой.

2.4. Исследование биосовместимости амфифильных полимеров N-винилпирролидона и наночастиц на их основе

Очевидно, что оценка биосовместимости и безопасности амфифильных полимеров и полимерных наноразмерных носителей, предполагаемых для применения в качестве новых высокоэффективных систем доставки биологически активных и лекарственных веществ и лекарственных форм на их основе позволит в значительной мере решить вопрос целесообразности практического применения этих полимеров в медицине, фармацевтике и биотехнологии. Однако, параметры биологической и токсикологической безопасности, как и биосовместимости амфифильных полимеров и полимерных наночастиц, в настоящее время изучены не достаточно.

Поскольку под биосовместимостью, в общем случае, понимают способность исследуемого материала (в данной работе – используемых амфифильных полимеров и наночастиц из них), выполнять основные цели его введения в организм, не оказывая при этом отрицательного воздействия на окружающие ткани, органы и организм в целом, в настоящем исследовании необходимым представлялось изучение различных параметров биологической безопасности полимеров и наночастиц и их взаимодействия с биологическими объектами.

В частности, целью настоящего исследования являлось изучение токсических свойств амфифильных полимеров N-винилпирролидона и наночастиц на их основе, нейтральности их в отношении проявления иммунной активности, инертности по отношению к молекулярным и форменным элементам крови, ее реологическим свойствам, рН и водно-солевому балансу, исследование взаимодействия полимеров с клетками, тканями и органами.

2.4.1 Изучение взаимодействия амфифильных полимеров N-винилпирролидона с компонентами крови

Как известно, важным фактором, влияющим на распределение наноразмерных форм биологически активных веществ в организме, является их связывание белками крови. При этом вопрос о характере влияния присутствия

различных полимерных систем доставки биологически активных веществ на воздействие белков плазмы на состояние клеток крови практически не изучен и требует решения, как в теоретическом, так и в практическом аспекте [282]. Решению проблемы защиты клетки в критических условиях может значительно поспособствовать изучение белковой регуляции различных типов лизиса эритроцитов. Также актуальным представляется изучение механизмов активации системы комплемента, являющейся частью иммунной системы организма, которая осуществляет его неспецифическую защиту [283]. Следовательно, изучение влияния как полимерных наноразмерных систем на компоненты крови, так и компонентов крови на полимерные наночастицы очень важно с точки зрения понимания их поведения и взаимодействия внутри живых организмов.

В данной работе были подробно изучены процессы и эффекты взаимодействия синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона различного строения и наночастиц на их основе с компонентами крови [284].

2.4.1.1 Исследование устойчивости полимерных наночастиц в присутствии компонентов крови

Поскольку свойства полимерных систем доставки лекарственных веществ главным образом определяются их взаимодействием с различными компонентами крови, в работе была проанализирована устойчивость наноразмерных частиц амфифильных полимеров ПВП в присутствии сыворотки крови человека.

Ранее было показано (см. Раздел 2.3.3), что наночастицы из используемых амфифильных полимеров способны сольубилизовать краситель пирен. В данном случае, по изменению интенсивности флуоресценции пиреновой метки, включенной в НЧ, была произведена оценка степени дестабилизирующего влияния на полимерные наноразмерные частицы сыворотки крови человека.

На рисунке 2.40 видно, что инкубация с сывороткой крови человека наночастиц, образованных амфифильными полимерами с низкой молекулярной массой гидрофильного полимерного фрагмента, происходит уменьшение интенсивности флуоресценции инкапсулированного пирена. Это может говорить

о том, что либо наблюдается частичное тушение флуоресценции компонентами крови, либо происходит частичное разрушение наночастиц в присутствии сыворотки крови. Этот эффект более выражен для полимеров с высокой молекулярной массой, что согласуется с данными по стабильности полимерных частиц в зависимости от строения амфифильного полимера, полученными ранее.

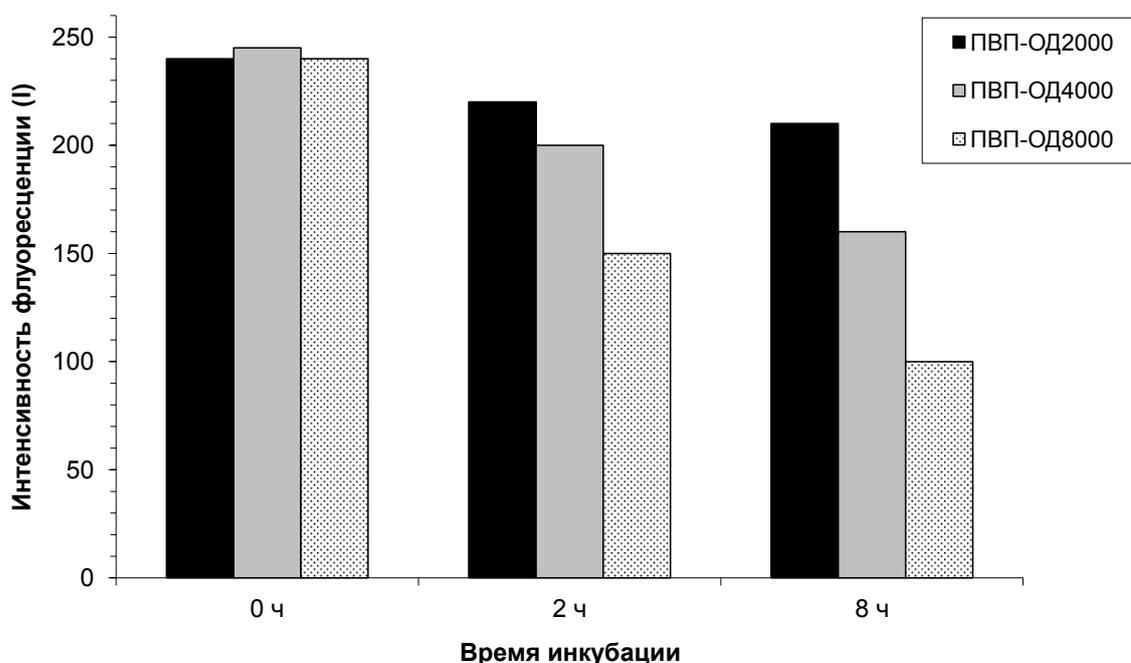


Рисунок 2.40 – Изменение интенсивности флуоресценции пирена, иммобилизованного в полимерных наночастицах, при инкубации с сывороткой крови человека

2.4.1.2 Изучение литического действия амфифильных полимеров на компоненты крови

В данной работе были проведены тесты по определению прямого литического действия амфифильных полимеров N-винилпирролидона на эритроциты барана (таблица 2.10). Из исследованных образцов только полимер с самой низкой молекулярной массой 1500 Да оказывал некоторое незначительное литическое действие на эритроциты.

С увеличением молекулярной массы гидрофильного фрагмента ПВП в амфифильных полимерах их литическое действие уменьшается за счет большей доли биосовместимого полимера в полимерных макромолекулах, и такие полимеры уже не оказывают никакого разрушающего действия на эритроциты.

Таблица 2.10 – Прямое литическое действие амфифильных полимеров N-винилпирролидона на эритроциты барана

Концентрация полимера, мМ	Лизис эритроцитов, %			
	ПВП-ОД1500	ПВП-ОД2500	ПВП-ОД6000	ПВП-ОД8000
0	1	0	0	0
0,2	2	0	0	0
0,4	4	3	1	0
0,6	2	2	2	1
0,8	7	3	1	2
1,0	5	3	2	2

2.4.1.3 Изучение активации системы комплемента в присутствии амфифильных полимеров

Следующим этапом исследования стало изучение активации системы комплемента в присутствии наночастиц на основе амфифильных производных ПВП. Система комплемента представляет собой часть иммунной системы и отвечает за неспецифическую защиту организма от клеток, инфицированных вирусами, опухолевых клеток и различных вредных микроорганизмов,

Влияние амфифильных производных ПВП на активацию системы комплемента по классическому пути (КПК) и по альтернативному пути (АПК) оценивали по величине такого параметра, как lag-t, то есть время от момента помещения эритроцитов в анализируемую сыворотку до начала лизиса этих эритроцитов. Величина lag-t характеризует скорость формирования комплекса мембранной атаки в результате каскада реакций органического протеолиза.

Вторым исследованным параметром активации системы комплемента стала скорость лизиса (V_h), которая отражает действие комплекса мембранной атаки по лизису клеток и определяется через уменьшение мутности взвеси эритроцитов.

Значения определенных параметров (таблица 2.11), показывают, что исследованные амфифильные полимеры ВП не оказывали влияния на активацию комплемента ни по классическому пути, ни по альтернативному пути.

Таблица 2.11 – Параметры активации системы комплемента по классическому (КПК) и альтернативному (АПК) пути в присутствии амфифильных полимеров N-винилпирролидона

*Концентрация полимера $C_p = 5\text{мМ}$

Тип полимера*	АПК		КПК		ГЕК
	Lag-t	V_h	Lag-t	V_h	
ПВП-ОД1500	87±9	85±12	98±5	99±5	100±5
ПВП-ОД4000	95±9	94±7	98±5	97±5	100±5
ПВП-ОД6000	91±5	102±13	98±5	90±7	100±5

И, наконец, выявленное в ходе исследования отсутствие воздействия амфифильных полимеров N-винилпирролидона на величину третьего показателя активации комплемента - гемолитической емкости комплемента (ГЕК), отражающего количество функционально активного комплемента, еще раз доказывает, что исследованные полимеры не инициируют каскады комплемента, а также не изменяют литический потенциал системы.

Полученные результаты данного исследования можно трактовать как одно из проявлений биосовместимости разрабатываемых амфифильных полимеров.

2.4.1.4 Изучение влияния амфифильных полимеров N-винилпирролидона на реологические свойства крови

Для подтверждения биосовместимости разрабатываемых полимерных наноразмерных носителей биологически активных и лекарственных веществ было изучено влияние водных растворов синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона с разным строением на комплекс реологических свойства крови человека, в том числе:

- асимптотическую вязкость крови;
- вязкость плазмы;
- количество свободного гемоглобина в плазме;
- агрегационную активность эритроцитов;

- кислотную резистентность эритроцитов;
- индекс ригидности эритроцитов (величину, обратно пропорциональную степени деформируемости эритроцитов).

На рисунке 2.41 приведены зависимости кислотной резистентности эритроцитов крови человека от количества и строения амфифильных полимеров. Для сравнения в ходе исследований использовали чистый физиологический раствор без полимера и раствор препарата «Гемодез» (Россия), являющегося широко применяемым биосовместимым кровезаменителем на основе поли-N-винилпирролидона.

Кислотная резистентность эритроцитов характеризует способность эритроцитов до определенного предела противостоять действию осмотических, механических, химических, температурных эффектов. При уменьшении резистентности эритроцитов до минимума начинается процесс гемолиза, т.е. разрушения эритроцитов.

Из рисунка 2.41 видно, что кислотная резистентность эритроцитов человека не зависит ни от концентрации амфифильных полимеров, ни от их молекулярной массы.

Результаты исследования других реологических свойств крови представлены в таблице 2.12. Как видно значения всех показателей для растворов амфифильных полимеров не отличаются от значений этих же параметров для физиологического раствора и препарата «Гемодез».

Таким образом, полученные результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что все исследованные образцы амфифильных полимеров N-винилпирролидона, в концентрациях, соответствующих дозам возможного инъекционного введения в организм человека, не влияют на реологические свойства крови.

Это, в свою очередь, является еще одним подтверждением биосовместимости и безвредности разработанных амфифильных полимеров N-винилпирролидона и систем доставки биологически-активных и лекарственных веществ в виде полимерных наночастиц на основе таких полимеров.

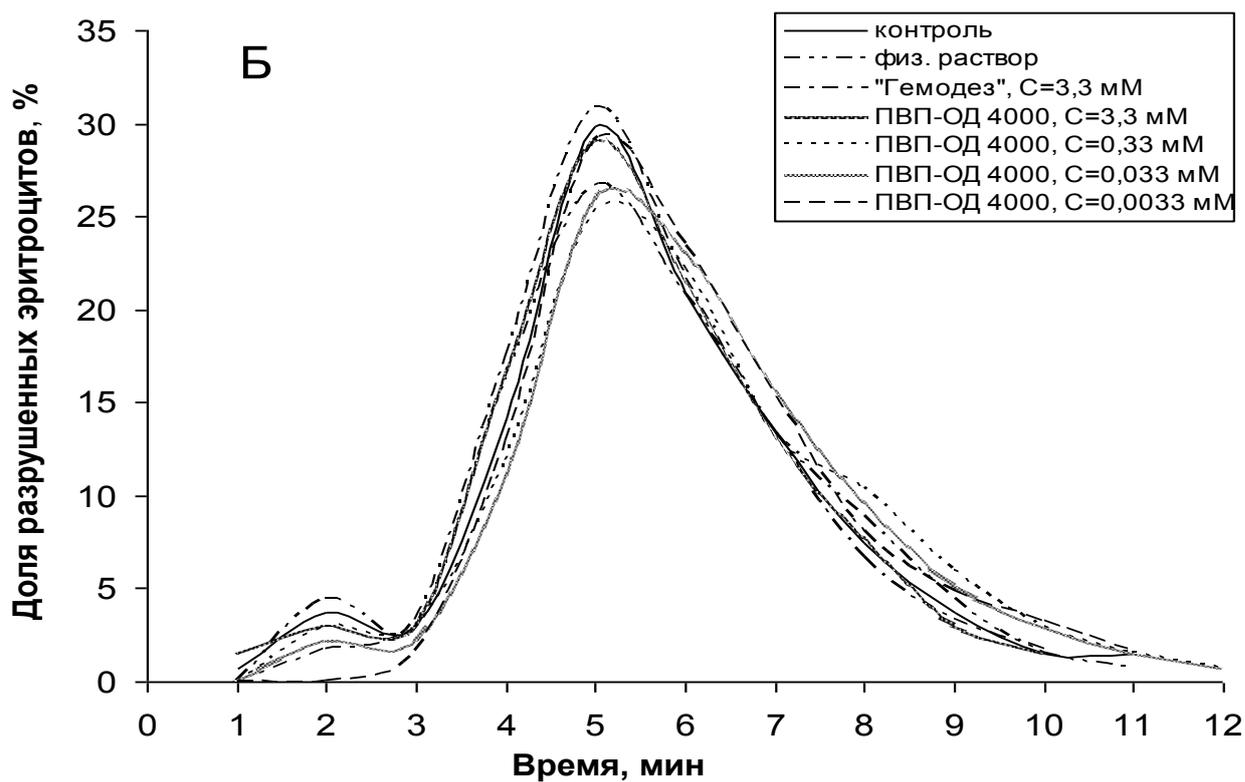
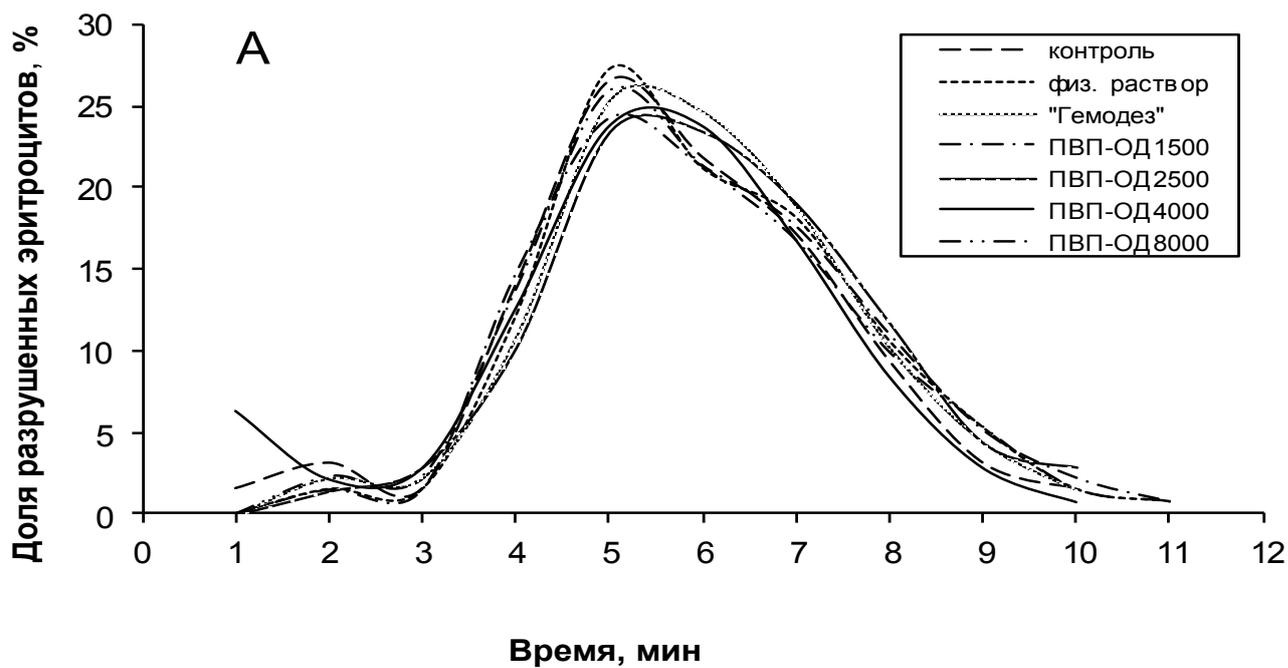


Рисунок 2.41 – Кислотная резистентность эритроцитов крови донора с амфифильными полимерами разной молекулярной массы (А) (концентрация всех образцов полимеров 3,3 мМ) и концентрации (Б)

Таблица 2.12 – Влияние амфифильных полимеров N-винилпирролидона на реологические свойства крови

№	Вариант исследования	СР	НС	СС	ВС	t _{max}	ℓ _{max}	IR	Hb _{пл}
1	Исходная кровь доноров	583,5±8,4	19,7±1,3	73,3±1,0	7,0±0,8	5,2±0,2	10,4±/0,2	70±19	28,4±10,6
2	Кровь доноров, инкуб. с физ. р-ром	600,1±11,4	17,2±2,1	73,9±1,6	8,8±1,1	5,2±0,2	10,7±0,2	64±16	35,0±1,6
3	Кровь доноров, инкуб. с препаратом «Гемодез», С=0,3мМ	586,6±8,7	18,9±1,7	73,8±1,9	7,1±1,0	5±0	10,2±0,2	78±10	32,0±7,7
4	Кровь доноров, инкуб. с ПВП-ОД 2000, С=0,3мМ	593,9±16,0	17,9±2,3	75,6±2,0	6,4±1,1	5±0	10,5±0,2	73±9	31,5±7,9
5	Кровь доноров, инкуб. с ПВП-ОД 2000, С=0,03мМ	610,1±2,7	16,2±0,7	74,8±1,4	9,0±0,8	5,1±0,1	10,3±0,3	71±16	30,2±7,2
6	Кровь доноров, инкуб. с ПВП-ОД 6500, С=0,3мМ	592,9±17,6	17,9±2,0	73,7±0,7	8,3±1,8	5,1±0,1	10,5±0,5	77±26	37,0±1,1
7	Кровь доноров, инкуб. с ПВП-ОД 6500, С=0,03мМ	594,2±3,4	17,2±0,9	75,8±0,8	6,9±1,1	5±0	10,5±0,5	70±30	30,0±7,1
8	Норма по кислотной резистентности	608±13,7	13,7±1,97	77,1±1,54	9,2±1,44	5,8±0,2	10,8±0,37	-	-

СР – суммарная резистентность; НС – низкостойкие эритроциты, %; СС – среднестойкие эритроциты, %;

ВС – высокостойкие эритроциты, %; t_{max} – время максимального гемолиза, мин;

ℓ_{max} – продолжительность гемолиза, мин; IR – индекс регидности;

Hb_{пл} – количество свободного гемоглобина в плазме, мг/100 мл

2.4.2 Исследование цитотоксичности амфифильных полимеров N-винилпирролидона

Для оценки уровня безвредности и биосовместимости разработанных полимеров в работе было проведено исследование цитотоксичности амфифильных поли-N-винилпирролидонов различного строения.

Исследование цитотоксичности полимеров проводили на устойчивых клетках карциномы молочной железы человека (MCF7/R). Тестируемые полимеры растворяли в культуральной среде (DMEM), полученные суспензии стерилизовали фильтрацией через стерильные фильтры (размер пор 0.22 мкм).

Растворы полимеров разной концентрации добавляли к клеткам. Затем клетки инкубации в течение 1 часа, отмывали, переносили в ростовую среду и культивировали 72 часа. После этого определяли долю клеток, выживших в эксперименте, с помощью МТТ теста (метод прижизненного окрашивания клеток метилтетразолиевым синим). Полученные данные свидетельствуют о том, что все синтезированные и исследованные амфифильные полимеры ВП, не оказывают заметного цитотоксического действия в исследованном диапазоне концентраций (рисунок 2.42) и обладают достаточно низким уровнем цитотоксичности.

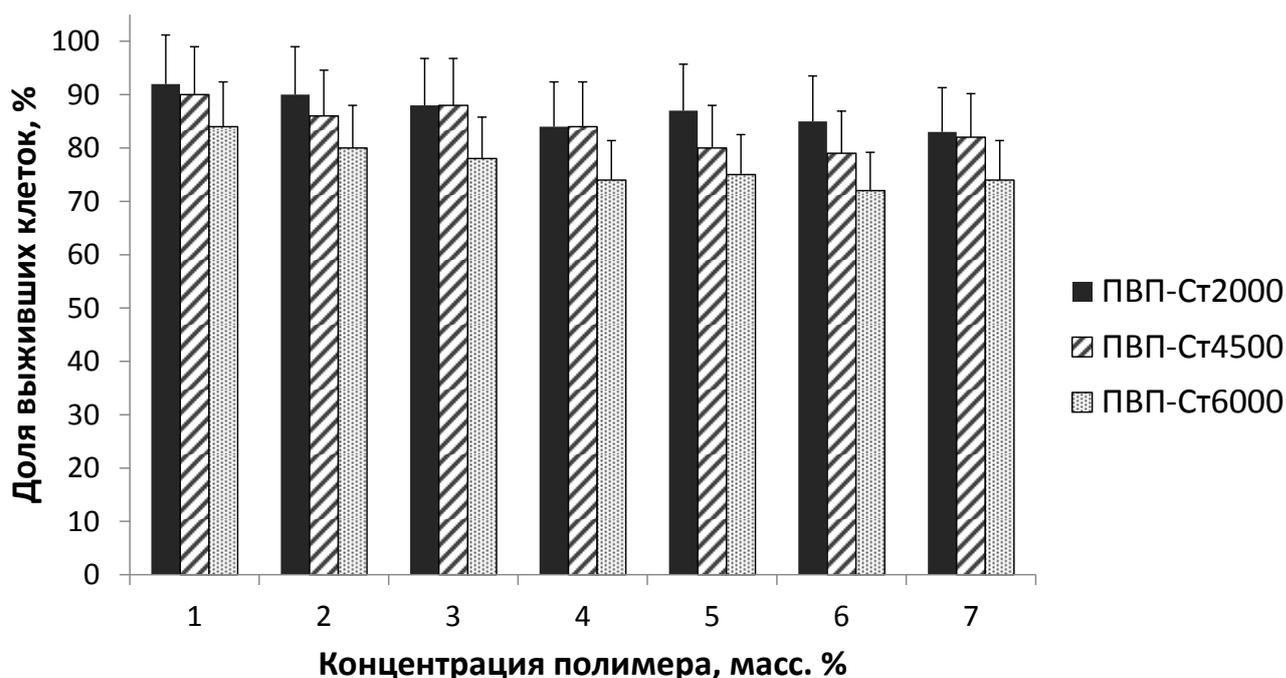


Рисунок 2.42 – Выживаемость устойчивых MCF7/R клеток в присутствии амфифильных полимеров (1- ПВП-Ст2000, 2 –ПВП-Ст4500, 3- ПВП-Ст6000)

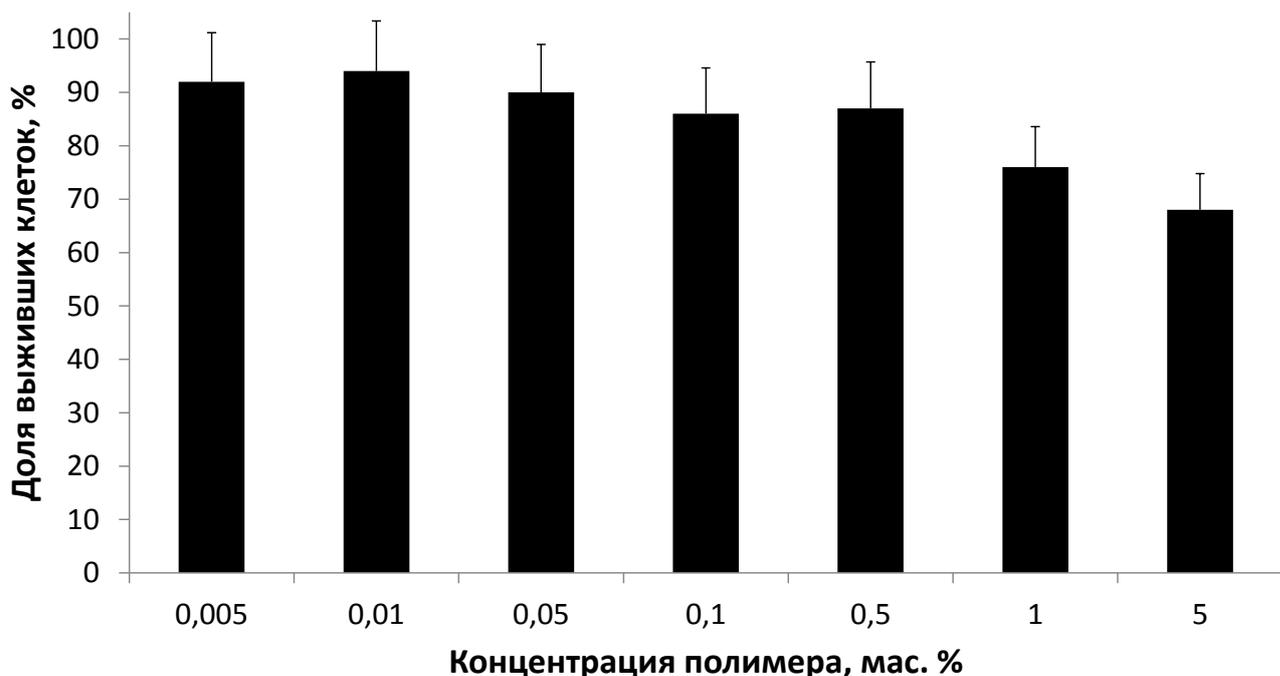


Рисунок 2.43 – Выживаемость устойчивых MCF7/R клеток в присутствии полимера с глициновыми группами (Гли-ЭПВП-Ст6000)

На рисунке 2.43 показано, что амфифильный эпоксидсодержащий поли-N-винилпирролидон с иммобилизованными остатками аминокислоты (глицина), начинает оказывать слабое токсическое действие на клетки только при концентрациях более 0,5 масс. %. Результат подтверждает, что и после введения остатка аминокислоты уровень цитотоксичности остается достаточно низким.

Низкий уровень цитотоксичности синтезированных полимеров подтвержден также при исследовании их интерферон-стимулирующей активности (таблица 2.13). Для этого изучали действие амфифильных полимеров на культуры тканей, в качестве которых использовали клетки, которые были получены из коллекции клеточных культур НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Используемые клетки помещали в ростовую среду «ИГЛА» (МЕМ), в которую затем вводились телячья эмбриональная сыворотка, глютамин и антибиотик (линкомицин). После этого клетки инфицировали 10-100 кратно разведенным вирусом (использовали вирус энцефаломieloкардита взятый из коллекции вирусов НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского). Затем инфицированные клетки инкубировались 48 часов в присутствии анализируемых амфифильных полимеров ВП с аминокислотными остатками в поддерживающей среде при 37 °С.

Результаты исследований показали, амфифильные полимеры производные N-винилпирролидона, содержащие аминокислотные остатки на всех клеточных культурах продемонстрировали или отсутствие цитотоксичности или обладали низкой цитотоксичностью. В то же самое время такие полимеры, содержащие остатки аминокислот, способны стимулировать индукцию интерферона, и обладают ярко выраженным противовирусным эффектом, который выражается в уровне выживания инфицированных клеток, соответствующем лучшим из используемых в настоящее время интерферонстимулирующих препаратов.

Таблица 2.13 – Продукция ИНФ (интерферона) в клетках Л-41 под действием различных препаратов (*in vitro*)

*О.цт. – отсутствие цитотоксичности в используемых концентрациях;

Гли-ЭПВП-Ст6000 – амфифильный полимер N-винилпирролидона, полученный одностадийным методом, с боковыми группами глицина;

Ала-ЭПВП-Ст6000 – амфифильный полимер N-винилпирролидона, полученный одностадийным методом, с боковыми группами аланина

Препарат	Токсичность (мкг/мл)	Исходная концентрация	Титр ИНФ (Ед/мл)		
			1	2	3
Гли-ЭПВП-Ст6000	О.цт.*	10 мг/мл	16	16	16
Ала-ЭПВП-Ст6000	О.цт.*	10 мг/мл	8	8	8
Ридостин	О.цт.*	1,0 мг/мл	4	4	4
Циклоферон	О.цт.*	6,0 мг/мл	4	4	4

В таблице 2.13 представлены данные по биологической активности и цитотоксичности синтезированных полимеров. В качестве препаратов сравнения в исследовании использовали известные готовые иммуностимулирующие препараты ридостин и циклоферон.

2.4.3 Исследование токсичности амфифильных полимеров N-винилпирролидона

В соответствии с общепринятым порядком проведения доклинических исследований в ходе целью работы стало определение параметров острой

токсичности амфифильных полимеров [285, 286], используемых для получения наночастиц.

Изучение острой токсичности проводили при однократном внутрибрюшинном и при однократном внутривенном введении различных доз амфифильных полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 на мышах линии BALB/C (самцы и самки, масса тела 20-21 г) и крысах Wistar (самцы и самки, масса тела 180-210 г).

Исследуемый полимер растворяли в стерильной дистиллированной воде и в различных дозах, в диапазоне 200-6000 мг/кг для внутрибрюшинного введения и 20-100 мг/кг для внутривенного, вводили мышам линии BALB/C и крысам Wistar. Длительность наблюдения за подопытными животными после введения полимеров составляла 14 дней.

Определение параметров токсичности полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 при однократном внутрибрюшинном введении мышам и крысам проводили с использованием двухэтапного метода. Вначале определяли ориентировочную среднесмертельную дозу ЛД₅₀ методом Дейхмана и Лебланка [287], с последующим установлением точных показателей токсичности ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД_{50+m} и ЛД₈₄ методом пробит-анализа по Личфилду и Уилкинсону [288].

При изучении токсичности полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/C на первом этапе получили результаты, приведенные в таблице 2.14.

На основании полученных данных показатели ориентировочных ЛД₅₀ для полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000, соответственно составили 3000, 4500 и 4000 мг/кг.

При изучении токсичности полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 на втором этапе в развернутых экспериментах на группах мышей с использованием метода пробит-анализа по Личфилду и Уилкинсону были испытаны дозы в диапазоне 3000-6500 мг/кг.

При обработке результатов проведенных исследований по оценке токсичности полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 при

однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/C были получены следующие результаты (таблица 2.15).

Таблица 2.14 – Показатели токсичности амфифильных полимеров при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/C. (1-й этап исследований)

Полимер	ПВП-ОД1500		ПВП-ОД4000		ПВП-ОД8000	
Исследуемые дозы, мг/кг	Пол животных		Пол животных		Пол животных	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
500	+	+	+	+	+	+
1000	+	+	+	+	+	+
1500	+	+	+	+	+	+
2000	+	+	+	+	+	+
2500	+	+	+	+	+	+
3000	x	+	+	+	+	+
3500	x	x	+	+	+	+
4000	x	x	+	+	x	x
4500	x	x	x	+	x	x
5000	-	-	x	x	x	x
5500	-	-	x	x	x	x
6000	-	-	x	x	-	-

Таблица 2.15 – Показатели токсичности амфифильных полимеров при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/C. (2-й этап исследований)

Полимер	Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
		ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД _{50+-m}	ЛД ₈₄
ПВП-ОД1500	Самцы	2520	2720	3120±300	3540
	Самки	3260	3430	3720±340	4010
ПВП-ОД4000	Самцы	4260	4410	4680±310	4960
	Самки	4680	4860	5140±380	5380
ПВП-ОД8000	Самцы	3720	3920	4140±320	4420
	Самки	3660	3880	4100±340	4360

По параметрам токсикометрии крысы Wistar оказались несколько менее чувствительными к токсическому действию полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 по сравнению с мышами линии BALB/C, однако статистически достоверных различий при этом не установлено (таблица 2.16).

Таблица 2.16 – Показатели токсичности амфифильных полимеров при однократном внутрибрюшинном введении крысам Wistar

Полимер	Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
		ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД _{50+-m}	ЛД ₈₄
ПВП-ОД1500	Самцы	2970	3110	3510±350	3960
	Самки	3690	3880	4150±290	4430
ПВП-ОД4000	Самцы	5180	5320	5580±340	5820
	Самки	4690	4810	5110±360	5410
ПВП-ОД8000	Самцы	4160	4320	4570±340	4810
	Самки	4020	4210	4530±380	4780

Проведенные исследования показали, что однократное внутрибрюшинное введение изучаемых полимеров мышами линии BALB/C в случае достижения токсических доз сопровождалось кратковременным возбуждением части животных, сменяющимся их угнетением, вялостью и адинамией. В последующие сутки, указанные явления интоксикации нарастали, и часть животных погибала в течение 48-72 часов после введения вещества в концентрациях, превышающих пороговые дозы.

Однократное внутрибрюшинное введение полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 крысам Wistar в разных дозах, при превышении пороговых значений вызвало картину интоксикации, существенно не отличающуюся от описанной выше картины отравления мышей линии BALB/C.

Представленные в таблицах 2.15 и 2.16 данные свидетельствуют об очень низкой токсичности полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 при

однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/С и крысам Wistar. При этом не было выявлено существенных половых и видовых различий в чувствительности данных видов лабораторных животных к токсическому действию полимеров. Оценка острой токсичности амфифильных полимеров по классификации К.К. Сидорова [289] показывает, что все исследованные образцы полимеров относятся 6 классу токсичности (относительно безвредно).

Поскольку лекарственные формы на основе полимерных наночастиц предполагают преимущественно инъекционный способ введения в организм, в данной работе было проведено исследование токсичности амфифильных полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 при однократном внутривенном введении этих полимеров в концентрациях от 20 до 100 мг/кг на крысах Wistar. Как видно из таблицы 2.17 внутривенное введение полимеров не приводило к гибели экспериментальных животных на протяжении всего периода наблюдения (14 дней).

Таблица 2.17 – Выживаемость экспериментальных животных после однократного внутривенного введения амфифильных полимеров (n=6)

Полимер	Доза, мг/кг	Количество выживших животных	Летальность, %
ПВП-ОД1500	20	6/6	0
	60	6/6	0
	100	6/6	0
ПВП-ОД4000	20	6/6	0
	60	6/6	0
	100	6/6	0
ПВП-ОД8000	20	6/6	0
	60	6/6	0
	100	6/6	0

Оценка состояния внутренних органов при вскрытии животных, умерщвленных в конце эксперимента, показала, что макроскопических изменений внутренних органов животных за время проведения опытов не

произошло. При этом средняя масса тела и органов животных, повергнутых введению полимерных препаратов, статистически не отличалась от веса животных в контроле.

Однако, в течение некоторого времени после внутривенного введения амфифильных полимеров в максимальных дозах (100 мг/кг), наблюдались определённые изменения в вегетативных и поведенческие реакции подопытных животных. В это время отмечалось увеличение частоты сердечных сокращений и дыхания, а также повышение двигательной активности. Однако эти явления носили временный характер, и проявлялись только после введения полимеров в дозах, значительно (более чем на порядок) превышающих расчетный уровень доз полимера, планируемый для введения в составе готовых лекарственных препаратов.

Через некоторый период времени (несколько часов) никаких отклонений в состоянии экспериментальных животных больше не наблюдали. Причина появления отклонений поведенческих и вегетативных реакций, скорее всего, может быть связана с временным нарушением гемодинамики в кровеносном русле животных после введения высоких доз амфифильных полимеров. Аналогичные нарушения наблюдаются также и при введении различных эмульсий и липосомальных систем [290, 291].

Из данных наблюдений можно сделать предположение о том, что при инъекционном (внутривенном) способе введения полимерных наноразмерных форм лекарственных веществ возможны не которые ограничения по их дозировке в силу особенностей строения амфифильных полимеров и коллоидных систем на их основе.

Проведенные исследования острой токсичности амфифильных полимеров позволили провести оценку их токсических доз и определить диапазон возможных концентраций, при которых наноразмерные носители на основе этих полимеров будут обладать высокой биосовместимостью в организме.

2.5 Разработка и исследование наноразмерных полимерных форм биологически активных и лекарственных веществ

Одними из наиболее перспективных наноразмерных систем доставки биологически активных и лекарственных веществ являются полимерные наночастицы и липосомам. Эти носители представляют собой наноразмерные сферические частицы, образованные амфифильными (дифильными) молекулами. Для создания полимерных мицелл используют амфифильные полимеры, содержащие гидрофильные и гидрофобные фрагменты, а для создания липосом чаще всего используют низкомолекулярные природные жиры – липиды, также имеющие амфифильное строение.

Выбор подходящего носителя зависит от многих факторов. Одним из важнейших из них является природа и строение включаемого активного агента.

Например, наночастицы мицеллярного типа, рассматриваемые в данной работе, и получаемые на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона, наиболее подходят для включения в свое гидрофобное ядро плохо растворимых лекарственных веществ.

Липосомы же, за счет наличия липосомальной мембраны, состоящей из двойного слоя липидов, могут содержать в своем составе и водорастворимые (в водном ядре) и гидрофобные (в липидной мембране) жирорастворимые биологически активные вещества.

С другой стороны липосомы обладают целым рядом существенных недостатков, например высокой стоимостью и низкой стабильностью. Этих недостатков лишены полимерные наноразмерные частицы.

Поэтому, целью данной работы являлась разработка на основе синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона обоих типов носителей БАВ – модифицированных полимерами липосом с повышенной стабильностью и полимерных наночастиц. При этом, актуальным представлялось получение конкретных лекарственных препаратов на основе полимерных наноносителей и различных модельных биологически активных и лекарственных веществ.

2.5.1 Разработка и исследование модифицированных амфифильными полимерами N-винилпирролидона липосомальных форм биологически активных веществ

Как было установлено ранее в данной работе, синтезированные амфифильные полимеры N-винилпирролидона состоят из полярных гидрофильных полимерных цепей, определяющих их растворимость в воде и гидрофобных алифатических групп, отвечающих за образование внутреннего ядра полимерных наночастиц, образующихся в водных растворах амфифильных полимеров при концентрациях выше определенной критической концентрации.

Кроме того, такие гидрофобные алифатические группы амфифильных полимеров в их растворах и коллоидных системах доступны для взаимодействия с гидрофобными фрагментами других молекул, находящихся в системе.

Доступность гидрофобных групп амфифильных полимеров для других молекул с гидрофобными фрагментами была подтверждена методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), путем исследования ЭПР-спектров растворов полимеров N-винилпирролидона содержащих и не содержащих концевые алифатические гидрофобные группы в присутствии гидрофобного спинового зонда (свободный нитроксильный радикал N-октил-2-гексил-2-(10-метоксикарбонил)децил-4,4'-диметилоксазолина).

Так, в случае системы, содержащей поли-N-винилпирролидон с молекулярной массой 4000 Да без концевой гидрофобной группы (рисунок 2.44А), ЭПР-спектр зонда показывает сильное межмолекулярное взаимодействие между молекулами самого зонда, который находится в системе в виде плохо распределяемой фазы.

В тоже время, в случае наличия в системе амфифильного полимера поли-N-винилпирролидона с молекулярной массой 4000 Да и одной концевой октадецильной гидрофобной группой (рисунок 2.44Б), наблюдается заметное усложнение ЭПР-спектра, отражающее высокую подвижность свободнорадикального зонда, ассоциированного с концевой гидрофобной алифатической группой полимера.

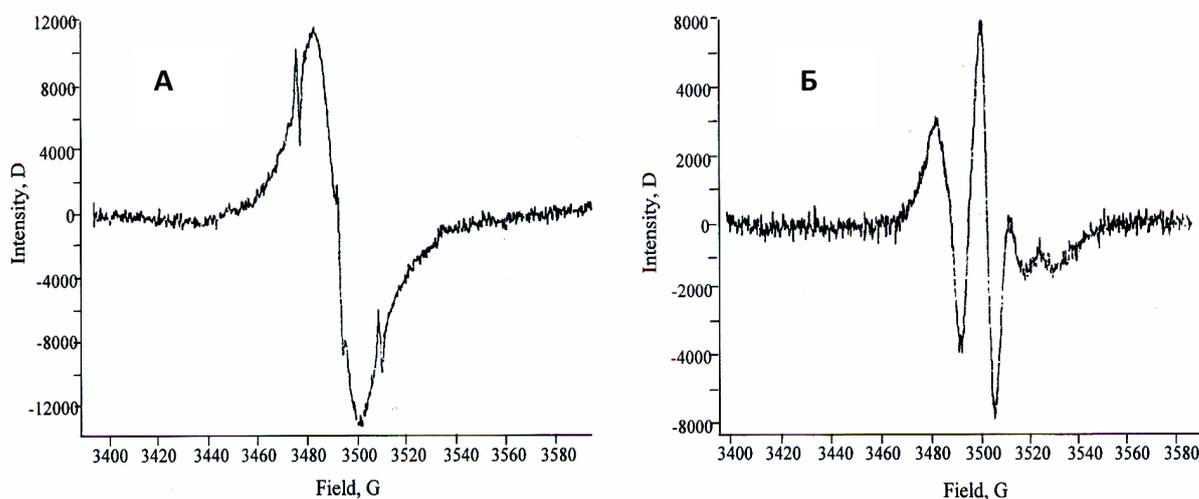
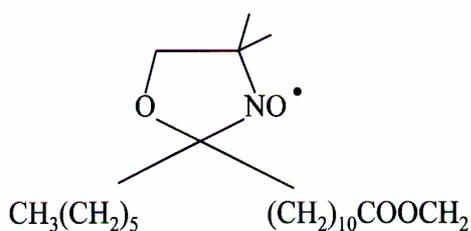


Рисунок 2.44 – ЭПР-спектр спинового зонда в присутствии поли-N-винилпирролидона (ПВП4000) (А) и его амфифильного производного (ПВП-ОД4000) (Б)

Полученные результаты исследования показывают способность амфифильных полимеров N-винилпирролидона взаимодействовать в водных средах с молекулами, содержащими гидрофобные фрагменты. Это также подтверждает возможность совместного использования таких амфифильных полимеров вместе с липидными компонентами липосомальных оболочек, имеющими гидрофобные части, для получения новых модифицированных липосом с существенно расширенными возможностями применения.

Кроме того, с целью подтверждения способности разработанных полимеров встраиваться в липидные мембраны липосом, были проанализированы изотермы сжатия однослойных лэнгмюровских пленок, которые получили нанесением на поверхность воды смесей липидов с полимерами в виде спиртовых растворов. Как хорошо известно, в этом случае факт встраивания амфифильных полимеров, представляющих собой поверхностно-активные вещества (ПАВ), в пленки можно

легко подтвердить сдвигом изотермы сжатия в область меньших значений степени сжатия липидного слоя.

Представленные на рисунок 2.45 данные исследования монослоев, полученных из нейтрального липида (фосфатидилхолина) до и после введения в их состав амфифильного полимера N-винилпирролидона. В приведенном примере в качестве объекта эксперимента был выбран амфифильный полимер с концевой стеариольной группой и молекулярной массой полимерного фрагмента 4500 Да, полученный одностадийным методом полимеризации N-винилпирролидона в присутствии стеароилхлорида.

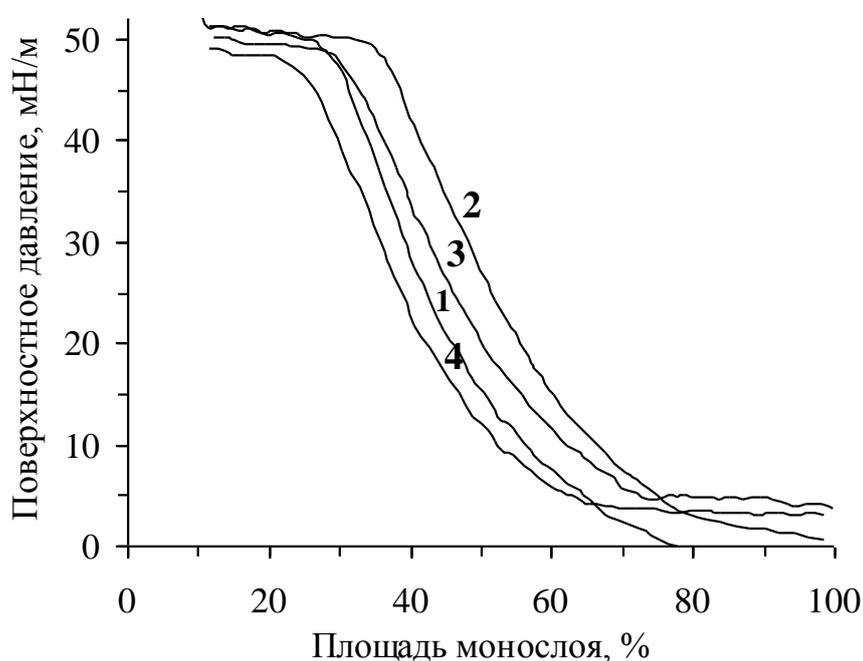


Рисунок 2.45 – Изотермы сжатия смесей фосфатидилхолин – амфифильный полимер ПВП-Ст4500. Содержание полимера в смеси: 1 - 0 масс.%, 2 - 10 масс.%, 3 - 20 масс.%, 4 – 30 масс.%, молекулярная масса полимера 4500 Да

Полученные данные свидетельствуют о том, что амфифильный полимер легко встраивается в липидный монослой. Максимальный сдвиг изотермы в сторону меньшей степени сжатия слоя (на рисунке 2.45 – вправо) наблюдается при этом для смеси с 10% массовым содержанием амфифильного полимера.

Успешное встраивание в липидный монослой фосфатидилхолина было подтверждено и для полимеров, полученных в две стадии (с разными молекулярными массами полимерной части и строением гидрофобного концевой

фрагмента), и для полимеров, полученных одностадийным методом (с разной молекулярной массой и с одним концевым стеариловым гидрофобным фрагментом), на что указывали изотермы сжатия.

2.5.1.1 Получение модифицированных амфифильными полимерами N-винилпирролидона липосом

Модификацию липосомальных мембран амфифильными полимерами N-винилпирролидона в данной работе проводили одновременно с формированием самих липосом. Для этого в исходную смесь липидов, формирующих липосомы, (фосфатидилхолин / кардиолипин (мольное соотношение 7:3)) добавляли раствор амфифильного полимера с разной концентрацией. В качестве модифицирующих липосомальную мембрану полимеров были выбраны амфифильные полимеры с концевой октадецильной группой и разной молекулярной массой полимерного фрагмента, так как они проявляли наибольшую склонность к агрегации и гидрофобным взаимодействиям (таблица 2.18). В качестве контроля, для сравнения, были получены немодифицированные нативные липосомы (Л) на основе тех же липосом-образующих липидов (фосфатидилхолин / кардиолипин).

Средний размер образовавшихся модифицированных липосом определяли методом динамического светорассеяния (таблица 2.18). Как видно, ни молекулярная масса, ни количество вводимого в липосомальную оболочку амфифильного полимера существенно не влияет на размер образующихся липосом, в виду небольшой его концентрации, по сравнению с липидами.

При этом нативные липосомы (Л), полученные без добавления модифицирующего амфифильного полимера, увеличивали свой размер при разбавлении системы (рисунок 2.46), что указывает на недостаточную агрегативную устойчивость липосомальной системы. Полимер-модифицированные липосомы, полученные добавлением амфифильного полимера к смеси липидов, наоборот сохраняли свой размер даже при значительном разбавлении. Это является свидетельством их более высокой устойчивости и стабильности по сравнению с нативными липосомами.

Таблица 2.18 – Липосомы, модифицированные амфифильными полимерами

*Средняя погрешность определения диаметра липосом ± 9 нм

Код модифицирующего полимера	Количество модифицирующего полимера, мол. %	Код липосомы	Средний диаметр липосом, нм*
-	0	Л	230
ПВП-ОД2000	3,0	Л-ПВП-ОД2000(3)	230
	6,0	Л-ПВП-ОД2000(6)	220
	10,0	Л-ПВП-ОД2000(10)	200
	15,0	Л-ПВП-ОД2000(15)	210
ПВП-ОД4000	3,0	Л-ПВП-ОД4000(3)	210
	6,0	Л-ПВП-ОД4000(6)	220
	10,0	Л-ПВП-ОД4000(10)	200
	15,0	Л-ПВП-ОД4000(15)	200
ПВП-ОД8000	3,0	Л-ПВП-ОД6500(3)	220
	6,0	Л-ПВП-ОД6500(6)	200
	10,0	Л-ПВП-ОД6500(10)	200
	15,0	Л-ПВП-ОД6500(15)	210

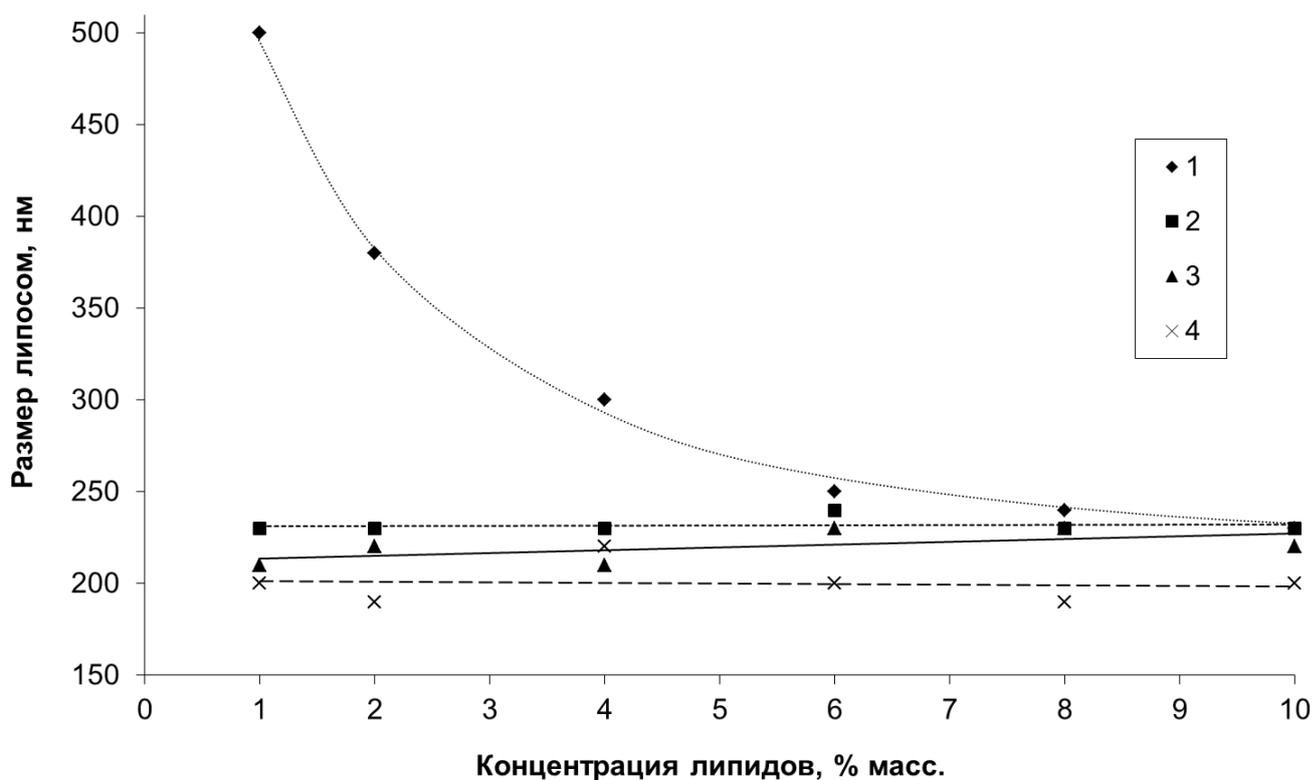


Рисунок 2.46 – Зависимость размеров липосом от концентрации липидов в растворе

1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД2000(3); 3 – Л-ПВП-ОД4000(6); 4 – Л-ПВП-ОД6500(10)

2.5.1.2 Исследование влияния амфифильных полимеров на свойства модифицированных липосом

Для исследования оказываемого амфифильными полимерами при модификации ими липосомальных мембран защитного эффекта в данной работе был изучен процесс взаимодействия липосом с поликатионами.

Поликатионы позволяют изменить заряд липосом и придать им новые аффинные свойства, способствующие целевому транспорту некоторых типов биологически активных веществ в организме. Кроме того, поликатионы в последнее время широко исследуются в качестве основы лекарственных препаратов с антивирусной и антимикробной активностью. Поэтому изучение взаимодействия поликатионов с липосомами позволяет также смоделировать процессы взаимодействия поликатионов с липидными слоями живых клеток.

В тоже время известно, что такое взаимодействие липосом с поликатионами затруднено активным действием поликатиона на липосомальную дисперсию, проявляющемся в активной агрегации липосом.

Эффективность защиты липосом путем введения в их липидные мембраны амфифильных полимеров была подтверждена в опыте по взаимодействию отрицательно заряженных липосом с поликатионами, которые обычно вызывают агрегацию таких липосом при связывании остатков фосфорной кислоты липидов с основными группами поликатионов.

Для этого с помощью метода флуориметрии исследовали систему, содержащую поликатион (кватернизованный поли-4-винилпирридин) и меченные флуоресцентной меткой отрицательно заряженные липосомы на основе смеси липидов фосфатидилхолина и кардиолипина (мольное соотношение соответственно 7:3). Данный метод основан на способности поликатионов к тушению флуоресценции при взаимодействии с флуоресцентной меткой.

Для изучения защитного эффекта амфифильных полимеров были использованы модифицированные амфифильным полимером липосомы, полученные добавлением к липосом-формирующим липидам различных

количеств амфифильного поли-N-винилпирролидона на стадии формирования липосом.

В качестве флуоресцентной метки для изучения адсорбции поликатиона на поверхности липосом, в состав липосом при формировании вводили продукт реакции флуоресцеинизотиоцианата с дипальмитоилфосфатидилэтаноламином.

Адсорбция поликатиона на поверхности липосом приводила к тушению флуоресценции метки (рисунок 2.47). Такая сорбция поликатиона может быть объяснена ионным взаимодействием между положительно заряженными четвертичными аммонийными солевыми группами поликатиона и отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты в липидном слое.

Используя этот метод, можно было оценить, насколько модификация поверхности липосомы амфифильным полимером N-винилпирролидона, способным за счет своей гидрофобной группы встраиваться в липосомальный бислой, влияет на связывание поликатиона с липосомами.

Как видно из рисунка 2.47А, при введении в мембрану липосом амфифильного поли-N-винилпирролидона, эффективность экранирования повышается с увеличением количества введенного полимера. Этот эффект может быть объяснен тем, что при высокой концентрации амфифильного полимера, его гидрофильные водорастворимые фрагменты, располагающиеся на поверхности липосом, создают более плотное облако, защищающее всю поверхность липосомы от контакта с поликатионом.

Исследование влияния молекулярной массы введенного амфифильного полимера N-винилпирролидона на процесс взаимодействия модифицированных липосом с поликатионом (рисунок 2.47Б) показало, что особенно заметен эффект экранирования для амфифильного ПВП с молекулярной массой 2000÷4000 Да. Возможно, уменьшением молекулярной массы гидрофильного полимерного фрагмента до этих величин обеспечивает оптимальное встраивание гидрофобной концевой группы амфифильного полимера в липидный бислой. При дальнейшем снижении молекулярной массы начинает сказываться снижение общей гидрофильности системы, что приводит даже к потере растворимости в воде.

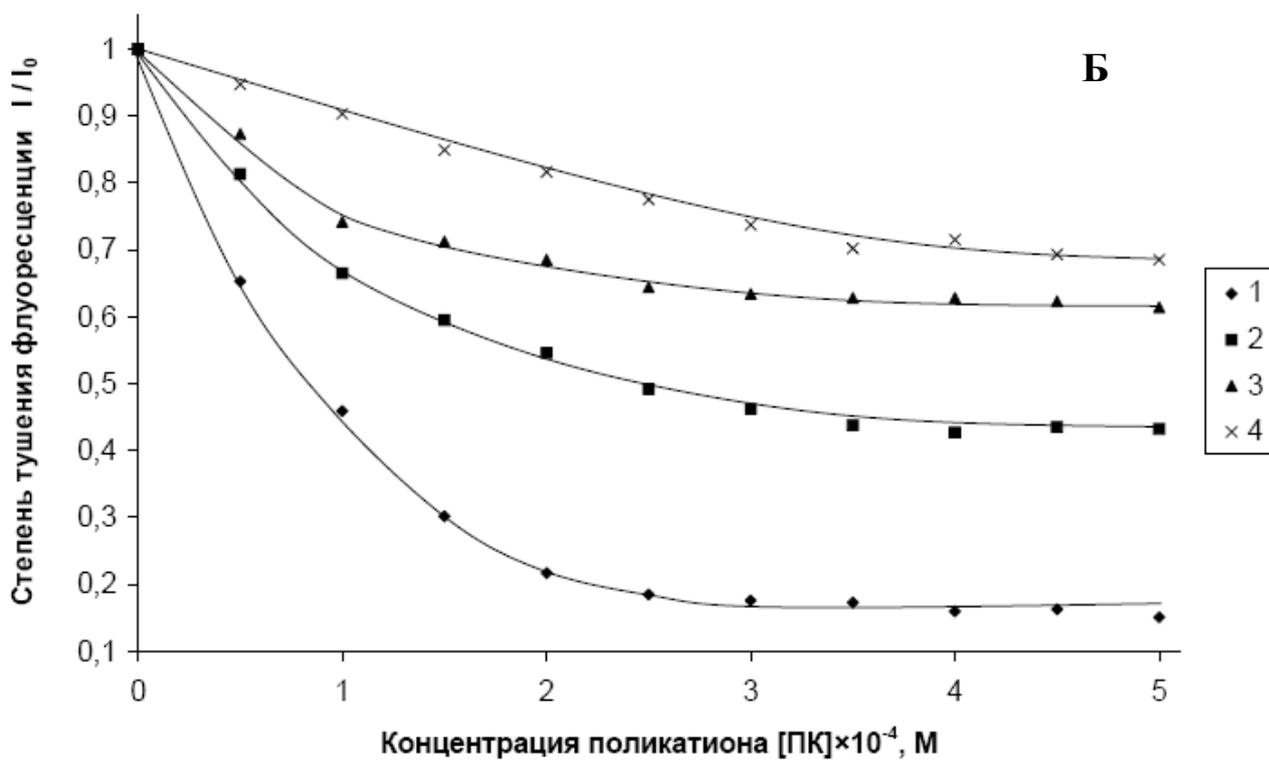
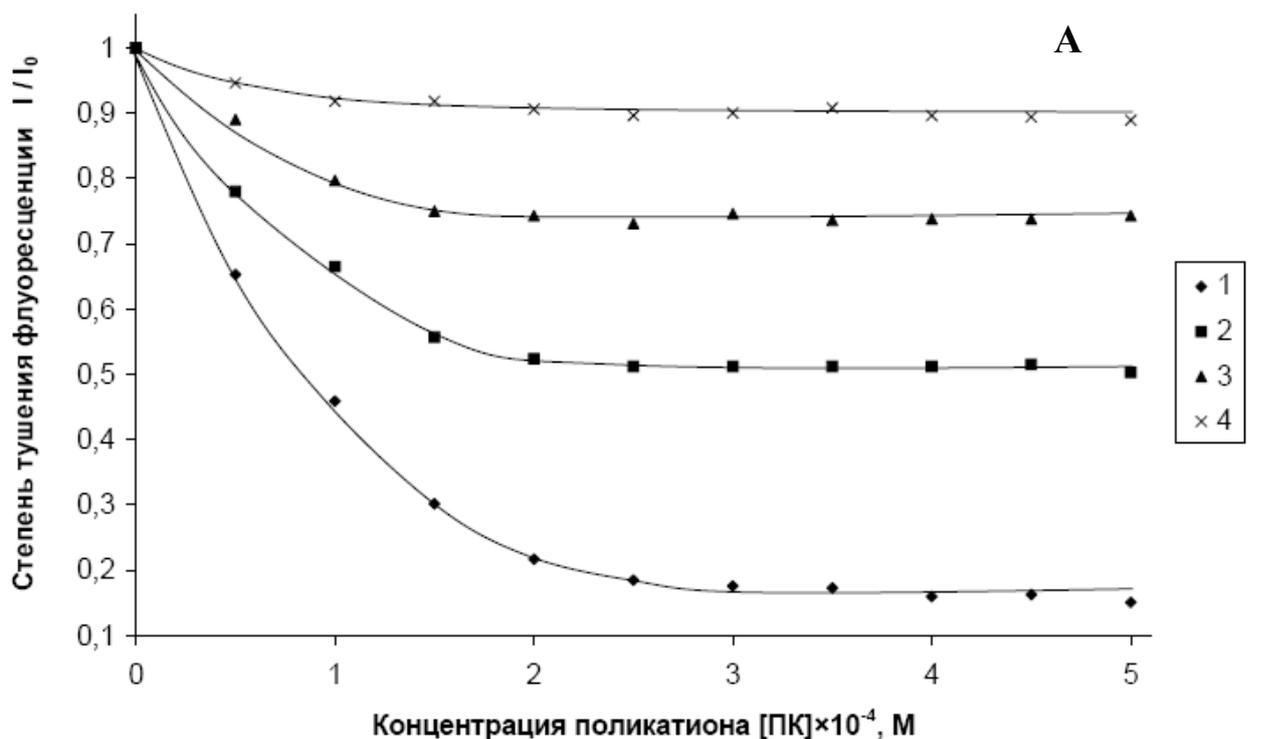


Рисунок 2.47 – Изменение флуоресценции при взаимодействии липосом, меченных флуоресцентной меткой, с поликатионом
 (А): 1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД4000(3); 3 – Л-ПВП-ОД4000(10);
 4 – Л-ПВП-ОД4000(15)
 (Б): 1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД6500(6); 3 – Л-ПВП-ОД4000(6);
 4 – Л-ПВП-ОД2000(6)

Измерение размеров липосом методом динамического светорассеяния (рисунок 2.48) при добавлении к ним поликатиона также подтвердило тот факт, что в отсутствие амфифильного поли-N-винилпирролидона, добавление поликатиона к суспензии отрицательно заряженных липосом ведет к их активной агрегации. В этом случае поликатион является сшивающим агентом.

Введение всего 1,5 мол. % амфифильного полимера резко ингибирует взаимодействие поликатиона с отрицательно заряженными липосомами. Как результат, уменьшаются размеры образующихся липосомальных ассоциатов. Увеличение количества модифицирующего полимера до 15 мол. % полностью предотвращает агрегацию липосом в присутствии поликатиона, демонстрируя тем самым эффективную защиту липосом.

Данные, полученные методом динамического светорассеяния, по влиянию концентрации (рисунок 2.48А) и молекулярной массы (рисунок 2.48Б) амфифильных полимеров на их способность экранировать поверхность липосом от внешнего воздействия поликатиона полностью совпадают с данными, полученными методом флуориметрии.

Изучение влияния на размер липосом при взаимодействии с поликатионом амфифильных полимеров с различной молекулярной массой, показало, что с увеличением количества амфифильных полимеров в липидном бислое до 45÷55 мол.% эффективность их влияния постоянно повышается. При дальнейшем увеличении количества введенного полимера наблюдается активная агрегация липосом с образованием частиц размером 500÷800 нм.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили возможность эффективной модификации амфифильными поли-N-винилпирролидонами поверхности липосом. При этом при достаточной концентрации амфифильного полимера в составе липосомальной мембраны, гидрофильные фрагменты полимеров образуют защитный слой на поверхности липосомы, защищающий ее от воздействия различных дестабилизирующих факторов.

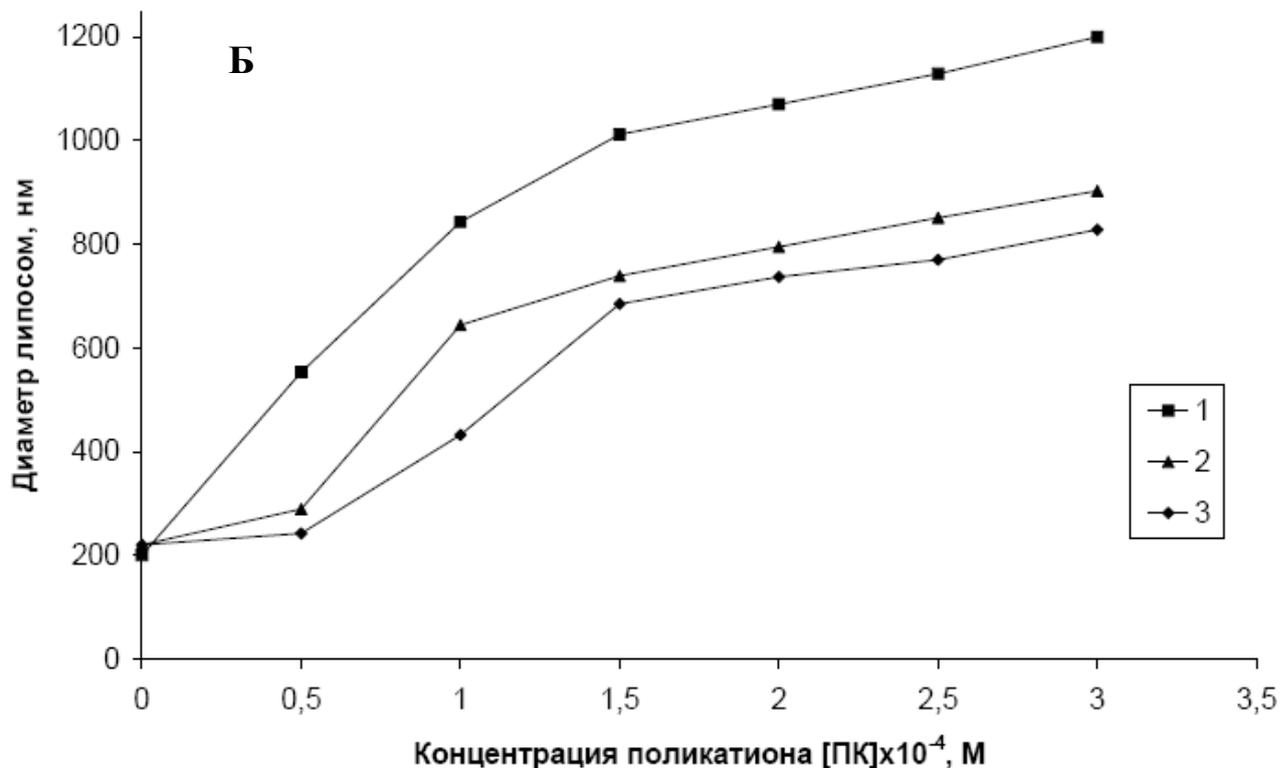
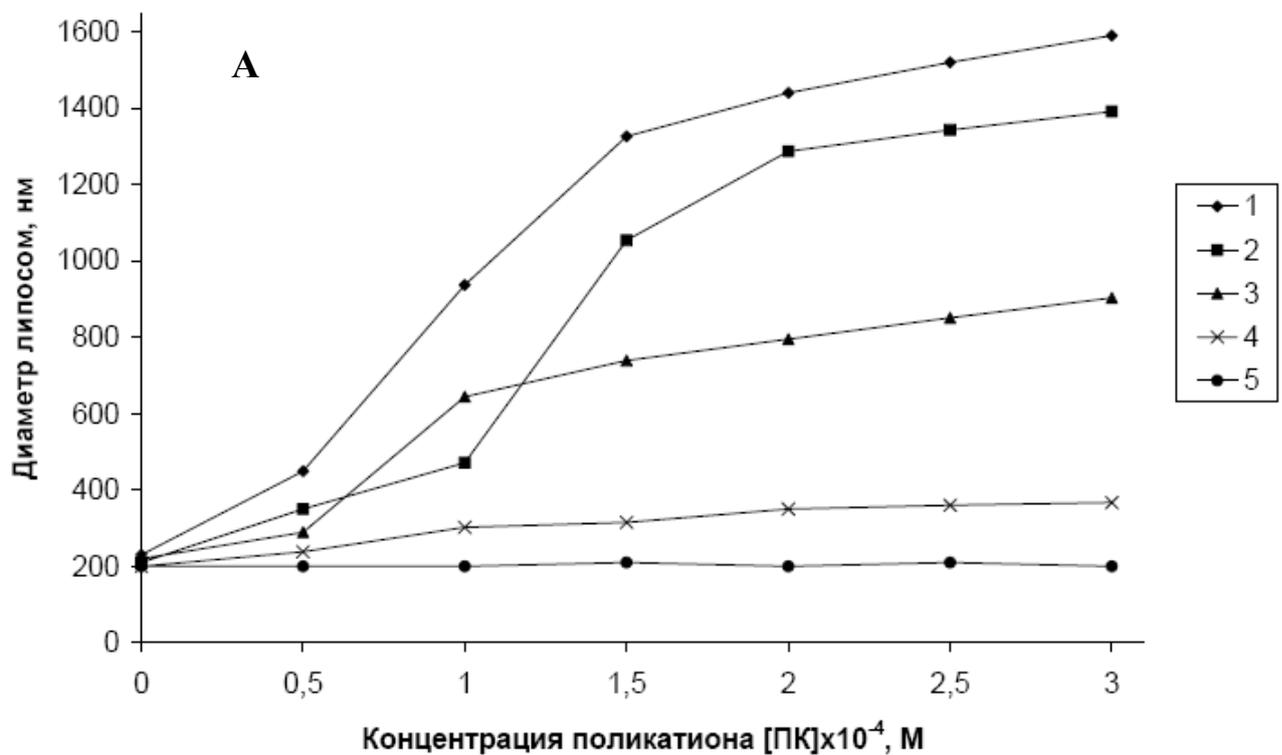


Рисунок 2.48 – Изменение размеров липосом под действием поликатиона различной концентрации

(А): 1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД4000(3); 3 – Л-ПВП-ОД4000(6);

4 – Л-ПВП-ОД4000(10); 5 – Л-ПВП-ОД4000(15)

(Б): 1 – Л-ПВП-ОД8000(6); 2 – Л-ПВП-ОД4000(6); 3 – Л-ПВП-ОД2000(6)

2.5.1.3 Изучение стабильности липосом, модифицированных амфифильными полимерами

В работе изучена стабильность липосом, модифицированных амфифильными полимерами, при хранении и под воздействием внешних разрушающих факторов.

Как видно из таблицы 2.19, в условиях длительного хранения система, состоящая из нативных, немодифицированных полимерами липосом (Л), не устойчива и склонна к агрегированию. Введение в липосомальную оболочку амфифильных полимеров N-винилпирролидона с концевой октадецильной группой ($M_n = 4000$) в количестве 3 и 10 % мол. (Л-ПВП-ОД4000(3) и Л-ПВП-ОД4000(10)) оказывает стабилизирующее действие на частицы: размер липосом остается практически неизменным при хранении в течение длительного срока (таблица 2.19).

Таблица 2.19 – Стабильность липосом при длительном хранении
*Средняя погрешность определения диаметра липосом ± 8 нм

Тип липосом	Размер липосом, нм		
	1 день	50 дней	70 дней
Л	182	272	340
Л-ПВП-ОД4000(3)	183	186	190
Л-ПВП-ОД4000(10)	183	182	185

Кроме того, в данной работе было исследовано влияние на стабильность получаемых модифицированных липосом однократного и многократного цикла замораживание / размораживание липосомальной суспензии. Как можно видеть из таблицы 2.20, процесс замораживания / размораживания приводит к некоторому увеличению размера липосом, причем степень увеличения размера частиц во всех случаях зависит от режимов оттаивания.

Таблица 2.20 – Стабильность липосом под действием низких температур
 *Средняя погрешность определения диаметра липосом ± 11 нм

Замораживание / размораживание	Средний диаметр липосом, нм		
	Л	Л-ПВП-ОД4000(3)	Л-ПВП-ОД4000(10)
5 дней -70°C / + 37 °C	180	180	180
5 дней -70°C / +20 °C	240	190	190
5 дней -70°C / +4 °C	380	240	200

Устойчивость модифицированных амфифильными полимерами липосом к воздействию дестабилизирующих агентов, по сравнению с нативными немодифицированными липосомами, была изучена на примере неионогенного детергента Тритона X-100 (рисунок 2.49А) и этанола (рисунок 2.49Б). Степень разрушающего воздействия дестабилизирующих агентов определяли по величине относительного светорассеяния растворов, измеренной при длине волны 400 нм на лазерном фотометре рассеянного света “ALV-5” (Германия).

Как было установлено в ходе исследования, добавление даже небольших количеств детергента Тритона к суспензии нативных немодифицированных липосом приводило к резкому уменьшению величины относительного светорассеяния системы (Т, %). В тоже время, изменение светорассеяния для суспензий липосом, модифицированных амфифильными полимерами N-винилпирролидона варьировалось в пределах всего $2 \div 15$ % (рисунок 2.49А).

В случае использования в качестве дестабилизирующего агент этанола, его добавление приводило к практически полному разрушению нативных липосом, тогда как для липосом, стабилизированных амфифильными полимерами, величина остаточного светорассеяния составляла примерно 80 % (рисунок 2.49Б).

Таким образом, можно говорить об эффективной защите липосом от дестабилизирующих и разрушающих воздействий путем модификации их оболочек амфифильными полимерами.

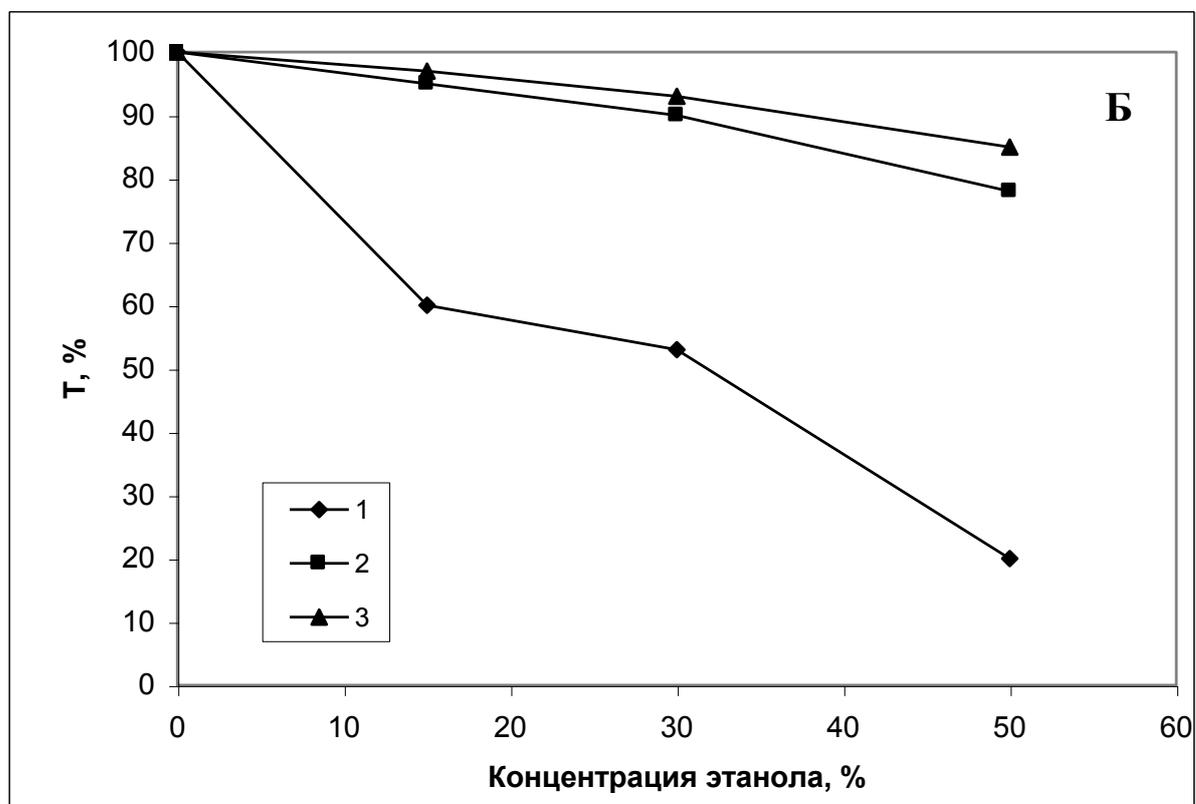
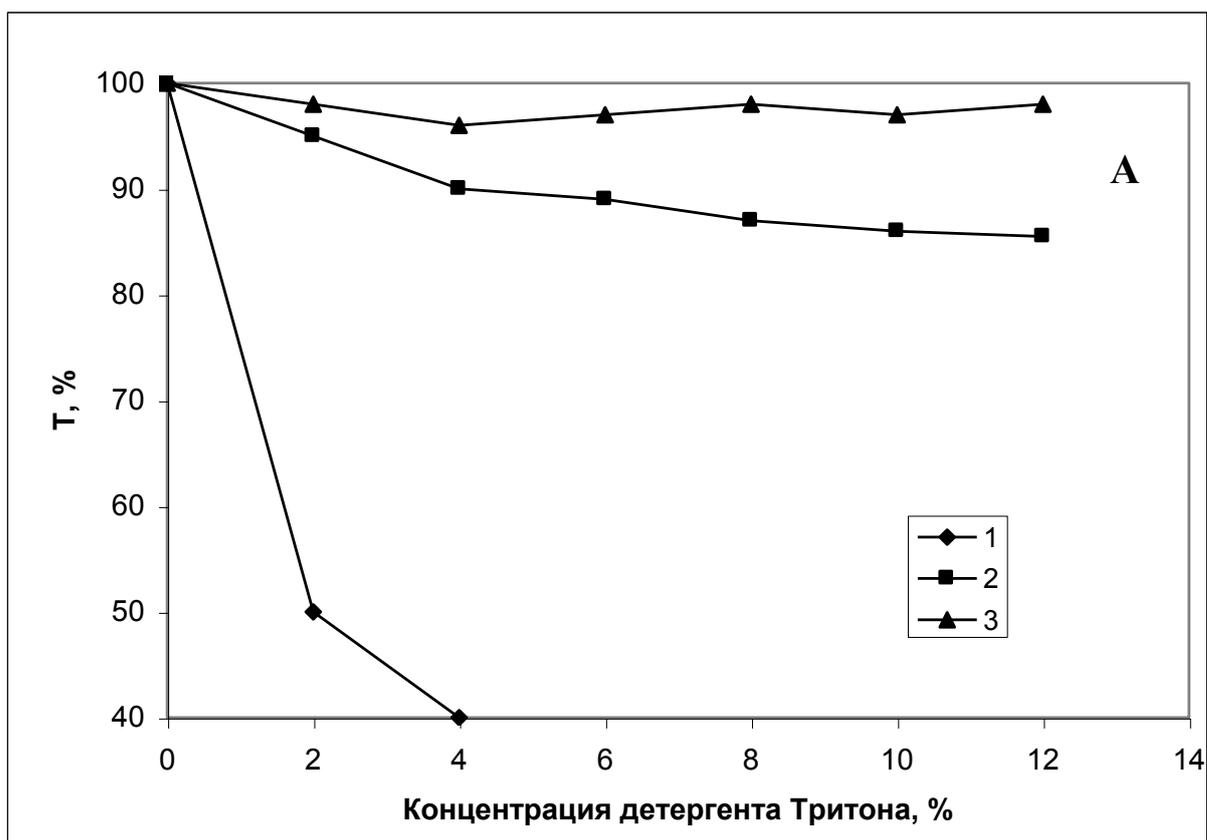


Рисунок 2.49 – Устойчивость липосом по отношению к действию детергента Тритона (А) и этанола (Б)
 1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД4000(3); 3 – Л-ПВП-ОД4000(10)

2.5.1.4 Исследование поведения липосом, модифицированных амфифильными полимерами, в условиях *in vitro*

Поскольку одной из основных задач модификации липосом амфифильными полимерами является их защита от разрушения при циркуляции в кровеносном русле, в данной работе было проведено исследование стабильности липосом в сыворотке крови мышей в искусственных условиях.

Для этого были получены липосомы (средний размер около 200 нм) из смеси фосфатидилхолин / кардиолипин (7:3 мол.) с добавлением 3 или 10 мол. % амфифильного поли-N-винилпирролидона с концевой октадецильной группой и молекулярной массой 2000 и 8000 (ПВП-ОД2000 и ПВП-ОД8000). Кроме того, полученные липосомы содержали включенный карбоксифлуоресцен (45мМ).

Разрушение липосом в присутствии сыворотки крови изучалось по увеличению флуоресценции системы, вызванному выделением карбоксифлуоресцена из дестабилизированных и разрушенных липосом.

В результате проведенных исследований установлено, что эффективность защиты содержащих карбоксифлуоресцен липосом амфифильным полимером зависит от содержания этого полимера в липосомальной мембране. Чем выше содержание амфифильного поли-N-винилпирролидона, тем лучшие защитные свойства он демонстрирует (рисунок 2.50А).

Некоторый эффект увеличения защитных свойств амфифильного полимера может быть достигнут при переходе от самых низкомолекулярных полимеров ($M_n=1000\div 2000$ Да) к полимерам с молекулярной массой водорастворимого фрагмента $2000\div 6000$ Да (рисунок 2.50Б).

При дальнейшем увеличении молекулярной массы амфифильных полимеров ($M_n=6000\div 15000$ Да) их защитные свойства ухудшаются. По-видимому, это связано с недостаточной эффективностью модификации липосомальных мембран такими полимерами, которая была обнаружена при изучении процессов модификации липосом амфифильными полимерами различного строения.

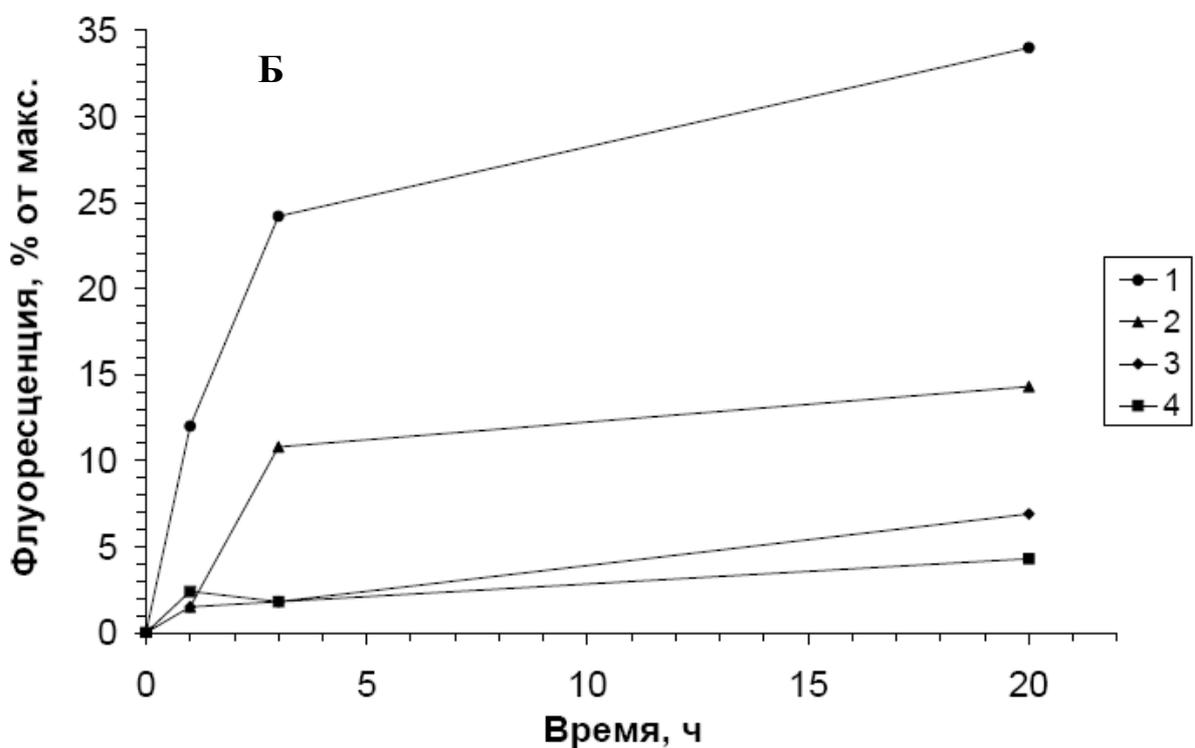
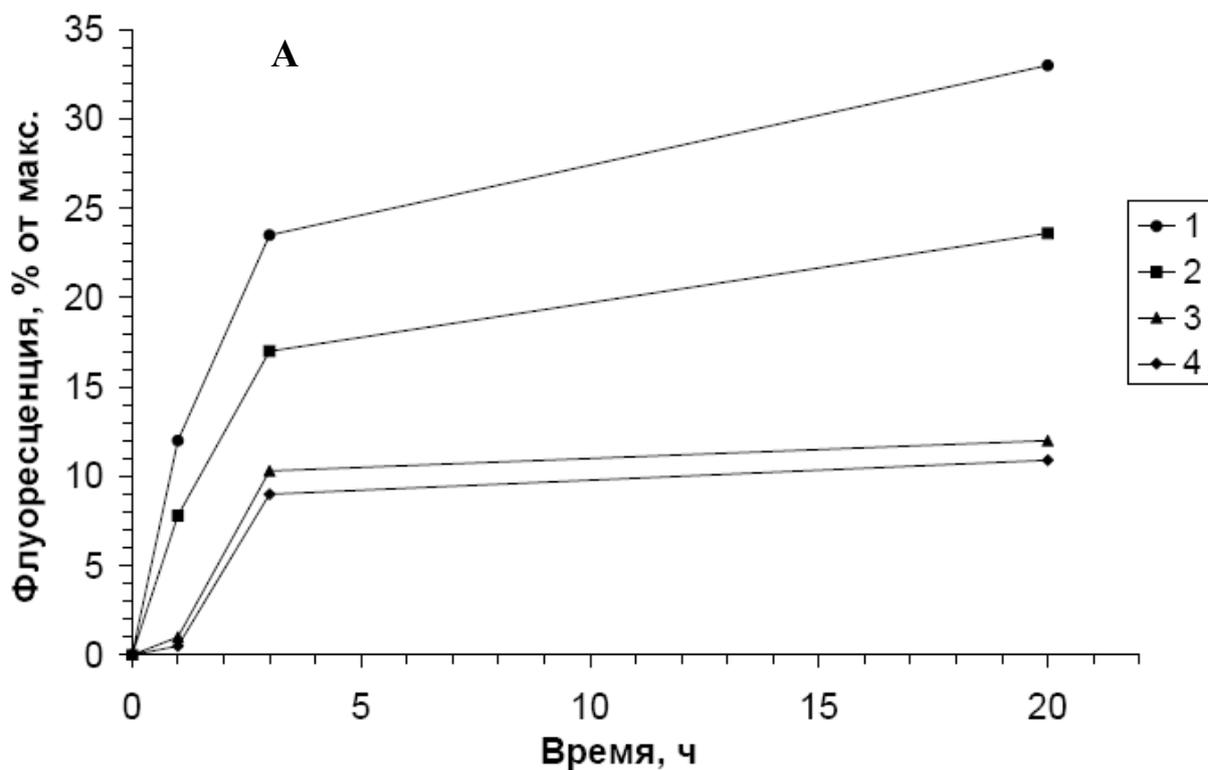


Рисунок 2.50 – Стабильность липосом при инкубировании с сывороткой крови

(А): 1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД2000(3); 3 – Л-ПВП-ОД2000(6);
4 – Л-ПВП-ОД2000(10)

(Б): 1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД8000(15); 3 – Л-ПВП-ОД2000(15);
4 – Л-ПВП-ОД4000(15)

Полученные результаты проведенных исследований еще раз подтвердили предположение о том, что существует определенное оптимальное соотношение гидрофильности и гидрофобности молекул модифицирующего амфифильного полимера, при котором полимер, встраиваясь в липосомальную мембрану, образует на поверхности липосомы защитное “облако”. Эта защитная полимерная оболочка должна иметь достаточные толщину, плотность и объем по всей поверхности липосомы, чтобы эффективно предотвращать воздействие внешних дестабилизирующих факторов на модифицированную липосому. Эффективность защиты липосом можно контролировать, изменяя молекулярную массу модифицирующих амфифильных поли-N-винилпирролидонов и их содержание в липосомальных мембранах.

2.5.1.5 Исследование поведения липосом, модифицированных амфифильными полимерами, в условиях *in vivo*

Поведение липосом, модифицированных синтезированными амфифильными полимерами N-винилпирролидона, в организме экспериментальных животных было изучено в экспериментах на белых линейных мышах BALB/C. Липосомы для исследований формировали из смеси фосфатидилхолин / холестерин (мольное соотношение 7:3). Одновременно с формированием липосом в их оболочку вводили различные количества модифицирующих амфифильных полимеров с разной молекулярной массой и один гидрофобным октадецильным фрагментом (ПВП-ОД2000, ПВП-ОД4000, ПВП-ОД8000). В качестве радиоактивной метки для визуализации системы доставки в липосомы вводили цитратный комплекс ^{111}In .

Липосомальную суспензию однократно вводили инъекционно (по 150 мкл) в хвостовую вену опытных животных (белые линейные мыши BALB/C). Через определенное время мышей умертвляли, собирали предназначенные для исследования кровь, печень и другие органы и ткани, и измеряли их γ -радиоактивность. Для получения результатов в каждой временной точке использовали 5-6 животных.

Результаты проведенных исследований (рисунок 2.51) показывают, что амфифильные полимеры N-винилпирролидона с концевыми алифатическими гидрофобными группами способны обеспечить эффективную защиту липосом *in vivo*. Результаты, представленные на рисунке 2.51А, демонстрируют, что введение в оболочку липосом амфифильных производных поли-N-винилпирролидона значительно увеличивает время циркуляции липосом в кровеносном русле, а, следовательно, модифицированные липосомы обеспечивают большую эффективность при доставке включенного лекарственного вещества.

Известно, что одним из защитных механизмов организма является захват посторонних макромолекулярных или микро- и наноразмерных объектов, попадающих в организм, клетками ретикуло-эндотелиальной системы, находящимися в различных органах, в частности, в печени. При использовании липосомального транспорта лекарственных веществ этот механизм разрушает и выводит из организма значительную часть липосомального препарата, а, следовательно, значительно снижает воздействие лекарственного вещества на пораженный орган и источник заболевания.

Использование амфифильных полимеров в качестве компонентов липосомальных мембран позволяет снизить захват модифицированных липосом клетками ретикуло-эндотелиальной системы, и как следствие уменьшить быстрое накопление липосом в печени (рисунок 2.51Б).

Данные, представленные на рисунке 2.51, показывают, что защитное действие полимера с более высокой молекулярной массой ($M_n=8000$) заметно ниже, по сравнению с более низкомолекулярными аналогами. Этот факт еще раз подтверждает пониженную эффективность модификации липосом амфифильными поли-N-винилпирролидонами с молекулярной массой больше 6000 Да. Увеличение количества амфифильного полимера, введенного в липосомы, для всех образцов полимеров увеличивает их стабилизирующий эффект, и приводит к образованию более устойчивых модифицированных липосом, пригодных для эффективного транспорта биологически-активных и лекарственных веществ в организме.

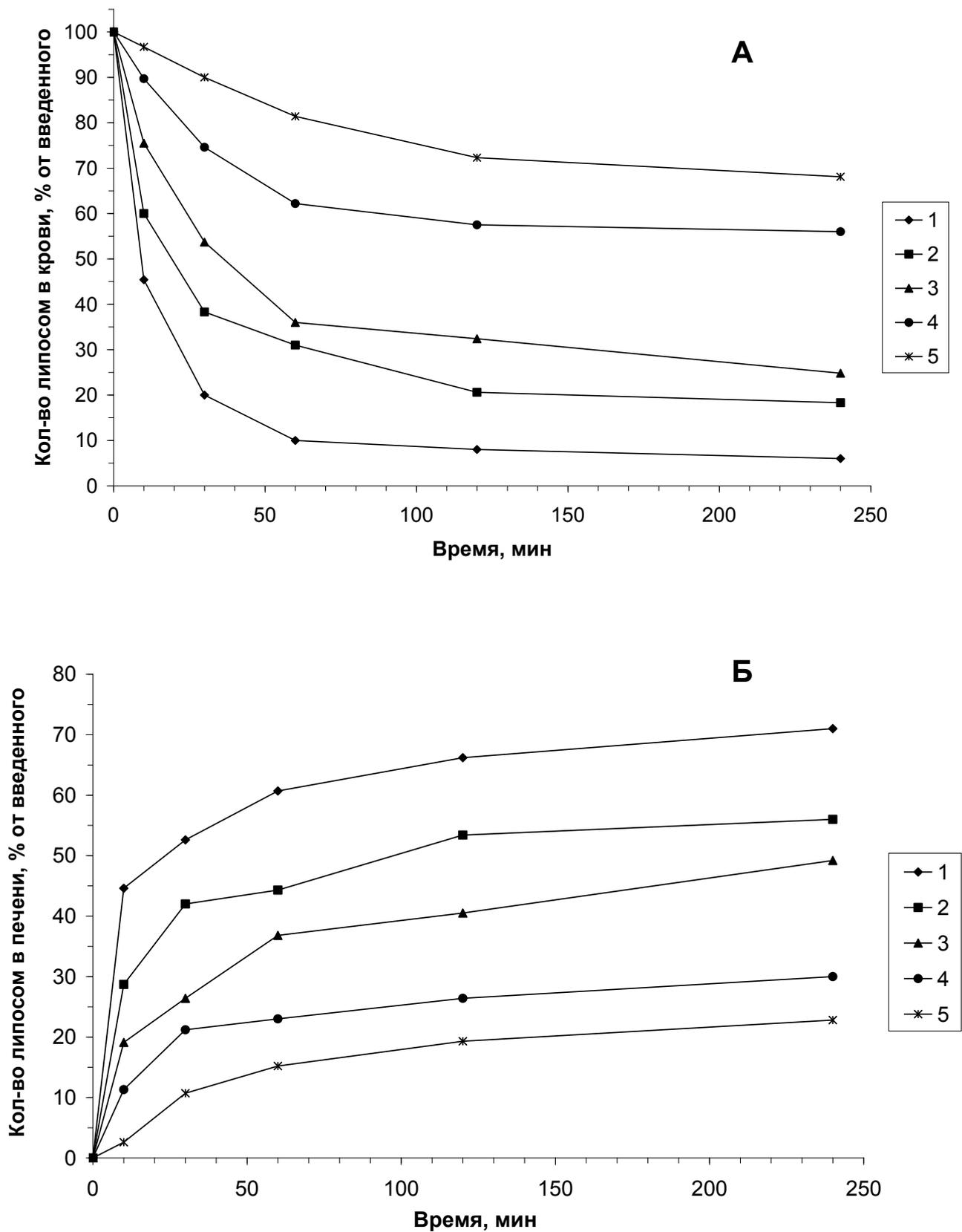


Рисунок 2.51 – Содержание липосом в крови (А) и накопление липосом в печени (Б) опытных животных

1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД8000(3); 3 – Л-ПВП-ОД2000(3);
 4 – Л-ПВП-ОД8000(10); 5 – Л-ПВП-ОД2000(10)

2.5.1.6 Получение и исследование модифицированной липосомальной формы противогрибковых антибиотиков

Внедрение в клиническую практику новых медицинских технологий (иммуносупрессионная терапия с использованием высоких доз препаратов, трансплантация органов и тканей, инвазивные лечебные и диагностические процедуры), противостояние пандемии ВИЧ-инфекции и широкое применение антибактериальных препаратов привели к увеличению числа иммунокомпрометированных пациентов с высоким риском развития тяжелых грибковых заболеваний. Количество грибковых инфекций прогрессивно увеличивается, а летальность остается неприемлемо высокой [292].

В данной работе в качестве объектов для включения в липосомы, модифицированные амфифильными полимерами N-винилпирролидона, и обладающими повышенной стабильностью, были использованы хорошо известные и широко применяемых в лечении грибковых заболеваний различной тяжести антифунгальные антибиотики - нистатин и амфотерицин В.

Нистатин (Нис) и амфотерицин В (АмфВ) - два структурно аналогичных полиеновых макролидных антибиотика, продуцируемых различными штаммами актиномицетов рода *Streptomyces*, характеризующиеся относительно невысокой антибактериальной и мощной противогрибковой активностью (рисунок 2.52).

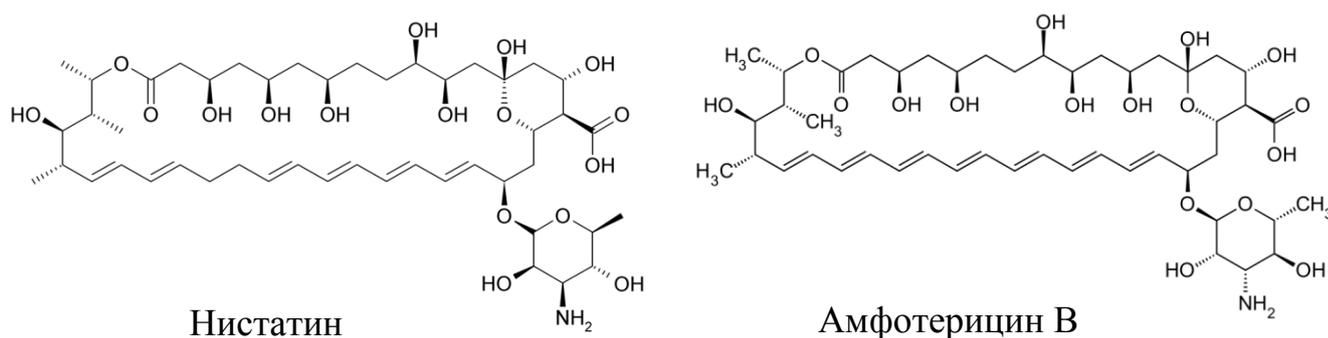


Рисунок 2.52 – Структурная формула противогрибковых антибиотиков нистатина и амфотерицина В

После более чем 40 лет с момента открытия, амфотерицин В все еще является наиболее известным противогрибковым препаратом, применяемым для лечения системных грибковых инфекций. Однако его исключительно низкая растворимость в воде и ряд негативных побочных эффектов ограничивают широкое применение препарата и вызывают необходимость разработки различных форм для сведения к минимуму этих недостатков.

Нистатин, также как и амфотерицин В, плохо растворим в воде, и практически не всасывается в желудочно-кишечном тракте, что приводит к очень низкой эффективности этого антибиотика и необходимым для его применения высоким дозам.

Ранее, в данной работе было установлено, что амфифильные полимеры N-винилпирролидона, содержащие гидрофильный фрагмент полимера и одну концевую алифатическую гидрофобную группу, способны встраиваться своими гидрофобными фрагментами в липосомальную мембрану, образуя на поверхности липосом защитный слой водорастворимого полимера.

Такая модификация повышает стабильность липосом к различным разрушающим факторам, снижает возможность захвата липосом клетками ретикуло-эндотелиальной системы и увеличивает время циркуляции липосом в организме.

Таким образом, перспективным представлялось получить новые высокоэффективные формы нистатина и амфотерицина В на основе полимер-модифицированных липосом, с целью придать этим лекарственным веществам хорошую совместимость с водными средами и создать лекарственную форму пролонгированного действия с контролируемым выделением активного вещества.

Для решения этой задачи был разработан метод, по которому были получены липосомы, поверхностный слой которых был модифицирован амфифильным поли-N-винилпирролидоном с молекулярной массой $M_n = 4000$ Да, содержащим одну концевую октадецильную группу (ПВП-ОД4000), с включенными фунгицидами (таблица 2.21).

Таблица 2.21 – Полимер-модифицированные липосомы с включенными противогрибковыми антибиотиками

Полимер	Кол-во полимера, мол. %	Фунгицид	Кол-во фунгицида, вес. %	Тип липосом
ПВП-ОД 4000	0	Нис	1	Л-Нис(1)
ПВП-ОД 4000	3	Нис	1	Л-ПВП-ОД4000(3)-Нис(1)
ПВП-ОД 4000	3	Нис	3	Л-ПВП-ОД4000(3)-Нис(3)
ПВП-ОД 4000	6	Нис	1	Л-ПВП-ОД4000(6)-Нис(1)
ПВП-ОД 4000	6	Нис	3	Л-ПВП-ОД4000(6)-Нис(3)
ПВП-ОД 4000	10	Нис	1	Л-ПВП-ОД4000(10)-Нис(1)
ПВП-ОД 4000	10	Нис	3	Л-ПВП-ОД4000(10)-Нис(3)
ПВП-ОД 4000	0	АмфВ	1	Л-АмфВ(1)
ПВП-ОД 4000	3	АмфВ	1	Л-ПВП-ОД4000(3)-АмфВ(1)
ПВП-ОД 4000	3	АмфВ	3	Л-ПВП-ОД4000(3)-АмфВ(3)
ПВП-ОД 4000	6	АмфВ	1	Л-ПВП-ОД4000(6)-АмфВ(1)
ПВП-ОД 4000	6	АмфВ	3	Л-ПВП-ОД4000(6)-АмфВ(3)
ПВП-ОД 4000	10	АмфВ	1	Л-ПВП-ОД4000(10)-АмфВ(1)
ПВП-ОД 4000	10	АмфВ	3	Л-ПВП-ОД4000(10)-АмфВ(3)

Липосомы формировали из смеси фосфатидилхолин / холестерин (мольное соотношение 7:3). Модификацию липосомальных мембран и включение в липосомы фунгицидов осуществляли одновременно с формированием липосом.

Методами динамического светорассеяния (рисунок 2.53) и трансмиссионной электронной микроскопии (рисунок 2.54) было установлено, что образующиеся модифицированные липосомы с включенными фунгицидами имеют сферическую форму, узкое распределение по размерам, и средний диаметр 150÷250 нм. При этом для исследованных образцов тип модифицирующего полимера, противогрибкового антибиотика и их содержание в образцах липосом (в исследованном диапазоне) существенно не влияли на их размеры.

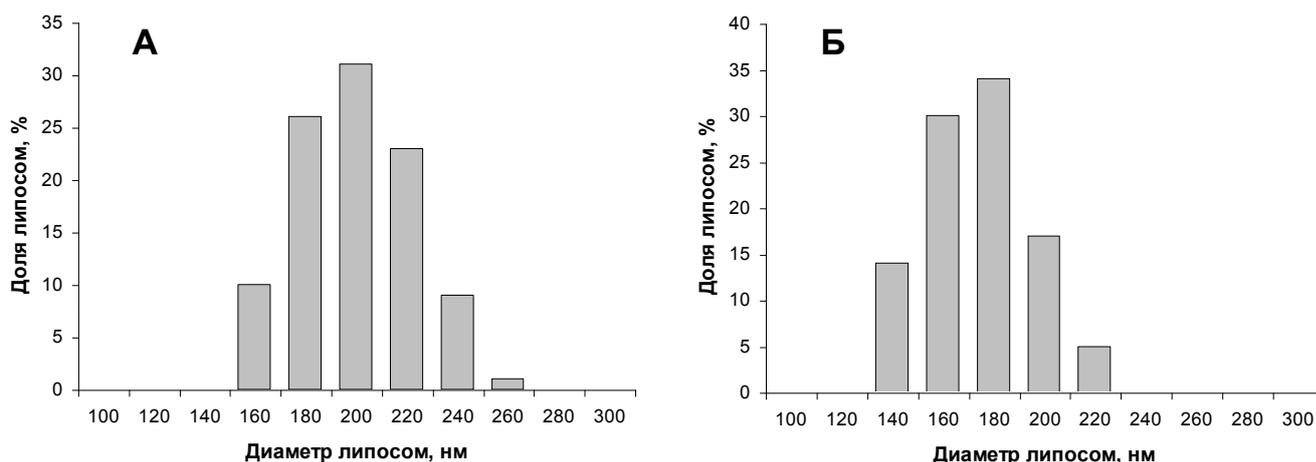


Рисунок 2.53 – Размер модифицированных липосом с включенными фунгицидами

А - Л-ПВП-ОД4000(3)-Нис(3); Б - Л-ПВП-ОД4000(10)-Нис(3)

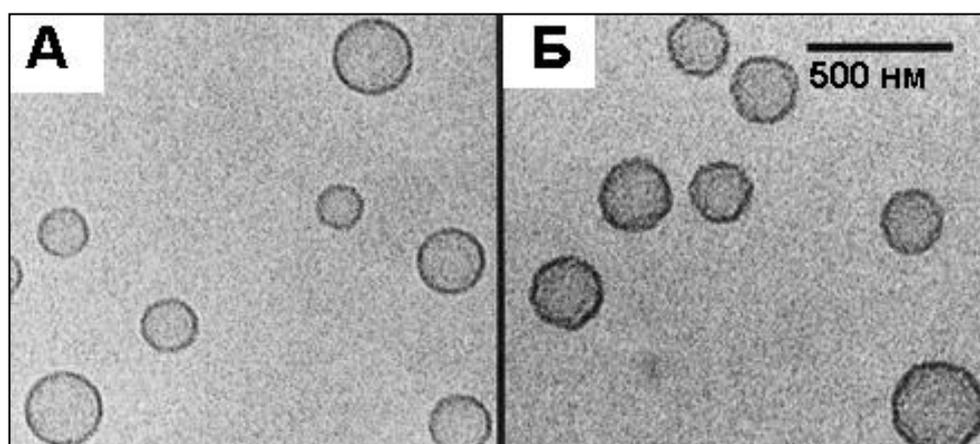


Рисунок 2.54 – ТЭМ микрофотографии липосом, загруженных фунгицидами
А - Л-ПВП-ОД4000(3)-Нис(3); Б - Л-ПВП-ОД4000(10)-Нис(3).

Для изучения стабильности липосом с включенными антибиотиками нистатином и амфотерицином В липосомальную суспензию подвергали ультразвуковому воздействию в течение 10 минут и количественно оценивали содержание интактного антибиотика спектрофотометрическим методом при длине волны 406 нм.

Как видно из рисунков 2.55 и 2.56 немодифицированные амфифильными полимерами липосомы Л-Нис(1) и Л-АмфВ(1) быстро разрушались под действием ультразвука. Через 10 минут ультразвуковой обработки не более 18 % включенного антибиотика оставалось интактным.

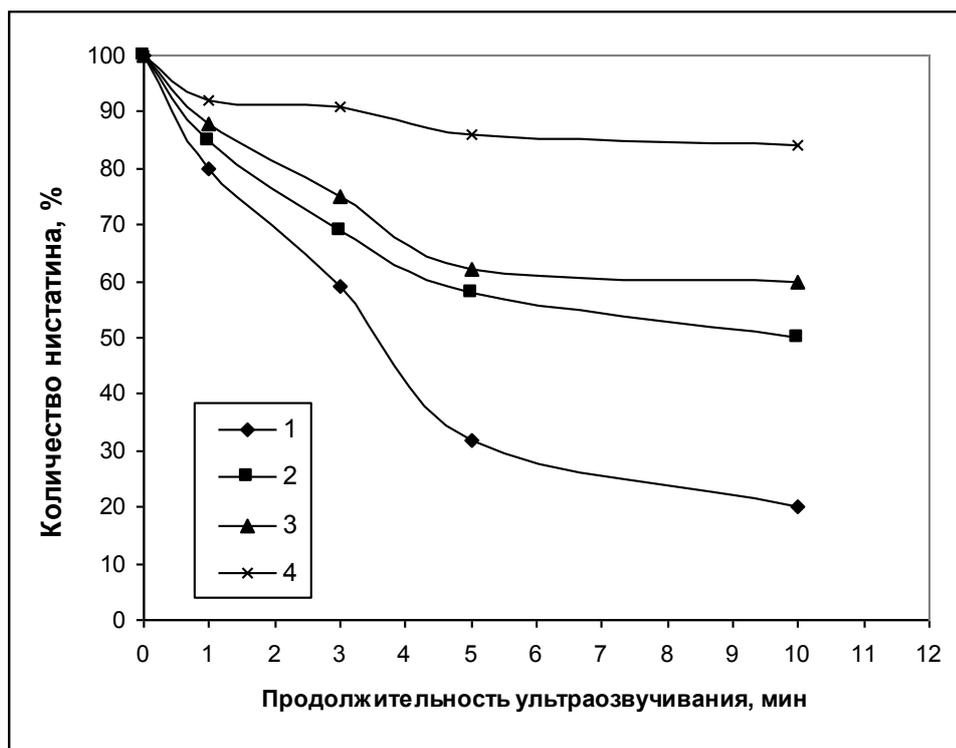


Рисунок 2.55 – Влияние ультразвукового воздействия на стабильность липосом с нистатином

1 – Л-Нис(1); 2 – Л-ПВП-ОД4000(3)-Нис(1);

3 – Л-ПВП-ОД4000(6)-Нис(1); 4 – Л-ПВП-ОД4000(10)-Нис(1)

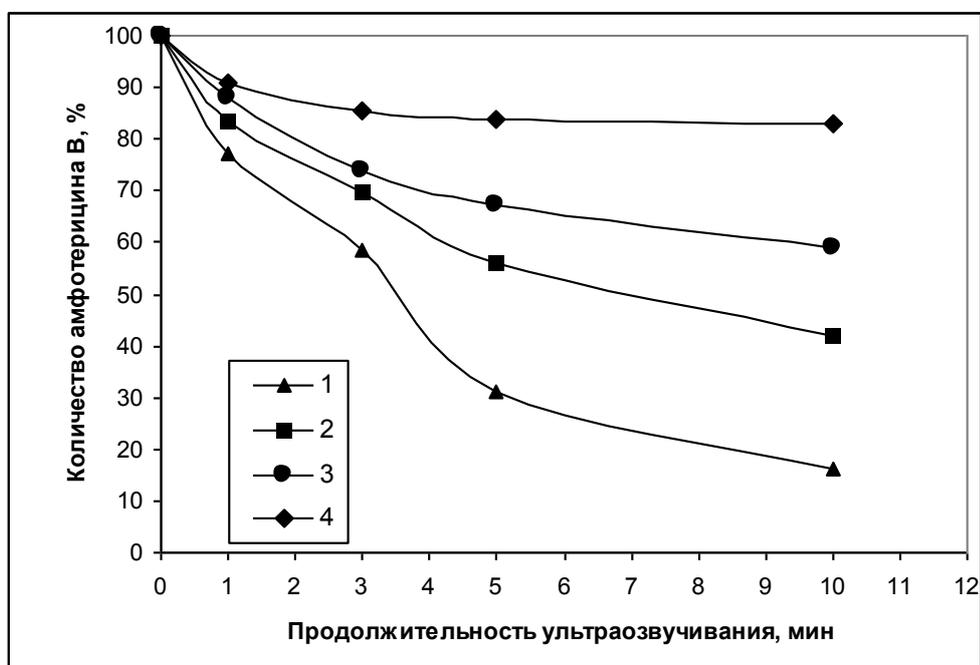


Рисунок 2.56 – Влияние ультразвукового воздействия на стабильность липосом с амфотерицином В

1 – Л-АмфВ(1); 2 – Л-ПВП-ОД4000(3)-АмфВ(1);

3 – Л-ПВП-ОД4000(6)-АмфВ(1); 4 – Л-ПВП-ОД4000(10)-АмфВ(1)

В случае липосом, стабилизированных амфифильными полимерами, ультразвук оказывал гораздо меньшее разрушающее воздействие на липосомальную мембрану, вследствие чего при максимальном времени деструктирующего действия, обнаруживали, приблизительно, от 45 до 85% интактного антибиотика. Повышение содержания амфифильного полимера в липосомах с 3 до 10 мольных процентов значительно увеличивало стабильность модифицированных амфифильными полимерами липосом.

Путем повышения концентрации нистатина и амфотерицина В в исходной смеси при формировании липосом, удалось получить модифицированные липосомы, содержащие до 20 весовых % включенного антибиотика. При этом выходы по антибиотику составляли до 75%. Количество включенного нистатина или амфотерицина В определяли спектрофотометрически.

Противогрибковую активность новых липосомальных форм нистатина и амфотерицина В определяли с использованием агаровой среды, по отношению к культуре гриба *Fuzarium oxysporum* ВКМФ-26040/0603. Эксперименты проводились в темноте при 25 °С в течение 7 дней. На рисунках 2.57 и 2.58 приведены диаграммы, отображающие значения эффективных доз (ED_{50}) для различных липосомальных препаратов нистатина и амфотерицина В.

Исследование антифунгальной активности липосомальных препаратов показало, что липосомы, модифицированные амфифильными полимерами N-винилпирролидона, и содержащие включенные антибиотики обладали несколько большей противогрибковой активностью по сравнению с нативными липосомами, при одинаковом весовом содержании нистатина и амфотерицина В в этих препаратах. Увеличение содержания нистатина и амфотерицина В во всех образцах липосом приводило к увеличению антифунгальной активности.

При этом значения ED_{50} для новых липосомальных форм нистатина и амфотерицина В были соответственно в 2÷2,4 и в 1,8÷3,2 раза ниже, чем значения ED_{50} для чистых нистатина ($ED_{50} = 35,7$) и амфотерицина В ($ED_{50} = 48$), определенные при тех же условиях по отношению к культуре гриба *Fuzarium oxysporum* ВКМФ-26040/0603.

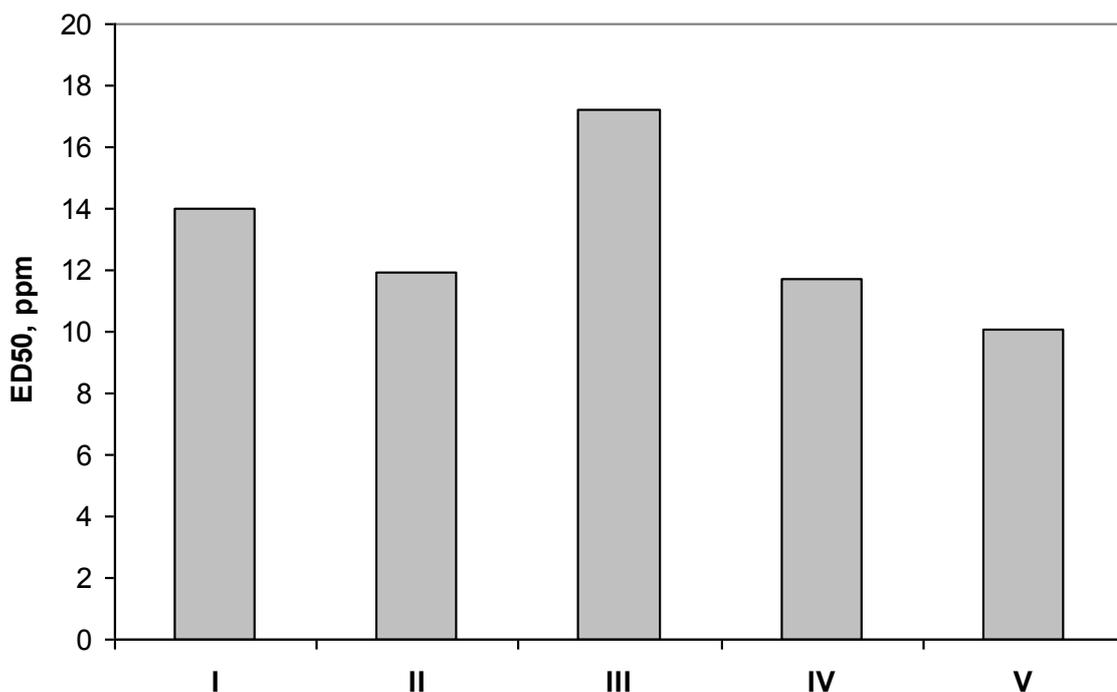


Рисунок 2.57 – Значения эффективных доз (ED50) для липосомальных препаратов нистатина

I – Л-Нис(1); II – Л-Нис(3); III – Л-ПВП-ОД4000(6)-Нис(0.5);

IV – Л-ПВП-ОД4000(6)-Нис(1); V – Л-ПВП-ОД4000(6)-Нис(3)

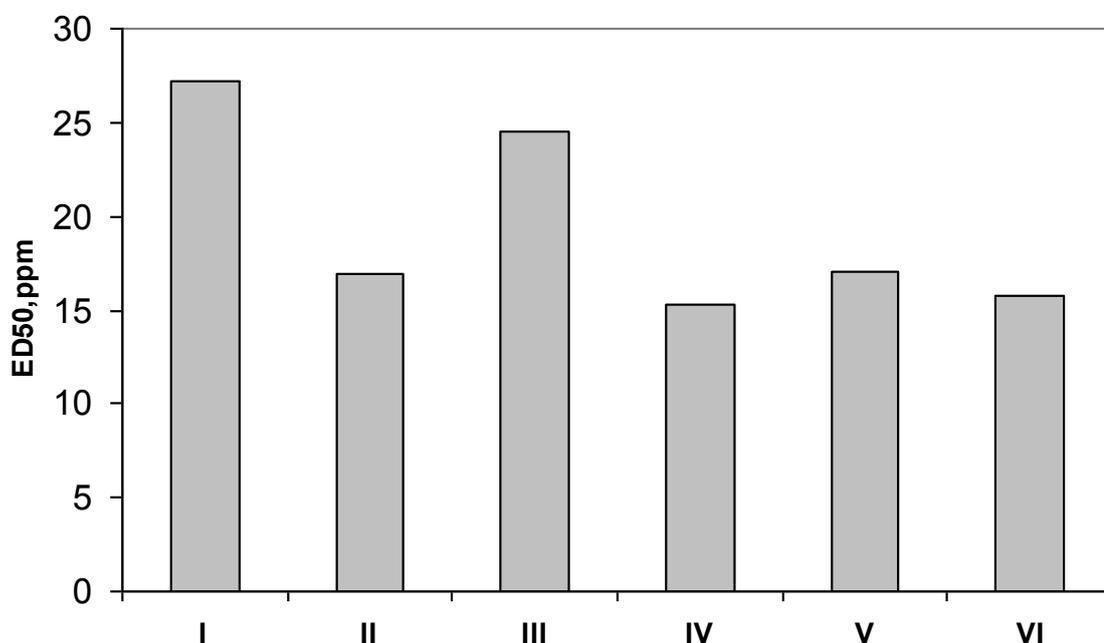


Рисунок 2.58 – Значения эффективных доз (ED50) для липосомальных препаратов амфотерицина В

I – Л-АмфВ(1); II – Л-ПВП-ОД4000(3)-АмфВ(1); III – Л-АмфВ(3);

IV – Л-ПВП-ОД4000(3)-АмфВ(3); V – Л-ПВП-ОД4000(6)-АмфВ(1);

VI – Л-ПВП-ОД4000(10)-АмфВ(3)

Таким образом, в ходе работы, получены новые липосомальные формы противогрибковых антибиотиков нистатина и амфотерицина В, представляющие собой фунгицид-содержащие липосомы, липидный слой которых модифицирован амфифильными полимерами N-винилпирролидона [293].

При этом модифицированные липосомы сохраняют специфические антифунгальные свойства антибиотиков при значительно большей стабильности таких систем по сравнению с нативными липосомами. Количество включенного макролидного антибиотика в составе таких наноразмерных липосомальных носителей может достигать 17 – 20 %. Полученные данные исследований говорят о высокой эффективности новых липосомальных форм.

2.5.2 Разработка и исследование наносомальных полимерных форм биологически активных веществ

Важным свойством разработанных наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона является их способность в процессе самоагрегации за счет гидрофобных взаимодействий включать в свое ядро плохо растворимые биологически активные молекулы. При этом происходит процесс солюбилизации – значительного увеличения растворимости гидрофобных веществ в водных растворах. В результате включения таких липофильных веществ (в том числе биологически активных) в ядро наноразмерных носителей образуются устойчивые равновесные нанодисперсные коллоидные системы.

Большое число факторов, влияющих на процесс солюбилизации (строение амфифильного полимера, строение включаемого вещества, природа контактирующих фаз, метод включения БАВ в наночастицы, температура и т.д.), приводит к тому, что включение вещества в наноносители, его растворимость, содержание в дисперсной фазе и размеры наночастиц можно контролируемо изменять в достаточно широком диапазоне. Свойства самого активного вещества при иммобилизации и переходе к наноразмерным коллоидным системам и очень малым количествам внутри каждой наночастицы, также могут сильно изменяться.

Известно, что некоторые биологически активные вещества, в очень малых концентрациях (например, внутри наночастиц) обладают повышенной активностью или проявляют такую активность, которая отсутствует или ослаблена при высокой концентрации активного агента. Поэтому получение новых, высокоэффективных наноразмерных носителей с включенными гидрофобными биологически активными веществами, позволяет обеспечить контролируемое пролонгированное выделение активного вещества в организме, его оптимальные дозировки, низкую токсичность и более высокую биологическую активность по сравнению с традиционными формами введения лекарственных веществ. Кроме того, повышение растворимости и содержания молекул активного вещества в водной фазе, позволит применять ранее не используемые в силу низкой растворимости, перспективные биологически активные и лекарственные вещества, потенциально обладающие высокой активностью, в форме полимерных наночастиц (например, инъекционно).

2.5.2.1 Получение и исследование наноразмерных полимерных форм биологически активных белков

В качестве модельного белка для включения в полимерные наночастицы были использованы соевый ингибитор протеиназ (ВВІ) и его гидрофобизованные производные (Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ). Биологически активные белки и пептиды являются одной из перспективных групп лекарственных веществ, активно изучаемых и применяемых в последние годы [294].

Молекула белка ВВІ имеет молекулярную массу 8000 Да и состоит из 71 аминокислотного остатка. Она не содержит остатков глицина и триптофана и но содержит семь дисульфидных мостиков [295]. Эта молекула построена из двух доменов, которые соединены между собой цепочками полипептидов. ВВІ не содержит в своей структуре гидрофобного ядра, что отличает его от других ингибиторов сериновых протеиназ с низкой молекулярной массой. Благодаря такому строению большая часть гидрофобных остатков ВВІ располагается на поверхности ингибитора и доступна для гидрофобных взаимодействий.

Перспективность использования ВВІ в качестве терапевтической субстанции определяется с одной стороны стабильностью белка, а с другой стороны довольно широким спектром оказываемого ингибирующего воздействия. ВВІ способен ингибировать как химотрипсина-, так и трипсиноподобные протеиназы [295]. Кроме того, установлено, что ВВІ обладает достаточно высоким антиканцерогенным потенциалом. Биологическое действие этого ингибитора связано с наличием в нем антихимотрипсина центрального. Пероральные формы на основе ВВІ в настоящее время проходят доклинические и клинические испытания в качестве антиканцерогенных препаратов [296].

Тем не менее, высокий терапевтический потенциал ВВІ ограничивается, в первую очередь, плохой растворимостью в воде, низкой способностью проникать через эпителиальный слой кишечника, и быстрым выведением из организма [297].

Исследование процессов включения модельных белков (ВВІ, Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ) в наночастицы из амфифильных полимеров N-винилпирролидона проводили с использованием соевого ингибитора протеиназ типа Баумана-Бирк (ВВІ), поставляемого компанией “Sigma” (США). Гидрофобизованные производные ВВІ, содержащие один (Оле-ВВІ) или два (Оле₂-ВВІ) олеоильных остатка были получены по известной методике [298]. Такие препараты ВВІ, модифицированные производными жирных ненасыщенных кислот, обладают лучшими мембранотропными свойствами по сравнению с нативным белком и имеют повышенное сродство к химотрипсину и эластазе лейкоцитов [299]. Однако растворимость гидрофобизованных производных ВВІ в водных средах, очевидно, еще ниже, чем у нативного белка ВВІ.

В связи с этим повышение растворимости белка ВВІ и его ацилированных производных путем их включения в наночастицы, образованные амфифильными полимерами, открывает пути к созданию высокоэффективных форм этих белков.

В качестве основы для создания наночастиц с включенными белками были использованы амфифильные полимеры N-винилпирролидона с одной концевой октадецильной гидрофобной группой и молекулярной массой водорастворимого полимерного фрагмента $M_n = 2000, 4000$ и 6000 (ПВП-ОД2000, ПВП-ОД4000 и

ПВП-ОД6000 соответственно). Как было ранее установлено в данной работе, такие полимеры обладают оптимальным сочетанием свойств в качестве основы для получения наночастиц. Эти полимеры в водных растворах, при концентрации, выше определенной критической концентрации агрегации (ККА) образуют наноразмерные сферические агрегаты.

При электрофорезе в полиакриламидном геле смеси белка ВВІ и амфифильных полимеров N-винилпирролидона с концентрацией меньше ККА, для каждого из полимерных препаратов наблюдалось появление белковой полосы, обладающей более высокой электрофоретической подвижностью, по сравнению с нативным белком, что свидетельствует о наличии ВВІ, связанного с амфифильными полимерами при низких концентрациях полимера [300].

Для получения полимерных наночастиц с включенными белками ВВІ, Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ использовали метод прямого растворения. Для этого расчетные количества полимера и белка растворяли в физиологическом растворе (0,15 NaCl, pH~7,4) или в воде при интенсивном перемешивании или обработке ультразвуком. Не растворившийся белок отделяли центрифугированием. Для измерения количества включенного в наночастицы белка, его выделяли из суспензии осаждением ацетоном, центрифугировали, высушивали и взвешивали.

В ходе работы удалось достичь достаточно высокого процента включения белка ВВІ и его производных в полимерные носители. Так, при концентрации полимера ПВП-ОД2600 1,0 мг/мл удалось получить суспензию наночастиц с концентрацией белка ВВІ до 1,0 мг/мл при эффективности включения около 90 %. Последующее увеличение концентрации белка ВВІ в системе ведет к уменьшению эффективности его включения, и, таким образом, является нерациональным и нецелесообразным. Высокий процент включения белка в полимерные наночастицы можно объяснить дополнительным связыванием полимера и белка, описанным выше.

Размеры полимерных наночастиц с включенными белками ВВІ, Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ и распределения их по размерам были определены методом динамического светорассеяния (рисунок 2.59). Результаты исследований

растворов с различными концентрациями белков и амфифильных полимеров представлены в таблицах 2.22 и 2.23.

Таблица 2.22 – Размер полимерных наночастиц с включенными модельными белками в воде

*Средняя погрешность определения диаметра частиц ± 12 нм

ПВП-ОД2000, мг/мл	ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*	Оле ₂ -ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*
0,02	0	70 ± 10	0	50 ± 10
	1,0	70 ± 10	1,0	60 ± 10
	2,0	50 ± 10	2,0	50 ± 10
0,5	0,5	370 ± 10	0,5	320 ± 10
	1,0	340 ± 10	1,0	100 ± 10
	2,0	260 ± 10	2,0	50 ± 10
5,0	0,5	400 ± 10	0,5	350 ± 10
	1,0	370 ± 10	1,0	140 ± 10
	2,0	290 ± 10	2,0	80 ± 10
ПВП-ОД 4000, мг/мл	ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*	Оле ₂ -ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*
0,02	0	Нет частиц	0	Нет частиц
	1,0	Нет частиц	1,0	90 ± 10
	2,0	Нет частиц	2,0	60 ± 10
0,5	0,5	430 ± 10	0,5	360 ± 10
	1,0	350 ± 10	1,0	120 ± 10
	2,0	290 ± 10	2,0	90 ± 10
5,0	0,5	440 ± 10	0,5	390 ± 10
	1,0	400 ± 10	1,0	170 ± 10
	2,0	340 ± 10	2,0	110 ± 10
ПВП-ОД 6000, мг/мл	ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*	Оле ₂ -ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*
0,02	0	Нет частиц	0	Нет частиц
	1,0	Нет частиц	1,0	110 ± 10
	2,0	Нет частиц	2,0	80 ± 10
0,5	0,5	Нет частиц	0,5	410 ± 10
	1,0	380 ± 10	1,0	230 ± 10
	2,0	330 ± 10	2,0	100 ± 10
5,0	0,5	510 ± 10	0,5	450 ± 10
	1,0	460 ± 10	1,0	200 ± 10
	2,0	390 ± 10	2,0	140 ± 10

Таблица 2.23 – Размер полимерных наночастиц с включенными гидрофобными производными белка ВВІ в буфере 0,05 М Tris-HCl, 0,15 М NaCl, pH 8,5

*Средняя погрешность определения диаметра частиц ± 9 нм

ПВП-ОД2000, мг/мл	Оле-ВВІ, mg/ml	Средний диаметр, нм*	Оле ₂ -ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*
0,02	0	Нет частиц	0	50 \pm 10
	1,0	50 \pm 10	1,0	40 \pm 10
	2,0	40 \pm 10	2,0	40 \pm 10
0,5	0,5	190 \pm 10	0,5	150 \pm 10
	1,0	150 \pm 10	1,0	70 \pm 10
	2,0	90 \pm 10	2,0	50 \pm 10
ПВП-ОД4000, мг/мл	Оле-ВВІ, mg/ml	Средний диаметр, нм*	Оле ₂ -ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*
0,02	0	Нет частиц	0	Нет частиц
	1,0	Нет частиц	1,0	70 \pm 10
	2,0	90 \pm 10	2,0	50 \pm 10
0,5	0,5	230 \pm 10	0,5	190 \pm 10
	1,0	180 \pm 10	1,0	90 \pm 10
	2,0	120 \pm 10	2,0	70 \pm 10
ПВП-ОД 6000, мг/мл	Оле-ВВІ, mg/ml	Средний диаметр, нм*	Оле ₂ -ВВІ, мг/мл	Средний диаметр, нм*
0,02	0	Нет частиц	0	Нет частиц
	1,0	Нет частиц	1,0	80 \pm 10
	2,0	110 \pm 10	2,0	70 \pm 10
0,5	0,5	260 \pm 10	0,5	240 \pm 10
	1,0	200 \pm 10	1,0	90 \pm 10
	2,0	130 \pm 10	2,0	80 \pm 10

Полученные наночастицы с включенными белками были визуализированы методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (рисунок 2.60). При этом было установлено, что образующиеся наноразмерные частицы имеют сферическую форму.

Как видно, увеличение содержания белка ВВІ в растворе с 0,5 до 2,0 мг/мл ведет к уменьшению размера частиц (таблица 2.22). Возможно, присутствие гидрофобного белка упорядочивает самосборку амфифильных макромолекул.

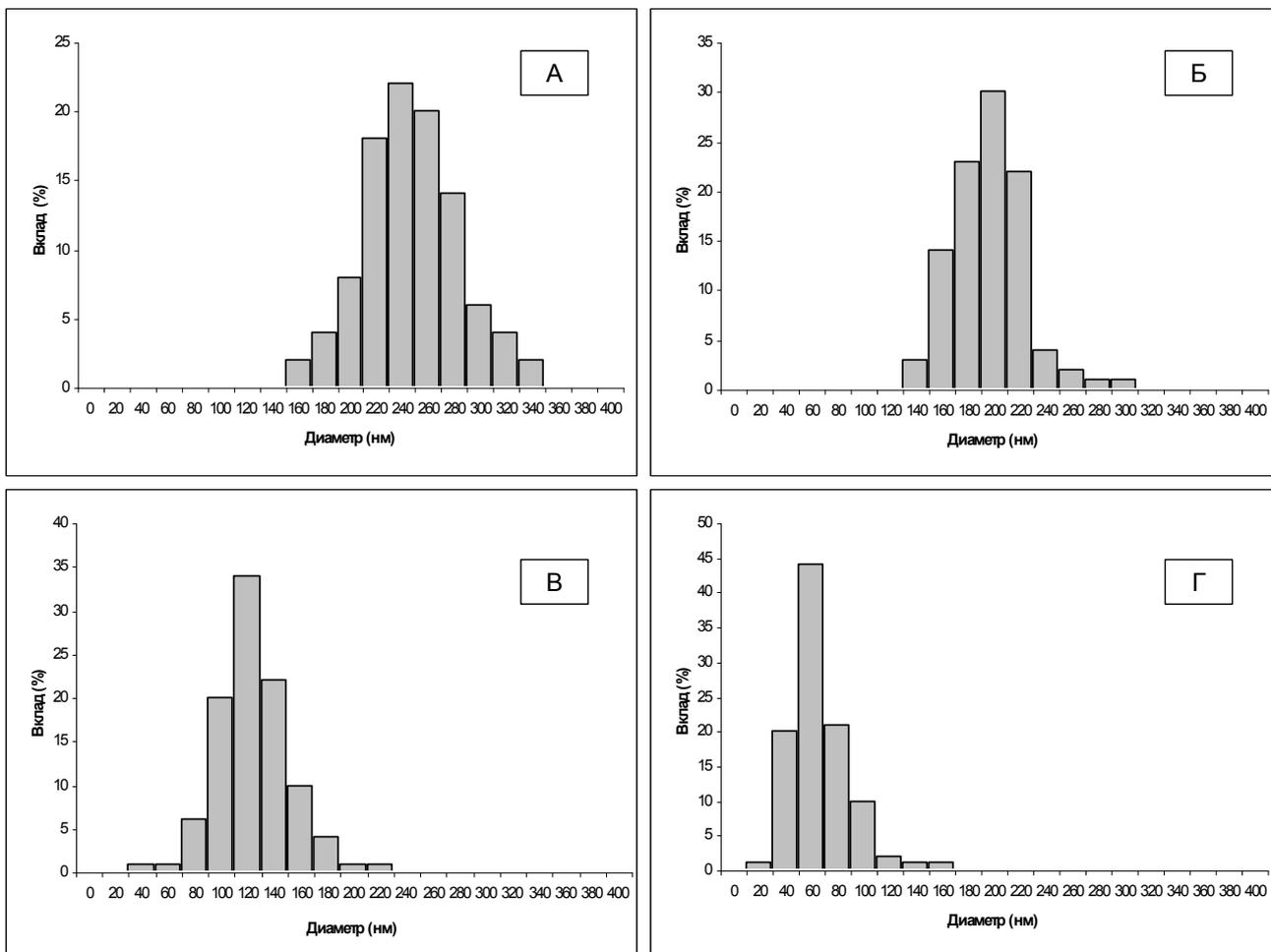


Рисунок 2.59 – Распределение полимерных частиц с включенными белками по размерам в физиологическом растворе. А – ПВП-ОД4000 (1,0 мг/мл); Б – ПВП-ОД4000 (1,0 мг/мл) + ВВІ (2,0 мг/мл); В – ПВП-ОД4000 (1,0 мг/мл) + Оле–ВВІ (2,0 мг/мл); Г – ПВП-ОД4000 (1,0 мг/мл) + Оле₂–ВВІ (2,0 мг/мл)

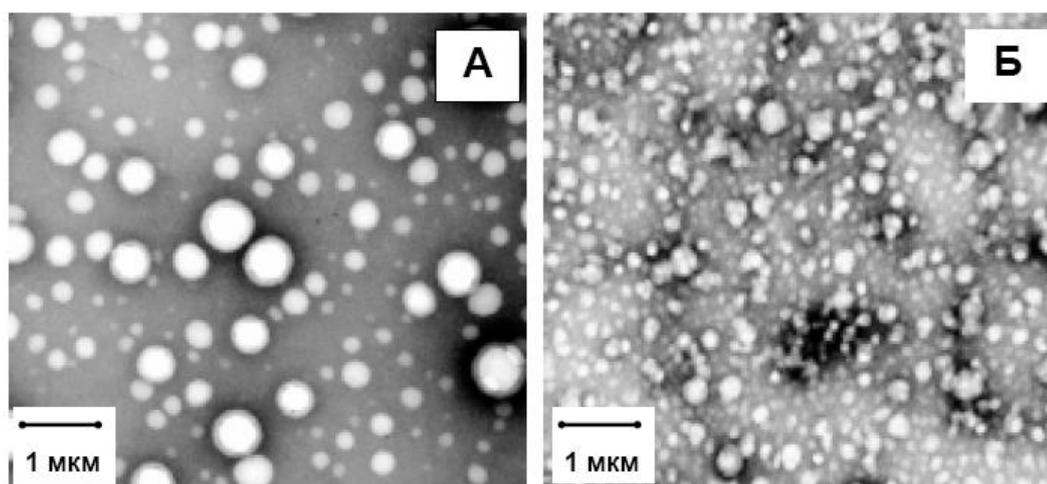


Рисунок 2.60 – Микрофотографии полимерных наночастиц с включенными белками в физиологическом растворе. А – ПВП-ОД2000 (5 мг/мл); В – ПВП-ОД2000 (5 мг/мл) + Оле₂–ВВІ (2,0 мг/мл)

Следует отметить, что в отличие от нативного белка ВВІ, его гидрофобные производные Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ инициируют образование агрегатов при очень низких концентрациях амфифильных полимеров в воде. Оба гидрофобизованных производных ВВІ уменьшают средний размер образующихся частиц и сужают их распределение по размерам (рисунки 2.59В, 2.59Г). Наиболее ярко этот эффект выражен для белка Оле₂-ВВІ. Такая разница может быть объяснена увеличением сродства белка к амфифильному полимеру, за счет усиления гидрофобных взаимодействий между ними, обусловленных введением в молекулу ВВІ двух дополнительных гидрофобных олеоильных остатков.

Важно подчеркнуть, что при определенном соотношении концентраций амфифильного полимера и белка Оле₂-ВВІ в смеси, этот белок практически полностью переходит в водную фазу.

Как видно из таблицы 2.23, при определенном соотношении амфифильного полимера и белка Оле₂-ВВІ, размер образующихся частиц уменьшается до 50 нм. Полученный размер частиц при этом сопоставим с предполагаемым размером мицеллярных ассоциатов для исследуемого полимера (30-50 нм).

Можно предположить, что в данном случае происходит перегруппировка крупных мицеллярных агрегатов на отдельные простые мицеллы с сольбилизованным в их гидрофобном ядре белком. При низком содержании Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ в смеси преобладают силы взаимодействия между цепями полимера, и образуются более крупные полимерные ассоциаты (рисунок 2.60А). При увеличении концентрации гидрофобизованного белка в системе, значительно возрастает вклад, вносимый гидрофобными взаимодействиями между остатками жирных кислот белка и полимера, что приводит к образованию небольших мицеллярных частиц, а не смешанных полимерных агрегатов (рисунок 2.60Б).

Оценить влияние гидрофобизации молекулы ВВІ на включение в полимерные наночастицы позволяют данные таблицы 2.23. Введение небольшого количества моноацилированного производного Оле-ВВІ в раствор вместе с амфифильными полимерами в отличие от Оле₂-ВВІ не приводит к образованию полимерных агрегатов. Вероятно, степень гидрофобности Оле-ВВІ недостаточна

для инициирования образования мицеллярных частиц амфифильным полимерами N-винилпирролидона. Однако, как и в случае включения в полимерные частицы белка Оле₂-ВВІ, наблюдается тенденция к уменьшению размеров частиц при увеличении концентрации Оле-ВВІ в тех случаях, когда полимерные наночастицы все же образуются. Таким образом, при включении в полимерные агрегаты моноацилированного производного ВВІ в растворе присутствуют как более крупные ассоциаты, так и небольшие по размерам мицеллярные частицы. Важно подчеркнуть, что полного перехода препарата Оле-ВВІ в водную фазу в данном концентрационном диапазоне белка и амфифильного полимера, в отличие от Оле₂-ВВІ, не наблюдалось.

Известно, что в процессе солюбилизации происходит включение вещества в ядро частицы, и при этом его взаимодействие с внешней средой практически исключено.

Для косвенного подтверждения солюбилизации препаратов белка ВВІ амфифильными полимерами N-винилпирролидона, было изучено денатурирующее воздействие низких значений рН раствора на антитриптическую активность чистого белка Оле₂-ВВІ, и белка Оле₂-ВВІ, включенного в полимерные наноразмерные частицы, в водной среде.

Полученные результаты показывают (рисунок 2.61), что в чистом виде белок Оле₂-ВВІ теряет 80 % своей антитриптической активности в течение 24 часов, а за 48 часов практически полностью инактивируется.

Однако, как показали исследования, включение белка Оле₂-ВВІ в полимерные наночастицы способствует сохранению его активности. Так, в смеси амфифильного полимера с белком, состоящей в основном из крупных агрегатов, активность белка Оле₂-ВВІ за 48 часов понижается на 60% (рисунок 2.61). Предположительно, при этом инактивируется белок, который не иммобилизован в ядре наночастиц, а локализован между цепями полимера крупных агрегатов и, вследствие этого, способен контактировать с агрессивной средой.

В тоже время, при определенном соотношении концентраций белка Оле₂-ВВІ и амфифильного полимера, которое ведет к образованию маленьких

мицеллярных частиц размером 30÷50 нм, наблюдается не только увеличение растворимости белка Оле₂-ВВІ, но и практически полное сохранение антипротеиназной активности ингибитора (90%) при воздействии на эту систему раствором с рН 7,4 (рисунок 2.61). Такой защитный эффект может быть объяснен отсутствием взаимодействия гидрофобизованного белка с растворителем, что является еще одним доказательством полной солюбилизации белка Оле₂-ВВІ.

Небольшая потеря антитриптической активности гидрофобизованного белка (около 10 %) может быть связана как с конформационными изменениями белка Оле₂-ВВІ, происходящими при инициации им процесса образования полимерных наночастиц с последующим включением белка в ядро частицы, так и с возможностью частичного контакта белка с агрессивной средой.

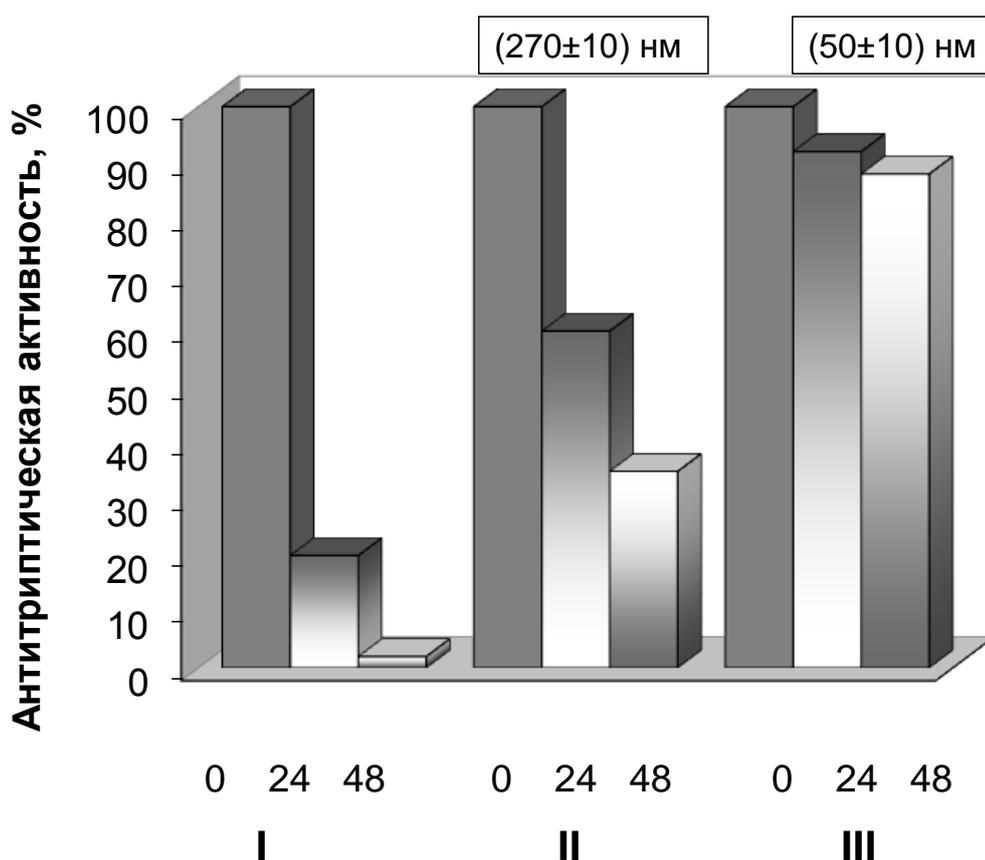


Рисунок 2.61 – Антитриптическая активность белка Оле₂-ВВІ в отсутствии и в присутствии амфифильного полимера ПВП-ОД6000, после инкубирования образцов в течение 24 и 48 часов при рН 1,4. I - Оле₂-ВВІ (0,5 мг/мл); II - ПВП-ОД6500 (0,5 мг/мл) + Оле₂-ВВІ (0,5 мг/мл); III - ПВП-ОД6500 (0,5 мг/мл) + Оле₂-ВВІ (1,0 мг/мл)

Еще одним из важнейших параметров систем доставки биологически активных веществ, позволяющим моделировать их поведение в организме, является кинетика выделения активного агента из лекарственной формы. Поэтому было проведено исследование кинетики выделения белка ВВІ и его производных из полимерных наночастиц на основе амфифильных полимеров. Исследование проводили при инкубации полимерных наночастиц с включенными белками в фосфатном (рН 7.4) и ацетатном (рН 5.5) буферных растворах. Выделявшийся из частиц белок в виде осадка отделяли, определяли его количество и измеряли его антитриптическую активность. Полученные кинетические кривые выделения активного агента на примере белка ВВІ в наночастицах из амфифильного поли-N-винилпирролидона с концевой октадецильной группой и молекулярной массой 4000 Да представлены на рисунке 2.62.

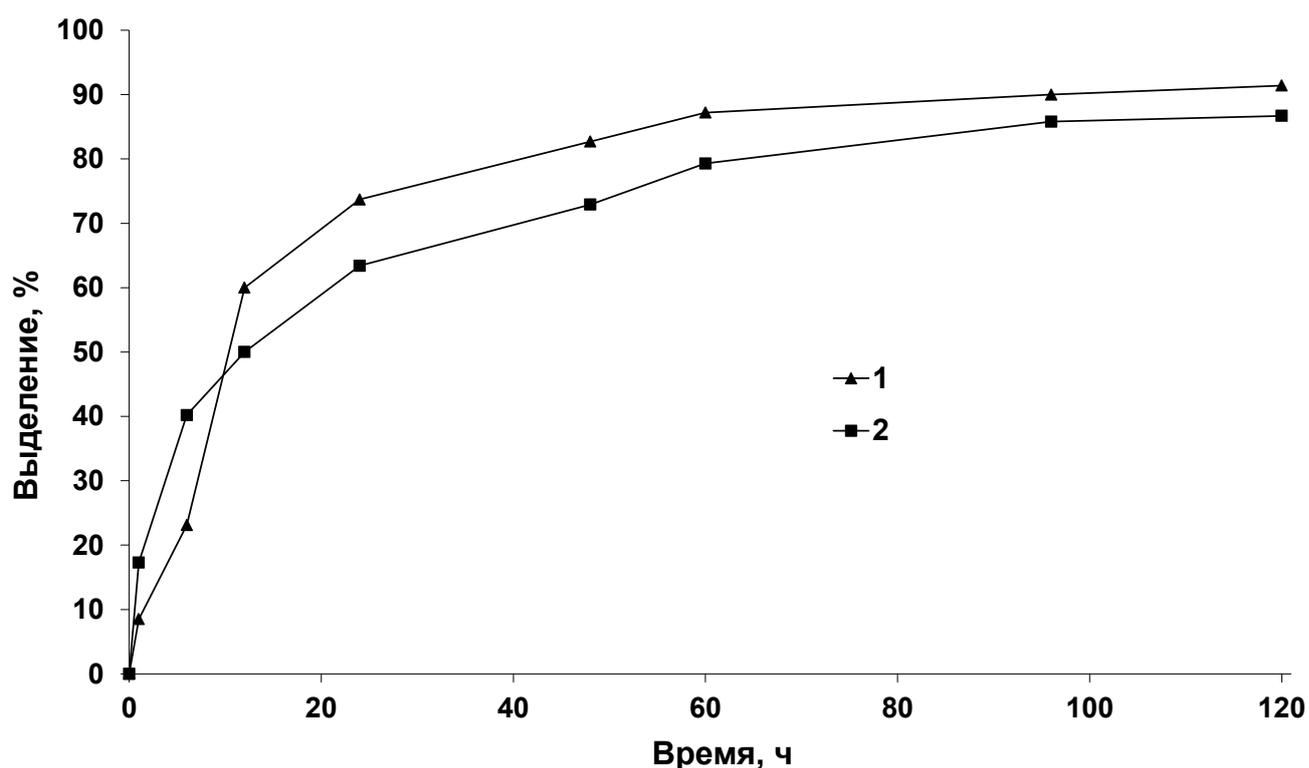


Рисунок 2.62 – Кинетика высвобождения белка ВВІ из наночастиц на основе полимера ПВП-ОД4000. 1 – в 0,05М фосфатном буферном растворе (рН 7.4, 37°С); 2 – в 0,05М ацетатном буферном растворе (рН 5.5, 37°С)

Как видно, постепенное выделение белка из полимерных наночастиц происходит пролонгировано в течение 48 часов инкубации в буферном растворе. Дальнейшая инкубация наночастиц сопровождается очень слабым выделением остаточных количеств белка, по-видимому, наиболее сильно связанного с полимером. При этом белок ВВІ практически полностью сохранял антитриптическую активность после инкубации, что говорит о сохранении его стабильности при инкапсуляции. Следовательно, включение белка в полимерные наночастицы может эффективно защищать его от инактивации, и обеспечивать его контролируемое продолжительное выделение.

Таким образом, в ходе работы были получены и охарактеризованы наноразмерные частицы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащие белок – соевый ингибитор протеиназы типа Баумана-Бирк (ВВІ) или его гидрофобизованные производные (Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ). Результаты исследования показывают, что белок, иммобилизованный в полимерных наноносителях, может быть эффективно защищен от протеолиза, опсонизации, воздействия окружающей среды и выведения из организма.

Полученные результаты [301] значительно расширяют наши представления возможности применения полимерных наноносителей как средств доставки биологически активных белковых агентов, а также о практической ценности технологии солубилизации этого класса биологически активных веществ.

2.5.2.2 Получение и исследование наносомальной стабилизированной формы фактора свертывания крови ІХ

Факторы свертывания крови являются белковыми компонентами плазмы крови (кроме фактора ІV), необходимыми для инициации и осуществления процесса свертывания крови.

Содержание различных факторов в крови человека варьируется в достаточно широких пределах и составляет от 2-3 мг/мл (фибриноген – фактор І) до 3-4 мкг/мл (фактор ІХ). Некоторые из них, такие как фактор VIII и ІХ, являются минорными белками крови, содержание которых не превышает

нескольких мкг/мл. Установлено, что содержание факторов свертывания, зависит от времени суток, пола, перенесенных травм, приема антибиотиков и некоторых других лекарственных препаратов.

Самым распространенным заболеванием, связанным с недостатком факторов свертывания крови, являются гемофилии. Гемофилии проявляются в виде спонтанных и долго неостанавливающихся кровотечениях. Различают несколько видов гемофилий – А, В и С.

Гемофилия В связана с недостатком в крови фактора IX, а в тяжелых случаях – с его почти полным отсутствием (менее 1% от нормы). Лечение гемофилии В является ввод в кровь пациента концентратов фактора IX.

Фактор IX (фактор Кристмаса) – белковый компонент плазмы крови, участвующий и являющийся необходимым для осуществления каскадного процесса свертывания крови. Это фактор является витамин-К-зависимым гликопротеином плазмы крови и синтезируется в печени [302]. Представляет собой профермент, необходимый для синтеза внутреннего активатора фактора X (фактора Стюарта-Прауэра). Фактор IX, выделенный из человеческой плазмы, является гликопротеидом с молекулярной массой 55000 Да [303].

Электрофоретическим методом было выявлено, что молекула фактора состоит из одной полипептидной цепи. В этой цепи обнаружены 13 внутренних дисульфидных мостиков. При анализе NH₂-концевой последовательности молекулы выявлены только тирозиновые остатки. Молекулярный размер фактора, содержащегося в плазме крови человека, значительно больше, чем у очищенного препарата. Он устойчив при pH 6,3-9,0. Инактивируется при 56°C [304].

Таким образом, фактор IX является неотъемлемой составной частью каскада свертывания крови. Его недостаток приводит к заболеванию, названному гемофилией В типа, одним из наиболее эффективных методом лечения которой является внешнее введение лекарственного препарата, содержащего фактор IX.

Проблема состоит в том, что факторы свертывания крови, в том числе и фактор IX, лабильны и инактивируются после выделения из плазмы. Естественным стабилизатором факторов свертывания крови, да и других белков и

гликопротеинов крови, является альбумин и некоторые другие белки, которые в большом количестве присутствует в крови и являются естественной средой их существования. В используемых в настоящее время лекарственных формах фактора IX белковые стабилизаторы не используются, чтобы не создавать белковую нагрузку на организм пациента при введении препарата. Добавляются только аминокислоты глицин и лизин. При этом устойчивое хранение фактора в виде лекарственной формы достигается только благодаря лиофильной сушке и пониженным температурам.

В связи с этим, актуальным представлялось создание полимерной наноразмерной стабилизированной формы фактора IX на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона.

Для этого был использован амфифильный полимер ПВП-ОД3500, содержащий гидрофильный блок поли-N-винилпирролидона с молекулярной массой 3500 Да, и один концевой гидрофобный октадецильный фрагмент.

Концентрат фактора IX свертывания крови был получен на действующем производстве в лаборатории фракционирования белков плазмы отдела экспериментальной и производственной трансфузиологии ГУ Гематологический научный центр РАМН, Москва.

Для получения полимерных наноразмерных агрегатов, содержащих стабилизированный фактор IX, использовали уже описанный ранее метод прямого растворения. Для этого расчетные количества полимера и фактора IX заранее отдельно растворяли в специальном буфере С, а затем сливали вместе при интенсивном перемешивании или обработке ультразвуком. Не растворившийся фактор IX отделяли центрифугированием или фильтрованием.

Состав буфера С полностью соответствовал составу среды, в которой получали фактор IX после фракционирования и представлял собой смесь 0.01 М три(гидроксиметил)аминометан, 0.06 М цитрат натрия (трехзамещенный), 0.12 М NaCl (рН 7,45). Параметры среды контролировали и проверяли каждый раз перед очередным экспериментом.

Размер образующихся полимерных наночастиц, содержащих фактор IX и их ζ -потенциал определяли с помощью анализатора размеров частиц «Malvern Zetasizer Nano ZS» (Великобритания). Морфологию полученных, нагруженных полимерных наночастиц определяли методом сканирующей электронной микроскопии. Эффективность включения фактора IX рассчитывали после отделения и взвешивания выпавшего в осадок свободного белка. Специфическую активность фактора IX в полученных препаратах на основе полимерных наночастиц оценивали с помощью коагулологического анализа, основанного на измерении времени свертывания плазмы, которое напрямую зависит от содержания фактора, активность которого измеряется.

Свойства полученных наночастиц и эффективность включения фактора IX от концентрации амфифильного полимера и соотношения полимера и белка приведены в таблице 2.24.

Таблица 2.24 – Полимерные наноразмерные частицы, содержащие фактор IX
*активность 1 мг использованного фактора IX ~ 80 МЕ, T = 25°C

ПВП-ОД3500, мг/мл	Фактор IX, мг/мл	Размер частиц, нм	ζ -потенциал, мВ	Степень включения фактора IX, %	Специфическая активность фактора IX, МЕ*/мл
0,5	0,25	118 ± 14	14,24 ± 0,56	90,1	18,02
1,0	0,25	124 ± 11	12,84 ± 0,82	95,7	19,14
2,0	0,25	176 ± 18	5,38 ± 0,44	86,3	17,26

Как видно из таблицы при увеличении исходного массового соотношения полимера к фактору IX от 2:1 до 4:1, количество включенного белка несколько возрастает, при этом размер образующихся частиц практически не изменяется. Это может быть связано с высокой молекулярной массой фактора IX (~55 кДа), большим размером его молекул, и как следствие большим количеством макромолекул, необходимым для формирования полимерного агрегата для инкапсуляции белка. Дальнейшее увеличение концентрации амфифильного

полимера в системе ведет к значительному увеличению размеров образующихся ассоциатов. Вероятно, идет процесс образования более крупных полимерных агрегатов сложной морфологии, в связи с чем включение в них крупных молекул фактора IX становится затруднено, и степень включения белка снижается.

На рисунке 2.63 представлены микрофотографии наночастиц с включенным фактором IX, полученные при начальном массовом соотношении амфифильного полимера и белка 2:1 и 4:1. Как видно, все образующиеся частицы имеют сферическую форму и размер менее 150 нм.

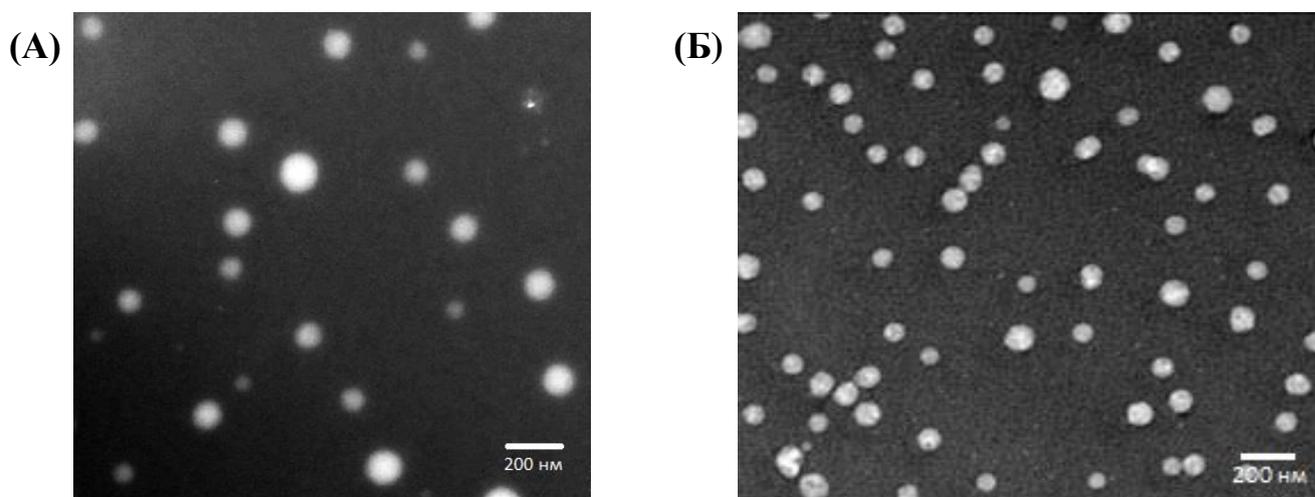


Рисунок 2.63 – Микрофотографии полимерных наночастиц на основе ПВП-ОД3500 с включенным фактором IX при массовом соотношении полимера и белка 2:1 (А) и 4:1 (Б)

Для изучения возможности стабилизации фактора IX и защиты его от инактивации путем включения в полимерные наночастицы на основе амфифильных полимеров поли-N-винилпирролидона, в качестве критерия оценки стабилизирующего действия была выбрана скорость падения специфической активности фактора IX, включенного в полимерные наночастицы по сравнению с чистым белком, в зависимости от времени инкубации препаратов, при различных температурах.

На рисунке 2.64 представлена зависимость активности фактора IX, включенного в полимерные наночастицы, полученные при различных концентрациях полимера и инкубированных при температуре 50 °С.

Активность фактора IX при 50°C начиная с первых же минут инкубации до, приблизительно, 3 часов упала с ~ 18,0 МЕ/мл до значений, меньших, чем 2,0 МЕ/мл, что говорит о практически полной деактивации белка. Однако, активность в образцах с полимерными наночастицами все же выше (2,95, 4,38 и 2,05 МЕ/мл против 1,25 МЕ/мл в контрольном образце, содержащем только фактор IX).

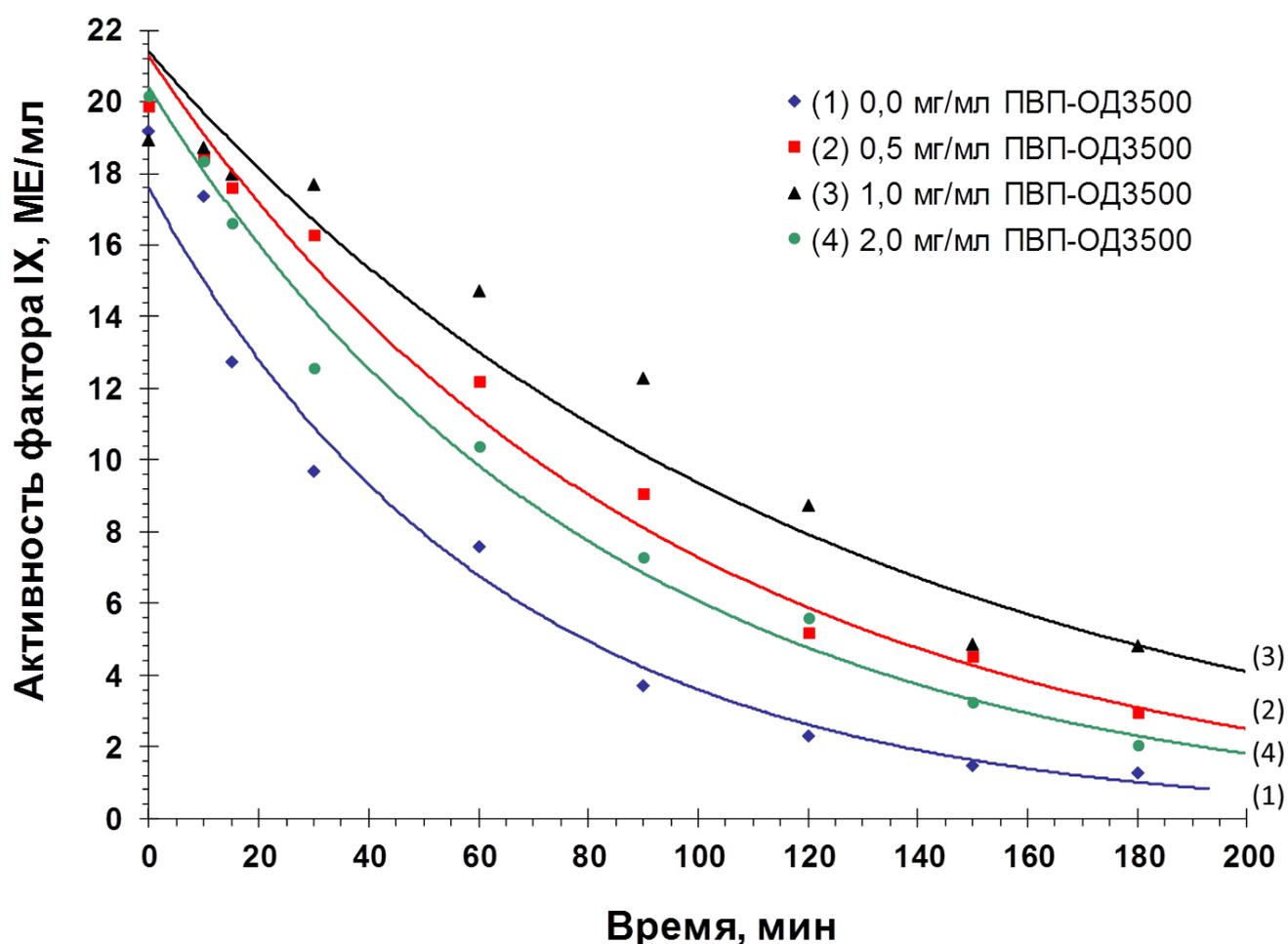


Рисунок 2.64 – Активность препаратов фактора IX на основе полимерных наночастиц (60°C)

Это, может быть возможным проявлением стабилизирующего эффекта со стороны амфифильного полимеров ПВП-ОД3500 при крайне неблагоприятных для фактора условиях высокой температуре 50°C. Поскольку температура в 50°C не является нормальной для существования фактора IX, то, даже в присутствии амфифильного полимера, белок деактивируется уже в первые 3 ч.

На следующей стадии исследования провели изучение стабильности фактора IX в виде наноразмерной полимерной формы при температуре близкой к температуре тела человека – 37°C (рисунок 2.65). Эта температура является более приемлемой для существования фактора IX. Находясь в водной среде, даже в отсутствии стабилизаторов, фактор IX сохранял активность на протяжении нескольких суток.

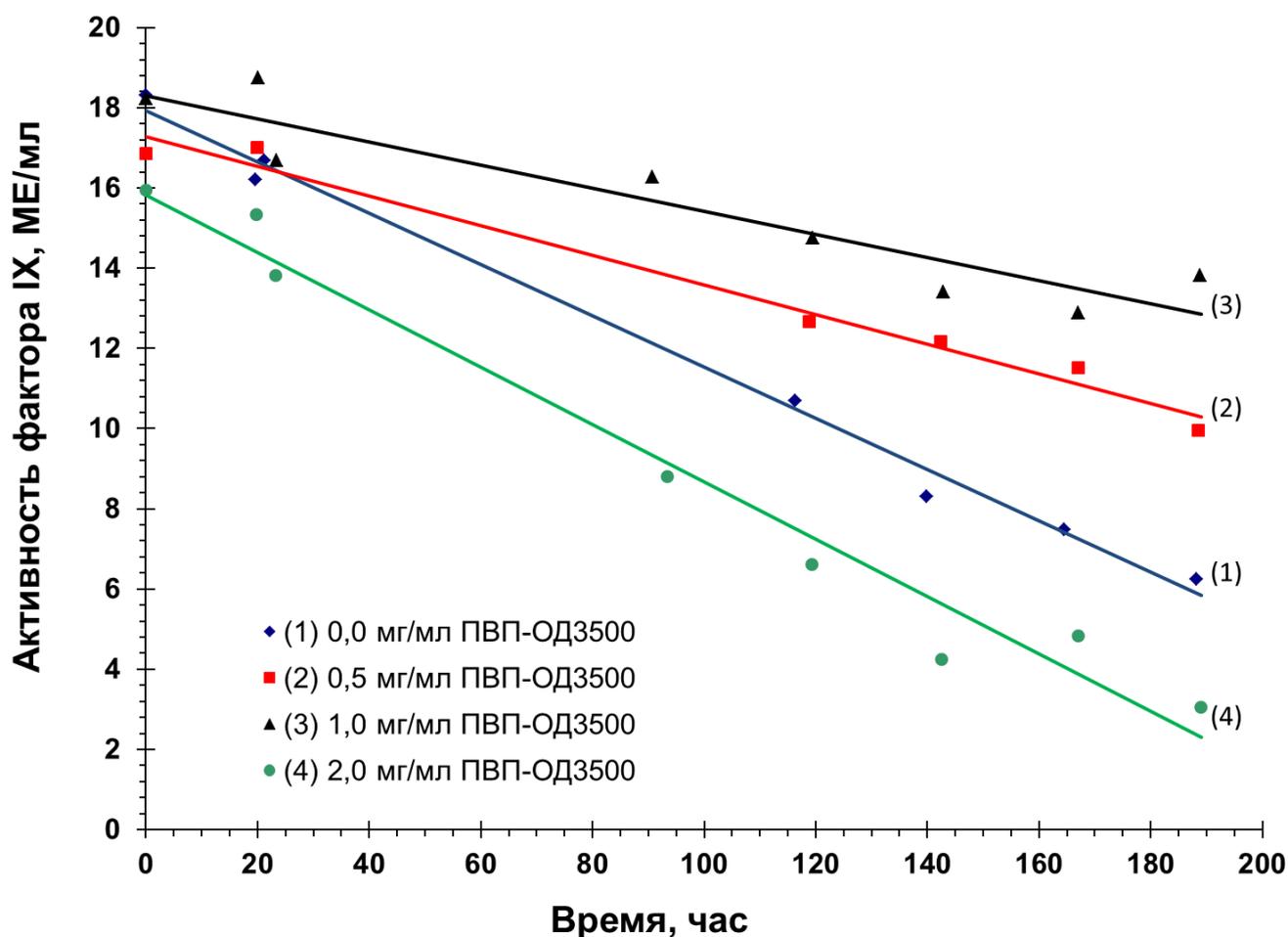


Рисунок 2.65 – Активность препаратов фактора IX на основе полимерных наночастиц (37°C)

На кривых активности фактора IX при 37°C явно видно преимущество включения белка в наночастицы на основе амфифильного полимера N-винилпирролидона. Причем, значение концентрации амфифильного полимера в препарате 1,0 мг/мл является наиболее благоприятным при данной температуре для стабилизации фактора IX, так как значения активности белка при таком соотношении с полимером в любой момент времени преобладали.

Следующие эксперименты по определению активности фактора IX в его наносомальных формах были проведены при температуре, эквивалентной повышенной температуре тела – 42°C (рисунок 2.66).

Температура 42°C является более критичной для хранения концентрата фактора IX. Это видно по более интенсивному падению активности в образцах, по сравнению с опытами при 37°C.

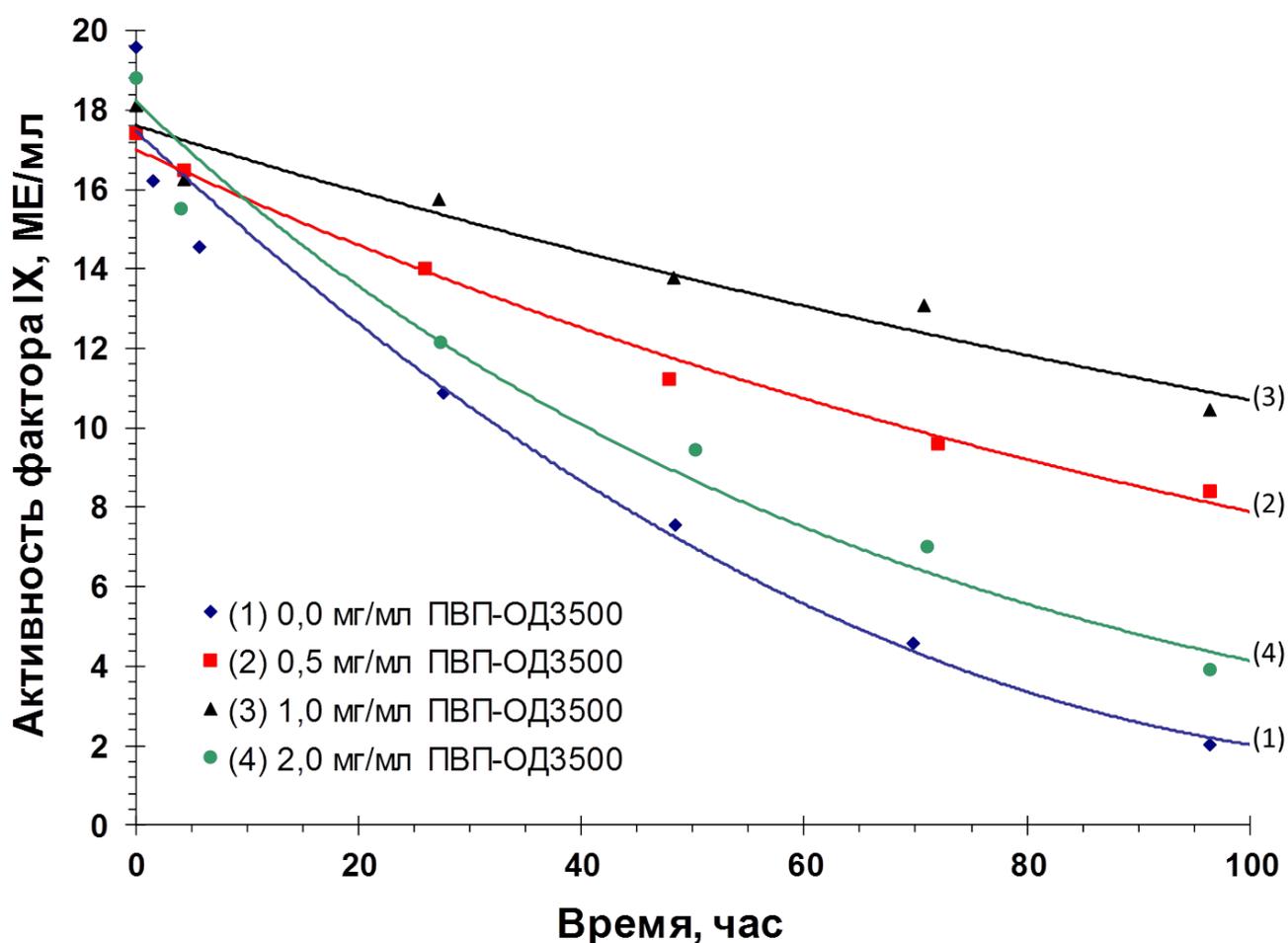


Рисунок 2.66 – Активность препаратов фактора IX на основе полимерных наночастиц (42°C).

При этом хорошо заметно, что и при такой температуре наиболее эффективной для стабилизации фактора IX является концентрация амфифильного полимера ПВП-ОД3500, равная 1,0 мг/мл (соотношение полимера и белка 4:1) Контрольный образец, содержащий чистый фактор IX, в этих условиях теряет активность наиболее стремительно.

Спустя сутки в пробе с чистым фактором IX происходило образование сгустка белка, в то время, как в образцах полимерных наночастиц с включенным фактором IX, образования сгустков не наблюдалось в течение всего времени инкубации. Это наблюдение является еще одним косвенным подтверждением стабилизации белка в присутствии амфифильного полимера.

Как показали проведенные исследования, стабилизирующий эффект включения фактора IX в полимерные наночастицы на основе амфифильного полимера зависит не только от соотношения полимера и белка при получении наночастиц и от концентрации полимера, но и от температуры, при которой инкубировались препараты фактора IX.

Для более наглядного представления зависимости активности фактора от количества амфифильного полимера в системе и температуры инкубации, и сравнения полученных результатов, в таблице 2.25 приведены значения активности фактора IX в его препаратах на 160-ом часу (37°C) и 80-ом часу (42°C) инкубации при разных соотношениях амфифильного полимера и белка.

Таблица 2.25 – Активность препаратов фактора IX после инкубации при различных температурах.

Концентрация ПВП-ОД3500, мг/мл	Массовое соотношение полимер/белок	Активность фактора IX, МЕ/мл	
		37°C, 160 часов	42°C, 80 часов
0,0	0:1	7,72	3,96
0,5	2:1	11,27	9,20
1,0	4:1	13,75	12,94
2,0	8:1	4,50	5,58

Как видно, наибольший стабилизирующий эффект на фактор IX оказывает включение его в наночастицы на основе амфифильного полимера ПВП-ОД3500, при соотношении полимер/белок 4:1 и концентрации амфифильного полимера ~1,0 мг/мл.

На заключительной стадии исследования полимерной наноразмерной формы фактора IX была изучена терапевтическая активность такой новой системы доставки в условиях *in vivo*.

Для экспериментов использовали мышей линии BALB/C nude (самки в возрасте 6–7 недель, вес 16–18г), полученных из филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова НПП «Питомника лабораторных животных» (Московская область, г. Пущино).

Опухоль, вызывающую недостаток факторов свертывания крови (в том числе и фактора IX) формировали путем введения мышам клеток гепатоклеточной карциномы HepG2 (Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАН).

Наночастицы на основе амфифильного полимера ПВП-ОД3500, содержащие суммарно 20 мкг фактора IX вводили внутривенно мышам с опухолью, полученной из клеток гепатоклеточной карциномы HepG2 (n=3).

После этого в течение 7 недель после инъекции препарата измеряли уровень фактора IX в плазме экспериментальных животных методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Для сравнения мышам с опухолью также инъекционно вводили чистый фактор IX в количестве 20 мкг. В качестве контроля определяли уровень фактора IX в плазме здоровых животных, без опухоли.

Результаты исследований показали (рисунок 2.67), что активный синтез фактора IX в плазме мышей с опухолью начался через 7 дней после инъекции препаратов, продлился около месяца, и прекратился через 35 дней после применения препаратов.

Достигаемый при этом уровень фактора IX в плазме, теоретически будет достаточен для перевода острой формы гемофилии В в умеренную форму у человека [305].

Снижение уровня фактора IX в организме экспериментальных животных в конце эксперимента, по всей видимости, связано с началом процессов некроза опухоли, вызванной клетками гепатоклеточной карциномы HepG2.

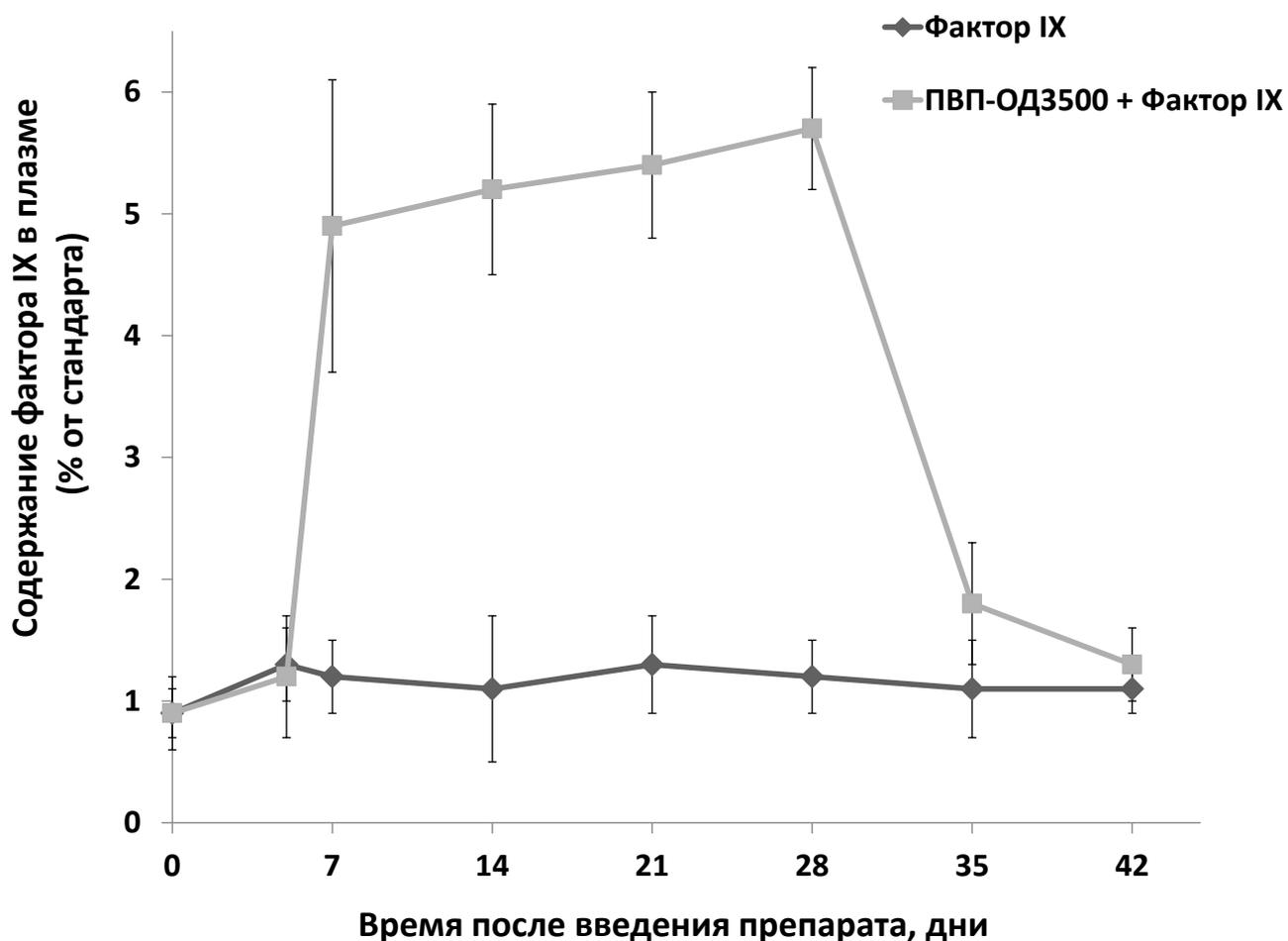


Рисунок 2.67 – Уровень выделяемого фактора IX в плазме крови животных после однократного внутривенного введения чистого фактора XI и полимерных наночастиц на основе амфифильного полимера ПВП-ОД3500 с включенным фактором IX. Уровень фактора IX в сыворотке плазмы здорового человека обычно составляет 15-20% от стандарта

Для определения острой токсичности полимерных наночастиц с включенным фактором IX в ходе эксперимента измерялись также концентрации цитоплазматических ферментов печени в крови животных.

В частности, измеряли содержание аспартатаминотрансферазы (АСТ) – фермента, который находится практически во всех клетках организма, но главным образом в клетках сердца и печени и в меньшей степени в почках и мышцах.

В норме активность АСТ в крови очень низкая. При повреждении тканей печени или мышц она высвобождается в кровь, и таким образом, является показателем повреждений печени.

Содержание АСТ у мышей, получивших инъекции полимерных наночастиц с фактором IX составило 65 ± 12.6 , 48 ± 10.7 , 33 ± 11.8 МЕ/л через 1, 4 и 7 дней после инъекционного введения препарата соответственно, и при этом не наблюдалось статистически достоверных различий со значениями, полученными для контрольной группы животных.

Кроме того, определяли содержание аланинаминотрансфераза (АЛТ) – фермента, который находится во всех клетках организма, главным образом в печени и почках.

В норме активность АЛТ в крови очень низкая. При проблемах с печенью фермент высвобождается в кровоток обычно еще до появления таких характерных симптомов, как желтуха. В связи с этим АЛТ часто используется как показатель повреждения печени.

Содержание АЛТ у мышей, получивших инъекции полимерных наночастиц с фактором IX составило 45 ± 6.7 , 41 ± 9.5 , 42 ± 12.7 МЕ/л через 1, 4 и 7 дней после инъекционного введения препарата соответственно, что также совпадало со значениями, полученными для контрольной группы животных.

Значение среднесмертельной дозы (LD_{50}) определяли на мышах BALB/C (самцы, возраст: 6-7 недель, вес: 18-20 г) путем однократного инъекционного введения полимерных наночастиц с фактором IX в дозах 0,1-100 мг/кг веса мышей (количество особей в группе $n=6$).

Значение LD_{50} методом пробит-анализа по Личфилду и Уилкинсону для полимерных наночастиц с фактором IX составило около $65 \pm 7,4$ мг/кг, что позволяет отнести наносомальную форму фактора IX в соответствии с классификацией К.К. Сидорова [289] к 3 классу умеренно токсичных веществ.

Таким образом, в работе было проведено исследование стабилизации фактора IX свертывания крови путем его включения за счет самосборки в водных средах, гидрофобных взаимодействий и водородных связей в полимерные наночастицы на основе амфифильного полимера N-винилпирролидона.

Получены зависимости активности фактора IX от времени инкубации при разном соотношении полимера и белка в системе. Для более глубокого изучения процесса стабилизации исследование активности фактора IX в его препаратах проводилось при разных температурах, соответствующих нормальной и повышенной температуре тела человека.

Выявлен стабилизирующий эффект при включении фактора IX в полимерные наночастицы по данным снижения активности фактора IX при инкубации его препаратов. При использовании препаратов фактора IX в виде нагруженных полимерных наночастиц значения активности фактора выше, чем у чистого белка, следовательно, его деактивация идет значительно медленнее.

Изучен терапевтический эффект полимерных наночастиц с фактором IX при моделировании гемофилии В в условиях *in vivo*. Показано, что однократное инъекционное введение наночастиц с фактором IX значительно стимулирует процессы выработки собственного фактора IX в организме в течение достаточно долго времени, по сравнению с применением чистого фактора IX.

Определение острой токсичности наночастиц на основе полимера ПВП-ОД3500 с включенным фактором IX, показало, что ЛД₅₀ для данного препарата составляет около 65 мг/кг при однократном инъекционном введении, что позволяет отнести этот препарат к классу умеренно токсичных веществ.

2.5.2.3 Получение и исследование наноразмерных полимерных форм противовоспалительных лекарственных веществ

Как уже было сказано ранее, одним из доступных способов повышения терапевтической эффективности биологически-активных и лекарственных веществ, их биодоступности и уменьшения их токсичности и проявлений побочной активности является включение их в наноразмерные системы доставки на основе амфифильных полимеров.

Такие системы биосовместимы, не вызывают побочных реакций организма, их дизайн, размеры и поверхность легко модифицируются для придания, устойчивости, пролонгированности действия, адресности доставки и других

свойств. Включение лекарственного вещества в состав полимерных наноразмерных частиц защищает его от быстрой деактивации и разрушения в кровеносном русле, что дает возможность использования биологически-активное вещество в более низких дозах.

В данной работе, в качестве модельной лекарственной субстанции для подтверждения возможности создания высокоэффективной наноразмерной полимерной лекарственной формы, было использовано противовоспалительное лекарственное вещество – индометацин (Инд).

Индометацин представляет собой производное индолуксусной кислоты (рисунок 2.68А). Это нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП), широко используемый при лечении и терапии острых и хронических артритов, ревматитов и других воспалительных заболеваний.

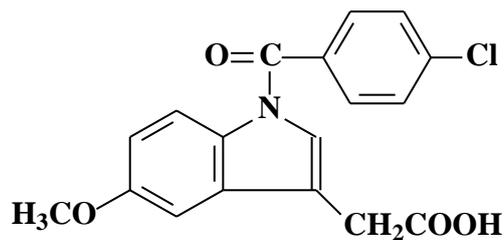
Механизм терапевтического действия индометацина основан на ингибировании циклооксигеназы-2 – фермента, вовлечённого в образование противовоспалительного простагландина PGE2 [306].

Недостатком этого индометацина, как и других нестероидных противовоспалительных агентов, являются выраженные побочные действия, в первую очередь язва желудка (вызывающая появление язвы) активность.

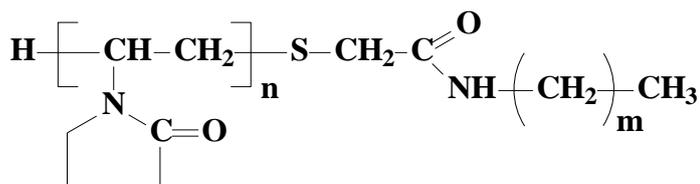
Однако очень хорошая терапевтическая эффективность препаратов индометацина стимулирует разработки его новых лекарственных форм для снижения риска и тяжести побочных эффектов [307, 308].

Имеются данные о повышении противовоспалительной активности и биодоступности индометацина и снижении вероятности возникновения язв после включения индометацина в липосомы различного состава [309]. Похожие результаты получены для комплексов индометацина с липидом фосфатидилхолином [310].

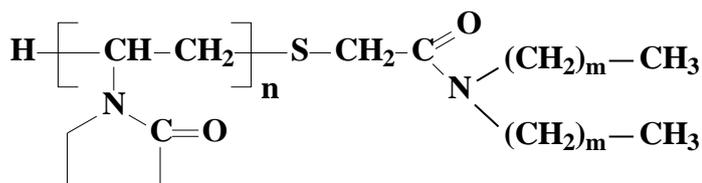
Также, известны разработки систем доставки и контролируемого выделения индометацина, состоящих из микроразмерных или наноразмерных носителей на основе биodeградируемых полимеров [311, 312].



А) Индометацин



Б) Амф-ПВП



В) Амф₂-ПВП

Рисунок 2.68 – Структурные формулы индометацина (А); амфифильного полимера N-винилпирролидона, содержащего концевую n-алкильную группу (Б); амфифильного полимера N-винилпирролидона, содержащего концевую ди(n-алкильную) группу (В)

Поскольку индометацин имеет гидрофобную природу, в данной работе перспективным представлялось его включение за счет гидрофобных взаимодействий в ядро полимерных наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона для возможного повышения эффективности индометацина в виде его новой лекарственной формы.

Как известно, на свойства полимерных наночастиц с включенными БАВ оказывают влияние различные факторы. Поэтому было проведено всестороннее изучение связи строения амфифильных полимеров N-винилпирролидона (величины и соотношения гидрофильного и гидрофобных фрагментов

полимерных макромолекул), концентрации полимера, соотношения полимера и индометацина, способа включения индометацина и получения полимерных наночастиц с характеристиками получаемой лекарственной формы (размер частиц, эффективность включения индометацина).

Для этого были синтезированы две группы амфифильных полимеров N-винилпирролидона с разной молекулярной массой гидрофильного полимерного фрагмента, содержащие n-алкильные или ди(n-алкильные) концевые гидрофобные группы различного строения (рисунок 2.68 Б,В). Определенные значения основных характеристик таких амфифильных полимеров приведены в таблицах 2.26 и 2.27.

Все синтезированные амфифильные полимеры, кроме ПВП-Гек2500 в водных средах при концентрациях выше критической концентрации агрегации (ККА) образовывали сферические наноразмерные частицы, что было подтверждено методами динамического светорассеяния и электронной микроскопии (рисунок 2.69). При этом частицы получали и диализным и эмульсионным методами.

Невозможность получить наночастицы из амфифильного полимера с молекулярной массой полимерного фрагмента 2500 Да и одной концевой гексильной группой, по видимому связана с недостаточной гидрофобностью такого алкильного фрагмента для самоагрегации макромолекул.

Среди исследованных образцов полимеров наблюдалась тенденция к увеличению значений ККА и размеров частиц при росте молекулярной массы гидрофильного полимерного фрагмента и уменьшении длины гидрофобного алкильного радикала, что полностью согласуется с полученными ранее данными и еще раз подтверждает необходимость наличия довольно больших гидрофобных концевых групп для самопроизвольного образования мелких мицеллярных наночастиц. Увеличение гидрофильной части амфифильного полимера приводит к тому, что такие полимеры агрегируют только при более высоких концентрациях с образованием более крупных ассоциатов.

Таблица 2.26 – Амфифильные полимеры N-винилпирролидона с n-алкильными гидрофобными группами

*Средняя погрешность определения диаметра частиц ± 9 нм

Код полимера	Молекулярная масса гидрофильного полимерного фрагмента	Гидрофобный фрагмент	ККА, μM	Размер частиц, нм	
				Диализный метод	Эмульсионный метод
ПВП-ОД8500	8500	октадецил	9.9	184	172
ПВП-ОД5000	5000	октадецил	8.9	131	104
ПВП-ОД3500	3500	октадецил	6.7	77	58
ПВП-ОД2500	2500	октадецил	5.5	55	46
ПВП-ГД3500	3500	гексадецил	11.6	122	102
ПВП-ДД3500	3500	додэцил	18.1	225	212
ПВП-Гек3500	3500	гексил	-	-	-

Таблица 2.27 – Амфифильные полимеры N-винилпирролидона с ди(n-алкильными) гидрофобными группами

*Средняя погрешность определения диаметра частиц ± 9 нм

Код полимера	Молекулярная масса гидрофильного полимерного фрагмента	Гидрофобный фрагмент	ККА, μM	Размер частиц, нм	
				Диализный метод	Эмульсионный метод
ПВП-ДД ₂ 3500	3500	дидодэцил	7.4	187	151
ПВП-ДД ₂ 5000	5000	дидодэцил	8.4	204	162
ПВП-ДД ₂ 9000	9000	дидодэцил	9.8	237	208
ПВП-Гек ₂ 5000	5000	дигексил	15.6	342	325
ПВП-ОД ₂ 5000	5000	диоктадецил	4.3	292	277

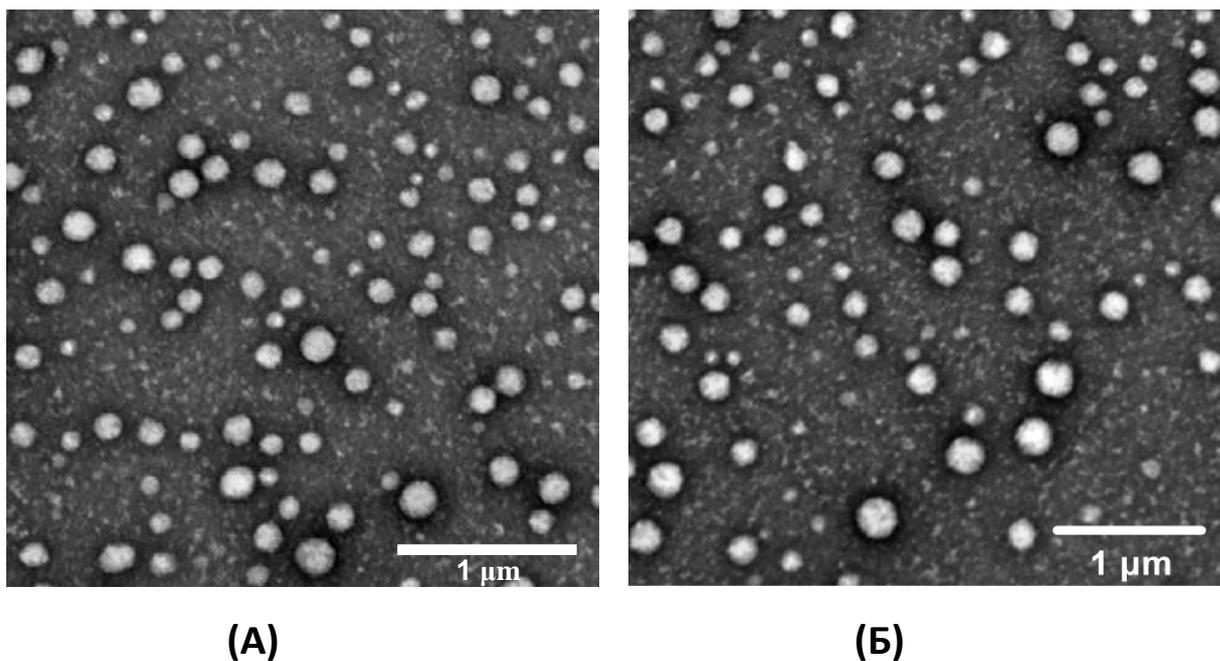


Рисунок 2.69 – Микрофотографии полимерных наночастиц, полученных из амфифильного полимера ПВП-ОД5000 (А) и полимерных частиц из полимера ПВП-ОД5000 с включенным индометацином при соотношении полимера и индометацина 1:1 (Б)

Для включения индометацина в наночастицы из амфифильных полимеров, его растворяли в небольших количествах растворителя, маленькими порциями добавляли к раствору амфифильного полимера в этом же растворителе, а затем готовили полимерные наночастицы с индометацином теми же методами (диализ или эмульсификация с последующим удалением растворителя под вакуумом), что и простые, не нагруженные полимерные агрегаты.

Размер и морфологию полученных наночастиц с индометацином определяли методами динамического светорассеяния и электронной микроскопии (рисунок 2.69Б). Все частицы с индометацином имели сферическую форму.

Для определения остаточных количеств растворителей после получения наночастиц коллоидный раствор анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии. При этом не было обнаружено пиков, соответствующих ни одному использованному растворителю, что свидетельствует об их практически полном удалении из системы при получении наночастиц.

С целью оптимизации получения новой лекарственной формы было изучено влияние строения амфифильного полимера, соотношения полимера и индометацина, типа растворителя, pH среды и используемого метода получения наночастиц с лекарственной субстанцией на размер образующихся частиц и эффективность включения биологически активного вещества.

Для оценки эффективности включения рассчитывали емкость включения по индометацину (ЕВИнд) и эффективность включения индометацина (ЭВИнд).

$$\text{ЕВИнд} = \frac{A - B}{C} \times 100\%,$$

$$\text{ЭВИнд} = \frac{A - B}{A} \times 100\%,$$

где А – общая масса использованного индометацина (г); В – масса невключившегося, не растворенного индометацина, отделенного от коллоидного раствора центрифугированием; С – масса использованного амфифильного полимера. Альтернативно, определяли количество включенного в наночастицы индометацина после отделения осадка несолубилизованного лекарственного вещества методом спектрофотометрии.

Полученные результаты исследования влияния различных факторов на размер полимерных наночастиц с индометацином и эффективность включения биологически активного вещества представлены на рисунках 2.70 - 2.73 и в таблицах 2.28 и 2.29.

Данные таблицы 2.28 показывают влияние типа растворителя на размер наночастиц, полученных диализным и эмульсионным методами, и эффективность включения в них индометацина.

Для метода выпаривания растворителя (эмульсионный метод) использование в качестве растворителя хлороформа позволяет получить частицы с меньшим размером и большей загрузкой лекарственного вещества, по сравнению с диметилформамидом (ДМФА) и тетрагидрофураном (ТГФ).

Таблица 2.28 – Влияние типа растворителя на размер частиц и эффективность включения индометацина в наночастицы на основе амфифильных полимеров Амф-ПВП

*Средняя погрешность определения диаметра частиц ± 11 нм

Образец	Соотношение полимер / индометацин	Растворитель	Размер частиц, нм		Эффективность включения ЭВ _{Инд} , %	
			Диализ	Эмульсия	Диализ	Эмульсия
ПВП-ОД3500	1:1	Хлороформ	-	105	-	42.4
ПВП-ОД3500	1:1	ДМФА	124	118	37.3	39.6
ПВП-ОД3500	1:1	ТГФ	141	134	27.4	31.2
ПВП-ГД3500	1:0.5	Хлороформ	-	97	-	99.1
ПВП-ГД3500	1:0.5	ДМФА	128	105	98.6	90,6
ПВП-ГД3500	1:0.5	ТГФ	146	136	69.5	76,1

Для диализного метода получения наночастиц с индометацином, в свою очередь, наиболее предпочтительным растворителем, обеспечивающим получение наиболее стабильных частиц с наименьшим размером, является ДМФА. Это объясняется тем, что органический растворитель, используемый для растворения амфифильного полимера в диализном методе, в отличие от эмульсионного, должен полностью смешиваться с водой. Таким образом, растворимость полимера в растворителе и растворителя в воде будет влиять на процессы образования наночастиц.

В то же время, определение эффективности включения индометацина в полимерные наночастицы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона строения Амф-ПВП показало, что эффективность загрузки лекарственным веществом при получении наночастиц эмульсионным методом в хлороформе во всех случаях заметно выше, чем при получении наноразмерных агрегатов диализным методом в ДМФА, что подтверждает более высокую

эффективность метода эмульсификации с последующим удалением растворителя под вакуумом. Следовательно, именно этот способ является предпочтительным для инкапсуляции индометацина.

Таблица 2.29 – Влияние концентрации и строения полимера, соотношения полимер / индометацин и метода получения на размер наночастиц на основе амфифильных полимеров Амф-ПВП с индометацином (C_p – концентрация амфифильного полимера

*Средняя погрешность определения диаметра частиц ± 10 нм

Образец	Соотношение полимер / индометацин	Размер частиц, нм			
		Диализ		Эмульсия	
		$C_p \sim$ ККА	$C_p=10$ мг/мл	$C_p \sim$ ККА	$C_p=10$ мг/мл
ПВП-ОД3500	1.0:0.0	77	287	58	245
ПВП-ОД3500	1.0:0.5	92	168	71	139
ПВП-ОД3500	1.0:1.0	116	124	98	105
ПВП-ОД8500	1.0:0.0	184	470	172	416
ПВП-ОД8500	1.0:0.5	198	325	188	262
ПВП-ОД8500	1.0:1.0	212	206	196	204
ПВП-ДД3500	1.0:0.0	230	540	198	506
ПВП-ДД3500	1.0:0.5	265	412	238	350
ПВП-ДД3500	1.0:1.0	292	276	262	195

Данные таблицы 2.29 демонстрируют влияние массового соотношения индометацина и амфифильного полимера строения Амф-ПВП на размер получаемых наночастиц. Увеличение количества индометацина в наночастицах по отношению к амфифильному полимеру увеличивает размер нагруженных лекарственной субстанцией частиц. Более того, дальнейшее увеличение соотношения индометацина к полимеру выше 1:1 приводит к резкому увеличению размеров агрегатов и к потере водосовместимости всей коллоидной системой, из-за гидрофобности индометацина. Поэтому, во всех следующих экспериментах по получению наночастиц с индометацином, его соотношение с амфифильными полимерами было ниже, чем 1:1.

На рисунке 2.70 представлена зависимость эффективности включения индометацина в наноразмерные частицы из полимеров с концевой *n*-алкильной группой, от количества добавляемой в систему лекарственной субстанции. Как видно, эффективность включения достигает практически 100% при соотношении Инд:Амф-ПВП равном 0.5:1 или меньше, что является свидетельством полной солубилизации активного агента амфифильными полимерами. Эти результаты соответствовали наблюдениям в ходе экспериментов, когда получаемые коллоидные системы сохраняли стабильность долгое время, не образуя осадков. Увеличение количества добавляемого в систему индометацина ведет к постепенному появлению осадка в системе. В результате эффективность включения лекарственного вещества значительно снижается при повышении соотношения индометацин / полимер от 0.5 к 1 до 1 к 1.

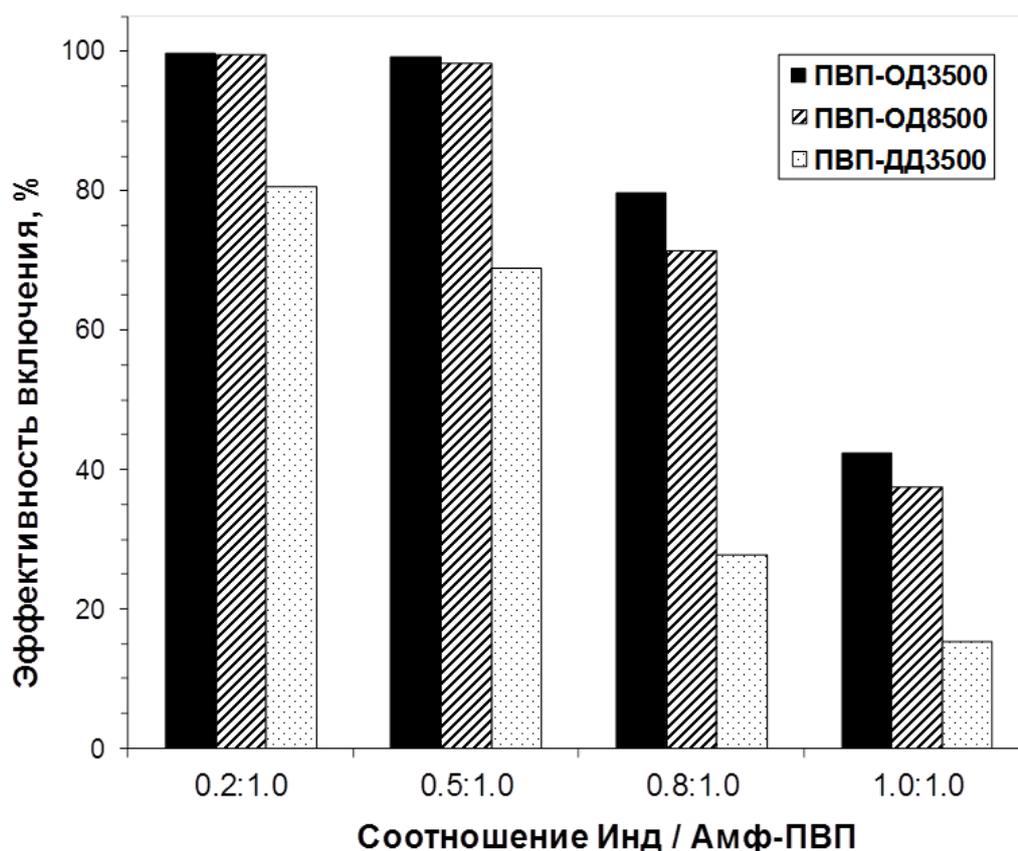


Рисунок 2.70 – Влияние массового соотношения индометацина (Инд) и амфифильного полимера *N*-винилпирролидона (Амф-ПВП) на эффективность включения лекарственного вещества в наночастицы

Влияние строения амфифильных полимеров на эффективность включения индометацина также продемонстрировано на рисунке 2.70. Наилучшие результаты были получены для полимеров строения Амф-ПВП с низкими молекулярными массами гидрофильной полимерной части и с самой большой концевой октадецильной гидрофобной группой. Такая картина полностью соотносится с результатами исследования процессов самоагрегации амфифильных полимеров методом флуоресцентного анализа. Полимеры с таким строением имеют самые низкие значения ККА и могут легче образовывать наночастицы и солюбилизировать индометацин за счет своего оптимального гидрофильно-гидрофобного баланса. Наиболее заметно это для полимера ПВП-ОД3500, с применением которого даже при массовом соотношении с индометацином 1:1 удалось получить наночастицы с относительно высокой степенью загрузки около 42,4%.

Кроме того, включение индометацина в наночастицы из полимеров строения Амф-ПВП также влияет и на размер наночастиц. Результаты исследования методом динамического светорассеяния показывают, что при низких концентрациях амфифильного полимера (около значений ККА) размер наночастиц увеличивается при увеличении количества вводимого в систему лекарственного вещества. При этом размер нагруженных индометацином частиц во всех случаях не превышал 200 нм (рисунок 2.69Б), а распределение частиц по размерам идентично распределению «пустых» наночастиц.

В случае высоких концентраций полимера (в десятки раз больше ККА) введение индометацина в систему ведет к значительному снижению размера нагруженных частиц до значений, характерных для систем с низкими концентрациями амфифильного полимера. Можно предположить, что в этом случае введение довольно гидрофобных молекул индометацина в систему упорядочивает и компактизирует структуру коллоидных ассоциатов за счет гидрофобных взаимодействий.

При небольшом соотношении индометацина и амфифильного полимера, то есть при низком содержании гидрофобного активного агента в системе, сила

взаимодействия гидрофильных полимерных цепей макромолекул превалирует, и вызывает образование крупных ассоциатов. Но с увеличением концентрации гидрофобного лекарственного вещества в смеси, основной вклад уже вносят гидрофобные взаимодействия между индометацином и гидрофобными группами амфифильного полимера.

В результате вместо больших полимерных агрегатов сложного строения образуются более мелкие нагруженные индометацином полимерные наночастицы мицеллярного типа.

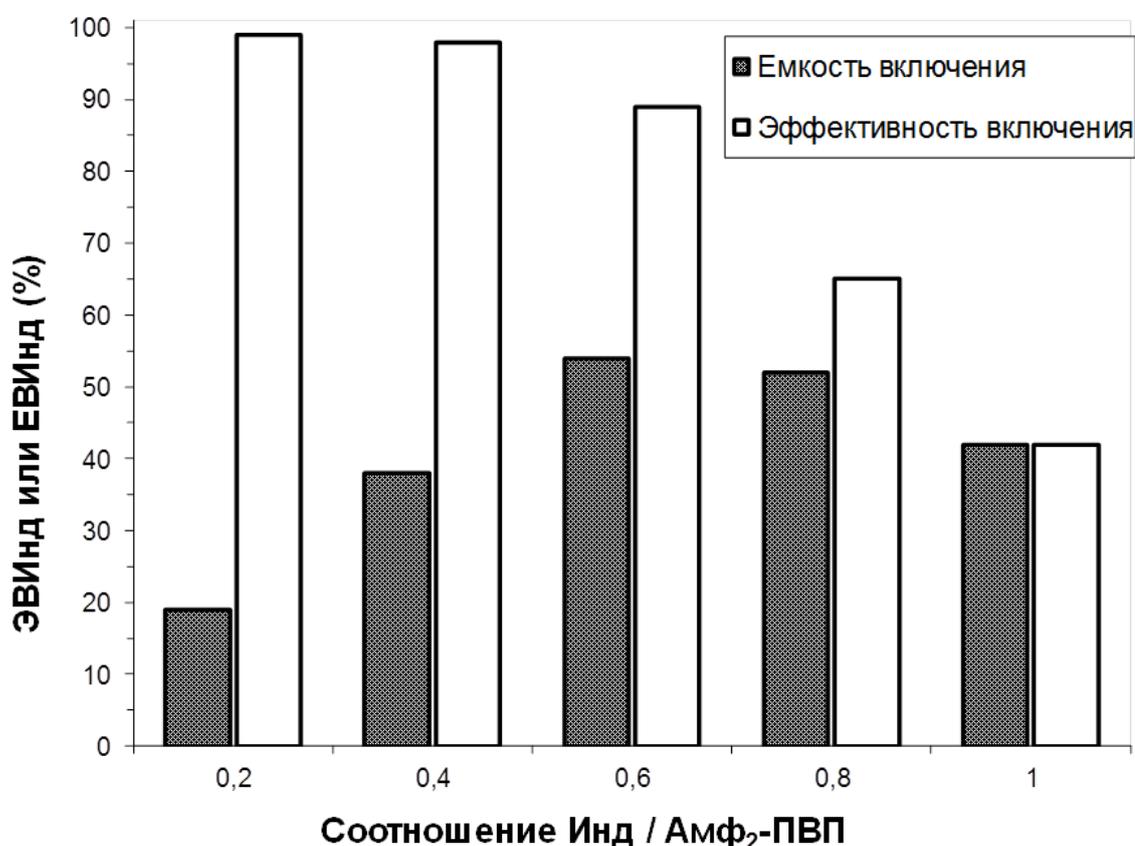


Рисунок 2.71 – Влияние массового соотношения индометацина (Инд) и амфифильного полимера N-винилпирролидона (Амф₂-ПВП) на эффективность включения лекарственного вещества в наночастицы (на примере полимера ПВП-ДД₂5000)

На рисунке 2.71 показано влияние количества индометацина на эффективность загрузки наночастиц из амифильного полимера строения Амф₂-ПВП (ПВП-ДД₂5000). Емкость загрузки увеличивается с ростом добавляемой

концентрации лекарственного вещества и достигает максимально ~50% с дальнейшим снижением до ~40 %. С другой стороны эффективность включения индометацина достигает практически 100% при относительно низкой емкости загрузки (<40%). Это показывает, что индометацин практически полностью инкапсулируется внутри ядра полимерных наночастиц. Дальнейшее увеличение количества индометацина снижает эффективность включения из-за дестабилизации системы.

Также как и амфифильные полимеры с гидрофобным н-алкильным фрагментом (Амф-ПВП) полимеры с диалкильной концевой группой при повышении емкости включения выше 50% образуют за счет агрегации и гидрофобных взаимодействий частицы большого размера и сложной структуры.

Наибольшей эффективности включения индометацина для диалкильных амфифильных полимеров Амф₂-ПВП также удалось достичь получением их эмульсионным методом.

Влияние строения амфифильных полимеров с диалкильными гидрофобными фрагментами на характеристики образующихся наночастиц также было изучено.

На рисунке 2.72А представлены данные, свидетельствующие о том, что молекулярная масса гидрофильного полимерного фрагмента ПВП оказывает незначительное влияние на емкость и эффективность включения индометацина.

С другой стороны, увеличение длины диалкильной концевой гидрофобной группы заметно увеличивает эффективность включения лекарственного вещества (рисунок 2.72Б). Наилучшие результаты получены для полимеров ПВП-ОД₂5000 и ПВП-ДД₂5000, для которых они лишь немного уступают амфифильному полимеру с н-алкильной гидрофобной группой ПВП-ОД5000.

При этом полученные данные полностью соответствуют результатам, полученным при изучении ККА этих полимеров, и объясняются оптимальным гидрофильно-гидрофобным балансом данных полимеров.

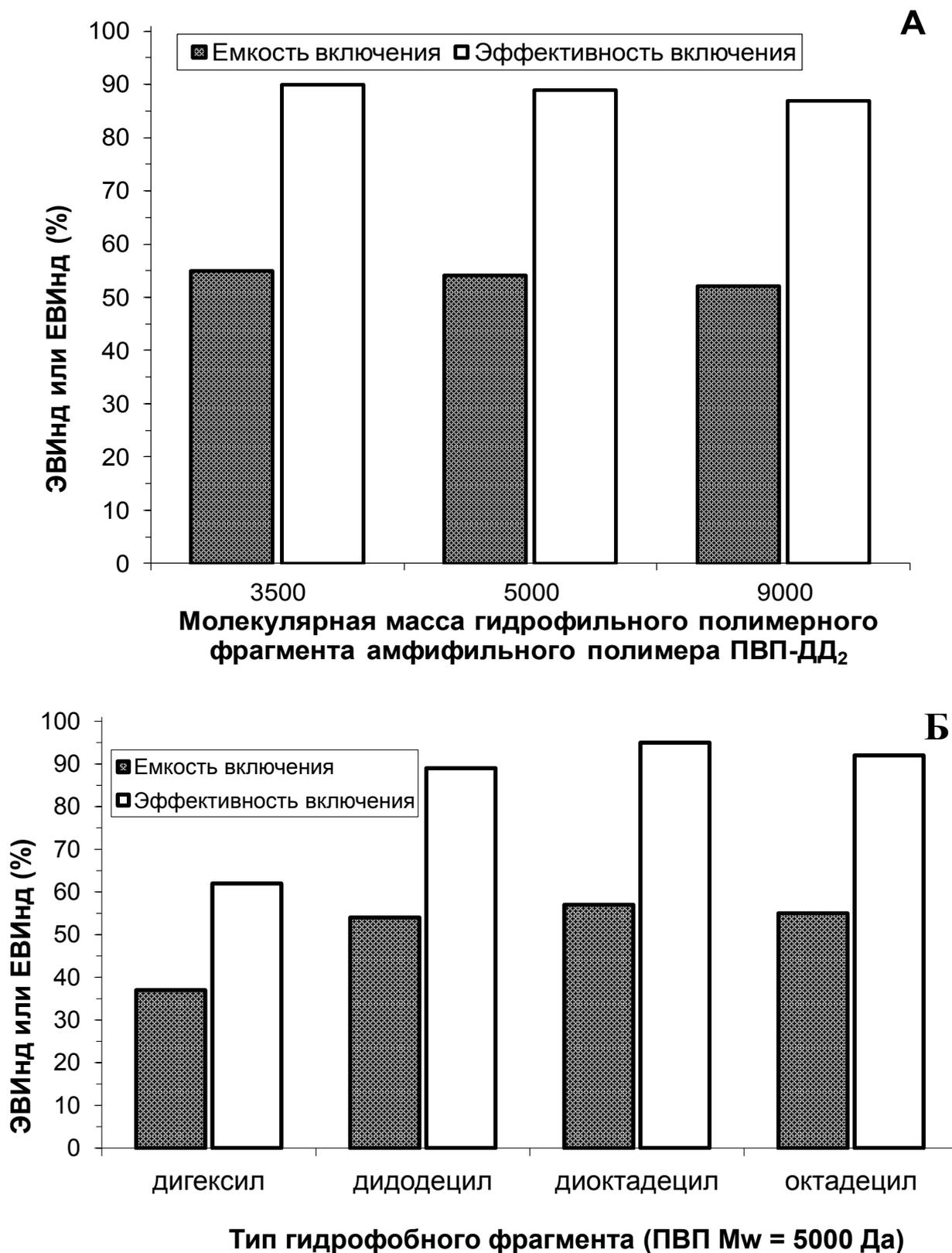


Рисунок 2.72 – Влияние строения гидрофильного (А) и гидрофобного (Б) фрагментов амфифильных полимеров N-винилпирролидона (Амф-ПВП и Амф₂-ПВП) на емкость и эффективность включения индометацина в наночастицы (соотношение индометацин / полимер – 0,6 мг/мг)

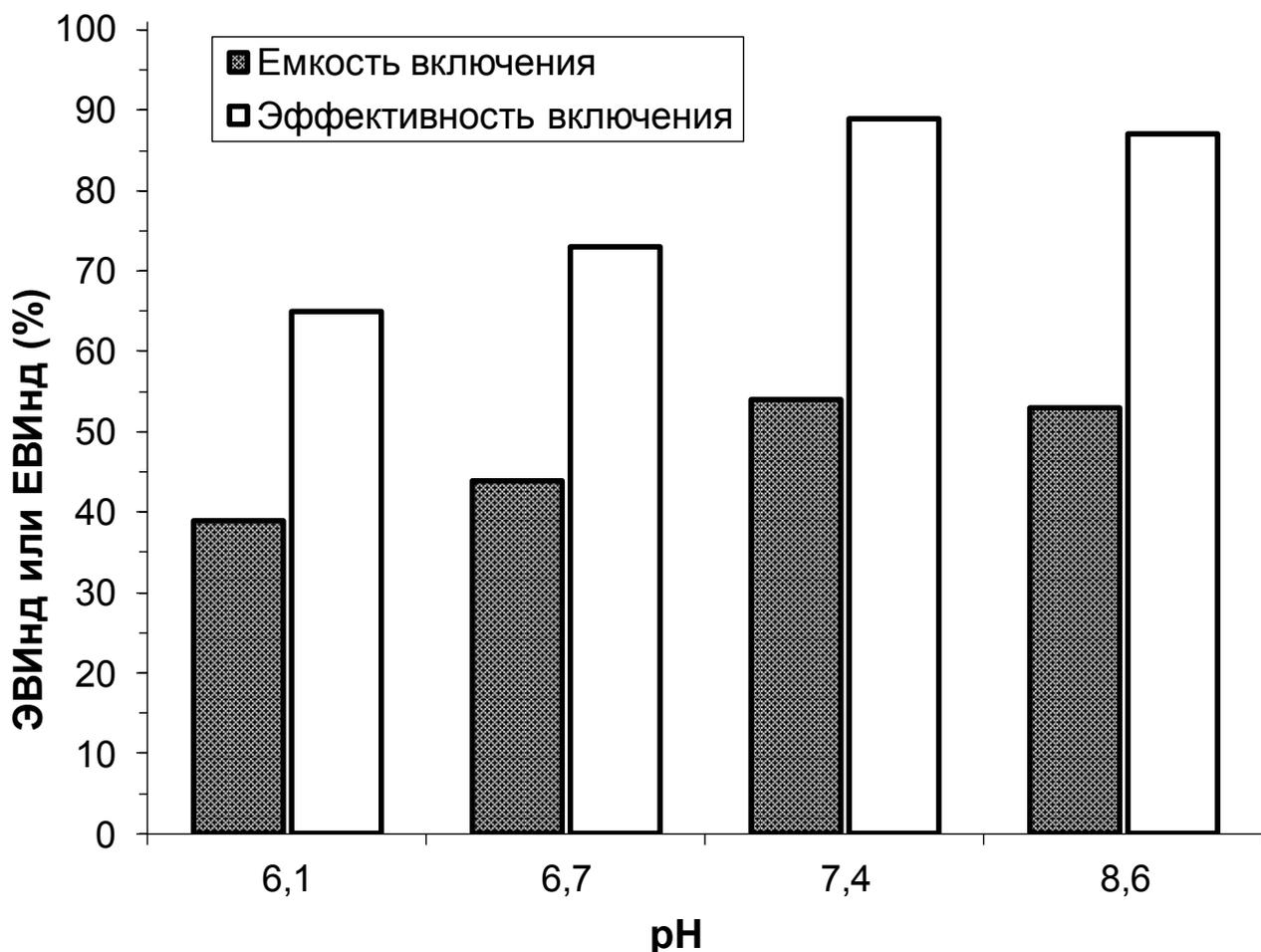


Рисунок 2.73 – Влияние рН среды на емкость и эффективность включения индометацина в наночастицы из полимера ПВП-ДД₂ (соотношение индометацин / полимер – 0,6 мг/мг)

На рисунке 2.73 приведены данные по влиянию рН среды буферного раствора на эффективность и емкость включения индометацина. И эффективность, и емкость при более низких значениях рН 6.1 и 6.7 были ниже, чем при рН 7.4 и 8.8. При низких значениях рН водородные связи между полимерным фрагментом амфифильного полимера и индометацином достаточно сильны, чтобы удержать определенные количества лекарственного вещества от попадания в гидрофобное ядро полимерных агрегатов. При увеличении рН среды до 7.4 эффективность и емкость включения индометацина возрастает, так как при этих условиях практически для всех молекул лекарственной субстанции

становится энергетически выгоднее включаться в ядро полимерных частиц за счет гидрофобных взаимодействий.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить оптимальные условия получения наиболее афинных к индометацину полимерных наночастиц, загруженных этим лекарственным веществом, позволяющие лекарственную форму с высокой эффективностью включения активного агента [311]. Полученные коллоидные растворы нагруженных индометацином наночастиц из амфифильных полимеров N-винилпирролидона обладали высокой стабильностью на протяжении долго времени без видимого изменения состава и выпадения осадка. Следует отметить, что приготовленные полимерные наночастицы с индометацином выдерживают лиофилизацию. После добавления воды лиофилизат легко редиспергируется с образованием устойчивой гомогенной коллоидной системы. При хранении в течение 6 месяцев при комнатной температуре лиофилизированная форма сохраняла седиментационную и агрегационную устойчивость. Общее содержание индометацина и размеры наночастиц в течение такого периода наблюдения практически не изменялись.

На следующем этапе было проведено исследование кинетики выделения индометацина из полученных наночастиц в условиях *in vitro*, так как кинетика выделения лекарственного вещества является одним из важных параметров системы доставки, который позволяет моделировать ее поведение в организме.

Исследование проводили в мешках для диализа в фосфатном буферном растворе (рН 7.4, 37°C). На рисунке 2.74 представлен профиль выделения со временем индометацина из наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона различного строения, с одной концевой n-алкильной гидрофобной группой (Амф-ПВП). Так как ускорение выделения индометацина в начальный этап времени было минимальным или отсутствовало вовсе, можно сделать вывод о том, что удалось получить полимерные наночастицы без остаточных количеств лекарственного вещества на поверхности носителей. В то время как «чистый» индометацин показывал выделение в количестве 98% за

первые 24 часа, индометацин, включенный во внутреннее ядро полимерных наночастиц, демонстрировал контролируемое выделение в количестве 45-50%, в срок до 10 дней. Скорость выделения индометацина сильно зависела от начального содержания загруженной лекарственной субстанции. Поскольку увеличение содержания гидрофобного индометацина в наночастицах усиливает его взаимодействие с гидрофобными алкильными фрагментами амфифильного полимера, оно может вызывать снижение скорости выделения и количества выделяемого лекарственного вещества.

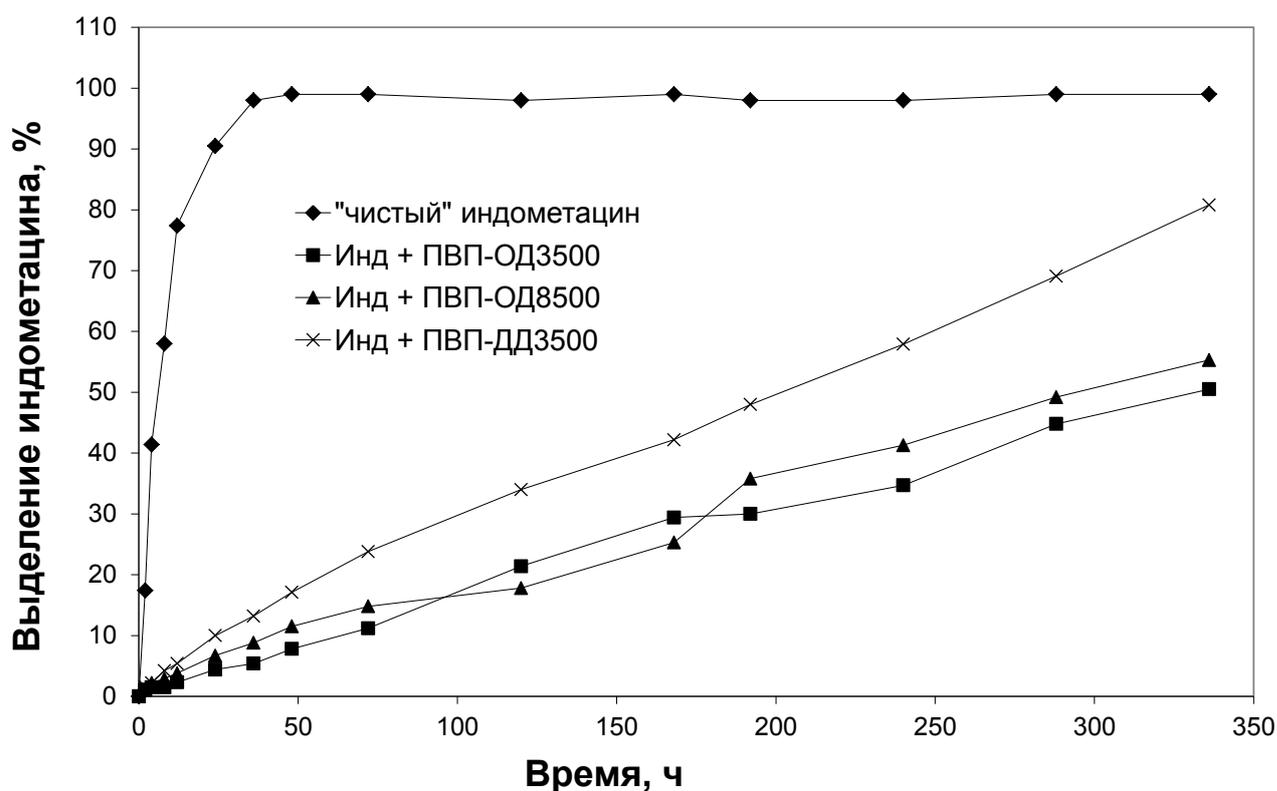


Рисунок 2.74 – Профили выделение индометацина из наночастиц на основе амфифильных полимеров Амф-ПВП в условиях *in vitro* (буферный раствор, рН 7.4, 37°C)

Для выяснения влияния размеров гидрофобного и гидрофильного фрагментов амфифильного полимера на профиль выделения индометацина, был проведен анализ его высвобождения из частиц на основе полимеров ПВП-ОД3500 и ПВП-ОД8500, которые содержат одинаковую октадецильную гидрофобную группу, но гидрофильные полимерные фрагменты с разной молекулярной массой, и полимеров ПВП-ОД3500 и ПВП-ДД3500 с одинаковой молекулярной массой

полимерной водорастворимой части, но разными концевыми гидрофобными фрагментами (октадецильным и додецильным соответственно) (рисунок 2.74).

Профили выделения из таких нагруженных индометацином наночастиц четко показывают, что основным фактором влияющим на высвобождение лекарственного вещества является афинность гидрофобного ядра полимерной наночастицы, образованного алкильными фрагментами амфифильного полимера и активного вещества. Поэтому наноразмерные частицы, приготовленные из полимеров с более длинным гидрофобным фрагментом (октадецильным), во всех случаях показывают более медленное выделение. Молекулярная масса водорастворимого полимерного фрагмента не оказывает заметного влияния на выделение индометацина из наночастиц.

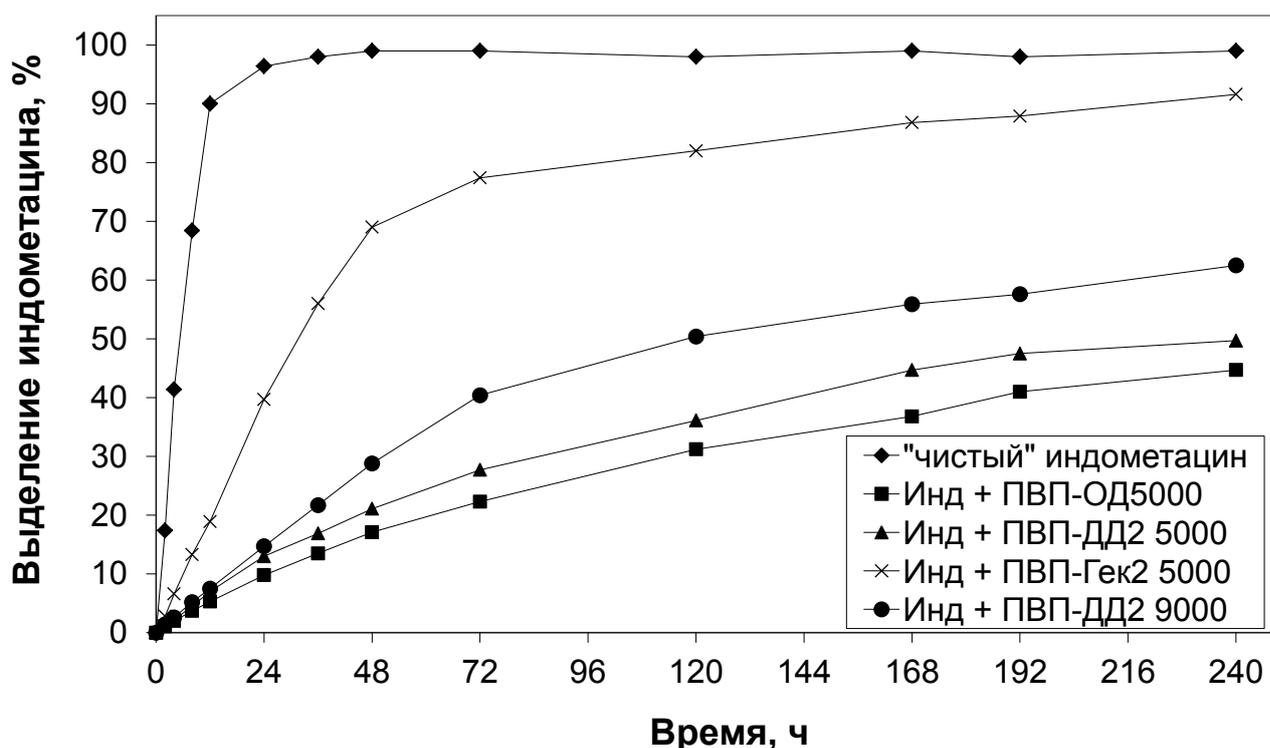


Рисунок 2.75 – Профили выделения индометацина из наночастиц на основе амфифильных полимеров Амф₂-ПВП в условиях *in vitro* (буферный раствор, рН 7.4, 37°C)

Для сравнения была также исследована кинетика выделения индометацина из наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих диалкильные гидрофобные фрагменты (рисунок 2.75). Полученные

профили выделения для таких полимеров носят тот же характер, что и полученные ранее для полимеров с н-алкильной концевой гидрофобной группой.

В целом скорость выделение лекарственного вещества уменьшается с увеличением гидрофобности образующих внутреннее ядро частиц фрагментов амфифильных полимеров. Профили выделения диалкильных амфифильных производных также указывают на то, что практически весь индометацин содержится в гидрофобном ядре полимерных носителей.

Таким образом, изучение кинетики выделения *in vitro* индометацина из полимерных наночастиц, образованных амфифильными полимерами N-винилпирролидона с разным строением гидрофильного и гидрофобного фрагмента показало, что при определенных условиях, полимеры с оптимальным строением образуют наночастицы, которые являются подходящими носителями для индометацина, так как обеспечивают отличную емкость и эффективность включения лекарственного вещества, а так же его пролонгированное и контролируемое выделение [313].

Поскольку важнейшую роль при разработке и применении новой лекарственной формы играет ее фармакокинетика и распределение в организме, были изучены биодоступность и биораспределение новой наноразмерной полимерной системы доставки индометацина в условиях *in vivo*. В качестве наносомальной формы индометацина в эксперименте использовали наночастицы на основе амфифильного полимера N-винилпирролидона с молекулярной массой полимерного гидрофильного фрагмента 3500 Да и одной концевой октадецильной гидрофобной группой (ПВП-ОД 3500). Соотношение полимер – индометацин в препарате составляло 1:0,25 (в/в), а средний размер частиц – 162 ± 28 нм. В качестве препарата сравнения использовали суспензию свободного индометацина. Исследования проводили на крысах-самцах Wistar, препараты вводили внутривенно, а дозы индометацина во всех случаях были равны и составляли 10 мг/кг.

Полученные результаты свидетельствуют, что новая форма введения в виде полимерных наночастиц оказывает значительное влияние на параметры биораспределения и на биодоступность индометацина.

На рисунке 2.76 показано изменение концентрации индометацина в крови экспериментальных животных (крысы Wistar) в течение 24 часов после однократного внутривентриального введения препаратов индометацина в виде полимерных наночастиц на основе амфифильного полимера N-винилпирролидона ПВП-ОД 3500 и в виде свободной лекарственной субстанции (доза индометацина в препаратах 10 мг/кг).

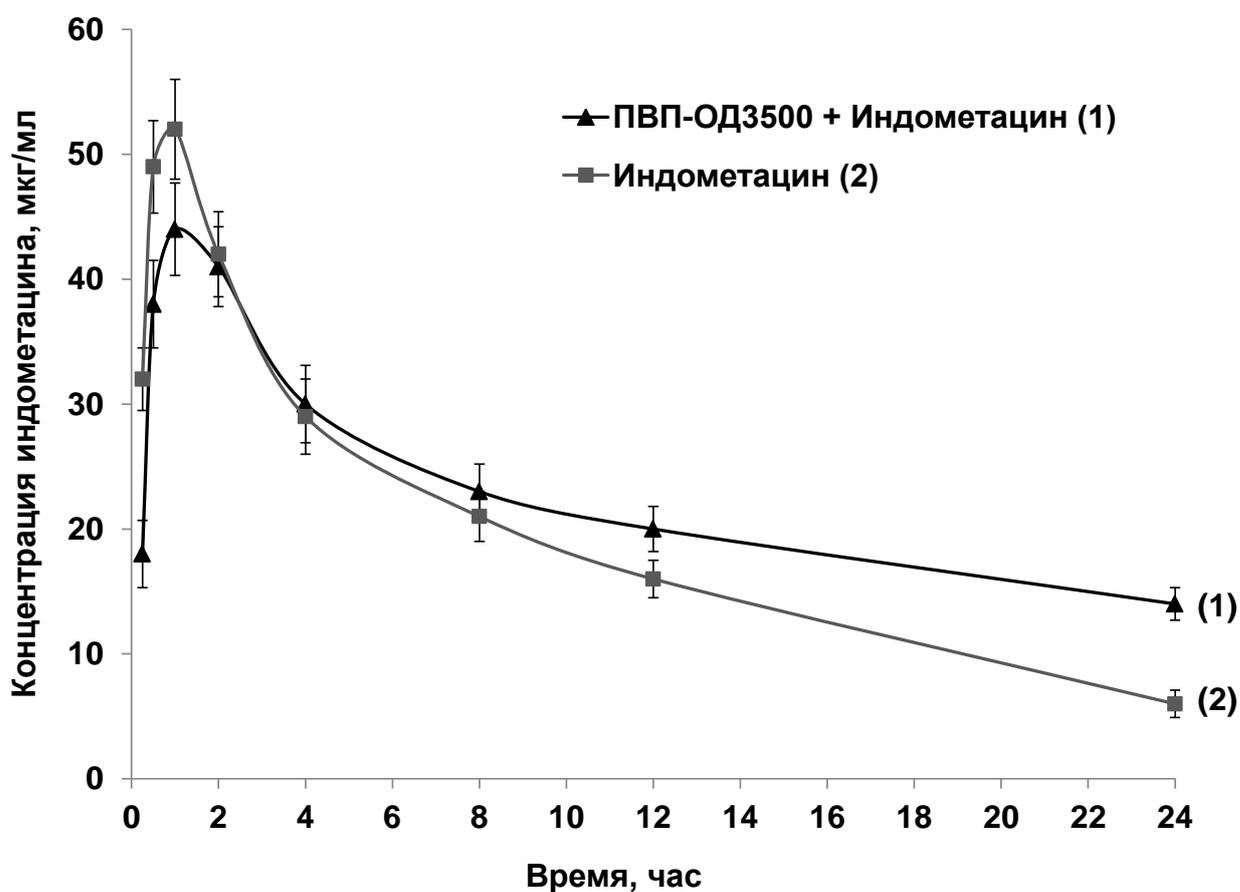


Рисунок 2.76 – Концентрация индометацина в плазме крови крыс после внутривентриального введения его стандартной и наносомальной формы (доза индометацина 10 мг/кг)

В первый час после введения препаратов концентрация индометацина в крови, в случае применения полимерной лекарственной формы несколько ниже по сравнению с применением свободной лекарственной субстанции. При этом в обоих случаях максимум концентрации индометацина достигался приблизительно

через 1ч и составил $51,82 \pm 6,47$ мкг/мл для чистого индометацина и $43,93 \pm 5,08$ мкг/мл для наночастиц на основе амфифильного полимера. Начиная с 4 часов после введения препаратов, наносомальная полимерная форма индометацина, наоборот, обеспечивает его более высокую концентрацию в плазме крови вплоть до окончания эксперимента через 24 часа после введения препаратов. В целом, изменения концентрации индометацина в крови в обоих случаях носят двухэкспоненциальный характер.

Значения определенных основных фармакокинетических параметров индометацина в форме полимерных наночастиц и в свободном виде представлены в таблице 2.30.

Таблица 2.30 – Фармакокинетические показатели индометацина в крови после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг в виде простой субстанции и в виде полимерных наночастиц на основе полимера ПВП-ОД 3500

Параметр	Обозначение (размерность)	Величина	
		Чистый индометацин	Наночастицы ПВП-ОД3500 с индометацином
Площадь под кривой «концентрация – время»*	AUC (мкг·ч/мл)	$516,70 \pm 68,414$	$738,91 \pm 110,16$
Площадь под кривой кривой «произведение времени на концентрацию – время»*	AUMC (мкг·ч ² /мл)	$5982,74 \pm 1026,09$	$160126,23 \pm 6121,12$
Общий (кажущийся) объём распределения*	Vd (мл/кг)	$202,63 \pm 57,54$	$298,34 \pm 39,89$
Общий клиренс	CL (мл/ч)	$15,05 \pm 2,12$	$15,12 \pm 2,03$
Среднее время удержания *	MRT (ч)	$12,01 \pm 0,93$	$21,46 \pm 4,51$

*Достоверное различие ($p < 0,05$)

Форма в виде полимерных наночастиц с иммобилизованным индометацином обеспечивает более низкую скорость элиминации активной субстанции, и, как следствие, более высокие значения среднего времени удержания индометацина в крови (MRT), площади под кривой «концентрация индометацина в крови – время» (AUC), площади под кривой «произведение времени на концентрацию индометацина в крови – время» AUMC и общего (кажущегося) объема распределения V_d по сравнению с простой формой индометацина.

Такой эффект можно объяснить контролируемым постепенным выделением индометацина из полимерных наночастиц и пролонгированной циркуляцией полимерных наночастиц *in vivo*.

Сравнение полученных значений фармакокинетических параметров свидетельствует о повышении биодоступности индометацина при введении его в организм в виде наносомальной полимерной формы.

Для исследования распределения индометацина, включенного в полимерные наночастицы, в органах и тканях организма определяли содержание этого лекарственного вещества в сердце, печени, почках и легких экспериментальных животных (крысы Wistar) через 0.5, 1, 4 и 8 часов после однократного внутрибрюшинного введения наносомального препарата, содержащего дозу индометацина 10 мг/кг. Для сравнения изучали накопление индометацина в органах после введения его в чистом виде в эквивалентной дозе. Рассчитанные общие количества индометацина, аккумулированного в каждом из органов за 8 часов (AUC_{tiss}) представлены на рисунке 2.77.

Как было установлено, статистически значимая разница ($p < 0,05$) в распределении индометацина в органах крыс после применения его наносомальной и обычной формы наблюдается только для печени и почек, тогда как для сердца и легких такое достоверное различие отсутствует. Снижение количества лекарственного вещества, захватываемого клетками ретикуло-эндотелиальной системы в печени и органами выделения (почками) при использовании полимерных наночастиц с включенным индометацином полностью

согласуется с увеличением среднего времени удерживания действующего вещества в крови (MRT) при введении иммобилизованной формы индометацина по сравнению с его простой формой ($21,46 \pm 4,51$ часа против $12,01 \pm 0,93$ часа соответственно).

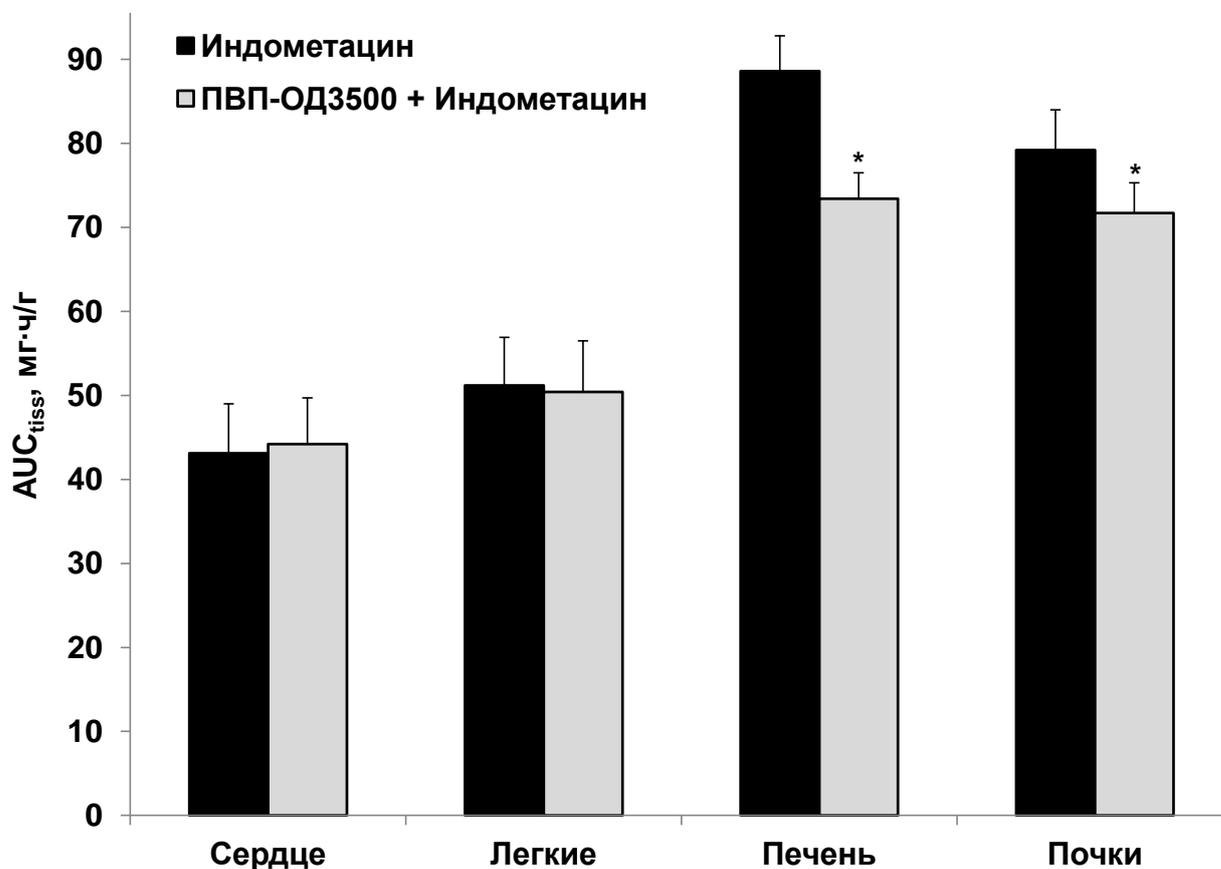


Рисунок 2.77 – Общее накопление индометацина в различных органах крыс спустя 8 часов после внутрибрюшинного введения его стандартной и наносомальной формы (доза индометацина 10 мг/кг). *Достоверное различие ($p < 0,05$)

Таким образом, полимерные наночастицы на основе амфифильного полимера N-винилпирролидона (ПВП-ОД 3500) не только уменьшают захват включенного в них индометацина печенью и почками, но также обеспечивают длительное удержание лекарственного вещества в крови экспериментальных животных. Наблюдаемое в ходе исследования повышение биодоступности индометацина в случае использования его наноразмерной полимерной формы введения позволяет предположить, что терапевтический эффект наносомальной формы может быть достигнут при меньшей дозе самого действующего вещества,

а, следовательно, при этом значительно снижается вероятность проявления токсичности индометацина и возникновения побочных эффектов.

Для изучения биосовместимости полученных полимерных наночастиц из амфифильных поли-N-винилпирролидонов, содержащих индометацин, в данной работе было проведено исследование токсичности этой лекарственной формы.

Определение цитотоксичности полимерных наночастиц с включенным индометацином проводили в условиях *in vitro* на нормальных фибробластах человека и сравнивали с цитотоксичностью свободного индометацина, не включенного в полимерные наночастицы, при той же его концентрации. Количество выживших после инкубации клеток определяли с помощью МТТ-теста. Выживаемость фибробластов рассчитывали в процентах по сравнению с контролем, который не обрабатывали ни наночастицами, ни чистым индометацином.

Рисунок 2.78 показывает результаты проведенных после 3-дневной инкубации клеток тестов. Как можно заметить, свободный индометацин демонстрировал более высокую цитотоксическую активность по сравнению с наночастицами из амфифильного полимера N-винилпирролидона, содержащими инкапсулированный индометацин, при одинаковом его содержании в обоих препаратах.

При этом цитотоксичность полимерных наночастиц с увеличением их концентрации и, соответственно, увеличением содержания в них индометацина, росла менее выражено, по сравнению со свободным индометацином, для которого наблюдалось пропорциональное увеличение цитотоксичности от концентрации.

Отсюда можно сделать вывод, что можно эффективно уменьшить прямое взаимодействие индометацина с клетками введением его в гидрофобное ядро наночастиц. Одновременно, внешняя оболочка частиц из водорастворимых цепей ПВП значительно уменьшает взаимодействие уже самих наночастиц с клетками, делая наночастицы незаметными для клеток.

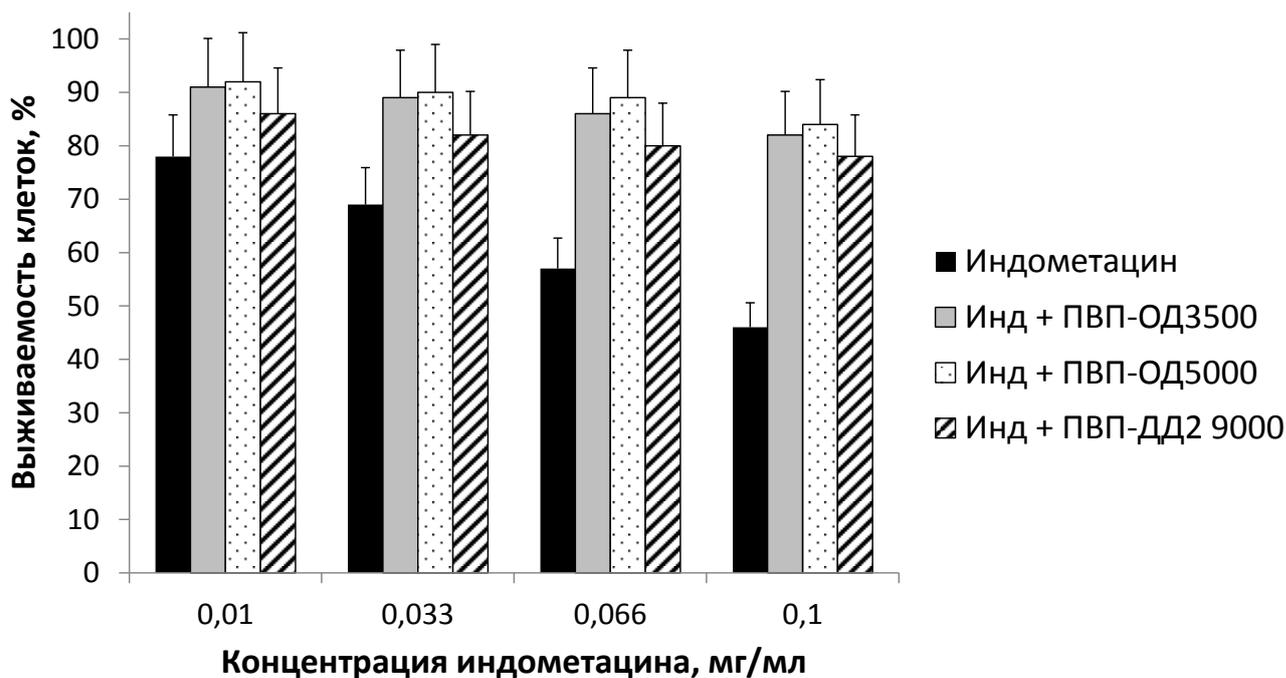


Рисунок 2.78 – Цитотоксичность полимерных наночастиц с включенным индометацином по отношению к фибробластам человека

Кроме того, длительное выделение пониженных доз индометацина из полимерных наночастиц, также может способствовать выживанию клеток. Таким образом, наночастицы из амфифильных полимеров N-винилпирролидона могут быть использованы в качестве носителей биологически активных и лекарственных веществ, не обладающих какой либо существенной цитотоксичностью.

На следующей стадии исследования было проведено изучение острой токсичности наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих включенный индометацин. Острую токсичность препарата изучали на мышах линии BALB/C и крысах Wistar. Исходный вес животных колебался в пределах 20-22 г для мышей и 150-180 г для крыс. В эксперимент отбирали клинически здоровых животных, которых предварительно выдерживали на 14-ти дневном карантине. Опытные группы состояли из 6-8 животных. При однократном внутрибрюшинном введении полимерных

наночастиц с индометацином были испытаны их дозы 10,0; 30,0; 50,0; 70,0 и 90,0 мг/кг. Расчёт доз препарата производили на 100% индометацин.

За животными велось наблюдение в течение 2-х недель после введения полимерных наночастиц, и отмечались случаи и сроки гибели животных. При этом также учитывалось общее состояние животных, сохранение дыхания, реакции на внешние раздражители, аппетита, состояние шерстного покрова и двигательных функций.

Данные по смертельным случаям использовались для определения токсических параметров - LD_{16} , LD_{50} и LD_{84} и величин отношения смертельных доз (LD_{84} / LD_{16}). Результаты определения параметров токсичности полимерных наночастиц на основе амфифильного полимера с молекулярной массой полимерного гидрофильного фрагмента 3500 Да и концевым октадецильным гидрофобным фрагментом (ПВП-ОД3500) с включенным индометацином приведены в таблице 2.31.

Таблица 2.31 – Выживаемость мышей BALB/C после однократного введения лекарственной формы индометацина на основе полимерных наночастиц (Инд + ПВП-ОД3500)

Доза индометацина, мг/кг	10,0	30,0	50,0	70,0	90,0
Выжило	6	5	3	1	0
Погибло	0	1	3	5	6

Таким образом, LD_{50} для наноразмерной полимерной лекарственной формы индометацина при внутрибрюшинном введении мышам BALB/C при пересчете на чистый индометацин составляет $52,2 \pm 0,55$ ($46,8 \div 57,4$) мг/кг.

При этом, из литературных данных известно, что LD_{50} для чистой субстанции индометацина (в виде натриевой соли) составляет 13 мг/кг [314]. Таким образом, включение индометацина в полимерные наночастицы, довольно заметно уменьшает его острую токсичность при внутрибрюшинном введении.

У животных, которые получили смертельные дозы, наблюдалась клиническая картина интоксикации. На следующие сутки после введения

препарата у опытных животных наблюдались шаткость походки, нарушение координации движения, и вскоре животные впадали в кому, а затем погибали.

Таблица 2.32 – Показатели токсичности наноразмерной полимерной формы индометацина (Инд + ПВП-ОД3500) при однократном внутрибрюшинном введении (в пересчете на чистый индометацин).

Вид животных	Показатели токсичности, мг/кг			
	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄	ЛД ₈₄ /ЛД ₁₆
Мыши	48,1	52,2 ± 0,55	56,8	1,18
Крысы	49,2	54,7 ± 0,48	58,7	1,20

Предварительная оценка видовой чувствительности к препарату не показала существенного отличия в чувствительности к препарату у мышей BALB/C и крыс Wistar (таблица 2.32).

Полученное значение ЛД₅₀ позволяет отнести испытанную лекарственную форму индометацина к классу 3 умеренно токсичных веществ по классификации К.К. Сидорова [289].

Для исследования противовоспалительного действия новой лекарственной формы индометацина в виде наночастиц из амфифильных полимеров N-винилпирролидона с включенной лекарственной субстанций в данной работе проводились исследования *in vivo* на лабораторных животных (крысы Wistar) с использованием двух разных моделей воспалительного процесса:

- модель отека лапы крыс, индуцированного полным адьювантом Фрейнда (ПАФ)
- модель каррагинан-индуцированного отека лапы крыс.

Это традиционные модели острого экссудативного воспаления [315], в которых противовоспалительная активность испытываемого препарата определяется измерением объема лап животных после введения адьюванта ПАФ или каррагинана. Терапевтическое воздействие вещества при этом оценивают по степени угнетения воспалительной реакции в сравнении с интактной левой

лапой животного или реакцией лап крыс контрольной группы. Для сравнения также использовали свободный, немодифицированный индометацин.

В таблицах 2.33 и 2.34 представлены результаты исследования противовоспалительной активности полимерной наноразмерной формы индометацина на модели каррагинан-индуцированного отека. В правую лапу крысы вводили 1% раствор каррагинана в объеме 0,1 мл. При этом исследовались две схемы введения лекарственного препарата – профилактический и терапевтический, при однократном введении лекарственного препарата (острый эксперимент).

Таблица 2.33 – Противовоспалительная активность препаратов индометацина при профилактическом приёме на модели отека лап крыс, индуцированного каррагинаном

Препарат	Доза индометацина, мг/кг	Профилактика		
		Разность объема лап, мл	Прирост объема, %	Торможение, %
Контроль	0	0,250±0,004	139,8	-
Инд + ПВП-ОД3500	1,0	0,118±0,007	65,6	53,1
Инд + ПВП-ОД3500	2,5	0,085±0,006	47,2	66,2
Инд + ПВП-ОД3500	5,0	0,052±0,006	28,7	79,5
Индометацин	5,0	0,108±0,004	60,1	57

Таблица 2.34 – Противовоспалительная активность препаратов индометацина при терапевтическом приёме на модели отека лап крыс, индуцированного каррагинаном

Препарат	Доза индометацина, мг/кг	Терапия		
		Разность объема лап, мл	Прирост объема, %	Торможение, %
Контроль	0	0,420±0,006	208,6	-
Инд + ПВП-ОД3500	1,0	0,294±0,006	147,1	29,5
Инд + ПВП-ОД3500	2,5	0,192±0,004	96,6	53,7
Инд + ПВП-ОД3500	5,0	0,122±0,007	61,2	70,7
Индометацин	5,0	0,278±0,007	139,4	33,2

В профилактическом режиме (таблица 2.33) полимерную форму индометацина в различных дозах в пересчете на содержащуюся в наночастицах лекарственную субстанцию или свободный индометацин (для сравнения) вводили внутривентрально за 30 мин до введения каррагинана.

В терапевтическом режиме (таблица 2.34) животные получали полимерную форму индометацина разной концентрации или свободный индометацин через 60 мин после инъекции каррагинана.

В обоих случаях измерение объема лап животных проводили через 4 часа после введения каррагинана. Полученные результаты являются средними значениями для групп животных из 5-8 особей.

Как следует из представленных данных, на модели каррагинан-индуцированного отека лекарственная форма на основе амфифильного полимера N-винилпирролидона с молекулярной массой гидрофильного фрагмента 3500 Да и одной концевой октадецильной гидрофобной группой (ПВП-ОД3500) оказывает противовоспалительное действие, которое по своей степени выраженности не уступает эффекту чистого индометацина в дозе 5,0 мг/кг уже при содержании активного вещества в полимерных наночастицах всего 1,0 мг/кг, а при равных концентрациях активной субстанции значительно превосходит чистый индометацин, как в условиях профилактического, так и в условиях терапевтического приема. Это говорит о высокой эффективности новой полимерной наноразмерной лекарственной формы.

На следующей стадии исследования для изучения противовоспалительной активности полимерных наночастиц с включенным индометацином использовали модель ПАФ-индуцированного отека при многократном (суб-хроническом) введении лекарственного препарата (рисунок 2.79).

Полный адъювант Фрейнда (ПАФ) вводили инъекционно в правую лапу крысы в объеме 0,1 мл. Препараты на основе полимерных наночастиц с различным содержанием индометацина и препарат сравнения (чистый индометацин) вводили внутривентрально, первый раз через 2 часа после инъекции ПАФ, а затем 1 раз в день в течение 3 дней.

Объем лап животных измеряли через определенные интервалы времени после введения ПАФ (2, 4, 6, 12, 24, 48 и 72 часа). Представленные результаты являются средними значениями для групп животных из 6-8 особей.

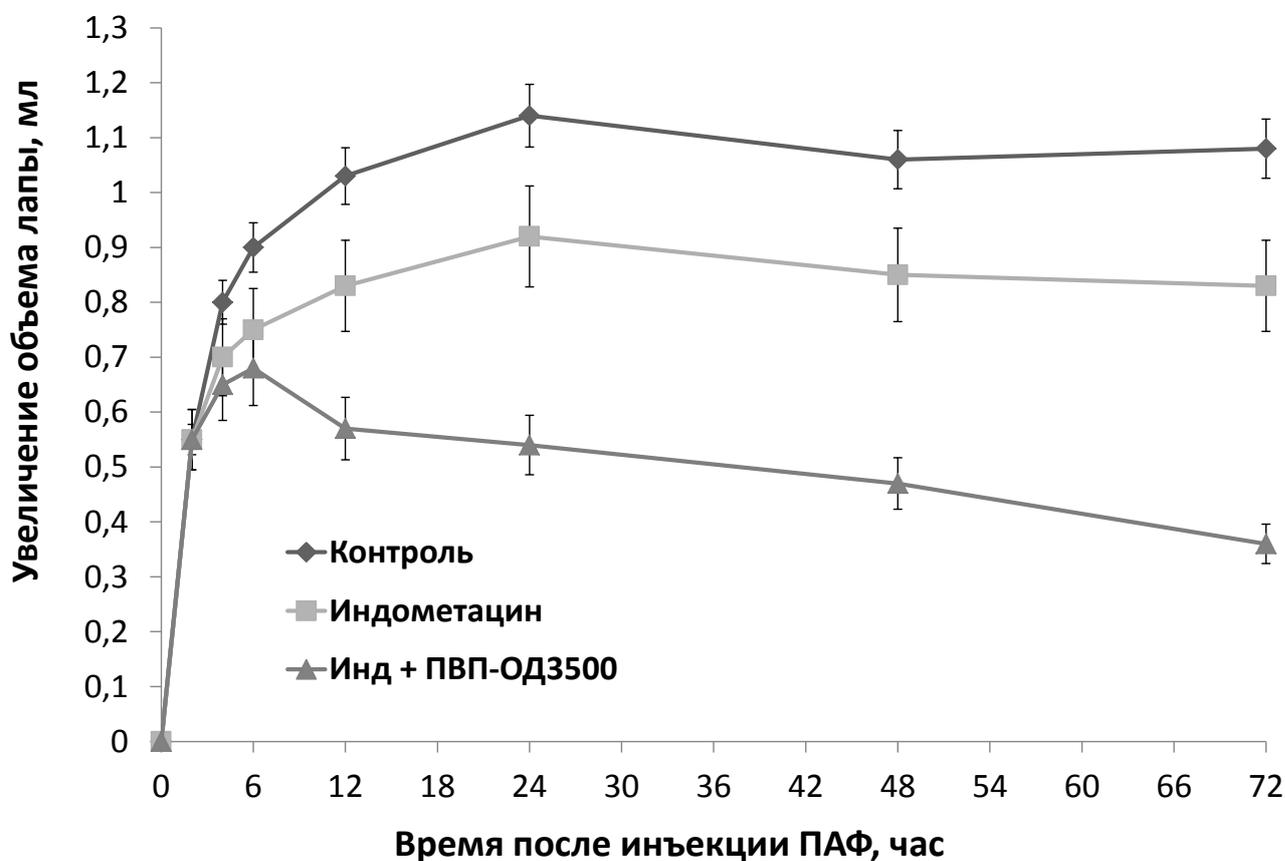


Рисунок 2.79 – Сравнение эффективности чистого индометацина и его наноразмерной полимерной формы (Инд + ПВП-ОД3500) при одинаковом содержании активного вещества (2,5 мг/кг) в отношении ПАФ-индуцированного отека у крыс (суб-хроническая модель)

Из данных, представленных на рисунке 2.79 видно, что и свободный индометацин и его новая форма введения на основе наночастиц из амфифильного полимера, введенные в количествах, обеспечивающих дозу индометацина 2,5 мг/кг, достоверно снижают степень воспаления и в суб-хроническом эксперименте. При этом новая полимерная форма индометацина с содержанием активного агента в дозе 2,5 мг/кг оказывает гораздо более ярко выраженное терапевтическое действие, которое можно объяснить повышением биодоступности и пролонгированностью действия наносомальной формы.

Способность наноразмерной формы индометацина оказывать мощное противовоспалительное действие при введении экспериментальным животным свидетельствует о целесообразности и перспективности использования готовой инъекционной лекарственной формы индометацина на основе полимерных наночастиц.

С учетом того, что одним из основных негативных свойств большинства нестероидных противовоспалительных субстанций является достаточно высокий риск развития нежелательных реакций со стороны желудочно-кишечного тракта, на заключительном этапе исследования проводилась оценка состояния желудка у опытных животных при ежедневном внутрижелудочном введении новой лекарственной формы индометацина на основе полимерных наночастиц из амфифильных полимеров N-винилпирролидона 1 раз в день в течение 4-х дней.

В качестве препарата сравнения использовали чистую субстанцию индометацина в его ульцерогенной дозе (50 мг/кг при внутрижелудочном введении крысам).

Макроскопическое морфологическое исследование и описание желудка подопытных крыс проводили в 3 сериях опытов:

- внутрижелудочное введение полимерных наночастиц на основе амфифильного полимера N-винилпирролидона с октадецильной гидрофобной группой и молекулярной массой полимерного фрагмента 3500 Да (ПВП-ОД3500) в дозе, содержащий 50 мг/кг индометацина один раз в день в течение 4-х дней;

- внутрижелудочное введение полимерных наночастиц на основе амфифильного полимера N-винилпирролидона с октадецильной гидрофобной группой и молекулярной массой полимерного фрагмента 5000 Да (ПВП-ОД5000) в дозе, содержащий 100 мг/кг индометацина один раз в день в течение 4-х дней;

- внутрижелудочное введение чистой субстанции индометацина (препарат сравнения) один раз в день в течение 4-х дней в дозе 50 мг/кг.

Проведенные эксперименты подтвердили выраженную ульцерогенную активность чистого индометацина. При морфологическом макроскопическом

исследовании желудка подопытных крыс, получавших внутрижелудочно индометацин (50 мг/кг), были выявлены выраженные изменения со стороны желудка и его достаточно серьезные поражения.

С другой стороны, одновременно, было отмечено, что оба испытанных образца полимерных наночастиц с индометацином обладали меньшей ulcerогенной активностью, чем у индометацина, хотя содержание индометацина в них было на уровне (50 мг/кг) и в 2 раза выше (100 мг/кг), чем в препарате сравнения.

Для сравнительной оценки ulcerогенной активности новой наноразмерной полимерной формы индометацина определяли значение индекса Паулса по результатам оценки морфологических изменений со стороны желудка.

Было выявлено, что значение индекса Паулса для индометацина (50 мг/кг) составило 12,4. Значение этого показателя для исследованных наносомальных форм индометацина, было ниже, чем для чистого индометацина (таблица 2.35).

Таблица 2.35 – Ульцерогенная активность полимерных наночастиц с индометацином при внутрижелудочном введении у крыс

№ группы	Препарат, доз	Индекс Паулса
1	Индометацин, 50 мг/кг	12,4
2	Инд + ПВП-ОД3500, 50 мг/кг	3,4
3	Инд + ПВП-ОД5000, 100 мг/кг	6,1

При исследовании наноразмерных полимерных форм индометацина на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона было установлено, что ulcerогенная активность наночастиц из полимера ПВП-ОД3500, с дозой индометацина 50 мг/кг была в среднем в 3,7 раз ($p < 0,05$) ниже, чем у чистого индометацина. Ульцерогенная активность другого образца наночастиц, из полимера ПВП-ОД5000 и дозой индометацина 100 мг/мл, все рано ниже, чем у препарата сравнения в 2 раза.

Вероятно, низкая ульцерогенная активность лекарственной формы индометацина на основе полимерных наночастиц связана с тем, что полимерные наночастицы, как система доставки, способны оказывать значительное влияние на фармакокинетику индометацина. Включение в гидрофобное ядро наночастиц из водосовместимых амфифильных полимеров должно способствовать более селективному транспорту индометацина в воспаленные ткани, что возможно будет проявляться в повышении терапевтической эффективности препарата в целом.

Таким образом, обнаружено существенное снижение побочного токсического действия индометацина на желудочно-кишечный тракт в случае использования его новой высокоэффективной лекарственной формы в виде полимерных наночастиц.

Проведенные исследования показали, что включение индометацина в полимерные наночастицы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона позволяет получить лекарственную форму, пригодную для инъекционного или перорального введения в организм и оказывающую эффективное, пролонгированное, противовоспалительное действие даже при низком содержании активного вещества в препарате.

Учитывая отсутствие в Российской Федерации выпускаемой промышленно инъекционной формы индометацина, а также существующие ограничения на применение его пероральной формы из-за выраженной токсичности и побочных эффектов, практическая значимость проведенных исследований и их результатов, а также перспективность дальнейшей разработки готовой инъекционной формы индометацина на основе полимерных наноразмерных носителей, очевидна.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Материалы

N-винилпирролидон – препарат фирмы “Sigma” (США): $M=111,14$; $t_{\text{кип}} = 72^{\circ}\text{C}$ (2,5 мм рт.ст.). Очищали перегонкой в вакууме при 363 К / 14 мм.рт.ст.

Динитрил азоизомасляной кислоты – препарат фирмы “Sigma” (США). $M=164,21$; $t_{\text{пл}} = 103-105^{\circ}\text{C}$. Очищали двукратной перекристаллизацией из этилового спирта.

Меркаптоуксунная кислота – препарат фирмы “Sigma” (США). $M=92,11$; $t_{\text{пл}} = 103-105^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{кип}} = 90^{\circ}\text{C}$ (6 мм рт.ст.).

Меркаптопропионовая кислота – препарат фирмы “Sigma” (США). $M=106,14$; $t_{\text{пл}} = 18^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{кип}} = 102^{\circ}\text{C}$ (16 мм рт.ст.).

Меркаптоэтиламин – выделяли из его солянокислой соли (“Sigma” (США), $M=113,61$) обработкой триэтиламиноом (“Sigma” (США), $M=101,19$).

Реакцию проводили в круглодонной колбе, снабженной мешалкой, куда загружали 11,35 г (0,1 моль) солянокислого меркаптоэтиламина, растворенного в 30 мл сухого изопропилового спирта, 10,1 г (0,1 моль) триэтиламина в 20 мл сухого изопропилового спирта при охлаждении. Полученный осадок солянокислого триэтиламина отфильтровывали, полученный раствор меркаптоэтиламина хранили при $T = 275 \div 278 \text{ K}$.

p-Гидроксibenзальдегид – реактив производства фирмы “Sigma” (США). $M=122,12$; $t_{\text{пл}} = 117-119^{\circ}\text{C}$.

Аллил бромид – реактив “Sigma” (США). $M=120,98$; $t_{\text{пл}} = -119,4^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{кип}} = 71,3^{\circ}\text{C}$. Очищался перегонкой.

n-Гексиламин, n-октиламин, n-додециламин, n-гексадециламин, n-октадециламин, ди(n-гексил)амин, ди(n-октил)амин, ди(n-октадецил)амин – препараты фирмы “Sigma” (США).

Хлорангидрид лауриновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидоновой или бегеновой кислоты получали из соответствующей кислоты производства “Sigma” (США) обработкой ее хлористым тионилем (“Sigma” (США), $M=118,97$).

В колбу для вакуумной перегонки с отводом для хлористого водорода загружали 1 моль соответствующей кислоты. Медленно из делительной воронки прикапывали 29,28 г (4 моль) хлористого тионила. В качестве катализатора в реакционную смесь добавляли 0,8 мл ДМФА. Реакционную смесь выдерживали 10 часов. Прямой перегонкой отгоняли избыток хлористого тионила. Фракцию хлорангидрида отбирали вакуумной перегонкой и хранили при $T = 275 \div 278$ К в запаянных ампулах.

N,N'-Дициклогексилкарбодиимид – реактив производства фирмы “Sigma” (США). $M=206,33$; $t_{пл} = 34^{\circ}\text{C}$; $t_{кип} = 122^{\circ}\text{C}$ (6 мм рт.ст.).

Аминокислоты – глицин ($M=75,07$; $t_{пл} = 232-236^{\circ}\text{C}$), β -аланин ($M=89,09$; $t_{пл} = 207^{\circ}\text{C}$), γ -аминомасляная кислота ($M=103,09$; $t_{пл} = 203^{\circ}\text{C}$). Использовались препараты фирмы “Acros” (США).

Хлорацетамид – реактив фирмы “Sigma”. $M=94,15$; $t_{пл} = 119-120^{\circ}\text{C}$.

Стеариновая кислота – препарат фирмы “Sigma” (США). $M=284,47$; $t_{пл} = 53-65^{\circ}\text{C}$.

Тионилхлорид – препарат фирмы “Sigma” (США). $M=83,50$; $t_{пл} = 34^{\circ}\text{C}$; $t_{кип} = 122^{\circ}\text{C}$.

Солянокислый гидроксиламин – препарат фирмы “Sigma” (США). $M=69,54$; $t_{пл} = 151-152^{\circ}\text{C}$.

Этилат натрия – препарат фирмы “Acros” (США). $M=68,05$; $t_{пл} = 260^{\circ}\text{C}$.

Триэтанолламин – препарат фирмы “Sigma” (США). $M=149,19$; $t_{пл} = 22^{\circ}\text{C}$.

Липиды фосфатидилхолин, кардиолипин, холестерол – препараты фирмы “Avanti Polar Lipids Inc.” (США).

Дифенилгексатриен (ДФГТ) – препарат фирмы “Sigma” (США). $M=232,33$; $t_{пл} = 199-203^{\circ}\text{C}$.

Пирен – продукт фирмы “Sigma” (США). $M=202,25$; $t_{пл} = 145-148^{\circ}\text{C}$.

Поликатион N-этил-4-винилпиридинийбромид/4-винилпиридин (95/5) – препарат фирмы “Sigma” (США).

Флуоресцеин-изо-тиоцианилдипальмитоилфосфатидилэтанол-амин (ФИТЦ-ДПФЭ) – продукт компании “Sigma” (США).

Нистатин – продукт компании “Sigma” (США). M=926,09.

Амфотерицин В – препарат фирмы “Sigma” (США). M=924,08.

Соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк (ВВІ) – использовали белковый концентрат из пищевой сои, содержащий 50% вес белка (по Лоури), 16,5 мас. % активного ВВІ (по ингибированию химотрипсина).

Индометацин – препарат фирмы “Sigma” (США). M=357,79.

Остальные используемые реактивы – продукты компании “Sigma”, США.

Растворители (ацетон, диметилсульфоксид, диэтиловый эфир, изопропиловый спирт, этиловый спирт диоксан, и др.) очищали и затем абсолютировали по известным методикам [316].

3.2 Методы

3.2.1 Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии меркаптосоединений

Навески N-винилпирролидона и инициатора (динитрила азоизомасляной кислоты) (0.1 ÷ 3.0 вес. %) растворяли в диоксане (30 %-ный раствор по мономеру) и затем добавляли к смеси различные количества меркаптоэтиламина, меркаптоуксусной кислоты или меркаптопропионовой кислоты. Ампулы с полученными растворами продувались инертным газом, запаивались и выдерживались при $T = 343 \text{ K}$ в течение 1 часа. Образовавшиеся полимеры осаждались в серный эфир, очищались экстракцией этим осадителем, и сушились до постоянного веса в вакууме. Выход полученных полимеров составлял 70-95 %.

3.2.2 Изучение кинетики полимеризации N-винилпирролидона в присутствии меркаптосоединений

Для изучения процессов полимеризации N-винилпирролидона в присутствии меркаптанов (меркаптоуксусной, меркаптопропионовой кислот и меркаптоэтиламина) использовали dilatометрический метод, являющийся одним из самых точных среди известных в настоящее время способов. В основе метода лежит изменение объема реакционной среды в результате полимеризации.

Для исследования готовили исходные растворы, идентичные по составу, но различающиеся концентрацией одного из компонентов (мономера – N-винилпирролидона, инициатора – динитрила азоизомасляной кислоты, или меркаптана – меркаптоуксусной кислоты, меркаптопропионовой кислоты или меркаптоэтиламина). После этого раствор помещали в дилатометр и пропускали через него ток инертного газа.

Затем дилатометр погружался в термостат, нагретый до температуры полимеризации. При помощи катетометра КМ-6 следили за изменением уровня жидкости в капилляре. Расчет степени превращения X производили по следующей формуле:

$$X = \frac{\Delta h \times S}{V_M^t \left(1 - \frac{\rho_m^t}{\rho_n^t} \right)},$$

где Δh – изменение уровня реакционной смеси в капилляре (усадка); S – сечение капилляра, см^2 ; V_M^t – объем реакционной смеси при температуре полимеризации, см^3 ; ρ_m^t – плотность мономера при температуре полимеризации, $\text{г}/\text{см}^3$; ρ_n^t – плотность полимера, $\text{г}/\text{см}^3$.

По полученным данным строили зависимости $X=f(\tau)$, где τ – время полимеризации. Затем рассчитывали скорость полимеризации ω ($\text{моль} \times \text{л}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) на линейных участках кривых по степени превращения мономера за определенный период времени по формуле:

$$\omega = \frac{1000 \times \rho_m^t \times X}{\tau \times 60 \times M_m},$$

где M_m – молекулярная масса мономера при температуре полимеризации; τ – время полимеризации, с.

Калибровка дилатометра. В сухой и чистый дилатометр заливали дистиллированную воду с помощью воронки так, чтобы уровень воды находился

в нижней части капилляра дилатометра. Затем отмечалось положение воды, и дилатометр взвешивался на аналитических весах (G_1). После этого в дилатометр добавляли еще дистиллированной воды так, чтобы уровень воды находился в верхней части капилляра. Дилатометр после этого снова взвешивался еще раз (G_2). Наконец, измеряли расстояние между первым и вторым уровнями воды (H) и по полученным значениям рассчитывали сечение капилляра дилатометра:

$$S = (G_2 - G_1) / H ,$$

где S – сечение, см^2 ; G_1, G_2 – результаты взвешивания, г; H – расстояние, см.

После этого дилатометр сушился в термошкафу, и приступали к изучению полимеризации с помощью откалиброванного дилатометра.

Измерение плотностей. Плотности мономеров измеряли пикнометрическим методом. Для определения плотностей мономеров при температурах полимеризации пикнометры помещали в термостат, в котором проводили кинетические измерения, наполняли мономером и затем взвешивали.

Плотности полимеров определялись методом, основанным на подборе плотности среды равной плотности исследуемого образца [317].

3.2.3 Синтез амфифильных производных полимеров, содержащих концевую карбоксильную группу

Расчетное количество поли-N-винилпирролидона, содержащего концевую карбоксильную группу, растворялось в сухом изопропанол. К полученному раствору добавлялся при перемешивании раствор избытка N,N'-дициклогексилкарбодиимида (2,0 моля на 1 моль карбоксильных групп) в этом же растворителе. Смесь перемешивалась при $T = 273 \text{ K}$ в течение 1 часа, а затем к ней добавлялся раствор соответствующего количества алифатического амина (н-гексиламина, н-октиламина, н-додециламина, н-гексадециламина, н-октадециламина, ди(н-гексил)амина, ди(н-октил)амина, ди(н-октадецил)амина) (1,5 моля на 1 моль карбоксильных групп) в сухом изопропанол и выдерживалась 2 часа при $T = 333 \text{ K}$. Выпавший после охлаждения реакционной смеси осадок отфильтровывался, а фильтрат упаривался до объема около 10 мл.

Полученный полимер осаждался в серный эфир, экстрагировался осадителем и сушился в вакууме до постоянного веса. Выход полимеров во всех случаях близок к теоретическому (75-80%).

3.2.4 Синтез амфифильных производных полимеров, содержащих концевую аминогруппу

Навеска поли-N-винилпирролидона, содержащего концевую аминогруппу, растворялась в сухом диоксане. В полученный раствор вводилось при перемешивании и при $T = 273$ К расчетное количество триэтиламина в диоксане, а затем хлорангидрид лауриновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидиновой или бегеновой кислоты в этом же растворителе и смесь выдерживалась в течение 2 часов при комнатной температуре. Выпавший осадок солянокислого триэтиламина отфильтровывался, а полученный полимер осаждался в серный эфир, экстрагировался осадителем и сушился в вакууме до постоянного веса. Выход полимеров во всех случаях близок к теоретическому (70÷75%).

3.2.5 Синтез п-аллилоксибензальдегида

В трехгорлую колбу, снабженную мешалкой, капельной воронкой и обратным холодильником, загружали 73,2 г (0,6 моль) п-гидроксибензальдегида, 150 мл сухого ацетона и 91,2 г (0,66 моль) прокаленного поташа. Смесь интенсивно перемешивали и кипятили в течение 20 минут, а затем при перемешивании, по каплям вводили 80,5 г (0,66 моль) предварительно перегнанного бромистого аллила и кипятили еще 8 часов при температуре 333 К.

Реакционную смесь вливали в 750 мл дистиллированной воды и многократно экстрагировали небольшими порциями диэтилового эфира. Эфирные вытяжки объединяли, промывали 10% водным раствором NaOH, затем отмывали дистиллированной водой до нейтральной среды промывных вод. Далее сушили над прокаленным $MgSO_4$ в течении суток. После отгонки эфира остаток отгоняли в вакууме, отбирая фракцию аллильного мономера (п-аллилоксибензальдегид, $T_k=381K$ (267Па)). Выход 45 г (62%).

3.2.6 Сополимеризация N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида

В подготовленные ампулы помещали точные навески мономеров (N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида), инициатора (динитрила азоизомасляной кислоты) и меркаптана (меркаптоуксусной кислоты), затем заливали тщательно высушенный и перегнанный диоксан. Ампулы продували аргоном, после чего запаивали и помещали в термостат, где поддерживалась требуемая температура ($T = 343 \text{ K}$) с точностью $\pm 0,5 \text{ K}$.

По окончании реакции ампулы вскрывали, и полимер высаждали в десятикратный объем диэтилового эфира. Полученный сополимер экстрагировали серным эфиром и сушили в вакууме до постоянного веса. Определяли выход и состав полученных сополимеров.

3.2.7 Синтез амфифильных производных сополимеров N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида

Сополимер N-винилпирролидона (ВП) и п-аллилоксибензальдегида (п-АОБА), содержащий концевую карбоксильную группу, растворялся в сухом изопропанолем, и к полученному раствору добавлялся при перемешивании раствор двукратного избытка N,N'-дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК) в 10 мл этого же растворителя. Смесь перемешивалась в течение 1 часа при $T = 273 \text{ K}$, затем к ней добавлялся раствор двукратного избытка н-октадециламина в сухом изопропанолем и смесь выдерживалась при $T = 333 \text{ K}$ еще 2 часа. Выпавшая в осадок дициклогексилмочевина отфильтровывалась, а фильтрат упаривался. Полученный полимер осаждался в эфир, экстрагировался осадителем и сушился в вакууме до постоянного веса.

Для предотвращения образования во время реакции модификации сополимеров оснований Шиффа, полученный полимер гидролизовался в слабокислой среде ($\text{pH}=5$) в течение 6 часов, после чего лиофильно сушился в течение 24 часов.

3.2.8 Измерение мутности растворов сополимеров N-винилпирролидона и п-аллилоксибензальдегида

Для измерения мутности были приготовлены растворы сополимеров и амфифильных сополимеров ВП и п-АОБА с концентрациями 5, 10, 15, 20 масс. %. Для этого навески сополимеров растворяли в бидистиллированной воде. Далее растворы исследовали на спектрофотометре «Unico SQ-2802PCS UV-Vis» (США). Герметично закрытую кювету помещали в термостатируемую ячейку. Раствор термостатировали в течение 10 минут, затем снимали спектр пропускания в диапазоне от 900 нм до 500 нм. Далее температуру в термостате поднимали на один или два градуса. При достижении температуры в ячейке равной заданной, начинали процесс термостатирования. Температурный диапазон измерений составлял 274 К до 371 К. После обработки экспериментальных данных, строили зависимость в координатах: мутность (%) от температуры (К), и определяли температуру выпадения полимера из раствора.

3.2.9 Синтез хлорангидрида стеариновой кислоты

Реакцию получения хлорангидрида стеариновой кислоты проводили обработкой стеариновой кислоты хлористым тионилем в колбе, снабженной эффективным обратным холодильником и мешалкой. К твёрдой стеариновой кислоте по каплям прикапывали небольшой избыток SOCl_2 (1,2 моль хлористого тионила на 1 моль кислоты). Реакционную смесь на водяной бане нагревали (50-80°C) до прекращения выделения SO_2 и HCl , затем избыток SOCl_2 отгоняли в вакууме на водоструйном насосе. Неочищенный хлорангидрид фракционировали, отделяя при давлении 8 мм. рт. ст. фракцию с температурой кипения 190-193°C.

3.2.10 Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты

Растворитель (диоксан), расчётное количество мономера (N-винилпирролидон), инициатора (ДАК), и регулятора роста цепи (стеарил хлорид) загружали в промытые и высушенные пробирки с притертыми пробками.

Пробирки продувались инертным газом. После этого они помещались в термостат, где поддерживали заданную температуру с точностью $\pm 0,2^\circ\text{C}$. Через определённое время содержимое пробирок осаждалось в диэтиловый эфир промывалось осадителем и сушилось до постоянного веса. Дополнительную очистку полученных полимеров осуществляли переосаждением, с последующей экстракцией соответствующим растворителем в приборе Сокслета. Затем окончательную очистку синтезированных амфифильных полимеров проводили в течение суток их диализом относительно 5 л дистиллированной воды. После окончания диализа содержимое диализных мешков лиофилизовали.

3.2.11 Изучение кинетики полимеризации N-винилпирролидона в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты

Исследование реакций полимеризации N-винилпирролидона в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты проводили, используя dilatометрический метод.

Для проведения измерений готовили начальные растворы идентичные по составу, но различающиеся концентрацией одного из компонентов (инициатора – динитрила азоизомаасляной кислоты, мономера – N-винилпирролидона, или передатчика цепи - хлорангидрида стеариновой кислоты). После этого реакционную смесь помещали в dilatометр и пропускали через него ток аргона.

Затем dilatометр помещали в нагретый до температуры полимеризации термостат. За изменением уровня жидкости в капилляре следили при помощи катетометра КМ-6. По полученным данным строили зависимости усадки реакционной смеси в капилляре от времени полимеризации. Окончательный расчет степени превращения X производился по формуле:

$$X = \frac{\Delta h \times S}{V_M^t \left(1 - \frac{\rho_m^t}{\rho_n^t} \right)},$$

где Δh – изменение уровня реакционной смеси в капилляре (усадка); S – сечение капилляра, см^2 ; V_M^t – объем реакционной смеси при температуре полимеризации, см^3 ; ρ_m^t – плотность мономера при температуре полимеризации, г/см^3 ; ρ_n^t – плотность полимера, г/см^3 .

Наконец скорость полимеризации ω (моль \times л $^{-1}\times$ с $^{-1}$) рассчитывали на линейных участках кривых по степени превращения мономера за определенный период времени по формуле:

$$\omega = \frac{1000 \times \rho_m^t \times X}{\tau \times 60 \times M_m},$$

где M_m – молекулярная масса мономера при температуре полимеризации; τ – время полимеризации, с.

Калибровку дилатометра и определение плотностей мономеров и полимеров проводили аналогично методике для изучения кинетики полимеризации N-винилпирролидона в присутствии меркаптосоединений (Раздел 3.2.2).

3.2.12 Эпоксидирование амфифильных полимеров N-винилпирролидона

К перемешиваемой смеси ПВП и хлорацетамида в течение 2 часов, при температуре 283 К (10⁰С) добавляли по каплям, с постоянной скоростью раствор этилата натрия. Для проведения реакции эпоксидирования использовали мольное соотношение полимер/хлорацетамид/натрий 1/0.75/1 соответственно. После добавления этилата натрия температура самопроизвольно поднималась на 2-3 °С и при этой температуре смесь перемешивалась в течение пяти часов. По истечении этого времени выпавший осадок отфильтровывался и экстрагировался серным эфиром в течение 3 дней с использованием прибора Сокслета. Полученный фильтрат концентрировали под вакуумом на роторном испарителе. Затем продукт реакции растворяли в сухом ДМСО и раствор полимера трижды отфильтровывали на фильтре Шотта от хлорида натрия. Фильтрат высаждали в ацетон и сушили до постоянного веса в вакуумном шкафу. Полученный после

концентрирования на роторном испарителе полимер очищали точно таким же образом. Выход продукта составлял 65%. Полученные полимеры представляли собой белые порошки, хорошо растворимые в воде, плохо в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, уксусной кислоте; нерастворимые в гептане, серном эфире, спирте, и других органических растворителях.

3.2.13 Модификация эпоксицированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона аминокислотами

В колбу, оснащенную мешалкой загружали 10 г эпоксицированного амфифильного полимера, содержащего 10% эпоксидных групп (0,086 моль), 20-ти кратный избыток аминокислоты (γ -аминомасляная кислота – 17,9 г; β -аланин – 15,5 г; глицин – 13,0 г) и 167 мл дистиллированной воды. После растворения всех реагентов в колбу добавляли при перемешивании водный раствор гидроксида натрия (7,1 г (0,18 моль) NaOH в 16,7 мл бидистиллированной воды). Реакцию проводили при комнатной температуре (298K) в течение 4 часов. Реакционную смесь оставляли на ночь и на следующий день, затем проводили нейтрализацию до pH=7, используя 0,5 н раствор HCl. После нейтрализации раствора его очищали диализом в течение 3-4 дней и лиофилизовали. Выход составлял около 7 г (70%). Состав полученного продукта определяли функциональным анализом по карбоксильной группе и вторичной аминогруппе аминокислотного остатка.

3.2.14 Анализ полимеров и сополимеров N-винилпирролидона и их амфифильных и функциональных производных

3.2.14.1 Определение содержания карбоксильных групп и молекулярной массы полимеров

Навеску полимера (0,50г) растворяли в 20 мл бидистиллированной воды и титровали 0,01N раствором NaOH. Определение проводили методом прямого потенциометрического титрования с помощью pH-метра “PHM 63 Digital pH meter” (Германия).

Среднечисловую молекулярную массу полимеров M_n вычисляли по формуле:

$$M_n = \frac{1000 \times m}{c_{\text{KOH}} \times V_t},$$

где m – масса навески полимера, г; c_{KOH} – концентрация раствора щелочи, г/мл; V_t – объем щелочи, пошедший на титрование, мл.

3.2.14.2 Определение содержания аминогрупп и молекулярной массы полимеров

Концентрацию аминогрупп определяли методом обратного потенциометрического титрования. В бюкс помещали расчетное количество полимера и активирующей смеси (соотношение пиридин/уксусный ангидрид было 22:3). Бюкс нагревали с обратным холодильником при температуре 95°C в течение 2 часов.

По окончании реакции смесь охлаждали и добавляли воду, чтобы гидролизовать уксусный ангидрид. Затем смесь титровали щелочью при помощи рН-метра “РНМ 63 Digital pH meter” (Германия).

3.2.14.3 Определение содержания кетонных групп и молекулярной массы полимеров

Использовался метод оксиметрического титрования. Этот метод позволил определить в синтезированных полимерах содержание кетонных групп и, на основе этих значений, рассчитать молекулярную массу полимера.

Оксимирующий реактив: растворяли 0,7 г солянокислого гидроксиламина в 10 мл бидистиллированной воды, и затем к этому раствору добавляли 0,5 г триэтанолamina, доводили объём реактива до 100 мл 96% этанолом. Навеску полимера (0,03-0,05 г) помещали в бюкс, заливали 5 мл оксимирующего раствора, закрывали бюкс и оставляли на 3 часа, после чего избыток триэтанолamina оттитровывали 0,02 н HCl.

Молекулярные массы полимеров вычисляли по формуле:

$$M_n = m_n \cdot 1000 / N_{\text{HCl}}(V_x - V),$$

где M_n – молекулярная масса полимера; m_n – масса навески полимера, г; N_{HCl} – нормальность раствора соляной кислот; $(V_x - V)$ – разница объёмов титранта, пошедшего на титрование холостой и контрольной проб.

3.2.14.4 Определение молекулярной массы полимеров методом паровой осмометрии

Метод позволяет определить молекулярную массу полимера по отношению давления насыщенного пара полимерного раствора и давления пара чистого растворителя. Измерения методом паровой осмометрии среднечисленной молекулярной массы полимеров ВП проводили на осмометре «Knauer» (Германия), с использованием полистирольных стандартов.

3.2.14.5 Определение содержания альдегидных групп в сополимерах

Содержание альдегидных групп в сополимерах определяли методом оксиметрического титрования. Оксимирующий реактив: 0,7 г солянокислого гидроксиламина растворяли в 10 мл дистиллированной воды и к полученному раствору прибавляли 0,5 г триэтанолamina, а затем доводили его объем до 100 мл 90%-ным этиловым спиртом. Навеску сополимера (0,03÷0,05г) заливали 5 мл оксимирующего раствора и оставляли на 2 часа, после чего избыток триэтанолamina оттитровывали 0,02 н. раствором HCl. Количество альдегидсодержащих звеньев на 100 звеньев сополимера считали по формуле:

$$\frac{M_1(100 - n) + 162n}{m} = \frac{36,5n}{T(V_x - V)}$$

где: M_1 – мол. масса звена ВП, г/моль; 162 – молекулярная масса п-аллилоксибензальдегида; n – количество альдегидных групп, мол. %; m – навеска сополимера, г; T – титр раствора HCl, моль/л; 36,5 – молекулярная масса HCl, г/моль; $(V_x - V)$ – разница объемов титранта, пошедших на титрование холостой и исследуемой проб.

3.2.14.6 Определение содержания эпоксидных групп в эпоксицированных полимерах

Использовали метод потенциометрического титрования, который основан на способности эпоксидной группы полимера присоединять хлороводород, образуя хлоргидрид. По разности между количеством введенной и непрореагировавшей соляной кислоты, определяемой титрованием щелочью, рассчитывали содержание эпоксидных групп. Для этого навеску полимера 0,1 г вносили в бюкс и добавляли 10 мл 0,1 н раствора HCl в воде. Одновременно ставили холостой опыт. Спустя 3 часа оттитровали пробу 0,1 н раствором гидроксида калия. Рассчитывали количества эпоксидных групп по формуле:

$$\frac{M_1 (100-X) + M_2 X}{g} = \frac{56 X}{T(V_0-V)}$$

где M_1 и M_2 - молекулярные веса мономеров; X - количество эпоксидных групп, мол.%; g - навеска полимера, г; T - титр раствора щелочи (KOH); V_0, V - объем щелочи, пошедший на титрование холостого опыта и пробы, соответственно, мл.

3.2.14.7 Определение содержания аминогрупп в модифицированных аминокислотами полимерах

Содержание в полимере аминогрупп определялось методом потенциометрического прямого титрования. Навеску полимера 0,1 г растворяли в 10 мл бидистиллированной воды и титровали 0,01 н раствором HCl в дистиллированной воде. Расчет количества аминогрупп проводилось по формуле:

$$\frac{111 \cdot 90 + (M_1 + M_2) \cdot X + M_3 \cdot (10 - X)}{g} = \frac{X \cdot 1000}{N_{HCl} \cdot V_{HCl}}$$

где 111 - молекулярная масса винилпирролидинового звена; 90 - процентное содержание ВП в цепи; M_1 - молекулярная масса эпоксицированного винилпирролидинового звена; M_2 - молекулярная масса аминокислоты; M_3 - молекулярная масса гидролизованного эпоксицированного винилпирролидинового звена; g - масса полимера, взятого для титрования; V_{HCl} -

объем соляной кислоты, пошедшей на титрование; N_{HCl} – нормальность соляной кислоты, пошедшей на титрование; X – процентное содержание вторичных аминных групп.

3.2.14.8 Определение содержания карбоксильных групп в модифицированных аминокислотами полимерах

Навеску полимера 0,1 г растворяли в 10 мл бидистиллированной воды и затем титровали потенциометрическим методом используя 0,01 н раствора NaOH в бидистиллированной воде. Расчет содержания карбоксильных групп проводили, используя следующую формулу, аналогично методике в Разделе 3.2.14.7:

$$\frac{111 \cdot 90 + (M_1 + M_2) \cdot X + M_3 \cdot (10 - X)}{g} = \frac{X \cdot 1000}{N_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}$$

где V_{NaOH} – объем гидроксида натрия, пошедшего на титрование; N_{NaOH} – нормальность гидроксида натрия, пошедшего на титрование; X – процентное содержание карбоксильных групп.

3.2.14.9 Спектральные методы исследования строения полимеров

Для исследований структурных характеристик получаемых веществ использовали ЯМР ^1H , ^{13}C и ИК-спектроскопию.

^1H ЯМР спектры регистрировали на спектрометре Bruker CXH-200 (Германия) при 200 МГц. В качестве внутренних стандартов использовали сигналы дейтерированных растворителей: хлороформа, ацетона и ДМСО. Химические сдвиги сигналов рассчитывали относительно эталона – тетраметилсилана (^1H). Твердотельный ЯМР ^{13}C снимали на частоте 12.5 кГц.

ИК-спектры снимали с таблеток KBr с помощью ИК-Фурье спектрометра «Paragon 1000PC» производства компании Perkin-Elmer (США), оснащенного микрофокусировочной приставкой, а также на спектрофотометре «Specord IR-75» (Carl Zeiss, Германия). Диапазон волновых чисел $4000\text{-}400\text{ см}^{-1}$ с разрешением 4 см^{-1} , число сканирований – 16.

3.2.15 Определение критической концентрации агрегации (ККА) амфифильных полимеров

Принцип метода. Солюбилизации водонерастворимого флуоресцентного красителя полимерными частицами. В качестве флуоресцентных красителей использовали пирен или использовали 1,3,5-дифенилгексатриен (ДФГТ). Флуоресценция красителей в суспензиях полимерных наночастиц увеличивалась при переносе из красителя из водной фазы в гидрофобное ядро ПН.

Подготовка реактивов. При использовании ДФГТ, ~2-4 мг этого красителя растворяли в 1 мг ацетона. 50 мкл полученного раствора еще разбавляли 1 мл ацетона и определяли концентрацию ДФГТ по поглощения в циклогексане при $\lambda = 353$ нм (10 мкл ДФГТ + 990 мкл циклогексана). Зная коэффициент молярной экстинкции (84280) рассчитывали концентрацию ДФГТ в растворе ацетона. Далее раствор ДФГТ в ацетоне (известной концентрации) разводили в PBS (натрий-фосфатный буфер) до конечной концентрации 0,5 мкМ. Ацетон из полученного раствора удаляли при интенсивном перемешивании при комнатной температуре в течение 1.5 - 2 часов (до исчезновения запаха ацетона). Полученный таким образом раствор необходимо использовать в течение 24 часов.

Содержащие 100 мкг пирена в этаноле (10 мг/мл) аликвоты высушивали под вакуумом. Затем в каждую пробирку с высушенным пиреном добавляли 1.8 мл физиологического раствора, который содержал 0.2 масс. % азида натрия.

Ход определения. Критические концентрации агрегации амфифильных полимеров определялись флуориметрическим методом на флуориметре «Hitachi 650-10S», Япония. Для этого подготавливали растворы полимера различной концентрации ($10^{-4} \div 10^{-10}$ М, пробы готовили разведением, не менее 10-12 проб).

В случае использования пирена, в заранее приготовленные пробирки с этим красителем добавляли 200 мкл последовательно разбавленных ($10^{-4} \div 10^{-10}$ М) образцов различных амфифильных производных поли-N-винилпирролидона и перемешивали при комнатной температуре 24 часа. Затем образцы центрифугировали 5 мин при скорости 2000 об/мин, чтобы удалить остатки плохо растворимого неиммобилизованного пирена. Интенсивность

флуоресценции иммобилизованного пирена измеряли при длине волны эмиссии 385 нм и длине волны возбуждения 339 нм.

При использовании ДФГТ к полученным растворам полимера разной концентрации добавляли приготовленный заранее раствор ДФГТ. После этого пробы помещали в сухой термостат на 30-40 мин. при температуре 37⁰С. Анализ на флуориметре проводили длине волны флуоресценции $\lambda_{эм} = 433$ нм и при длине волны возбуждения $\lambda_{экт} = 366$ нм. Для этого в кювету прибора помещали 1-2 мл исследуемого раствора, и определялась интенсивность флуоресценции.

По полученным данным строили график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации полимера. ККА определяли как точку пересечения прямых, проведенных через точки с низкой флуоресценцией и точки подъема.

3.2.16 Получение полимерных наночастиц методом прямого растворения

При получении полимерных наночастиц методом прямого растворения, расчетное количество амфифильного полимера растворяли в обеспыленной бидистиллированной воде или в физиологическом растворе (0.15 М NaCl, pH ~ 7.4), так чтобы получить концентрацию от 1 до 1000 ККА этого полимера. Раствор интенсивно перемешивали на вортекс-шейкере при 1000 об/мин в течение 4-6 часов, затем отбирали и анализировали пробы.

3.2.17 Получение полимерных наночастиц диализным методом

Для получения ненагруженных биологически активным или лекарственным веществом «пустых» наночастиц, растворы амфифильных полимеров (0.1÷10 мг/мл) в ДМСО диализовали в течение 24, 48 или 72 часов относительно 5 л дистиллированной воды или физиологического раствора, с использованием диализных мешков или кассет с пределом фильтрации MW от 1000 до 14000 (“Sigma”, США). Полученный в диализном мешке раствор наночастиц использовали для дальнейших исследований. В случае необходимости включения

активного вещества в полимерные наночастицы, его раствор в ДМСО добавляли к раствору амфифильного полимера перед началом диализа.

3.2.18 Получение полимерных наночастиц эмульсионным методом

Навеску амфифильного полимера N-винилпирролидона растворяли в подходящем несмешивающемся с водой органическом растворителе (этилацетат, хлороформ, метилхлорид и пр.) при перемешивании, и, при необходимости, при нагревании (40÷50 °С). Полученный органический раствор прикапывали к дистиллированной воде или физиологическому раствору и гомогенизировали образующуюся систему с помощью ультразвукового гомогенизатора («Bandelin Sonopuls HD 2070», США). При этом подбирали для каждого случая оптимальный режим гомогенизации. По окончании гомогенизации органический растворитель отгоняли из системы на ротационном испарителе («Heidilph Hei-Vap Value Digital», Германия). Далее полученную дисперсию наночастиц замораживали и лиофильно сушили (лиофильная сушка «Martin Christ BETA 2-8 LDplus», Германия). Полученный таким образом лиофилизат был стабилен в течение длительного времени (от 6 месяцев) при хранении в герметичной емкости.

Для включения в полимерные наночастицы гидрофобного лекарственного или биологически активного вещества, готовили его раствор в том же растворителе, что и раствор полимера, и оба эти раствора добавляли в воду или в физиологический раствор, а полученную систему гомогенизировали ультразвуком. Полученную дисперсию наночастиц с включенным лекарственным веществом центрифугировали при 4200 об/мин (центрифуга «Sigma 2-16», Германия) для отделения невключившегося гидрофобного активного вещества. Центрифугат замораживали и лиофильно сушили, с образованием стабильного длительного время лиофилизата.

3.2.19 Получение полимерных наночастиц суспензионным методом

Навеску амфифильного полимера N-винилпирролидона растворяли в дистиллированной воде при перемешивании, и, при необходимости, при

нагревании (40÷50 °С). Навеску включаемого в полимерные наночастицы гидрофобного лекарственного вещества растворяли в подходящем, смешивающемся с водой органическом растворителе (этиловый спирт, ацетон и пр.). Полученный органический раствор прикапывали к водному раствору полимера при одновременной гомогенизации на ультразвуковом гомогенизаторе «Vandelin Sonopuls HD 2070» (США). При этом выбирали подходящий режим гомогенизации. Полученную суспензию наночастиц центрифугировали (центрифуга «Sigma 2-16», Германия) для отделения невключившегося гидрофобного биологически активного вещества. Центрифугат замораживали и лиофильно сушили (лиофильная сушка «Martin Christ BETA 2-8 LDplus», Германия). Полученный таким образом лиофилизат был стабилен в течение длительного времени (не менее 6 месяцев) при хранении в герметичной емкости.

«Пустые» полимерные наночастицы (без включенного гидрофобного лекарственного вещества) получали аналогичным способом, просто не добавляя лекарственных субстанций к раствору полимера в воде или в физиологическом растворе. В таком случае эта методика становится аналогична методу прямого растворения (Раздел 3.2.16).

3.2.20 Измерение размеров полимерных наночастиц

Измерение размеров «пустых» и «нагруженных» полимерных наночастиц и модифицированных амфифильными полимерами липосом проводили методами динамического светорассеяния и анализа траектории наночастиц.

Метод динамического светорассеяния. Измерение размеров частиц проводили методом динамического светорассеяния на двухугловом анализаторе размеров частиц «Malvern Zetasizer Nano ZS» (Великобритания). Для этого готовили суспензию частиц в разных средах таким образом, чтобы наблюдалась слабая опалесценция. 3 мл такого раствора помещали в термостатируемую кювету прибора и проводили измерение. Полученные результаты представляли собой диаграмму распределения размера частиц по размеру с указанием среднего размера частиц.

Метод анализа траектории наночастиц. Альтернативным методом измерения размера наночастиц является метод анализа траектории наночастиц (NTA). По этому методу для визуализации частиц в растворе используется сфокусированный лазерный луч. При наблюдении освещенного объема раствора через ультрамикроскоп сверху, под прямым углом к лазерному пучку, отдельные наночастицы выглядят как светлые точки на темном фоне. Высокочувствительная научная камера записывает видео броуновского движения таких точек. Данная видеозапись обрабатывается программным обеспечением для выделения отдельных наночастиц на каждом кадре и отслеживания перемещений частиц между кадрами. Полученные данные автоматически обрабатываются с помощью уравнения Эйнштейна-Стокса для нахождения размера частиц.

Непосредственно нами, для определения размеров частиц, был использован прибор «NanoSight LM10» фирмы Malvern (Великобритания). Данный прибор оснащен полупроводниковым лазером с длиной волны 642 нм. Для проведения измерений готовили раствор частиц в разных средах, что бы он обладал слабой опалесценцией. Приготовленный раствор помещали в камеру для измерения. Полученные результаты представляли собой диаграмму распределения размера частиц по размеру с указанием среднего размера частиц.

3.2.21 Измерение ζ -потенциала полимерных наночастиц

ζ -потенциал «пустых» и «нагруженных» полимерных наночастиц, являющийся одной из важнейших характеристик их стабильности, определяли методом динамического светорассеяния на приборе «Malvern Zetasizer Nano ZS» (Великобритания). Для проведения измерений готовили раствор частиц в PBS так, что бы он обладал слабой опалесценцией. 1-2 мл такого раствора помещали в термостатирующую кювету с электродами и проводили измерение ζ -потенциала.

3.2.22 Определение морфологии и визуализация полимерных наночастиц

Морфологию полимерных наночастиц и модифицированных амфифильными полимерами липосом изучали методом сканирующей

трансмиссионной электронной микроскопии с использованием микроскопа «JEOL JEM-2000» (Япония) при напряжении 20-30 кВ. Для подготовки образцов каплю суспензии частиц помещали на подложку из поливинилформалия (0.2 масс. % раствор, "Sigma" (США)), нанесенного на медную сетку. После высушивания образец помещали в микроскоп и проводили исследования.

3.2.23 Изучение механической устойчивости полимерных наночастиц

Дисперсию полимерных наночастиц или модифицированных липосом в физиологическом растворе или дистиллированной воде отфильтровывали через фильтры «Millipore» (США) с диаметром пор 0,22 мкм. Полученные фильтраты подвергали 10, 15, 30 и 60 секундной обработке ультразвуком на установке «Bandelin Sonopuls HD 2070» (США) при максимальной мощности.

С помощью метода динамического светорассеяния оценивали размер полученных после фильтрации и ультразвукования частиц.

3.2.24 Исследование структурной организации смешанных полимер-липидных мембран

Для изучения взаимодействия синтезированных амфифильных полимеров с липидными мембранами анализировали изотермы сжатия пленок Ленгмюра, которые получали нанесением на поверхность водной фазы спиртовых растворов смесей полимера и липида. Исследования проводились на установке, произведенной компанией НТ-МДТ (Россия). Объем ванны установки составлял 300 мл. Скорость сжатия липидного монослоя составляла 20 мм/мин. При этом, в качестве водной фазы для пленок использовался фосфатный буфер с рН 7.

3.2.25 Получение липосом, модифицированных амфифильными полимерами N-винилпирролидона

Липосомы формировали из смеси фосфатидилхолин / кардиолипин (мольное соотношение 7:3). Спиртовые растворы липидов и раствор амфифильного полимера ВП в метаноле смешивали в колбе. Затем органические

растворители отгоняли при 308 К на роторном испарителе («Heidilph Hei-Var Value Digital», Германия). Образовавшаяся тонкая пленка липидов с амфифильным полимером диспергировалась в 2 мл 10^{-2} М боратного буфера, pH = 9.2. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком на максимальной мощности течение 5-10 минут (ультразвуковой диспергатор «Bandelin Sonopuls HD 2070» (США)), непрерывно охлаждая холодной водой.

Сформированные липосомы отделялись от пыли на центрифуге «Sigma 2-16» (Германия) в течение 5 минут (скорость вращения 46000 об/мин). Для получения модифицированных липосом в виде порошков раствор сушили в лиофильной сушке «Martin Christ BETA 2-8 LDplus» (Германия) 24÷48 часов. Количество вводимого амфифильного ПВП составляло 1÷15 мол. %.

Для дальнейшего изучения свойств полимер-модифицированных липосом методом флуориметрии к смеси липидов добавляли 0,5 мол. % флуоресцеин-изо-тиоцианилдипальмитоилфосфатидилэтанол-амина (ФИТЦ-ДПФЭ), являющегося флуоресцентномеченным липидом.

3.2.26 Исследование стабильности модифицированных липосом

Для изучения стабильности модифицированных амфифильными полимерами липосом к раствору, содержащему модифицированные или простые, немодифицированные липосомы, добавляли расчетное количество дезагрегантов (10%-ного водного раствора Тритона X-100 или этанола), интенсивно перемешивали и через 10 минут измеряли относительное светорассеяние и размер частиц на приборе «Malvern Zetasizer Nano ZS» (Великобритания)

Изменения интенсивности флуоресценции липосом со встроенной в мембрану флуоресцентной меткой (ФТК-ДПФЭ) под воздействием поликатиона (поли-этилпиридиниум-4-винилхлорида) в присутствии или отсутствии амфифильного полимера N-винилпирролидона в составе липосом фиксировались с помощью флуоресцентного спектрофотометра «Hitachi F-2000» (Япония).

3.2.27 Включение фунгицидов в липосомы, модифицированные амфифильными полимерами

Формирование модифицированных липосом с включенными антибиотиками проводили с использованием двух методик.

В первом случае липосом-формирующие компоненты (смеси фосфатидилхолин / кардиолипин (мольное соотношение 7:3)), а также амфифильный полимер и биологически активное вещество (нистатин или амфотерицин В) в расчетных количествах растворяли в хлороформе при температуре 20°C.

Полученный раствор вакуумировали в среде азота или аргона, полученную пленку замораживали. Затем пленку диспергировали в фосфатном буфере pH 7,4 0,01М при 277 К. Диализат пропускали через фильтры Nucleopore (Spectrum Lab Inc.) с размером пор 0.6, 0.4 и 0.2 мкм. Выделенные фракции липосом размером около 200 нм использовались для исследований их стабильности и биологической активности.

Во втором случае липосом-формирующие компоненты, а также расчетные количества амфифильного полимера и нистатина (амфотерицина В) растворяли в этаноле, а затем раствор упаривали на ротаторном испарителе «Heidolph Hei-Var Value Digital» (Германия) при 308 К.

Полученную пленку диспергировали в 0,01М фосфатном буфере pH 9,2. Полученную эмульсию подвергали воздействию ультразвуком на максимальной мощности в течение 5-8 минут (ультразвуковой диспергатор «Bandelin Sonopuls HD 2070» (США)) непрерывно охлаждая холодной водой. Фракцию липосом с размерами 200 нм выделяли с помощью гелепроникающей хроматографии с использованием сефадекса G-25.

Обе методики давали аналогичные результаты по размерам получаемых липосом, и содержанию модифицирующих полимеров и включенных фунгицидов.

3.2.28 Исследование стабильности модифицированных липосом с фунгицидами

Для определения механической стабильности водную дисперсию липосом с включенным антибиотиком (нистатин или амфотерицин В) в пробирках обрабатывали ультразвуком при 293 К в течение 1-10 мин с частотой 35кГц («Bandelin Sonopuls HD 2070» (США)), после этого в пробирки добавляли метанол до конечного соотношения вода/метанол=1/1. Далее методом ультрафильтрации на мембранах «UM-2 Diaflo ultrafilters» (Amicon, США) отделяли низкомолекулярную фракцию антифунгального антибиотика. Количество антибиотика в фильтрате определяли спектрофотометрическим методом.

Для определения устойчивости к циклам замораживания и оттаивания, дисперсию полимерных модифицированных амфифильными полимерами и обычных липосом замораживали при 203 К в течение 5 дней. По истечении срока образцы разделяли на 3 партии по температуре оттаивания (313 К, 293 К, 278 К) и измеряли размер частиц в размороженных растворах методом динамического светорассеяния.

3.2.29 Количественное определение включенного в полимерные наночастицы биологически активного вещества

Количественное определение включенных в полимерные наночастицы или в модифицированные амфифильными полимерами липосомы биологически активных веществ проводили спектрофотометрическим методом, на спектрофотометре «Unico SQ-2802PCS UV-Vis» (Германия), измеряя интенсивность поглощения наночастицами, после отделения невключившегося лекарственного вещества.

Концентрации исследованных в данной работе биологически активных и лекарственных субстанций (нистатин, амфотерицин В, индометацин, соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк (ВВІ)), включенных в полимерные частицы или в модифицированные амфифильными полимерами липосомы,

рассчитывали по полученным калибровочным графикам. Для построения калибровочного графика готовили последовательным двукратным разбавлением ряд растворов включаемого лекарственного или биологически активного вещества в этаноле (не менее 6 точек).

Интенсивность светового поглощения для растворов нистатина определяли при длине волны $\lambda = 306$ нм, для растворов амфотерицина В при длине волны $\lambda = 406$ нм, для растворов ВВІ при длине волны $\lambda = 253$ нм, и для растворов индометацина при длине волны $\lambda = 319$ нм.

3.2.30 Изучение кумулятивной кинетики выделения БАВ из полимерных наночастиц

Точную навеску полимерных наночастиц или модифицированных амфифильными полимерами липосом, с известным содержанием биологически активной субстанции растворяли в фиксированном объеме дистиллированной воды, физиологического или буферного раствора. Полученный раствор заливали в кассету для диализа (Thermo Scientific, США) с молекулярно-массовым отсечением 1 кДа или 3 кДа и диализовали против фиксированного объема среды (без ее замены). Через временные промежутки отбирали по 3 мл диализуемой системы из кассеты и проводили ее спектрофотометрическое исследование и количественное определение активной субстанции, в соответствии с методикой из Раздела 3.2.29. После измерения пробу возвращали в кассету для неизменности объема и состава системы, и продолжали диализ. Измерения проводили до прекращения выделения включенного вещества из кассеты для диализа.

3.2.31 Изучение устойчивости полимерных наночастиц в присутствии сыворотки крови

Суспензии полимерные наночастиц, содержащие иммобилизованный пирен в концентрации $0,01 \div 0,03$ мг/мл, инкубировали с 50%-ной сывороткой крови человека. Высвобождение пирена из наночастиц при различной продолжительности инкубации регистрировали по изменению интенсивность

флуоресценции пирена, измеренной при длине волны эмиссии 385 нм и длине волны возбуждения 339 нм. Для сравнения наблюдали выделение пирена из НЧ в присутствии и в отсутствии сыворотки крови. В качестве контроля брали свободный пирен в физиологическом растворе и чистую сыворотку крови.

3.2.32 Исследование литического действия амфифильных полимеров на компоненты крови

Для исследования использовали эритроциты, полученные из крови барана. Кровь отбиралась из яремной вены барана и смешивалась с равным объемом стерильного раствора Олсвера при соблюдении асептических условий, затем перемешивалась и разливалась в пробирки. Для стабилизации клеток кровь оставляли при 4⁰С на 4-8 суток. Выделенные эритроциты хранили при 4⁰С.

Чтобы приготовить стандартную взвесь эритроцитов барана осадок эритроцитов (Е) несколько раз отмывали 10-кратным объемом буфера VBS²⁺, а затем центрифугировали (1000 об/мин) в течение 10-15 минут. Отмытые эритроциты барана ресуспендировали в буфере VBS²⁺ так, чтобы после 10-кратного разбавления дистиллированной водой полученная суспензия характеризовалась поглощением, 0.7 при длине волны 541 нм. Такая суспензия соответствовала концентрации клеток 1x10⁹ клеток/мл. Стандартизованные эритроциты хранились при 4⁰С и использовались в течение нескольких суток.

Сенсибилизацию эритроцитов барана (Е) проводили, добавляя к стандартизованной взвеси эритроцитов (1x10⁹ клеток/мл) равный объем гемолитической сыворотки, разбавленной в соотношении 1 к 400 буфером VBS²⁺, тщательно перемешивая на вортекс-шейкере, и инкубируя затем при 37⁰С в течение 30 минут, при периодическом встряхивании. После завершения инкубации, добавляя буфер VBS²⁺, доводили концентрацию взвеси эритроцитов до 1,5 x 10⁸ клеток/мл, так, чтобы оптическая плотность 200 мкл готовой суспензии сенсибилизированных эритроцитов (ЕА), лизированных в 3.0 мл воды, равнялась 1.0 при длине волны 412 нм. Стандартизованная взвесь ЕА хранилась при 4⁰С и использовалась для исследований в течение суток.

Исследования литической активности проводились с амфифильными полимерами, растворенными в буфере VBS²⁺ (0,01 M). Эксперименты проводили следующим образом. Возрастающие концентрации препаратов (от 0,2 до 0,8 мМ) были инкубированы с 200 мкл EA ($1,5 \cdot 10^8$ кл/мл) в течение 30 мин при 37⁰C при периодическом перемешивании. После инкубации в каждую пробу добавляли по 2,5 мл холодного (4⁰C) раствора 0,15 M NaCl, центрифугировали и определяли степень лизиса в супернатанте спектрофотометрическим методом при длине волны 412 нм. Контрольная проба не содержала добавленного амфифильного полимера. Повышенный гемолиз в опытных пробах, по сравнению с контрольной пробой, свидетельствовал о наличии воздействия на эритроциты.

3.2.33 Исследование активации системы комплемента в присутствии амфифильных полимеров

В качестве инициаторов и мишеней для действия комплемента использовали сенсibilизированные эритроциты барана (EA). Эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором и помещали в изотонический вероналовый буфер (рН 7.2). Стандартная смесь содержала 18 млн. клеток на 1 мл буфера. Источником активности комплемента являлась сыворотка крови доноров.

Оценку влияния амфифильных полимеров N-винилпирролидона на комплемент проводили, используя следующие показатели состояния системы: время до наступления гемолиза или величина lag-периода, скорость комплемент-зависимого лизиса эритроцитов (V лизиса) и гемолитическая емкость комплемента (ГЕК). Все показатели определяли кинетическим способом, регистрируя лизис клеток по убыли оптической плотности при а термостатированной (37⁰C) кювете спектрофотометра при 412 нм.

Для определения влияния амфифильных полимеров на активацию комплемента по альтернативному пути лизис эритроцитов барана регистрировали в присутствии 10 мМ этиленгликоля тетрауксусной кислоты (ЭГТА), избирательно блокирующего классический путь активации комплемента. Воздействие амфифильных полимеров на классический путь без амплификации

со стороны альтернативного пути определяли в сыворотке крови человека, предварительно лишенной фактора D, путем избирательной сорбции фактора D на ионообменнике ДЕАЕ-Сефадекс А-50.

3.2.34 Исследование влияния амфифильных полимеров на реологические свойства крови

Изучение влияния растворов амфифильных поли-N-винилпирролидонов проводили на крови доноров. Использовали венозную кровь на гепарине.

Определение вязкости крови и плазмы. Асимптотическую вязкость крови и плазмы определяли с помощью ротационного вискозиметра АКР-2 (Россия) при $t=37^{\circ}\text{C}$ и скорости сдвига 250c^{-1} . Для получения плазмы пробу крови центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин.

Определение деформируемости эритроцитов. Для определения деформируемости эритроцитов пробу крови центрифугировали 15 мин при 1500 об./мин., затем со дна пробирки брали эритроцитарную массу и разводили её физиологическим раствором до гематокрита $Ht=2$. Деформируемость эритроцитов исследовали фильтрационным методом, основанным на прохождении эритроцитов через фильтры с порами 3 мкм и толщиной 10-15 мкм. Измерения проводили на приборе ИДА-1. Регистрировали время фильтрации физ. раствора t_{ϕ} . Далее определяли время фильтрации суспензии эритроцитов t_c . Вычисляли индекс ригидности эритроцитов по формуле

$$IR = \frac{t_c - t_{\phi}}{t_{\phi}} \cdot \frac{100}{Ht}$$

Определение агрегационной способности эритроцитов. Для исследования агрегационной способности эритроцитов пробу крови центрифугировали 15 мин при 1500 тыс. об/мин. Со дна пробирки брали 5-6 капель эритроцитарной массы. Пробирку опять центрифугировали 15 мин. при 3000 об/мин. для получения плазмы. К отобранной эритроцитарной массе добавляли плазмы до гематокрита 0,25-0,27 л/л. Агрегацию эритроцитов измеряли в камере Горяева фотометрическим способом.

Определение кислотной резистентности эритроцитов. Сущность метода состоит в регистрации кинетики гемолиза эритроцитов при действии гемолитика в фотоэлектрическом колориметре при постоянной температуре (+24°C). Взвесь эритроцитов готовилась из свежевзятой гепаринизированной крови на физиологическом растворе с оптической плотностью 0,9, измеренной на фотоэлектрическом однолучевом колориметре (КФО). К 3,0 мл взвеси эритроцитов приливали 3,0мл 0,002Н НСІ, приготовленный на физиологическом растворе и включали механизм записи. Изменение оптической плотности регистрировалось самописцем. Кривая изменения оптической плотности взвеси эритроцитов включалась с систему координат, и ось абсцисс делили на равные промежутки по 1 см, что соответствует промежутку времени 1 мин. Затем из точек пересечения проводили линии, параллельные абсцисс, до пересечения с соответствующим перпендикуляром; на основании величины отрезков перпендикуляров строили эритрограмму. Для определения качественного состава эритроцитов эритрограмма делилась на три группы по устойчивости эритроцитов к кислотному гемолитику: первые 4мин - низкостойкие эритроциты (НС), последующие 4мин - среднестойкие эритроциты(СС), всё остальное - высокостойкие эритроциты. Количественной характеристикой кислотной резистентности служила их суммарная резистентность (СР) являющаяся суммой произведений процента гемолизированных эритроцитов на время в минутах, соответствующее данной группе эритроцитов, вычисляемое по формуле:

$$СР=n_1T_1+n_2T_2+\dots+n_kT_k,$$

где СР – суммарная резистентность эритроцитов; n – процент эритроцитов, разрушившихся за единицу времени (мин); Т – время, прошедшее от начала гемолиза.

Методика определения свободного гемоглобина. В пробирке готовили смесь, состоящую из 2мл ацетатного буфера, 1мл раствора бензидина 0,1%, 1мл раствора Н₂О₂ 0,33%. Выдерживали 3 мин. В эту пробирку добавляли 20 мкл плазмы, не касаясь ни стенок пробирки, ни самого раствора. Раствор

выдерживали 3 мин. И затем измеряли оптическую плотность на КФО. Содержание свободного гемоглобина определяли по калибровке.

Статистическую обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Отличия считали достоверными при $P \leq 0,05$.

3.2.35 Оценка цитотоксичности полимеров и полимерных наночастиц

Для определения цитотоксичности полимеров использовали нормальные фибробласты эмбриона человека линии ФЭЧ-Т и клетки устойчивой карциномы молочной железы линии MSF/R7 (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского). Для культивирования клеток использовали питательную среду «Игла» производства института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) производства фирмы «ПанЭко».

МТС тест. За 24 часа до эксперимента клетки устойчивой карциномы молочной железы MSF/R7 высаживали в 96-луночные планшеты для получения монослоев клеток на поверхности лунок, в количестве 12-15 тысяч клеток на лунку. На следующий день 2 мас.% растворы разных образцов полимеров, фильтровали через 0,22 мкм стерилизующие фильтры. Затем из приготовленных планшетов удалялась культуральная среда и в каждую лунку первого ряда добавлялась аликвота (200 мкл) раствора полимера. Второй и следующие ряды лунок заполняли, после разбавления исходных растворов в 2, 4, 8, 16 и т.д. раз.

Полученные образцы инкубировались в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5% содержании CO₂ в воздушной среде и 95% влажности в течение 1 часа. После инкубации среда в лунках заменялась на культуральную, затем планшеты снова инкубировались в течение еще 72 часов при тех же условиях.

Долю выживших клеток определяли и рассчитывали следующим методом. В каждую лунку с клетками добавляли по 50 мкл раствора метилтетразолиевого синего (МТС). Этот краситель проникает внутрь клеток, окисляется там до формазана под действием окислительно-восстановительных ферментов, а затем выпадает в форме синих кристаллов. В мертвых клетках такое превращение с МТС не происходит. Через 2-3 часа после того, как добавили краситель МТС,

среду в планшетах заменяли на ДМСО. В результате происходил лизис клеток что приводило к растворению кристаллов формазана в ДМСО. Оптическую плотность окрашенных растворов, полученных этим способом, определяли фотометрическим методом при длине волны 550 нм и сравнивали с контрольным значением оптической плотности, определенной в отсутствие полимера. Каждый результат рассчитывают как среднее для 3х параллельных измерений.

MTT тест. Клетки нормальных фибробластов эмбриона человека линии ФЭЧ-Т рассеивали на 96-луночный планшет в концентрации 200 тыс. кл/мл в каждую лунку, в объеме 100 мкл среды с 10% ЭТС, и культивировали в CO₂ инкубаторе при 37°C. Через 24 часа после посадки клеток, в лунки вносили по 100 мкл раствора изучаемого полимера или полимерных наночастиц в заданных разведениях. Эксперименты повторяли с 4 повторами. Контролем служили интактные клетки, культивируемые параллельно с опытными.

MTT-тестирование для изучения цитотоксического действия, основано на способности митохондриальных и цитоплазмических дегидрогеназ живых, метаболически активных клеток восстанавливать бесцветный водорастворимый MTT-реагент (тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) до голубого формазана, который кристаллизуется внутри клеток. Кристаллы формазана переводят в раствор с помощью органического растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) с последующим количественным определением спектрофотометрическим методом. Таким образом, восстановленный клетками MTT-реагент является показателем жизнеспособности клеток в культуре, что позволяет оценить гибель клеток, вызванную цитотоксичным веществом или препаратом.

После культивирования клеток в полимерными наночастицами в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C, культуральную среду из лунок отбирали, добавляли по 100 мкл среды с 20 мкл MTT (Sigma, США) в исходной концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 часов. Затем среду с MTT удаляли и добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся в живых клетках кристаллов формазана. Осадок клеток ресуспендировали в течение 6 мин пипетированием.

Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора формазана, измеряя его оптическую плотность на спектрофотометре «Immunochem 2100» (США) при длине волны 550 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Отличия считали достоверными при $P \leq 0,05$

3.2.36 Оценка острой токсичности амфифильных полимеров и полимерных наночастиц

Исследования проводились на мышах BALB/C и крысах Wistar в соответствии с правилами работы с лабораторными животными, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации [318].

Мыши линии BALB/C (самцы и самки, возраст 6-7 недель, масса тела 20-21 г) и крысы Wistar (самцы и самки, возраст 7-8 недель, масса тела 180-210 г) были получены из питомника лабораторных животных Филиала ИБХ РАН в г. Пущино (Московская обл.). Сформированные группы животных содержались в условиях вивария НИИЭК ФГУ «РКНПК Росмедтехнологий» на стандартном рационе брикетированных экструзированных кормов и со свободным доступом к питьевой воде. После двухнедельного карантина животные были введены в эксперимент.

Острую токсичность «пустых» полимерных наночастиц изучали при введении доз в интервале 200-6000 мг/кг для однократного внутрибрюшинного введения и в интервале 20-100 мг/кг для однократного внутривенного введения препаратов.

Острую токсичность полимерных наночастиц, содержащих индометацин, изучали при однократном внутрибрюшинном введении доз в интервале 10,0-90,0 мг/кг (в расчете на индометацин).

Острую токсичность полимерных наночастиц, содержащих фактор IX свертывания крови изучали при однократном внутривенном введении доз в интервале 1-100 мг/кг.

Наблюдение за животными проводили от 2х до 4х недель. Токсичность оценивалась по числу павших животных, срокам их гибели и «пиками» гибели, а

также на основании клинической картины интоксикации, включая двигательную активность и поведенческие реакции. При проведении макроскопического (паталогоанатомического) исследования умерщвленных в конце эксперимента или павших в ходе эксперимента животных оценивали состояние внутренних органов (сердце, головной мозг, легкие, печень, почки, селезенка).

По результатам экспериментов рассчитывали значение ЛД₅₀ по таблице «Средние эффективные дозы и их ошибки при разных последовательностях реакций и разных экспериментальных дозировках» [319]. Класс токсичности исследуемых соединений определяли методом И.В. Березовской (2003) [289] в зависимости от значения ЛД₅₀.

Выборочно проводились патоморфологические исследования. Определяли вес следующих органов: сердца, легких, печени, почек, селезенки, тимуса, семенников и яичников. Массовые коэффициенты рассчитывались исходя из массы тела, которую измеряли перед смертью животного. Для гистологического исследования брали легкие, сердце, печень, селезенку и семенники. Органы фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Серии срезов окрашивали гематоксилин-эозином.

Статистическую обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Отличия считали достоверными при $P \leq 0,05$.

3.2.37 Определение специфической активности фактора IX свертывания крови в виде его полимерной наноразмерной формы

Для определения специфической активности фактора IX свертывания крови, включенного в полимерные наночастицы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона использовался метод одностадийного коагулологического анализа. При этом анализ осуществляли в динамических условиях, то есть проводили повторные измерения активности через определенные промежутки времени для получения полной картины падения активности со временем.

Коагулологический анализ основан на измерении времени свертывания плазмы, которое напрямую зависит от содержания фактора, активность которого

измеряется. Проводился анализ с использованием коагулометра Amelung KC 4 A micro (Tcoag, Ирландия). Использовали клоттинговый метод, основанный на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад плазмы, до момента образования сгустка (выпадения фибрина). Образование фибрина приводит к увеличению мутности образца, которое детектируется оптической системой.

Для исследований использовали два типа человеческой плазмы – контрольную, и субстрат-дефицитную по фактору IX.

Контрольная плазма (НПО «Ренам», Россия) представлял собой полноценную плазму, взятую у здоровых доноров (мужчин) лечебным плазмаферезом, и содержащую все необходимые компоненты крови, нужные для запуска процесса свертывания. Такая плазма использовалась для построения калибровки коагулометра.

Субстрат-дефицитная по фактору IX плазма (НПО «Ренам», Россия) использовалась как среда для внесения в нее проб фактора IX и препаратов наночастиц на основе амфифильных полимеров с включенным фактором IX. Такая плазма содержала все необходимые для процесса свертывания компоненты крови, исключая фактор IX (менее 1% от нормы). Выделялась из крови доноров, болеющих тяжелой формой гемофилии В, методом лечебного плазмафереза.

Используется прямолинейная зависимость между активностью фактора (его содержанием) и разведением пробы фактора в плазме в полулогарифмических координатах. Для достоверности результатов готовили четыре разведения одной пробы анализируемого препарата фактора IX в плазме (например, в 21, 105, 210 и 420 раз) и проводили измерения. Результаты представляют собой среднее арифметическое двух параллельных измерений. На основе полученных результатов строился график для сравнения с калибровочной прямой (полученной измерениями контрольной плазмы) по нескольким критериям: критерий параллельности (коэффициент чувствительности); критерий линейности (r^2); стандартное отклонение. Критерий параллельности, или коэффициент чувствительности представлял собой тангенс угла наклона получившейся прямой.

Чем это значение было ближе к калибровочному, тем меньше были ошибки измерения при разведении. Критерий линейности r^2 - сумма квадратов отклонений точек от данной прямой к сумме квадратов отклонений точек калибровочной прямой, в идеале равен 1,000. Допускалось значение r^2 0,999. Стандартное отклонение использовалось как контрольное. Если измерение не проходило хотя бы по одному из критериев, то его считали недостоверным. Активность в образце рассчитывали, учитывая разведение.

Концентрат фактора IX свертывания крови был получен на действующем производстве в лаборатории фракционирования белков плазмы отдела экспериментальной и производственной трансфузиологии ГУ Гематологический научный центр РАМН, Москва. Хранился фактор IX в замороженном виде.

Для получения полимерных наноразмерных агрегатов, содержащих стабилизированный фактор IX, использовали метод прямого растворения (Раздел 3.2.16). Для этого использовали специальный буфер С, состав которого полностью соответствовал составу среды, в которой получали фактор IX после фракционирования и представлял собой смесь 0.01 М три(гидроксиметил)аминометан, 0.06 М цитрат натрия (трехзамещенный), 0.12 М NaCl (рН 7,45). Параметры среды контролировали и проверяли каждый раз перед очередным экспериментом.

Коагулологический анализ заключался в определении специфической активности фактора IX в образцах его полимерной наноразмерной формы при различных температурах (37°C, 42°C, 60°C). Для анализа отбирали пробу в 10 мкл из нужного образца, следя за тем, чтобы в пробу не попадали сгустки или взвеси. При необходимости производим предварительное центрифугирование образца. Отобранную пробу 10 мкл вносили в субстрат-дефицитную по фактору IX плазму и готовили четыре разведения. Далее следовало добавление CaCl_2 , который выполнял роль активатора свертывания плазмы, и затем систему помещали в термостат для поддержания заданной температуры. Этот момент считали за начало свертывания, время которого фиксировалось как время анализа. Во избежание накопления ошибки в определении активности в нулевой точке

размораживание фактора IX и приготовление его полимерной наносомальной формы полимером производили непосредственно перед измерениями.

3.2.38 Исследование влияния полимерной наносомальной формы фактора IX на его выработку организмом в условиях *in vivo*

Клетки гепатоклеточной карциномы HepG2 (Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН) выращивали на среде ДМЕМ (НПП "ПанЭко", Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (НПП "ПанЭко", Россия).

Мыши линии BALB/C nude, получены из филиала Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова НПП «Питомника лабораторных животных» (Московская область, г. Пущино). Животных содержали в пластиковых клетках по 4-6 особей с дополнительной фильтрацией и вентиляцией воздуха и свободным доступом к пище и воде. В работе использовали самок в возрасте 6–7 недель, весом 16–18 г. Животные вводились в эксперимент после двухнедельного карантина. Исследования проводились в соответствии с правилами работы с лабораторными животными, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации [301].

Опухоль, вызывающую недостаток факторов свертывания крови (в том числе и фактора IX) формировали путем введения мышам клеток гепатоклеточной карциномы HepG2 (Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН) (2×10^6 клеток/мышь в 100 мкл 0,9 % NaCl) подкожно в правый и левый бок мыши, ближе к бедру. Время формирования опухолей составляло 12–14 дней. Эксперимент начинали, когда объем опухоли становился достаточно большим (приблизительно 1 см в диаметре).

Наночастицы на основе амфифильного полимера ПВП-ОД3500, содержащие суммарно 20 мкг фактора IX вводили внутривенно мышам с опухолью, полученной из клеток гепатоклеточной карциномы HepG2 (n=3).

После этого в течение 7 недель после инъекции препарата измеряли уровень фактора IX в плазме экспериментальных животных методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Фактор IX Тест, НПО «Ренам», Россия).

Для сравнения мышам с опухолью также инъекционно вводили чистый фактор IX в количестве 20 мкг. В качестве контроля определяли уровень фактора IX в плазме здоровых животных, без опухоли.

Статистическую обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Отличия считали достоверными при $P \leq 0,05$.

3.2.39 Оценка биораспределения и биодоступности наносомальной полимерной формы индометацина

Исследования биораспределения и биодоступности индометацина в виде полимерной лекарственной формы проводили на крысах Wistar (самцы, масса тела 150-180 г) в соответствии с правилами работы с лабораторными животными, установленными Министерством здравоохранения РФ [318].

Перед проведением экспериментов животных выдерживали на карантине в течение 14 дней. Животных содержали на стандартном брикетированном корме со свободным доступом к питьевой воде. Для проведения экспериментов формировали две группы животных, по 6 животных в каждой группе. Животным первой группы внутрибрюшинно вводили 1 мл препарата, содержащего наночастицы с индометацином в дозе 10 мг/кг (в пересчете на чистый индометацин). Животным второй группы для сравнения внутрибрюшинно вводили 1 мл суспензии свободного индометацина, также в дозе 10 мг/кг.

Для определения биодоступности наносомальной и свободной формы индометацина по их содержанию в плазме крови, в течение 24 ч после введения препаратов, через определённые промежутки времени, из хвостовой вены животных отбирали образцы крови для анализа. Индометацин из образцов экстрагировали метанолом, а затем определяли его содержание в метанольных экстрактах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (хроматограф Spectra Physics, США) с использованием колонки LiChro-Cart RP-18

(размер 250 x 4 мм, размер частиц сорбента 5 мкм). Хоромотограммы регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора Shimadzu SPD-6AV (Япония) при длине волны 280 нм. Анализ проводился при комнатной температуре. В качестве подвижной фазы использовалась система метанол – уксусная кислота (1 масс. %) (объемное соотношение 73:27, pH 3.0), а скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин.

Для исследования биораспределения полимерных наночастиц, содержащих индометацин, в тканях и органах, животных из двух групп, после однократного введения дозы индометацина 10 мг/кг в виде наносомальной полимерной формы или суспензии свободного индометацина соответственно, умерщвляли через 0.5, 1, 4 и 8 часов. Сердце, печень, легкие и почки отделяли, промывали фосфатно-солевым буферным раствором (pH 7,2), высушивали и взвешивали. Затем образцы тканей и органов гомогенизировали, и экстрагировали метанолом содержащийся в них индометацин. Концентрацию индометацина определяли методом ВЭЖК по методике, описанной ранее в этом разделе. Затем рассчитывали количество лекарственного вещества, накопленного за 8 часов в каждом из органов в пересчете на единицу его массы, и, наконец, сравнивали результаты и определяли разницу между результатами для групп, получивших полимерные наночастицы с индометацином или свободный индометацин.

Фармакокинетические параметры рассчитывали с использование программного обеспечения «Phoenix WinNonlin 5.3» (Certara, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel. Для расчетов использовали критерий t Стьюдента, и отличия считали достоверными при $P \leq 0,05$. Полученные данные представлены как средние значения \pm S.D.

3.2.40 Оценка противовоспалительного действия лекарственной формы индометацина на основе полимерных наночастиц

Исследование противовоспалительного действия полимерной лекарственной формы индометацина проводили на крысах Wistar (самцы и самки,

масса тела 150-180 г). Использовали две модели воспалительного процесса - модель отека лапы крыс, индуцированного полным адьювантом Фрейнда (ПАФ), и модель каррагинан-индуцированного отека лапы крыс.

При воспроизводстве модели каррагинан-индуцированного отека лапы крыс в подушечку правой лапы крысы вводили 1% раствор каррагинана (Sigma, США) в объеме 0,1 мл. Полимерные наночастицы с индометацином в разных дозах вводили внутривентрально за 30 мин до введения каррагинана, в случае профилактической модели лечения, или через 60 минут после введения каррагинана, в случае терапевтической модели лечения. В качестве препарата сравнения использовали чистую субстанцию индометацина (Sigma, США). Измерение объема лап проводили с помощью цифрового водяного плетизмометра (Ugo Basile, Италия) через 4 часа после введения каррагинана. Терапевтическое воздействие препаратов оценивали по степени угнетения воспалительной реакции в сравнении с интактной левой лапой данного животного и реакцией лап крыс контрольной группы.

При воспроизводстве модели ПАФ-индуцированного отека лапы крыс, ПАФ (Thermo Scientific, США) вводили в подушечку правой лапы крысы в объеме 0,1 мл. Полимерные наночастицы с индометацином в разных дозах вводили внутривентрально, первый раз через 2 часа после инъекции ПАФ, а затем 1 раз в день в течение 3 дней. Препарат сравнения, чистую субстанцию индометацина применяли в таком же режиме.

Статистическую обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Отличия считали достоверными при $P \leq 0,05$.

3.2.41 Оценка ульцерогенности полимерной наноформы индометацина

Ульцерогенность новой лекарственной формы индометацина на основе полимерных наночастиц оценивалась при внутривентральном введении (в виде водных суспензий с добавлением 1% крахмала) в течение 4-х дней по 1 раз в день крысам Wistar (самцы и самки, масса тела 150-180 г), лишенным пищи за 18 часов до эксперимента. На 5-й день после начала опыта животные забивались (под

легким эфирным наркозом), желудки крыс извлекались, рассекались их по малой кривизне и промывались в изотоническом растворе хлорида натрия для удаления их содержимого. Визуальная оценка состояния слизистой оболочки желудка проводилась с использованием лупы, после чего определялась степень деструктивного поражения (количество эрозий и кровоизлияний в пересчете на одно животное). Ульцерогенная активность новых соединений оценивалась по значению индекса Паулса. Индекс Паулса (ИП) – интегральный показатель масштабов деструкции в желудке, определяли по формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{СД} \times N(\%)}{100},$$

где СД – степень деструкции, N – количество крыс с поражениями, %.

Помимо этого, подсчитывалась суммарная протяженность деструкций (полосовидных поражений, эрозий, точечных поражений) [320].

В каждой серии опытов использовали по 8 животных. Статистическую обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Отличия считали достоверными при $P \leq 0,05$.

ВЫВОДЫ

1. Предложен новый подход к решению проблемы доставки плохорастворимых биологически активных и лекарственных веществ, основанный на использовании в качестве носителей самопроизвольно образующихся в водных средах наноразмерных ассоциатов амфифильных производных поли-N-винилпирролидона и липосом, модифицированных амфифильными полимерами. Показаны возможности практического применения таких систем доставки на примере иммобилизованных форм соевого ингибитора протеиназ типа Баумана-Бирк и его производных, фактора крови IX, нистатина, амфотерицина В и индометацина.

2. Сформулированы научные подходы к синтезу новых амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона, состоящих из гидрофильного полимерного фрагмента разной молекулярной массы и одной концевой n-алкильной или ди-n-алкильной гидрофобной группы различного строения.

3. Разработаны методы синтеза новых функциональных амфифильных полимеров, содержащих боковые функциональные группы в полимерном фрагменте – эпоксидные, альдегидные, аминокислотные и другие. Показана перспективность их использования для создания носителей для направленного транспорта БАВ в организме.

4. На основе детального анализа поведения амфифильных полимеров в водных средах, показано, что при определенных концентрациях они самопроизвольно формируют наноразмерные сферические структуры размером от 30 до 300 нм.

5. Получены и охарактеризованы липосомы, модифицированные синтезированными амфифильными производными поли-N-винилпирролидона (ПВП). Установлено, что модификация липосомальных мембран амфифильными полимерами ВП ведет к увеличению их стабильности против воздействия различных дестабилизирующих факторов, таких как поликатионы, детергенты, механическое воздействие, циклы замораживания-размораживания, и к повышению эффективности включенных в них БАВ.

6. Разработаны и опробованы методы получения наноразмерных полимерных систем доставки БАВ различной природы. С использованием модельных БАВ проведено сравнение различных методов получения наночастиц (диализ, ультразвуковое диспергирование, эмульсионный метод и т.д.) и определены оптимальные условия получения наноразмерных форм введения с высоким содержанием включенного БАВ (массовое соотношение гидрофильной и гидрофобной частей полимера, его концентрация, массовое соотношение полимера и БАВ, тип выбранного растворителя).

7. Показано, что наноносители на основе синтезированных амфифильных полимеров способны с высокой эффективностью включать БАВ различной природы. Впервые были получены полимерные наночастицы, содержащие соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк и его производные (препараты белковой природы, обладающие противовоспалительным и антиканцерогенным действием), противовоспалительный препарат индометацин, противогрибковые препараты нистатин и амфотерицин, фактор крови IX. Для всех исследованных лекарственных веществ определены преимущества их новых иммобилизованных полимерных наноразмерных форм по сравнению с немобилизованными субстанциями.

8. Проведено изучение *in vitro* и *in vivo* биосовместимости синтезированных амфифильных полимеров, их цитотоксичности, острой токсичности, влияния на компоненты и реологические свойства крови. Показана высокая биосовместимость амфифильных полимеров ВП и наночастиц на их основе.

9. Разработана новая стратегия получения биосовместимых амфифильных полимеров с различным строением и массовым соотношением гидрофильной и гидрофобной частей и полимерных наноносителей на их основе. Практическая значимость новой стратегии состоит в возможности получать наноразмерную форму абсолютно разных по строению и свойствам биологически активных веществ, сочетающую биосовместимость, направленную доставку в организме, сниженную эффективную дозу и пролонгированное, контролируемое действие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Patterson J.P., Kelley E.G., Murphy R.P., Moughton A.O., Robin M.P., Lu A., Epps T.H. Structural characterization of amphiphilic homopolymer micelles using light scattering, SANS, and Cryo-TEM // *Macromol.* 2013. Vol. 46. P. 6319-6325.
2. Crassous J.J., Rochette C.N., Wittemann A., Schrunner M., Ballauff M., Drechsler M. Quantitative analysis of polymer colloids by cryo-transmission electron microscopy // *Langmuir.* 2009. Vol. 25. P. 7862-7871.
3. Shokri N., Akbari Javar H., Fouladdel Sh., Khalaj A., Khoshayand M.R., Dinarvand R., Atyabi F., Nomani A., Azizi E. Preparation and evaluation of poly (caprolactone fumarate) nanoparticles containing doxorubicin HCl // *Daru.* 2011. Vol. 19. P. 12-22.
4. Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy// *Nat. nanotechnol.* 2007. Vol. 2. P. 761-770.
5. Abhilash M. Potential applications of nanoparticles // *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2010. Vol. 1. Iss. 1. P. 1-12.
6. Kayser O., Lemke A., Hernandez-Trejo N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2005. Vol. 6. Iss. 1. P. 3-5.
7. Crassous J.J., Ballauff, M., Drechsler M., Schmidt J., Talmon, Y. Imaging the volume transition in thermosensitive core-shell particles by cryo-transmission electron microscopy // *Langmuir.* 2006. Vol. 22. P. 2403-2406.
8. Murthy S.K. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges // *Int. J. Nanomed.* 2007. Vol. 2. Iss. 2. P. 129-141.
9. Nakache E., Poulain N., Candau F., Orecchioni A.M., Irache J.M. Biopolymer and polymer nanoparticles and their biomedical applications. // In: *Handbook of nanostructured materials and nanotechnology.* New York: Academic Press, 2000. P. 577-635.

10. Халатур П.Г. Самоорганизация полимеров // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. № 4. С. 36-43.
11. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules // *Pol. J.* 1985. Vol. 17. P. 117-132.
12. Lenz R.W. Organic chemistry of synthetic high polymers. New York: Wiley, 1967. 348 p.
13. McGrath J.E. Block and graft copolymers // *J. Chem. Educ.* 1981. Vol. 58. P. 914-921.
14. Odian G. Principles of polymerization. Hoboken: Wiley, 2004. 832 p.
15. Newkome G.R., Yao Z., Baker G.R., Gupta V.K. Cascade molecules: a new approach to micelles // *J. Org. Chem.* 1985. Vol. 50. P. 2003-2004.
16. Riess G. Micellization of block copolymers // *Prog. Polym. Sci.* 2003. Vol. 28. Iss. 7. P. 1107-1170.
17. Yasugi K., Nagasaki Y., Kato M., Kataoka K. Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(lactide) block copolymers as potential drug carrier // *J. Control. Release.* 1999. Vol. 62. Iss. 1-2. P. 89-100.
18. Kataoka K., Matsumoto V., Yokoyama M., Okano V., Sakurai Y., Fukushima S., Okamoto K., Kwon G.S. Doxombicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(benzyl aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance // *J. Control. Release.* 2000. Vol. 64. Iss. 1-3. P. 143-153.
19. Allen C., Han J., Yu Y., Maysinger D., Eisenberg A. Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone // *J. Control. Release.* 2000. Vol. 63. Iss. 3. P. 275-286.
20. Kabanov A.V., Nazarova I.R., Astafieva I.V., Batrakova E.V., Alakhov V.Yu., Yaroslavov A.A., Kabanov V.A. Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene- β -oxypropylene- β -oxyethylene) solutions // *Macromol.* 1995. Vol. 28. Iss. 7. P. 2303-2314.

21. Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes // *FEBS Letters*. 1990. Vol. 268. Iss. 1. P. 235-238.
22. Lasic D.D., Woodle M.C., Martin F.J., Valentincic T. Phase behavior of stealth-lipid-lecithin mixtures // *Period. Biol.* 1991. Vol. 93. Iss. 2. P. 287-290.
23. Cornelissen J.J.L.M., Fischer M., Sommerdijk N.A.J.M., Nolte R.J.M., Helical superstructures from charged poly(styrene)-poly(isocyanodipeptide) block copolymers // *Science*. 1998. Vol. 280. Iss. 5368. P. 1427-1430.
24. Discher B.M., Hammer D.A., Bates F.S., Discher D.E., Polymer vesicles in various media // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000. Vol. 5. Iss. 1-2. P. 125-131.
25. Hajduk D.A., Kossuth M.B., Hillmyer M.A., Bates F.S. Complex phase behavior in aqueous solutions of poly(ethylene oxide)-poly(ethylene) block copolymers // *J. of Phys. Chem.* 1998. Vol. 102. Iss. 22. P. 4269-4276.
26. Kabanov A.V., Alakhov V.Y. Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2002. Vol.19. Iss. 1. P. 72.
27. Burke S., Shen H., Eisenberg A. Multiple vesicular morphologies from block copolymers in solution // *Macromol. Symp.* 2001. Vol.175. Iss. 1. P. 273-284.
28. Discher D.E., Eisenberg A. Polymer vesicles // *Science*. 2002. Vol. 297. Iss. 5583 P. 967-973.
29. Shen H., Eisenberg A. Control of architecture in block-copolymer vesicles // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000. Vol. 39. Iss. 18. P. 3310-3312.
30. Yu K., Eisenberg A. Bilayer morphologies of self-assembled crew-cut aggregates of amphiphilic PS-b-PEO diblock copolymers in solution // *Macromol.* 1998. Vol.31. Iss. 11. P. 3509-3518.
31. Soo P.L., Eisenberg A. Preparation of block copolymer vesicles in solution // *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 2004. Vol.42, Iss. 6. P. 923-938.
32. Borsali R., Minatti E., Putaux J.L., Schappacher M., Deffieux A., Viville P., Lazzaroni R., Narayanan T., From “sunflower-like” assemblies toward giant wormlike micelles // *Langmuir*. 2003. Vol.19. Iss. 1. P. 6-9.

33. Breulmann M., Forster S., Antonietti M. Mesoscopic surface patterns formed by block copolymer micelles // *Macromol. Chem. Phys.* . 2000. Vol. 201. Iss. 2. P. 204-21.
34. Ding J., Liu G. Water-soluble hollow nanospheres as potential drug carriers // *J. of Phys. Chem. B.* 1998. Vol.102. Iss. 31. P.6107-6113.
35. Antonietti M., Foerster S. Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids // *Adv. Mater.* 2003. Vol.15. Iss. 16. P. 1323-1333.
36. Zhang L., Eisenberg A. Multiple morphologies of "crew-cut" aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block copolymers // *Science.* 1995. Vol. 268. Iss. 5218 P. 1728-1731.
37. Discher B.M., Won Y.Y., Ege D.S., Lee J.C.M., Bates F.S., Discher D.E., Hammer D.A. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers // *Science.* 1999. Vol. 284, Iss. 5417. P. 1143-1146.
38. Foerster S., Antonietti M., Amphiphilic block copolymers in structure-controlled nanomaterial hybrids // *Adv. Mater.* 1998. Vol. 10. Iss. 3. P. 195-217.
39. Choucair A., Eisenberg A., Control of amphiphilic block copolymer morphologies using solution conditions // *Eur. Phys. J.* 2003. Vol. 10. Iss. 1. P. 37-44.
40. Yu K., Eisenberg A., Multiple morphologies in aqueous solutions of aggregates of polystyrene-block-poly(ethylene oxide) diblock copolymers // *Macromol.* 1996. Vol. 29. Iss. 19. P. 6359-6361.
41. Yu K., Zhang L., A. Eisenberg A. Novel morphologies of "crew-cut" aggregates of amphiphilic diblock copolymers in dilute solution // *Langmuir.* 1996. Vol. 12. Iss. 25. P. 5980-5984.
42. Zhang L., Eisenberg A. Multiple morphologies and characteristics of "crew-cut" micelle-like aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) diblock copolymers in aqueous solutions // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. Vol. 118. Iss. 13. P. 3168-3181.
43. Yu Y., Zhang L., Eisenberg A. Morphogenic effect of solvent on crew-cut aggregates of apmphiphilic diblock copolymers // *Macromol.* 1998. Vol. 31. Iss. 4. P. 1144-1154.

44. Rosoff M. Vesicles. Surfactant Science Series. Vol. 62. New York: Marcel Dekker, 1996. 752 p.
45. Schillen K., Bryskhe K., Mel'nikova Y.S., Vesicles Formed from a Poly(ethylene oxide)–Poly(propylene oxide)–Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer in Dilute Aqueous Solution // *Macromol.* 1999. Vol. 32. Iss. 20. P. 6885-6888.
46. Kwon G. S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2003 Vol. 20. Iss. 3. P. 357-403.
47. Morcol T., Nagappan P., Nerenbaum L., Mitchell A., Bell S. J. Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin // *Int. J. Pharm.* 2004. Vol. 277. Iss. 1-2 P. 91-97.
48. Abuchowski A., Esvan T., Palczuk N.C., McCoy J. R., Davis F.F. Treatment of L5178Y tumor-bearing DBF1 mice with a nonimmunogenic L-glutaminase-L-asparaginase // *Cancer Treat. Rep.* 1979. Vol. 63. Iss. 6. P. 1127-1132.
49. Harris J.M., Martin N.E., Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics // *Clin. Pharmacokinet.* 2001. Vol. 40. Iss. 7. P. 539-551.
50. Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M. Chemistry for peptide and protein pegylation // *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2002. Vol.54. Iss. 4. P. 459-476.
51. Veronese F.M., Harris J.M. Introduction and overview of peptide and protein pegylation // *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2002. Vol. 54. Iss. 4. P. 453-456.
52. Garbuzenko O., Barenholz Y., Prievo A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer // *Chem. Phys. Lipids.* 2005. Vol.135, Iss. 2. P. 117-129.
53. Calvo P., Gouritin B., Brigger I., Lasmezas C., Deslys J., Williams A., Andreux J.P., Dormont D., Couvreur P. Pegylated polycyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prion diseases // *J. Neurosci. Meth.* 2001. Vol. 111. Iss. 2. P. 151-155.
54. Moghimi S.M. Chemical camouflage of nanospheres with a poorly reactive surface: towards development of stealth and target-specific nanocarriers // *BBA-Molecular Cell Research.* 2002. Vol. 1590. Iss. 1-3. P. 131-139.

55. Smith R. Tanford C. The critical micelle concentration of dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water-methanol solutions // *J. Mol Biol.* 1972. Vol. 67. Iss. 1. P. 75-83.
56. Garratty G. Progress in modulation the RBC membrane to produce transfusable universal/stealth donor RBCs. // *Transfusion Medicine Review.* 2004. Vol.18, Iss.4. P. 245-256.
57. Torchilin V.P., Trubetskoy V.S, Whiteman K.R., Caliceti P., Ferruti P., Veronese F. M. New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes in vivo // *J. Pharm. Sci.* 1995. Vol. 84 Iss. 9. P. 1049-1053.
58. Torchilin V.P., Levchenko T.S., Whiteman K.R., Yaroslavov A.A., Tsatsakis A.M., Rizos A.K., Michailova E.V., Shtilman M.I. Amphiphilic poly-n-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification // *Biomaterials.* 2001 Vol. 22. Iss. 22. P. 3035-3044.
59. Le Garrec D., Taillefer J., Van Lier J.E., Lenaerts V., Leroux J.C. Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model // *J. Drug Target.* 2002. Vol. 10. Iss. 5. P. 429-437.
60. Johnson S.D., Anderson J.M., Marchant R.E. Biocompatibility studies on plasma polymerized interface materials encompassing both hydrophobic and hydrophilic surfaces // *J. Biomed. Mater. Res.* 1992. Vol. 26. Iss. 7. P. 915-935.
61. V.P. Torchilin, M.I. Shtilman, V.S. Trubetskoy, K.R. Whiteman, Milstein A. M. Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo // *BBA- Biomembranes.* 1994. Vol. 1195. Iss. 1. P. 181-184.
62. Sharma D., Chelvi T.P., Kaur J., Chakravorty K., De T.K., Maitra A., Ralhan R. Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy // *Oncol. Res.* 1996. Vol. 8. Iss. 7-8. P. 281-286.
63. Moneghini M., Voinovich D., Princivalle F., Magarotto L. Formulation and evaluation of vinylpyrrolidone/vinylacetate copolymer microspheres with carbamazepine // *Pharm. Dev. Technol.* 2000. Vol. 5. Iss. 3. P. 347-353.

64. Benahmed A., Ranger M., Leroux J.C. Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) // *Pharm. Res.* 2001. Vol.18. Iss. 3. P. 323-328.

65. Luppi B., Orienti I., Bigucci F., Cerchiara T., Zuccari G., Fazzi S., Zecchi V. Poly(vinylalcohol-co-vinyloleate) for the preparation of micelles enhancing retinyl palmitate transcutaneous permeation // *Drug Deliv.* 2002. Vol. 9. Iss. 3. P. 147-152.

66. Luppi B., Bigucci F., Cerchiara T., Andrisano V., Pucci V., Mandrioli R., Zecchi V. Micelles based on polyvinyl alcohol substituted with oleic acid for targeting of lipophilic drugs // *Drug Deliv.* 2005. Vol. 12. Iss. 1. P. 21-26.

67. Nam Y.S., Kang H.S., Park J.Y., Park T.G., Han S.H., Chang I.S. New micelle-like polymer aggregates made from PEI-PLGA diblock copolymers: micellar characteristics and cellular uptake // *Biomaterials.* 2003. Vol. 24. Iss. 12. P. 2053-2059.

68. Kabanov A.V., Chekhonin V.P., Alakhov V.Yu., Batrakova E. V., Lebedev A. S., Melik-Nubarov N. S., Arzhakov S. A., Levashov A. V., Morozov G. V., Severin E. S. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. Micelles as micro-containers for drug targeting // *FEBS Lett.* 1989. Vol. 258. Iss. 2. P. 343-345.

69. Miller D.W., Batrakova E.V., Waltner T.O., Alakhov V.Yu., Kabanov A. V. Interactions of pluronic block copolymers with brain microvessel endothelial cells: evidence of two potential pathways for drug absorption // *Bioconjugate Chem.* 1997. Vol. 8. Iss. 5. P. 649-657.

70. Katayose S., Kataoka K. Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer // *J. Pharm. Sci.* 1998. Vol. 87. Iss. 2. P. 160-163.

71. Trubetskoy V.S., Gazelle G.S., Wolf G.L., Torchilin V.P. Block-copolymer of polyethylene glycol and polylysine as a carrier of organic iodine: design of long-circulating particulate contrast medium for x-ray computed tomography // *J. Drug Target.* 1997. Vol. 4. Iss. 6. P. 381-388.

72. Yokoyama M., Miyauchi M., Yamada N., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K., Inoue S. Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric

anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer // *Cancer Res.* 1990. Vol. 50. Iss. 6. P. 1693-1700.

73. Harada A., Kataoka K. Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core. Preparation of narrowly-distributed micelles from lysozyme and poly(ethyleneglycol)-poly(aspartic acid) block copolymer in aqueous medium // *Macromol.* 1998. Vol. 31. Iss. 2. P. 288-294.

74. Kwon G. S., Naito M., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles // *Pharm. Res.* 1995. Vol. 12. Iss. 2. P. 192-195.

75. Kwon G.S., Naito M., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. Block copolymer micelles for drug delivery: loading and release of doxorubicin // *J. Control. Release.* 1997. Vol. 48. Iss. 2. P. 195-201.

76. Jeong Y.I., Cheon J.B., Kim S.H., Nah J.W., Lee Y.M., Sung Y.K. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro // *J. Control. Release.* 1998. Vol. 51. Iss. 2. P. 169-178.

77. Kim S.Y., Shin I.G., Lee Y.M., Cho C.G., Sung Y.K. Methoxy poly(ethylene glycol) and ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviors // *J. Control. Release.* 1998. Vol. 51. Iss. 1. P. 13-22.

78. Allen C., Yu Y., Maysinger D., Eisenberg A. Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) block copolymer micelles as a novel drug delivery vehicle for neurotrophic agents FK506 and L-685,818 // *Bioconjugate Chem.* 1998. Vol. 9. Iss. 5. P. 564-572.

79. Hagan S.A., Coombes A.G. A., Garnett M. C. Polylactide-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery systems. 1. Characterization of water dispersible micelle-forming systems // *Langmuir.* 1996. Vol. 12. Iss. 9. P. 2153-2161.

80. Ramaswamy M., Zhang X., Burt H., Wasan K.M. Human plasma distribution of free paclitaxel and paclitaxel associated with diblock copolymers // *J. Pharm. Sci.* 1997. Vol. 86. Iss. 4. P. 460-464.

81. Kabanov A.V., Kabanov V.A. Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects. // *Adv. Drug Deliver. Rev.* 1990. Vol. 30. Iss. 1. P. 49-60.
82. Darling T.R., Davis T.P., Fryd M., Gridnev A.A., Haddleton D.M., Ittel S.D., Matheson Jr R.R., Moad G., Rizzardo E. Living polymerization: Rationale for uniform terminology // *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2000. Vol. 38. Iss. 10. P. 1706-1708.
83. Szwarc M. Living polymers. Their discovery, characterization, and properties// *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 1998. Vol. 36. Iss. 1. P. 9-15.
84. Hadjichristidis N., Iatrou H., Pispas S., Pitsikalis M. Anionic polymerization: High vacuum techniques // *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2000. Vol. 38. Iss. 18. P. 3211-3234.
85. Kaditi E., Mountrichas G., Pispas S. Amphiphilic block copolymers by a combination of anionic polymerization and selective post-polymerization functionalization // *Eur. Polym. J.* 2011. Vol. 47. Iss. 4. P. 415-434.
86. Aoshima S., Kanaoka S. A renaissance in living cationic polymerization // *Chem. rev.* 2009. Vol. 109. Iss. 11. P. 5245-5287.
87. Takahashi R., Ouchi M., Satoh K., Kamigaito M., Sawamoto M. Amphiphilic 3-arm star block polymers by living cationic polymerization // *Polymer journal.* 1999. Vol.31. P. 995-1000.
88. Georges M.K., Veregin R.P.N., Kazmaier P.M., Hamer G.K. Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process // *Macromol.* 1993. Vol. 26. Iss. 11. P. 2987-2988.
89. Lagrille O., Cameron N.R., Lovell P.A., Blanchard R., Goeta A.E., Koch R. Novel acyclic nitroxides for nitroxide-mediated polymerization: Kinetic, electron paramagnetic resonance spectroscopy, X-ray diffraction, and molecular modeling investigations // *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2006. Vol. 44. Iss. 6. P. 1926-1940.

90. Hawker C.J., Bosman A.W., Harth E. New polymer synthesis by nitroxide mediated living radical polymerizations // Chem. rev. 2001. Vol. 101. Iss. 12. P. 3661-3688.
91. Lee C., Yang C., Wang L., Chiu W. Novel amphiphilic carbon black composite nanoparticles from TEMPO-terminated polymer and TEMPO-terminated block copolymer grafted carbon black. // Polymer. 2005. Vol.46. Iss. 15. P. 5514-5523.
92. Wang D., Kopeckova J.P, Minko T., Nanayakkara V., Kopecek J. Synthesis of starlike N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers: potential drug carriers // Biomacromol. 2000. V. 1. Iss. 3. P. 313-319.
93. Kamei S., Kopecek J. Prolonged blood circulation in rats of nanospheres surface-modified with semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] // Pharm. Res.1995. Vol. 12. Iss. 5. P. 663-668.
94. Chiefari J., Rizzardo E. Control of free-radical polymerization by chain transfer methods // In: Handbook of radical polymerization. Hoboken: John Wiley & Sons, 2002. P. 629-691.
95. Corner T. Free radical polymerisation. The synthesis of graft copolymers // Adv. Polym. Sci. 2005. Vol. 62. P. 95-142.
96. Гришин Д.Ф., Гришин И.Д. Современные методы контролируемой радикальной полимеризации для получения новых материалов с заданными свойствами: эл. учеб. пособие. Н.Н.: Нижегородский госуниверситет, 2010. 48 с.
97. Ghosh P.K. Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug carriers // Indian J. Biochem. Biophys. 2000. Vol. 37. Iss. 5. P. 273-282.
98. Elgadir M.A., Uddin M.S., Ferdosh S., Adam A., Chowdhury A.J.K., Sarker M.Z.I. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review // J. Food Drug Anal. 2015. Vol. 23. Iss. 4. P. 619-629.
99. Fernandez-Urrusuno R., Calvo P., Remunan-Lopez C., Villa-Jato J.L., Alonso M.J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanopartilces // Pharm. Res. 1999. Vol. 16. Iss. 10. P. 1576-1581.

100. Li P., Dai Y.N., Zhang J.P., Wang A.Q., Wei Q. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine // *Int. J. Biomed. Sci.* 2008. Vol. 4. Iss. 3. P. 221-228.
101. Luppi B., Bigucci F., Corace G., Delucca A., Cerchiara T., Sorrenti M. Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine // *European J. Pharm. Sci.* 2011. Vol. 44. Iss. 4. P. 559-565.
102. Kateb B., Chiu K., Black K.L., Yamamoto V., Khalsa B., Ljubimova J.Y. Nanoplatforms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: What should be the policy? // *NeuroImage.* 2001. Vol. 54. Iss. 1. P. 106-124.
103. Sohn M., Al-Ghananeem A., DeLuca P.P. Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects // *Int. J. Mol. Sci.* 2010. Vol. 11. Iss. 9. P. 3298-3322.
104. Sundar S., Kundu J., Kundu S.C. Biopolymeric nanoparticles // *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2010. Vol. 11. Iss. 1. P. 1-13.
105. Birrenbach G., Speiser P.P. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology // *J. Pharm. Sci.* 1976. Vol. 65. Iss. 12. P. 1763-1766.
106. Kreuter J., Speiser P.P. New adjuvants on a polymethylmethacrylate base // *Infect Immun.* 1976. Vol. 13. Iss. 1. P. 204-210.
107. Couvreur P., Kante B., Roland M, Guiot P., Bauduin P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties // *J. Pharm. Pharmacol.* 1979. Vol. 31. Iss. 1. P. 331-332.
108. Gurny R., Peppas N.A., Harrington D.D., Banker G.S. Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1981. Vol. 7. Iss. 1. P. 1-25.
109. Vauthier-Holtzscheler C., Benabbou S., Spenlehauer G., Veillard M., Couvreur P. Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems // *STP Pharma Sci.* 1991. Vol. 1. Iss. 2. P. 109-116.
110. Allemann E., Leroux J.C., Gurny R., Doelker E. In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. // *Pharm. Res.* 1993. Vol.10. Iss. 12. P1732-1737.

111. Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery // *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2005. Vol. 57. Iss. 11. P. 1595-1639.
112. Kumaresh S.S., Tejraj M.A., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices // *J. Control. Release.* 2001. Vol. 70. Iss. 1. P. 1-20.
113. Mohanraj V.J., Chen Y. Nanoparticles. A Review // *Trop. J. Pharm. Res.* 2006. Vol. 5. Iss. 1. P. 561-573.
114. Rao J.P., Geckeler K.E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters // *Prog. Polym. Sci.* 2011. Vol. 36. Iss. 7. P. 887-913.
115. Reis C.P., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles // *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 2006. Vol. 2. Iss. 1. P. 8-21.
116. Lemoine D., Preat V. Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins // *J. Control. Release.* 1998. Vol. 54. Iss. 1. P. 15-27.
117. Song C.X., Labhasetwar V., Murphy H., Qu X., Humphrey W.R., Shebuski R.J., Levy R.J. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery // *J. Control. Release.* 1997. Vol. 43. Iss. 2. P. 197-212.
118. Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J. Ph., Ammoury N., Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement // *Int. J. Pharm.* 1989. Vol. 55. Iss. 1. P. R1-R4.
119. Barichello J.M., Morishita M., Takayama K., Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999. Vol.25. Iss. 4. P. 471-476.
120. Galindo-Rodriguez S., Allemann E., Fessi H., Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods // *Pharm. Res.* 2004. Vol. 21. Iss. 8. P. 1428-1439.
121. Ganachaud F., Katz J.L. Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices // *Chemphyschem.* 2005. Vol. 6. Iss. 2. P. 209-216.

122. Quintanar-Guerrero D., Allemann E., Fessi H., Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998. Vol. 24. Iss. 12. P. 1113-1128.
123. Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Couvreur P. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003. Vol. 55. Iss. 4. P. 519-548.
124. Dimitrova B., Ivanov I. B., Nakache E. Mass transport effects on the stability of emulsion: emulsion films with acetic acid and acetone diffusing across the interface // *J. Disper. Sci. Technol.* 1988. Vol. 9. Iss. 4. P. 321-341.
125. Wehrle P., Magenheimer B., Benita S. The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995. Vol. 41. Iss. 1. P. 19-26.
126. Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Couvreur P. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles // *Molecules.* 2005. Vol. 10. Iss. 1. P. 126-145.
127. Arbos P., Wirth M., Arangoa M.A., Gabor F., Irache J.M. Gantrez AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates // *J. Control. Release.* 2002. Vol. 83. Iss. 3. P. 321-330.
128. Allémann E., Leroux J.C., Gurny R. Polymeric nano-and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998. Vol. 34. Iss. 2. P. 171-189.
129. Memisoglu E., Bochot A., Ozalp M., Sen M., Duchene D., Hincal A.A. Direct formation of nanospheres from amphiphilic β -cyclodextrin inclusion complexes // *Pharm. Res.* 2003. Vol. 20. Iss. 1. P. 117-125.
130. Niwa T.H.T.N.Y., Takeuchi H., Hino T., Kunou N., Kawashima Y. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D, L-lactide / glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior // *J. Control. Release.* 1993. Vol. 25. Iss. 1. P. 89-98.

131. Vargas A., Pegaz B., Debeve E., Konan-Kouakou Y., Lange N., Ballini J.P., Delie F. Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos // *Int. J. Pharm.* 2004. Vol. 286. Iss. 1. P. 131-145.
132. Konan Y.N., Gurny R., Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2002. Vol. 66. Iss. 2. P. 89-106.
133. Yoo H.S., Oh J.E., Lee K.H., Park T.G. Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release // *Pharm. Res.* 1999. Vol. 16. Iss. 7. P. 1114-1118.
134. Perez C., Sanchez A., Putnam D., Ting D., Langer R., Alonso M.J. Poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA // *J. Control. Release.* 2001. Vol. 75. Iss. 1. P. 211-224.
135. Lu W., Zhang Y., Tan Y.Z., Hu K.L., Jiang X.G., Fu S.K. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery // *J. Control. Release.* 2005. Vol. 107. Iss. 3. P. 428-448.
136. Saxena V., Sadoqi M., Shao J. Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release // *Int. J. Pharm.* 2004. Vol. 278. Iss. 2. P. 293-301.
137. El-Shabouri M.H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A // *Int. J. Pharm.* 2002. Vol. 249. Iss. 1. P. 101-108.
138. Jung T., Kamm W., Breitenbach A., Kaiserling E., Xiao J.X., Kissel T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? // *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* 2000. Vol. 50. Iss. 1. P. 147-160.
139. Lambert G., Fattal E., Couvreur P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 47. Iss. 1. P. 99-112.
140. Couvreur P., Dubernet C., Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends // *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* 1995. Vol. 41. Iss. 1. P. 2-13.

141. Jeong Y.I., Cho C.S., Kim S.H., Ko K.S., Kim S.I., Shim Y.H., Nah J.W. Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant // *J. Appl. Polym. Sci.* 2001. Vol. 80. Iss. 12. P. 2228-2236.
142. Kostag M., Kohler S., Liebert T., Heinze T. Pure cellulose nanoparticles from trimethylsilyl cellulose // *Macromol. Symp.* 2010. Vol. 294. Iss. 2. P. 96-106.
143. Jeon H.J., Jeong Y.I., Jang M.K., Park Y.H., Nah, J.W. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics // *Int. J. Pharm.* 2000. Vol. 207. Iss. 1. P. 99-108.
144. Jung S.W., Jeong Y.L., Kim Y.H., Kim S.H. Self-assembled polymeric nanoparticles of poly (ethylene glycol) grafted pullulan acetate as a novel drug carrier // *Arch. Pharm. Res.* 2004. Vol. 27. Iss. 5. P. 562-569.
145. Liu M., Zhou Z., Wang X., Xu J., Yang K., Cui Q., Zhang Q. Formation of poly (L, D-lactide) spheres with controlled size by direct dialysis // *Polymer.* 2007. Vol. 48. Iss. 19. P. 5767-5779.
146. Hornig S., Heinze T. Nanoscale structures of dextran esters // *Carbohydr. Polym.* 2007. Vol. 68. Iss. 2. P. 280-286.
147. Heinze T., Michealis N. Reactive polymeric nanoparticles based on unconventional dextran derivatives // *Eur. Polym. J.* 2007. Vol. 43. Iss. 3. P. 697-703.
148. Park K.H., Song H.C., Na K., Bom H.S., Lee K.H., Kim S., Lee D.H. Ionic strength-sensitive pullulan acetate nanoparticles (PAN) for intratumoral administration of radioisotope: Ionic strength-dependent aggregation behavior and ^{99m}Tc retention property // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2007. Vol. 59. Iss. 1. P. 16-23.
149. Choi S.W., Kim J.H. Design of surface-modified poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone // *J. Control. Release.* 2007. Vol. 122. Iss. 1. P. 24-30.
150. He X., Ma J., Mercado A.E., Xu W., Jabbari E. Cytotoxicity of paclitaxel in biodegradable self-assembled core-shell poly (lactide-co-glycolide ethylene oxide fumarate) nanoparticles // *Pharm. Res.* 2008. Vol. 25. Iss. 7. P. 1552-1562.

151. Zhang Z., Lee S.H., Gan C.W., Feng S.S. In vitro and in vivo investigation on PLA.TPGS nanoparticles for controlled and sustained small molecule chemotherapy // *Pharm. Res.* 2008. Vol. 25. Iss. 8. P. 1925-1935.

152. Sheikh F.A., Barakat N.A., Kanjwal M.A., Aryal S., Khil M.S., Kim H.Y. Novel self-assembled amphiphilic poly (ϵ -caprolactone)-grafted-poly (vinyl alcohol) nanoparticles: hydrophobic and hydrophilic drugs carrier nanoparticles // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009. Vol. 20. Iss. 3. P. 821-831.

153. Errico C., Bartoli C., Chiellini F., Chiellini E. Poly (hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. Vol. 2009. Article ID 571702. 10 p.

154. York P. Strategies for particle design using supercritical fluid technologies // *Pharm. Sci. Tech. Today.* 1999. Vol. 2. Iss. 11. P. 430-440.

155. Kawashima Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 47. Iss. 1. P. 1-2.

156. Weber M., Thies M.C. Understanding the RESS process // In: *Supercritical fluid technology in materials science and engineering: syntheses, properties, and applications.* New York: Marcel Dekker, 2002. P. 387-427.

157. Chernyak Y., Henon F., Harris R.B., Gould R.D., Franklin R.K., Edwards J.R., Carbonell R. G. Formation of perfluoropolyether coatings by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS) process. Part 1: Experimental results // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2001. Vol. 40. Iss. 26. P. 6118-6126.

158. Blasig A., Shi C., Enick R.M., Thies M.C. Effect of concentration and degree of saturation on RESS of a CO₂-soluble fluoropolymer // *Ind. Eng. Chem Res.* 2002. Vol. 41. Iss. 20. P. 4976-4983.

159. Lim K.T., Subban G.H., Hwang H.S., Kim J.T., Ju C.S., Johnston K.P. Novel semiconducting polymer particles by supercritical fluid process // *Macromol. Rapid Comm.* 2005. Vol. 26. Iss. 22. P. 1779-1783.

160. Sane A., Thies M.C. Effect of material properties and processing conditions on RESS of poly (l-lactide) // *J. Supercrit. Fluids.* 2007. Vol. 40. Iss. 1. P. 134-143.

161. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. Novel hydrophilic chitosan polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers // *J. Appl. Polym. Sci.* 1997. Vol. 63. Iss. 1. P. 125-132.
162. Calvo P., Remuñan-López C., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. Chitosan and chitosan / ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines // *Pharm. Res.* 1997. Vol. 14. Iss. 10. P. 1431-1436.
163. Dustgania A., Vasheghani Farahani E., Imani M. Preparation of chitosan nanoparticles loaded by dexamethasone sodium phosphate // *Iran. J. Pharm. Sci.* 2008. Vol. 4. Iss. 2. P. 111-114.
164. Ekman B., Sjöholm I. Improved stability of proteins immobilized in microparticles prepared by a modified emulsion polymerization technique // *J. Pharm. Sci.* 1978. Vol. 67. Iss. 5. P. 693-696.
165. Lowe P.J., Temple C.S. Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats // *J. Pharm. Pharmacol.* 1994. Vol. 46. Iss. 7. P. 547-552.
166. Kreuter J. On the mechanism of termination in heterogeneous polymerization // *J. Polym. Sci.: Polym. Lett. Ed.* 1982. Vol. 20. Iss. 10. P. 543-545.
167. Matyjaszewski K., Xia J. Atom transfer radical polymerization // *Chem. rev.* 2001. Vol. 101. Iss. 9. P. 2921-2990.
168. Zetterlund P.B., Nakamura T., Okubo M. Mechanistic investigation of particle size effects in TEMPO-mediated radical polymerization of styrene in aqueous miniemulsion // *Macromol.* 2007. Vol. 40. Iss. 24. P. 8663-8672.
169. Zetterlund P.B., Kagawa Y., Okubo M. Controlled / living radical polymerization in dispersed systems // *Chem. rev.* 2008. Vol. 108. Iss. 9. P. 3747-3794.
170. Nicolas J., Charleux B., Guerret O., Magnet S. Nitroxide-mediated controlled free-radical emulsion polymerization using a difunctional water-soluble alkoxyamine initiator. Toward the control of particle size, particle size distribution, and the synthesis of triblock copolymers // *Macromol.* 2005. Vol. 38. Iss. 24. P. 9963-9973.

171. Landfester K., Musyanovych A., Mailander V. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process // *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 2010. Vol. 48. Iss. 3. P. 493-515.

172. Lambert G., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Gulik A., Couvreur P. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core for the delivery of oligonucleotides // *Int. J. Pharm.* 2001. Vol. 214. Iss. 1. P. 13-16.

173. Charcosset C., Fessi H. A membrane contactor for the preparation of nanoparticles // *Desalination.* 2006. Vol. 200. Iss. 1. P. 568-569.

174. Gaudin F., Sintès-Zydowicz N. Core-shell biocompatible polyurethane nanocapsules obtained by interfacial step polymerisation in miniemulsion // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2008. Vol. 331. Iss. 1. P. 133-142.

175. Wu M., Dellacherie E., Durand A., Marie E. Poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization. 2. PEG-based surfactants // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2009. Vol. 69. Iss. 1. P. 147-151.

176. Karode S.K., Kulkarni S.S., Suresh A.K., Mashelkar R.A. New insights into kinetics and thermodynamics of interfacial polymerization // *Chem. Eng. Sci.* 1998. Vol. 53. Iss. 15. P. 2649-2663.

177. Crespy D., Stark M., Hoffmann-Richter C., Ziener U., Landfester K. Polymeric nanoreactors for hydrophilic reagents synthesized by interfacial polycondensation on miniemulsion droplets // *Macromol.* 2007. Vol. 40. Iss. 9. P. 3122-3135.

178. Danicher L., Frere Y., Le Calve A. Synthesis by interfacial polycondensation of polyamide capsules with various sizes. Characteristics and properties // *Macromol. Symp.* 2000. Vol. 151. P. 387-392.

179. Torini L., Argillier J.F., Zydowicz N. Interfacial polycondensation encapsulation in miniemulsion // *Macromol.* 2005. Vol. 38. Iss. 8. P. 3225-3236.

180. Scott C., Wu D., Ho C.C., Co C.C. Liquid-core capsules via interfacial polymerization: a free-radical analogy of the nylon rope trick // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127. Iss. 12. P. 4160-4161.

181. Sarkar D., El-Khoury J., Lopina S.T., Hu J. An effective method for preparing polymer nanocapsules with hydrophobic acrylic shell and hydrophilic interior by inverse emulsion radical polymerization // *Macromol.* 2005. Vol. 38. Iss. 20. P. 8603-8605.

182. Fallouh N.A.K., Roblot-Treupel L., Fessi H., Devissaguet J.P., Puisieux F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules // *Int. J. Pharm.* 1986. Vol. 28. Iss. 2. P. 125-132.

183. Gallardo M., Couarraze G., Denizot B., Treupel L., Couvreur P., Puisieux F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate // *Int. J. Pharm.* 1993. Vol. 100. Iss. 1. P. 55-64.

184. Aboubakar M., Puisieux F., Couvreur P., Deyme M., Vauthier, C. Study of the mechanism of insulin encapsulation in poly (isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization // *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. Vol. 47. Iss. 4. P. 568-576.

185. Puglisi G., Fresta M., Giammona G., Ventura C.A. Influence of the preparation conditions on poly (ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation // *Int. J. Pharm.* 1995. Vol. 125. Iss. 2. P. 283-287.

186. Gasco M.R., Trotta M. Nanoparticles from microemulsions // *Int. J. Pharm.* 1986. Vol. 29. Iss. 2. P. 267-268.

187. Watnasirichaikul S., Davies N.M., Rades T., Tucker I.G. Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions // *Pharm. Res.* 2000. Vol. 17. Iss. 6. P. 684-689.

188. Штильман М. И. Полимеры медико-биологического назначения. М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. 400 с.

189. Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. М.: Химия. 1986, 296 с.

190. Shtilman M.I. Polymeric biomaterials. Part I. Utresht-Tokyo: VSP, 2000. 247 p.

191. Штильман М.И. Биодegradация имплантатов из полимерных материалов // В книге: Биосовместимые материалы / Под ред. В.И. Севастьянова,

М.П. Кирпичникова. М.: Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011. С. 159-196.

192. Shtilman M.I. Biodegradation // In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials. Boca Raton: CRC Press, 2015. P. 804-816.

193. Liechty W.B., Kryscio D.R., Slaughter B.V., Peppas N.A. Polymers for drug delivery systems // Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 2010. Vol. 1. P. 149-173.

194. Chiellini E., Corti A., D'Antone S., Solaro R. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials // Prog. Polym. Sci. 2003. Vol. 28. Iss. 6. P. 963-1014.

195. Tseng Y., Tabata Y., Hyon S., Ikada Y. In vitro toxicity test of 2-cyanoacrylate polymers by cell culture method // J. Biomed. Mater. Res. 1990. Vol. 24. Iss. 10. P. 1355-1367.

196. Vauther C., Couvreur P., Dubernet C. Poly(alkylcyanoacrylates). From preparation to real application as drug delivery systems // In: Colloidal biomolecules, biomaterials, and biomedical application. Boca Raton: CRC Press. 2003. P. 349-368.

197. Wide C.W.R., Leonard F. Degradation of poly(methyl-2-cyanoacrylates) // J. Biomed. Mater. Res. 1980. Vol.14. Iss. 1. P. 93-106.

198. Jiang G., Qiu W., DeLuca P.P. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of insulin-loaded poly (acryloyl-hydroxyethyl starch)-PLGA composite microspheres // Pharm. Res. 2003. Vol. 20. Iss. 3. P. 452-459.

199. Торчилин В. П. Иммуобилизованные ферменты в медицине. М.: Знание, 1986. 31 с.

200. Shtilman M.I. Immobilization on polymers. Utresht-Tokyo: VSP, 1993. 479 p.

201. Bunnell J.E., Tatu C.A., Lerch H.E., Orem W.H., Pavlovic N. Evaluating nephrotoxicity of high-molecular-weight organic compounds in drinking water from lignite aquifers // J. Toxicol. Environ. Health A. 2007. Vol. 70. Iss. 24. P. 2089-2091.

202. Hasegawa I., Hirashima N. Styrene maleic acid neocarzinostatin-transcatheter embolization for hepatocellular carcinoma – third report // Gan to kagaku ryoho Cancer Chemother. 2002. Vol. 29. Iss. 2. P. 253-259.

203. Koksel H., Ozturk S., Kahraman K., Basman A., Ozbas O.O., Ryu G.H. Evaluation of molecular weight distribution, pasting and functional properties, and enzyme resistant starch content of acid-modified corn starches // *Food Sci. Biotechnol.* 2008. Vol. 17. Iss. 4. P. 755-760.
204. Коршак В.В., Штильман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: Наука, 1998. 281 с.
205. Gupta A. K., Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies // *NanoBioscience, IEEE Transactions on.* 2004. Vol. 3. Iss. 1. P. 66-73.
206. Neradovic D., Soga O., Van Nostrum C.F., Hennink W.E. The effect of the processing and formulation parameters on the size of nanoparticles based on block copolymers of poly (ethylene glycol) and poly (N-isopropylacrylamide) with and without hydrolytically sensitive groups // *Biomaterials.* 2004. Vol. 25. Iss. 12. P. 2409-2418.
207. Bharali D.J., Sahoo S.K., Mozumdar S., Maitra A. Cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles: a potential carrier for hydrophilic drugs // *J. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 258. Iss. 2. P. 415-423.
208. Magee W.E., Talcott M.L., Straub S.X., Vriend C.Y. A comparison of negatively and positively charged liposomes containing entrapped polynucleic polycytidylic acid for interferon induction in mice // *BBA - Gen. Subjects.* 1976. Vol. 451. Iss. 2. P. 610-618.
209. Gaur U., Sahoo S.K., De Tapas K., Ghosh P.C., Maitra A., Ghosh P.K. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system // *Int. J. Pharm.* 2000. Vol. 202. Iss. 1. P. 1-10.
210. Yokoyama M., Fukushima S., Uehara R., Okamoto K., Kataoka K., Sakurai Y., Okano, T. Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor // *J. Control. Release.* 1998. Vol. 50. Iss. 1. P. 79-92.
211. Speiser P.P. Nanoparticles and liposomes: a state of the art // *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1991. Vol. 13. Iss. 5. P. 337-342.

212. Kreuter J. The influence of coatings with surfactants on the body distribution of nanoparticles after intravenous injection to rats // *Clin. Mater.* 1993. Vol. 13. Iss. 1. P. 131-134.

213. Luo Y., Prestwich G.D. Cancer-targeted polymeric drugs // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2002. Vol. 2. Iss. 3. P. 209-226.

214. Jiao Y., Ubrich N., Marchand-Arvier M., Vigneron C., Hoffman M., Lecompte T., Maincent P. In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits // *Circulation.* 2002. Vol. 105. Iss. 2. P. 230-235.

215. Webber M.M., Sansi P. Thrombosis detection using radionuclide techniques // *CRC Crit. Rev. Clin. Radiol. Nucl. Med.* 1976. Vol. 7. Iss. 3. P. 263-290.

216. Biswas S., Torchilin V.P. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014. Vol.66. P. 26-41.

217. Jhaveri A., Deshpande P., Torchilin V.P. Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy // *J. Control. Release.* 2014. Vol.190. P352-370.

218. Koren E., Apte A., Jani A., Torchilin V.P. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity // *J. Control. Release.* 2014. Vol.160. Iss. 2. P. 264-273.

219. Beck P., Kreuter J., Reszka R., Fichtner I. Influence of polybutylcyanoacrylate nanoparticles and liposomes on the efficacy and toxicity of the anticancer drug mitoxantrone in murine tumour models // *J. Microencapsul.* 1993. Vol. 10. Iss. 1. P. 101-114.

220. Gabizon A.A. Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy // *Cancer invest.* 2001. Vol. 19. Iss. 4. P. 424-436.

221. Gelperina S.E., Khalansky A.S., Skidan I.N., Smirnova Z.S., Bobruskin A.I., Severin S.E., Kreuter J. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma // *Toxicol. lett.* 2002. Vol. 126. Iss. 2. P. 131-141.

222. Kwon G.S., Naito M., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles // *Pharm. Res.* 1995. Vol. 12. Iss. 2. P. 192-195.
223. Arshady R. Microspheres, Microcapsules and liposomes: general concepts and criteria // *MML SERIES.* 1999. Vol. 1. P. 11-45.
224. Fuchs S., Coester C. Protein-based nanoparticles as a drug delivery system: chances, risks, perspectives // *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 2010. Vol. 20. Iss. 5. P. 331-342.
225. Asselin B.L. The three asparaginases // In: *Drug resistance in leukemia and lymphoma III.* New York: Springer US, 1999. P. 621-629.
226. Позднякова Р.В. Влияние декстрана и поливинилпирролидона на функциональную активность фагоцитирующих клеточных систем: дис. канд. биол. наук. Новосибирск. 2001, 136 с.
227. Van Etten E.W., Van Vianen W., Roovers P., Frederik P. Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: effects on ultrastructure, in vitro activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. Vol. 44. Iss. 6. P. 1598-1603.
228. Barichello J.M., Morishita M., Takayama K., Nagai T. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats // *Int. J. Pharm.* 1999. Vol. 184. Iss. 2. P. 189-198.
229. Takeuchi H., Matsui Y., Yamamoto H., Kawashima Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats // *J. Control. Release.* 2003. Vol. 86. Iss. 2. P. 235-242.
230. Sheikh N.A., Al-Shamisi M., Morrow W.J. Delivery systems for molecular vaccination // *Curr. Opin. Molec. Therap.* 2000. Vol. 2. Iss. 1. P. 37-54.
231. Müller R.H., Jacobs C., Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 47. Iss. 1. P. 3-19.

232. Trubetskoy V.S., Frank-Kamenetsky M.D., Whiteman K.R., Wolf G.L., Torchilin V.P. Stable polymeric micelles: lymphangiographic contrast media for gamma scintigraphy and magnetic resonance imaging // *Acad. Radiol.* 1996. Vol. 3. Iss. 3. P. 232-238.
233. Doelker E. *Interfacial phenomena in drug delivery and targeting.* Harwood: Academic Publishers, 1995. 289 p.
234. Tan J.S., Butterfield D.E., Voycheck C.L., Caldwell K.D., Li J.T. Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize interactions with blood components and prolong blood circulation in rats // *Biomaterials.* 1993. Vol. 14. Iss. 11. P. 823-833.
235. Ghanem G.E., Joubran C., Arnould R., Lejeune F., Fruhling J. Labelled polycyanoacrylate nanoparticles for human in vivo use // *Appl. Radiat. Isot.* 1993. Vol. 44. Iss. 9. P. 1219-1224.
236. Torchilin V.P. Polymeric contrast agents for medical imaging // *Curr. Pharm. Biotech.* 2000. Vol. 1. Iss. 2. P. 183-215.
237. Estelrich J., Sanchez-Martín M.J., Busquets M.A. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents // *Int. J. Nanomed.* 2015. Vol. 10. P. 1727-1741.
238. Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012. Vol. 64. P. 24-36.
239. Nikam V.K., Kotade K.B., Gaware V.M., Dolas R.T., Dhamak K.B., Somwanshi S.B., Khadse A.N., Kashid V.A. Eudragit a versatile polymer : a review // *Pharmacologyonline.* 2011. Vol. 1. P. 152-164.
240. Hahn B., Wendorff J.H., Portugall M., Ringsdorf H. Structure and phase transitions of a liquid crystalline polymer // *Colloid Pol. Sci.* 1981. Vol. 259. Iss. 9. P. 875-884.
241. Fisher T.C. PEG-coated red blood cells: Simplifying blood transfusion in the new millennium // *Immunohematology.* 2000. Vol.16. P. 37-48.

242. Garay R.P., El-Gewely R., Armstrong J.K., Garratty G., Richette P. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2012. Vol. 9. Iss. 11. P. 1319-1323.
243. Лешин В.В., Радбиль Т.И., Сорокина Г.Н., Абрамова А.И., Зильберман Е.Н., Штаркман Б.П. Полимеризация метилметакрилата до глубоких степеней превращения в присутствии н-додецилмеркаптана // *Физико-химические основы синтеза и переработки полимеров.* Горький: ГГУ, 1986. С. 18-22.
244. Kuskov A.N., Shtil'man M.I., Tsatsakis A.M., Torchilin V.P., Yamskov, I.A. Synthesis of amphiphilic N-vinylpyrrolidone and acrylamide polymers of various structures // *Russ. J. Appl. Chem.* 2005. Vol. 78. Iss. 5. P. 806-810.
245. Сидельковская Ф.П. Химия N-винилпирролидона и его полимеров. М.: Наука, 1970. 150 с.
246. Ito K. Effect of radical scavenger on initiation efficiency // *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 1972. Vol. 10. Iss. 1. P. 57-62.
247. Липатов Ю.Р. Справочник по физической химии полимеров. Киев: Наукова Думка, 1984. 374 с.
248. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. М.: Мир, 1970. Т.1. С. 422-424.
249. Маки Р., Смит Д. Путеводитель по органическому синтезу. М.: Мир, 1985. 352 с.
250. Оудиан Д. Основы химии полимеров. М.: Мир, 1974. 614 с.
251. Ушаков Р.Н., Трухманова Л.Б., Маркелова В.М., Кропачев В.А. О сополимеризации кротонового альдегида с винилпирролидоном // *Высокомолекулярные соединения.* 1967. Т. 9(А). № 5. С. 999-1004.
252. Gannon J.A., Fettes E.M., Tobolsky A.V. Chain Transfer of Styrene with Various Dihalides and the Preparation of Polystyrene Dihalides // *J. Am. Chem. Soc.* 1952. Vol. 74. Iss. 7. P. 1854-1855.
253. Bevington J.C., Troth H.G. Tracer studies of transfer reactions. Part 3. – Diphenylamine with various monomers // *Trans. Faraday Soc.* 1963. Vol. 59. P. 1348-1352.

254. Гладышев Г.П. Полимеризация винильных мономеров. Алма-Ата: Академия наук Казахской ССР, 1964. 322 с.
255. Wilson, G. An acyl radical cascade model for the total synthesis of lycouadin. Birmingham: Birmingham Young University, 2005. 111 p.
256. Фрейдлина Р.Х. Радикальная теломеризация. М.: Химия, 1988. 288 с.
257. Морган П. Поликонденсационные процессы синтеза полимеров. Л.: Химия, 1970. 448 с.
258. Штильман М.И., Хвостова В.Ю., Ташмухамедов Р.И., Головкова Т.А., Tsatsakis A.M. Эпоксидсодержащий поли-N-винилпирролидон // Пластмассы. 2001. № 7. С. 5-9.
259. Шаймурзин А.Х., Штильман М.И., Кусков А.Н. Получение и исследование иммобилизованной формы 6-бензиламинопурина на полимерном носителе // Пластические массы. 2013. Т. 10. С. 31-35.
260. Малиновский М.Р. Окиси олефинов и их производные. М.: Химия, 1961. 553 с.
261. Альберт А. Сергент Е. Константы ионизации кислот и оснований. М.-Л.: Химия, 1964. 180 с.
262. Петров А.А., Бальян Х.В., Трощенко А.Т. Органическая химия. М.: Высшая школа, 1973. 624 с.
263. Ташмухамедов Р.И., Клягина М.В., Хвостова В.Ю., Штильман М.И. Взаимодействие глицина с 4-метил-1-окса-4-азаспиро[2,4]гептанкарбоксамидом // Вестник РУДН Серия Экология и природоведение. 2005. № 1. С. 176-177.
264. Ташмухамедов Р.И., Штильман М.И., Хвостова В.Ю., Клягина А.М., Tsatsakis A.M., Шашкова И.М. Поли-N-винилпирролидон с боковыми аминокислотными группами // Высокомолекулярные соединения Серия А. 2005. Т.47, № 6. С. 1-4.
265. Ташмухамедов Р.И., Штильман М.И., Хвостова В.Ю., Клягина А.М. Присоединение аминокислот к дизамещенным эпоксидам // Известия ВУЗов. Химия и химическая технология. 2006. Т.49. № 1. С.93-95.

266. Крисс Е.Е., Григорьева А.Р., Волченкова А.Р. Координационные соединения металлов в медицине. Киев: Наукова думка, 1986. 216 с.
267. Тагер А. А. Физикохимия полимеров. М.: Химия, 1978. 544 с.
268. Кусков А.Н., Горячая А.В., Супрун О.В., Штильман М.И., Ярославов А.А., Мелик-Нубаров Н.С. Поведение амфифильных полимеров N-винилпирролидона в водных средах // Пластические массы. 2009. Т. 1. С. 36-42.
269. Kwon G.S., Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1996. Vol. 21. Iss. 2. P. 107-116.
270. Allen C., Maysinger D., Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 1999. Vol. 16. Iss. 1. P. 3-27.
271. Fairley N., Hoang B., Allen C. Morphological control of poly (ethylene glycol)-block-poly (ϵ -caprolactone) copolymer aggregates in aqueous solution // *Biomacromol.* 2008. Vol. 9. Iss. 9. P. 2283-2291.
272. Bootz A., Vogel V., Schubert D., Kreuter J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004. Vol. 57. Iss. 2. P. 369-375.
273. Alexandridis P., Lindman B. Amphiphilic block copolymers: self-assembly and applications. Amsterdam: Elsevier, 2000. 448 p.
274. Nuopponen M., Ojala J., Tenhu H. Aggregation behaviour of well-defined amphiphilic diblock copolymers with poly (N-isopropylacrylamide) and hydrophobic blocks // *Polymer.* 2004. Vol. 45. Iss. 11. P. 3643-3650.
275. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991, 544 с.
276. Kuskov A.N., Shtilman M.I., Goryachaya A.V., Tashmuhamedov R.I., Yaroslavov A.A., Torchilin V.P., Tsatsakis A.M., Rizos A.K. Self-assembling nano-scaled drug delivery systems composed of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones // *J. Non-Cryst. Solids.* 2007. Vol. 353. Iss. 22. P. 3969-3975.

277. Gorski N., Kalus J. Determination of the structure of tetradecyldimethylaminoxide micelles in water by small-angle neutron scattering // J. Phys. Chem. B. 1997. Vol. 101. Iss. 22. P. 4390-4393.

278. Jennings V., Mader K., Gohla S.H. Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ¹H-NMR study // Int. J. Pharm. 2000. Vol. 205. Iss. 1. P. 15-21.

279. Lee J.H., Jung S.W., Kim I.S., Jeong Y.I., Kim Y.H., Kim S.H. Polymeric nanoparticle composed of fatty acids and poly (ethylene glycol) as a drug carrier // Int. J. Pharm. 2003. Vol. 251. Iss. 1. P. 23-32.

280. Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии. СПб.: Химия, 1995. 399 с.

281. Щукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. М.: Высшая школа, 2004. 446 с.

282. Cohen S., Berstein H. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. New York: Marcel Dekker, 1996. 552 p.

283. Ройт А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991, 327 p.

284. Виллемсон А.Л., Кусков А.Н., Штильман М.И., Галебская Л.В., Рюмина Е.В., Ларионова Н.И. Взаимодействие полимерных агрегатов стеароил-поли-N-винилпирролидона с компонентами крови // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 6. С. 765-773.

285. Kante B., Couvreur P., Dubois-Krack G., De Meester C., Guiot P., Roland M., Mercier M., Speiser P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles I: Free nanoparticles // J. Pharm. Sci. 1982. Vol. 71. Iss. 7, P. 786-790.

286. Couvreur P., Kante B., Grislain L., Roland M., Speiser P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles // J. Pharm. Sci. 1982. Vol. 71. Iss. 7. P. 790-792.

287. Deichmann W.B., LeBlanc T.J. Determination of the approximate lethal dose with about six animals // J. Ind. Hyg. Toxicol. 1943. Vol. 25. P. 415-417.

288. Litchfield J.T., Wilcoxon F.A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1949. Vol. 96. P. 99-113.

289. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. № 3. С. 32-34.

290. Stojiljkovic M.P., Zhang D., Lopes H.F., Lee C.G., Goodfriend T.L., Egan B.M. Hemodynamic effects of lipids in humans // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2001. Vol. 280. Iss. 6. P. R1674-R1679.

291. Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs, and radiocontrast agents // Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2001. Vol. 18. Iss. 6. P. 567-606

292. Groll A.H., Shah P.M., Mentzel C., Schneider M., Just-Nuebling G., Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital // J. Infect. 1996. Vol. 33. Iss. 1. P. 23-32.

293. Ямсков И.А., Кусков А.Н., Бабиевский К.К., Березин Б.Б., Краюхина М.А., Самойлова Н.А., Тихонов В.Е., Штильман М.И. Новые липосомальные формы противогрибковых антибиотиков, модифицированные амфифильными полимерами // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 6. С. 688-693.

294. Tobio M., Gref R., Sanchez A., Langer R., Alonso M.J. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration // Pharm. Res. 1998. Vol. 15. Iss. 2. P. 270-275.

295. Birk Y. The Bowman – Birk inhibitor. Trypsin – and chymotrypsin – inhibitor from soybeans // Int. J. Pept. Protein Res. 1985. Vol. 25. Iss. 2. P. 113-131.

296. Kennedy A.R. Anticarcinogenic activity of protease inhibitors overview // In: Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents. New York: Springer US, 1993. P. 9-64.

297. Larionov N.I., Gladysheva I.P., Polekhina O.V., Kurochkina L.P., Gorbatova E.N. Synthesis and biodistribution of Bowman-Birk soybean protease inhibitor conjugate with amphiphilic polyester // Appl. Biochem. Biotech. 1996. Vol. 61. Iss. 1-2. P. 139-148.

298. Малых Е.В., Тюрина О.П., Ларионова Н.И. Ацилирование соевого ингибитора протеиназ типа Баумана-Бирк производными ненасыщенных жирных кислот // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 549-554.

299. Малых Е.В., Ларионова Н.И. Изучение антипротеиназной активности ацилированных производных соевого ингибитора протеиназ типа Баумана-Бирк // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1676-1681.

300. Виллемсон А.Л., Малых Е.В., Штильман М.И., Ларионова Н.И. Самоорганизующиеся системы на основе амфифильного поливинилпирролидона и их взаимодействие с модельными белками // Биохимия. 2003. Т. 68. С.1063-1069.

301. Kuskov A.N., Villemson A.L., Shtilman M.I., Larionova N.I., Tsatsakis A.M., Tsikalas I., Rizos A.K. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nano-carriers with incorporated model proteins // J. Phys. Condens. Matter. 2007. Vol. 19. Iss. 20. P. 5139-5150.

302. McGraw R.A., Davis L.M., Lundblad R.L., Stafford D.W., Roberts H.R. Structure and function of factor IX: defects in haemophilia B // Clin. Haematol. 1985. Vol. 14. Iss. 2. P. 359-383.

303. Schmidt A.E., Bajaj S.P. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa // Trends Cardiovasc. Med. 2003. Vol. 13. Iss. 1. P. 39-45.

304. Morfini M., Coppola A., Franchini M., Di Minno G. Clinical use of factor VIII and factor IX concentrates // Blood Transfus. 2013. Vol. 11. Iss. 4. P. 55-63.

305. VandenDriessche T., Collen D., Chuah M.K. Viral vector-mediated gene therapy for hemophilia // Curr. Gene Ther. 2001. Vol. 1. Iss. 3. P 301-315.

306. Rainsford K.D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century // In: Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. P. 3-27.

307. Schlansky B., Hwang J.H. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy // J. Gastroenterol. 2009. Vol. 44. Iss. 19. P. 44-52.

308. Sivalingam N., Pichandi S., Chapla A., Dinakaran A., Jacob M. Zinc protects against indomethacin-induced damage in the rat small intestine // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 654. Iss. 1. P. 106-116.

309. Srinath P., Vyas S.P., Diwan P.V. Preparation and pharmacodynamic evaluation of liposomes of indomethacin // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2000. Vol. 26. Iss. 3. P. 313-321.

310. Dvir E., Elman A., Simmons D., Shapiro I., Duvdevani R., Dahan A., Friedman J.E. DP-155, a lecithin derivative of indomethacin, is a novel nonsteroidal antiinflammatory drug for analgesia and Alzheimer's disease therapy // *CNS drug reviews.* 2007. Vol. 13. Iss. 2. P. 260-277.

311. Kuskov A.N., Voskresenskaya A.A., Goryachaya A.V., Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M. Preparation and characterization of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles containing indomethacin // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010. Vol. 21. Iss. 5. P. 1521-1530.

312. Yuksel N., Baykara M., Shirinzade H., Suzen S. Investigation of triacetin effect on indomethacin release from poly (methyl methacrylate) microspheres: Evaluation of interactions using FT-IR and NMR spectroscopies // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 404. Iss. 1. P. 102-109.

313. Kuskov A.N., Voskresenskaya A.A., Goryachaya A.V., Shtilman M.I., Spandidos D.A., Rizos A.K., Tsatsakis A.M. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal anti-inflammatory drugs: Characterization and in vitro controlled release of indomethacin // *Int. J. Mol. Med.* 2010. Vol. 26. Iss. 1. P. 85-94.

314. Klaassen C.D. Studies on the mechanism of spironolactone protection against indomethacin toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1976. Vol. 38. Iss. 1. P. 127-135.

315. Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Издательство «Медицина, 2005. 832 с.

316. Райхардт Х. Растворители в органической химии. Л.: Химия, 1973. 416 с.
317. Торопцева А.А. Лабораторный практикум по химии и технологии ВМС. Л.: Химия, 1972, 414 с.
318. Каркищенко Н.Н., Грачев Р.В. (ред.) Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Профиль, 2010. 358 с.
319. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. 1987. Т. 41, № 4. С. 497-501.
320. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии. М.: Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ. 2000. 351 с.