Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Лусс Анна Леонидовна

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

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор Штильман М.И.

Москва - 2018

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 4
1. ВВЕДЕНИЕ 5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10
2.1. Амфифильные сополимеры: строение и свойства 10
2.1.1. Особенности строения амфифильных полимеров и сополимеров 10
2.1.2. Поведение амфифильных полимеров в растворах 12
2.1.3. Термодинамические аспекты ассоциации амфифильных полимеров . 16
2.2. Наночастицы на основе амфифильных полимеров 19
2.2.1. Основные типы полимерных наночастиц 19
2.2.2. Способы получения наноразмерных частиц. 24
2.3. Механизмы транспорта веществ в живую клетку и его ингибирование 25
2.3.1. Механизмы эндоцитоза макромолекул. 26
2.3.2. Общая теория слияния мембран. 30
2.3.3. Ингибирование эндоцитоза. 34
2.3.4. Влияние физико-химических свойств наночастиц в биологических исследованиях 38
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 44
3.1. Одностадийный синтез амфифильных полимеров N-винилпирролидона 44
3.2. Получение амфифильных полимеров N-винилпирролидона радикальной полимеризацией в присутствии длинноцепных меркаптанов 45
3.3. Исследование строения синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона. 50
3.4. Исследование агрегации амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих одну концевую тиоалкильную группу 56
3.5. Получение мицелоподобных агрегатов на основе поли-N-винилпирролидона с концевой октадецильной группой 59
3.6. Выявление основных физических характеристик наночастиц. 61
3.7. Получение модельных пустых водонаполненных нанокакпсул методом прямого растворения 64
3.8. Получение частиц суспензионным методом. 65
3.9. Получение частиц диализным и эмульсионными методами. 69
3.10. Исследования проникновения частиц в клеточные культуры *in vitro* .. 74
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 90
4.1 Характеристики исходных соединений 90

4.2. Методики синтезов 93
4.2.1. Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии тиольных соединений 93
4.2.2. Получение полимерных наночастиц методом прямого растворения .. 94
4.2.3. Получение наночастиц эмульсионным способом. 94
4.2.4. Получение наночастиц суспензионным способом. 94
4.2.5.Получение наночастиц диализным методом. 95
4.3. Методы анализов 95
4.3.1. Определение молекулярной массы методом обратного йодометрического титрования 95
4.3.2. Определение молекулярной массы методом паровой осмометрии 96
4.3.3. ИК-спектроскопия 96
4.3.4. УФ-спектроскопия 97
4.3.5. ЯМР-спектроскопия 97
4.3.6. Определение критической концентрации мицеллообразования 97
4.3.7. Определение гидродинамического диаметра методом анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis - NTA) 98
4.3.8. Определение поверхностного заряда наночастиц 98
4.3.9. Определение размеров и морфологии частиц методом атомно-силовой микроскопии. 98
4.3.10. Определение морфологии и размера частиц методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ). 99
4.4. Исследования проникновения частиц в клеточные культуры in vitro. ... 99
5. ВЫВОДЫ 102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 104
Приложение А 115

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПВП – поли – N – винилпирролидон

ПЭО – полиэтиленоксид

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ДАК – динитрил азоизомасляной кислоты (азодиизобутиронитрил)

БАВ – биологически активное вещество

ИК – инфракрасный

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

ОД – октадецил

ГД – гексадецил

ОДМ – октадецилмеркаптан

ГДМ – гексадецилмеркаптан

ДМ – децилмеркаптан

ДФГТ – дифенилгексатриен

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

ДМСО – диметилсульфоксид

ТЭМ – трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

NTA – анализ тракеторий наночастиц

м.д.- миллионная доля

о.е. – относительные единицы

ММ – молекулярная масса

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

PI3Ks - фосфатидилинозитол-3-киназа

РНК – рибонуклеиновая кислота

PBS - Натрий-фосфатный буфер

M_n – среднечисленная молекулярная масса

1. ВВЕДЕНИЕ
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

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

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

– исследование метода синтеза амфифильных полимеров N-винилпирролидона с концевыми тиоалкильными группами радикальной полимеризацией, проводимой в присутствии алкилмеркаптанов в качестве передатчиков цепи;

– установление влияния условий проведения полимеризации на химическое строение, среднечисловые молекулярные массы образующихся амфифильных полимеров N-винилпирролидона с концевыми тиоалкильными группами;

– исследование агрегации амфифильных полимеров N-винилпирролидона с концевыми тиоалкильными группами и выявление влияния их строения на критические концентрации мицеллообразования и размер образующихся мицеллоподобных агрегатов;

– исследование процесса включения в такие агрегаты БАВ на примере полифенола куркумина;

– определение влияния размера куркумин-содержащих частиц на механизм их проникновения внутрь живых клеток и характер перераспределения куркумина между клеточными компартментами с использованием различных клеточных культур, а также ингибиторов рецептор-опосредованного и динамин-зависимого эндоцитоза.

Научная новизна:

– впервые исследовано влияние химического строения амфифильных полимеров, получаемых полимеризацией N-винилпирролидона в присутствии

н-алкилмеркаптанов содержащих одну концевую тиоалкильную группу, на их критические концентраций мицеллообразования (ККМ) и их молекулярно-массовые характеристики;

– впервые получены мицеллоподобные системы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащие в качестве модельного БАВ полифенол куркумин;

– на примере нефагоцитирующих клеток глиобластомы и фагоцитирующих фибробластов человека в опытах *in vitro* показано что механизм поглощения куркумина живыми клетками критическим образом зависит от значения среднего размера частиц носителя. Для носителей со средним диаметром большим 50 нм поглощение куркумина происходит вследствие эндоцитоза с попаданием куркумина в фагосомы, тогда как при использовании носителей меньшего размера возможно реализуется механизм слияния с мембраной с проникновением куркумина в цито- и нуклеоплазму.

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

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

Положения, выносимые на защиту:

- результаты исследования синтеза амфифильных полимеров, содержащих одну концевую н-тиоалкильную группу, радикальной

полимеризацией N-винилпирролидона в присутствии н-алкилмеркаптанов различного строения, и изучения их строения и физических свойств;

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

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

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

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

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечивается применением комплекса современных методов исследования адекватных поставленным задачам.

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

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

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

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Амфифильные сополимеры: строение и свойства

2.1.1. Особенности строения амфифильных полимеров и сополимеров

Как в отечественной, так и в зарубежной литературе в настоящее время встречается множество трактовок понятия амфифильности. Применительно к макромолекулярным системам в большинстве работ под амфифильными полимерами понимают вещества полимерной природы, обладающие тропностью (лиофильностью) к гидрофильным и гидрофобным средам одновременно. Эти полимеры способны растворяться или набухать как в органических растворителях несмешивающихся с водой, так и водных растворах и смесях.

К этому классу веществ относятся многие синтетические и полусинтетические водорастворимые гомо- и сополимеры, например поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль, сополимеры этилен- и пропиленгликолей и их сополимеры и т.д. Частным случаем проявления амфифильности являются полимеры у которых фрагменты амфифильной молекулы с разной лиофильностью пространственно разделены. Они способны к самоорганизации в растворе (мицеллообразованию) либо на границе раздела фаз (формирование мономолекулярных слоёв). Большими возможностями по созданию амфифильных структур обладают сополимеры, строение которых определяет различное сочетание гидрофильных и гидрофобных фрагментов [1].

Для амфифильных полимеров гидрофильная и гидрофобная части (Рис. 1) могут быть представлены как короткими фрагментами, так и более длинными участками, причем в последнем случае речь идет, как правило, о блок-сополимерах. Существование полярной и неполярной частей молекулы способствует агрегации частиц с образованием мицелл, билипидных слоев, ленгмюровских пленок и др. [2].

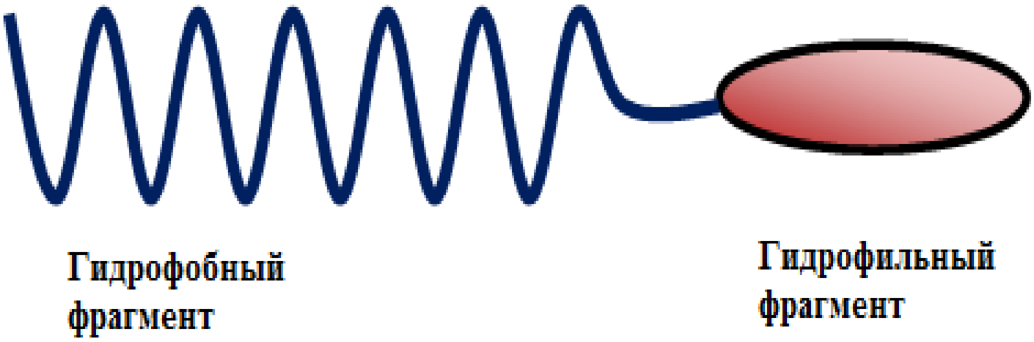


Рис. 1. Строение амфифильной молекулы

В последнее время наблюдается значительный прогресс в развитии синтетических путей получения амфифильных блок-сополимеров различного строения, растворимости и функциональности. Их архитектура весьма разнообразна. Они могут представлять собой диблок-, триблок- и мультиблочные, а также привитые сополимеры. Отдельную группу составляют телехелевые полимеры с одной (семителехелевые) или двумя концевыми группами противоположной полярности (эндкепированые полимеры) (рис.2). [3,4]

Блок-сополимеры:	
ди-блок	$\sim M_1M_1M_1M_1M_1\sim M_2M_2M_2M_2M_2\sim$
три-блок	$\sim M_1M_1M_1M_1M_1\sim M_2M_2M_2M_2M_2\sim M_1M_1M_1M_1M_1\sim$
Привитой сополимер	$\sim M_1M_1M_1M_1M_1\sim$ $\quad\quad\quad\vert$ $\quad\quad\quad M_2M_2M_2M_2M_2\sim$
Эндкепированные сополимеры	$M_2\sim M_1M_1M_1M_1M_1\sim$ $M_2\sim M_1M_1M_1M_1M_1\sim M_1M_1M_1M_1M_1\sim M_2$

Рис. 1. Архитектура некоторых амфифильных сополимеров.
$\sim M_1\sim$ – гидрофильный фрагмент, $\sim M_2\sim$ – гидрофобный фрагмент.

Одним из наиболее распространенных гидрофильных фрагментов являются этиленоксидные последовательности звеньев различной длины. Блок-сополимеры состоящие из полиэтиленоксидных фрагментов (ПЭО) и

других полиалкиленоксидов меньшей полярности, таких как полипропиленоксид (ППО) и полибутиленоксид (ПБО), являются классом амфифильных сополимеров, которые традиционно привлекают значительный интерес и доступны коммерчески под торговыми марками Плюроник™ и Синпероник™ [5].

Еще одной рассматриваемой группой амфифильных полимеров являются продукты, содержащие в качестве гидрофильного фрагмента полимерную цепь, а в качестве гидрофобного фрагмента длинноцепные алифатические радикалы [6]. Примером продуктов, имеющих такое строение, могут служить сополимеры N-винилпирролидона, содержащие концевые группы выполняющие функцию гидрофобных радикалов [7], причем их свойства, во многом схожи с ПЭО-содержащими амфифильными блок-сополимерами, однако, они существенно менее токсичны [8].

2.1.2. Поведение амфифильных полимеров в растворах

Поведение амфифильных полимеров в растворах определяется строением их гидрофильных и гидрофобных фрагментов, а также термодинамическими свойствами растворителя по отношению к фрагментам, составляющим полимер (блокам). Предпочтительное сродство растворителя к одному из фрагментов макромолекулы вызывает самоорганизацию в растворе. Типичная концентрационная фазовая диаграмма, отражающая тип надмолекулярных образований в зависимости от концентрации в системе амфифильный полимер - селективный к одному из фрагментов полимера растворитель приведена на рис. 3 [10].

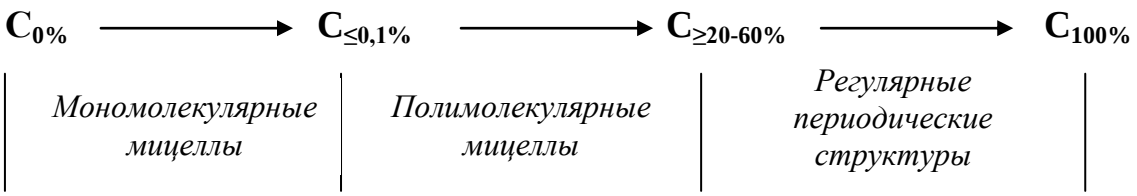


Рис. 3. Концентрационно-фазовая диаграмма системы амфифильный полимер - селективный растворитель.

При низких концентрациях в жидкой среде, амфифильные молекулы существуют по отдельности, однако, при увеличении концентрации имеет

место агрегирование в определенном узком интервале концентраций. Концентрация, при которой начинается образование агрегатов, известна как критическая концентрация мицеллообразования (ККМ).

Тенденция амфифильных полимеров к самопроизвольной ассоциации при концентрациях выше ККМ связана с одной стороны с минимизацией взаимодействий между их гидрофобными частями и водной полярной средой, а с другой стороны к усилению взаимодействия между гидрофобными фрагментами и гидрофильными фрагментами с полярной средой, в качестве которой, как правило, выступает вода.

В зависимости от молекулярной архитектуры возможны различные типы ассоциированных структур. Наиболее типичной является самоорганизация двухблочных сополимеров (и триблочных с «нерастворимым» средним блоком) в сферические мицеллы, имеющие «сердцевину», состоящую из водонерастворимых гидрофобных блоков и «короны», состоящей из сольватированных сегментов водорастворимых блоков.

Триблок-сополимеры с «нерастворимыми» концевыми блоками часто образуют рыхлые мицеллы или сети типа «хризантема» посредством ассоциации гидрофобных концевых групп[1] (Рис.4).

На рисунке приведены

A) Диблок-сополимер в растворе (неассоциированная молекула или "юнимер".

B) Мономолекулярная структура, сформированная усложнением конформации цепи привитых гидрофобных блоков.

C) Диблок-сополимеры организованные в сферические мицеллы, имеющие "ядро", состоящее из водонерастворимого (гидрофобного) фрагмента и "корону" образованную солватированными сегментами водорастворимого блока.

D) Хаотичная система, образованная ассоциацией гидрофобных частей триблок-сополимера с концевыми гидрофобными группами.

E) "Хризантема"-подобная мицелла, образованная полимерами с гидрофобными концевыми группами.

F) Триблок сополимеры, организованные в сферические мицеллы, состоящие из центрального гидрофобного блока и концевых растворимых фрагментов.

I) Полимер-полимерный комплекс, образованный за счет многоточечного взаимодействия гидрофобных фрагментов различных полимерных цепей

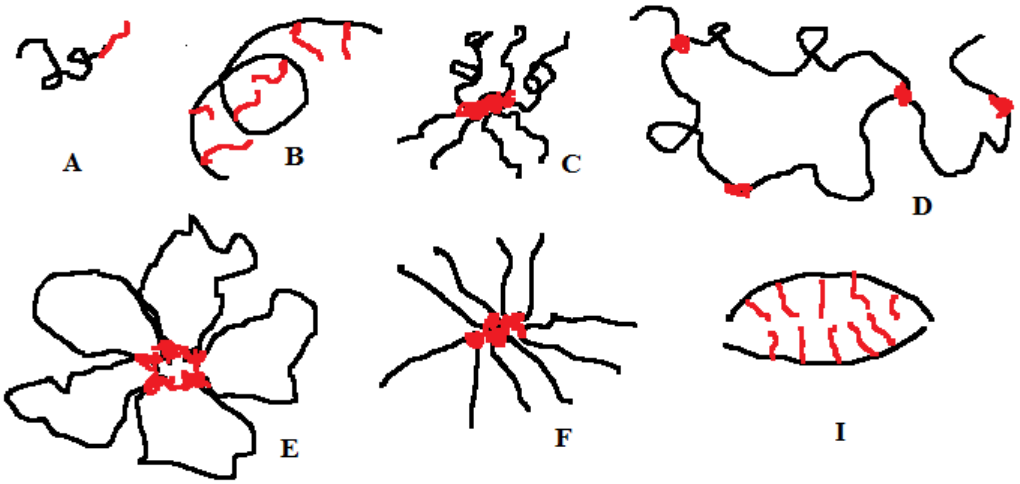


Рис. 4. Амфифильные сополимеры в водных растворах.

В концентрированных коллоидных растворах амфифильные полимерные молекулы часто склонны к образованию лиотропных жидкокристаллических фаз. Об этом имеются многочисленные свидетельства, однако они гораздо менее изучены по сравнению с мицеллярными растворами, существующими в области относительно невысоких концентраций.

В зависимости от характеристик полимера в смеси с водой (и маслом) лиотропные структуры образуются в виде кубической (сферические мицеллы, кристаллизованные в кубическую трехмерную решетку), гексагональной (цилиндрические мицеллы, кристаллизованные в гексагональную решетку) и/или слоистой фазы (плоские бислои) (Рис. 5).

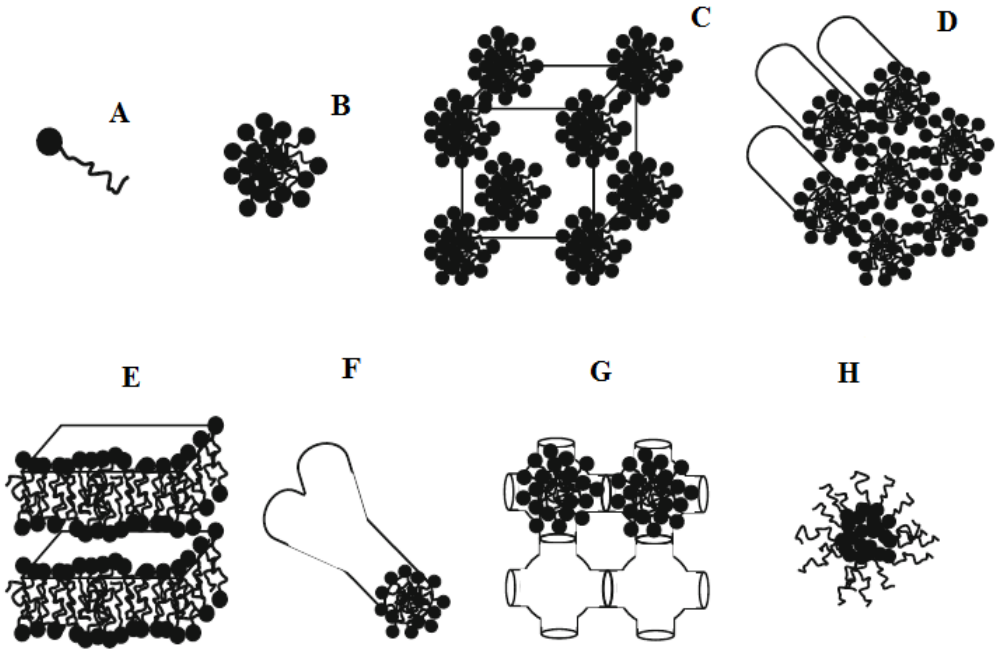


Рис.5. Некоторые типы лиотропных жидкокристаллических структур, образованные амфифильными молекулами в водных растворах: A - единичная молекула ПАВ; B - нормальная мицелла; C - кубическая упаковка мицелл; D - гексагональная упаковка мицелл; E - ламеллярный жидкий кристалл; F - Червеподобная упаковка мицелл; G - двусторонняя кубическая упаковка мицелл; H - обратная/инвертированная мицелла.

При более высокой концентрации образуются упорядоченные периодические структуры, которые в силу мощной пространственной организации иногда называют суперрешетками [9].

Физико-химические и биологические свойства амфифильных сополимеров можно контролировать изменяя природу гидрофильных и гидрофобных звеньев и их протяженность. Агрегаты, образованные из привитых сополимеров обычно имеют меньшие размеры, чем частицы из амфифильных аналогов, несущих концевую гидрофобную группу [10]. Кроме того, мицеллы, сформированные из привитых сополимеров, могут дополнительно агрегировать в большие частицы, в которых гидрофобные фрагменты находятся в более тесном контакте с водой [11].

2.1.3. Термодинамические аспекты ассоциации амфифильных полимеров

Ассоциация в водных растворах амфифильных молекул приводит к образованию различных структур, которые могут переходить друг в друга при изменении ряда параметров, таких как температура, концентрация, состав, ионная сила или pH среды.

Объяснение закономерностей ассоциации амфифильных полимеров, которые в этом случае тождественны по смыслу поверхностно-активным веществам, способных к мицеллообразованию, непосредственно связано с представлениями об этом процессе как равновесном и обратимом в термодинамическом отношении. С другой стороны, хотя термодинамический подход позволяет сформулировать условия образования ассоциатов поверхностно-активных веществ в самом общем виде, он не является достаточным для всеобъемлющего описания такого рода процессов.

Во-первых, термодинамический подход не сообщает ничего о механизме процессов, приводящих к ассоциации. Во-вторых, термодинамические параметры ассоциации отражают лишь результат усреднения действия ряда сил в различных областях системы.

И хотя использование модельных представлений о механизме ассоциации представляется весьма плодотворным подходом, особенно в связи с вопросами изменения геометрии ассоциатов и образования лиотропных жидкокристаллических фаз [13], в данном направлении еще не достигнуты успехи, достаточные для проведения количественных расчетов, обладающих прогностической способностью. Поэтому до настоящего времени, количественное рассмотрение процесса ассоциации связано, главным образом, с применением аппарата термодинамики.

Как было отмечено ранее, процесс ассоциации поверхностно-активных веществ (ПАВ) в мицеллы при концентрации выше ККМ обеспечивается, как унификацией взаимодействий в системе по признаку гидрофильности (гидрофобности), так и восстановления порядка межмолекулярных

взаимодействий в самой среде. В случае водных сред эти взаимодействия обеспечиваются главным образом водородными связями [12].

Процесс ассоциации ПАВ при достижении ККМ формально может быть выражен следующим равновесием [15]:

$$nM = M_n \quad (1)$$

Константа равновесия процесса ассоциации в этом случае дается следующим уравнением:

$$K_a = \frac{a_M}{a^n} \qquad (2)$$

где: K_a – константа равновесия для процесса ассоциации, a_M – активность мицеллярной формы ПАВ в области ККМ; a – активность молекулярной формы ПАВ в области ККМ, n – степень ассоциации молекулярных форм ПАВ в первично образующихся мицеллах.

При этом в соответствии с уравнением изотермы Вант-Гоффа, возможно установить взаимосвязь между ККМ и стандартной энергией Гиббса ассоциации:

$$\Delta G_a^o = -RTlnK_a = RTln\frac{a^n}{a_M} \qquad (3),$$

где R – универсальная газовая постоянная, T - температура.

Дальнейшие упрощения последнего уравнения могут быть сделаны в предположение о единичной активности мицеллярной фазы ($a_M \approx 1$) и допущение об идеальном поведении раствора при концентрации равной ККМ ($a =$ ККМ), что приводит к следующему уравнению:

$$\Delta G_a^o = nRTln\text{ККМ} \qquad (4)$$

Так как мицеллообразование происходит в разбавленных растворах (ККМ<<1), то стандартная энергия Гиббса ассоциации в области ККМ должна быть величиной отрицательной, что указывает на самопроизвольный характер мицеллообразования. ККМ для амфифильных блок-сополимеров обычно находится в пределах 10^{-6}-10^{-7}М, в то время как для низкомолекулярных ПАВ в пределах 10^{-3}-10^{-4} М. Поэтому, ассоциаты образованные из амфифильных

блок-сополимеров в основном более термодинамически устойчивы, чем низкомолекулярные аналоги [13].

Так как $\Delta G^o = \Delta H^o - T\Delta S^o$, то последнее уравнение может быть переписано в форме:

$$\ln(ККМ) = \frac{\Delta H^o}{nRT} - \frac{\Delta S^o}{nR} \qquad (5)$$

Если построить линейную зависимость в координатах «ln(ККМ) – 1/T», то тангенс угла наклона равен $\Delta H^o/nR$, а отрезок отсекаемый на оси ординат равен $-\Delta S^o/nR$, то возможно определить изменения стандартной энтальпии и энтропии в процессе мицеллобразования в расчете на одну молекулу (моль молекул) исходного ПАВ в предположении о независимости определяемых величин от температуры.

Приведенное выше уравнение (5) предполагает, что для определенных полимеров, таких как Плюроники, где $\Delta H^o > 0$, значение ln(ККМ), и следовательно ККМ, будет уменьшаться с увеличением температуры. Практика показывает, что для Плюроников с увеличением температуры ККМ действительно понижается, что позволяет формировать мицеллы в области меньших концентраций. Противоположное влияние имеет температура на величину ККМ для ПАВ, если $\Delta H^o < 0$.

В общем случае ассоциаты могут состоять из нескольких различных ПАВ, и в таком случае они называются смешанными ассоциатами. В идеальном случае, ККМ смешанной системы может быть вычислена исходя из ККМ и мольных долей (М) индивидуальных компонентов:

$$\frac{1}{ККМ} = \frac{M_1}{ККМ_1} + \frac{M_2}{ККМ_2} \qquad (6)$$

Проведенный термодинамический анализ также указывает на существование критической температуры мицеллообразования (КТМ). Анализ значений ККМ и КТМ, а также их зависимостей от концентрации и температуры, соответственно, дает простой способ определения термодинамических параметров самоорганизации, таких как свободная энергия и энтальпия и энтропия ассоциации [14].

Следует отметить, что рассмотренный подход применим к любым типам поверхностно-активных веществ, способных образовывать мицеллы, включая полимеры и сополимеры соответствующего строения.

2.2. Наночастицы на основе амфифильных полимеров

2.2.1. Основные типы полимерных наночастиц

Применение гидрофобных терапевтически активных веществ, как известно, сопряжено с рядом трудностей, таких как: плохое поглощение из желудочно-кишечного тракта, низкая биодоступность, а также агрегация молекул, вызывающая такие осложнения, как, например, эмболия. С другой стороны, их эффективное использование затрудняет плохая растворимость в воде, присущая многим лекарственным препаратам, особенно противораковым.

Для преодоления этих проблем, могут быть использованы полимерные наночастицы на основе амфифильных сополимеров, внутрь которых включают плохо растворимые в воде лекарственные средства [15]. Такие наноразмерные носители представляют собой компактные образования имеющие диаметр от 10 до 1000 нм, образующие в воде коллоидные системы.

Различные типы наночастиц широко применяются в качестве носителей лекарственных средств для диагностики и терапии. Их использование в качестве носителей фармацевтических препаратов хорошо зарекомендовало себя в последнее десятилетие а эффективность подтверждена в клинических исследованиях. Поверхностная модификация наночастиц, таких как липосомы, мицеллы, нанокапсулы, полимерные наночастицы, твердые липидные частицы, ниосомы и др., как правило, используется для контроля их биологических свойств и дает возможность одновременно выполнять различные терапевтически или диагностически важные функции.

В зависимости от агрегатного состояния, морфологических особенностей и способа образования полимерные наночастицы можно подразделить на нанокристаллы, нанокапсулы и наносферы, полимерные мицеллы, липосомы,

ниосомы и полимеросомы [16].. Наноразмерные частицы образуют и дендримеры, макромолекула которых имеет суперразветвленное строение и которые могут не относиться к амфифильным системам, (рис.6) [17].

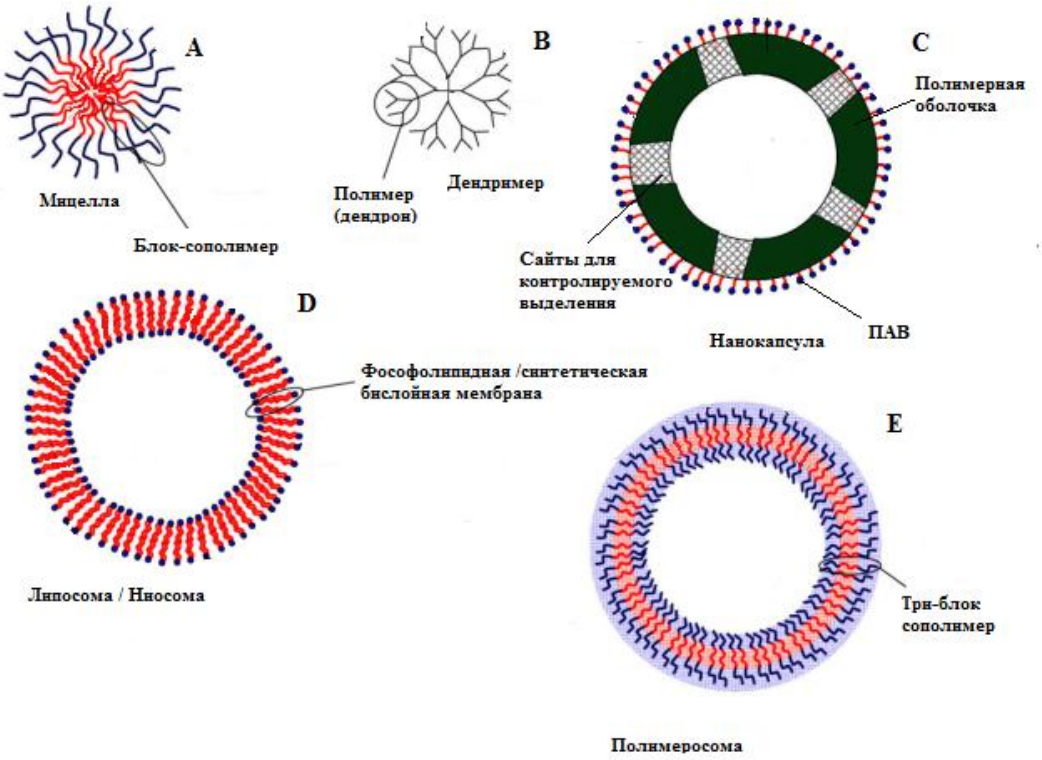


Рис.6. Некоторые типы наночастиц: A - Мицелла; B - Дендример; C - Нанокапсула; D - Липосома (ниосома); E – Полимеросома [17].

Мицеллы. Наиболее типичной структурой наночастиц, образованных на основе амфифильных полимеров являются мицеллы (структура (C) на рис. 4 и (A) на рис.6. Мицеллы – это коллоидные частицы размером обычно в диапазоне от 5 до 100 нм, иногда выше. Мицеллы образуются при концентрации не меньшей ККМ [18].

Амфифильные сополимеры обычно имеют более низкие ККМ по сравнению с низкомолекулярными ПАВ аналогичных типов. ККМ полимерных агрегатов обычно находятся в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-7} ммоль/л, в отличие от 10^{-3} до 10^{-4} ммоль/л для низкомолекулярных поверхностно-активных веществ [14].

Например, ККМ для сополимеров поли-(N-изопропилакриламид) – полистирол и полиэтиленоксид – поли(β-бензил-L-аспартат) может достигать

0.0005-0.002 объемных процентов в зависимости от состава [19]. Однако некоторые сополимеры имеют более высокие ККМ, достигая значений выше 0.01-10%об. в случае полоксамеров [20].

Амфифильные полимеры с высокой ККМ не нашли широкого применения для доставки лекарственных средств, так как их мицеллы нестабильны в водной среде и легко диссоциируют при уменьшении концентрации вплоть до образования молекулярных растворов.

Морфология мицелл, которые можно получить из амфифильных полимеров, довольно разнообразна. Обычно предполагается, что сополимеры образуют агрегаты, форма которых близка к сферической. Однако имеются многочисленные данные, указывающие на существование множества мицеллярных форм несферической геометрии. Это различные палочкообразные формы, кольца, ламеллярные структуры, ленточные формы, трубчатые структуры, гексагонально упакованные структуры.

Липосомы. Липосомы представляют собой сферические закрытые везикулы, состоящие из фосфолипидных мембран с водной фазой внутри полости. Размер липосом обычно находится в диапазоне от нескольких десятков нанометров до нескольких сотен микрометров, и их мембрана может состоять из одного или нескольких бислоев. Толщина одного бислоя составляет около 3,5 нм. Липосомы привлекли значительное внимание ввиду их способности солюбилизировать липофильные вещества, и инкапсулировать гидрофильные лекарственные средства [17].

Для получения липосом доступно большое количество способов (например, лиофилизация, экструзия, гидратация липидов в органических растворителях, микрофлюидизация и т. д.) и широкий спектр исходных фосфолипидов.

Широкий спектр областей применения липосом от контрастирования в рентгенологии, ферментативного катализа и обнаружения токсинов в окружающей среде, до контролируемое выделения лекарств внутри организма в медицине потребовал разработки методов контроля их размера и

морфологии. Этому посвящено большое количество исследований проведенных в последние годы. Доставка лекарств в организм с использованием липосом одобрена для лечения рака с середины 1990-х годов, но интенсивные исследования в этой области не останавливаются до сих пор [21].

Основной недостаток липосом как лекарственной формы - относительная небольшая стабильность при хранении. Этого недостатка лишены полимерные наночастицы, имеющие практически те же области возможного применения [22].

Ниосомы - представляют собой нефосфолипидные мембранные везикулы, состоящие в основном из неионогенных ПАВ (Спан 60). Также во многих в систему вводят холестерин или его производные и анионные ПАВ, такие как дицетилфосфат. Ниосомы имеют свойства и области применения схожие с липосомами, однако их низкая стоимость, лучшая стабильность в некоторых биологических процессах и меньшие требования, предъявляемые к условиям хранения исходных реагентов, делают ниосомы перспективной альтернативой использованию липосом [25].

Полимеросомы - представляют собой класс искусственных везикул, полученных из синтетических блок-сополимеров. Типичные полимеросомы являются полыми сферами, которые содержат водный раствор в ядре, окруженном двуслойной мембраной. Ядро полимеросомы можно использовать для инкапсулирования водорастворимых лекарственные средств, ферментов, белков, пептидов, а также фрагментов ДНК и РНК. Мембрана может включать в себя гидрофобные лекарственные средства. Для получения полимеросом используются синтетические блок-сополимеры. В зависимости от природы полимерных фрагментов и молекулярного веса сополимера могут быть получены не только полимеросомы с различными свойствами, например, с чувствительностью к различным типам внешнего воздействия, выделяющие лекарства под действием внешнего сигнала, а также с различной толщиной мембраны и различной проницаемостью. Обычно полимеросомы имеют

прочные мембраны толщиной 3-4 нанометра, образованные сополимерами с относительно высокой молекулярной массой. Также длительное время нахождения полимеросом в кровотоке может быть достигнуто путем введения гидрофильного поверхностного слоя, например ПЭО [26].

Наносферы и нанокапсулы. Наряду с другими видами полимерных частиц, таких мицеллы и липосомы в водной среде могут быть получены и другие носители малого размера (50-500 нм) - наносферы (сплошные полимерные частицы сферической формы) и нанокапсулы (полые полимерные частицы также сферической формы). Небольшой размер получаемых наносфер и нанокапсул привлекает внимание при использовании данных носителей в биологических опытах in vitro и in vivo. Существуют различные способы получения, среди которых наиболее часто используемыми являются методы выпаривания растворителя, двойная эмульсия и осаждение наночастиц. Выбор метода, главным образом зависит физико-химических свойств, используемого полимера и включенного в наночастицы биологического материала, однако размер и распределение по размерам получаемых нанокапсул/наносфер обычно не поддается контролю. [27,28].

Дендримеры – В отличие от приведенных выше систем, образованных различным образом сформированных агрегатов амфифильных молекул, дендримеры представляют собой сильно разветвленные полимеры с несколькими концевыми группами, которые позволяют инкапсулировать или концентрировать молекулы лекарственных средств различных типов на поверхности или в сердцевине. Степень разветвления дендримера определяемая как число повторяющихся циклов ветвления (генераций), выполняемых во время синтеза, определяет число разветвлений и количество терминальных групп в структуре дендримера. При этом его диаметр увеличивается линейно, а число функциональных групп на периферии возрастает экспоненциально. К наиболее часто используемым типам дендримеров относятся: полиамидоамины, полиамины, полиамиды (полипетиды), полиэфиры и синтетические аналоги ДНК [23].

Дендримеры амфифильной природы интересны в основном с точки зрения доставки лекарственных средств [24]. Загрузка дендримеров активным веществом достигается гидрофобными/гидрофильными взаимодействиями, а концы цепи могут быть функционализованы с увеличением плотности на переферии, что защищает молекулы включенного вещества от обмена с другими дендримерами и компонентами крови [23].

2.2.2. Способы получения наноразмерных частиц.

Наиболее распространенными методами, используемым для получения наноразмерных частиц, в том числе содержащих иммобилизованные лекарственные вещества, являются диализный метод, метод выпаривания растворителя из масляно-водной эмульсии, метод твердой дисперсии и метод микрофазного разделения. Другим инновационным одноступенчатым способом получения полимерных мицелл является лиофилизация растворенной смеси лекарственного вещества и полимера в системе вода – терт-бутанол [29]. Также широкое применение нашли методы, основанные на прямом растворении [30], комплексообразовании [31], химическом конъюгировании [32] и различные способы удаления растворителя [33].

Метод прямого растворения. Для получения полимерных частиц методом прямого растворения поверхностно-активные полимеры растворяют в водной среде до достижения концентраций значительно превышающих критическую концентрацию мицеллообразования. Следует отметить, что данный методм подходит только для полимеров, хорошо растворимых в воде[14].

Метод диализа. Метод диализа включает в себя добавление небольшого количества воды к раствору полимера и лекарственного средства в смешивающемся с водой органическом растворителе, например таком как диметилформамид, с последующим диализом против воды в течении нескольких часов для удаления органического растворителя. [34,35].

Метод выпаривания растворителя из масляно-водной эмульсии. В этом случае лекарственное вещество совместно с полимером растворяют в несмешивающимся с водой органическом растворителе или смеси растворителей. Полученный раствор медленно добавляют к дистиллированной воде при интенсивном перемешивании с образованием эмульсии с внутренней органической фазой и непрерывной водной фазой, которая упорядочивает полимер с образованием мицелл. Иногда ПАВ, такие как поливиниловый спирт, используют вместо водного раствора. Затем из полученной эмульсии удаляют растворитель путем его испарения [36-39].

Метод твердой дисперсии. При использовании этого метода, лекарственное вещество вместе с полимером, растворяют в органическом растворителе, и твердый полимерный матрикс получают после испарения растворителя при пониженном давлении. Лекарственно-загруженные полимерные мицеллы получают после добавления воды в предварительно нагретую полимерную матрицу [40-41].

Метод микрофазного разделения. В этом способе лекарственное вещество и полимер растворяют в (органическом растворителе) тетрагидрофуране, и полученный раствор по каплям добавляют к воде при интенсивном перемешивании. Полимерные мицеллы формируются спонтанно, и лекарственное средство включается во внутренний слой мицелл. Органический растворитель удаляют при пониженном давлении [36].

2.3. Механизмы транспорта веществ в живую клетку и его ингибирование

Из-за наличия гидрофобного внутреннего монослоя липидный бислой клеточных мембран служит барьером для прохождения большинства полярных молекул. Эта барьерная функция имеет решающее значение, поскольку она позволяет клетке поддерживать постоянной концентрации большинства веществ растворенных в цитозоле, которые отличаются от таковых во внеклеточной среде. То же касается концентрации основных белков, солей и других веществ в каждом из компартментов (органелл,

отсеков), отграниченных внутриклеточной мембраной от цитозоля. Однако для использования этого барьера клетки должны были развивать способы передачи нужных им водорастворимых молекул через эти мембраны, чтобы поглощать необходимые питательные вещества, выделять метаболические отходы и регулировать концентрации внутриклеточных ионов. Транспортировка неорганических ионов и небольших водорастворимых органических молекул через липидный бислой достигается с помощью специализированных трансмембранных белков, каждый из которых ответственен за перенос конкретного иона или молекулы или группы близкородственных ионов и молекул. Клетки могут также переносить большие макромолекулы и даже частицы через свои мембраны, но механизмы, используемые в большинстве этих случаев, отличаются от таковых при переносе малых молекул.

2.3.1. Механизмы эндоцитоза макромолекул.

Эндоцитоз является универсальным ключевым механизмом, с помощью которого клетки общаются с окружающей средой. Он заключается в образовании пузырьковых мембранных везикул различного типа с последующим их переносом внутрь цитозоля (интернализацией) и слиянием с внутриклеточными транспортными везикулами - эндосомами. Клетки используют эндоцитоз для различных целей от поглощения питательных веществ до инициирования или прекращения передачи межклеточных сигналов, поэтому эндоцитарные везикулы могут образовываться с помощью нескольких механизмов. Хотя классификация путей интернализации постоянно развивается, существует, по меньшей мере, два основных пути генерации внутриклеточных (эндоцитарных) носителей: внутриклеточная сборка везикул, покрытых снаружи клатрином - веществом искривляющим мембрану и интернализация кусков (доменов) плазматической мембраны

липидного бислоя с последующим образованием больших вакуолей и фагосом. Такими везикулами опосредуется фагоцитоз, и микропиноцитоз [42].

Эндоцитозный путь начинается на плазматической мембране. Поскольку через этот путь осуществляется контакт клетки с внешней средой, макромолекулярное содержимое которой весьма разнообразно, механизмы эндоцитоза выполняют в некотором роде барьерные функции, в задачу которых входит распознавание природы внеклеточных макромолекул. Этот первоначальный «фейс-контроль» кандидатов на вход в клетку реализуется за счет существования несколько путей входа, или порталов, через которые в клетку проникают разные типы макромолекул. Хотя существуют и способы проникновения, не опосредуемые формированием эндосом (образование пор, перенос через мембрану с помощью транспортеров), основная масса внеклеточных макромолекул использует механизмы везикулярного транспорта, поскольку они тесно связаны с механизмами сортировки и внутриклеточной целевой доставки. Характерной чертой разных порталов являются их строго определенные размеры и, в ряде случаев, связь с дальнейшей судьбой груза (рис. 7) [43].

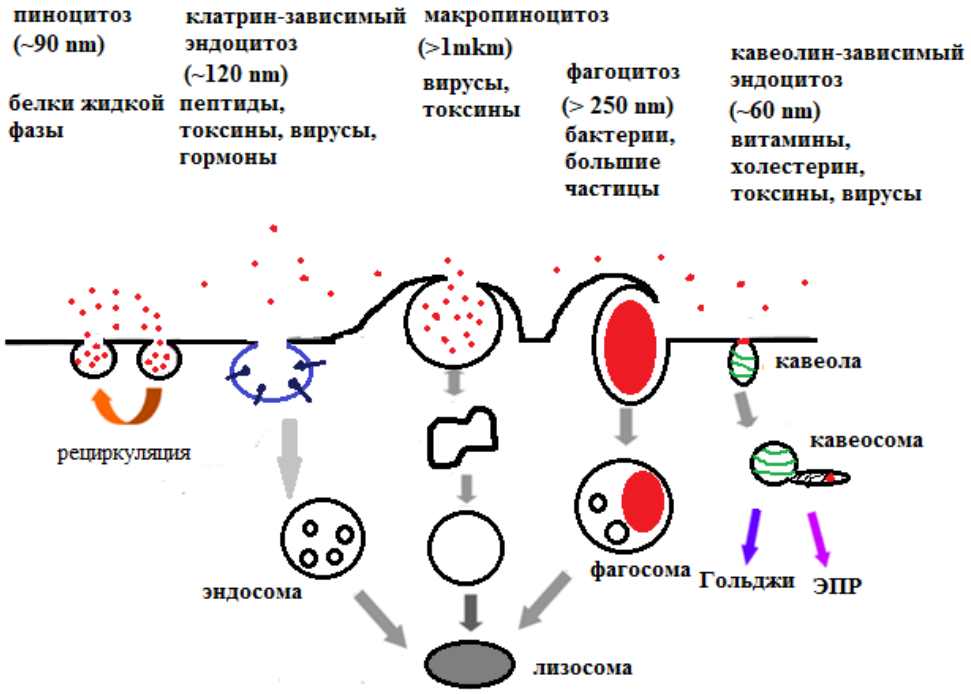


Рис.7. Некоторые типы механизмов эндоцитоза.

Пиноцитоз – это путь, через который в клетку попадают в основном белки жидкой фазы, поэтому он часто называется жидкофазным эндоцитозом (fluid-phase endocytosis, FPE). На самом деле, белки и другие компоненты жидкой фазы попадают во все формирующиеся на плазматической мембране углубления (инвагинации), но исключительность пиноцитоза в том, что никакие известные ныне мембранные белки не используют специфически этот путь для попадания в клетку. Пиносомы имеют около 90 нм в диаметре и образуются во всех клетках постоянно (но с разной скоростью). Если добавить в культуральную жидкость какой-нибудь флуоресцентно-меченый белок, например, бычий сывороточный альбумин (БСА), то его содержание в клетке будет увеличиваться медленно и относительно линейно, отражая баланс между интернализованным (поглощенным клеткой) и рециклировавшим (выброшенном наружу) грузом. Более 90 % материала, попавшего в пиносомы, быстро рециклирует. Это говорит о том, что пиноцитоз в основном поддерживает гомеостаз поверхностной мембраны [44]. Следует отметить, что клетки различных тканей организма могут иметь разные наборы специфических рецепторов для одного и того же лиганда. Например, эпителий легкого может поглощать БСА обычным пиноцитозом, а в мембранах клеток эпителия почечных канальцев имеются специализированные рецепторы для этого белка и в этом случае он будет проходить внутрь клетки значительно быстрее с использованием механизма рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Рецептор- опосредованный эндоцитоз это особый механизм активного специфического трансмембранного транспорта, который предназначен для быстрого поглощения клеткой специфических макромолекул, ионов или частиц. При этом плазмолемма выпучивается внутрь клетки, формируя окаймлённые ямки - инвагинации. С внутренней стороны ямка представляет собой зачаток пузырька - эндосомы построенной из билипидной мембраны со встроенными молекулами адаптивных белков играющими роль своеобразных клиньев. Количество молекул белков адаптина клатрина и др. на единицу

площади мембраны определяет кривизну выпучивания необходимую для эффективного захвата конкретного поглощаемого вещества или частицы.

Помимо адаптина и клатрина, присутствие которых обязательно, набор адаптивных белков включает трансмембранные белки - рецепторы специфичные к поглощаемому субстрату (например, ЛПНП-рецептор). Субстрат, находящийся вне клетки связывается с рецепторами внутри инвагинации на поверхности мембраны. Эффективность связывания определяется, помимо прочих факторов, кривизной инвагинации. В результате каскада активных взаимодействий субстрат поглощается клеткой со значительно большей скоростью по сравнению со скоростью обычного эндоцитоза. Связывание субстрата приводит к образованию внутриклеточной везикулы - окаймлённого внутриклеточного пузырька. На последней стадии шейка, связывающая внутриклеточную везикулу с мембраной перерезается с участием фермента динамина с образованием свободной внутриклеточной - эндосомы. Рецептор-опосредованный эндоцитоз обеспечивает быстрое и контролируемое поглощения клеткой индивидуальных субстратов - лигандов соответствующих рецепторов. Например, с его помощью происходит , интернализация и рециркулирование ЛПНП необходимых для стабилизации клеточной мембраны. Внутри клетки эндосомы могут сливаться друг с другом, с клеточной мембраной или лизосомами, при этом происходит образование вторичных эндосом. При слиянии с внешней мембраной происходит возврат в плазмолемму белков - рецепторов для повторного использования.

Например, когда клетке требуется холестерин для построения плазмолеммы, она экспрессирует ЛПНП-рецепторы на плазматической мембране и захватывает ЛПНП из межклеточного матрикса внутрь клетки. [45].

Фагоцитоз - от греческого "поедание" — процесс поглощения клеткой твёрдых нерастворимых субстратов, к которым относятся все виды корпускуллярных носителей включая наночастицы. Процесс в целом сходен с

пиноцитозом и рецептор-опосредованным эндоцитозом. Отличительной особенностью является размер образующегося пузырька - фагосомы, который может достигать от 250 нм до 10 микрон. Второе отличие - далеко не все клетки способны к фагоцитозу. Третье отличие - обязательная атака содержимого фагосомы лизосомальными ферментами внутри фагоцитирующей клетки. После поглощения клеткой фагосома сливается с первичной лизосомой с образованием вторичной лизосомы. В кислой среде смесь различных лизосомальных ферментов включая гидролазы расщепляет субстрат, оказавшиеся во вторичной лизосоме. Продукты расщепления либо экскретируются через лизосомную мембрану в цитоплазму клетки, либо удаляются в межклеточный матрикс за счет экзоцитоза. Кроме функции питания у животных клеток фагоцитоз играет защитную роль. Фагоцитарная активность лейкоцитов и макрофагов необходимая функция клеточного иммунитета играющая огромное значение в защите организма от попадающих в него микробов, вирусов и других нежелательных частиц. Впервые открыл и описал фагоцитоз великий русский физиолог И. И. Мечников.

2.3.2. Теория слияния мембран.

Аггрегация и слияние мембран — нормальный процесс, который играет важнейшую роль в гетерологичном и гомологичном межмембранных взаимодействиях происходящих при множестве физиологических процессов: эндоцитозе и экзоцитозе; дифференцировке тканей, при обмене информационными молекулами между клетками, оплодотворении клеток, митозе; биогенезе мышечных волокон; в процессе приобретения клетками новых антигенных свойств; в ходе аутоиммунных реакций (например, при слиянии макрофагов с лимфоцитами); при секреции ядерного содержимого в цитоплазму; при слиянии макрофагов во время воспаления тканей при липосомотропной химиотерапии и т.д.. Механизмы взаимодействия мембран универсален. Он един и включают в себя одни и те же стадии как для слияния биологических клеточных, так и для модельных (искусственных) мембран.

Это дает широкие возможности для синтеза новых синтетических мембран, способных сливаться с биологическими.

Слияние может, происходит только в специфических участках билипидного слоя плазмолеммы свободных от поверхностных и трансмембранных белков и поверхностных антенных полисахаридов. такие участки составляют около 30-40% поверхности плазмолеммы. Доля свободных участков у внутреклеточных мембран значительно больше. Мембраны клеток несут общий отрицательный заряд. Локальный ξ потенциал может принимать значение о -2 до -40 мв причем участки покрытые мембранными белками несут больший по абсолютной величине заряд. Сближение мембран вызывает локальный скачок ξ потенциала, до его с -20÷-30 мв и может инициировать образование промежуточных(перед слиянием) структур, то есть вызывать дестабилизацию мембраны - необходимую стадию предшествующую слиянию. При слиянии биологических мембран главным эндогенным фактором слияния являются Ca^{2+} . Они резко снижают гидратационный барьер, который необходимо преодалеть при юнификации слоев поверхностно активных липидов образующих биологические мембраны. Кроме того, ионы Ca^{2+} частично нейтрализуют отрицательный поверхностный заряд, снижают электростатическое отталкивание и непосредственно модифицируют структуру билипидного слоя становясь противоионами фосфатных остатков восфолипидов. Это вызывает фазовое разделение в липидных слоях, дестабилизируя их. При этом образуются кальциевые мостики между липидами двух контактирующих мембран, инициируя слияние. Эффект усиливается при условии наличия в бислоях кислых липидов, которые при физиологических значениях pH остаются заряженными. Например, из за отсутствия кислых остатков полимерные липосомы на основе фосфатидил-инозитола под действием Ca^{2+} (1 мМ) не сливаются, а только агрегируют. Это основа способа синтеза стабильных липосом способных не обмениваться содержимим с окружающим матриксом. Однако липосомы из фосфатидной кислоты легко подвержены Са-инициируемой агрегации с

последующим слиянием.[46] Липосомы, не несущие поверхностного заряда, поглощаются только за счет фагоцитоза, тогда как имеющие слабый отрицательный заряд способны сливаться с плазмалеммой. Предположительно, фагоцитоз незаряженных липосом инициируется их сорбцией не зависящей от поверхностного заряда их мембран, но завершается лишь при задержке или невозможности слияния.

Липосомы из нейтрального липида фосфатидилхолина не способны к слиянию с плазмолеммой. Присутствие в мембранах наряду с кислыми липидами незаряженного лецитина увеличивает необходимую для слияния концентрацию двухвалентных катионов кальция и существенно уменьшает скорость этого процесса. Присутствие в заряженной мембране холестерина весьма сильно замедляет слияние вплоть до полного ингибирования. Полярные амфифильные поверхностно активные молекулы (моноацилглицериды, ненасыщенные жирные кислоты,), а так же продукты перекисного окисления липидов, поликатионы (полилизин), алифатичаские углеводороды (декан), диметилсульфоксид также могут инициировать слияние.

Слияние начинается с предварительной агрегации везикул с последующим слипанием мембран. Слипание может сопровождаться множеством дополнительных процессов: высвобождением содержимого везикул во внешнюю среду, тепловыделением и дестабилизацией мембраны, которая может вызывать образование новых кохлеарных (внутри мембранных) структур и появление в среде обратных мицелл, содержащих «конические» липиды. Самой длительной стадией является агрегация везикул, слияние же происходит очень быстро. Слияния мембран неизбежно вызывает фазовый переходом, который может сопровождается тепловым эффектом. Частичное высвобождение содержимого везикул может сильно отставать во времени от слияния, при этом как правило высвобождается небольшая (5 —10%) часть содержимого. Собственно акт слияния состоит из нескольких стадий:

- Частичное - полуслияние;
- Полное слияние, завершающееся стабилизацией переходных структур;
- Формирование особых кохлеарных внутримембранных частиц;
- Самоемое главное - объединением внутренних объемов клеток и везикул.

При слиянии происходит снижение плотности отрицательного поверхностного заряда везикулы.

Увеличение ионной силы среды, снижение pH и введение поверхностно активных поликатионов в состав мембраны везикулы способствует сближению, контакту и, в конечном счете, слиянию мембран.

Повышение вязкости среды весьма важный фактор. Повышенная вязкость мешает сближению, но облегчает контакт и увеличивает вероятность слияния уже сближенных мембран.

Деформация плазмолеммы — один из важнейших факторов влияющих на слипание и слияние мембран. В зоне контакта происходит практически полная дегидратация полярных головок фосфолипидов билипидного слоя плазмолеммы. Некоторые двухвалентные катионы (кальций, магний и др.) облегчают и инициируют дегидратацию головки фосфолипидов. Это одна из важнейших функций ионов кальция в организме животных. Незаряженные полимеры могут как инициировать, так и ингибировать слияние. Например: полиэтиленгликоль индуциатор слияния везикул, а декстран вызывает лишь их агрегацию, но не слияние. Оба полимера связывают структурированную воду у поверхности билипидных слоев, однако затем, полиэтиленгликоль, в отличие от декстрана, внедряется в мембрану и вызывает образование структурных дефектов в билипидном слое, что облегчает слияние.

В случае слияния билипидных слоем плотный контакт мембран вызывает структурную перестройку слоев. Это приводит к образованию новых жидкокристаллических надмолекулярных структур сначала пенталаминарной,

а затем триламинарной диафрагмы. Она формируется в результате постепенного вытеснения двух лишних слоев мембран на периферию области контакта. Триламинарная структура представляет собой новый одинарный билипидный слой в зоне контакта, который образовался из двух сблизившихся и контактирующих бислоев. Образование триламинарной диафрагмы - универсальный процесс характерный для любого межмембранного взаимодействия при слиянии между собой мембран любого состава. Примечательно, что гидрофильная поверхность триламинарной структуры образуется не в результате взаимного проникновения двух бислоев. Для слияния необходимо, чтобы билипидные слои везикул в зоне контакта находились в жидком, или точнее в жидкокристаллическом состоянии. Избыток фосфолипидов в мембране тормозит слияние[47].

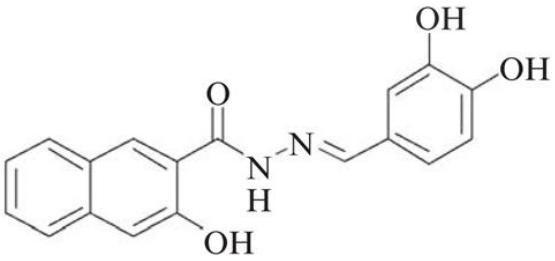
2.3.3. Ингибирование эндоцитоза.

Эндоцитоз регулируется сложным многопротеиновым липидно-белковым взаимодействием. Для каждого пути интернализации существуют как общие так и уникальные протеины, регулирующие конкретный путь. В литературе описано использование генетического (выбивание генов) и фармакологического ингибирования конкретных веществ, участвующих в эндоцитозе, для исследования их биологической роли и путей интернализации. Следует заметить, что фармакологическое ингибирование эндоцитарных путей имеет долгую историю и остается популярным в наши дни, несмотря на то, что общепринятые широко используемые ингибиторы конкретных путей интернализации не полностью специфичны [48].

Ингибиторы рецептор-опосредованного эндоцитоза

Рецептор-опосредованный эндоцитоз может быть разделен на два вида: на клатрин-зависимый и клатрин-независимый. Клатрин-зависмый эндоцитоз характеризуется образованием частично инвагинированной мембранной структуры с цитоплазматической поверхностью покрытой клатрином с выпуклой стороны. На второй стадии из них с помощью динамина образуются

везикулы покрытые клатрином с наружи [49]. Эндоцитарная активность плазматической мембраны возникает при образовании внутриклеточных везикул, что требует деления мембраны. Этот шаг контролируется динамином. Динамин представляет собой большую ГТФазу, которая обладает способностью олигомеризоваться на липидных мембранах. Наиболее подробно исследована роль динамина именно в клатрин опосредованном эндоцитозе , однако он также необходим для интернализации многих других лигандов, не содержащих клатрин [50]. Первый специфический ингибитор молекулярного динамина, названный «дайносор», был найден почти десять лет назад [51].



Дайносор

Он является относительно слабым ингибитором активности динамина и нацелен на ГТФазный фрагмент этого белка. Дайносор эффективно блокирует интернализацию классических лигандов поглощаемых за счет опосредованного клатрином эндоцитоза. К ним относятся трансферрин и рецептор липопротеинов низкой плотности. Блокирование поглощения связано с вмешательством в инвагинацию и деление везикул, покрытых клатрином [51]. Дайносор не является полностью специфичным ингибитором. Он ингибирует и другие пути интернализации, такие как кавеол-опосредованный эндоцитоз и пиноцитоз. Попытки улучшить активность и специфичность дайносора привели к созданию его полусинтетических производных ДД и Динго. Эти соединения блокируют поглощение трансферрина при весьма низких микромолярных концентрациях [52]. В дополнение к дайносору было найдено и несколько других химических ингибиторов динамина. Большинство из них являются неконкурентными

ингибиторами активности ГТФазы динамина, а ингибитор называемый MiTMAB связывается с белком плекстрином, тем самым блокируя взаимодействие динамина с мембранными фосфолипидами [53]. Несмотря на распространенное мнение, что фармакологические ингибиторы динамина являются селективными инструментами для прерывания мембранного деления, данные, полученные с этими соединениями, следует рассматривать с осторожностью.

Ингибиторы эндосомальной миграции

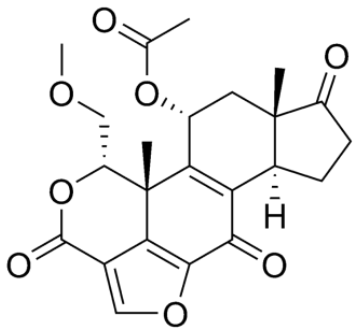
Двунаправленная миграция из плазматической мембраны включает доставку грузов в различные эндосомальные популяции, которые служат в качестве центров обработки, определяющих конечные пункты транспортируемых молекул. Например, рециркулирующие эндосомы необходимы для доставки интернализованных белков обратно на поверхность клетки, а также для энтероградного перемещения везикулами различных веществ в плазматическую мембрану [54]. Поздние эндосомы опосредуют ретроградный перенос белков, предназначенных для лизосомальной деградации [55]. Кроме того, ретроградное перемещение из эндосомальных отделений в аппарат Гольджи имеет важное значение для возвращения важных ферментов, структурных и регуляторных белков, истощенных при экзоцитозе [56]. В нескольких исследованиях были описаны небольшие низкомолекулярные соединения, которые избирательно блокируют либо энтероградную, либо ретроградную передачу через эндосомы. Например, сульфонамидное соединение, 16D10, ингибирует рециркуляцию рецептора трансферрина, не затрагивая эндоцитоз белка или трафик от ЭПР к аппарату Гольджи [57]. 16D10, по-видимому, имеет двойную функцию, и действует как ингибитор эндосомной V-АТФазы и прямого протонного ионофора, приводящую к увеличению эндосомального pH.

Ретроградный путь через эндосомы в Гольджи и ЭПР недавно был нацелен на поиски маломолекулярных ингибиторов перемещения патогенов и токсичности [58]. Были обнаружены ряд ингибиторов ретроградного

эндосомального трафика с различной специфичностью. Одним из примечательных примеров являются так называемые ретро-соединения, которые блокируют перенос рицина и сигаподобных токсинов из ранних эндосом в транс-Гольджи, не затрагивая другие этапы перемещения или морфологию многих внутриклеточных органелл [59].

Ретросоединения характеризуются различными биологическими активностями, которые включают ингибирование клеточного проникновения вирус папилломы человека in vitro [60] и защиту мышей от летального воздействия рицина in vivo [59]. Интересно, что Ретро-1 влияет на внутриклеточное распределение экзогенно добавленных олигонуклеотидов и способствует их накоплению в ядре [61]. Это делает ретро-соединения привлекательными агентами для ядерной доставки фармакологических агентов. Небольшие молекулярные соединения (соединения 75 и 134) также ингибируют различные стадии ретроградного эндосомального переноса бактериальных токсинов [62]. Эти соединения задерживают холерный токсин и тормозят действие сига-токсинов в ранних эндосомах, блокируя их доставку в транс-Гольджи. Поскольку большинство ингибиторов ретроградного эндосомального трафика были обнаружены путем поиска специфических клеточных фенотипов, молекулярные мишени этих ингибиторов остаются неизвестными. Заметным исключением является YM201636, пиридофуропиримидиновое соединение, идентифицированное программой обнаружения лекарств, нацеленной на синтез фосфоинозитида [63]. Еще одним широко известным ингибитором эндоцитарной миграции является вортманнин, стероидный метаболит грибов Penicillium funiculosum, Talaromyces wortmannii. Вортманнин является селективным и необратимым ингибиторо фрсфатидилинозитол-3-киназ (PI3Ks), которые представляют собой группу ферментов, участвующих во внутриклеточной передачи сигналов. Этот сигнальный путь универсален для всех клеток. Он отвечает рост и апоптоз клеток, их пролиферацию и дифференцировку. Вортманнин имеет ингибирующую концентрацию in vitro (IC50) около 1.9 нМ, что делает

его более сильным ингибитором, чем LY294002, другим широко применяемым ингибитором PI3Ks [64].



Вортманнин

Вортманнин может ингибировать не только PI3Ks всех трех классов, но и другие известные ферменты, связанные с PI3Ks, такие как фосфатидилинозитол-4-киназы, миозиновую легкую цепную киназу (MLCK) и Митоген-активированную протеинкиназу (MAPK) в высоких концентрациях [65-67].

2.3.4. Влияние физико-химических свойств наночастиц в биологических исследованиях

Наличие границы раздела между наноразмерной частицей (НЧ) и биологическими системами подразумевает динамические физико-химические взаимодействия, кинетику и термодинамику обмена между поверхностью наноматериала и поверхностью биологической системы (белков, мембран, фосфолипидов, эндоцитных везикул, органелл, ДНК и биологических жидкостей).

При этом существенную роль играет возможность модификации наночастиц перед их взаимодействием с биологическими системами.

Наиболее важные результаты такой модификации включают повышенную стабильность и увеличенный период полувыведения, требуемое биораспределение, пассивное или активное нацеливание в требуемую патологическую зону, реагирование на местные физиологические возбудители, такие как изменения местного pH и/или температуры в

патологических областях, а также способность служить в качестве контрастных агентов для различных способов визуализации (гамма-сцинтиграфия, магнитно-резонансная томография, компьютерная томография, ультрасонография).

Нельзя с точностью оценить все взаимодействия, которые играют роль на границе раздела, но можно остановиться на некоторых, выполняющих основную роль. В данном случае она состоит из трех динамически взаимодействующих компонентов:

- поверхность НЧ, характеристики которой определяются ее физико-химическим составом;
- граница раздела твердое тело-жидкость и изменения которые происходят при взаимодействии частицы с компонентами окружающей среды;
- контактная зона границы раздела твердое тело - жидкость (Рис.8)

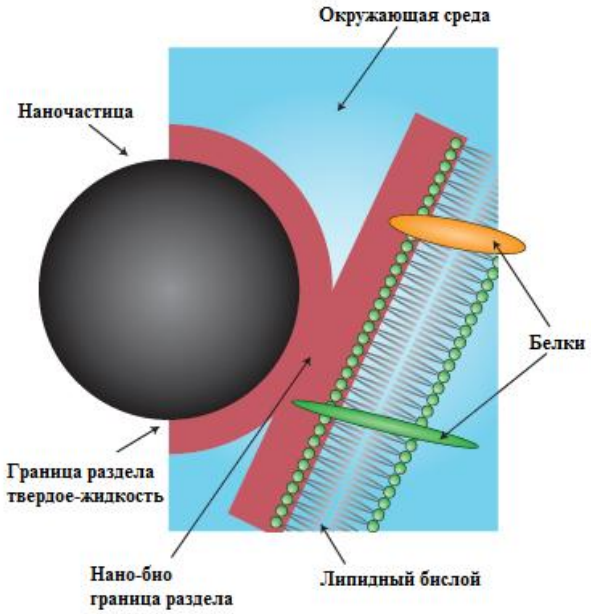


Рис.8 Представление о границах раздела между наночастицей и липидным бислоем.

Наиболее важными характеристиками наночастицы, которые определяют свойства ее поверхности являются: химический состав, наличие

функциональных групп на поверхности, её форма и гидрофобность/гидрофильность материала частицы [68].

Другие поддающиеся количественной оценке свойства, такие как эффективный поверхностный заряд (ζ-потенциал), агрегация частиц, состояние дисперсии определяются характеристиками суспензионных сред [68], включая ионную силу, pH, температуру и присутствие больших органических молекул [69]. Характеристики частиц вносят активный вклад во взаимодействие со средой посредством: (i) адсорбции ионов, белков, природных органических материалов; (ii) образование бислоя; (iii) растворение; или (iv) минимизация свободной поверхностной энергии путем поверхностной реструктуризации [70].

На первый взгляд взаимодействия между наночастицами и клетками, подчиняются тем же принципам, что и между коллоидными частицами. Классические общеизвестные виды физических сил: Ван-дер-Вальсовы (ВдВ), электростатические, сольватационные, сольвофобные имеют место однако не являются определяющими и для прогнозирования результата взаимодействия клеточной мембраны с частицей требуется учитывать множество физических, химических и биологических факторов [71]. Например, поскольку наночастицы содержат относительно немного атомов, силы ВдВ сильно зависят от их расположения на поверхности и стандартной функции объемной диэлектрической проницаемости [72].

Эта сложность значительно возрастает, когда речь заходит о границе раздела между наноматериалами и биологическими системами. Для примера рассмотрим взаимодействие между частицами SiO_2 и клеткой фибробластов.

Типичные взаимодействия между наночастицами окиси кремния друг с другом в воде связаны с ВдВ, электростатическими и сольватирующими силами [73]. В биологических жидкостях общая ионная сила обычно составляет около 150 мМ, что означает, что электростатические силы, скорее всего, будут экранированы в пределах нескольких нанометров от поверхности. Молекулы воды взаимодействуют с частицам с достаточной энергией для

образования на их поверхностях слоев, затрудняющих контакт компонентов системы. Таким образом, силы сольватации повышают стабильность частиц посредством «гидрофильного отталкивания». С другой стороны, быстрое обезвоживание и агрегация будут происходить, если относительное сродство двух взаимодействующих поверхностей к молекулам воды намного ниже, чем между самими молекулами воды - «гидрофобным притяжением» или «гидрофобным эффектом» [72].

Рассмотрим теперь пример частицы, взаимодействующей с клеткой фибробластов. Несмотря на то, что и в данном случае действуют силы, подобные описанным выше, существенные различия возникают при её приближении к поверхностности мембраны. Во-первых, клетка имеет эластичную совместимую мембрану, которая может деформироваться в результате текучести [71]. Это приводит к сложному набору взаимодействий.

Так, сложность возникает из-за гетерогенности поверхности клетки [74], где неоднородность заряда в значительной степени изменяет энергию взаимодействий даже между двумя «идеальными» частицами [75]. Клетки имеют поверхностную гетерогенность по шкале длин 10-50 нм из-за присутствия поверхностных белков и других структур.

Таким образом, микрометризованная частица, взаимодействующая с поверхностью клетки, будет испытывать усреднение энергетических уровней, охватывающих множество гетерогенных участков. Однако, если наночастица имеет размер 10-50 нм, то она может взаимодействовать с одним гомогенным участком мембраны клетки. Энергия взаимодействия будет сильно варьироваться в зависимости от ее точного местоположения и способности перемещаться по поверхности клетки. Кроме того, группы частиц могут образовывать агрегаты, которые будут демонстрировать свойства значительно отличающиеся от свойств изолированных частиц.

Следующая сложность возникает по причине того, что клетка не является пассивной системой. Транспортируя ионы и биологические молекулы, секретируя белки, она способна окружать поверхность частицы, превращая ее

в нечто очень отличное от поверхности, первоначально помещенной в систему.

Этот феномен вводит понятие зависимой от времени динамической границы раздела [76]. Возможность эндоцитоза увеличивает сложность этих взаимодействий, что затрудняет их теоретическое прогнозирование. Для фагоцитоза частиц были предприняты попытки моделировать влияние специфических рецептор-лигандных взаимодействий вместе с электростатическими силами, силами отталкивания и притяжения и ВдВ силами между поверхностью частицы и мембраны клеток фагоцитов [77].

Этот подход учитывает, что эти взаимодействия изменяются в экспериментальных условиях с учетом типов клеток, их стадий дифференциации, состава культуральной среды и путей клеточной обработки.

Тем не менее, размер и поверхностный заряд полимерных НЧ, являются физико-химическими переменными, которые регулируют клеточное поглощение. Так, положительный заряд НЧ может стать определяющим и вызвать повышенное поглощение, как и эндоцитозным путем, так и прямым проникновением, так как катионные поверхности НЧ могут взаимодействовать с анионными фофсфолипидами, белками и гликанами на поверхности клеток за счет сильных электростатических взаимодействий [78].

В работе [79] показан интересный эксперимент влияния размера и поверхностного заряда флуоресцентных, монодисперсных триблок-сополимерных НЧ на поглощение клетками через различные механизмы. Синтезированный полимерные НЧ на основе полиэтиленгликоль-полигексиленадипинат-полиэтиелнгликоль с двумя различными размерами (45-90 нм) и различными поверхностными зарядами (нейтральный (-4 мВ), положительный (+22 мВ), отрицательный (-19 мВ)) поглощались клетками NR8383 (макрофаги мышей) и Caco-2 (аденокорцинома толстой кишки человека). Было показано, что малые частицы с положительным зарядом поглощались быстрее, чем остальные.

С другой стороны в работе [80] исследовали полистирольные НЧ двух размеров 24 нм и 42 нм. Было показано, что частицы малого размера успешно интернализуются в клетки HeLa клатрин- и кавеолин- и холестерин-независимыми эндоцитозными путями и локализуются в околоядерном пространстве, избегая поглощения эндосомами и лизосомами, в то время как частицы большего размера (43 нм) в основном накапливаются в лизосомах.

Таким образом, продемонстрированы широкие возможности использования наночастиц в качестве носителей лекарственных препаратов.

Кроме того, обоснована важность исследования взаимодействия наночастиц с клетками как метода, позволяющего оптимизировать поступление биологически активного вещества, иммобилизованного в данные наночастицы в требуемые части клетки.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Одностадийный синтез амфифильных полимеров N-винилпирролидона

Гомополимеры и сополимеры N-винилпирролидона обладают уникальным лиофильно-лиофобным балансом, позволяющим им растворяться как во многих несмешивающихся с водой органических растворителях, так и в водных средах. Они широко используются как в качестве полимеров с собственной биологической активностью, так и в качестве носителей различных лекарственных средств [6].

Важной их особенностью является способность образовывать комплексы с многими классами БАВ. Они являются перспективными веществами для использования в генной терапии, так как способны формировать лабильные ионные связи с полинуклеотидами с вовлечением в реакцию остатков фосфорной кислоты, входящей в состав РНК и ДНК со слабой нуклеофильной пирролидоновой группировкой [81,82].

В специальных случаях при создании неионогенных поверхностно-активных веществ, необходимых компонентов наноразмерных носителей лекарственных средств, олигомеры поливинилпирролидона используют в качестве гидрофильного фрагмента, при этом наиболее широкое применение нашли два способа создания гидрофобной части молекул.

Первый заключается в сополимеризации N-винилпирролидона с гидрофобными мономерами с образованием блок-сополимеров, содержащих чередующиеся гидрофильные и гидрофобные блоки, расположенные вдоль основной цепи. Такие сополимеры образуют устойчивые ленгмюровские слои, однако малопригодны для создания систем способных к самоорганизации в мицеллы в растворе [83].

В настоящей работе использовали альтернативный подход, заключающийся во ведении гидрофобной концевой группы в гомополимеры поли-N-винилпирролидона при проведении полимеризации мономера в

присутствии передатчиков цепи, которыми могут являться меркаптаны или хлорангидриды алифатических кислот, содержащие длинные алифатические радикалы [84,85]. При этом образуется полимер, не содержащий последовательности гидрофильных и гидрофобных фрагментов в основной цепи. Молекулы содержат только один гидрофильный и один гидрофобный фрагменты, соединенные ковалентной связью. Это облегчает самоорганизацию макромолекул в мицеллы в водных средах, что было использовано при дальнейших синтезах наноразмерных носителей лекарств.

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

Для синтеза амфифильных сополимеров N-винилпирролидона использовали метод свободнорадикальной полимеризации в присутствии хлорангидридов жирных кислот либо меркаптанов нормального строения в качестве передатчиков цепи (Рис.9).

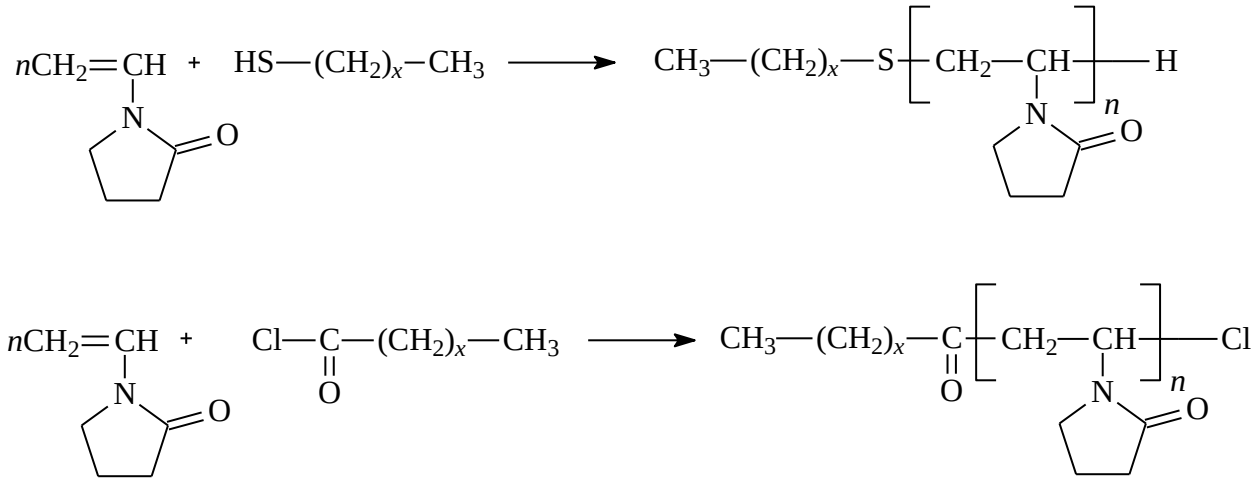


Рис.9. Схема радикальной полимеризации N-винилпирролидона в присутствии передатчика цепи.

Полимеризацию вели с использованием ДАК в качестве радикального инициатора и хлорангидриды лауриновой, пальметиновой, стеариновой и бехеноиновой кислот в качестве передатчиков цепи. Было показано, что полученные терминированные олигомеры способны к самоорганизации в

растворе с образованием наночастиц, имеющих имеющих форму близкую к сферической и средний размер в интервале 150-200 нм [84]. Частицы такого размера и формы можно использовать в качестве нанокорпускуллярных носителей лекарственных средств, однако в процессе синтеза образуется трудноразделимая смесь олигомеров с разной молекулярной массой и длиной цепи поливинилпирролидонового фрагмента молекулы. Это ни чуть не мешает образованию наночастиц, однако вносит неопределенность в скорость биодеградации и механизм выведения таких олигомеров из организма. Полученные частицы можно рекомендовать для использования в культурах клеток, но их применение в живых организмах требует дальнейшей тщательной оценки и длительных исследований механизмов выведения олигомеров из организма по окончании срока действия. Контроль молекулярной массы играет ключевую роль в механизмах выведения небиодеградирующих полимеров, к которым относятся большинство карбоцепных полимеров включая поли-N-винилпирролидон. Риск блокировки клубочковой фильтрации при внутривенном введении наночастиц требует тщательного контроля молекулярной массы образующихся эндкепированных сополимеров. Способ их синтеза с использованием хлорангидридов кислот не позволяет контролировать молекулярную массу олигомеров с достаточной надежностью. Это связано с недостаточно большой разницей активности взаимодействия мономера винилпирролидона и хлорангидрида с радикальным инициатором ДАК [85]. Поэтому в дальнейшем в работе использовали меркаптосоединения. Константа их активности в реакции с ДАК превышает на три порядка константу для поливинилпирролидона. Поэтому алифатические меркаптаны широко используются в процессах полимеризации в качестве агентов передачи цепи, позволяющих легко контролировать молекулярную массу, образующихся олигомеров[86-88]. В настоящей работе, на примере поли-N-винилпирролидона была продемонстрирована возможность использование этой реакции для введения необходимых концевых функциональных групп в образующиеся семителехелевые сополимеры [89].

Высокая реакционная способность меркаптанов в выше указанных радикальных процессах инициируемых динитрилом азобисизомасляной кислоты (ДАК) хорошо описана в ряде работ [90 - 92]. В них предложены условия реакции, при которых скорость взаимодействия продуктов распада радикального инициатора с меркаптаном значительно превышает скорость инициирования при взаимодействии с двойной связью непредельного мономера. В этих условиях фактическим инициатором полимеризации и передатчиком цепи является радикал меркаптан в соответствии со схемой, приведенной на рисунке 10.

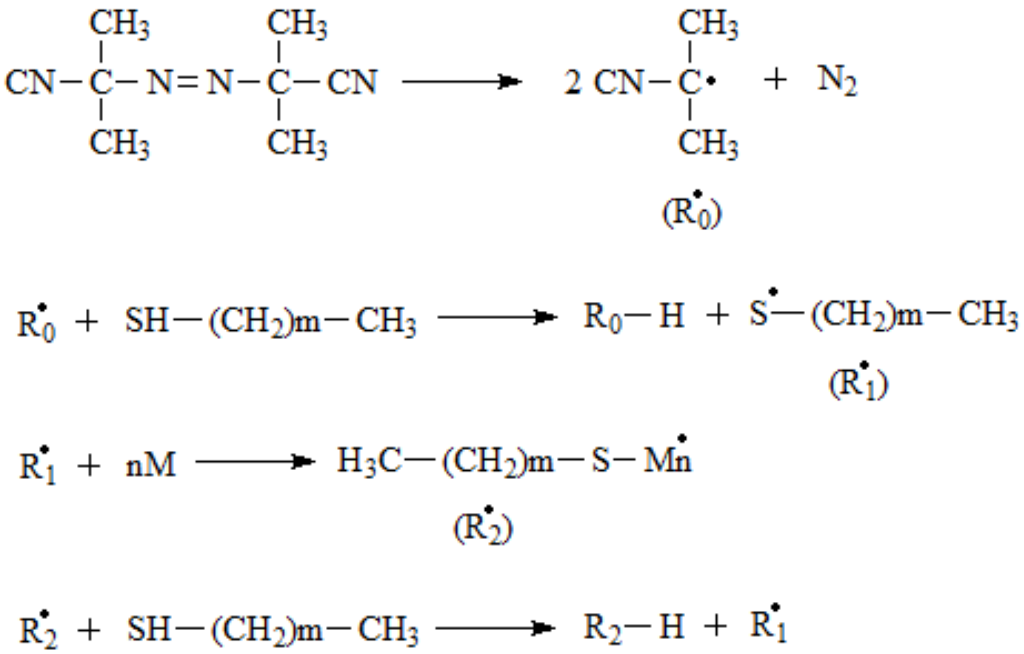
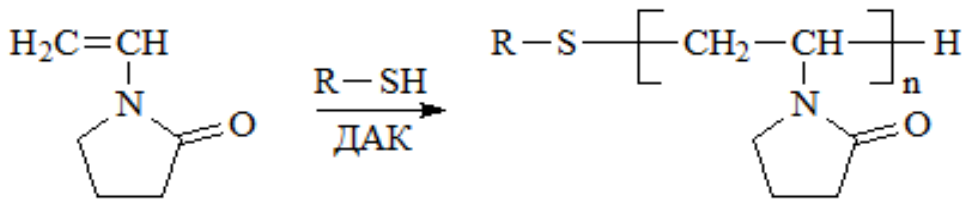


Рис.10. Механизм радикальной полимеризации в присутствии меркаптана

В этих условиях фактическим инициатором полимеризации и передатчиком цепи является радикал меркаптана. Одновременно меркаптан обрывает растущую полимерную цепь (Рис. 10).

Выбор амфифильного поливинилпирролидона (ПВП) в качестве основного полимера, формирующего мицеллы, связан с уникальностью его свойств, указанных выше. В работе были использованы три

длинноцепочечных меркаптана – децилмеркаптан, гексадецилмеркаптан и октадецилмеркаптан (Рис.11).



Где R = $C_{10}H_{21}$, $C_{16}H_{33}$, $C_{18}H_{37}$

Рис.11. Схема радикальной полимеризации N-винилпирролидона в присутствии передатчика цепи меркаптана.

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

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

Введение в реакцию длинноцепочечного октадецилмеркаптана в количестве 0,01 %мольн. позволяет получать высокомолекулярный полимер (Mn=40 кДа), в то время как использование более высокого мольного количества более короткого децилмеркаптана приводит к снижению молекулярной массы до 16 кДа (рис.12).

Гексадецилмекраптан занимает промежуточное положение и позволяет при низком количестве передатчика цепи получать полимер с молекулярной массой 20 кДа (рис.12). При увеличении содержания агента передачи цепи выше 1 %мольн. указанный выше эффект нивелируется. Наблюдаемый эффект указывает на диффузионный контроль взаимодействия между макрорадикалом роста и меркаптаном. Действительно, если концентрация меркаптана невелика, то существенную роль в скорости ограничения размера материальной цепи путем ее передачи должна играть скорость диффузии меркаптана внутрь макрорадикала. Очевидно, что с ростом молекулярной

массы меркаптана его коэффициенты диффузии должны убывать, что, по всей видимости, приводит к замедлению акта передачи цепи и снижению относительной константы передачи цепи на меркаптан с ростом его молекулярной массы.

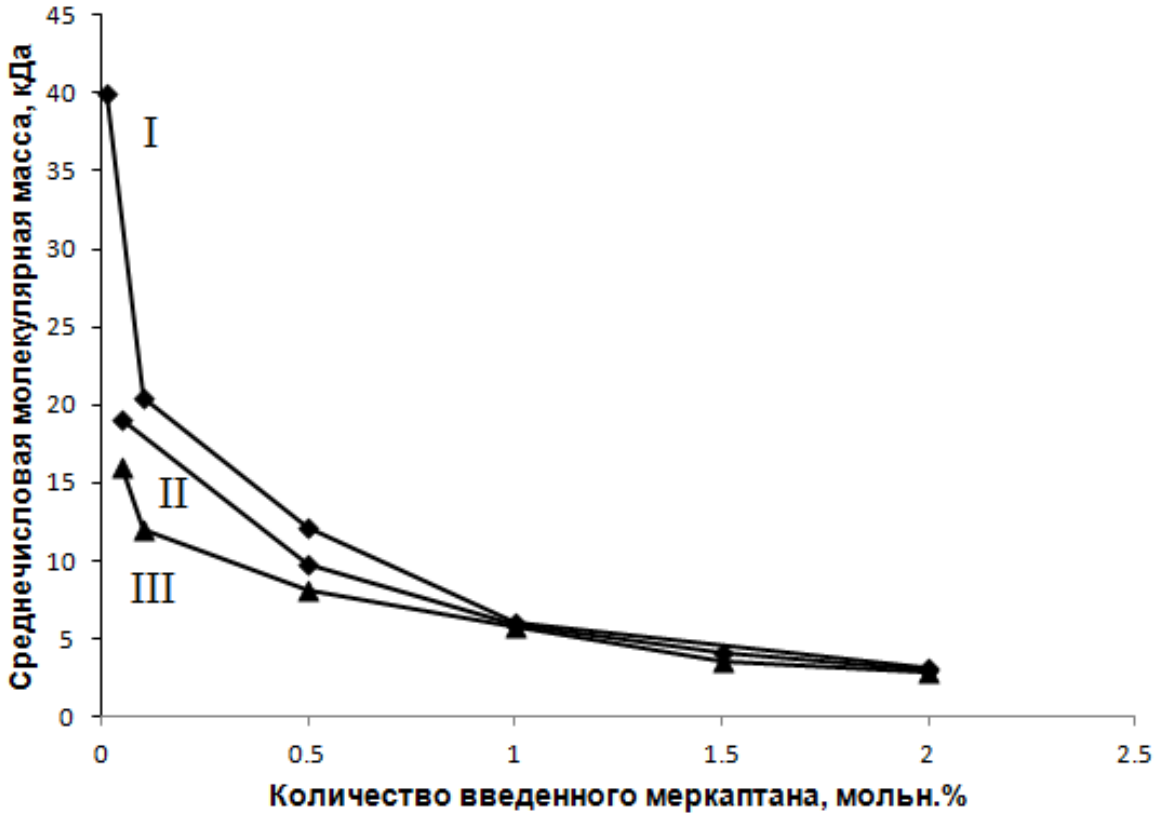


Рис.12. Зависимость среднечисловой молекулярной массы амфифильного поли-N-винилпирролидона от количества введенного в систему I - октадецилмеркаптана; II - гексадецилмеркаптана; III - децилмеркаптана.

С увеличением концентрации меркаптана в системе снижается длина радикалов роста взаимодействующих с меркаптаном, что способствует переходу реакции ограничения материальной цепи в кинетическую область и вырождению отмеченного эффекта.

3.3. Исследование строения синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона.

В таблице 1 представлены все синтезированные семителехелевые полимеры N-винилпирролидона содержащие длинный алифатический радикал ковалентно связанный с одним из концов макромолекул. То, что все полученные полимеры содержали только одну концевую функциональную группу подтверждено результатами измерения молекулярных масс двумя независимыми методами: обратным иодометрическим титрованием сульфидных функциональных групп и методом паровой осмометрии (таблица 1).

Таблица 1

Семителехелевые полимеры N-винилпирролидона

Mn* - среднечисловая молекулярная масса, определенная по концевым группам

Mn** - среднечисловая молекулярная масса, определенная, методом паровой осмометрии

Строение полимера	M_n^*	M_n^{**}
ПВП-S-$C_{10}H_{21}$	2800	2750
	3500	3400
	5700	5700
	8090	8150
	12000	11900
	16000	16200
ПВП-S-$C_{16}H_{33}$	3000	3100
	4060	4000
	5900	5850
	9800	9900
	19000	18950
ПВП-S-$C_{18}H_{37}$	1000	1100
	3100	3200
	6050	6000
	12100	12000
	20500	20550
	40000	40100

В ходе работы структура синтезированных амфифильных полимеров N-винилпирролидона была изучена методами ЯМР спектроскопии высокого разрешения на ядрах ^{13}C и ^{1}H и ИК спектроскопии с преобразованием Фурье.

На рис. 13 приведен ^{13}C-ЯМР спектр амфифильного полимера N-винилпирролидона с молекулярной массой M_n=6050, содержащего концевую гидрофобную октадецильную группу. Спектры сняты из раствора в ДМСО-d6, в котором полученные амфифильные полимеры не образуют мицелл.

Как видно, в спектре присутствуют сигналы карбонильных атомов углерода пирролидоновых циклов в области 174 м.д., CH_3-групп октадецильного конца - 14 м.д., углеродов метиленовых групп алифатического радикала - 29 м.д., а также углеродов четырех метиленовых групп пирролидонового кольца - 18,31,41,46 м.д. С другой стороны отсутствие сигналов в области химических сдвигов 120-130 м.д. говорит об отсутствии остатков нитрила изомасляной кислоты на конце цепи, в количествах превышающих чувствительность метода.

В протонном спектре полимеров также имеются триплет с химическим сдвигом 0,86 м.д. соответствующий сигналу метильной группы концевого тиоктадецильного фрагмента (Рис.14). Широкий сигнал с химическим сдвигом 1.23 м.д. метиленовых групп тиоктадецильной концевой группы, за исключением метиленовой группы соединенной непосредственно с атомом серы, триплет которой наблюдается в более слабом поле (2,57-2,62 м.д.). Оставшиеся сигналы относятся к протонам основной цепи и пирролидонового кольца, представляющим сложные сильно связанные спиновые системы типа $(A_2B)_n$ и $A_2B_2C_2$, соответственно и появляющиеся в области химических сдвигов 1,35- 4.0 м.д.

В ИК спектрах синтезированных амфифильных полимеров имеются все характеристические полосы поглощения типичные для поливинилпирролидонового и алкилмеркаптанового фрагментов (Рис.15) [93]. Отсутствие характеристических полос поглощения в области 2200 - 2260 $см^{-1}$

указывает на отсутствие нитрильной концевой группы. Очень сильная полоса валентных колебаний нитрильной группы является весьма характерной, дает узкий интенсивный сигнал, легко идентифицируется и обладает большой мольной экстинкцией. Наличие в макромолекуле концевой тиооктадецильной группы не может быть оценено количественно, так как она не имеет собственных характеристических сигналов в ИК спектре отличных от валентных и деформационных колебаний типичных для всех алифатических функциональных групп, включая основную цепь поливинилпирролидонового фрагмента [94].

Таким образом, методами ИК- и ЯМР-спектроскопии было подтверждено, что в условиях реакции не образуется определяемых количеств гомополимера ПВП, содержащего в качестве концевой группы остаток нитрила масляной кислоты. Все синтезированные продукты относятся к классу семителехелевых полимеров, содержащих только один алифатический радикал, ковалентно связанный сульфидной группой с концевой группой основой цепи ПВП.

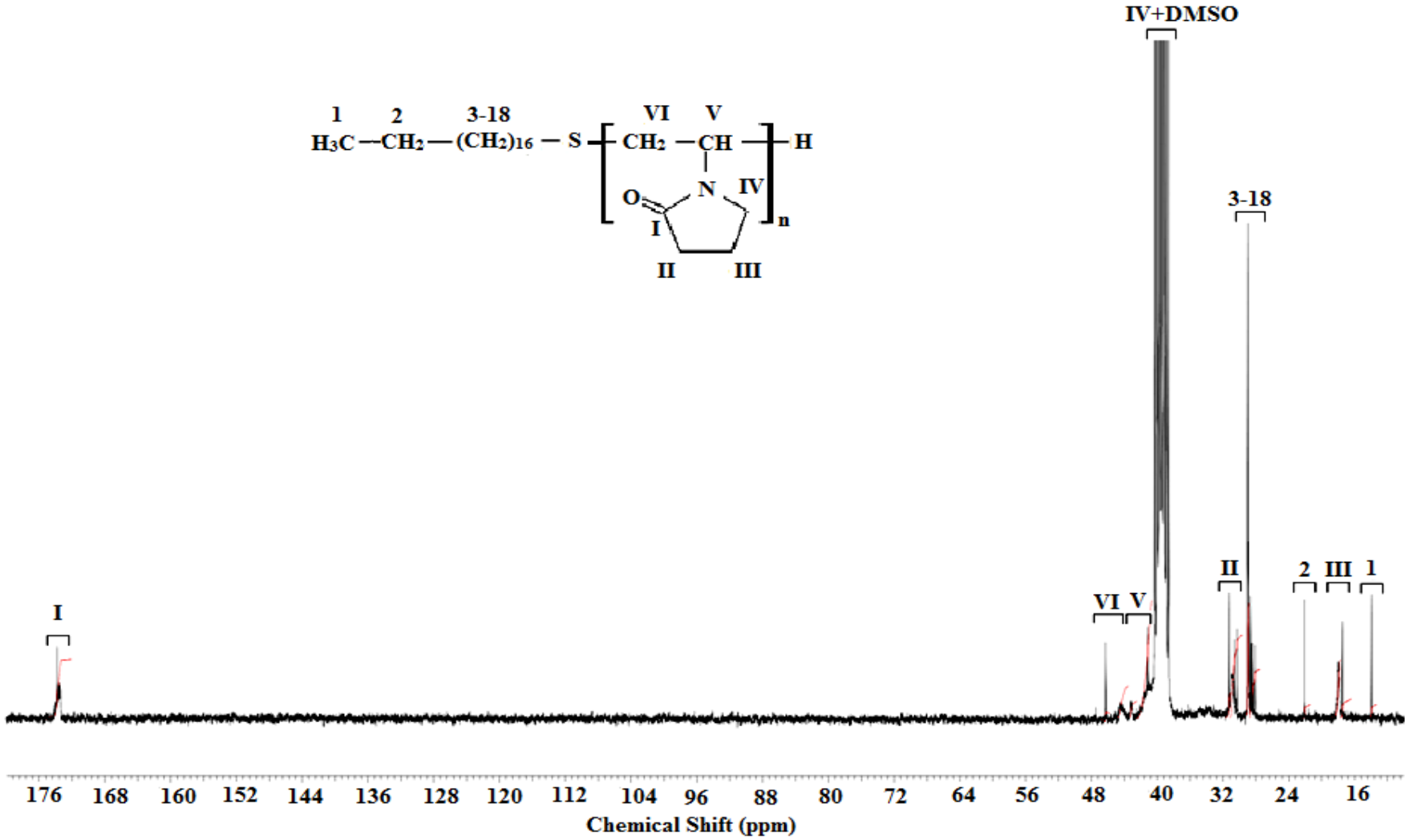


Рис. 13. ^{13}C-ЯМР спектр амфифильного полимера N-винилпирролидона с молекулярной массой M_n=6050, содержащего концевую гидрофобную октадецильную группу

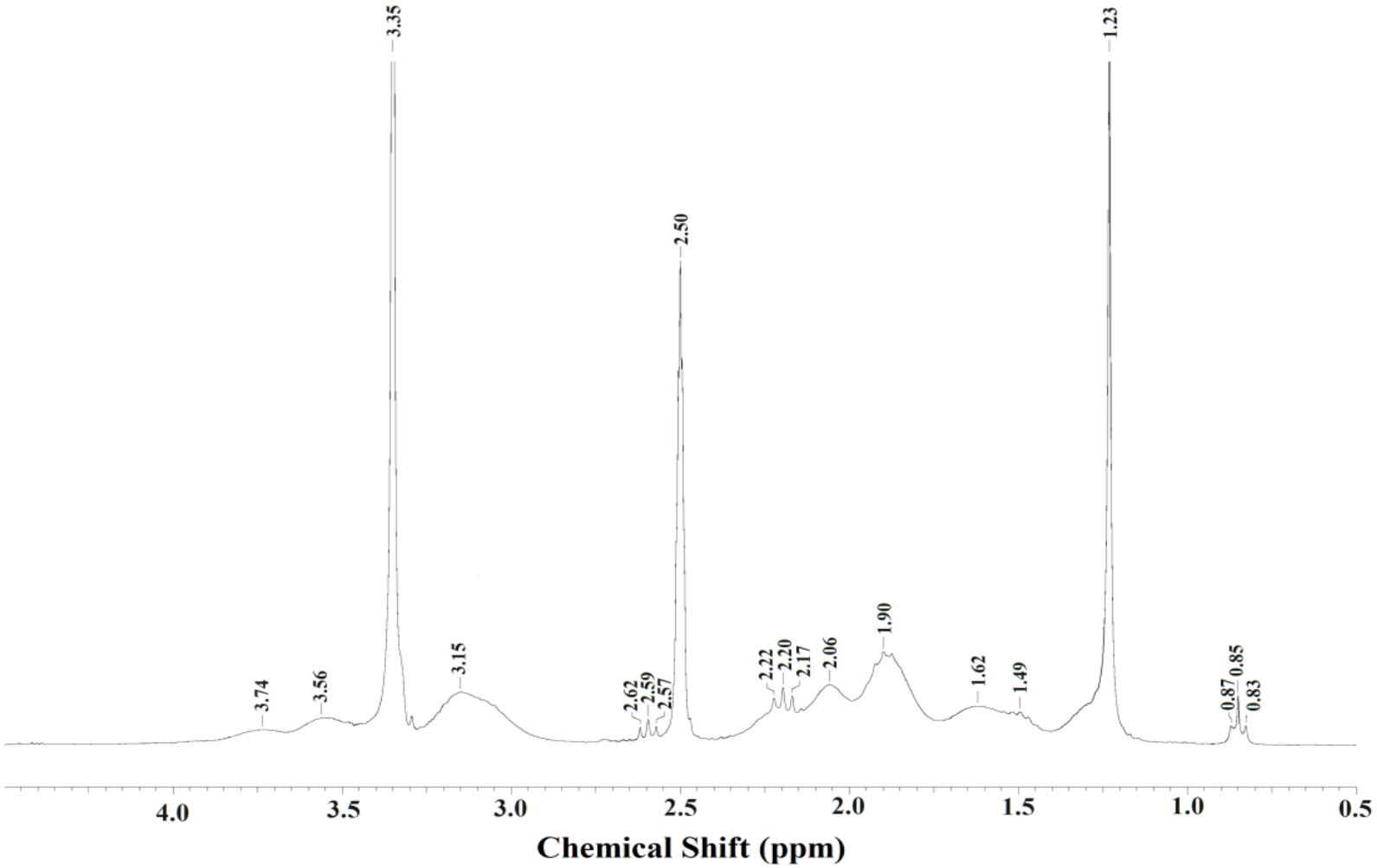


Рис 14. ^{1}H-ЯМР спектр амфифильного полимера N-винилпирролидона с молекулярной массой M_n=6050, содержащего концевую гидрофобную октадецильную группу

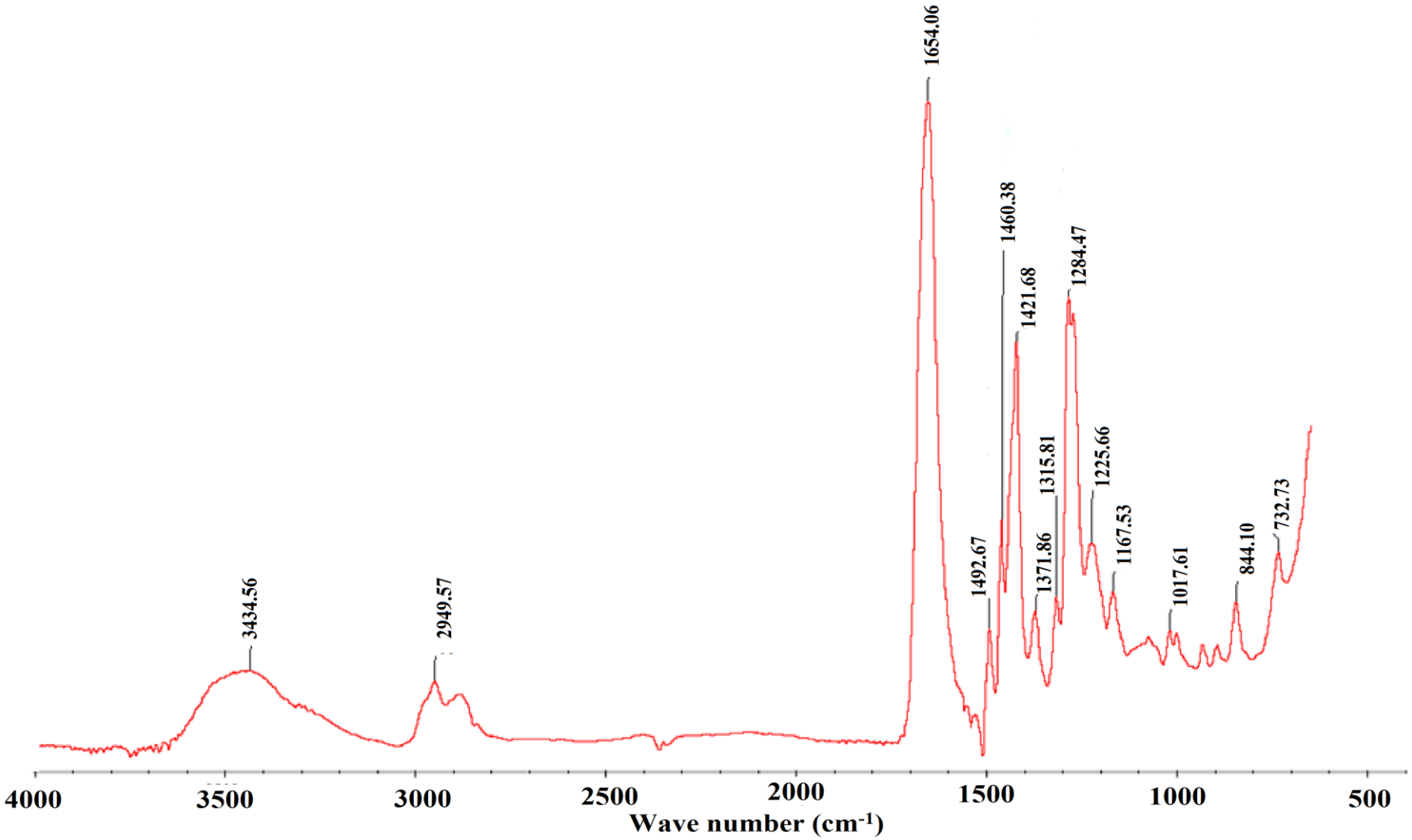


Рис. 15. ИК спектр амфифильного полимера N-винилпирролидона с молекулярной массой M_n=6050, содержащего концевую гидрофобную октадецильную группу

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

Полимеры являются семителехелевыми и содержат в каждой макромолекуле гидрофильный и гидрофобный фрагменты, соединенные ковалентно. В растворе при концентрации выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) они образуют агрегаты в виде мицеллярных структур в которых тиоалкильные радикалы ориентированы внутрь с образованием гидрофобного ядра, а гидрофильные фрагмент макромолекул ПВП ориентированы наружу с образованием гидрофильной оболочки.

Для определения ККМ синтезированных полимеров, были исследованы флуоресцентные спектры излучения ДФГТ в присутствии различных концентраций амфифильных полимеров. Метод основан на свойстве ДФГТ изменять спектр флуоресценции после включения внутрь мицелл. Он легко включается в гидрофобное ядро мицелл, где образует ассоциаты проявляющие интенсивную флуоресценцию. Благодаря низкой растворимости в воде, а также способности флуоресцировать только в ассоциированном состоянии внутри мицелл, это вещество используется в качестве свидетеля при определении ККМ широкого спектра поверхностно активных веществ.

На Рис. 16 представлен типичная зависимость интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации амфифильного полимера в растворе.

Данные определения ККМ полимеров с различным гидрофобным фрагментом и различной среднечисловой молекулярной массой представлены в таблице 2.

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

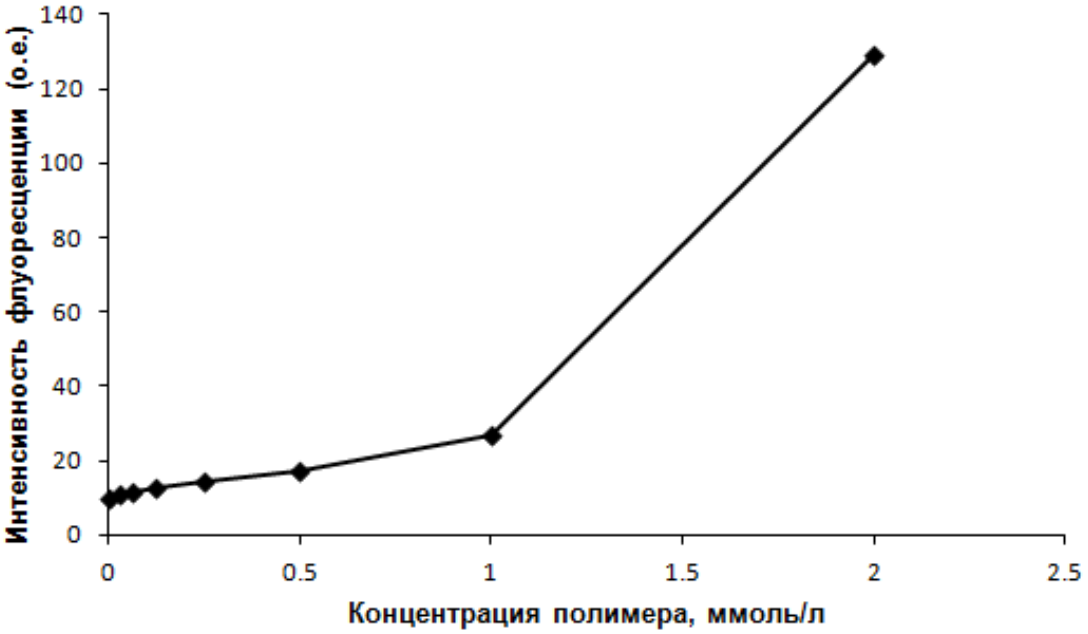


Рис. 16. Зависимость интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации амфифильного полимера (ПВП-ДО-3500) при 25°С.

Таблица 2.

Критическая концентрация мицелообразования семителехелевых полимеров N-винилпиролидона.

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

Так присутствие концевого тиооктадецильного радикала в полимере со среденечисловой молекулярной массой M_n=3,5 кДа позволяет получать продукт с ККМ = 0,054) ммоль/л, в то время как аналогичный продукт с тиогексадецильным терминальным заместителем имеет ККМ в 4 раза более

высокий (0,242 ммоль/л), а с тиодецильным в 20 раза выше (1,000 ммоль/л) (Рис.17).

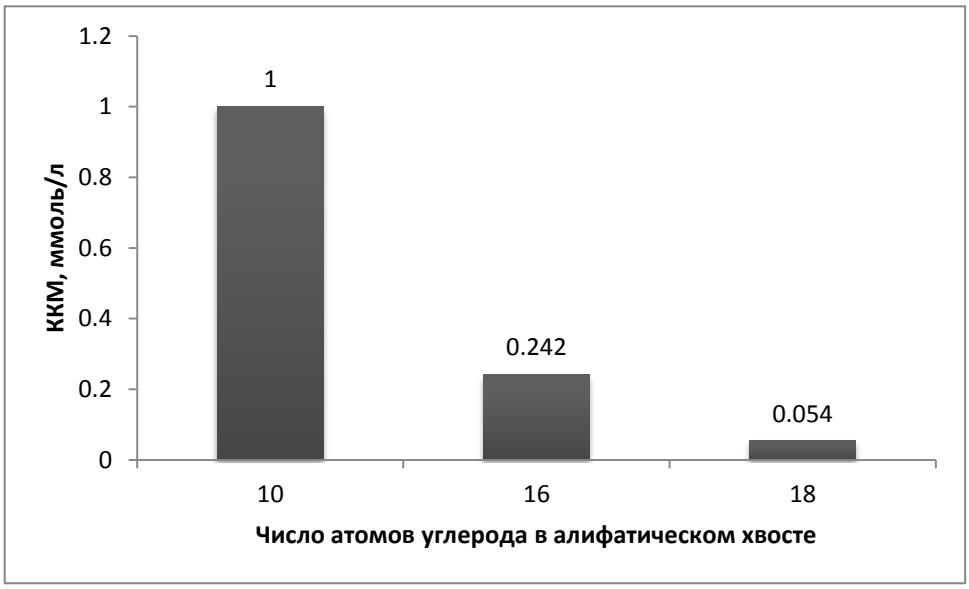


Рис.17. ККМ для образцов с различными терминальными группами (M_n=3500)

У всех исследованных образцов, независимо от длины тиоалифатического терминального радикала, ККМ возрастает с увеличением среднечисловой молекулярной массы поливинилпирролидонового фрагмента, однако зависимость носит сложный характер (Рис.18). Вплоть до M_n = 6 кДа критическая концентрация мицеллообразования линейно зависит от молекулярной массы, дальнейшее увеличение M_n приводит к более резкому возрастанию ККМ, на графике наблюдается перегиб, дальнейшее увеличение молекулярной массы вплоть до M_n= 40 кДа приводит к значительному возрастанию ККМ. Это указывает на резкое снижение способности к мицеллообразованию с увеличением молекулярной массы полимеров выше приблизительно 7,0 кДа.

Такой характер зависимости описан для полисахаридов, содержащих гидрофобные заместители в боковой цепи [95]. Это явление объясняется изменением характера межмолекулярного взаимодействия при увеличении молекулярной массы гидрофильной части полимера выше длины

кинетического сегмента, экранирования гидрофобных групп и затруднённому, вследствие этого, формированию мицелл [95].

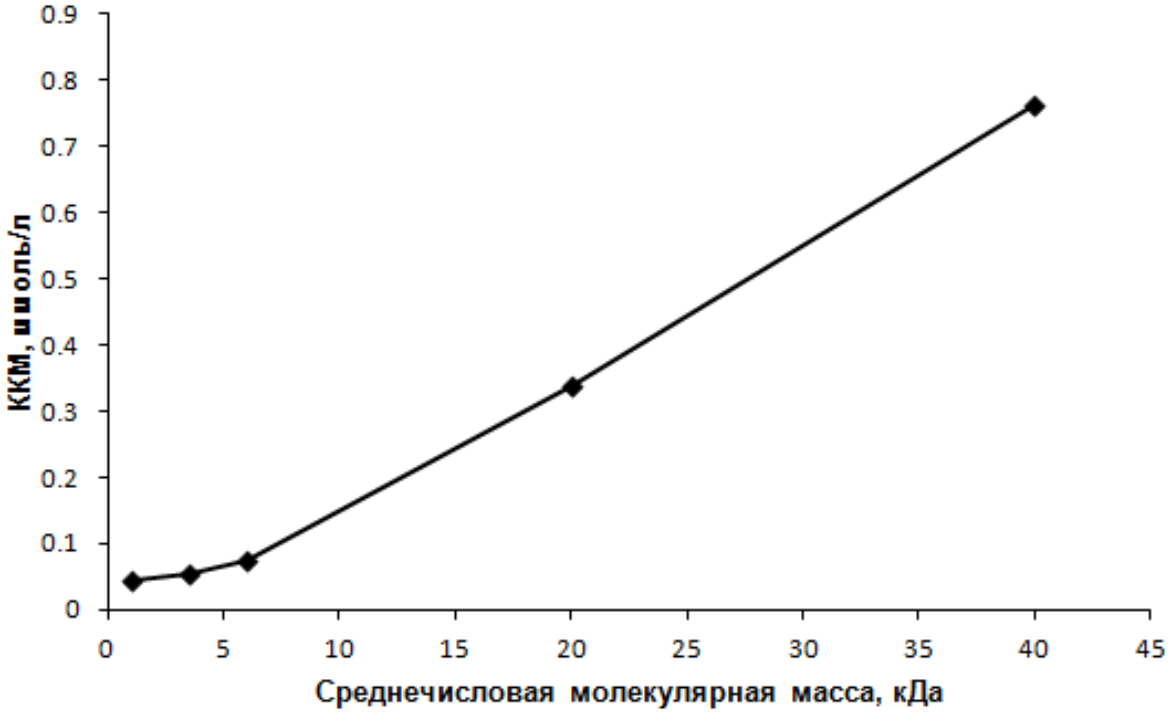


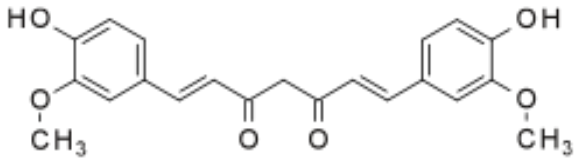
Рис.18. Зависимость ККМ амфифильных полимеров от их среднечисловой молекулярной массы (для полимера с концевой тиооктадецильной группой).

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

3.5. Получение мицелоподобных агрегатов на основе поли-N-винилпирролидона с концевой октадецильной группой

Наноразмерные мицелоподобные агрегаты для исследования их свойств в качестве носителя получали четырьмя способами: способом прямого растворения поверхностно активного полимера в воде (Р), суспензионным способом (С), эмульсионным способом (Э) и диализным способом (Д) с использованием полимеров различных молекулярных масс, которые указаны в названии полимера цифрой.

При этом в качестве иммобилизуемого вещества был использован куркумин – природный флуоресцентный краситель, впервые выделенный из корня куркумы:



Куркумин

Куркумин является полифенолом, окрашенным в желтый цвет, область поглощения λ_{max} =430 нм. Нерастворимый в водных средах куркумин является весьма удобным флуоресцентным маркером, позволяющим проводить гистологические исследования с использованием конофокальной микроскопии. Под действием возбуждающего света (λ=493 нм) он излучает фотоны с длинной волны λ = 517 нм, видимые в оранжевой части видимой области спектра.[96] Куркумин не токсичен и широко используется для визуализации различных биологических систем, включая живые клетки.

Кроме того он весьма распространен как безвредный желтый пищевой краситель и лекарственное вещество, обладает выраженным антиоксидантным и легким желчегонным действием, улучшает пищеварение, снижает холестерин и уровень сахара в крови, уменьшает риск возникновения онкологических заболеваний, снимает воспаление и боль при заболеваниях суставов, очищает и защищает печень от негативных факторов. Поэтому иммобилизация куркумина как лекарственного вещества имеет и некоторое самостоятельное значение.

Методом растворения получали только пустые частицы носителя, не содержащего модельное соединение внутри. В остальных случаях синтезировали мицеллы, содержащие иммобилизованный куркумин.

Эмульсионный и суспензионный методы отличались друг от друга применением различных типов дисперсионных сред, использованных для введения куркумина в раствор поверхностно активного полимера.

В обоих случаях диспергирование производилось при помощи ультразвукового дезинтегратора с частотой колебаний титанового индентора 22 кГц и амлитудой 0,1 мм, однако в случае эмульсионного метода применяли пару растворителей несмешивающихся друг с другом (хлороформ-вода), а в случае суспензионного - дисперсию куркумина в воде образующуюся при смешении двух неограниченно совместимых растворителей (ацетон-вода).

При использовании *диализного метода* частицы носителя наполненные куркумином образовывались в процессе изменения состава дисперсионной среды, происходящего при диализе смеси двух растворителей в которых куркумин первоначально находится в виде истинного раствора.

В процессе диализа против воды куркумин выпадает из раствора в смеси вода-ДМСО-куркумин-амфифильный полимер в виде тонкой коллоидной дисперсии, в которой на поверхности частиц имеется монослой адсорбированного полимера, обладающего поверхностной активностью.

3.6. Выявление основных физических характеристик наночастиц.

Основными характеристиками наноразмерных носителей являются их размер, форма и заряд внешней поверхности (ζ-потенциал) [97].

В работе использовали три независимых способа определения и визуализации этих основных характеристик. Основным использованным методом являлся *анализ траекторий наночастиц в растворе* (NTA). Этот метод является третьим поколением методов анализа размеров и формы наночастиц.

Он обладает рядом весьма существенных преимуществ перед использовавшимися ранее методами, основанными на динамическом светорассеянии и лазерном доплеровском светорассеянии. Метод NTA позволяет определять все характеристики, упомянутые ранее, а кроме этого

позволяет устанавливать распределение частиц по размерам и размер частиц наиболее часто встречающихся в образце.

Это позволяет отбросить все ошибки усреднения, исключить влияние единичных крупных частиц и бактериальных загрязнений, попавших в образец. При этом средний размер частиц образца, измеренный другими методами, может значительно отличаться от результатов полученных методом NTA. В некоторых случаях разница столь существенна, что один и тот же образец, измеренный разными методами, попадает в разные категории наноносителей.

Другой важной характеристикой наноразмерных носителей является *ζ-потенциал поверхности*, который может принимать значения от положительных (общий положительный заряд поверхности) до резко отрицательных (отрицательный заряд мицелл, сформированных из поверхностно-активных веществ анионного типа).

ζ-потенциал является ключевой характеристикой для частиц, взаимодействующих с мембраной живой клетки. В тех случаях, когда значение заряда носителя совпадает с отрицательным зарядом мембраны клетки и меньше его по модулю, возможно его проникновение сквозь биологические мембранные барьеры без нарушения их целостности. Во всех остальных случаях, когда потенциал клетки резко отличается от потенциала носителя проникновение возможно только путем рецептор-опосредованного, либо обычного фагоцитоза. Обычно ζ-потенциал живой клетки колеблется в пределах от -20 до -30 мВ.

Третьим важным способом исследования наноносителей являются основные виды микроскопии: просвечивающая (трасмиссионная, ТЭМ), конфокальная и атомно-силовая микроскопии, каждая из которых предназначена для визуализации основных физических и биологических свойств наноносителей, включая их форму и распределение по органеллам клетки.

В работе *трансмиссионную микроскопию* использовали для исследования размера и формы наноносителей в эксперименте, в котором излучение, падающее на образец, частично поглощается материалом носителя, а прошедший свет регистрируется.

Для калибровки был использован куркумин, поглощение света которым хорошо изучено. Метод хорошо подходит для исследования наноносителей диаметром более 50 нм. Главным его достоинством является возможность оценки не только размеров, но и формы наноносителей. Кроме того, он позволяет отличать полые носители (капсулы), от сплошных (частицы), и оценивать толщину их стенки.

Атомно-силовая микроскопия была использована для оценки формы и размеров наночастиц малого диаметра, имеющих средний диаметр меньше 50 нм. Метод предполагает предварительное высушивание частиц на поверхности подложки, в качестве которой используются мусковитовая слюда. Он уникален для работы с носителями малого и сверхмалого диаметра, однако стадия высушивания приводит к искажению изначальной формы и размеров носителя в сторону их уменьшения. Оценить этот эффект в количественных характеристиках не удается, поэтому способ следует рассматривать, как качественный, оценочный.

Конфокальная микроскопия была использована для оценки эффективности проникновения наноносителей в клетку с использованием различных биологических механизмов. Подробно метод описан в разделе 3.10. Исследования проникновения частиц в клеточные культуры проводили в условиях *in vitro*.

Фракционирование наноразмерных носителей по размеру осуществляли центрифугированием суспензий через центрифужные фильтры, отсекающие частицы размером менее 50 нм.

Важным параметром полученных носителей является их размер, что, как будет показано ниже, влияет на особенность их взаимодействия с живыми клетками.

Разделение наноразмерных носителей на группыы производили по их способности проникать внутрь тканей и клеток с использованием разных физиологических механизмов. Обычно изменение механизма проникновения связано с размером носителя и влечет резкое перераспределение доставляемого БАВ по органам и тканям [97].

К первой группе были отнесены носители с диаметром от 100 до 400 нм, которые могут поглощаться фагоцитирующими клетками ретикуло-эндотелиальной системы, но не способные проходить через стенки сосудов и биологические барьеры. Ко второй группе были отнесены носители с диаметром от 50 до 100 нм, проникающие внутрь ткани и поглощаемые большинством клеток по механизму фагоцитоза. К третьей группе были отнесены частицы диаметром менее 50 нм, которые поглощаются подавляющим большинством клеток, даже теми из них, которые не способны к активному эндоцитозу.

Рассмотрение характеристик полученных образцов, приведенных в таблице 3, показывает, что использованные методы получения частиц позволяют охватить все три отмеченные группы, что позволяет провести биологические исследования с учетом всех трех диапазонов.

При этом следует отметить, что при анализе характеристик частиц должен быть учтен не только средний гидродинамический диаметр, который традиционно используется в большинстве публикаций, а диаметр наибольшего количества частиц в системе, так как именно они определяют способность доставлять лекарства в те или иные органы. По результатам NTA диаметр большинства частиц (мода) более чем в 3,5 раза меньше среднего значения (328 нм) и составляет 88 нм.

3.7. Получение модельных пустых водонаполненных нанокакпсул методом прямого растворения

Метод прямого растворения был использован для оценки возможности получения мицелл наноразмерных носителей на основе амфифильных

полимеров винилпирролидона, содержащих одну концевую н-октадецильную группу и имеющих молекулярные массы от 1000 до 12000 Да. Результаты оценки их основных свойств в коллоидном состоянии представлены в табл 3.

Таблица 3

Основные характеристики ненаполненных водонаполненных наночастиц, полученных методом прямого растворения*

Код полимера	ККМ ммоль/л	Средний гидродинамический диаметр, нм	Мода, нм	ζ-потенциал, мВ
ПВП-ОД 1000	0.044	328	88	-2.06
ПВП-ОД 3500	0.054	163	33	-2.31
ПВП-ОД 6000	0.065	105	37	-2.81
ПВП-ОД 12000	0.087	46	21	-2.44

*См. приложение А

Как видно, полученные таким методом образцы имеют средний гидродинамический диаметр в пределах от 328 до 46 нм. Т.е. этими образцами могут быть охвачены все диапазоны частиц с точки зрения их взаимодействия с клетками.

Было выявлено, что молекулярная масса используемых полимеров мало влияет на ζ-потенциал, который находится в пределах от -2 до -3 мВ и мало отличается от ζ-потенциала плазмолеммы, который также имеет близкое отрицательное значение и может колебаться от -2 до -40 мВ в зависимости от типа клеток и состава конкретного участка мембраны. Чистые билипидные участки несут меньший по абсолютной величине отрицательный заряд по сравнению с участками насыщенными трансмембранными белками.

3.8. Получение частиц суспензионным методом.

Суспензионный способ получения наноразмерных носителей использовали для получения капсул наполненных куркумином в качестве

модельного БАВ, которое затем регистрировали в клетках и тканях методом флуоресцентной микроскопии.

В синтезах использовали образцы амфифильного ПВП с тиооктадецильной концевой группой и среднечисловой молекулярной массой от 1 до 12 кДа. (таблица 4)

Таблица 4

Основные характеристики наночастиц, полученных суспензионным методом*

ПВП-ОД-	Способ получения	Средний гидродинами-ческий диаметр, нм	Мода, нм	Содержание иммобили-зованного куркумина, % масс.	ζ-потенциал, мВ
ПВП-ОД 1000	Суспензия	160	89	6,1	-2.76
ПВП-ОД 3500	Суспензия	63	21	8,4	-3.47
ПВП-ОД 6000	Суспензия	73	30	8,5	-4.00
ПВП-ОД 12000	Суспензия	110	34	8,3	-4.32
ПВП-ОД 6000	Эмульсия	202	167	8,7	-4.00

*См. приложение А

Учитывая, что загрузка куркумина составляла 10 %масс. от массы полимера, степень включения БАВ в капсулы была достаточно высокой и достигала для последних образцов 94-97 %.

Способ предусматривает получение частиц в четыре стадии. На первой происходит смешение ацетонового раствора куркумина с водным раствором амфифильного ПВП при постоянном озвучивании на ультразвуковом дезинтеграторе в условиях описанных выше. При этом происходит высаживание куркумина из ацетонового раствора в водную дисперсионную среду с образованием наноразмерных твердых агрегатов, которые затем покрываются слоем полимера. На второй стадии в вакууме ацетон отгоняют из дисперсионной среды. Избыток куркумина отделяют центрифугированием. На четвертой стадии суспензию замораживают и воду удаляют лиофилизацией.

Основные свойства, размер, форму и ζ-потенциал частиц определяют после ресуспендирования полученных образцов в воде. Зависимость среднего размера частиц от молекулярной массы и ККМ, использованных полимеров носит сложный характер. При увеличении молекулярной массы размер сначала сокращается с 160 до 60 нм, а затем возрастает до 110 нм. Для повышения достоверности полученных результатов эксперименты повторили трижды, и во всех случаях зависимость носила идентичный характер.

Возрастание среднего размера можно объяснить агрегацией частиц, полученных из более высокомолекулярного амфифильного ПВП при ресуспендировании лиофилизованных образцов.

Способ позволяет получать все три типа полых наноносителей, поглощаемых, как за счет эндоцитоза, так и за счет слияния с клеткой, описанных выше. ζ-Потенциал полученных частиц мало отличается от модельных ненаполненных куркумином и находится в пределах от -2 до -4,5 мВ.

Полученные образцы дополнительно очищали от низкомолекулярных примесей полимера несвязанного с куркумином и частиц диаметром меньше 50 нм. Для этого использовали метод центрифугирования суспензии через полупроницаемую мембрану с пределом пропускания 30 кДа. В экспериментах использовались мицеллы, содержащие солюбилизированный куркумин, полученные с использованием амфифильного ПВП со среднечисловой молекулярной массой 6050 Да (ПВП-ОДМ-6000). Выделенная фракция с удаленными частицами малого диаметра имеет средний размер частиц 200 нм, при этом наиболее часто встречающийся размер (мода) составляет 170 нм. Эти частицы использовали в качестве носителей для модельного вещества куркумина с целью его доставки в клеточные культуры различных типов.

Форму полученных наноносителей изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ). Во всех случаях синтезированные частицы

имели форму близкую к сферической и сплошное непросвечивающее ядро. Наиболее типичная форма частиц представлена на Рис. 19.

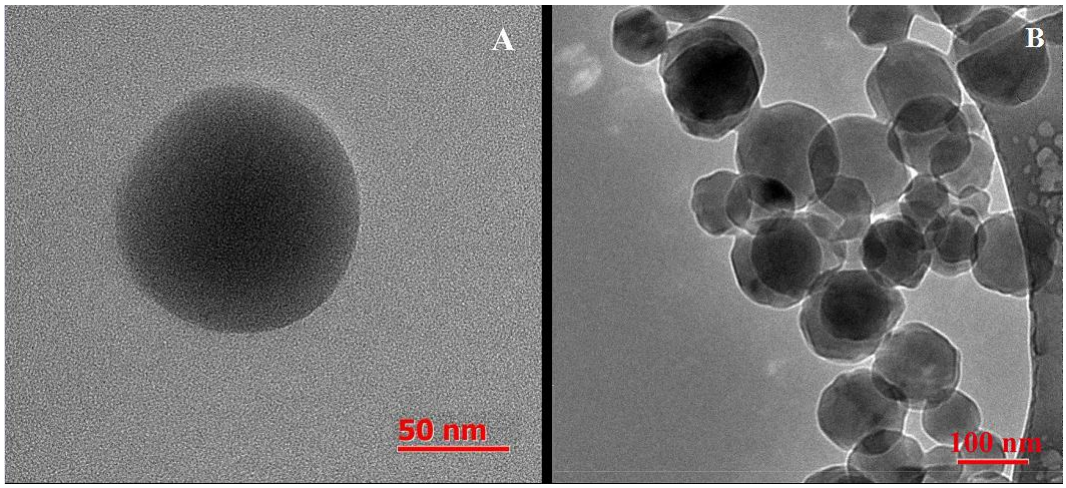


Рис 19. ТЭМ-микрофотографии наночастиц ПВП-ОД-6000, нагруженных куркумином, полученных суспензионным методом.

Определение размера частиц проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) после их нанесения на поверхность слюды, причем средние размеры, определяемые этим методом, несколько отличаются от приведенных выше, поскольку представляют собой не гидродинамический диаметр, а средний диаметр твердой высушенной частицы распластанной по поверхности слюды (Рис.20).

Средний диаметр частиц, полученный способом АСМ, составляет 100 нм. Главным достоинством метода является возможность отличить капсулы от сплошных частиц. На Рис. 20 представлен поперечный профиль частицы и наглядно показано, что она является сплошной. Полые частицы имеют бимодальную зависимость с существенной полостью внутри, а на микроскопии имеют торообразную форму.

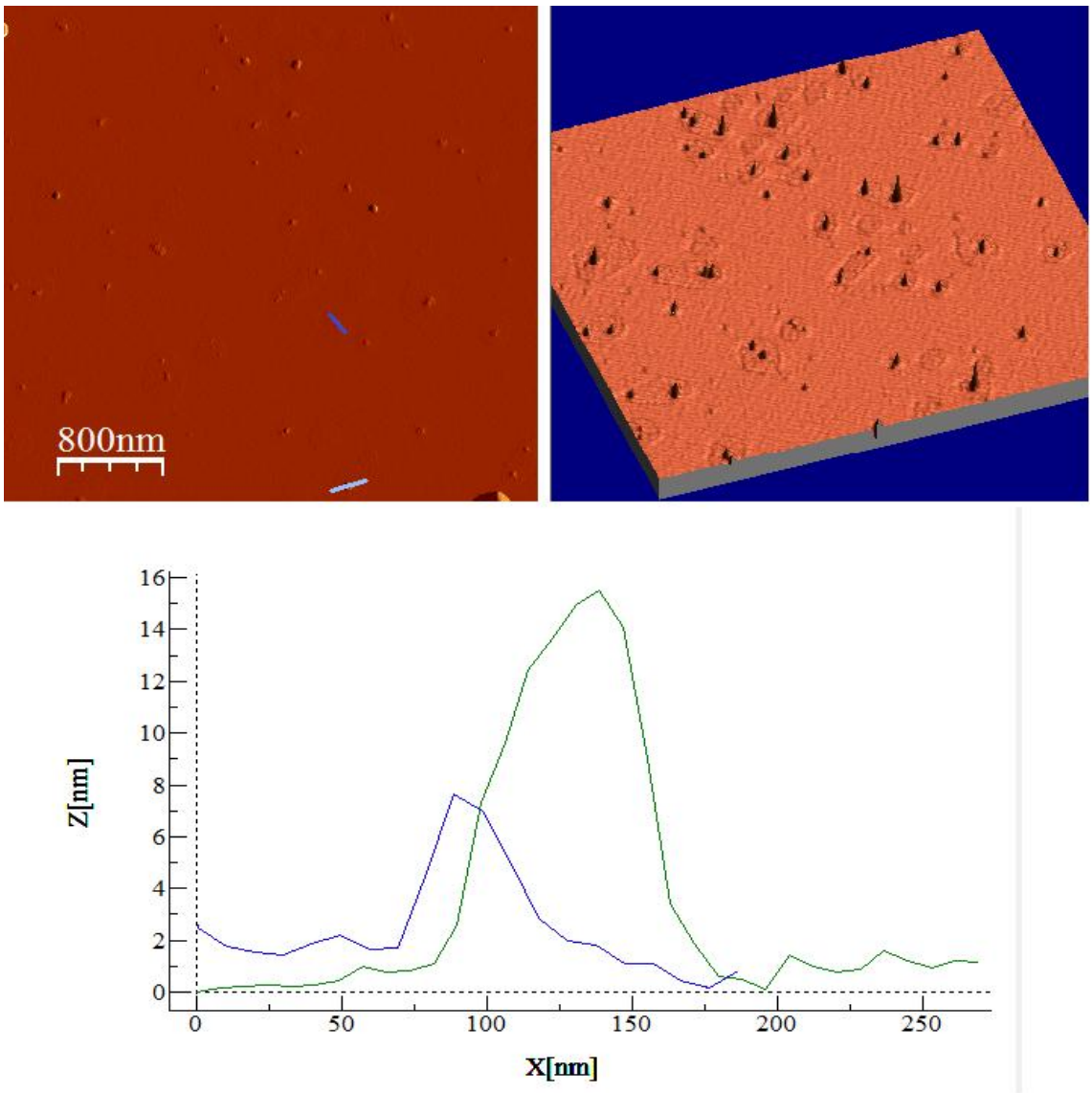


Рис. 20. АСМ-Микрофотографии частиц на основе ПВП-ОД-6000, нагруженных куркумином, полученных суспензионным методом: A- 2D изображение частиц; B - 3D изображение частиц; C - поперечный профиль (диаметр (X); высота (Z)).

3.9. Получение частиц диализным и эмульсионными методами.

Кроме выше указанных методов в работе использовали эмульсионный и диализный методы получения капсул наполненных твердым куркумином внутри. Оба метода не имеют существенных преимуществ перед описанными выше и являются вспомогательными (таблица 5).

Таблица 5

Основные характеристики частиц полученных диализным и эмульсионным методами*.

Код полимера	Способ получения	Средний гидродинами-ческий диаметр, нм	Мода, нм	Содержание иммобили-зованного куркумина, % мас	ζ-потенциал, мВ
ПВП-ОД 6000	Диализ	167	86	6,4	-4.22
ПВП-ОД 6000	Эмульсия	202	167	8,7	-4.00

*См. приложение А

Эмульсионный метод состоял из четырех стадий. На первой стадии, смешением водного раствора амфифильного ПВП с раствором куркумина в хлороформе получают эмульсию, которую обрабатывают ультразвуком с образованием двухфазной системы, содержащей дисперсную фазу - хлороформенный раствор куркумина в непрерывной водной фазе, содержащей амфифильный ПВП со среднечисленной молекулярной массой 6000 Да.

На второй стадии хлороформ отгоняют в вакууме с образованием суспензии куркумина в воде. На третьей стадии смесь замораживают, воду удаляют лиофилизацией. Все основные характеристики полученных капсул, заполненных твердым куркумином определяют после их ресуспендирования в воде. Средний гидродинамический диаметр частиц составлял 200 нм, мода - 167 нм. Частицы по размеру можно отнести к первой из отмеченных выше групп. ζ-Потенциал поверхности равен -4,00 мВ и не отличается от частиц полученных выше. По данным ТЭМ частицы имеют форму близкую к сферической и содержат твердое ядро (Рис. 21).

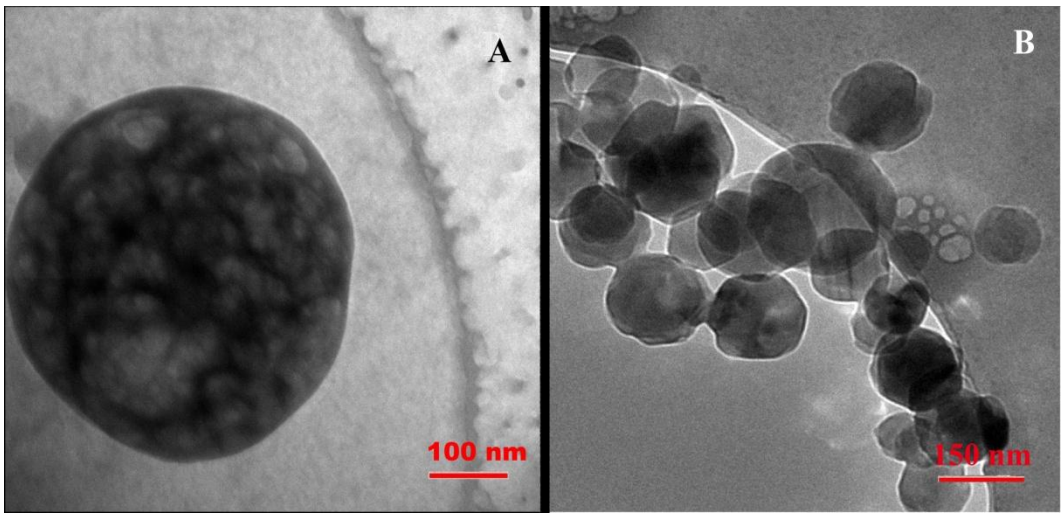


Рис.21. ТЭМ-микрофотографии наночастиц ПВП-ОД-6000, нагруженных куркумином, полученных эмульсионным методом.

Отсутствие полости в ядрах частиц было подтверждено методом АСМ (Рис. 22).

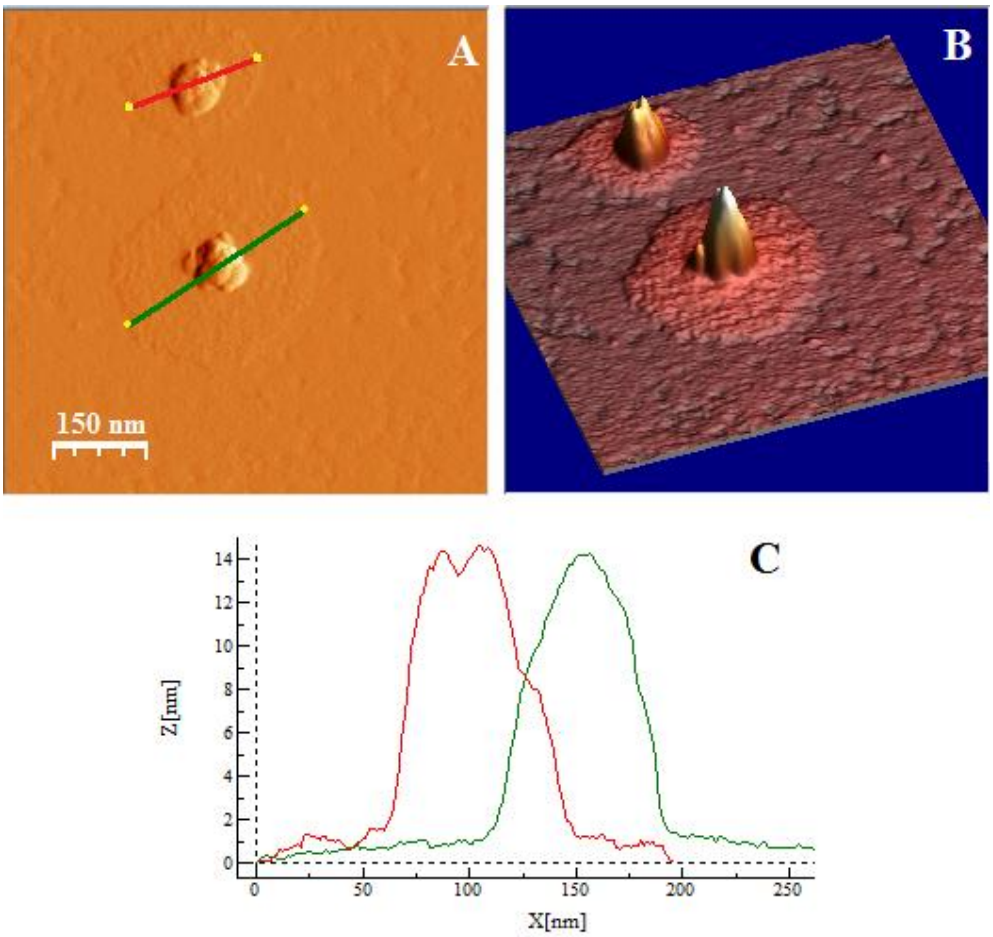


Рис. 22. Микрофотографии АСМ ПВП-ОД-6000, нагруженных куркумином, полученных эмульсионным методом: А- 2D изображение частиц; В - 3D изображение частиц; С - поперечный профиль (диаметр (X); высота (Z)).

Диализный метод предусматривает две стадии: на первой стадии получали совместный раствор куркумина и амфифильного ПВП в общем растворителе, которым является ДМСО. В работе использовали ПВП с молекулярной массой 6000 Да с одной концевой тиооктадецильной группой.

На второй стадии полученный раствор диализовали против воды в условиях исчерпывающего диализа (5-кратная смена воды за 5 суток). Образующуюся суспензию капсул наполненных куркумином лиофилизовали и определяли ее характеристики после ресуспендирования, как описано выше.

Следует отметить, что данный метод позволяет получать частицы, не содержащие фракций с гидродинамическим диаметром менее 50 нм, которые вероятно удаляются при диализе.

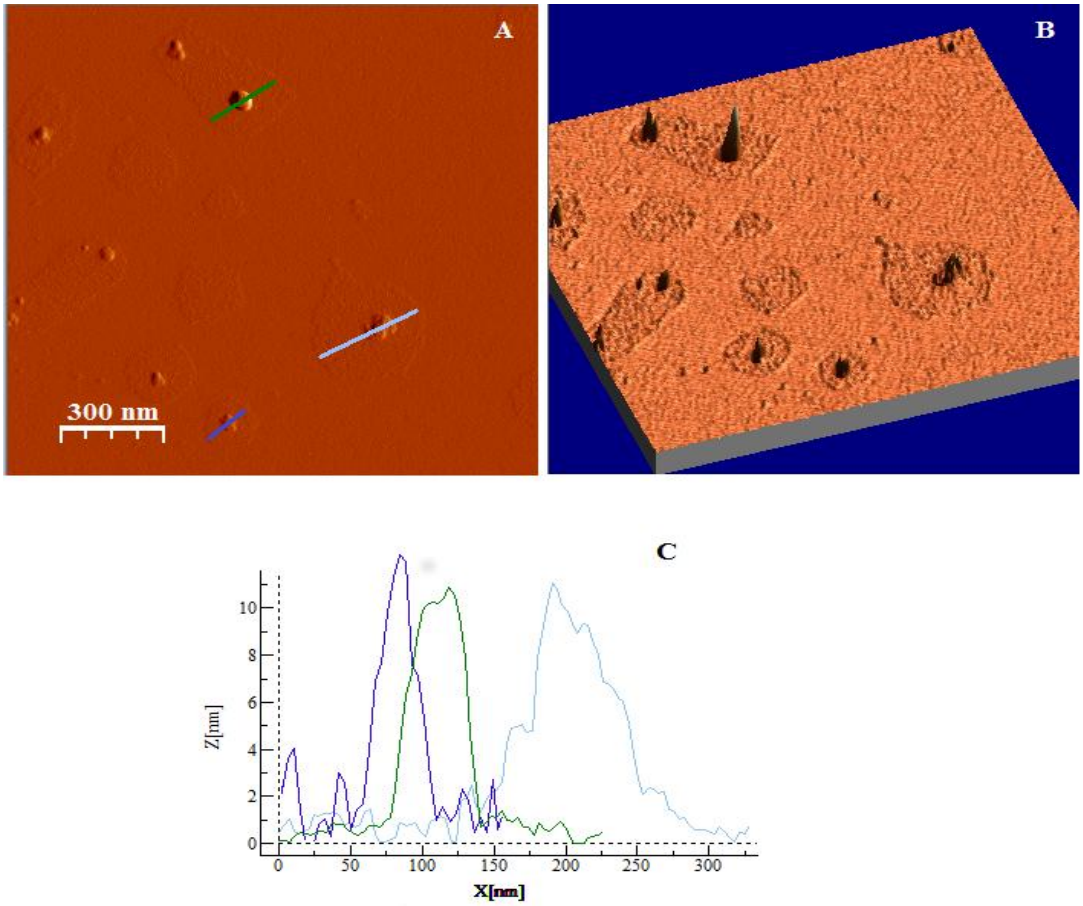


Рис. 23. Микрофотографии АСМ ПВП-ОД-6000, нагруженных куркумином, полученных диализным методом: A- 2D изображение частиц; B - 3D изображение частиц; C - поперечный профиль (диаметр (X); высота (Z)).

Средний размер полученных наноносителей по данным NTA приведен в таблице 5. Важной характеристикой этих частиц является отсутствие полых капсул с удаленным куркумином образование которых возможно при длительном диализе. По данным АСМ такие полые частицы в продукте присутствуют в небольшом количестве (Рис 23).

Образовавшиеся частицы имеют форму близкую к сферической и содержат твердую внутреннюю часть (Рис.24).

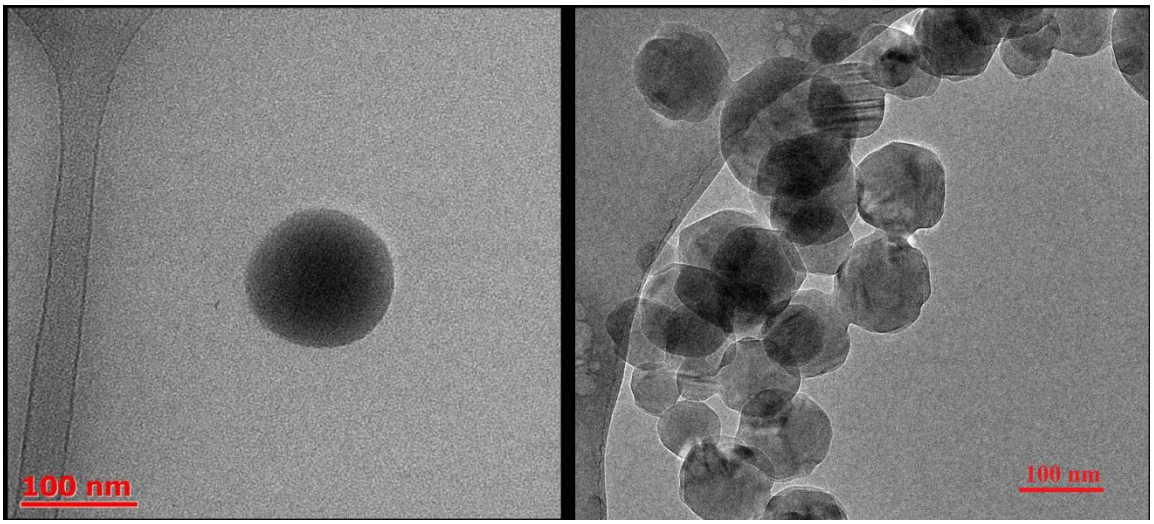


Рис. 24. ТЭМ микрофотографии наночастиц ПВП-ОД-6000, нагруженных куркумином, полученных диализным методом.

В результате проведенных исследований были отобраны носители, содержащие иммобилизованный куркумин для проведения дальнейших биологических испытаний in vitro с использованием культур клеток (Табл.6).

В дальнейшем исследовали следующие образцы:

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

Такой выбор образцов для биологических испытаний позволил во-первых выявить влияние размера частиц носителя на проникновение в клетку на примере образцов большого и малого диаметров, полученных одним и тем же способом (образцы Б и В) а во-вторых, исследовать влияет ли на проникновение в клетку способ получения частиц, когда они имеют практически идентичные характеристики (образцы А и В). Основные характеристики образцов отобранных для биологических испытаний приведены в таблице 6.

Таблица 6.

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

	Код полимера	Способ получения	Средний гидродинами-ческий диаметр, нм	Мода, нм	Содержание иммобили-зованного куркумина, % масс.	ζ-потенциал, мВ
А	ПВП-ОД 6000 (Табл.5)	Эмульсия	202	167	8,7	-4.00
Б	ПВП-ОД 6000 (Табл.4)	Суспензия	73	30	8,5	-4.00
В	ПВП-ОД 6000 Ц*	Суспензия	200	170	7,8	-

* Образец (Б) после ценрифугирования

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

Испытания *in vitro* проводили в Ольбургском университет, Дания (Aalborg University, Denmark). Клеточные культуры глиобластомы U87 и фибробластов человека CRL 2429 любезно предоставлены департаментом здравоохранения и науки, Ольбургского университета.

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

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

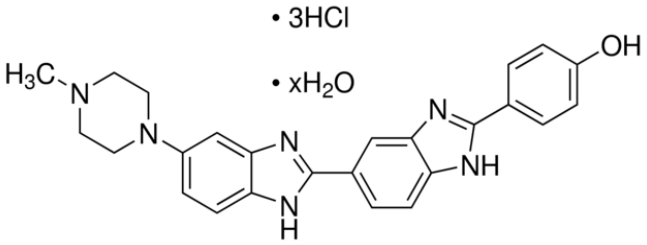
Вторая клеточная культура фибробластов человека CRL2429 напротив способна к интенсивному обычному фагоцитозу и не требует для поглощения частиц предварительной маркировки их поверхности белками. Однако в не меньшей степени эта культура способна поглощать маркированные частицы с использованием механизма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

Для того, чтобы разделить различные механизмы поглощения в работе использовали два ингибитора фагоцитоза:

Вортманнин - ингибитор рецепторно-опосредованного фагоцитоза, специфичекий ковалентный ингибитор клеточных фосфоинозитол-3-киназ (PI3Ks) блокирующий передачу внутриклеточного сигнала на расходование энергии по захвату частицы мембраной клетки [98] (Как отмечалось выше (стр.34, стр.36).

Дайносор - ингибитор любого динамин-зависимого эндоцитоза. Он предотвращает срезание эндоцитных везикул внутрь клетки [51].

В качестве ДНК-связывающей метки для определения относительной флуоресценции при конфокальной микроскопии использовали стандартный флуоресцентный краситель Hoechct 33258 [99]. Этот краситель проникает в клетку за счет пиноцитоза и образует флуоресцирующий комплекс с нуклеотидами ядра. Он широко используется для визуализации ядер как живых, так и фиксированных клеток в опытах на клеточных культурах. После окраски видимыми становятся только ДНК содержащие компартменты.



Hoechst 33258

Распределение куркумина по ядрам клеток анализировали путем расчета колокализации флуорофора [100] в каналах флуоресценции куркумина и Hoechst.

Эндоцитоз частиц большого диаметра А.

При использовании частиц большого диаметра А в обеих культурах клеток в отсутствии ингибиторов эндоцитоза наблюдалось медленное увеличение относительной флуоресценции куркумина во времени. Частицы поглощаются клетками и накапливаются в цитозоле. В клеточных культурах обработанных дайносором относительная флуоресценция оставалась постоянной. В этих условиях клетки обеих культур не поглощали и не накапливали частиц большого диаметра.

В присутствии вортманнина, который блокирует только рецептор-опосредованный эндоцитоз, в обеих культурах ингибирование не наблюдалось. При большом времени поглощения составляющим около 60 минут, хорошо виден токсический блокирующий эффект вортманнина одинаковый для обеих клеточных культур как для способной к рецепторно-опосредованному фагоцитозу, так и для неспособной.

Отсутствие эффекта ингибирования в этом эксперименте подтверждает отсутствие резкой иммуногенности амфифильных поливинилпирролидонов. Использованные наночастицы большого диаметра не абсорбируют белок в условиях эксперимента и не имеют на своей поверхности никаких специфических рецептор-направленных лигандов.

Вторым выводом является подтверждение обычного фагоцитарного механизма поглощения куркумин-нагруженных частиц большого диаметра, который блокируется в присутствии дайносора. (Рис.25).

Выявление мест накопления частиц внутри клетки проводили путем анализа колокализации куркумина и нуклеинового красителя (Hoechst), который в условиях эксперимента накапливается в ядре. Исследование с использованием конфокальной микроскопии показало, что два флуорофора (куркумин и Hotchst) локализованы в различных компартментнах без значительного перекрытия.

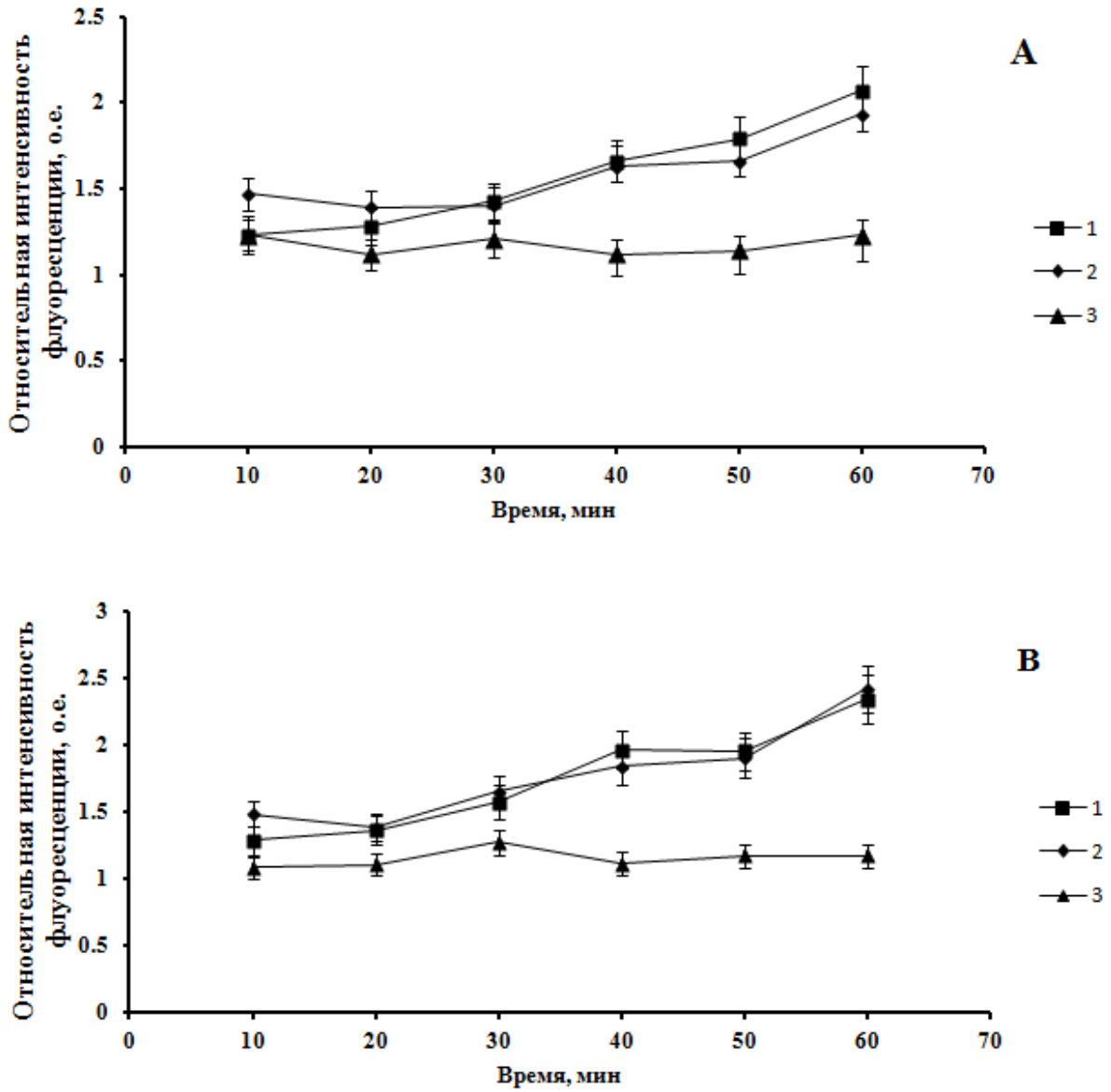


Рис. 25. In vitro динамика поглощения куркумин-нагруженных ПВП-ОД-6000 наноносителей (образец А), клетками U87 (А) и CRL 2429 (В): 1 – без ингибиторов эндоцитоза; 2- в присутствии вортманнина; 3 – в присутствии дайносора.

На 2D-гистограмме яркие пиксели в куркуминовом канале соответствуют темным в канале Hoechst и наоборот, что приводит к определенной прямоугольной форме гистограммы (Рис.26). Это подтверждает, что куркумин нагруженные наноносители большого диаметра А, главным образом, локализованы в цитоплазме и не проникают в ядро.

Совокупность полученных результатов говорит о том, что поглощение мицелл большого диаметра А, главным образом, протекает через динамин-зависимый эндоцитозный путь. Это также подтверждается наличием значительного количества куркумина во внутреннем цитозольном компартменте как клеток культур U87, так и CRL 2429. В то же время свечение в нуклеозоле в куркуминовом канале отсутствует, что свидетельствует об отсутствии проникновения наночастиц большого диаметра в ядро живых клеток (Рис.26).

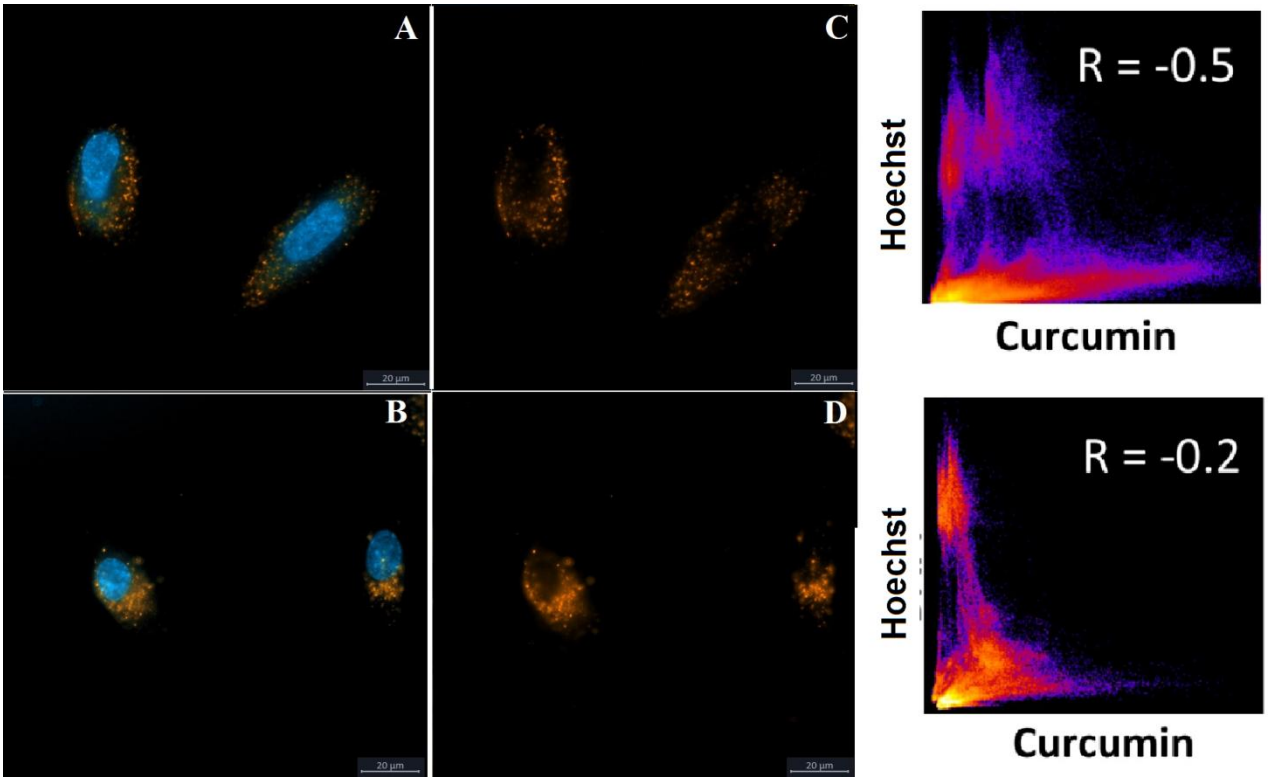


Рис. 26. Флуоресцентные фотографии, показывающие CRL 2429(A и C) и U 87 (B и D) клетки после инкубации с куркумин-нагруженным ПВП-ОД-6000 частицами (образец А). 2D - гистограмма показывает колокализацию флуорофоров в куркуминовом (517 нм, оранжевый) и Hoechst (465 нм, голубой) флуоресцентных каналах и соответствующие значения коэффициента корреляции Пирсона R.

Эндоцитоз частиц малого диаметра Б.

Изучение проникновения куркумин нагруженных наночастиц малого диаметра в живые клетки проводили в тех же условиях, что и частиц А. Использовали носители Б со средним диаметром 105 нм (Табл. 6).

В отличие от частиц большого диаметра в идентичных условиях эксперимента куркумин в мицеллах малого диаметра поглощается клетками обеих клеточных линий U87 и CRL 2429 с примерно одинаковой скоростью. Причем процесс не зависел от наличия в среде ингибиторов (Рис.27). Кроме того, максимум относительной флуоресценции достигается очень быстро, в течение 5 минут для обеих клеточных культур как в присутствии дайносора, так и вортманнина. После поглощения носителя куркумин гомогенно распределялся по всей клетке, включая ядро. Не обнаружено значимого снижения интенсивности флуоресценции в куркуминовом канале в ядре по сравнению с другими компартментами клетки. (Рис. 28) Включение куркумина в ядро клеточных культур U87 и CRL2429 также можно увидеть на 3D фотографиях (Рис. 29).

Этот вывод подтверждается также анализом колокализации куркумина и красителя Hoechst, показывающим частичное перекрытие каналов флуоресценции куркумина и нуклеинового красителя для клеточных культур CRL 2429 и U87. Куркумин присутствует в клеточном компартменте отличном от ядра, также в ядре имеется значительная популяция пикселей с высокой интенсивностью, как куркумина, так и нуклеинового красителя (Рис.28).

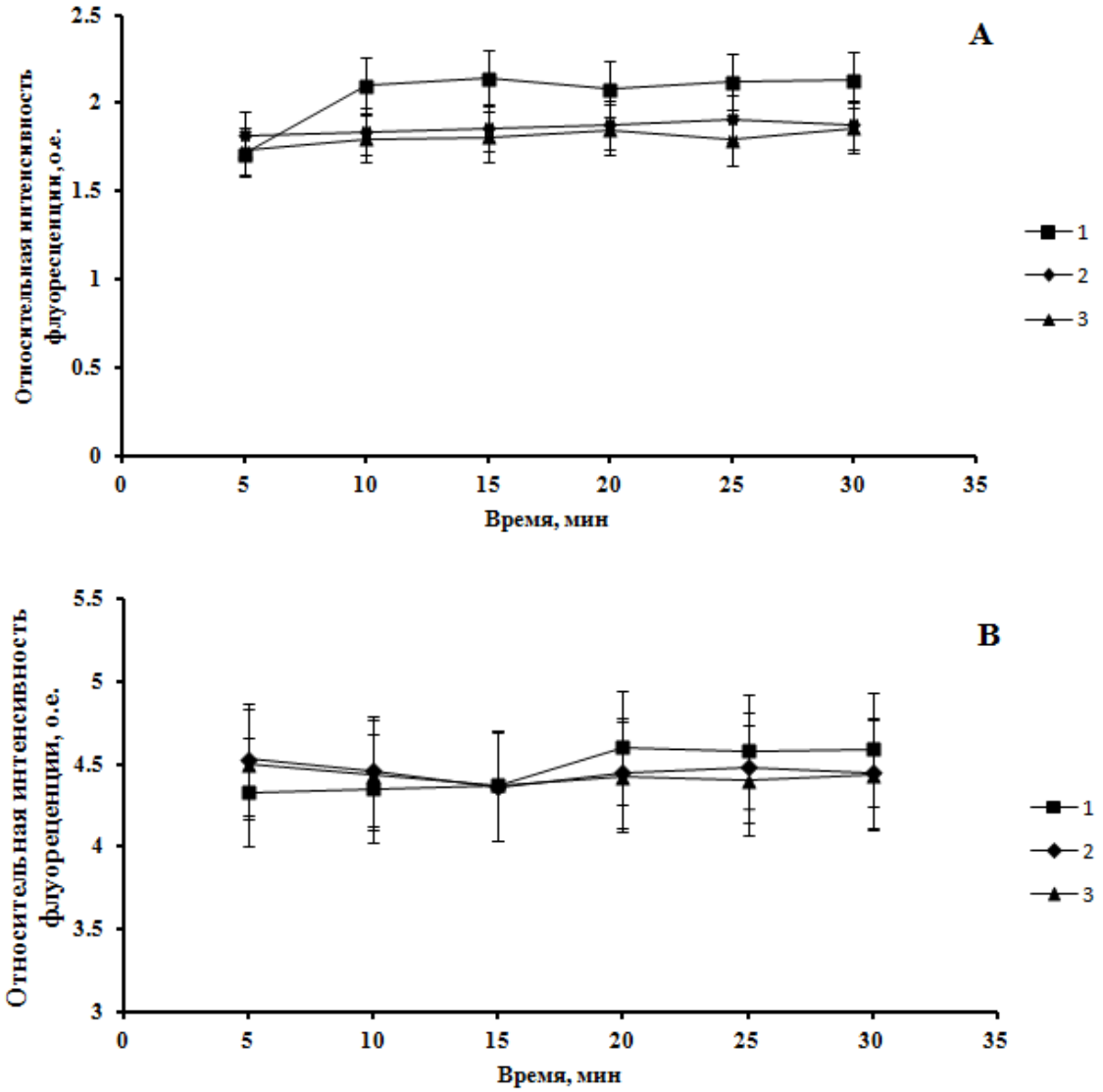


Рис. 27. In vitro динамика поглощения куркумин-нагруженных ПВП-ОД-6000 наноносителей (образец Б) клетками U87 (А) и CRL 2429 (В): 1 – без ингибиторов эндоцитоза; 2- в присутствии вортманнина; 3- в присутствии дайносора.

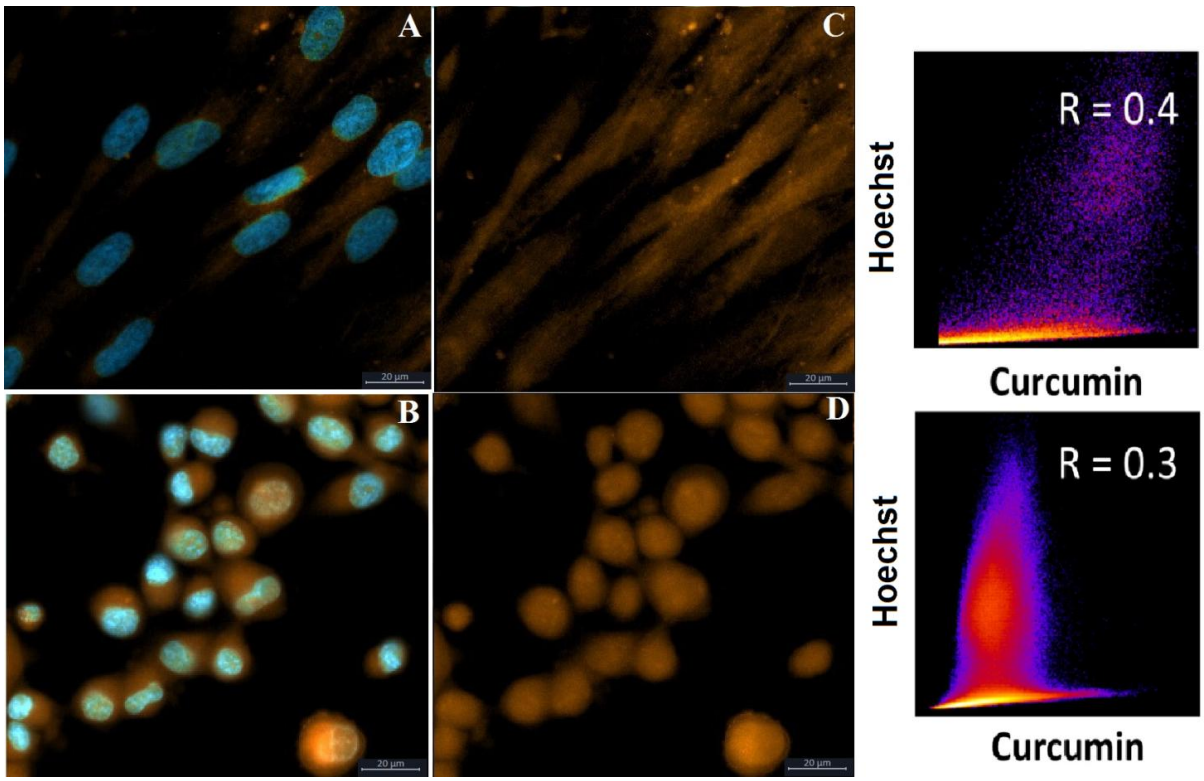


Рис. 28. Флуоресцентные фотографии, показывающие CRL 2429(A и C) и U87 (B и D) клетки после инкубации с куркумин-нагруженным ПВП-ОД-6000 частицами (образец Б). 2D - гистограмма показывает колокализацию флуорофоров в куркуминовом (517 нм, оранжевый) и Hoechst (465 нм, голубой) флуоресцентных каналах и соответствующие значения коэффициента корреляции Пирсона R.

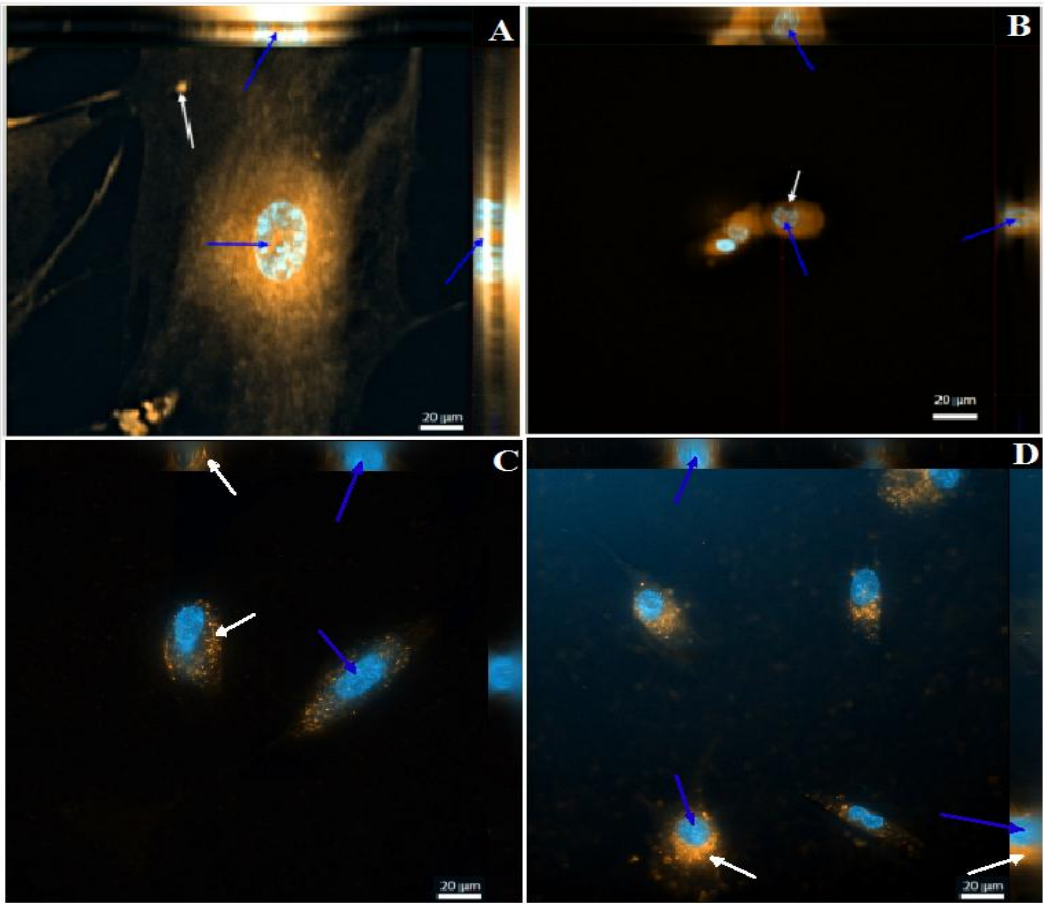


Рис. 29. 3D флуоресцентные фотографии, состоящие из 40 наложенных слоев, показывающие CRL 2429 (A и C) и U87 (B и D) клеточные культуры инкубированные с 1 мг/мл дисперсией куркумин-нагруженных ПВП-ОД-6000 наноносителей в течение 30 минут. A и B микрофотографии показывают клетки обработанные наноносителями Б. C и D микрофотографии показывают клетки обработанные с наноносителями А. Голубые стрелки показывают внутриядерный компартмент, белые стрелки показывают экстраядерный компартмент.

Результаты экспериментов подтверждают изменение механизма поглощения куркумина при уменьшении диаметра куркумин-нагруженных наночастиц ниже 50 нм. В качестве возможных механизмов проникновения маленьких частиц можно предположить следующие механизмы:

- проникновение за счет диффузии [101];
- слияние полимерной оболочки с мембраной клетки [102];
- образование пор [103].

Для лучшего понимания возможного механизма проникновения куркумин-нагруженных наночастиц малого диаметра было проведено два дополнительных эксперимента:

1. Исследовано проникновение в клетку частиц куркумина не покрытых амфифильным полимером. Если проникновение наночастиц малого диаметра внутрь клетки происходит за счет диффузии через мембрану, то покрытые и непокрытые частицы равного диаметра должны проникать с приблизительно равной скоростью.
2. Проведено сравнительное исследование эндоцитоза двух фракций разного диаметра куркумин-нагруженных частиц полученных в одном и том же синтезе. По составу наночастицы абсолютно идентичны и отличаются только размером. Разница в диаметре частиц не слишком велика. Мелкая фракция имеет диаметр 50 нм, крупные частицы - 200нм. Если проникновение в клетку происходит за счет образования пор (частицы "протыкают" мембрану), то и мелкие и крупные частицы должны проникать с приблизительно равной скоростью определяемой только качеством их поверхности определяеся типом используемого амфифильного полимера и способом синтеза. Разные фракции частиц, полученных в одном синтезе имебт идентичные поверхности.

Эндоцитоз крупных наночастиц (крупной фракции) В выделенной ценрифугированием частиц малого диаметра Б.

Суспензия частиц малого диаметра Б содержит примесь частиц большего диаметра, которую выделяли из смеси мембранным центрифугированием. Полученную фракцию (образец В, таблица 6) использовали в опытах по изучению эндоцитоза. Сравнивали результаты эндоцитоза клетками крупной -

В и мелкой Б фракций суспензии куркумин- нагруженных наночастиц. Результаты исследований наглядно продемонстрировали: мелкие и крупные частицы проникабт через мембрану с использованием абсолютно разных механизмов и с разной скоростью. Таким образом, механизм эндоцитоза мелких наночастиц через образование пор в мембране можно считать мало вероятным.

В случае мелких наночастиц наблюдалось проникновение куркумина в ядро клетки в обеих изученных клеточных культурах. Эти результаты означают возможность доставки фаррмацевтически активных веществ в ядро U87 и CRL 2429 клеток без их энзиметической деградации в лизосомах.

Также стоит отметить, что в образцах Б полученных суспензионным методом содержатся примесь частиц большого размера относящихся ко второму классу- к крупным частицам. Они поглощаются за счет эндоцитоза и попадают в лизосомы с последующей атакой лизосомальными ферментами. Крупные частицы куркумина в лизосомах хорошо видны на конфокальной микроскопии на фоне множества мелких частиц адсорбированных клеткой за счет прямого проникновения (Рис. 30).

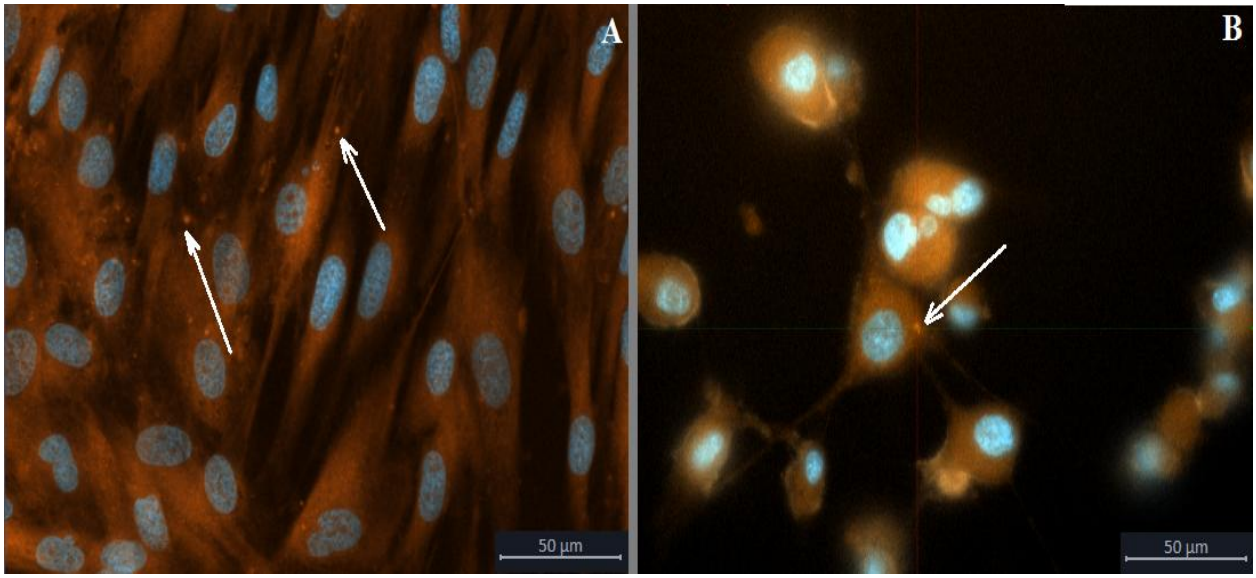


Рис. 30. Флуоресцентные фотографии CRL 2429 (A) и U87 (B) клеточных культур после инкубации с куркумин-нагруженными ПВП-ОД-6000 частицами (образец Б). Белые стрелки указывают на примесь частиц, захваченных эндосомами клетки.

Эндоцитоз частиц куркумина не покрытых слоем амфифильного полимера

В качестве препарата сравнения в работе использовали наночастицы неинкапсулированного куркумина не имеющие на своей поверхности слоя поверхностно активного эндкепированного ПВП. Их получали известным широко-распространенным методом осаждения из раствора в ДМСО. Для этого раствор куркумина в ДМСО добавляли непосредственно в водную питательную среду DMEM и после достижения необходимых концентраций смешивали ее с культурой клеток. Оказалось, что присутствие в системе амфифильного ПВП является принципиально важным. В контрольных образцах, в которых он отсутствовал, куркумин поглощается клетками только за счет фагоцитоза (Рис. 31). Свободное проникновение не наблюдалось (Рис. 32). Таким образом, проникновение мелких частиц за счет диффузии через мембрану не происходит. Непокрытые частицы куркумина поглощаются только за счет фагоцитоза независимо от их размера.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что наиболее вероятным механизмом проникновения наночастиц малого диаметра через плазмолемму является слияние фосфолипидного участка мембраны клетки с мембраной построенной из амфифильного полимера покрывающей поверхность наночастицы. Очевидно, что механизм требует уточнения и дальнейших исследований.

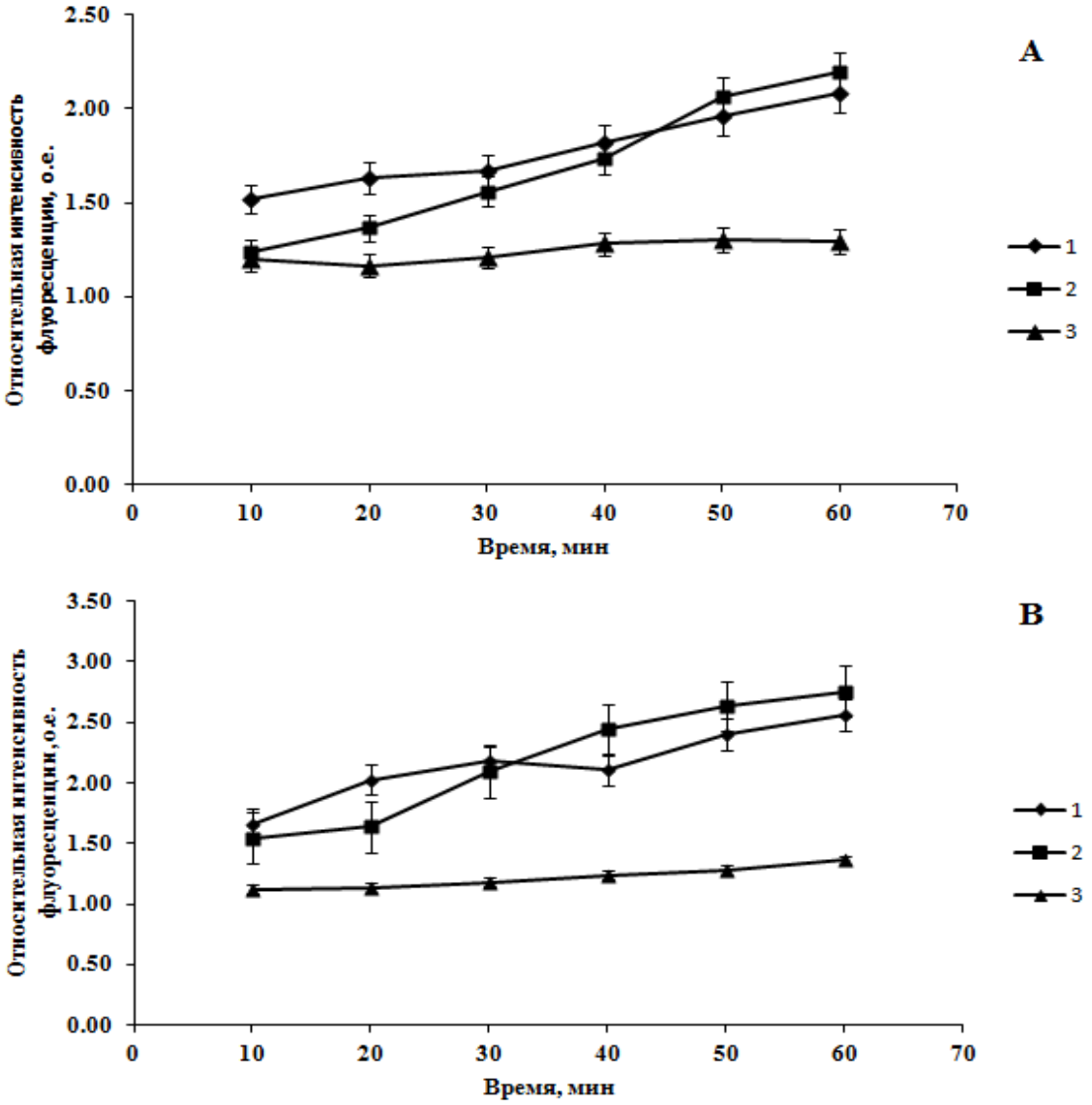


Рис. 31. In vitro динамика поглощения куркумина клетками U87 (A) и CRL 2429 (B): 1 – без ингибиторов эндоцитоза; 2- в присутствии вортманнина; 3- в присутствии дайносора.

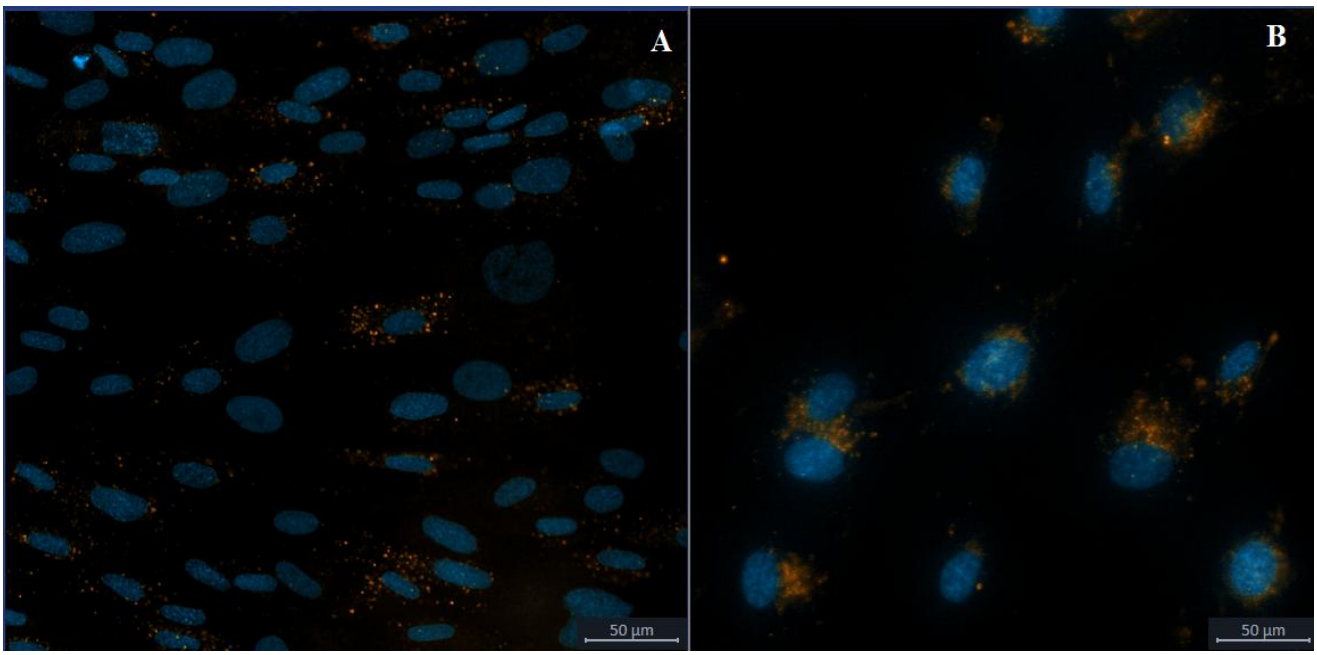


Рис. 32. Флуоресцентные фотографии CRL 2429 (A) и U87 (B) клеточных культур после инкубации с куркумином (1 мг/мл) в течение 30 минут без использования ингибиторов.

Влияние размера частиц на их проникновение в компартменты клетки

Для подтверждения предположения о том, что частицы малого размера содержащие куркумин проникают во все компартменты клеток, включая ядро, фракцию частиц Б отфильтровывали используя центрифужные фильтры с отсечкой молекулярной массы 30 кДа для удаления частиц менее 50 нм.

Мицеллы полученные после фильтрации (B) имеют размер более чем 50 нм и были использованы в клеточных культурах без использования ингибиторов и действуют как и в случае частиц А. Рис. 33 показывает, что куркумин больше не проникает в ядро клетки CRL 2429 фибробластов и U87 глиобластом, а захватываются везикулами. Также это было подтверждено анализом колокализации. Аналогично частицам А, видно, что два красителя находятся в разных компартментах клеток.

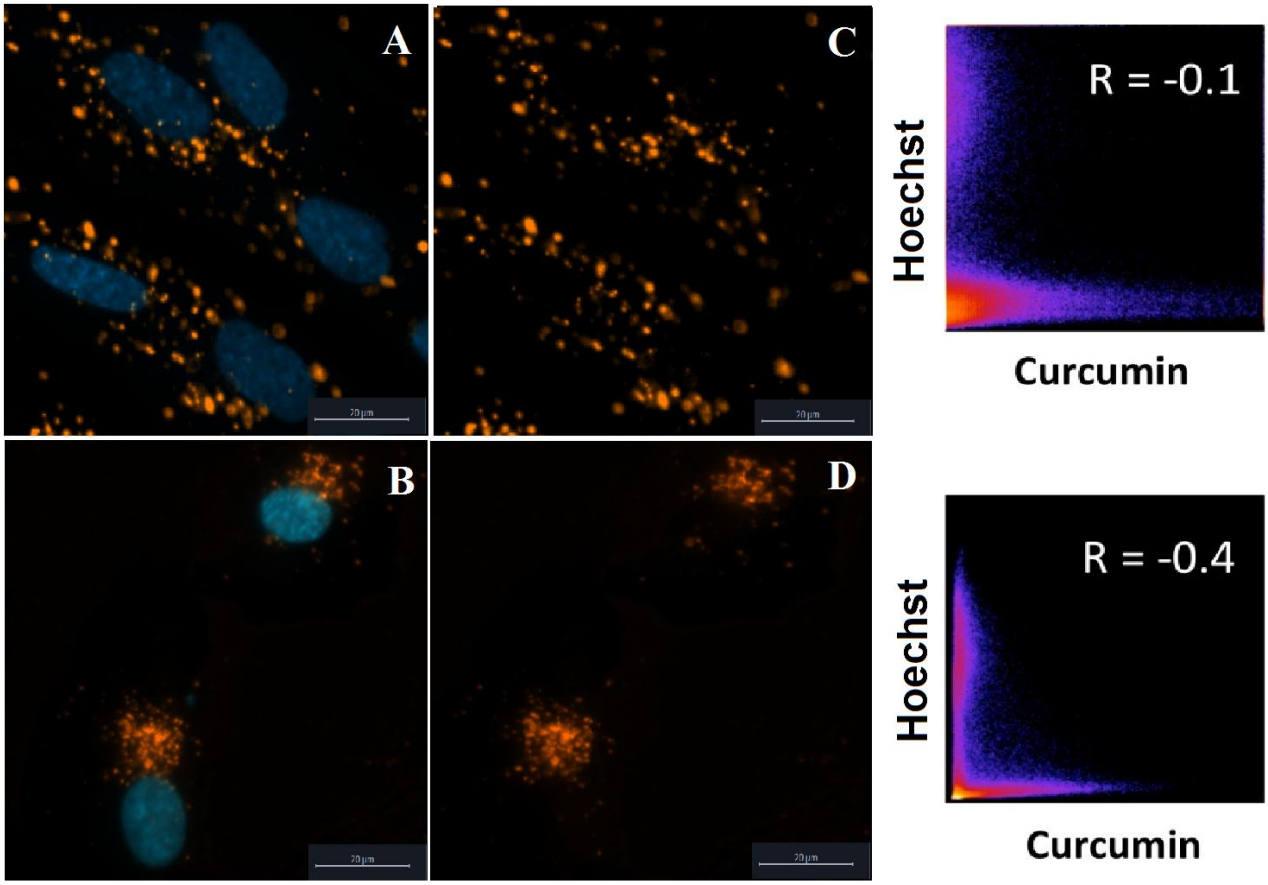


Рис. 33. Флуоресцентные фотографии CRL 2429 (A и C) и U87 (B и D) клеточных культур после инкубации с куркумин-нагруженными ПВП-ОД-6000 частицам (образец B). 2D - гистограмма показывает колокализацию флуорофоров в куркуминовом (517 нм, оранжевый) и Hoechst (465 нм, голубой) флуоресцентных каналах и соответствующие значения коэффициента корреляции Пирсона R.

Хорошо известно, что размер наноносителей сильно влияет на поглощение их клетками. Однако это явление , как считается, связано прежде всего с особенностями механизма эндоцитоза, в частности с оптимальной кривизной изгиба мембраны, необходимой для управления процессом образования инвагинации [104]. Также на этот процесс влияет наличие на поверхности наночастицы специальных направляющих агентов, взаимодействующих с рецепторами на поверхности клетки. Однако в данном случае процесс поглощения не зависит от присутсвия ингибиторов поглощения, а наночастицы не имеют каких-либо специфических целевых фрагментов. Это подразумевает неэндоцитарный путь клеточного поглощения наноносителей. Схожие результаты получены для проникающих в клетку

петидов (cell-penetrating peptides - CPP), которые использовались в качестве функциональных фрагментов [105]. Было обнаружено, что CPP могут индуцировать неэндоцитарный механизм поглощения нагруженного вещества за счет временной дестабилизации мембраны и образования пор, пригодных для переноса относительно больших молекул [106, 107]. С другой стороны моделирующие исследования показали, что так называемые частицы Януса также способны осуществлять прямое проникновение через мембрану [101] и образование пор [103], облегчая поглощение других частиц. Очевидно, что такие механизмы создают механизм проникновения частиц не только через клеточную мембрану, но и в другие компартменты, включая ядро. Несмотря на то, что необходимы дальнейшие исследования для определения точного механизма поглощения, тот факт, что полимерные наноносители эндкепированного поли-N-винилпирролидона со средним диаметром менее 50 нм проявляют другой механизм проникновения в клетки, открывает захватывающую возможность доставки ФАВ в различные клеточные компартменты, включая клеточное ядро[108,109].

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1 Характеристики исходных соединений

Основные физические константы веществ приведены при помощи справочника [94].

N-винилпирролидон - химическое соединение с формулой C_6H_9NO. Бесцветная жидкость со слабым характерным запахом. Растворяется в воде и большинстве органических растворителях. Молекулярная масса - 111. tкип.= 72 °С (2,5 мм рт.ст.); d_4^{20} = 1,046 г/см^3; n_d^{20} = 1,5124; В работе был использован препарат фирмы «Acros», очищенный перегонкой под вакуумом при Р=10мм.рт.ст., t =90 °С.

Диоксан (диэтилендиоксид) - Химическое соединение с формулой $C_4H_8O_2$, циклический простой эфир. Применяется в органической химии в качестве полярного апротонного растворителя. Является бесцветной подвижной жидкость со сладковатым запахом, схожим с запахом диэтилового эфира. Диоксан смешивается с водой, спиртом, эфиром; образует с водой азеотропную смесь ($t_{кип}$ 87,8 °С, 81,6 % диоксана). В работе использовали препарат фирмы "Баум-Люкс", очищенный перегонкой.

Динитрилазоизомасляной кислоты (ДАК) – азобисизобутиронитрил, ТУ 113-03-365-82. Инициатор радикальной полимеризации.

Белый порошок, растворим в этаноле, нерастворим в воде. При нагревании распадается на свободные радикалы. Азо-бис-изобутиронитрил весьма токсичен. В работе использовали отечественный препарат фирмы "Химмед", ч.д.а, очищенный перекристаллизацией из этанола.

Стандарт-титр натрия гидроокись 0,1н. В работе использовали отечественный препарат фирмы "Баум-Люкс" без дополнительной очистки.

Стандарт-титр йод 0,1н. В работе использовали отечественный препарат фирмы "Баум-Люкс" без дополнительной очистки.

Стандарт-титр натрий серноватистокислый 0,1н - В работе использовали отечественный препарат фирмы "Баум-Люкс" без дополнительной очистки.

Куркумин (1,7-Бис(4-гидрокси-3-метоксифенил) -1,6-гептадиен-3,5-дион, тумаровый желтый, диферулоилметан) - химическое соединение фенольного ряда с химической формулой $C_{21}H_{20}O_6$. Представляет собой порошок от ярко-желтого до оранжевого цвета. Нерастворим в воде. Легко растворяется в спирте, эфире, минеральных кислотах и щелочах. Является потенциальным противоопухулевым препаратом для терапии, некоторых видов рака. Молекулярная масса – 368,38. Температура плавления – 183 ºС.

В работе использовался препарат фирмы «Sigma-Aldrich», без предварительной очистки.

Ацетон (диметилкетон, 2-пропанон) – простейший представитель насущенных кетонов. Бесцветная легколетучая жидкость с характерным запахом. Во всех отношениях смешивается с водой, диэтиловым эфиром, этанолом и т.д. Молекулярная масса – 58,08. d_4^{20}=0,7899 г/см^3. $t_{плав}$=-95ºС; $t_{кип}$=56,1ºС. В работе использован отечественный препарат фирмы «Химмед» о.с.ч., очищенный перегонкой.

Хлороформ (трихлорметан, метилтрихлорид, хладон 20) – бесцветная летучая жидкость с эфирным запахом. Молекулярная масса – 119,38. d_4^{20}=1,483 г/см^3. $t_{плав}$=-63,5ºС; $t_{кип}$=61,2ºС. В работе использован препарат фирмы «База №1 Химреактивов», х.ч., очищенный перегонкой.

Диметилсульфоксид (ДМСО) – вязкая бесцветная жидкость с характерным, важный апротонный растворитель. Молекулярная масса – 78,13. d_4^{20}=1,104 г/см^3. $t_{плав}$=18,5ºС; $t_{кип}$=189ºС. В работе использован препарат фирмы «Th.Geyer», очищенный перегонкой.

Децилмеркаптан (1-декантиол) - химическое соединение с химической формулой $C_{10}H_{22}S$. Представляет собой жидкость с характерным запахом. Не растворим в воде. Молекулярная масса - 174,35; d_4^{20}=0,841, $t_{плав}$=-26,0ºС, $t_{кип}$=114ºС. В работе использован препарат фирмы «Sigma-Aldrich», без предварительной очистки.

Гексадецилмеркаптан (1-гексадекантиол) - химическое соединение с химической формулой $C_{16}H_{34}S$.Порошок белого цвета с характерным запахом.

Не растворим в воде. Растворим в органических растворителях Молекулярная масса -258,51, $t_{плав}$=19,0ºС. В работе использован препарат фирмы «Sigma-Aldrich», без предварительной очистки.

Октадецилмеркаптан (1-октадекантиол) – химическое соединение с химической формулой $C_{18}H_{38}S$. Представляет собой белый порошок, практически без запаха. Не растворим в воде. Растворим в диэтиловом эфире, этаноле. Молекулярная масса – 286,56. В работе использован препарат фирмы «Sigma-Aldrich», без предварительной очистки.

Вода дистиллированная - прозрачная жидкость, не имеющая цвета, запаха и вкуса. Молекулярная масса - 18,01. В работе использовался бидистиллят обеспыленный.

Дайносор (3-гидрокси-нафталин-2-карбоновая кислота) – клеточно-проницаемый, обратимый, неконкурентоспособный динамин 1 и динамин 2 ингибитор активности гуанозинтрифософтазы. Химическое соединение с формулой $C_{18}H_{14}N_2O_4 \times H_2O$. Представляет собой порошок белого цвета, не растворимый в воде. Растворим в ДМСО. Молекулярная масса - 322,31.

В работе использован препарат фирмы «Sigma-Aldrich», без предварительной очистки.

Вортманнин - химическое соединение биологического происхождения с формулой $C_{23}H_{24}O_8$, представляет собой порошок белого цвета. Растворим в ДМСО, метаноле, в воде и этаноле. Антигрибковый препарат, специфический ингибитор клеточных фосфоинозитид-3-киназ. Используется в клеточной биологии как ингибитор рецептор-опосредованного эндоцитоза. $T_{пл}$=240ºС. Молекулярная масса – 428,43. В работе использован препарат фирмы «Sigma-Aldrich», без предварительной очистки.

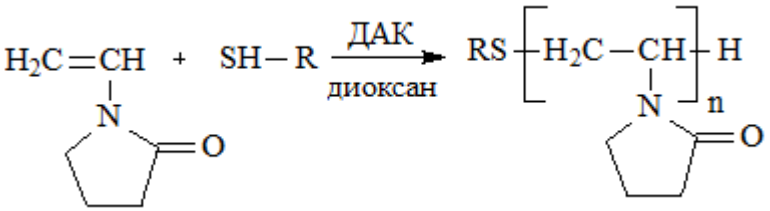
Hoechst 33258 (раствор 10 мг/мл в воде) - химическое соединение с формулой $C_{25}H_{24}N_6O \cdot 3HCl \cdot \times H_2O$, представляет собой жидкость желтого цвета без запаха. Является красителем нуклеиновых кислот и флуоресцирует при связывании с ДНК.Молекулярная масса - 533,88, λex=352 нм/ λem=461. В

работе использован препарат фирмы «ThermoFisher Scientific», без предварительной очистки.

Дифенилгексатриен - химическое соединение с формулой $C_{18}H_{16}$. Углеводород способный к флуоресценции. Практически не флуоресцирует в воде, но проявляет сильную флуоресценцию при интернализации в липидную мембрану или мицеллу. Молекулярная масса - 232,32. λex=366 нм/λem=433 нм. В работе использован препарат фирмы «Sigma-Aldrich», без предварительной очистки

4.2. Методики синтезов

4.2.1. Полимеризация N-винилпирролидона в присутствии тиольных соединений



В хорошо промытые и высушенные пробирки с притертыми пробками загружали 11.1 г (0,1 моль) N-винилпирролидона, требуемое количество меркаптана в качестве передатчика цепи (0,5-8 мольн.%), ДАК (1 масс.%) в качестве инициатора и 20 мл диоксана в качестве растворителя. Пробирки продували инертным газом (аргон). Реакцию проводили при постоянном перемешивании при 70°С в течении 3 часов. После заданного времени, содержимое пробирок растворяли в дистиллированной воде и отгоняли на роторном испарители (IKA RV10+HB10 Digital). После этого очистку проводили диализом против воды (Slide-A-Lyzer ™ Dialysis Flask, 2K MWCO, Thermo Scientific, США) в течении 5 суток. По окончании диализа, содержимое диализных мешков растворяли в дистиллированной воде и отгоняли на роторном испарители. Содержимое кубового остатка сушили лиофильно, а затем в вакуумном пистолете.

Полученные полимеры представляют собой белые порошки, хорошо растворимые в воде. Выход полимера определяли гравиметрически.

4.2.2. Получение полимерных наночастиц методом прямого растворения

Расчетное количество полимера растворяли в бидистиллированной воде (0,01 г/мл. Затем полученный раствор перемешивали на шейкере (Vibromax 100, Heidolph, Германия) в течении 4-6 часов. После этого раствор замораживали в жидком азоте и лиофильно сушили.

4.2.3. Получение наночастиц эмульсионным способом.

Раствор куркумина в хлороформе (0,01 г/мл) по каплям добавляли к дисперсии амфифильного ПВП в воде (0.1 г/мл) при ультразвуковом диспергировании и интенсивном охлаждении. Затем хлороформ выпаривали на роторном испарителе, полученный раствор центрифугировали в течении 25 минут при 5000 об/мин. Супернатант замораживали в жидком азоте и лиофильно сушили (Alpha 1-4 LD plus, Martin Christ, Германия).

4.2.4. Получение наночастиц суспензионным способом.

Полученный амфифильный ПВП диспергировали в воде (0,1 г/мл), а куркумин растворяли в ацетоне (0,01 г/мл). Равные объемы растворов полимера и куркумина перемешивали при ультразвуковом диспергировании (CV 33 Sonics Vabracel) при охлаждении. Затем полученный раствор центрифугировали в течении 25 минут при 5000 об/мин. Супернатант замораживали в жидком азоте и сушили лиофильно.

Для удаления фракции частиц, имеющих маленький диаметр ниже 100 нм, раствор содержащий частицы с нагруженным куркумином фильтровали используя центрифужные фильтры Amicon Ultra объемом 0,5 мл (Merck Millipore, Германия) с отсечением полимера с молекулярной массой 30 кДа при 7000 оборотах в минут в течении 10 минут.

4.2.5.Получение наночастиц диализным методом.

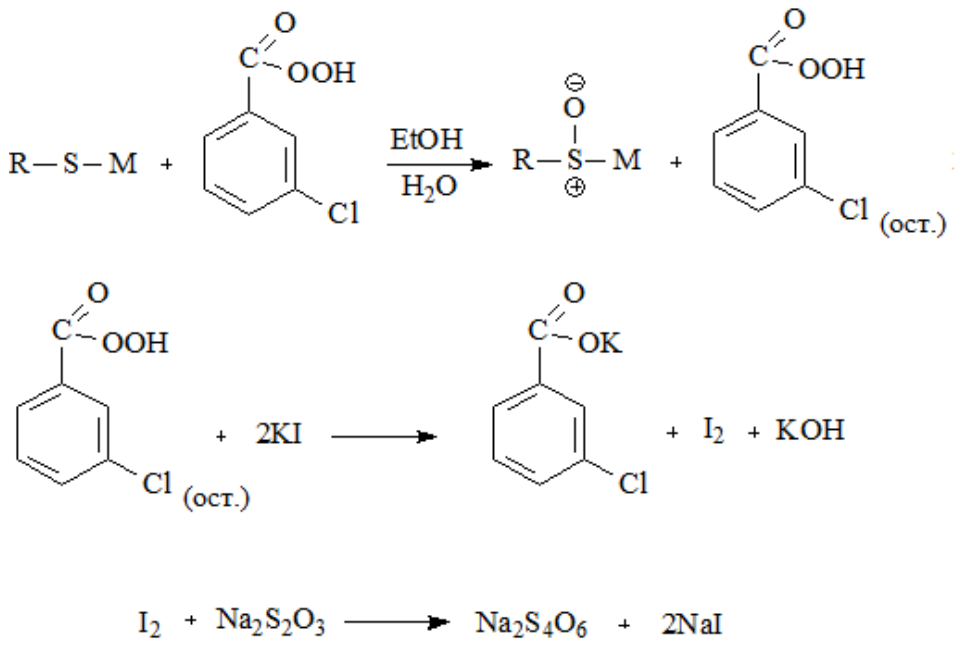
Полученный амфифильный ПВП (0,1 г) и куркумин (0,01 г) растворяли в ДМСО (20 мл). Полученный раствор диализовали против воды в течение 5 суток. Затем полученные образцы центрифугировали в течение 25 минут при 5000 об/мин. Супернатант замораживали в жидком азоте и лиофильно сушили.

4.3. Методы анализов

4.3.1. Определение молекулярной массы методом обратного йодометрического титрования

Данная методика позволяет определить количество сульфидных групп в полимере и, следовательно, среднечисленную молекулярную массу.

Для определения среднечисленной молекулярной массы использовали 0,1Н раствор KI, 0,01Н раствор $Na_2S_2O_3$. Для приготовления раствора м-хлорпербензойной кислоты необходимо навеску (примерно 0,7 г) растворяли в 250 мл холодного этанола. Далее точную навеску полимера массой 0,3 г помещали в бюкс и заливали 20 мл раствора м-хлорпербензойной кислоты и 10 мл дистиллированной воды (делают 3 пробы). Приготавливали аналогичную холостую (контрольную пробу). Полученные растворы выдерживали в течение 24 часов при 0^0С. После этого в каждую пробу добавляли избыток KI (15 мл). Образцы оттитровывали раствором тиосульфата натрия до исчезновения окраски йода. Процесс описывается следующими реакциями:



Среднечисленную молекулярную массу определяли по формуле:

$$MM = \frac{1000 \cdot m \cdot 2}{(V_{хол} - V) \cdot c}$$

где: m – масса навески полимера, г.; $V_{хол}$– объем тиосульфата натрия, пошедшего на титрование холостой пробы (без полимера), мл.; V – объем тиосульфата натрия, пошедшего на титрование пробы с полимером, мл.;c - концентрация тиосульфата натрия, г/мл.

4.3.2. Определение молекулярной массы методом паровой осмометрии

Метод паровой осмометрии позволяет определить молекулярную массу полимера в очень низких концентрациях. Измерения методом паровой осмометрии среднечисленной молекулярной массы ПВП проводили на осмометре «Knauer K-7000» (Германия), в качестве стандарта использовали полистирол. Полученные данные обрабатывались на программном обеспечении EuroOsmo 7000.

4.3.3. ИК-спектроскопия

Инфракрасные спектры полученных соединений снимали с использованием таблеток KBr на ИК-Фурье спектрометре JASCO FT/IR-6800 (США) с разрешением 4 см$^{-1}$ в диапазоне волновых чисел от 400 до 4000 см$^{-1}$ при

комнатной температуре с числом сканирований - 64. Результаты обрабатывали на программном обеспечении " Spectra Manager ".

4.3.4. УФ-спектроскопия

Спектры поглощения в УФ и видимой области записывали на спектрофотометре UNICO UV-2804. В ультрафиолетовой области спектра 200-400 нм и в видимой области 400-1100 нм..

4.3.5. ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C были сняты на приборе Bruker CXP-200 (Германия) при 200 и 90 МГц соответственно с использованием ДМСО-d6 в качестве растворителя. Химические сдвиги сигналов рассчитывали относительно эталона – тетраметилсилана .

4.3.6. Определение критической концентрации мицеллообразования

Критическую концентрацию мицеллообразования определяли методом флуоресцентной спектроскопии. В качестве флуоресцентной пробы использовали ДФГТ. Метод основывается на солюбилизации гидрофобного ДФГТ полимерными частицами. Для этого 4 мг ДФГТ растворяли в 1 мл ацетона. Затем полученный раствор разбавляли фосфатным буфером до концентрации ДФГТ 0.5 мкМ. Из полученного раствора при интенсивном перемешивании под вакуумом отгоняли ацетон. Полученный раствор добавляли к пробам, содержащим раствор амфифильного ПВП в фосфатном буфере, так, что бы конечная концентрация ДФГТ была 0.25 мкМ. После добавления ДФГТ пробы помещали в сухой термостат на 30 мин. Измерения интенсивности флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Hitachi 650-10S (Hitachi Instruments Inc., Япония) при длине волны возбуждения λ_{ex} = 366 нм и излучения λ_{em} = 433 нм.

4.3.7. Определение гидродинамического диаметра методом анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis - NTA)

Для всех экспериментов, лиофилизованный порошок частиц диспергировали в дистиллированной воде (0,02 мг/мл). Во всех случаях распределение частиц по размерам определяли методом анализа траекторий наночастиц (NTA - Nanoparticle Tracking Analysis), используя инструмент Nanosight LM10 (Malvern) снабженного лазером с длинной волны 642 нм и CCD камерой. Полученные дисперсии частиц разбавлялись дистиллированной водой до концентрации 1 мг/мл, температура измерений составляла 25°C. Лазерный луч направляется на дисперсию и движение всех частиц в области видимой камерой и оптическим микроскопом, записывается на видео и отслеживается программным обеспечением NTA. Основываясь на полученных траекториях броуновского движения рассчитывался гидродинамический радиус каждой частицы. Каждый образец измеряли в течение 160 секунд с частотой кадров 30 в секунду; измерения проводили трижды для каждого образца и усредняли.

4.3.8. Определение поверхностного заряда наночастиц

Дзета-потенцил определяли используя Zetasizer Nano Z&S (Malvern Instruments Ltd.). Измерения проводили при 25°C и значении pH=7,4 (Натрий-фосфатный буфер). Измерения проводились трижды для каждого образца.

4.3.9. Определение размеров и морфологии частиц методом атомно-силовой микроскопии.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) наночастиц производили с использованием Multimode Nanoscope IIIa (Bruker), работающего в полуконтактном режиме. Для измерений использовались мягкие кантилеверы OMCL-AC240TS (Olympus) и HA-NC (ScanSense) с номинальными силовыми константами 2 Н/м и 3,5 Н/м, соответственно. В качестве подложки использовали мусковитовые слюды, размером 1x1 см^2, обработанные (3-аминопропил)триметоксисиланом (Sigma-Aldrich) для создания положительно заряженной поверхности [110]. Затем раствор наночастиц инкубировали

поверх функционализированной слюды в течение 5-10 мин. Затем подложки промывали дистиллированной водой, сушили в потоке азота и отображали в АСМ. Полученные изображения обрабатывались с использованием встроенного Nanoscope программного обеспечения, а также программного обеспечения WSxM v.5 [111].

4.3.10. Определение морфологии и размера частиц методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ).

Морфологию и размер полимерных наночастиц изучали методом трансмиссионной электронной микроскопии с использованием микроскопа «JEOL JEM-2000» (Япония) при напряжении 20-30 кВ. Каплю суспензии частиц помещали на подложку из 0.2 %масс. раствора поливинилформаля, нанесенного на медную сетку. После высушивания образец помещали в микроскоп и проводили исследования. Результаты обрабатывали при помощи программного обеспечения DigitalMicrograph.

4.4. Исследования проникновения частиц в клеточные культуры in vitro.

Линии клеток глиобластомы человека (U87, ATCC no. HTB-14) и первичных фибробласт человека (ATCC no. CRL 2429) были предоставлены Ольбургским инситутом, Дания. Клеточные культуры растили в среде Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM F12), дополненной 100 ед/мл пенициллином, 10 мг/мл стрептомицином и 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS). Клетки выращивали в культуральных колбах (75 см^2, Greiner BioOne) в стандартном инкубаторе, с поддержанием влажной среды, 5% CO2 при 37°C и пассировали каждые два дня.

Для изучения механизма поглощения наночастиц клетками, клетки высаживали в стерильные 96-луночные планшеты с плотностью около 5000 клеток/см^2. Для каждого типа клеток, использовали три различных экспериментальных условия: контрольная линия, линия обработанная дайносором и линия обработанная вортманнином. Через 24 часа клетки промывали PBS и затем преинкубировали в течении 15 минут с Hoechst 33258

растворенном в культуральной среди в отношении 1:1000 и промывались культуральной средой. Затем клетки инкубировались с растворами ингибиторов (12.5 µл дайносор в 1 мл среды (80 мМ) и 0,11µл вортманнин в 1 мл среды (100 нМ)) при 37°С в течении 30 минут. Контрольная линия инкубировалась с культуральной средой без добавления ингибиторов в течении 30 минут. Затем клетки обрабатывались 150 µл наночастиц (0,13 мг/мл в культуральной среде) или раствора куркумина в ДМСО (0,007 мг/мл) предварительно отфильтрованными через 0,22 µм фильтр. Наблюдения проводились в течении 30 минут для частиц полученных суспензионным методом и раствора куркумина в ДМСО и в течении 60 минут для частиц полученных эмульсионным методом. Для наблюдения процесса поглощения клетки промывали три раза PBS, а затем фотографировали используя Axio Observer.Z1 инвертированный микроскоп (Carl Zeiss, Германия).

Поглощение куркумина клетками определяли как относительную интенсивность флуоресценции на длине волны излучения куркумина, определяемую отношением количества ярких пикселей выше определенного порога (соответствующего фону) в канале флуоресценции куркумина (возбуждение 493 нм и излучение 517 нм) к таковому в канале DAPI, соответствующему Hoechst 33258 (возбуждение 353 нм и излучение 465 нм) с использованием программного обеспечения для обработки изображение Zen Lite (Carl Zeiss, Германия) и MATLAB (MathWorks, США).

Оценка колоколизации. Полученные изображения обрабатывали с помощью программ Zen 2 Lite (Zeiss AG, Германия) и ImageJ (National Institute of Health, США) с использованием плагина coloc2 [112].

Степень колокализации определяли с помощью коэффициента корреляции Пирсона, который дает количественное значение степени перекрывания между флуоресцентными сигналами двух исследуемых изображений. Коэффициент Пирсона может иметь значение от 1 до -1. Степень корреляционной связи характеризовалась как:

Абсолютное значение коэффициента	Теснота корреляционной связи
Менее 0.3	слабая
От 0.3 до 0.5	умеренная
От 05 до 0.7	заметная
От 0.7 до 0.9	высокая
Более 0.9	весьма высокая

Каждый эксперимент проводили не менее 3 раз. Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента (уровень значимости $p<0,05$).

5. ВЫВОДЫ

1. Радикальной полимеризацией N-винилпирролидона с использованием насыщенных меркаптанов нормального строения в качестве передатчиков цепи получены амфифильные полимеры с молекулярной массой от 1 до 40 кДа, содержащие одну концевую тиоалкильную группу, проявляющие поверхностно-активные свойства и перспективные для получения наноразмерных носителей лекарственных средств,.
2. Выявлены условия получения и фракционирования по размерам наноносителей на основе поверхностно-активных производных поли-N-винилпирролидона с концевой тиооктадецильной группой, содержащих внутри модельное физиологически активное соединение куркумин. Они характеризующиеся узким распределением по размерам и получены двух основных типов: носители среднего диаметра 200-50 нм и носители малого диаметра (50-20 нм).
3. Определены основные характеристики наноносителей с использованием оптических и физических методов визуализации формы и размера, а также с помощью анализа траекторий их движения в жидкости. Выявлено, что независимо от среднего размера и способа получения они, имеют форму близкую к сферической и характеризуются малым по величине отрицательным значением ζ-потенциала.
4. В экспериментах на двух культурах клеток изучено взаимодействие синтезированных наноразмерных носителей с живыми клетками организма человека с использованием куркумина и Hoechst33258 в качестве флуоресцентных меток, вортманнина и дайносора в качестве ингибиторов фагоцитоза. Выявлена зависимость механизма и скорости проникновения внутрь клеток и органелл от размера частиц носителя. Показано, что наноразмерные системы со средним диаметром от 200 до 50 нм поглощаются клетками культур тканей за счет фагоцитоза и проникают через плазмолемму внутри фагосом. Внутрь большинства органелл они не проникают. Носители малого гидродинамического радиуса от 20 до 50 нм проникают через

плазмолемму значительно быстрее, минуя механизм фагоцитоза. Они проникают внутрь большинства органелл, включая ядро живой клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paschalis A. Amphiphilic copolymers and their application //Current opinion in Colloid & Interface Science. 1996. Vol. 1. Iss. 4. P. 490-501

2. Халатур П.Г. Самоорганизация полимеров // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. № 4. С. 36-43.

3. Förster S., Antoniette M. Amphiphilic Block Copolymers in Structure // Advanced Materials. 1998. Vol. 10. N. 3. P. 195-217

4. Motoyanaqi J., Kurata A., Minoda M. Self-assembly behavior of amphiphilic C_{60}-end-capped poly(vinyl ether)s in water and dissociation of the aggregates by the complexing of the C_{60} moieties with externally added γ-cyclodextrins // Langmuir. 2015. Vol. 31. N. 8. P. 2256-2261

5. Kabanov A.V., Batrakova E.V., Alakhov V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery // Journal of Controlled Release. 2002. N. 82. P. 189-212

6. Kuskov A.N., Shtilman M.I., Goryachaya A.V., et al. Self-assembling nanoscaled drug delivery systems composed of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones // Journal of Non-Crystalline Solids. 2007. Vol.353, N. 41-43. P. 3969-3975

7. Kuskov A.N., Voskresenskaya A.A., Goryachaya A.V., et al. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal, anti-inflammatory drugs: Characterization and in vitro controlled release of indomethacin // International journal of molecular medicine. 2010. Vol. 26. P. 85-94

8. Lasic D.D., Woodle M.C., Martin F.J., Valentincic T. Phase behavior of 'stealth-lipid' decithin mixtures // Period. Biol. 1991. Vol. 93. P. 287-290

9. Hadjichristidis N., Pispas S., Floudas G. Block Copolymers: Synthetic Strategies, Physical Properties, and Applications. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2003. 444 p.

10. Winnik F.M., Davidson A.R., Hamer G.K., Kitano H. Amphiphilic poly(N-isopropylacrylamides) prepared by using a lipophilic radical initiator: synthesis and solution properties in water // Macromolecules. 1992. Vol. 25. P. 1876-1880.

11. Gao Z., Eisenberg A. A model of micellization for block copolymers in solutions // Macromolecules. 1993. Vol. 26. P. 7353 - 7360.

12. Dhembre G.N., Moon R.S., Kshirsagar R.V. A review on polymeric micellar nanocarriers // International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011. Vol. 2. N. 2. P. 109-116.

13. Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. Amphiphilic Block Copolymers for Drug Delivery // Journal of Pharmaceutical Science. 2003. Vol. 92. N. 7. P. 1343-1354.

14. Torchilin V.P. Structure and design of polymeric surfacant-based drug delievery systems // J Control Release. 2001. N. 73. P. 137-172.

15. Gilliyar C., Fikstad D.T., Tyavanagimatt S. Chalelenges and opportunities in oral delievery of poorly water-soluble drugs // Drug Deliv. Technol. 2006. Vol. 6. P. 57-63.

16. Arshady R. Dendrimers assemblies nanocomposites. London: Citus Ltd. 2002. 576 p.

17. Musyanovich A., Landfester K. Polymer Micro- and Nanocapsules as Biological Carriers with Multifunctional Properties // Macromolecular Bioscience. 2014. Vol. 14. P. 458-477.

18. Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. Amphiphilic Block Copolymers for Drug Delivery // Journal of pharmaceutical Sciences. 2003. Vol. 92. N. 7. P. 1343-1354.

19. La S.B., Okano K., Kataoka K. Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(b-benzyl l-aspartate) block copolymer micelles // J. Pharm. Sci. 1996. Vol. 85. p. 85-90.

20. Kabanov V.A., Batrakova E.V., Melik-Nubarov N.S., et al. New class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers

as microontainers for drug targeting form blood in brain // J. Control. Rel. 1992. Vol. 22. P. 141-158.

21. Torchilin V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers // Nat Rev Drug Discov. 2005. Vol. 4. N. 2. P. 145-160.

22. Torchilin V.P. Polymer-coated long circulating microparticulets in pharmaceuticals // J. Microencapsulation. 1998. Vol. 15. P. 1-19.

23. Lee C.C., Mackay J.A., Frechet M.J., Szoka F.C. Designing dendrimers for biological applications // Nature Biotechnology. 2005. Vol. 23. P. 1517-1526.

24. Oberoj H.S., Nukolova N.V., Kabanov A.V., Bronich T.K. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs // Advanced Drug Delivery Reviews. 2013. Vol. 65. N. 13-14. P. 1667-1685.

25. Kazi K.M., Mandal A.S., Biswas N., et al. Niosome: A future of targeted drug delivery systems // J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2010. Vol. 1. N. 4. P. 374-380.

26. Meng F.H., Engbers G.M., Gessner A., et al. Pegylated polystyrene particles as a model system for artificial cells // J. Biomed. Mater. Res. 2004. Vol. 70. P 97-106.

27. Hrkach J.S., Peracchia M.T., Bomb A., et al. Nanotehcnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by H-NMR spectroscopy // Biomaterials. 1997. Vol.18. P. 27-30.

28. Lu Z., Bei J., Wang S. A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer // J. of Contr, Rel. 1999. Vol. 61. P. 107-112.

29. Dufresne M.H., Fournier E., Jones M.C., et al. Block copolymer micelles—engineering versatile carriers for drugs and biomacromolecules // In: Gurny R, editor. Challenges in drug delivery for the new millennium, 96. Saint-Priest: Bulletin Technique Gattefosse; , Saint-Priest, 2003

30. Alakhov V.Y., Moskaleva E.Y., Batrakova E.V., Kabanov A.V. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 copolymer // Bioconjug Chem. 1996. Vol.7. P. 209-216.

31. Nishiyama N., Kataoka K. Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelle containing cis-dichlorodiammineplatinum (II) in the core // J Control Release. 2001. Vol. 74. P. 83-94.

32. Li Y., Kwon G.S. Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethylL-aspartamide). I. Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release // Pharm. Res. 2000. Vol. 17. P. 607-611.

33. Lavasanifar A., Samuel J., Kwon G.S. Micelles self-assembled from poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl stearate solvent evaporation method: effect on the solubilization and haemolytic activity of amphotericin B // J Control Release. 2001. Vol. 77. P. 155-160.

34. Kim J.H., Emoto K., Iijima M., et al. Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: increased solubilization of taxol // Polym Adv Technol. 1999. Vol. 10. P. 647 – 654.

35. Butsele K.V., Sibreta P., Fustin C.A., et al. Synthesis and pH-dependent micellization of diblock copolymer mixtures // J Colloid Interf Sci. 2009. Vol. 329. P. 235-243.

36. Zhiang J., Wu M., Yang J., et al. Anionic poly (lactic acid)-polyurethane micelles as potential biodegradable drug delivery carriers // Colloids Surfaces A. 2009. Vol. 337. P. 200-204.

37. Patil Y.B., Toti U.S., Khadir A., et al. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery // Biomaterials. 2009. Vol. 30. P. 859-866.

38. Zhang J., Jiang W., Zhao X., Wang Y. Preparation and characterization of polymeric micelles from poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol block copolymers as potential drug carriers // Tsinghua Sci Technol. 2007. Vol. 12. P. 493-496.

39. Hongyu C., Na L., Xing W., et al. Morphology and in vitro release kinetics of drug-loaded micelles based on well-defined PMPC-b-PBMA copolymer // Int J Pharm. 2009. Vol. 371. P. 190-196.

40. Zhang X., Jackson J.K., Burt H.M. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol // Int J Pharm. 1996. Vol. 132. P. 195-206.

41. Taillefer J., Jones M.C., Brasseur N., et al. Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs // J Pharm Sci. 2000. Vol. 89. P. 52-62.

42. Doherty G.J., McMahon H.T. Mechanisms of Endocutosis // The annual Review of Biochemistry. 2009. Vol. 78. P. 857-902.

43. Корнилова Е.С. Везикулярный транспорт и передача внутриклеточного сигнала. С.-П.: Изд-во Политехнического ун-та, 2011. 183 с.

44. Kazmierczak A., Maszewski J. Uptake of fluorescent-labeled BSA into root cells: endocytosis? // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 1997. Vol. 66. N. 3-4. P. 319-324.

45. Goldstein J.L., Anderson R.G., Brown M.S. Receptor-mediated endocytosis and the cellular uptake of low density lipoprotein // Ciba Found Symp. 1982. Vol. 92. P. 77-95.

46. Левицкий Д.О. Биохимия мембран. Кальций и биологические мебраны. М.: Высш.шк., 1990. 124 с.

47. Глебов Р.Н. Биохимия мембран. Эндоцитоз и экзоцитоз. М.: Высш. шк., 1987. 95 с.

48. Ivanov A.I. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? // Methods Mol.Biol. 2008. Vol. 440. P. 15-33.

49. Schmid S.L. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process // Annu. Rev. Biochem. 1997. Vol. 66. P. 511-548.

50. Hinshaw J.E. Dynamin and its role in membrane fission // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2000. Vol. 16. P. 483-519.

51. Macia E., Ehrlich M., Massol R., et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin // Dev. Cell. 2006. Vol. 10. P. 839-850.

52. McCluskey A., Daniel J.A., Hadzic G., et al. Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis // Traffic. 2013. Vol. 14. N. 12. P. 1272-1289.

53. Quan A., McGeachie A.B., Keating D.J., et al. Myristyl trimethyl ammonium bromide and octadecyl trimethyl ammonium bromide are surface-active small molecule dynamin inhibitors that block endocytosis mediated by dynamin I or dynamin II // Mol. Pharmacol. 2007. Vol. 72. P. 1425-1439.

54. Taguchi T. Emerging roles of recycling endosomes // J. Biochem. 2013. Vol. 153. P. 505-510.

55. Rainero E., Norman J.C. Late endosomal and lysosomal traffi cking during integrin-mediated cell migration and invasion: cell matrix receptors are traffi cked through the late endosomal pathway in a way that dictates how cells migrate // Bioassays. 2013. Vol. 35. P. 523-532.

56. Burd C.G. Physiology and pathology of endosome-to-Golgi retrograde sorting // Traffic. 2011. Vol. 12. P. 948-955.

57. Nieland T.J., Feng Y., Brown J.X., et al. Chemical genetic screening identifies sulfonamides that raise organellar pH and interfere with membrane traffic // Traffic. 2004. Vol. 5. P. 478-492.

58. Barbier J., Bouclier C., Johannes L., Gillet D. Inhibitors of the cellular trafficking of ricin // Toxins. 2012. Vol.4. P. 15-27.

59. Stechman B., Bai S.K., Gobbo E., et al. Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge // Cell. 2010. Vol. 141. N.2. P. 231-242.

60. Lipovsky A., Popa A., Pimienta G., et al. Genome-wide siRNA screen identifi es the retromer as a cellular entry factor for human papillomavirus // Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 2013. Vol. 41. P. 3673-3687.

61. Ming X., Carver K., Fisher M., et al. The small molecule Retro-1 enhances the pharmacological actions of antisense and splice switching oligonucleotides // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 110. P. 7452-7457.

62. Saenz J.B., Dogget T.A., Haslam D.B. Identification and characterization of small molecules that inhibit intracellular toxin transport // Infect. Immun. 2007. Vol. 75. P. 4552-4561.

63. Jefferies H.B., Cooke F.T., Jat P., et al. A selective PIKfyve inhibitor blocks PtdIns(3,5) P(2) production and disrupts endomembrane transport and retroviral budding // EMBO Rep. 2008. Vol. 9. P. 164-170.

64. Vlahost C.J., Matter W.F., Hui K.Y., Brown R.F. A specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) // The J. of Biol. Chem. 1994. Vol. 269. N. 7. P. 5241-5248.

65. Vanhaesebroeck B., Leevers S.J., Ahmadi K., et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids // Annu. Rev. Biochem. 2011. Vol.70. P. 535-602.

66. Ferby I., Waga I., Kume K., et al. PAF-induced MAPK Activation Is Inhibited by Wortmannin in Neutrophils and Macrophages // Adv. Exp. Med. Biol. 1996. Vol. 416. P. 321-326.

67. Liu Y., Jiang N., Wu J., et al. Polo-like Kinases Inhibited by Wortmannin: Labeling Site and Downstream Effects. 2007. Vol. 282. N.4. P. 2505-2511.

68. Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel // Science. 2016. V. 311. P. 622-627.

69. Lee B., Komarneni S. Chemical Processing of Ceramics, Second Edition, Boca Raton: CRC Press. 767 P. 2005.

70. Min Y., Akbulut M., Kristiansen K., Golan Y., Israelachvili J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly // Nature Mat. 2008. Vol. 7. P. 527-538.

71. Dagastine R.R., Manica R., Carnie S.L., et al. Dynamic Forces Between Two Deformable Oil Droplets in Water // Science. 2006. Vol. 313. P. 210-213.

72. Kim H.Y., Sofo J.O., Velegol D., et al. Van der Waals dispersion forces between dielectric nanoclusters // Langmuir. 2007. Vol. 23. P. 1735-1740.

73. Velegol D. Assembling colloidal devices by controlling interparticle forces // J. Nanophoton. 2007. Vol. 1. 012502.

74. Feick J.D., Chukwumah N., Noel A.E., Velegol D. Altering surface charge nonuniformity on individual colloidal particles // Langmuir. 2004. Vol. 20. P. 3090-3095.

75. Velegol D., Thwar P.K. Analytical model for the effect of surface charge nonuniformity on colloidal interactions // Langmuire. 2001. Vol. 17. P. 7687-7693.

76. Baca H.K., Carnes E., Singh S., et.al. Cell-directed assembly of bio/nano interfaces: A new scheme for cell immobilization // Acc. Chem. Res. 2007. Vol. 40. P. 836-845.

77. Chen H., Langer R., Edwards D.A. A film tension theory of phagocytosis // J. Colloid Interface Sci. 1997. Vol. 190. P. 118-133.

78. Zhao F., Zhao Y., Liu Y., et al. Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials // Small. Vol. 7. P. 1322-1337.

79. Bhattacharjee S., Ershov D., Fytianos K., et al. Cytotoxicity and Cellular Uptake of Tri-Block Copolymer Nanoparticles with Different Size and Surface Characteristics // Particle and Fibre Toxicology. 2012. Vol. 9. N.11.

80. Lai S.K., Hida K., Man S.T., et al. Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway // Biomaterials. 2007. Vol.

81. Izumrudov V., Kargov S., Zhiryakova M., et al. Competitive reactions in solutions of DNA and water-soluble interpolyelectrolyte complexes // Biopolymers. 1995. Vol. 35. N. 5. P. 523-531.

82. Sergeev-Cherenkov A., Antipina M., Yurova T., et al. Low-dimensional hybrid organic-inorganic nanostructures via planar DNA-amphiphilic polycation complexes // Surface Science. 2004. Vol. 566. P. 659-663.

83. Туршатов А.А. Монослои Ленгмюра на основе некоторых статистических сополимеров. дис...канд. хим. наук: 02.00.06 - Нижний Новгород, 2001 - 107 с.

84. Кусков А.Н., Куликов П.П., Лусс А.Л., и др. Получение полимерных наночастиц самоорганизацией производных амфифильного поли-N-винилпирролидона в водной среде // Журнал прикладной химии. 2016. Т.89. № 9. С. 1461-1468.

85. Горячая А.В. Водорастворимые функциональные амфифильные полимеры: дис …канд. хим. наук: 02.00.06. – Москва, 2009. – 133 с.

86. McFarland J.W., Pariser R. Consumption of mecraptan chain transfer agents in cloroprene polymerization // J.App.Pol. Sci. 1963. Vol.7. P. 675-683.

87. Mallik K.L. Tertiary-octyl mercaptan as a chain transfer agent in emulsion polymerisation of styrene at low temperature // Naturwissenschaften. 1958. Vol.55. I.16. P. 385-385.

88. Zhang X.J., Wang J.P., Zhang X.X., et al. The Effects of the Chain Transfer Agent (Dodecyl Mercaptan) on the Morphologies and Thermal Properties of Nanocapsules Containing n-Octadecane // Sci. of Adv. Mat. 2013. Vol. 5. I. 3. P. 254-259(6).

89. Лусс А.Л., Куликов П.П., Кусков А.Н., Штильман М.И. Амфифильные полимерные наночастицы для генного транспорта на основе сополимеров N-винилпирролидона // Успехи в химии и химической технологии, Т. 31, № 11(192), С. 64-66

90. Лешин В.В., Радбиль Т.И., Сорокина Г.Н., и др. Полимеризация метилметакрилата до глубоких степеней превращения в присутствии н-додецилмеркаптана // Физико-химические основы синтеза и переработки полимеров. 1986. С. 18-22.

91. Kuskov A.N., Shtil'man M.I., Tsatsakis A.M., et al. Synthesis of amphiphilic N-vinylpyrrolidone and acrylamide polymers of various // J.Appl. Chem. 2005. Vol. 78. N. 5. P. 806-810.

92. Sizova O.Yu., Mezhuev Ya.O., Kulikov P.P., et al. Solubilization of prothionamide with micelles of an amphiphilic acrylic acid oligomer with thiohexyl terminal groups and preparation of postoperative cavity filling formulations // Russian Journal of Applied Chemistry. 2017. Vol. 90. N. 6. P. 910-914

93. Borodko Y., Habas S.E., Koebel M., et al. Probing the interaction of poly(vynilpyrrolidone) with platinum nanocrystals by UV-Raman and FTIR // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110. P. 23052- 23059.

94. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография. М.: Мир, 1976. 538 с.

95. Дятлов В.А. Акрилимидобразующие полимеры: синтез, свойства и применение: Дис …д-ра хим. наук: 02.00.06. – Москва, 2015. – 496 с.
96. Chingnell C.F., Bilski P., Reszka K.J. Spectral and photochemical properties of curcumin // Photochem Photobiol. 1994. Vol. 59. I. 3. P. 295-302.
97. Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy // Particle and Fibre Toxicology. 2005. P. 2-8.
98. Arcaro A., Wymann M.P. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role 3,4,5-triphosphate in neutrofil responses // Biochem J.1993. Vol. 296. P. 297-301.
99. Daxhelet G.A., Coene M.M., Hoet P.P., Cocito C.G. Spectrofluorometry of dyes with DNAs of different base composition and conformation // Anal. Biochem. 1989. Vol. 179. P. 401-403.
100. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // Nature methods. 2012. Vol.9. N.7. P 676-682.
101. Ding H.-M., Ma Y.-Q. Interaction between Janus particles and membranes // Nanoscale. 2012. Vol. 4. P. 1116-1122.
102. Savic R., Luo L., Eisenberg A., Maysinger D. Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles // Science. 2003. Vol. 300. I. 5619. P. 615-618.
103. Alexeev A., Uspal W.E., Balazs A.C. Harnessing Janus nanoparticles to create controllable pores in membranes // ACS Nano. 2008. Vol. 2. I. 6. P. 1117-1122.
104. Han H. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction // Nanomedicine. 2016. Vol. 11. P. 673–692.
105. Verma A., Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions // Small. 2010. Vol. 6. N. 1. P.12-21.
106. Madani F., Lindberg S., Langel U., et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides // J. Biophys. 2011. 414729.

107. Heitz F., Morris M.C., Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics // Br. J. Pharmacol. 2009. Vol. 157. N.2. P.195–206.

108. Luss A.L., Kulikov P.P., Romme S.B. et al. Nanosized carriers based on amphiphilicpoly-N-vinyl-2-pyrrolidone for intranuclear drug delivery // Nanomedecine. 2018. Vol. 13. I. 7. P. 703-715.

109. Luss A.L., Andersen C.L., Benito I.G. et al. Drug delivery platform based om amphiphilic poly-N-vinyl-2-pyrrolidone: the role of size distribution in cellular uptake // Biophysical Journal. Vol. 114. I.3. P. 278-279.

110. Fojan P., Gurevich L. Atomic Force Microscopy Study of the Interactions of Indolicidin with Model Membranes and DNA // Antimicrobial Peptides. 2017. Vol. 1548. P. 201-205.

111. Horcas I., Fernandez R., Gomez- Rodriguez J.M., Colhero J., Gomez-Herrero J., Baro A.M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology // Rev Sci Instrum. 2007. P. 78.

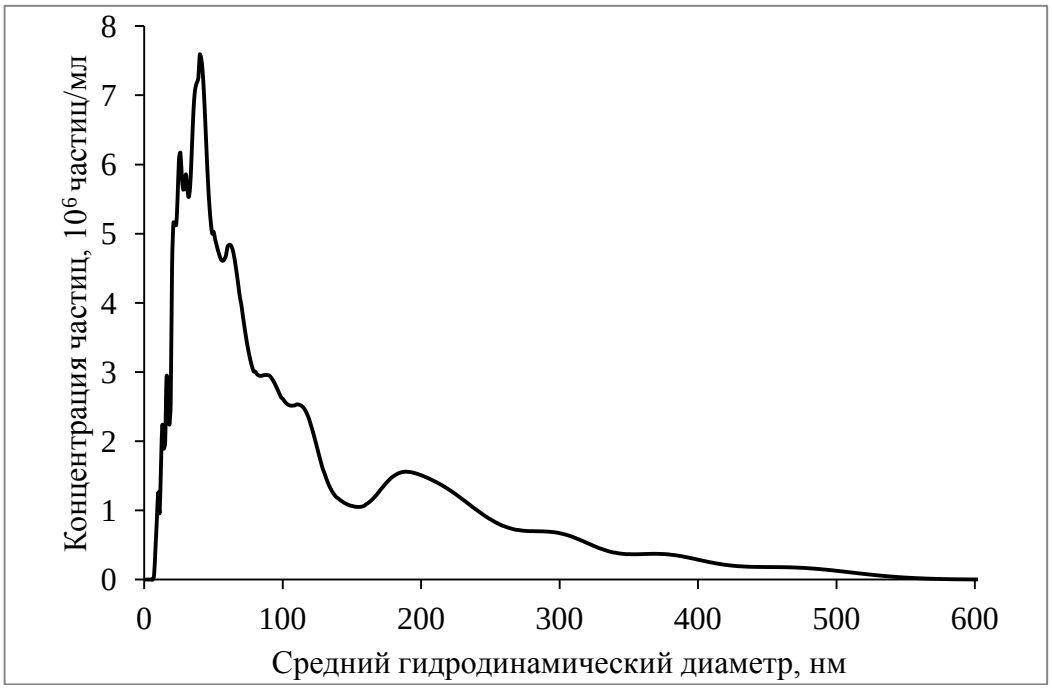
112. Dunn K.W., Kamocka M.M., McDonald J.H, Practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2011. Vol. 300. N. 4. P.723-742.

Приложение А

Исследование основых характеристик частиц

Размер частиц, полученных диализным методом

Код полимера	Способ получения	Средний гидродинами-ческий диаметр, нм	Мода, нм	Содержание иммобили-зованного куркумина, % мас	ζ-потенциал, мВ	Мода, %
ПВП-ОД 6000	Диализ	167	86	6.4	-4.2	49.6

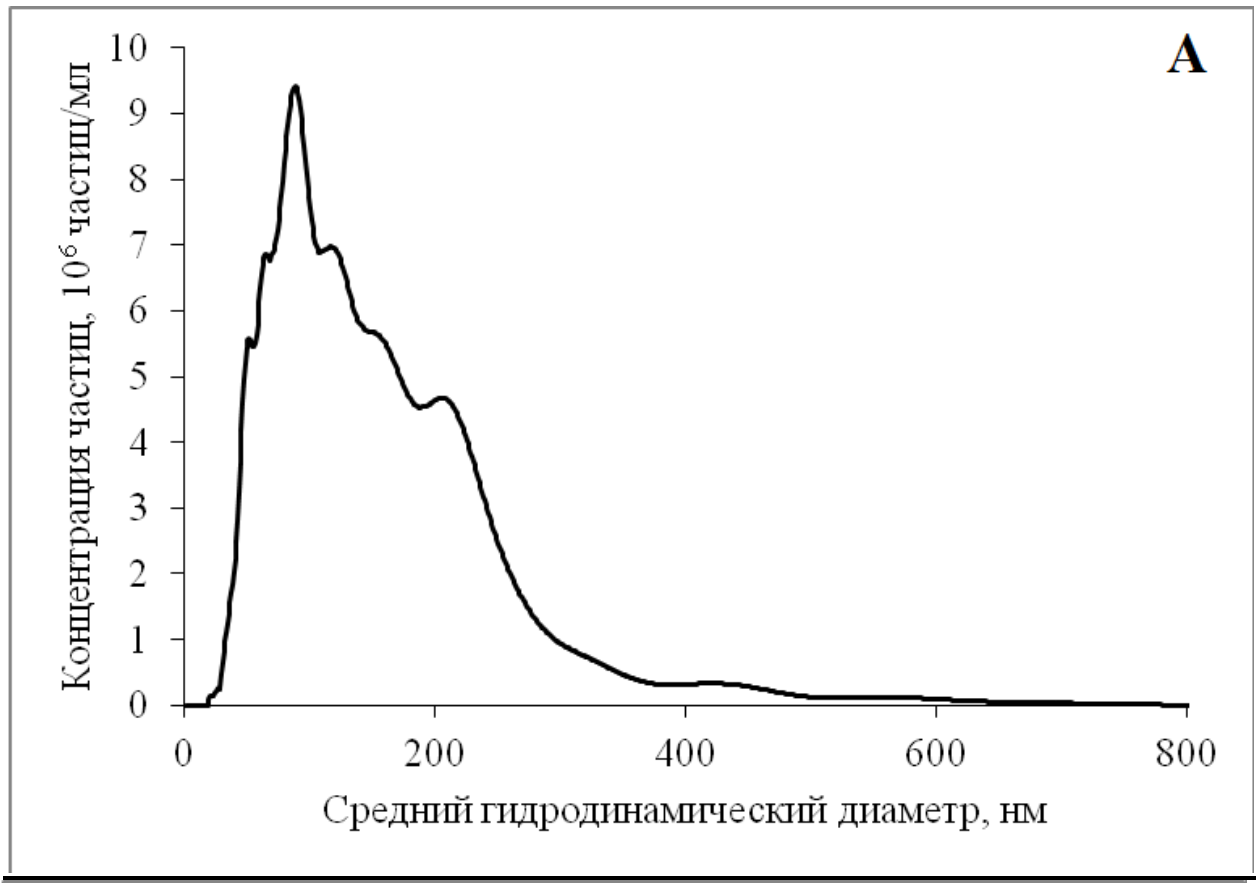


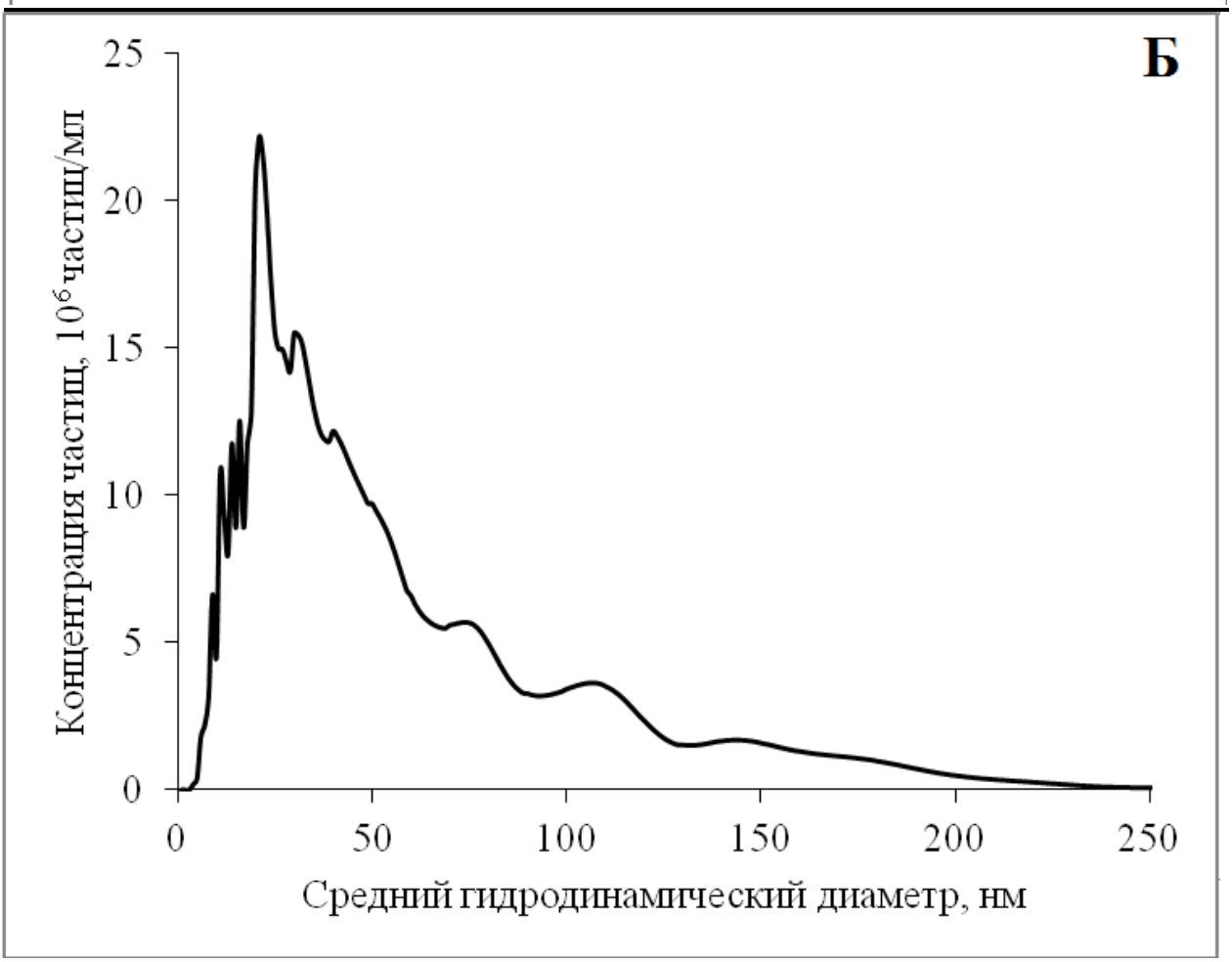
Размер частиц, полученных эмульсионным методом

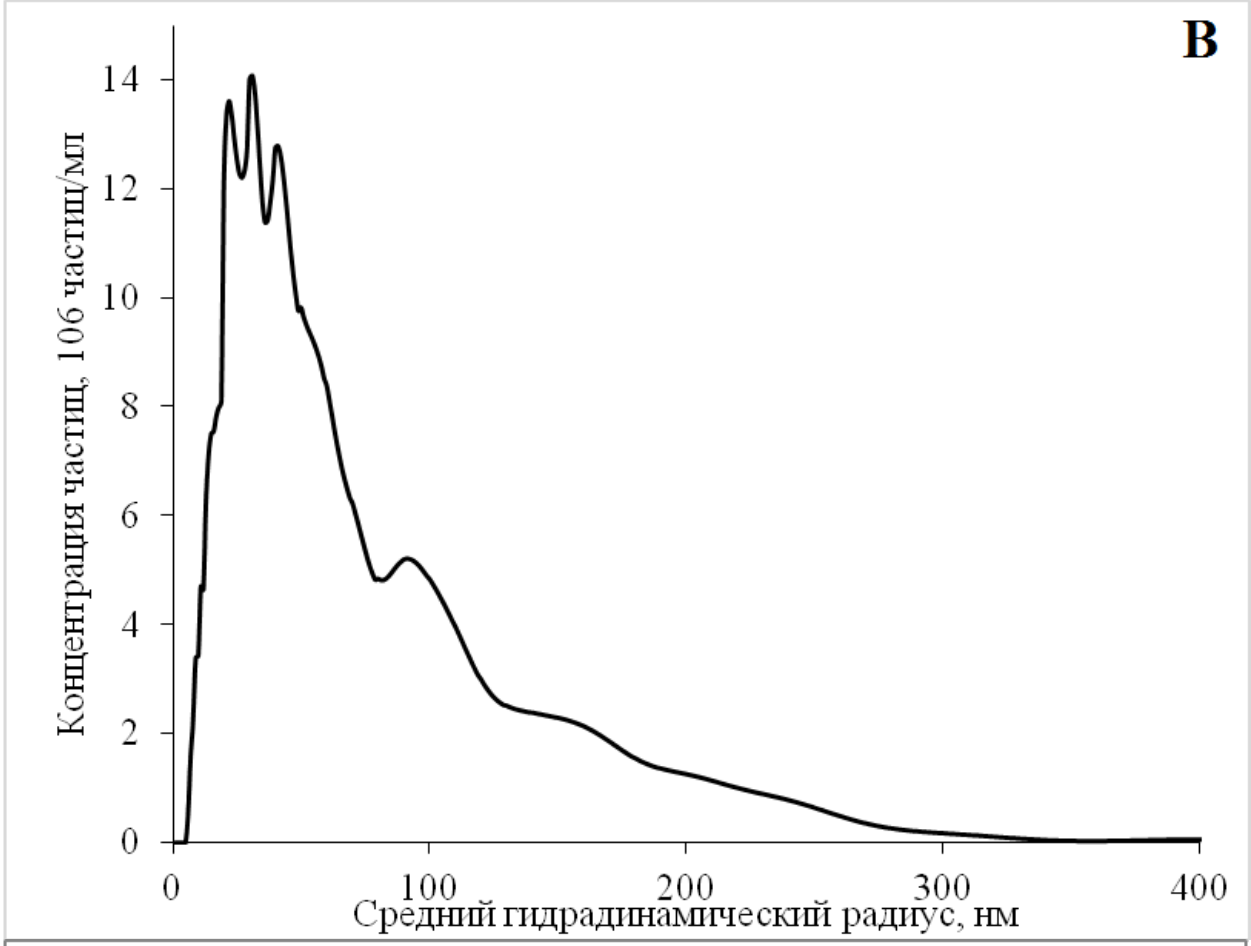
Код полимера	Способ получения	Средний гидродинами-ческий диаметр, нм	Мода, нм	Содержание иммобили-зованного куркумина, % мас	ζ-потенциал, мВ	Мода, %
ПВП-ОД 6000	Эмульсия	202	167	8,7	-4	82,2

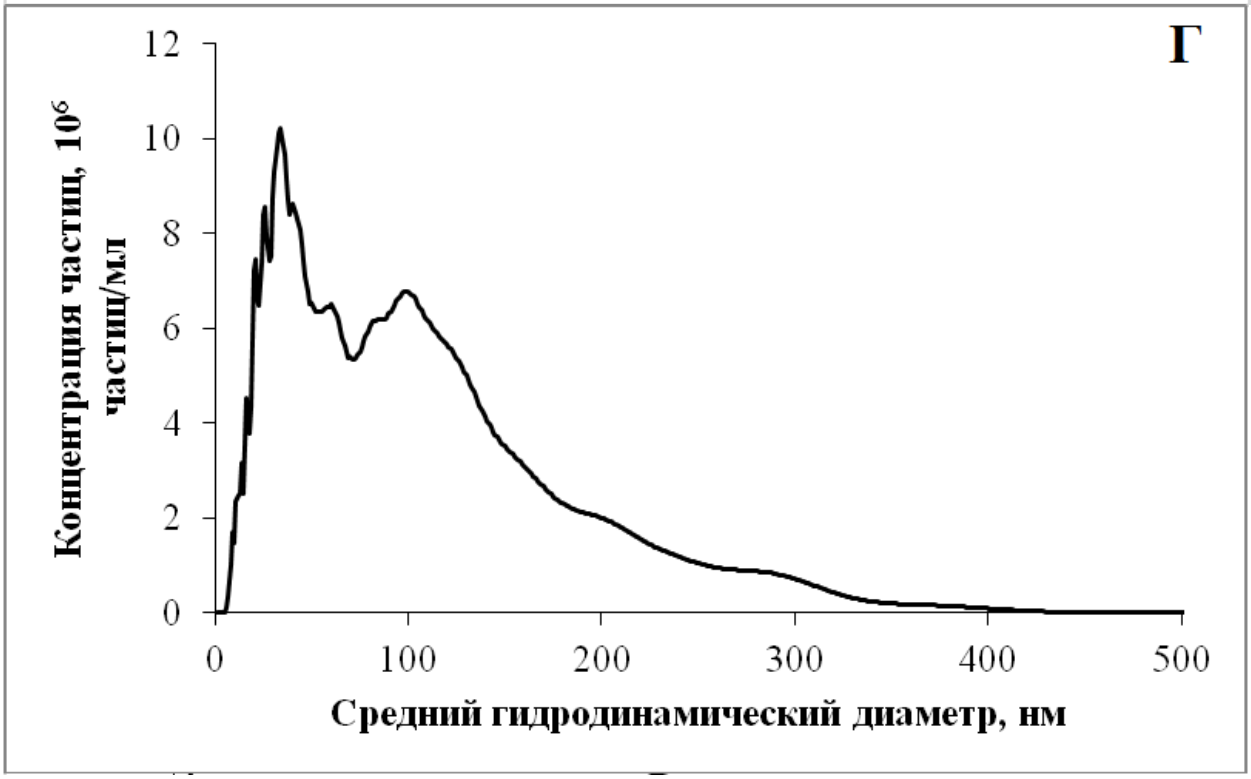
Размер частиц, полученных суспензионным методом

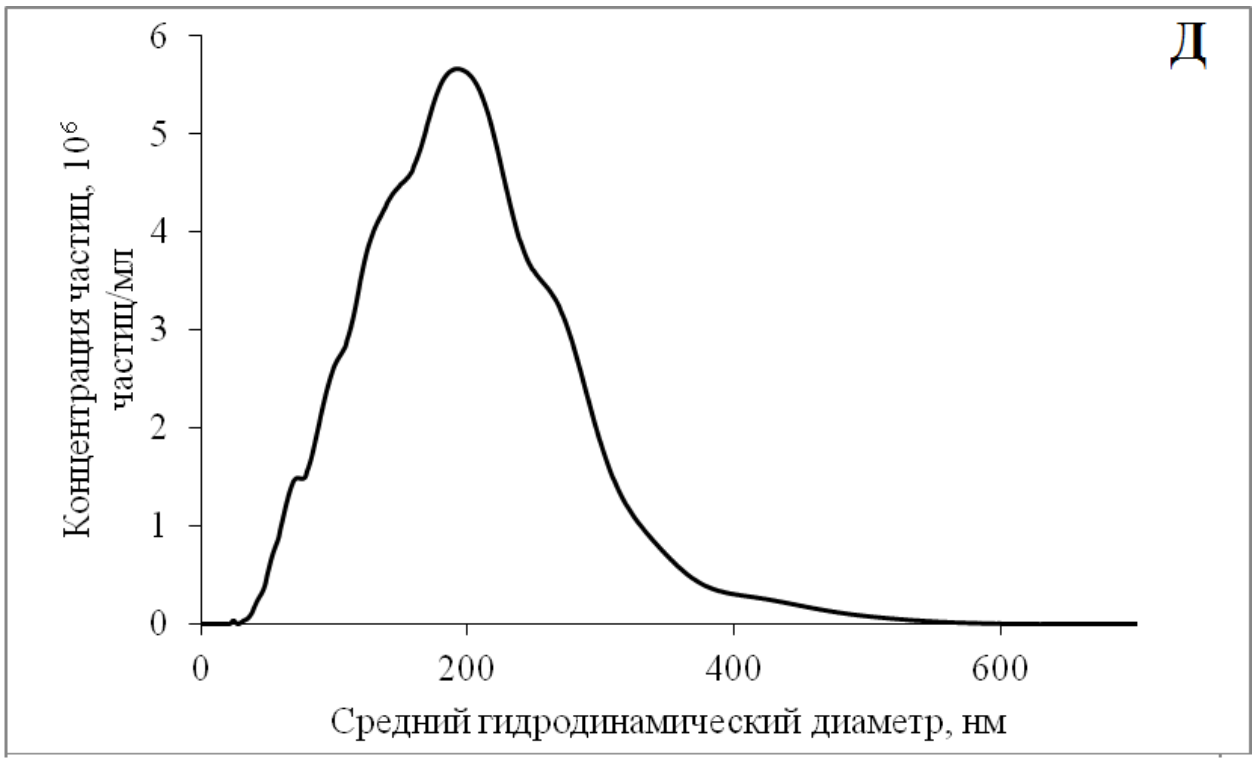
Код полимера	Способ получения	Средний гидродинами-ческий диаметр, нм	Мода, нм	Содержание иммобили-зованного куркумина, % мас	ζ-потенциал, мВ	Мода, %
ПВП-ОД 1000 (А)	Суспензия	160	89	6,1	-2.76	33,3
ПВП-ОД 3500 (Б)	Суспензия	63	21	8,4	-3.47	61,8
ПВП-ОД 6000 (В)	Суспензия	73	30	8,5	-4	58,26
ПВП-ОД 12000 (Г)	Суспензия	110	34	8,3	-4.32	20,2
ПВП-ОД 6000 Ц (Д)	Суспензия	200	170	7,8	-	50,2


А
Концентрация частиц, 10^6 частиц/мл
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
200
400
600
800
Средний гидродинамический диаметр, нм


Б
Концентрация частиц, 10^6 частиц/мл
25
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
250
Средний гидродинамический диаметр, нм

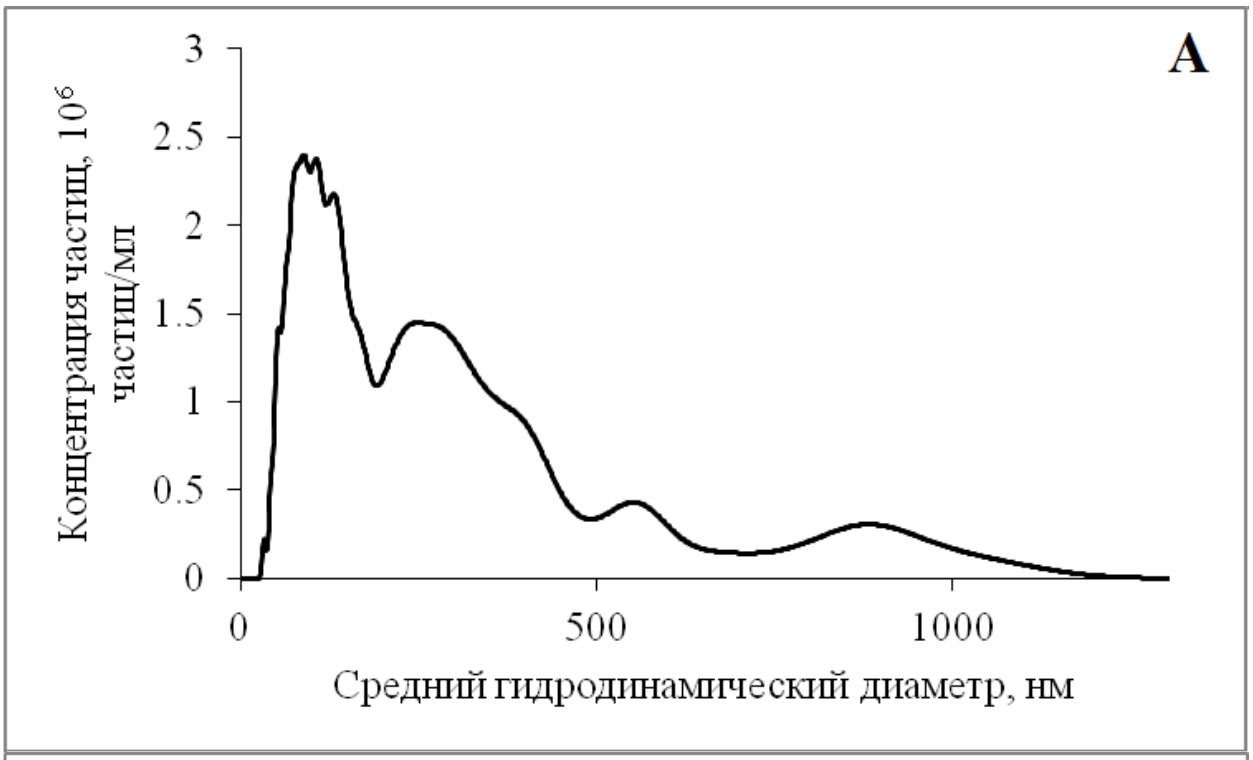

В
Концентрация частиц, 106 частиц/мл
0
2
4
6
8
10
12
14
0
100
200
300
400
Средний гидрадинамический радиус, нм

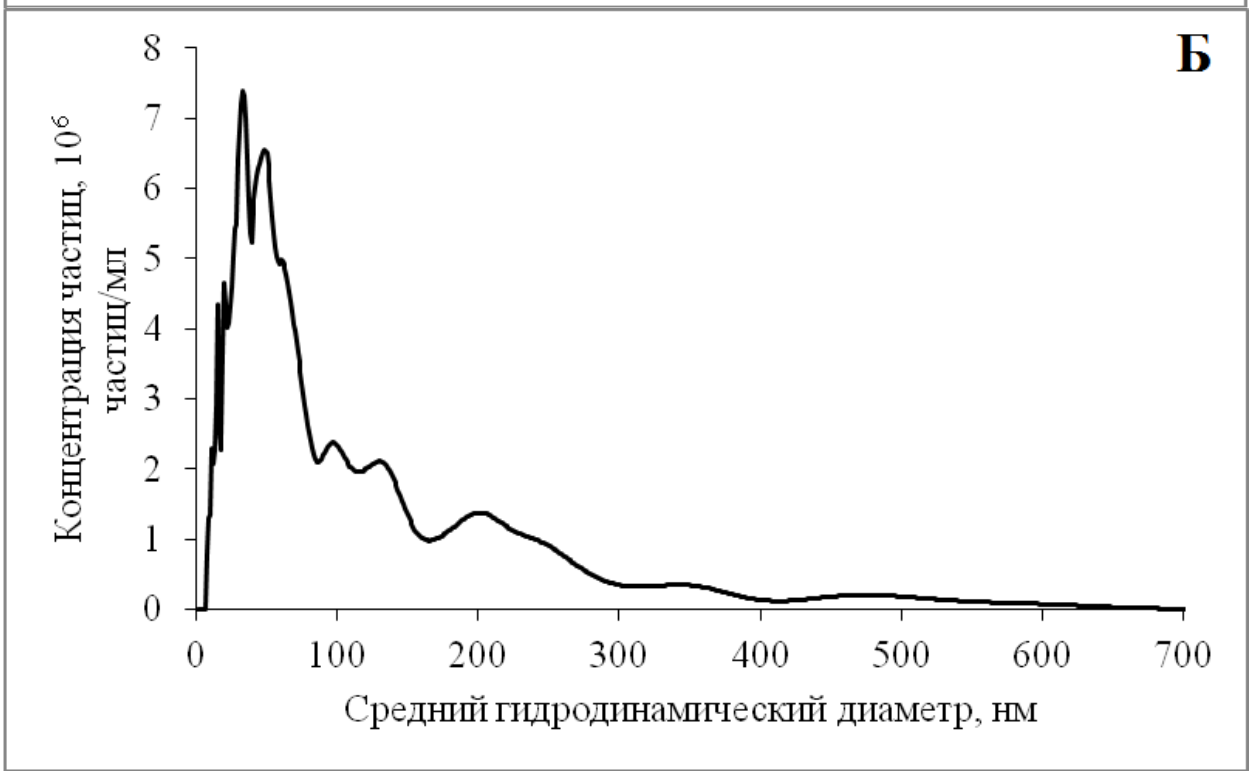

Г
Концентрация частиц, 10⁶ частиц/мл
0
2
4
6
8
10
12
0
100
200
300
400
500
Средний гидродинамический диаметр, нм

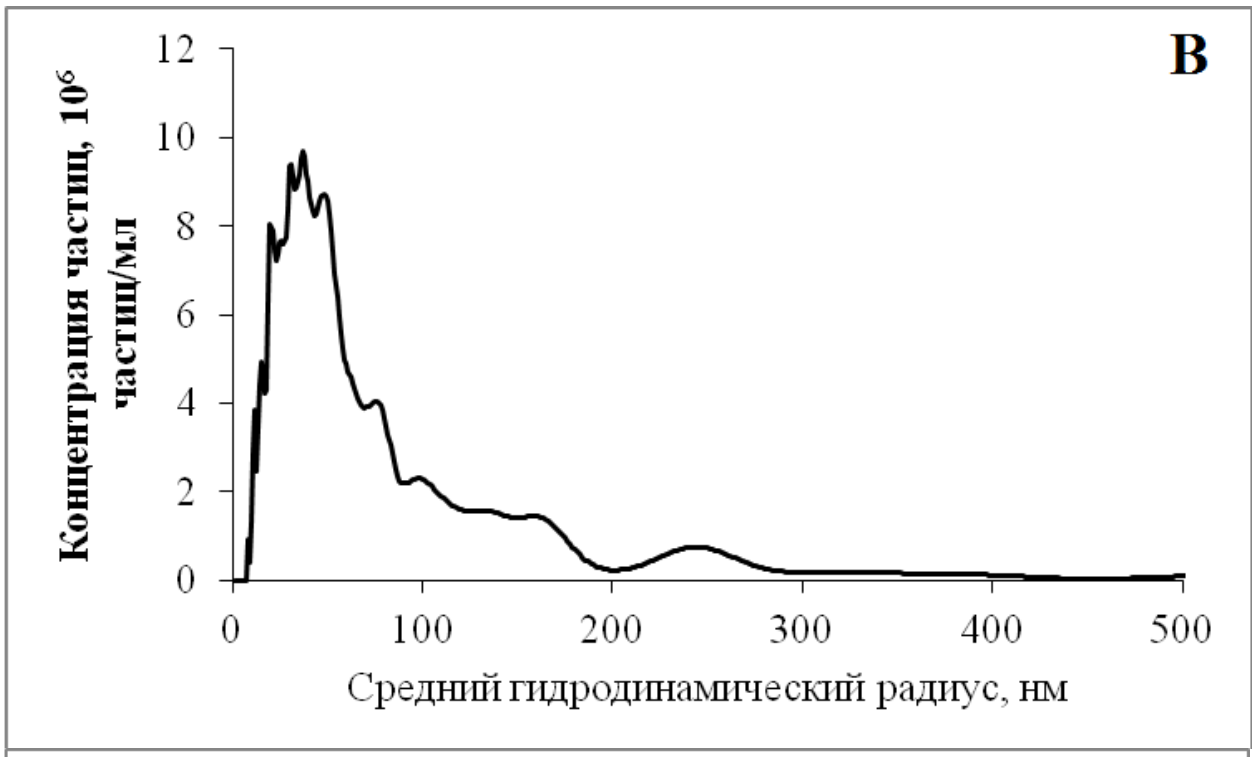


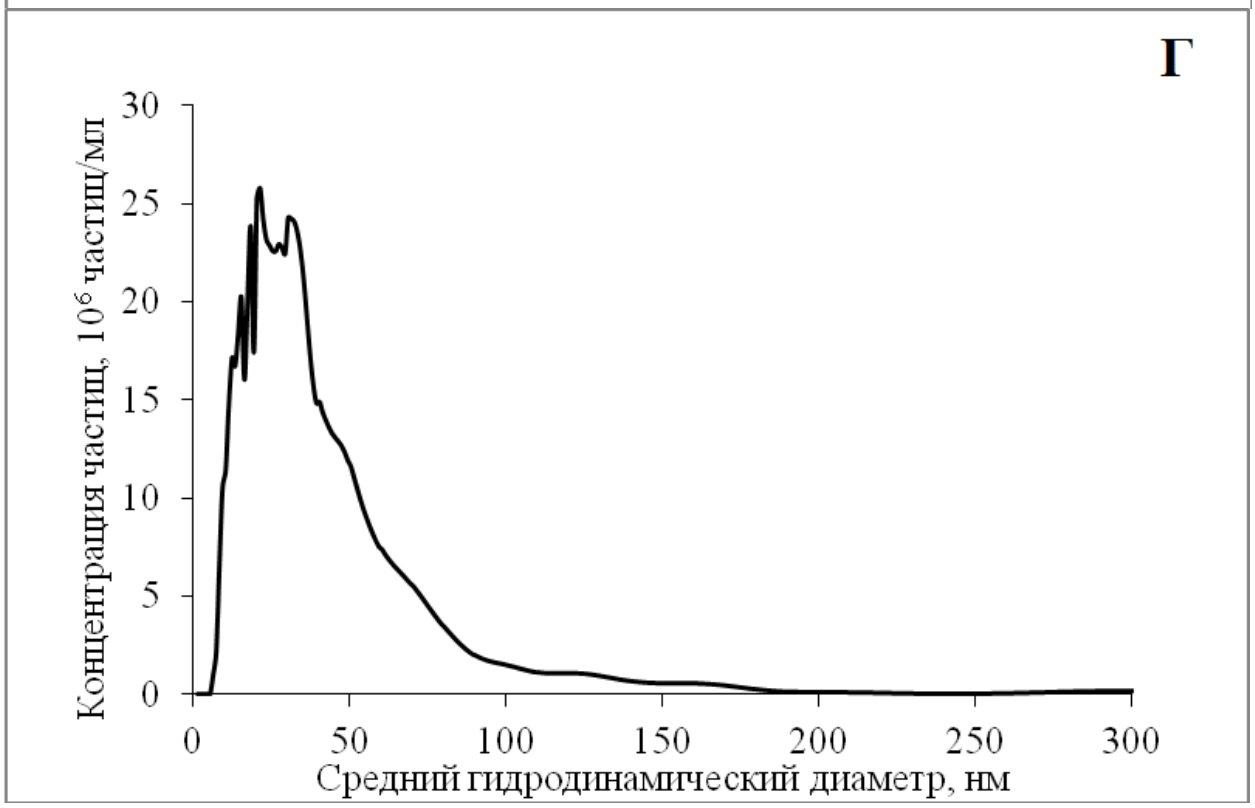
Размер пустых водонаполненных частиц, полученных прямым растворением

Код полимера	Способ получения	Средний гидродинами-ческий диаметр, нм	Мода, нм	ζ-потенциал, мВ	Мода, %
ПВП-ОД 1000 (А)	0.044	328	88	-2.06	38,9
ПВП-ОД 3500 (Б)	0.054	163	33	-2.31	32,6
ПВП-ОД 6000 (В)	0.065	105	37	-2.81	58,6
ПВП-ОД 12000 (Г)	0.087	46	21	-2.44	50,17


А
Концентрация частиц, 10^6 частиц/мл
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
500
1000
Средний гидродинамический диаметр, нм


Б
Концентрация частиц, 10^6 частиц/мл
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
100
200
300
400
500
600
700
Средний гидродинамический диаметр, нм


В
Концентрация частиц, 10⁶ частиц/мл
12
10
8
6
4
2
0
0
100
200
300
400
500
Средний гидродинамический радиус, нм


Г
Концентрация частиц, 10⁶ частиц/мл
30
25
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
250
300
Средний гидродинамический диаметр, нм