

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЛЬВІВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЯКОВІВ МАРІЯ ВАСИЛІВНА

УДК 541.64; 544.773.432; 66.095.26-922.3

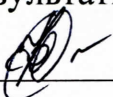
ДИСЕРТАЦІЯ

Амфільні флуоресцеїнвмісні кополіестери N-похідних глутамінової кислоти
одержані за реакцією Стегліха

02.00.06 - хімія високомолекулярних сполук

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 М.В. Яковів

Науковий керівник



Варваренко Сергій Миколайович

доктор хімічних наук, старший науковий
співробітник

Ідентичність всіх примірників дисертації

ЗАСВІДЧУЮ:

Вчений секретар спеціалізованої

вченої ради Д 35.052.01, д.х.н. проф.



/ О. Г. Будішевська /

Львів-2019

АНОТАЦІЯ

Яковів М.В. Амфифільні флуоресцеїнмісні кополіестери N-похідних глутамінової кислоти одержані за реакцією Стегліха. – Кваліфікована наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.06 - Хімія високомолекулярних сполук. – Національний університет “Львівська політехніка”, Львів, 2019.

Дисертація присвячена синтезу незворотньою поліконденсацією за реакцією Стегліха амфифільних кополіестерів на основі природних амінокислот, поліетердіолів і флуоресцеїну, та комплексному дослідженню їх структури, колоїдно-хімічних та біохімічних властивостей, як перспективної основи для створення полімерних систем транспорту ліків з функцією візуалізації.

У першому розділі наведено огляд нанорозмірних систем доставки ліків. Наведений перелік вимог, які висуваються до полімеру біомедичного призначення. Показано, що сучасний розвиток систем транспорту ліків пов'язаний із створенням багатофункційних структур, які окрім функції носія наділяються також властивостями націлювання в зону патології і візуалізації.

Описано методи надання носіям діагностичних властивостей і показано, що найбільш доцільним є використання кополімерів, які містять ковалентно зв'язані хромофорні фрагменти здатні до флуоресценції.

Проаналізовано можливості флуоресцентної візуалізації систем доставки та обумовлено природу та властивості фрагмента-репортера і методи введення його в структуру полімерів. На основі проведеного огляду літератури сформовано мету дослідження.

У другому розділі наведено характеристики речовин, які використовуються у роботі, описано методики їх очистки, а також методики досліджень та аналізів.

Третій розділ присвячений розробленню методики синтезу амфифільних кополіестерів – псевдополіамінокислот, які містили би хромофорні групи, здатні до флуоресценції, і, разом з тим, зберігали баланс властивостей, притаманний наноносіям. Для цього були проведені дослідження перебігу незворотньої

поліконденсації за реакцією Стегліха флуоресцеїну, як гідроксилвмісного комономеру та 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти, як карбоксилвмісного комономеру, і вперше синтезовано кополіестер, що містить флуоресцеїн, як повторювану ланку. На основі детального вивчення структури отриманих кополіестерів було виявлено особливості реакції Стегліха при кополіконденсації флуоресцеїну та основні чинники, які мають вплив на її перебіг. Це створило передумови для одержання через реакцію незворотньої кополіконденсації за Стегліхом біосумісних кополіестерів більш складної амфифільної будови, в якій флуоресцеїн був використаний як один з комономерів і включений у структуру макромолекули, у якості флуоресцентної мітки.

Підтверджено структури та охарактеризовано ряд отриманих амфифільних кополіестерів N-похідних глутамінової кислоти і поліетердіолів з хромофорними групами флуоресцеїну в макроланцюгу. Методами ^1H ЯМР спектроскопії, високоефективної SEC хроматографії досліджено особливості структури флуоресцеїнівмісних кополіестерів їх молекулярно-масові розподіли та функціональність в залежності від умов одержання та природи комономерів.

У четвертому розділі наведено результати досліджень колоїдно-хімічних властивостей нових амфифільних флуоресцеїнівмісних кополіестерів. Показано, що такі амфифільні кополіестери понижають поверхневий натяг і здатні утворювати у водному розчині самостабілізовані дисперсії наночастинок.

Вперше проведені комплексні дослідження поверхневої активності отриманих флуоресцеїнівмісних кополіестерів у водних середовищах, розмірів частинок і стабільності їх дисперсій в залежності від природи мономерних ланок, їх співвідношення та вмісту флуоресцеїну у кополіестері. Встановлено, що фракції олігомерів, які відрізняються ступенем поліконденсації у складі кополіестерів близькі за складом мономерів і проявляють схожі поверхнево-активні властивості. Водні дисперсії нових флуоресцеїнівмісних амфифільних кополіестерів містять частинки дисперсної фази гідродинамічний діаметр яких, в залежності від природи мономерних ланок, їх співвідношення у кополіестері, та

концентрації становить від 50 до 400 нм і характеризуються бімодальним розподілом за розмірами, який не змінюється у температурному діапазоні 20÷45°C.

У розділі наведені результати дослідження солюбілізації частинками водних дисперсій амфифільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів малорозчинних у воді сполук на прикладі судану (III) та куркуміну. Встановлено, що величина солюбілізаційної ємності дисперсій отриманих кополієстерів залежить від їх складу і природи солюбілізату.

Проведено оцінку ліпофільності нових флуоресцеїнвмісних амфифільних кополієстерів розрахунковими (виходячи із складу) та експериментальними методами (виходячи із коефіцієнту перерозподілу) і їх гідрофільно-ліпофільного балансу (HLB) для прогнозування характеру їх біорозподілу в залежності від природи мономерних ланок та структури макромолекул. В результаті проведених досліджень встановлено, що синтезовані кополієстери характеризуються значеннями $\log P_{o/w}$ в межах від -0,5 до 0,5, що свідчить про їх спорідненість як з водною так і з ліпофільною фазами, що є одним з важливих факторів, які визначають перспективність амфифільних сполук при створенні та дослідженні систем транспорту ліків.

Наведено результати досліджень залежності агрегативної стійкості дисперсій флуоресцеїнвмісних кополієстерів у воді та водних розчинах бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Встановлено, що синтезовані кополієстери здатні утворювати комплекси з альбуміном, що супроводжується зміною стабілізації частинок їх дисперсної фази в залежності від складу макромолекул. Включення флуоресцеїну в структуру макромолекул кополієстерів приводить до зменшення їх здатності до сорбції альбуміну у порівнянні з аналогами у яких флуоресцеїн відсутній. При цьому кополієстери у комплексі з сорбованим альбуміном зберігають здатність до перерозподілу у ліпофільну фазу n-октанолу. Значення їх гідрофільно-ліпофільного балансу у комплексі з сорбованим альбуміном не зазнає суттєвої зміни і це може свідчити про здатність до збереження властивостей наноносіїв при їх введенні у організм.

У п'ятому розділі наведено результати досліджень нових амфифільних кополієстерів на основі N-ацилпохідних глютамінової кислоти та полієтердіолів, макромолекули яких містять ковалентно зв'язаний флуоресцеїн, а також їх окремих складових *in vitro* на живих клітинах. За результатами цих досліджень показано, що флуоресцеїнмісні кополієстери, при однакових з поширеними блоккополімерами типу «Плюронік значеннями HLB, характеризуються значно вищими значеннями їх нетоксичної для клітин концентрації. Вперше встановлено взаємозв'язок структури і складу кополієстерів з параметрами, які визначають рівень їх нетоксичності. Встановлено, що із збільшенням молекулярної маси гідрофільного фрагмента PEG у складі кополієстеру збільшується концентрація, при якій цитотоксичності не спостерігається.

Оцінено здатність амфифільних кополієстерів до проникнення в живі клітини і можливість забезпечення контролю за цим процесом, використовуючи ефект люмінісценції флуоресцеїну, який вивільняється внаслідок гідролітичних процесів розкладу кополієстеру всередині клітини.

Вивчення впливів флуоресцеїнмісних кополієстерів на функціональний та структурний стан печінки та нирок лабораторних тварин дозволило зробити висновок про їх безпечність для організму та можливість використання, як самостійних біохімічних маркерів, так і в складі наносистем транспорту ліків для їх маркування та дослідження властивостей.

Ключові слова: флуоресцеїнмісні кополієстери, реакція Стегліха, незворотня кополіконденсація, системи доставки ліків, полімерні міцели, поверхнево-активні речовини, амфифільні полімери біомедичного призначення.

ABSTRACT

Yakoviv M.V. Amphiphilic fluorescein-containing copolyesters of N-derivatives of glutamic acid obtained by the Steglich reaction. - On the rights of the manuscript.

The thesis for obtaining a degree of Candidate of Sciences in Chemistry (PhD), speciality 02.00.06 «Chemistry of High-Molecular Compounds» – Lviv Polytechnic National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Lviv, 2019.

The dissertation is devoted to the irreversible polycondensation synthesis by the Steglich reaction of amphiphilic copolyester based on natural amino acids, polyether diols and fluorescein, and a comprehensive study of their structure, colloid chemical and biochemical properties as a perspective basis for the creation of polymer systems for the transport of drugs with visualization function.

In the first chapter provides an overview of nanosized drug delivery systems. Given a list of requirements for biomedical polymer. It is shown that modern growth in the creation of drug transport systems is associated with the creation of multifunctional structures, which, in addition to the deliver's function, are also endowed with targeting and visualization properties.

Described the methods for providing diagnostic properties to carriers and it is shown that the most expedient is the use of co-polymers containing covalently bounded chromophore fragments capable to fluorescence.

Analyzed the possibilities of fluorescence visualization of delivery systems and explained the nature and properties of the fragment-reporter and methods of its introduction into the structure of polymers. Based on the literature review was formulated the purpose of the study.

The second chapter describes the characteristics of the substances used in the work, also describes the methods of their purification and the methods of research and analysis.

The third chapter is devoted to the development of a synthesis method of the amphiphilic copolyester – pseudo-poly(amino) acids containing chromophore groups that are capable to fluorescence, and, at the same time, retained the balance of properties inherent for nano-carriers. For this purpose, were performed studies of the irreversible polycondensation by the Steglich reaction of fluorescein, as a hydroxyl-containing comonomer and 2-(dodecanoylamino)pentanedioic acid as a carboxyl-containing comonomer and for first time was synthesized the copolyester containing fluorescein as a repeating link. Based on detailed study of the structure of the obtained copolyesters, were revealed the features of the Steglich reaction during co-polycondensation of fluorescein and the main factors influencing this process. It created the prerequisites for

obtaining a biocompatible copolyesters with more complex amphiphilic structure, in which fluorescein was used as one of the co-monomers and included into the structure of the macromolecule, as a fluorescent label, through the irreversible copolycondensation by Steglich reaction.

The structures were confirmed and were characterized a number of obtained amphiphilic copolyester of N-derivatives of glutamic acid and polyether diols with chromophoric fluorescein groups in the macrochain. Using the methods of ^1H NMR spectroscopy, high-performance SEC chromatography were studied the peculiarities of the structure of fluorescein-containing copolyesters, their molecular mass distribution and functionality, depending on the obtaining conditions and nature of co-monomers.

In the fourth chapter are represented the results of research of colloid-chemical properties of new amphiphilic fluorescein-containing copolyesters. It is shown that such amphiphilic copolyesters reduce the surface tension and are capable to form in self-stabilized dispersion of nanoparticles in aqueous solution.

For the first time were performed complex studies of surface activity of fluorescein-containing copolyesters in aqueous media, particle size and stability of their dispersions, depending on the nature of monomer units, their ratio and fluorescein content in copolyester.

It has been established that the fractions of oligomers, which differ in the degree of polycondensation in the co-polyester, are similar in composition with monomers and exhibit similar surface-active properties. The aqueous dispersions of the new fluorescein-containing amphiphilic copolyesters contain particles of a disperse phase whose hydrodynamic diameter, depending on the nature of the monomer units, copolyester ratio, and a concentration has a 50 to 400 nm, and characterized by a bimodal distribution in size that does not change in the temperature range $20 \div 45^\circ\text{C}$.

In the chapter are given the results of the solubilization study of water-soluble compounds on the example of Sudan (III) and curcumin by particles of the dispersed phase of aqueous dispersions of amphiphilic fluorescein-containing copolyesters. It has been established that the amount of solubilization capacity of dispersions obtained from copolyester depends on their composition and the nature of solubilizate.

Performed an assessment of lipophilicity of new fluorescein-containing amphiphilic copolyesters by calculated (based on composition) and experimental methods (based on the coefficient of redistribution) and their hydrophilic-lipophilic balance (HLB) to predict the nature of their biodistribution, depending on the nature of the monomer units and the structure of the macromolecules. As a result of the research, it was found that the synthesized copolyesters is characterized by values of $\log P_{o/w}$ in the range from -0.5 to 0.5, which testifies their affinity for both water and lipid phases, which is one of the important factors that determine promising of amphiphilic compounds in the creation and research of drug delivery systems.

Presented the results of investigations of dependence of the aggregate stability of dispersions of fluorescein-containing copolyesters in water and aqueous solutions of bovine serum albumin. Established that synthesized copolyesters are capable to form complexes with albumin, which is accompanied with change of stabilization of particles of dispersed phase, depending on the composition of macromolecules. The inclusion of fluorescein into the structure of the copolyesters macromolecules leads to a decrease of their ability to absorb albumin compared to those in which fluorescein is absent. In this case, copolyesters in complex with sorbed albumin retains the ability to redistribute the lipophilic phase of n-octanol. The value of their hydrophilic-lipophilic balance in the complex with sorbed albumin will not undergo a significant change, and this may indicate the ability to save the properties of nano-carriers when they are introduced into the body.

The fifth chapter presents the results of studies of new amphiphilic co-polyesters based on N-acyl derivative of glutamic acid and polyether diols, whose macromolecules contain covalently bounded fluorescein, and their individual components in vitro on living cells. According to the results of these studies, it has been shown that fluorescein-containing copolyesters, with such a commonly used block co-polymers as "Pluronic" are characterized with values of HLB, considerably higher of their non-toxic concentrations for cells. For the first time is established the connexion between the structure and composition of copolyesters with parameters that determine their level of non-toxicity. It has been found that fluorescein-containing co-polyesters containing

polyether diols with more than 1000 Da molar mass contributes an increase of cell survival compared to control group.

Evaluated the ability of amphiphilic copolyesters to penetrate into living cells and the possibility to provide a control over this process, using the luminescence effect of fluorescein that liberate as a result of hydrolytic processes of the copolyesters degradation in the cell.

The study of the effects of fluorescein-containing copolyester on the functional and structural status of the liver and kidneys of laboratory animals made it possible to conclude that they are safe for the organism and they are able to be used as independent biochemical markers, as well as in the drug nanosystems for marking them and studying their properties.

Key words: fluorescein-containing copolyesters, Steglich reaction, irreversible polycondensation, drug delivery systems, polymeric micelles, surfactants, amphiphilic polymers for biomedical purpose.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Дослідження амфіфільних властивостей кополієстерів з хромофорними групами в системі вода-октанол / **М. В. Ференс**¹, Н. В. Фігурка, Т. М. Василюшин, О. В. Майкович, С. М. Варваренко // Chemistry, Technology and Application of Substance=Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2018. Vol.1, № 1. Р. 145–151. (*Особистий внесок: дослідження перерозподілу кополієстерів в системі вода-октанол, обговорення результатів, написання статті*).
2. Модифікація поліакриламідних гідрогелів із застосуванням поверхнево-активних псевдополіамінокислот / **М. В. Ференс**, В. Ф. Кір'янчук, А. В. Вороновська, С. М. Варваренко, С. А. Воронов // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2016. № 841. С. 444–450. (*Особистий внесок: синтез псевдополіамінокислот, дослідження їх колоїдно-хімічних характеристик, обговорення результатів*).

¹ Прізвище **Ференс** змінено на **Яковів** у зв'язку з одруженням.

3. Флуоресцеїновмісні тераностики на основі псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення лікарських засобів. / С. М. Варваренко, В. Я. Самарик, В. В. Влізло, Д. Д. Остапів, Н. Г. Носова, І. Т. Тарнавчик, Н. В. Фігурка, **М. В. Ференс**, М. І. Нагорняк, Р. С. Тарас // Полімерний журнал. 2015. Т. 37, № 2. С. 193–199. (*Особистий внесок: дослідження поверхнево-активних властивостей флуоресцеїновмісних псевдополіамінокислот, обговорення результатів, участь у написанні статті*).

4. Флуоресцеїновмісні кополіестери глютамінової кислоти та поліетердіолів / **Ференс М. В.**, Н. Г. Носова, Н. В. Фігурка, С. М. Варваренко, В. Ф. Кір'янчук, С. А. Воронов // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2015. № 812. С. 443–448. (*Особистий внесок: синтез флуоресцеїновмісних кополієстерів, обговорення результатів, участь у написанні статті*).

5. Реакційна здатність гідроксильних груп зі складу сахарози в реакції Стегліха / М. І. Нагорняк, В. Я. Самарик, **М. В. Ференс**, І. А. Дронь. Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2015. № 812. С. 69–73. (*Особистий внесок: інтерпретація спектральних даних, обговорення результатів, участь у написанні статті*).

6. Amphiphilic aminofuncional diesterethers as dispersed system stabilizers / **M. V. Ferens**, N. G. Nosova, N. V. Fihurka, I. A. Dron, S. M. Varvarenko // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». 2014. № 787: Хімія, технологія речовин та їх застосування. С. 358–361. (*Особистий внесок: дослідження поверхнево-активних властивостей отриманих дієстеретерів, обговорення результатів, участь у написанні статті*).

Статті у наукових фахових виданнях України, які входять до міжнародних наукометричних баз:

7. Researches of amphiphilic properties of copolyesters with chromophore groups / **Mariia Yakoviv**, Nataliia Fihurka, Nataliya Nosova, Volodymyr Samaryk, Taras Vasylyshyn, Svitlana Hermanovych, Stanislav Voronov, Sergiy Varvarenko // Chemistry & Chemical Technology. 2018. Vol. 12, № 3. P. 318–325. (*Особистий*

внесок: одержання кополієстерів, дослідження їх властивостей, обговорення результатів, написання статті)

8. Одержання кополієстерів флуоресцеїну і 2-(додеканоїламіно)пентадіонової кислоти за реакцією Стегліха / С. М. Варваренко, **М. В. Ференс**, В. Я. Самарик, Н. Г. Носова, Н. В. Фігурка, Д. Д. Остапів, С. А. Воронов // Вопросы химии и химической технологии. 2018. № 2 (117). С. 5–15. *(Особистий внесок: виконання експериментальної роботи, обговорення результатів, написання статті)*

9. Characteristics of novel polymer based on pseudo-polyamino acids GluLa-DPG-PEG600: binding of albumin, biocompatibility, biodistribution and potential crossing the blood-brain barrier in rats / В. О. Chekh, **M. V. Ferens**, D. D. Ostapiv, V.Y.Samaryk, S.M. Varvarenko, V.V.Vlizlo // The Ukrainian Biochemical Journal. 2017.Vol. 89, iss. 4. P. 13–21. *(Особистий внесок: синтез псевдополіамінокислот різної структури, обговорення результатів, участь у написанні статті)*

10. Modification of polysaccharides by N-derivatives of glutamic acid using Steglich reaction / Mykhailo Nagornyak, Natalia Figurka, Volodymyr Samaryk, Serhiy Varvarenko, **Maria Ferens**, Victoria Oleksa // Chemistry & Chemical Technology. 2016. Vol. 10, № 4. P. 423–427. *(Особистий внесок здобувача: виконання частини експериментальної роботи, інтерпретація спектральних даних, обговорення результатів)*

Статті у закордонних виданнях, які входять до міжнародних наукометричних баз даних:

11. A study of an irreversible condensation of glutamic acid and polyoxyethylene/polyoxypropylene diols using thionyl chloride / Nataliia Fihurka, Ihor Tarnavchuk, Volodymyr Samaryk, Sergiy Varvarenko, Nataliya Nosova, Andriy Voronov, Mykhaylo Nagornyak, **Mariia Ferens**, Stanislav Voronov // Organic Preparations and Procedures International. 2018. Vol. 50, iss. 5. P. 502–508. *(Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

Статті у інших наукових періодичних виданнях України:

12. GluLa-DPG-PEG600 nanopolymer binds proteins and spreads to rats' organs and tissues / В. О. Chekh, **M. V. Ferens**, Y. V. Martyn, D. D. Ostapiv, V. V. Vlizlo.

Біологічні студії=Studia Biologica. 2016. Т. 10, № 3/4. С. 17–24. *(Особистий внесок здобувача: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

13. Nanopolymer GluLa-DPG-PEG600-F can Penetrate into Cells and Deposit in Rats Body / В. Chekh, **M. Ferens**, N. Susol, S. Varvarenko, D. Ostapiv, V. Vlizlo // Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Біологічні науки. 2016. № 12. С. 138–142. *(Особистий внесок: синтез флуоресцеїнвмісних кополієстерів, обговорення результатів)*

14. Functional and structural state of rats' kidneys and liver under the influence of nanopolymer based on pseudopolyamino acids / В. О. Chekh, **M. V. Ferens**, Y. V. Martyn, D. D. Ostapiv, V. V. Vlizlo // Біологія тварин= The Animal biology. 2016. Т. 18, № 3. С. 107–113. *(Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів, участь у написанні статті)*

Патенти на корисну модель:

15. № 119660 Спосіб одержання амфіфільних кополієстерів природних двоосновних амінокислот та поліалкілендіолів розгалуженої будови та дисперсних середовищ на їх основі / Самарик В.Я., Тарас Р.С., Нагорняк М.І., Соловйова О.О., Козак І. А., Варваренко С.М., Носова Н.Г., **Ференс М.В.**, Воронов А.С., Тарнавчик І.Т., Воронов С.А. Патент опубліковано 10.10.2017, бюл. № 19/2017 *(Особистий внесок: апробація методик синтезу, синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

16. № 98749 Спосіб одержання кополієстерів двоосновних α -амінокислот та поліетергліколів / Варваренко С.М., Самарик В.Я., Воронов А.С., Носова Н.Г., Тарнавчик І.Т., Фігурка Н.В., Дронь І.А., **Ференс М.В.**, Нагорняк М.І., Тарас Р.С., Воронов С.А. Патент опубліковано 12.05.2015, бюл. № 9/2015 *(Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

Публікації у збірниках матеріалів та тез доповідей міжнародних і вітчизняних наукових конференцій:

17. **Mariia Yakoviv**, Olha Maikovych, Stanislav Voronov, Pamela Pasetto, Sergiy Varvarenko Multi-functional self-fluorescent micelles for controlled drug delivery and bioimaging // EastWest Chemistry Conference 10-12 October, 2018, Lviv, p. 111

18. **Yakoviv M.V.**, Nosova N.G., Samaryk V.Y., Varvarenko S.M., Pasetto P. Study of physical interactions of amphiphilic copolyester of fluorescein with albumin in aqueous dispersions // International conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018), 27 - 30 August, Kyiv, P.398.
19. **Yakoviv M.V.**, Pasetto P., Varvarenko S.M. Researches in amphiphilic properties of copolyesters with chromophore groups // II Всеукраїнська науково-практична конференція "Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості"–Херсон: ХНТУ, Україна, 22-23 травня 2018, с.35-36
20. **Яковів М.В.**, Варваренко С.М. Дослідження амфифільних властивостей кополієстерів з хромофорними групами в системі вода-октанол // II Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи», - Житомир, Україна, 16 травня, 2018, с.338
21. Василюшин Т.М., **Яковів М.В.**, Фігурка Н.В., Остапів Д.Д., Варваренко С.М. Синтез та властивості афифільних кополієстерів з спеціальними властивостями // XIX Міжнародна конференція студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії", – Київ, Україна, 22-24 травня, 2018,с.140.
22. Olha Maikovych, **Maria Ferens**, Taras Vasylyshyn, Serhiy Varvarenko. Porous polyacrylamide hydrogels – preparation and properties // 20th JCF-Frühjahrssymposium Jung Chemiker Forum, Konstanz, Germany, 2018, March 21st – 24th, p. 216.
23. **Ференс М. В.**, Варваренко С. М., Фігурка Н. В., Майкович О. В. Особливості кополіконденсації флуоресцеїну в умовах реакції Стегліха // I Міжнародна (XI Українська) наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених “Хімічні проблеми сьогодні 2018” – Вінниця, Україна, 27–29 березня, 2018, с.336.
24. **Ференс М.В.**, Майкович О.В., Берчук Н.С., Стасюк А.В., Василюшин Т.М. Застосування амінофункційних дієстерів глютамінової кислоти для створення парфумерно-косметичних засобів // IV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених і студентів «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості»–Херсон: ХНТУ, Україна, 30-31 жовтня, 2017, с. 61

25. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Nataliya Nosova, Nataliia Berchuk, Semen Khomyak, Stanislav Voronov. Amphiphilic fluorescent copolyesters for monitoring in drug delivery // IX International conference in chemistry Kyiv-Toulouse (ICKT-9), Kyiv, Ukraine, June 4-9, 2017, p.52.
26. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Stanislav Voronov and Dmytro Ostapiv. Copolyesters based on natural aminoacids with special properties for drug delivery system // 19th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium), Mainz, Germany, 2017, March 29th - April 1st, p. 106.
27. **Ференс М.В.**, Носова Н.Г., Кірянчук В.Ф., Вороновська А.В., Варваренко С.М., Воронов С.А. Поверхнево-активні поліестеретери та композиції гідрогелів на їх основі // Міжнародна науково-технічна конференція «Сучасні технології одержання та переробки полімерних матеріалів», Львів, Україна, 21-23 вересня, 2016, С.98.
28. **Ференс М.В.**, Тарас Р.С., Товарницький А.І., Варваренко С.М. Синтез нанорозмірного магнетиту, модифікованого структурованими псевдополіамінокислотами поліестерного типу для доставки лікарських препаратів // III Міжнародна науково-практична конференція «Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво», Шостка, Україна, 23-25 листопада 2016 р., С. 104.
29. **Марія Ференс**, Сергій Варваренко, Володимир Самарик, Наталія Носова, Анна Вороновська, Станіслав Воронов, Богдан Чех, Дмитро Остапів. Флуоресцеїновмісні псевдополіамінокислоти – нові наносистеми для транспорту ліків // II Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми хімії та хімічної технології», Національний університет харчових технологій, Київ, Україна, 21-23 листопада 2016 р., С. 156-157
30. Voronovska A., Tovarnitskyi A., Zelenyak O., Ranevska M., Stasiuk A., **Ferens M.**, Fihurka N., Tarnavchuk I. Poly(ethylene glycol) and poly(propylene glycol) – containing aminofunctional copolyesters for biomedical application // International youth science forum «LITTERIS ET ARTIBUS», Lviv, Ukraine, 24-26 November 2016, P. 442.

31. Тарас Р.С., Нагорняк М.І., **Ференс М.В.**, Солодкий І.Т., Варваренко С.М., Самарик В.Я. Одержання амфифільних кополієстерів природних двоосновних амінокислот та поліалкілендіолів розгалуженої будови// Міжнародна науково-технічна конференція «Сучасні технології одержання та переробки полімерних матеріалів», Львів, Україна, 21-23 вересня, 2016, С.96.
32. **Ференс М.В.**, Нагорняк М.І., Цап В.Р., Варваренко С.М. Амінофункційні кополієстери із спеціальними властивостями для систем доставки ліків //XXIV Українська конференція з органічної хімії, Полтава, Україна, 19-23 вересня, 2016, С. 261.
33. **M.V. Ferens**, S.M. Varvarenko, B.O. Chekh, N.G. Nosova, A.V. Panchenko. The introduction of fluorescein into the structure of pseudo-poly(amino acids) and study of their colloidal-chemical properties // International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO – 2016), Lviv, Ukraine, August24-27, 2016,p.68.
34. **Mariia Ferens**, Roman Taras, Iryna Kozak, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Bogdan Chekh. Synthesis nanoscale magnetite, modified structured pseudopolyaminoacids polyester type for the delivery of drugs // 18th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium), Kiel, Germany, 2016, March 16-19, p. 184.
35. Chekh B. O., **Ferens M.**, Vlizlo V. V. Testing of P-116 based of nano-polymer system containing pseudo polyamino acids.// Abstrsct book for Conference for young scientist 2015, Kyiv, 2015, p. 117.
36. **Ференс Марія**, Кір'янчук Василина, Варваренко Сергій, Носова Наталя, Панченко Анна, Воронов Станіслав. Синтез та дослідження властивостей тераностичних систем доставки ліків з флуоресцеїновим фрагментом // Тези доповідей II Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми хімії та технології органічних хрещовин» (APCTOS2).-Львів,Україна, 5–7 листопада 2015 р. С. 79.
37. **Марія Ференс**, Наталя Носова, Анна Панченко, Василина Кір'янчук, Сергій Варваренко, Станіслав Воронов. Флуоресцеїновмісні системи транспорту ліків на основі кополієстерів глютамінової кислоти та поліетердіолів // Тези доповідей XV

наукової конференції “Львівські хімічні читання – 2015”. - м.Львів, 24–27 травня 2015 р. - С. 130.

38 **Ferens M.V.**, Ilchuk V.V., Nagornyak M.I., Panchenko A.V., Varvarenko S.M., Samaryk V.J. Synthesis and study of surface-active properties of aminofuncional fluorescent copolyesters. // Abstracts of the All-Ukrainian scientific-practical conference "The concept of sustainable development and its implementation," Ternopil, Ukraine, 2015, April 16-18, P.126-127.

39. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Nataliia Fihurka, Stanislav Voronov. Synthesis of novel psevdopoly(amino acid)s with fluorescein fragments and study of their properties // 17th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium), Munster, Germany, 2015, March 25-28, p. P2-034.

40. R.S.Taras, **M.V. Ferens**, V.Y. Samaryk, M.I.Nagornyak , V.V. Ilchuk, S.A.Voronov. Getting cross-stitched polyester type psevdopoliaminoacid.// VIII Ukrainian-Polish Conference “Polymer sofspecial applications” Bukovel, Ukraine, October 1-4, 2014.

41. **Mariia Ferens**, Nataliya Nosova, Iryna Dron, Viktoriya Ilchuk, Sergiy Varvarenko. Aminofuncional diesterethers as stabilizers dispersed phase. VIII Ukrainian-Polish Conference “Polymer sofspecial applications” Bukovel, Ukraine, October 1-4, 2014.

42. Nagornyak Mykhaylo, Fihurka Natalia, **Ferens Mariia**. Polyesters based on glutamic acid as potential polymer for biomedical application.// 16th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium), Jena, Germany, 2014, March 26-29, p. 181.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень.....	20
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1.	28
1.1. Нанорозмірні частинки.....	28
1.1.1. Наночастинки на основі амфифільних полімерів.....	30
1.2. Молекулярна візуалізація за допомогою флуоресценції.....	39
1.5. Методи введення барвників у полімери.....	44
1.5.1. Зв'язування за рахунок фізичних взаємодій.....	44
1.5.2. Зв'язування за рахунок ковалентного приєднання.....	45
1.5.3. Полімеризація мономерів-барвників.....	46
1.5.4. Полімер-аналогічні реакції модифікування полімерів молекулами барвника.....	46
1.5.5. Одержання похідних окремих хромофорів з високою молекулярною масою.....	47
1.5.6. Реакції поліконденсації та/або перехресного зв'язування відповідних барвників/похідних барвників.....	47
РОЗДІЛ 2. Вихідні речовини, методики проведення синтезів та аналізів.	50
2.1. Вихідні речовини, матеріали та їх характеристики.....	50
2.2. Методики проведення синтезів і експериментів.....	52
2.2.1. Методика одержання поліестерів флуоресцеїну за реакцією Стегліха ...	52
2.2.2. Методика одержання статистичних флуоресцеїнвмісних кополіестерів за реакцією Стегліха.....	52
2.3. Методики проведення аналізів.....	53
2.3.1. Визначення вмісту флуоресцеїну в полімері.....	53
2.3.2. ПМР-спектроскопія.....	54
2.3.3. ІЧ-спектроскопія.....	54
2.3.4. Ексклюзійна хроматографія.....	55

2.3.5. Визначення ефективного гідродинамічного радіусу та ζ - потенціалу частинок у дисперсіях кополієстерів.....	55
2.3.6. Визначення поверхневого натягу речовин та критичної концентрації міцелоутворення.	55
2.3.7 Визначення коефіцієнту розподілу макромолекул амінофункційних кополієстерів у бінарній системі вода- октанол.	55
2.3.8. Визначення гідрофільно-ліпофільного балансу (HLB) кополієстерів....	56
2.3.9 Дослідження сольобілізації малорозчинних у воді барвників дисперсіями кополієстерів.....	56
2.3.10. Методика дослідження перерозподілу Судану III з водного розчину полімера в октанол	57
2.3.11 Дослідження вивільнення флуоресцеїну при гідролізі флуоресцеїнвмісних кополієстерів.....	57
2.3.12. Дослідження сорбції альбуміну розчинами кополієстерів.....	58
2.3.13. Фракціонування флуоресцеїнвмісних кополієстерів методом діалізу .	58
2.3.14. Дослідження цитотоксичності флуоресцеїнвмісних кополієстерів.....	58
РОЗДІЛ 3. Особливості синтезу кополієстерів флуоресцеїну за реакцією Стегліха	60
3.1. Особливості синтезу простих кополієстерів флуоресцеїну.....	61
3.2 Синтез статистичних амфифільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів за реакцією Стегліха	84
3.2.1. Визначення флуоресцеїну, який є кінцевою ланкою кополієстеру	100
3.2.2. Дослідження молекулярно-масового розподілу отриманих кополієстерів	102
РОЗДІЛ 4. Колоїдно-хімічні властивості флуоресцеїнвмісних кополієстерів	108
4.1. Поверхнево-активні властивості амфифільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів	108
4.2. Впливу складу кополієстерів на поверхнево-активні властивості та стабільність їх дисперсій.	119
4.3. Дослідження розміру частинок дисперсної фази.	123
4.4. Вплив температури на розмір частинок дисперсної фази	126

4.5.Солубілізація нерозчинних у воді речовин міцелами флуоресцеїновмісних кополієстерів	127
4.6.Дослідження амфифільних властивостей кополієстерів з хромофорними групами.....	137
4.7. Вивчення гідролітичних властивостей флуоресцеїновмісних кополієстерів	146
4.8.Зв'язування альбуміну з наночастинками флуоресцентних кополієстерів .	148
Розділ 5. Напрямки практичного застосування одержаних амфифільних флуоресцеїновмісних кополієстерів	158
5.1. Нові олігомерні похідні флуоресцеїну як перспективні засоби для створення діагностикумів в біохімічних дослідженнях	158
5.1.1.Вивчення цитотоксичності кополієстерів	159
5.1.2.Зв'язок фізико-хімічних властивостей кополієстерів з їх цитотоксичністю	170
5.2. Дослідження взаємодії флуоресцеїновмісних кополієстерів з живими клітинами <i>in vitro</i>	175
5.3.Використання флуоресцеїновмісних кополієстерів як маркерів для вивчення поширення дисперсних систем транспорту ліків.....	177
Висновки.....	181
Список використаної літератури	183
Додаток.....	202

Перелік умовних позначень

1.	GluSt	2-(октадеканоїламіно)пентандіова кислота (N-стеароїлглутамінова кислота)
2.	GluLa	2-(додеканоїламіно)пентандіова кислота (N-лауреїлглутамінова кислота)
3.	DCC	N,N-дициклогексилкарбодимід
4.	DCU	N,N-дициклогексилсечовина
5.	DMAP	4-(N,N-диметиламіно)піридин
6.	ДМФА	N,N-диметилформахід
7.	PEG	Поліоксиетиленгліколь
8.	DPG	Діоксипропіленгліколь
9.	DEG	Діетиленгліколь
10.	F або Ф	Флуоресцеїн
11.	ККА	Критична концентрація агрегатоутворення
12.	ККМ	Критична концентрація міцелоутворення
13.	$C_{\text{ннк}}$	Значення найбільшої нетоксичної концентрації
14.	C_{50}	Концентрація, при якій спостерігається загибель половини клітин
15.	ІЧ	Інфрачервона спектроскопія
16.	ПМР	Спектроскопія протонного магнітного резонансу
17.	НЛВ (ГЛБ)	Гідрофільно-ліпофільний баланс
18.	ТШХ	Тонкошарова хроматографія
19.	ММР	Молекулярно-масовий розподіл
20.	ММ	Молекулярна маса
21.	BSA	Бичачий сироватковий альбумін
22.	FDA	Food and Drug Administration (Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів)
23.	PBS	Фосфатно-сольовий буферний розчин
24.	НЧ	Наночастинки
25.	QD	Квантові точки
26.	SANS	Малокутове розсіювання нейтронів
27.	ПАР	Поверхнево-активні речовини

ВСТУП

Останнім часом спостерігається інтенсивний розвиток технологій, які пов'язані з наноб'єктами різної природи, насамперед, у галузі фармації і медицини. В цих галузях на особливу увагу заслуговують дисперсні системи наночастинок на основі амфифільних полімерів завдяки притаманним їм унікальним фізико-хімічним властивостям. Полімерні наночастинки, як носії, продемонстрували значне покращення терапевтичної ефективності лікарських препаратів і широко досліджуються, як компоненти систем транспорту та вивільнення ліків. На відміну від інших типів наночастинок, в залежності від природи і властивостей, полімерні носії можуть конструюватися із здатністю орієнтуватись на певні органи, тканини чи клітини і, в кінцевому рахунку, біологічно розкладатися з мінімальною системною токсичністю. Цікавим також є розроблення наномедичних форм, у яких поєднуються можливості терапії та діагностики захворювань. Таке завдання щораз частіше ставлять за мету у дослідженнях, які проводяться на стику таких наукових галузей як хімія, фармацевтика і медицина. Основною перевагою таких полімерних наночастинок є те, що вони не обмежені тільки доставкою і вивільненням терапевтичних сполук, а здатні також забезпечувати надання інформації про їх поширення в живих тканинах, що дозволяє контролювати ефективність доставки терапевтичних засобів.

Значна кількість літературних даних вказує на те, що задовільняти вимоги, які ставлять до наносіїв, можуть полімери, отримані методом поліконденсації, такі, наприклад, як амфифільні кополіестери (т.зв. псевдополіамінокислоти) на основі N-похідних двоосновних природних амінокислот. Цей клас полімерів завдяки біодеградабельності, нетоксичності, біосумісності, є одним з найбільш перспективних для біомедичного використання. Введення в структуру таких полімерів хромофорних груп (флуоресцентних) із збереженням заданого балансу їх колоїдно-хімічних властивостей є актуальним завданням оскільки відкриває широкі можливості для створення нових багатофункційних полімерних наносистем доставки ліків та дослідження їх ефективності.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Тема дисертації відповідає науковому напрямку кафедри хімічної технології переробки пластмас: теоретичні і прикладні аспекти одержання, модифікування, суміщення і переробки функціоналізованих (ко)полімерів, полімерних (нано)композитів, гідрогелів; розроблення технологій одержання виробів (литтєвих, конструкційних, ізоляційних, оптичних, плівкових, мембран, імплантантів, лікарських форм, клейових, адгезивів, синтетичних волокон, тканин і технологічних рідин) зі спеціальними властивостями. Дисертація виконана в межах науково-дослідних робіт: «Конструювання тераностиків на основі макромолекул псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення терапевтичних препаратів» (2013-2014) держ. реєстр. № 0113U003183; «Конструювання нано- і мікрочастинок ад'ювантів на основі блок-кополімерів природних амінокислот та поліетердіолів для створення вакцин» (2015-2017) № держреєстрації 0115U000442; "Функціональна мімікрія людської шкіри прищепленими до полімерної поверхні гібридними гідрогелями біополімерів для лікування її ушкоджень великої площі" (2018-2019) № держреєстрації 0118U000262. Автор дисертаційної роботи є одним з виконавців цих тем. Частина експериментального дослідження була проведена здобувачем під час стажування у Інституті Молекул і Матеріалів в м. Ле Ман (грант від Посольства Франції в Україні «Короткострокові стажування у Франції для молодих українських науковців»), а також під час стажування у Гданському технологічному університеті у рамках програми ERASMUS+ та міжуніверситетської угоди між Національним університетом «Львівська політехніка» та Гданським технологічним університетом (Польща).

Мета і завдання дослідження. Метою є встановлення закономірностей та розроблення синтезу нових амфифільних кополієстерів N-похідних глютамінової кислоти з поліетердіолами і флуоресцеїном незворотньою поліконденсацією за реакцією Стегліха, вивчення їх властивостей та дослідження водних дисперсій створених на їх основі.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

- обґрунтувати вибір флуоресцентного комономеру та дослідити особливості синтезу поліестерів флуоресцеїну при його нерівноважній поліконденсації з 2-(додеканоїламіно)пентадіоювою кислотою за реакцією Стегліха;
- синтезувати за реакцією Стегліха нові амфифільні кополіестери N-похідних глутамінової кислоти з поліетердіолами різної природи і молекулярної маси та флуоресцеїном, підтвердити їх структуру та встановити особливості реакції Стегліха при синтезі кополіестерів з використанням флуоресцеїну;
- провести комплексні дослідження фізико-хімічних властивостей у рядах кополіестерів, синтезованих на основі різних N-ацилпохідних глутамінової кислоти та поліетердіолів і флуоресцеїну та оцінити їх здатність понижувати поверхневий натяг водних розчинів, утворювати самостабілізовані дисперсії у воді з частинками визначених розмірів, солюбілізувати та вивільняти модельні ліпофільні сполуки;
- встановити взаємозв'язок будови та складу амфифільних кополіестерів із стабільністю водних дисперсій на їх основі, закономірностями їх перерозподілу в системі вода-октанол та гідролітичного розкладу з вивільненням флуоресцеїну та впливу на ці процеси водорозчинних білків плазми крові;
- провести дослідження цитотоксичності амфифільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів, оцінити ступінь їх впливу на живі клітини в залежності від складу кополіестерів та їх колоїдно-хімічних характеристик;
- продемонструвати шляхи практичного використання флуоресцеїнвмісних кополіестерів для візуалізації полімеру носія в живих клітинах та тканинах організму.

Об'єкт дослідження: Процес одержання кополіестерів N-похідних глутамінової кислоти з поліетердіолами і флуоресцеїном незворотньою поліконденсацією за реакцією Стегліха, склад, структура та властивості нових флуоресцеїнвмісних кополіестерів.

Предмет дослідження: Амфифільні флуоресцеїнвмісні кополіестери N-похідних глутамінової кислоти одержані незворотною поліконденсацією за реакцією Стегліха, встановлення взаємозв'язку їх структури з колоїдно-хімічними властивостями, здатністю до формування колоїдних систем та ступенем їх впливу на біологічні об'єкти.

Методи дослідження: ІЧ - спектроскопія з Фур'є перетворенням, ^1H - та ^{13}C -ЯМР-спектроскопія, динамічне світлорозсіювання, фотокolorиметрія, визначення поверхневого натягу (методом Дю-Нуї), функціональний аналіз, тонкошарова хроматографія, елементний аналіз, гель-проникна хроматографія.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що:

- вперше запропоновано та розроблено метод синтезу поліестерів флуоресцеїну та 2-(додеканоїламіно)пентадіоївої кислоти методом незворотної поліконденсації за реакцією Стегліха;
- при використанні флуоресцеїну як комономеру у незворотній кополіконденсації за реакцією Стегліха отримано амфифільні тер- та тетракополіестери N-ацилпохідних глутамінової кислоти з поліетердіолами;
- встановлено залежності складу та будови ряду синтезованих за реакцією Стегліха амфифільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів від природи мономерних ланок (величини замісника в N-ацилпохідних глутамінової кислоти та молекулярної маси поліетердіолу), а також частки флуоресцеїну у мономерній суміші;
- показано, що кополіконденсація за реакцією Стегліха дозволяє отримувати флуоресцеїнвмісні кополіестери визначеного складу та будови з керованими параметрами їх поверхневого натягу у воді, розмірами частинок їх водних дисперсій, параметрами розподілу між водною та ліпофільною фазами, здатністю до солюбілізації малорозчинних у воді сполук та їх вивільнення, гідролітичною стійкістю у водних середовищах;
- показано, що будова та склад амфифільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів визначає стабільність їх водних дисперсій при контакті з водорозчинними білками

плазми крові, при цьому характеристики біорозподілу та гідролітичні властивості кополієстерів у комплексі з бичачим сироватковим альбуміном змінюються несуттєво;

- встановлено взаємозв'язок будови амфифільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів з ступенем їх впливу на живі об'єкти і показано, що флуоресцеїнвмісні кополієстери, отримані з використанням поліоксietenгліколів з молярними масами понад 1000 Да проявляють мінімальний рівень цитотоксичності.

Практичне значення отриманих результатів За результатами встановлених закономірностей та розробленого методу синтезу отримано нові поверхнево-активні кополієстери, які містять фрагменти флуоресцеїну в макроланцюгу. Наведені в роботі результати цілеспрямованих досліджень з формування на основі одержаних флуоресцеїнвмісних кополієстерів водних дисперсій, їх колоїдно-хімічних властивостей, здатності сорбувати альбумін, солубілізувати та вивільняти малорозчинні у воді сполуки, отримання флуоресцентного відгуку дозволяють вважати їх перспективним матеріалом для застосування у медичних та біохімічних дослідженнях.

Дослідження *in vitro* їх взаємодії з живими клітинами показано здатність до взаємодії з клітинними мембранами і проникнення всередину клітини. Це дозволило сформулювати вимоги та рекомендації до використання флуоресцеїнвмісних кополієстерів у дослідженнях функціонування живих клітин, отриманням флуоресцентного відгуку.

Фізіологічні дослідження *in vivo* на тваринах (лабораторних щурах) показали, що одержані полімери є малотоксичними і з успіхом можуть бути використані як полімерні маркери для створення та вивчення ефективності носіїв у системах доставки терапевтичних препаратів.

Перспективність використання нових флуоресцеїнвмісних кополієстерів для потреб біології та медицини підтверджено дослідженнями, проведеними в Інституті біології тварин НААН України, публікаціями, які не ввійшли в перелік фахових та патентами на корисну модель.

Особистий внесок здобувача полягає в аналізі літературних джерел, обґрунтуванні мети та завдань досліджень, виконанні експериментальної роботи щодо одержання незворотньою кополіконденсацією за реакцією Стегліха флуоресцеїнвмісних кополієстерів N-похідних глютамінової кислоти і полієтердіолів, розробленні методів аналізу складу кополієстерів та комплексного дослідження властивостей кополієстерів та дисперсних систем на їх основі. Обговорення та узагальнення одержаних експериментальних результатів, вибір напрямків практичного застосування та формулювання висновків проводилось автором спільно з науковим керівником д.х.н. Варваренком С.М., а також д.х.н. Самариком В.Я., к.х.н. Носовою Н.Г. і д.х.н. Вороновим С.А. Спектральні та молекулярно-масові характеристики кополієстерів досліджувались в Інституті молекул та матеріалів (м. Ле Ман, Франція). Біохімічні дослідження проводились в Інституті біології тварин НААН та обговорювались з д.с-г.н. Остапівим Д.Д.

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати дисертаційної роботи доповідалися й обговорювалися на: 16th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium) (Jena, Germany, 2014); VIII Ukrainian-Polish Conference “Polymer special applications” (Bukovel, Ukraine, 2014); 17th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium) (Munster, Germany, 2015); All-Ukrainian scientific-practical conference "The concept of sustainable development and its implementation" (Ternopil, Ukraine, 2015); XV науковій конференції “Львівські хімічні читання – 2015” (Львів, 2015); II Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми хімії та технології органічних речовин» (APCTOS2)» (Львів, 2015); Conference for young scientist 2015 (Kyiv, 2015); 18th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium) (Kiel, Germany, 2016); International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO – 2016) (Lviv, 2016); XXIV Українська конференція з органічної хімії (Полтава, 2016); Міжнародній науково-технічній конференції «Сучасні технології одержання та переробки полімерних матеріалів» (Львів, 2016); International youth science forum «LITTERIS ET ARTIBUS» (Lviv, 2016); II Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні проблеми хімії та хімічної технології» (Київ, 2016); III

Міжнародній науково-практичній конференції «Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво» (Шостка, 2016); 19th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium) (Mainz, Germany, 2017); IX International conference in chemistry Kyiv-Toulouse (ICKT-9) (Kyiv, 2017); IV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених і студентів «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості» (Херсон, 2017); I Міжнародній (XI Українська) науковій конференції студентів, аспірантів і молодих учених “Хімічні проблеми сьогодення 2018”, (Вінниця, 2018); 20th JCF-Frühjahrssymposium Jung Chemiker Forum (Konstanz, Germany, 2018); XIX Міжнародній конференції студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії" (Київ, 2018); II Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» (Житомир, 2018); II Всеукраїнській науково-практичній конференції "Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості"(Херсон, 2018); International conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018) (Kyiv, 2018); EastWest Chemistry Conference (Lviv, 2018).

Публікації. Основні положення дисертації відображені у 42 друкованих працях, з них 6 статей у наукових фахових виданнях України, 4 статті у виданнях, які включено до міжнародних наукометричних баз, 1 стаття у науковому періодичному виданні іншої держави, включеному до міжнародних наукометричних баз, 3 статті у інших наукових періодичних виданнях України, 2 патенти України на корисну модель, 26 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел літератури (186 найменувань). Загальний обсяг дисертації становить 209 сторінок, містить 25 таблиць та 85 рисунків.

РОЗДІЛ 1.

1.1. Нанорозмірні частинки

Нанорозмірні частинки (НЧ) в останні десятиліття щораз частіше фігурують як об'єкти досліджень у цілому ряді наукових напрямків і технологій, в тому числі пов'язаних з їх медико-біологічними застосуваннями.

Відомі в даний час НЧ мають різну будову і хімічну природу. Зокрема, до них відносять природні утворення (наприклад, віруси, клітинні оболонки, везикули), різні структури неорганічного походження (НЧ золота, кремнію, фосфату кальцію, нанокристали, що володіють властивостями «квантових точок»), системи на основі карбону (карбонові нанотрубки, фулерени), полімерні системи (дендримери, наносфери, нанокапсули).

Особливе місце серед НЧ займають асоціати сполук, які мають амфіфільну (дифільну) будову, що надає їм здатність до самовільної організації з утворенням різних надмолекулярних структур. Дифільні (амфіфільні) молекули відіграють одну з найважливіших ролей в житті живих організмів. Так, мембрана клітин складається більш ніж зі ста амфіфільних молекул, до яких відносяться фосфоліпиди різної будови, глікопротеїни та білки, які самоорганізуються з утворенням подвійного шару, який, відокремлюючи клітину від навколишнього середовища, разом з тим бере активну участь у підтриманні в ній необхідного для життя балансу поживних елементів [1].

Штучно отримані організовані асоціати ліпідів (ліпосоми) знайшли широке застосування в якості систем доставки біологічно активних і лікарських речовин, чому присвячена велика кількість досліджень [2,3,4,5,6].

Синтетичні амфіфільні молекули, володіючи поверхневою активністю та здатністю утворювати надмолекулярні асоціати, є поширеними як компоненти різних хімічних продуктів від моторних масел і розчинів для буріння свердловин до побутових миючих засобів і косметики [7].

Окрему групу НЧ складають асоціати амфіфільних кополімерів, макромолекули яких містять полярні і неполярні блоки. Широкі можливості

варіювання будови молекул таких полімерів на стадії синтезу дозволяють забезпечувати їм заданий рівень розчинності у певних середовищах, контролювати і управляти процесами їх самозбирання з утворенням НЧ, і нарешті, регулювати включення в утворені ними агрегати молекул інших речовин різної природи. Ці властивості роблять полімерні системи зручним матеріалом для отримання на їх основі НЧ з структурою, яку можна адаптувати до потреб медико-біологічного застосування [8].

З розвитком полімерної хімії з'являються можливості отримувати макромолекули з наперед визначеними складом і будовою, властивості яких легко змінюються через введення відповідних блоків у їх структуру.

Вперше такий підхід для створення фармакологічно активних полімерів було запропоновано Х. Рінгсдорфом [9], який вважав, що до складу полімеру повинні бути включені фрагменти, кожен з яких відповідальний за певну властивість: розчинність у середовищах протилежної полярності, впізнавання мішені (векторні групи), а також біологічно активні сполуки, приєднані до полімеру через спеціальні структурні вставки - спейсери. Всі блоки при цьому об'єднуються каркасом полімеру-носія і вся система являє собою єдине макромолекулярне утворення. Модель Х. Рінгсдорфа ґрунтується на уявленні про адитивність властивостей компонентів, які входять до її складу. Згідно цієї моделі фізико-хімічні характеристики системи визначаються в основному структурою та природою полімеру-носія, а біологічна активність - іншими компонентами, включаючи ліки. Можливість варіювати структуру полімерного носія, змінювати взаємне розташування компонентів і їх співвідношення в таких системах дозволяє в широких межах регулювати окрім всього іншого також і фармакологічні і фармакінетичні властивості системи в цілому [9].

Подальший розвиток робіт у цьому напрямку зводився, в основному, до пошуку відповідних полімерів-носіїв, методів їх модифікування заданими функціональними фрагментами (векторними групами, біологічно активними сполуками, засобами візуалізації), які би дозволяли максимально наблизитися до створення НЧ, які відповідали би вимогам до «ідеального полімеру носія».

1.1.1. Наночастинки на основі амфифільних полімерів

Полімери, які містять в одній макромолекулі гідрофільні (полярні) і ліпофільні (неполярні) фрагменти відносяться до класу амфифільних. Амфифільні властивості в першу чергу проявляються у їх здатності до самовільної асоціації з утворенням організованих структур у розчині. Внаслідок агрегації найпростіших амфифільних макромолекул, у розчині утворюються НЧ, які зазвичай мають розмір від 10 до 1000 нм [10].

Найпростішим варіантом будови амфифільного полімеру можна вважати диблок кополімер в якому один з фрагментів проявляє ліпофільні властивості, а інший гідрофільні. Наявність такого типу сполучень фрагментів у макромолекулах більш складної будови є необхідною умовою для надання їм амфифільних властивостей.

Асоціати амфифільних полімерів у розчинах, в залежності від полярності середовища, містять на поверхні фрагменти ліпофільні до даного середовища. Оскільки в більшості випадків амфифільні полімери знаходять застосування в медико-біологічних областях, де таким середовищем є вода, то найчастіше такі асоціати утворюються за рахунок міжмолекулярних, в данному випадку гідрофобних взаємодій ліпофільних фрагментів, а гідрофільні фрагменти формують зовнішню оболонку асоціатів.

Однією з важливих переваг амфифільних полімерів є те, що змінюючи хімічну структуру, будову і співвідношення гідрофільних і гідрофобних фрагментів, можна ефективно впливати на процеси самоасоціації і на морфологію агрегатів, які утворюються (рис. 1.1).

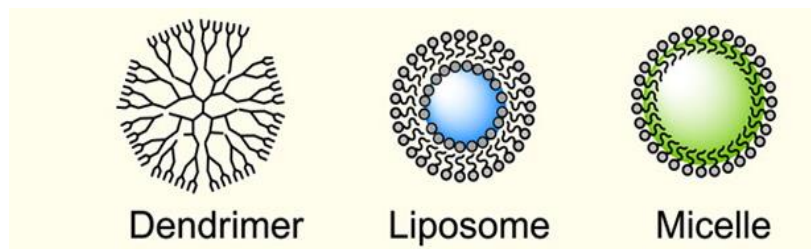


Рис.1.1-Схематичне зображення морфології агрегатів на основі амфифільних полімерів [11].

Морфологія таких структур залежить від співвідношення різнополярних частин молекули, їх хімічної будови, температури, концентрації полімеру і ряду інших параметрів.

Варто зауважити, що самоагрегація макромолекул в надструктури може відбуватися як у гідрофільному водному середовищі, так і в інших розчинниках [12]. Існує цілий клас так званих інвертабельних полімерів які завдяки певному співвідношенню гідрофільних та ліпофільних фрагментів можуть утворювати НЧ як у водному так і в неводних середовищах [13]. Проте, саме агрегати, які утворюються у водних середовищах, викликають найбільший інтерес, так як вони найбільш близькі до біологічних систем.



Рис. 1.2 Формування міцели у водному середовищі.

З точки зору створення нанорозмірних носіїв лікарських речовин найбільш перспективними надструктурами, що утворюються в розчинах амфифільних полімерів, є міцели (рис 1.2). При цьому окремі молекули амфифільних полімерів, які утворюють такі агрегати, називають унімерами [14]. З точки зору термодинаміки унімери в розчині знаходяться в рівновазі з агрегатами, утворення яких відбувається тільки при концентрації розчину вище певного значення. Прості міцели представляють собою агрегати, що складаються з «ядра» і «оболонки», які існують в певному діапазоні концентрацій полімеру. Причому у випадку полімерних систем на ізотермі поверхневого натягу доволі часто окрім критичної концентрації міцелоутворення (ККМ) можуть спостерігатися додаткові

перегини, що відповідають організованим структурним перебудовам міцелярної фази, які отримали назву критична концентрація агрегатоутворення (ККА) [15].

Полімерні міцели за властивостями часто порівнюють з нанорозмірними частинками, що утворюються з природних сполук-ліпідів і ліпопротеїнів. Ці носії мають схожу структуру «ядро-оболонка». Однак більш сповільнені процеси досягнення рівноважних станів у амфифільних полімерів робить міцели на їх основі більш стабільними системами в порівнянні з міцелами на основі ліпідів [16].

Взаємодія між молекулами полімеру у міцелярному агрегаті залежить від відносної полярності його фрагментів, загальної молекулярної маси полімеру, співвідношення гідрофобної і гідрофільної частин і може бути набагато вища, ніж в наночастинках на основі ліпідів. У порівнянні з агрегатами з низькомолекулярних поверхнево-активних сполук, самоорганізовані системи на основі амфифільних полімерів мають більш високу стабільність і набагато менші значення ККА [17].

Структура амфифільних полімерів

Найчастіше в даний час в якості гідрофільних фрагментів амфифільних полімерів, які утворюють при самоагрегуванні зовнішню оболонку міцелярних агрегатів, використовують поліетиленоксид (PEG) з молекулярною масою від 1 до 15 кДа [18]. Гідрофобні фрагменти, які формують ядро полімерних агрегатів, як правило складаються з полімерних блоків пропіленоксиду [19], L-лізину [20], аспарагінової або глутамінової кислоти [21], β -бензоїл-L-аспартату [22], γ -бензил-L-глутамату [23], капролактону [24], D,L-молочної кислоти [25], і ряду інших полімерів. Деякі з них безпосередньо формують гідрофобне ядро міцелярних агрегатів, в той час як інші полімери (наприклад, полілізин) утворюють більш гідрофільні полімерні ланцюги, які формують гідрофобне ядро наночастинки тільки після комплексування з ліпофільними лікарськими препаратами. Останнім часом активізувався пошук нових сполук, які виступали б гідрофобними фрагментами і були б при цьому природного походження. Перевагами наночастинок на їх основі є здатність до біодеградації, сумісність з біологічними

тканинами організму та нетоксичність. У якості мономерної ланки для синтезу такого полімеру часто використовують природні амінокислоти, наприклад, трифункційну L-глутамінову кислоту та її N-похідні [26].

1.1.2. Загальні вимоги до полімерів, які входять до складу наночастинок біомедичного застосування

Полімери, які використовують для отримання нанорозмірних систем, призначених для застосування в медико-біологічних областях, в тому числі для доставки біологічно-активних і лікарських речовин, особливо ті, які вводяться ін'єкційно, мають відповідати ряду важливих вимог. Вони повинні відрізнятися високою чистотою і не містити домішок, шкідливих для організму, розкладатися в організмі із заданою швидкістю, не утворюючи при біодеградації токсичних речовин, або достатньо швидко виводитися з організму [27]. Таким чином, вибір оптимальної структури полімеру біомедичного призначення визначається трьома основними факторами: біосумісністю, можливістю виведення з організму полімеру і продуктів його розпаду і фізико-хімічними властивостями полімеру, оскільки саме від цих параметрів залежить його вплив на організм і здатність виконати задані функціональні завдання [28].

1.1.2.1. Біосумісність полімерів

Біосумісність, тобто здатність забезпечувати виконання необхідного медико-біологічного завдання без негативного впливу на прилеглі тканини і організм в цілому, займає центральне місце серед вимог, що висуваються до полімеру, призначеному для безпосереднього контакту з живим організмом, в тому числі для НЧ лікарського призначення [27].

На рівень біосумісності полімеру, в першу чергу має вплив ступінь його очищення від шкідливих домішок, які можуть надавати токсичну, подразнюючу, алергенну, пірогенну або інші побічні дії. Це стосується залишків мономерів, каталізаторів і розчинників, не до кінця видалених за обраною методикою очищення матеріалу. При цьому повинна враховуватися можливість утворення токсичних речовин під час переробки полімеру у відповідний виріб, а також можливі наслідки при його стерилізації. Слід зазначити, що ідеально видалити

низькомолекулярні речовини з макромолекулярної системи вкрай важко, навіть при застосуванні самих ефективних методів (діаліз). Тому їх вміст повинен контролюватися і відповідати наявним медико-санітарним вимогам з врахуванням результатів досліджень як на гостру, так і хронічну токсичність. Рівень біосумісності об'єкта, який вводиться в організм, залежить від поведінки останнього в організмі, тобто в першу чергу від метаболізму полімеру, з якого він виготовлений.

Щодо полімерів, які використовуються для отримання НЧ в даний час, достатній рівень біосумісності досягається завдяки застосуванню природних полімерів, таких як полісахариди (хітозан, крохмаль, декстран та деякі інші полісахариди), мікробні поліестери (полігідроксибутират і кополімери гідроксибутирату) і синтетичних полімерів-аліфатичних поліестерів (гомо полімерів і кополімерів гліколевої і молочної кислот, полікапролактона, поліангідридів), поліетиленоксидів різної молекулярної маси і їх кополімерів, синтетичні полімерні похідні амінокислот [27].

1.1.2.2. Виведення полімеру з організму

Як відомо, біодеградація полімерного виробу під дією навколишнього біологічного середовища може відбуватися за двома механізмами - безпосереднє виведення полімеру з організму, якщо він розчинний у воді і має обмежену молекулярну масу, і виведення з організму продуктів після розпаду полімеру [29].

Прикладами полімерів, що виводяться з організму у цілісному стані, є полімери невисокої молекулярної маси, які використовуються при створенні препаратів кровозамінників - дезінтоксикаторів. Виведення з організму таких полімерів може здійснюватися через ниркову фільтрацію [30].

У іншому випадку найчастіше це відбувається через гідроліз полімеру, наприклад, під впливом ферментних систем організму. Тому, при необхідності застосування для отримання НЧ досить високомолекулярного і нерозчинного у воді полімеру ключовим завданням є введення в його основу і/або в бічні ланцюги груп, здатних до гідролітичної деградації [31].

Пошукам і вивченню властивостей полімерних систем доставки лікарських речовин з використанням НЧ, присвячена велика кількість досліджень, що дозволило розробити базові вимоги до систем доставки на основі НЧ. Крім зазначеної вище нешкідливості, в ідеальному випадку такі системи, як мінімум повинні мати наступні характеристики:

- А. Високий ступінь однорідності, як за складом, так і за розміром частинок.
- Б. Максимальний ступінь включення активної субстанції.
- В. Забезпечення вивільнення активної речовини з певною, необхідною швидкістю.
- Г. Можливістю цільової доставки активної речовини до ураженого органу.

1.1.2.3. Особливості будови полімерів і наночастинок

На сьогодні уже добре відомо, що використання полімерних форм дозволяє продовжити дію водонерозчинної лікарської речовини, знизити її токсичність, і при наявності в молекулі полімеру фрагмента-вектора спрямувати макромолекулярну систему до необхідного органу. Слід зазначити, що створенню полімерів для лікарських засобів, їх властивостям і особливостям будови, різним аспектам біологічної активності було присвячено велику кількість робіт, особливо в 70-80-тих роках минулого століття, що відображено у величезній кількості публікацій [32,28].

Молекулярна маса та молекулярно-масовий розподіл. При створенні полімерних наночастинок важливе значення має молекулярна маса полімеру, оскільки вона значною мірою впливає на формування наночастинок. Особливо це стосується полімерів, нездатних до біорозкладу [33,34].

Ще один важливий параметр полімерів - це розподіл його макромолекул за молекулярною масою. У деяких природних полімерів, таких як більшість глобулярних білків, молекули мають однакову молекулярну масу. Однак, у випадку біохімічної або хімічної обробки природних полімерів (наприклад, 2-гідроксиетилкрохмалю, декстрану), або синтетичних полімерів, в готовому продукті, в залежності від способу отримання таких полімерів, присутні макромолекули різної молекулярної маси, які можуть характеризуватися різною

швидкістю виведення з організму. В цьому випадку виникають складнощі для точного прогнозування поведінки препарату на основі такого полімеру в організмі [35].

Розмір полімерних наночастинок. Літературні джерела свідчать, що розподіл колоїдних полімерних систем в організмі, багато в чому залежить від розміру їх частинок [36]. Розміри наночастинок можуть коливатися в широкому діапазоні і складати від 10-30 нм для амфіфільних низькомолекулярних полімерів, до 600 нм і більше (три-блок-кополімер ПЕО-полібензил-L-аспартат) [37]. Встановлено, що частинки з діаметром понад 1,0-8,0 мкм в основному накопичуються в легенях, завдяки захопленню клітинами ретикуло-ендотеліальної системи. Частинки, розмір яких складає від 0,01 до 0,8 мкм, особливо активно захоплюються моноядерними фагоцитозними клітинами ретикуло-ендотеліальної системи кісткового мозку, печінки, і селезінки. При цьому показано, що зменшення розміру частинок, значно збільшує швидкість і ступінь їх захоплення клітинами кісткового мозку.

У зв'язку з цим, при розробці полімерних НЧ для систем доставки біологічно-активних і лікарських речовин намагаються сформувати невеликі наночастинок з діаметром менше 200 нм та вузьким розподілом за розмірами. За рахунок зменшення розміру частинок стає можливим внутрішньовенне введення препарату. Внутрішньом'язове і підшкірне введення полімерних лікарських форм також вимагають використання частинок малих розмірів. У разі невеликого розміру НЧ значно знижуються негативні реакції організму у місці їх введення. Є дані проте, що від розміру наночастинок можуть залежати також і канцерогенні властивості препаратів, які з ними вводяться [38].

Заряд і гідрофільність. Розподіл полімерних НЧ в тканинах організму, кінетика і динаміка виділення з них активної речовини, залежать від їх будови, складу та функціональності. Зокрема, вплив на біорозподіл має співвідношення гідрофільної і гідрофобної частки полімеру, стабільність наночастинок і їх поверхневий заряд. Підвищення гідрофільності поверхні наночастинок призводить до зменшення їх фагоцитозного захоплення клітинами і макрофагами,

збільшує час циркуляції в кровоносному руслі і зменшує ймовірність їх зв'язування з білками сироватки крові [39]. Вивчення впливу заряду на біорозподіл наночастинок в організмі показало, що НЧ, які мають близький до нейтрального поверхневий заряд, захоплюються макрофагами в меншій мірі, ніж позитивно чи негативно заряджені частинки [40]. Крім того продемонстровано, що, на відміну від нейтральних НЧ, негативно заряджені НЧ, більш активно захоплюються клітинами селезінки і печінки і швидше виводяться з кровотоку. У той же час позитивно заряджені наночастинок спочатку накопичуються в легенях, а вже потім переносяться в клітини селезінки і печінки. Нейтральні полімерні НЧ мають проміжну швидкість виведення [41].

Швидкість виділення активної речовини з полімерних наночастинок

Швидкість вивільнення біологічно-активних речовин з полімерних НЧ, залежить від масового співвідношення між полімером і лікарським препаратом і концентрації полімеру у вихідній суміші. У разі іммобілізації лікарської речовини в НЧ на основі полімеру, який є біодеградабельним в фізіологічних умовах, стає можливим поступове виділення активного агента в середовище організму, як у вільному вигляді, так і спільно з фрагментами носія, які після розкладання перейшли в розчин. Швидкість виділення лікарської речовини в цьому випадку буде визначатися швидкістю біодеградації матеріалу наночастинок [42].

Підсумовуючи результати проведеного аналізу, можна відзначити, що «ідеальна» нанорозмірна полімерна система доставки лікарських і біологічно-активних речовин повинна легко формуватися з молекул полімеру-носія (наприклад, самоасоціації амфіфільних полімерів), здатна сорбувати достатню кількість лікарської речовини для забезпечення її ефективної дії, а також містити молекули або функціональні групи, що забезпечують цільову доставку активної речовини в організм. При цьому розмір наночастинок повинен бути <200 нм, зокрема, для того, щоб забезпечити можливість їх проникнення через захисні бар'єри організму, в органи, в тканини, і навіть всередину деяких типів клітин [43,44]. Такі полімерні НЧ не будуть викликати будь-яких негативних біологічних реакцій і повинні бути стійкі в організмі протягом необхідного інтервалу часу.

При цьому, включений в НЧ лікарський препарат повинен вивільнятися при контакті препарату з мішенню в організмі, і врешті-решт, всі компоненти полімерної НЧ і продуктів її метаболізму повинні легко і без побічної токсичної дії виводитися з організму після виконання всіх її терапевтичних функцій.

Однак очікуваного успіху від розроблення «ідеальної» нанорозмірної полімерної системи доставки лікарських препаратів у відповідності до вищерозглянутих критеріїв у повній мірі досягнути ще не вдалося. Не повністю вияснені ще деякі фундаментальні уявлення про функціонування нанорозмірних систем доставки. Наприклад, проблемою є складність спостереження за накопиченням наночастинок в певних зонах організму у реальному часі. Необхідно було знайти ефективний метод відслідковування наночастинок в тканинах організму. Для розв'язання цього завдання використовують багатофункціональні системи доставки, які містять у своєму складі фрагмент, який відповідає за візуалізацію наночастинок у місці її розташування.

На даний час докладаються значні зусилля для розробки універсальної багатофункціональної терапії, яка могла би поєднувати в одній системі діагностичні і терапевтичні засоби [45]. Як і традиційна діагностика, нанодіагностика переслідує мету можливо більш раннього виявлення захворювання, в ідеалі, на молекулярному рівні. У зв'язку з цим в наномедицині з'явився термін «молекулярна візуалізація».

Для візуалізації засобів доставки ліків використовуються такі методи – оптична когересцентна томографія (візуалізуючі агенти – наночастинки Ауруму, наносфери); магнітно-резонансна томографія (візуалізуючі агенти – матеріали на основі Мангану, оксиду Феруму, сполуки Гадолінію, перфлуоровуглеводні); позитрон-емісійна томографія та однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (візуалізуючі агенти – радіоізотопи ^{64}Cu , ^{18}F , ^{124}I , ^{111}In); флуориметрія (візуалізуючі агенти – квантові точки, органічні флуорофори, люмінофори).

Флуоресцентні методи одержання зображень, такі як флуоресцентна мікроскопія, є однією з найбільш ефективних і широко використовуваних сучасних технологій в галузі наук про життя для аналізу кількісної поведінки

біомолекул у живих клітинах, тканинах та організмах [46]. Хоча існує безліч альтернативних технологій одержання зображень, флуоресцентне маркування молекул та їх подальше спостереження за допомогою різних оптичних інструментів демонструють значні переваги, особливо коли необхідний кількісний контроль у живих клітинах, оскільки це є один із найважливіших факторів, які необхідно проаналізувати для розуміння динаміки процесів.

1.2. Молекулярна візуалізація за допомогою флуоресценції

Розвиток нових комп'ютерних і біохімічних візуалізуючих технологій дозволив наблизитися до створення нових методів діагностики на клітинному і навіть молекулярному рівні, які допоможуть з'ясувати природу патологічного процесу на самій ранній стадії захворювання. Первинна мета молекулярної візуалізації полягає в отриманні інформації про ключові молекулярні механізми, що визначають функціонування живих систем при нормальному функціонуванні і при запальних процесах. До молекулярної візуалізації в широкому розумінні відносять технології одержання зображень молекул і/або оцінки їх функціонального стану (магнітно-резонансна візуалізація, позитрон-емісійна томографія, оптичне відображення, авторадіографія та ін.). Для аналізу зображень досліджуваних об'єктів, які одержуються за допомогою нових методів молекулярної діагностики, використовують системи штучного інтелекту, системи моделювання захворювань *in vitro* та *in vivo*.

При оптичній візуалізації використовується електромагнітне випромінювання (в тому числі і лазерне випромінювання) для зондування живих тканин пацієнта з метою отримання діагностичної інформації про біохімічний склад і анатомічну (морфологічну) будову [47].

Можна виділити два напрямки розвитку методів флуоресцентної діагностики. Перший пов'язаний з контрастуванням тканин екзогенними флуоресцентними речовинами з метою подальшого виявлення за інтенсивністю сигналу зображення патологічних змін. А другий пов'язаний зі створенням більш чутливої апаратури, яка реагує на ендогенну (природну) флуоресценцію клітин тканини, що дозволить здійснювати дослідження накопичення в тканинах

природних флуорохромів – флавінових ферментів, порфіринів і т.п. - і їх функціональної активності. За обома напрямками розроблені пристрої, які вже дозволені для клінічного застосування або проходять останні етапи клінічних випробувань. Однак, основні області заявлених застосувань цих систем флуоресцентної діагностики більше відносяться до першого напрямку діагностики [47].

Оптична (лазерна) візуалізація відкриває нові унікальні можливості безпосередньо спостерігати життєву динаміку тих чи інших об'єктивних біохімічних показників у пацієнта і коригувати по них хід курсу лікування. За умови розробки портативних кишенькових приладів флуоресцентних томографів, з'явиться можливість проводити щоденний моніторинг свого стану здоров'я [47].

Лазерна флуоресцентна візуалізація базується на аналізі характеристик флуоресценції в біотканинах ендогенних або екзогенних флуоресцентних сполук при їх опроміненні низько інтенсивним лазерним випромінюванням певних довжин хвиль [48].

До переваг флуоресцентних методів варто віднести те, що вони дозволяють працювати з нативними об'єктами (оскільки при низьких інтенсивностях світло, яке збуджує флуоресценцію, мало змінює фізіологічний стан тканин), мають високу чутливість і можуть забезпечувати реєстрацію процесів у їх динаміці.

Перспективність флуоресцентних методів візуалізації пояснюється практичністю, простотою у виконанні і меншою вартістю в порівнянні з магнітно-резонансною томографією (МРТ) та позитронною емісійною томографією (ПЕТ). При використанні флуоресцентних речовин візуалізувати можна також фермент, що функціонує в осередку ураження, або специфічні молекули на поверхні клітин або субклітинних структур.

Основною областю застосування методів флуоресцентної діагностики вважається онкологія, проте внаслідок того, що гнійні, ранові, опікові та інші деструктивно-запальні процеси в тканинах також супроводжуються зміною флуоресцентної активності клітин тканин, область застосування цих методів в медицині може бути істотно ширшою [47].

Флуоресцентні методи дослідження стали досить ефективним інструментом як у фундаментальній науці, так і в практичній медицині. З огляду на зростаючі темпи вдосконалення спектральних приладів і комп'ютерної техніки, можна вважати, що дослідження флуоресценції має великі перспективи для дослідження в біологічних системах.

1.3. Механізм флуоресценції

Здатні флуоресціювати атоми, молекули і молекулярні комплекси називають флуорофорами або флуорохромами. Зазвичай цими термінами користуються як синонімами. Також, треба зауважити, що в літературних джерелах ковалентно приєднаний до макромолекули флуоресціюючий компонент прийнято називати флуоресцентною міткою, а вільний флуорофор - зондом. Флуорофори, які застосовуються в мікроскопії традиційно називають флуоресцентними барвниками.

Флуоресценція характеризується рядом параметрів, які змінюються в залежності від хімічної модифікації флуорофора або фізичного оточення. Ці параметри і є тією «специфічною мовою», якою передається інформація від флуоресцентного репортера. Серед них найбільше значення мають: спектри поглинання і флуоресценції та квантовий вихід.

Квантовий вихід флуоресценції - це характеристика ефективності, з якою поглинена енергія трансформується в випромінювання в порівнянні з процесами не випромінюючої релаксації. Кількісно квантовий вихід визначається як відношення числа випущених фотонів до числа поглинутих. Чим більший квантовий вихід, тим вища інтенсивність світіння флуорофора. Часто цей показник є вирішальним при виборі флуорофора на роль флуоресцентного репортера. Наприклад, флуоресцеїн має квантовий вихід близько 0.9, що і забезпечує його широке використання як в ролі самостійного зонда, так і в якості флуоресцентної мітки для нефлуоресціюючих молекул. Важливо також і те, що цей показник дуже чутливий до різних фізико-хімічних взаємодій та оточення молекули репортера.

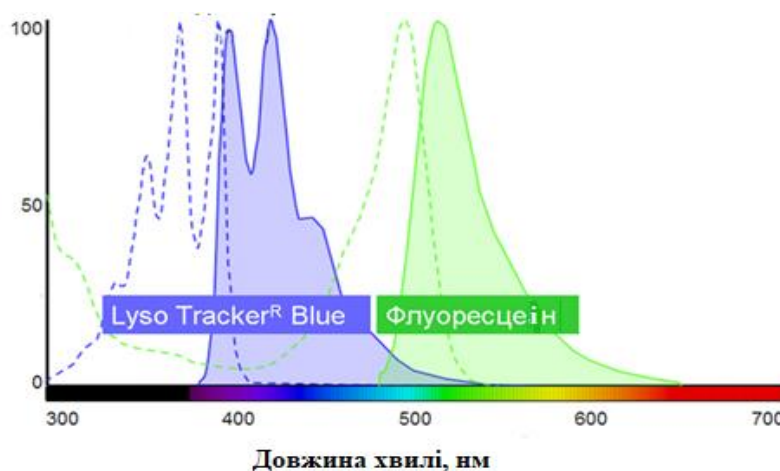


Рис 1.4 Спектри поглинання (пунктир) і флуоресценції (суцільні лінії) флуоресцеїну і Lyso Tracker TMBBlue (Molecular Probes[®]).

Кожен флуорофор має індивідуальні спектри поглинання і флуоресценції. Для ілюстрації на рис. 1.4 представлені спектри Lyso Tracker[™] Blue (Molecular Probes[®]) і флуоресцеїну. Основними параметрами спектрів є інтенсивність флуоресценції, положення максимумів і ширина спектра на рівні половини максимуму. Часто саме ці параметри «інформують» про певні властивості оточення, в якому знаходиться репортер [49].

1.4 Флуоресцентні матеріали, для візуалізації

Для отримання оптичного зображення можна використовувати багато видів флуорофорів. Вони в основному класифікуються на дві категорії: неорганічні речовини (квантові точки (QD), лантаніди) та органічні барвники і їх похідні.

Квантові точки (QD)- це флуоресцентні неорганічні нанокристали, розміри яких дозволяють вводити їх в наночастинки утворені полімером-носієм отримуючи зображення зон поширення і накопичення носія [50]. Вузькі спектри випромінювання та висока стійкість до фотознебарвлення флуоресцентних нанокристалів роблять QD дуже цікавими об'єктами для досліджень. Однак у них також є недоліки, а саме: складна хімія поверхні, потенційна хімічна токсичність та нанотоксичність [51].

Оптичні властивості деяких флуоресцентних матеріалів вказано в таблиці 1.1 і 1.2 (для коефіцієнта квантового виходу та екстинкції, проби були випробувані з використанням води як розчинника, за винятком коли вказано інший).

Таблиця 1.1.

Оптичні властивості флуоресцентних матеріалів.

Категорія	Флуоресцентний матеріал	Випромінювання, λ_{\max} (нм)	Квантовий вихід	Коефіцієнт екстинкції ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
Квантові точки	Сульфід кадмію	370-500	<0.60	100000÷950000
	Селенід кадмію	470-660	0.65-0.85	100000÷700000
	Телурид кадмію	520-770	0.3-0.75	130000÷600000
Органічні барвники	FITC	541	0,97(етанол)	92000(етанол)
	Родамін В	610	0,49(етанол)	106000(етанол)
	Тексаз червоний	615	0,93(етанол)	140000(етанол)
	Флуоресцеїн	521	0,79 (етанол)	92300(етанол)
Флуоресцентні протеїни	Cerulean	475	0,62	43000
	T-sapphire	511	0,60	44000
	mOrange	562	0,69	71000
	mPlum	649	0,10	41000

Розроблено також велику кількість флуоресцентних органічних барвників для біологічних застосувань та особливо мікроскопії (флуоресцеїни, родаміни, ціаніни та ін.). Флуоресцентні зонди широко використовувалися для спостереження за внутрішньоклітинними органелами, що вимагає високоселективного накопичення флуорофорів в зазначених структурах.

Таблиця 1.2.

Порівняння властивостей флуоресцентних матеріалів

Властивість	Органічні барвники	Квантові точки	Флуоресцентні протеїни
Діапазон емісії	весь діапазон	Весь діапазон від УФ до ІЧ(в залежності від розміру)	440-649 нм
Коефіцієнт молярної екстинкції, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	$2,5 \times 10^4 - 2,5 \times 10^5$	$10^5 - 10^6$	$10^3 - 1,5 \times 10^5$
Квантовий вихід	0,5-1,0	0,1-0,8	0,02-0,62
Розмір/ молекулярна маса	до 0,5 нм	6-60 нм	≈27 кДа
Час життя флуоресценції	1-10 нс	10-100 нс	1-10нс
Розчинність	Залежить від хімічної структури	Залежить від хімічної структури	Може бути водорозчинним
Технологічність	завантажуються з полімерними носіями	Зазвичай використовується як флуоресцентний зонд	Працює індивідуально, як біосенсор

В якості маркерів для органел зазвичай використовуються родамін (мітохондрії), акридіновий помаранчевий (кислотні органели, наприклад мітохондрії) і карбоціаніни (ендоплазматична сітка). Саме ці речовини вибирають через високі квантові виходи і стійкість до фотознебарвлення [52, 53]. Як правило вони мають низьку токсичність і широко використовуються як мітки для білкових макромолекул. Мічені флуоресцеїном імуноглобуліни є комерційними реактивами, і їх часто використовують при флуоресцентній мікроскопії біологічних об'єктів. Створені фотостійкі і рН-нечутливі зонди, наприклад, барвники серії Alexa Fluor [54].

1.5. Методи введення барвників у полімери

З швидким розвитком колоїдних систем на основі біодеградабельних полімерів, величезну кількість досліджень було зосереджено на проблемах зв'язування органічних барвників з цими колоїдами для різних біомедичних застосувань, особливо полімерних наночастинок для отримання зображень з місць онконкологічного ураження тканин. Реакції зв'язування, які ведуть до утворення кон'югатів барвник-полімер, можуть бути за своїм характером як ковалентними, так і нековалентними. Нековалентне зв'язування може відбуватися через різні види взаємодій, такі як іонні та дипольно-дипольні взаємодії або через утворення комплексів (інкапсулювання)[55].

1.5.1. Зв'язування за рахунок фізичних взаємодій

Схематична ілюстрація не ковалентного зв'язування барвника з полімерними матеріалами наведена на рис.1.5.

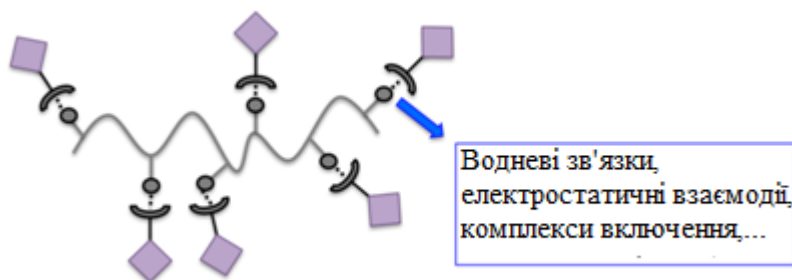


Рис.1.5 Схематичне зображення зв'язування барвника з полімерними макромолекулами.

Полісахариди, через велику кількість полярних замісників, які дозволяють утворювати дипольні взаємодії з відповідними субстратами, можна вважати придатними матеріалами для приєднання барвників. Вони можуть бути отримані з натуральних продуктів (наприклад, крохмалю, целюлози, хітозану) і тому є легко доступні. Є повідомлення про ефективну адсорбцію в певних умовах аніонних азобарвників, що містять сульфонатні групи полімерами крохмалю та β -циклодекстрину [56, 57]. Формування таких супрамолекулярних комплексів було досліджено, проте виявлено сильну залежність їх стійкості від рН-середовища.

Окрім матеріалів на основі сахаридів, було знайдено декілька інших полімерів, які здатні адсорбувати молекули барвників через іонні або диполь-дипольні взаємодії. Наприклад, описано полімери, які утворені шляхом електростатичного самозбирання [58]. Волокнисті полімерні матеріали утворюються з поєднання похідної перилен діїміду, яка заряджена позитивно та негативно зарядженої купрум-фталоціанідної похідної. Спіральне укладання обох сполук призводить до полімерних структур, які стабілізуються через комбінацію взаємодій передачі заряду та кулонівських сил. Інша система, яка також включає електростатичні взаємодії, складається з гідрогелю полі(акрилова кислота-ко-акриламід) та катіонного барвника метилового фіолетового [59]. Однак, відносно сильна взаємодія з молекулами барвника перешкоджає процесу його дифузії і вивільненню з гідрогелю.

1.5.2. Зв'язування за рахунок ковалентного приєднання

Можна навести велику кількість прикладів синтетичних шляхів, які дозволяють ковалентно зв'язувати молекули барвників з полімерними матеріалами. Основні з них це: (1) полімеризація мономерів-барвників; (2) реакції поліконденсації або перехресного зв'язування відповідних барвників або похідних барвників; (3) приєднання молекул барвника до попередньо отриманих полімерів з функціональними групами через полімер-аналогічні перетворення; (4) одержання похідних окремих хромофорів з високою молекулярною масою. Одержання полімерних барвників для технічних та промислових застосувань

здійснюється в основному за методами 1-3, оскільки матеріали, що отримуються можуть містити більш високі кількості барвників, аніж похідні одного хромофору з високою молекулярною масою [60].

1.5.3. Полімеризація мономерів-барвників

Перетворення молекул барвника в здатні до полімеризації похідні, а потім їх (ко-) полімеризація є одним з методів, що дозволяє вводити барвник в полімерну молекулу. Схематична ілюстрація показана на рис.1.6 [61, 62].

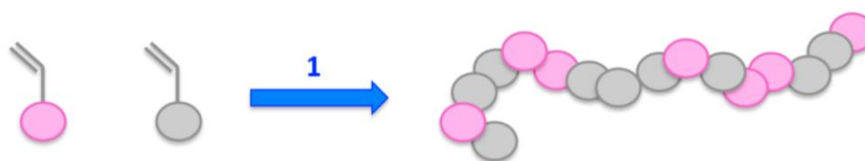


Рис. 1.6. Схема одержання полімерних барвників через кополімеризацію мономерів-барвників.

1.5.4. Полімер-аналогічні реакції модифікування полімерів молекулами барвника.

Полімер-аналогічні перетворення з приєднанням барвників вимагають наявності функціональних бічних або кінцевих груп, які можуть легко взаємодіяти з функціональними групами інших молекул (рис.1.7.).

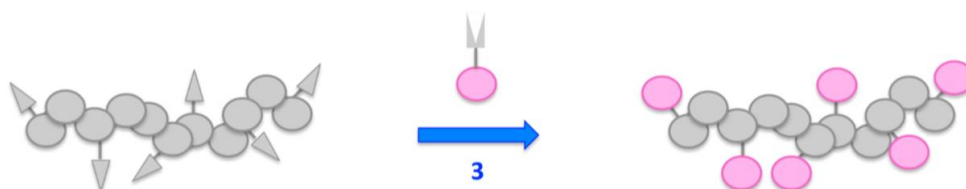


Рис.1.7. Схема модифікування полімеру через полімер-аналогічне приєднання молекул барвника.

Ці молекули можуть бути або самими барвниками, або будівельним блоком, який створює можливість для прикріплення хромофору [63, 64]. В літературі описано спосіб введення барвника в макромолекули полімеру через полімер-аналогічні перетворення з використанням тіоціанатного похідного флуоресцеїну (FITC) і реакційноздатних груп у складі попередньо синтезованих полімерів [65]. Однак, FITC має високу токсичність і вимагає додаткових заходів з очистки та контролю залишкових кількостей в отриманих продуктах.

1.5.5. Одержання похідних окремих хромофорів з високою молекулярною масою

Для промислових цілей був розроблений клас макромолекулярно-функціоналізованих барвників Milliken Chemicals. Ці барвники, що продаються під назвою Versatint®, є речовинами високої молекулярної маси, які використовуються для фарбування текстильних волокон [66]. Ці матеріали одержують полімеризацію етиленоксиду методом «прищеплення до» молекул барвника.

Однак такими способами здебільшого одержують полімерні барвники для технічних та промислових застосувань, і їх застосування в медицині неможливе через їх нездатність до біодеградування, а це є однією з вимог до полімерів носіїв.

1.5.6. Реакції поліконденсації та/або перехресного зв'язування відповідних барвників/похідних барвників

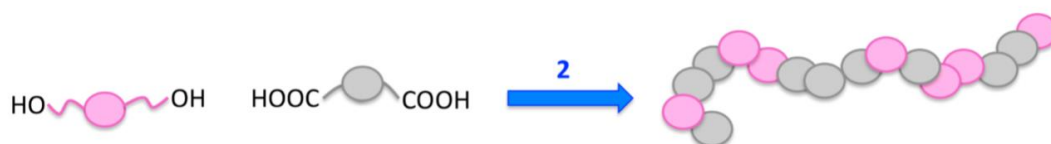


Рис.1.8. Схема одержання барвник-вмісного полімеру через реакцію кополіконденсації.

Великий потенціал поліконденсації (рис. 1.8) для одержання полімерів біомедичного призначення продемонстровано в ряді публікацій [67,68,69].

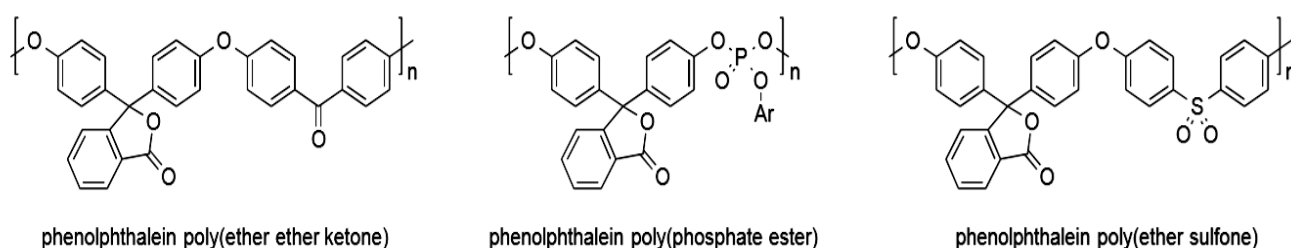


Рис.1.9. Приклади фенолфталеїнівмісних полімерів одержаних за реакцією поліконденсації.

Велика кількість досліджень, присвячена включенню фенолфталеїну в полімери через поліконденсацію, вказує на великий потенціал таких матеріалів. Наприклад, реакція поліконденсації фенолфталеїну з сполуками, які мають вільну гідроксильну групу. Типовими матеріалами, отриманими таким способом, є

поліфенолфталеїнетеркетони, поліфенолфталеїнфосфатетери та поліфенолфталеїн сульфонетери (рис.1.9).

Серед цих продуктів цінним є лінійний фенолфталеїн полісульфонетер, оскільки він є комерційно доступним і його фізико-механічні властивості дозволяють одержувати мембрани. Універсальність цього матеріалу була підтверджена в ряді досліджень через одержання полімерів чутливих до зміни рН [70,71].

Також за реакцією поліконденсації були отримані похідні перилен бісіміду та полі-L-яблучної кислоти, які є водорозчинними і використовуються для флуоресцентного маркування живих клітин (рис.1.10.)

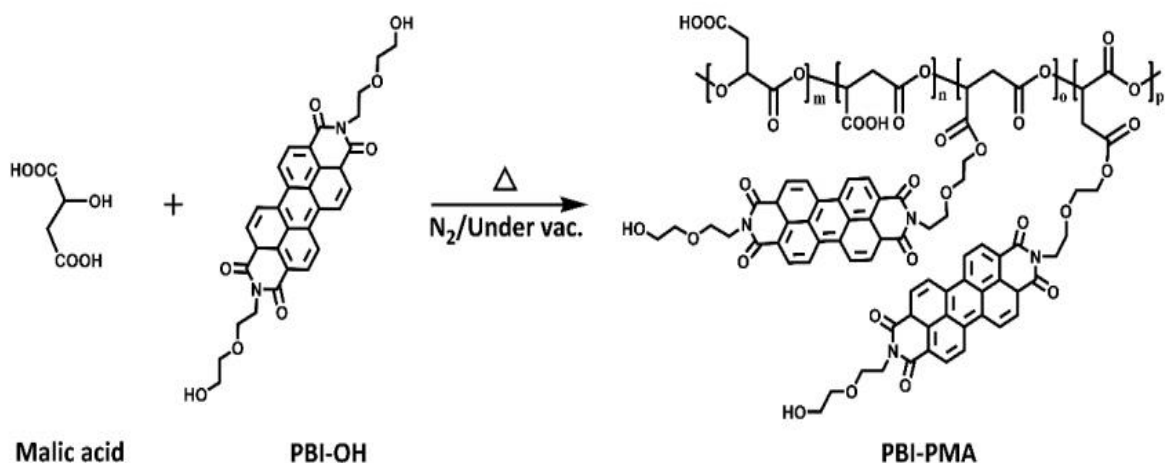


Рис.1.10. Одержання полімерних похідних перилен бісіміду та L-яблучної кислоти.

Цей добре розчинний у воді полімер демонструє сильну рН-залежну флуоресценцію з найбільшою інтенсивністю при рН 6. Він має низьку цитотоксичність і високий потенціал як агент для маркування клітин [72].

Тим не менш повідомлень про залучення флуорофорів в макромолекули методом поліконденсації не надто багато і взагалі нема полімерів цього типу з використанням флуоресцеїну, як найбільш поширеного фрагмента-мітки. Грунтуючись на даних, наведених в огляді, можна говорити про необхідність і перспективність створення нових біосумісних амфіфільних полімерів медико-біологічного призначення одержаних за реакцією поліконденсації, як основи для отримання систем доставки ліків з можливістю діагностики і терапії водночас.

Дана робота присвячена одержанню флуоресцеїновмісних амфіфільних поліестерів, дослідженню їх колоїдно-хімічних характеристик. Введення заданої кількості хромофорних груп в макромолекули дасть можливість гнучко управляти спектральним відгуком в різних біологічних середовищах. Синтез амфіфільних полімерів з хромофорною групою є основою для створення наноносіїв нового покоління, які окрім здатності транспортувати лікарські засоби дають можливість оцінити ефективність цього транспорту в певних тканинах організму через виявлення зони накопичення наночастинок з ліками.

РОЗДІЛ 2. Вихідні речовини, методики проведення синтезів та аналізів.

2.1. Вихідні речовини, матеріали та їх характеристики

2-(октадеканойламіно)пентандіова кислота (**GluSt**) - кристали, погано розчинні у воді, при нагріванні розчиняються в спиртах та етерах. Емпірична формула – $C_{23}H_{43}NO_5$. Молярна маса – 413,59 г/моль; густина – 0,848 г/см³.

2-(додеканоїламіно)пентандіова кислота (**GluLa**) – білі кристали, емпірична формула – $C_{17}H_{31}NO_5$, молярна маса – 329,43 г/моль, густина-1,081 г/см³, $T_{кип}$ – 543,6°C. Використовували без додаткового очищення.

Діетиленгліколь (**DEG**) (Aldrich). прозора в'язка рідина. Гігроскопічний, має солодкуватий смак. Молярна маса - 106,12 г/моль, густина - 1,118 г/см³, температура топлення $T_{пл}=262,7$ К, температура кипіння $T_{к}=517\div 518$ К. Розчинний у воді, нижчих спиртах, пропаноні, аніліні, фенолі і хлороформі. Малорозчинний у диетиловому етері і чотирихлористому карбоні. Погано розчинний у мінеральних і рослинних оліях. Очищали перегонкою у вакуумі. Після очищення основні фізико-хімічні константи співпадали з літературними.

Дипропіленгліколь (**DPG**) (Aldrich). - прозора, в'язка рідина без запаху. Гігроскопічний. Зміщується з водою, розчинний у багатьох органічних розчинниках. Практично нетоксичний, застосовується в фармацевтичній, харчовій і парфюмерній промисловості. Молярна маса - 134,17 г/моль, густина - 1,024 г/см³, температура кипіння $T_{к}=505$ К. Очищали перегонкою у вакуумі. Після очищення основні фізико-хімічні константи співпадали з літературними.

Поліоксиетиленгліколь (**PEG** або **ПЕГ**) (поліетери етиленгліколю) молярної маси 400, 600, 1000, 1500 Да (Aldrich). В залежності від середньої молярної маси полімери – 300-1000 Да в'язкі рідини, 1500-2000 Да - пастоподібні або тверді речовини. Зміщуються з водою. Розчинні в багатьох органічних розчинниках: бензені, тетрахлорметані, хлороформі, N,N-диметилформаміді, ацетонітрилі. Для очищення від домішок води до відповідного поліетиленгліколю (PEG) додавали бензол та відганяли азеотропну суміш бензол-вода (342 К), далі відганяли бензол (353,1 К). Залишки бензолу із зразка PEG видаляли у вакуумі до постійної ваги.

Флуоресцеїн (**F**) (3', 6'-дигідроксиспіро [2-бензофуран-3,9'-ксантен]) (Aldrich) — синтетичний барвник ксантенового ряду. У водних розчинах при $pH=7\div 12$ має яскраву зеленувату флуоресценцією. Емпірична формула – $C_{20}H_{12}O_5$, молярна маса - 332,306 г/моль. Температура топлення $T_{пл}$ – 314-316°C. Погано розчинний в більшості розчинників. У присутності основ добре розчинний у спиртових та водних розчинах. Використовували без додаткового очищення. Вміст основної речовини не менше 99,0% Використовували без додаткового очищення.

N,N'-дициклогексилкарбодіімід (**ДЦК** або **DCC**) (Aldrich). Білі (блідо-жовті) кристали, розчині в бензені, хлорованих вуглеводнях, не розчині в ацетоні. Молярна маса – 206,33 г/моль, $T_{пл}$ – 305-308 К, $T_{кип}$ – 428 К (при 11 мм. рт.ст.). Вміст основної речовини не менше 99,0%, використовався без додаткового очищення.

4-Диметиламінопіридин (**ДМАП** або **DMAP**), 99% (Alfa Aesar). безбарвна кристалічна речовина з характерним запахом, розчинна у воді та багатьох органічних розчинниках. Молярна маса – 122,17 г/моль, $T_{пл}$ – 386÷387К. Відомий під назвою «каталізатор Стегліха». Використовували без додаткового очищення.

Дициклогексилсечовина (**ДЦС** або **DCU**) – білі кристали, не розчинні в спирті, хлороформі, бензолі, діетиловому етері, мало розчинні в ДМФА. Молярна маса – 224,34 г/моль; $T_{пл}$ – 504-508 К.

Бензен - молекулярна формула C_6H_6 . Безбарвна летка рідина з характерним запахом. Молярна маса – 78,11 г/моль. густина – 0,8765 г/см³; $T_{кип}$ – 278,7 К; $T_{пл}$ – 353,3 К.

N,N-Диметилформамід (**ДМФА**) при стандартних умовах малов'язка прозора рідина. Молярна маса – 73,09 г/моль; густина – 0,9445 г/см³; $T_{кип}$ – 426 К; $T_{пл}$ – 334 К. Для очищення від води та інших домішок ДМФА витримували над КОН і переганяли у вакуумі над СаО, Після очищення основні фізико-хімічні константи співпадали з літературними, $n_d^{25} = 1,4269$.

Етанол (спирт етиловий) абсолютований (Fluka) - вміст основної речовини 99 %, $d^{20}=790$ кг/м³; $n_d^{20} = 1.3614$. Використовували без додаткового очищення.

Вода, бідистилят $d^{20} = 998$ кг/м³; $n_d^{20} = 1.333$.

Розчинники, крім вище зазначених випадків, використовували марок "ХЧ" та "ОСЧ 9-5". Додатково розчинники очищали за методиками [73].

2.2 Методики проведення синтезів і експериментів

2.2.1 Методика одержання поліестерів флуоресцеїну за реакцією Стегліха

В двогорлий реактор, об'ємом 50 мл, оснащений мішалкою та зворотнім холодильником з хлоркальцієвою трубкою, завантажували $3,00 \cdot 10^{-3}$ моль 2-(додеканоїламіно)пентандіової (GluLa) кислоти та $3,15 \cdot 10^{-3}$ моль флуоресцеїну і 35 мл розчинника. Після цього, реакційну масу охолоджували до 280 К і, при перемішуванні, послідовно вводили, попередньо приготовані, розчини 4-диметиламінопіридину ($4,5 \cdot 10^{-4}$ моль) та дициклогексилкарбодіїміду ($6,3 \cdot 10^{-3}$ моль) у відповідному розчиннику. Температуру реакційної суміші піднімали до 288 К і витримували при перемішуванні протягом 3-х годин, а потім ще 3 години при 308 К. Утворений осад дициклогексилсечовини (DCU) з реакційної суміші відділяли фільтруванням через паперовий фільтр. Фільтрат упарювали у вакуумі за залишкового тиску $2,0 \div 3,0$ кПа.

Для очистки полімер ($1 \div 3$ г) розчиняли в метиленхлориді (20 мл) і промивали отриманий розчин спочатку 15 мл 15% розчину NaCl у 0,1 N HCl, а після цього промивали тричі по 15 мл 15%-ним розчином NaCl у воді і тричі по 20 мл дистильованою водою. Промитий розчин упарювали і отриманий вологий продукт сушили при 303К у вакуумі до сталої маси.

2.2.2 Методика одержання статистичних флуоресцеїнівмісних кополіестерів за реакцією Стегліха

У двогорлий реактор об'ємом 50 мл оснащений мішалкою, насадкою Діна-Старка та зворотнім холодильником з хлоркальцієвою трубкою завантажували $3,00 \cdot 10^{-3}$ моль N-захищеної глутамінової кислоти (GluLa або GluSt), комономерів з ряду поліетердіолів (DEG, PEG-400, PEG-600, PEG-1000 та PEG-1500), дипропіленгліколь (DPG), а також флуоресцеїн, сумарна кількість яких складала $3,15 \cdot 10^{-3}$ моль, завантажували 35 мл сухого бензену і осушували реакційну суміш відбиранням через насадку Діна-Старка 10 мл азеотропної суміші. Після цього, реакційну масу охолоджували до 280К і при перемішуванні послідовно вводили попередньо приготовлені розчини 4-диметиламінопіридину ($4,5 \cdot 10^{-4}$ моль) та дициклогексилкарбодіїміду ($6,3 \cdot 10^{-3}$ моль) у відповідному розчиннику.

Температуру реакційної суміші піднімали до 288 К і витримували протягом 3-х годин, а потім витримували ще 3 години при 308 К.

Після завершення реакції відділяли з реакційної суміші утворений осад дициклогексилсечовини (DCU) фільтруванням на паперовому фільтрі. Фільтрат упарювали у вакуумі водоструминного насосу. Для очистки полімер (1÷3 г) розчиняли в метилені хлористому (20 мл) і отриманий розчин кількаразово промивали спочатку 15 мл 15% розчину NaCl у 0,1 N HCl. Після цього тричі по 20 мл промивали 15%-ним розчином NaCl у воді і тричі водою по 20 мл до нейтрального рН промивних вод. Розчин упарювали у вакуумі водоструминного насосу. Отриманий кополіестер сушили при 303К у вакуумі до сталої маси.

2.3. Методики проведення аналізів

2.3.1 Визначення вмісту флуоресцеїну в полімері

Вміст флуоресцеїну в полімерах визначали після їх гідролізу у лужному середовищі методом спектрофотометрії (спектрофотометр «ЮНИКО 1201»).

Для кількісної оцінки вмісту флуоресцеїну в полімерах будували залежності (калібрувальні криві) оптичної густини (D) розчину флуоресцеїну в метанольному розчині КОН від концентрації барвника (рис.2.1.). Визначення проводили при довжині хвилі світла $\lambda=490$ нм, в якій спостерігався максимум поглинання для даної системи. Залежність (калібрувальна пряма) оптичної густини від концентрації флуоресцеїну у розчині описується рівнянням:

$$D = 0.01 + 465.0 \cdot C_{\text{ф}} \quad (2.1)$$

де D – виміряна оптична густина розчину;

$C_{\text{ф}}$ - концентрація флуоресцеїну в розчині.

Для проведення аналізу готували розчин флуоресцеїнівмісного кополіестеру в метанолі з концентрацією 0,07-0,08%. До отриманого розчину додавали 0,1мл 0,5N КОН і у герметичній тарі поміщали на 1 год у водяну баню при $T=333\text{K}$. Вимірювання оптичної густини D одержаних гідролізатів проводили з використанням кварцевих кювет товщиною 5,0 мм. Розбавлення аналітичного розчину проводили метанолом з таким розрахунком, щоб оптична густина D знаходилась в межах 0,2÷0,8.

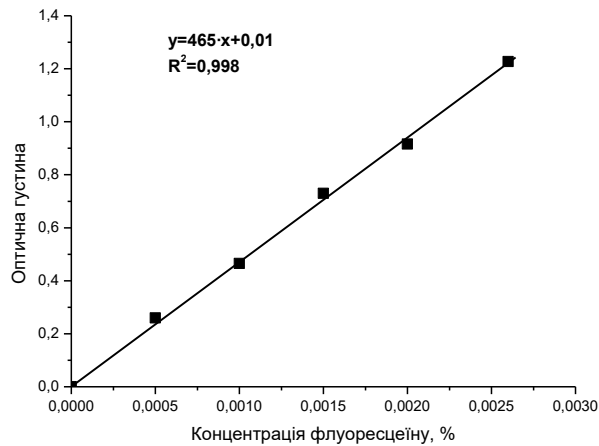


Рис. 2.1. Залежність оптичної густини (**D**) розчину флуоресцеїну в метанольному розчині КОН від концентрації барвника.

Концентрацію флуоресцеїну в полімері після врахування розбавлень розраховували за формулою:

$$C_{\text{ф.п.}} = \frac{(D - a)}{b} \cdot \frac{m_1}{m_2}, \quad (2.2)$$

де D - виміряна оптична густина розчину;

a , b – коефіцієнти з рівняння калібрувальної прямої;

m_1 - маса отриманого розчину;

m_2 - наважка полімеру.

2.3.2. ПМР-спектроскопія

^1H ЯМР спектри зразків мономерних фрагментів та кополієстерів флуоресцеїну отримували у дейтерохлороформі, дейротетрагідрофурані, D_2O , дейтерометанолі на приладі Bruker Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer при частоті 400 МГц в автоматичному режимі сканування. Аналіз спектрів проводили за таблицями характерних хімічних зсувів, наведених у [74], а також за допомогою прогнозних спектрів у програмному забезпеченні ACDLabs.

2.3.3. ІЧ-спектроскопія

ІЧ спектри зразків кополієстерів отримані на приладі Thermo Scientific iD5 ATR Nicolet iS5 IR Spectrometer, методика ATR-FTIR (порушеного повного внутрішнього відбиття). Аналіз ІЧ-спектрів проводили за таблицями характерних частот поглинання [75, 76].

2.3.4 Ексклюзивна хроматографія

Середню молекулярну масу, молекулярно-масовий розподіл та коефіцієнт полідисперсності кополієстерів отримували з використанням хроматографа Waters Corporation з рефрактометричним детектором Waters 2998, насосом Waters 1515 Isocratic HPLC Pump. Як елюент використовували тетрагідрофуран з витратою 0,1 мл/хв. Для калібрування, як стандарт використовували PEG. За допомогою відповідного програмного забезпечення отримували значення середньої ММ, ММ розподіл та коефіцієнт полідисперсності.

2.3.5. Визначення ефективного гідродинамічного радіусу та ζ - потенціалу частинок у дисперсіях кополієстерів.

Ефективний гідродинамічний радіус та ζ - потенціал частинок дисперсної фази у водних дисперсіях кополієстерів з концентрацією 0,01÷0,5% визначали на приладі Malvern Zetasizer Nano S. Вимірювання повторювали тричі.

2.3.6. Визначення поверхневого натягу речовин та критичної концентрації міцелоутворення.

Визначення поверхневого натягу речовин проводили за методом Дю-Нуї (відриву платинового кільця). Величину поверхневого натягу та критичну концентрацію міцелоутворення кополієстерів розраховували за методикою [77]. Поверхневу активність кополієстерів оцінювали за допомогою співвідношення:

$$g \approx (\sigma_0 - \sigma_{\text{ККМ}}) / C_{\text{ККМ}}, \quad (2.3)$$

σ_0 - поверхневий натяг розчинника (вода 72,2 мН/м);

$\sigma_{\text{ККМ}}$ - поверхневий натяг при ККМ;

$C_{\text{ККМ}}$ - критична концентрація міцелоутворення

2.3.7 Визначення коефіцієнту розподілу макромолекул амінофункційних кополієстерів у бінарній системі вода- октанол.

Наважку флуоресцеїнвмісного кополієстеру, диспергували у воді створюючи концентрації 0,3÷0,5%. До 1.00±0,10 г отриманої дисперсії додавали 1.00±0,10 г н-октанолу і перемішували протягом 24 год. Утворену емульсію центрифугували при 10000 с-1 для розділення фаз протягом 10 хв. З кожної фази відбирали пробу і визначали вміст флуоресцеїну за методикою 2.3.1.

Коефіцієнт розподілу флуоресцеїнвмісного кополіестеру ($P_{o/w}$) визначається відношенням концентрації флуоресцеїну в октанолі до його концентрації у воді:

$$P_{o/w} = C_o/C_w, \quad (2.4)$$

де C_o , % - концентрація флуоресцеїну в н-октанолі; C_w , % - концентрація флуоресцеїну у воді.

2.3.8. Визначення гідрофільно-ліпофільного балансу (HLB) кополієстерів

Експериментальне значення гідрофільно-ліпофільного балансу ($HLB_{\text{експ}}$) розраховували із співвідношення концентрацій кополіестеру в різних фазах після перерозподілу в системі вода-октанол за формулою Девіса:

$$HLB = 7 + 0.36 \cdot \ln(C_w/C_o), \quad (2.5)$$

де C_w , C_o – концентрації кополіестеру у водній та октанольній фазах відповідно.

Розрахункові значення $HLB_{\text{розрах}}$ отримували за адитивною схемою з врахуванням частки кожного фрагменту у складі кополіестеру (за даними ^1H ЯМР спектроскопії). При цьому значення $\text{Log}P_{o/w}$ для всіх фрагментів отримували, використовуючи програмне забезпечення ACDLabs [78].

2.3.9 Дослідження солюбілізації малорозчинних у воді барвників дисперсіями кополієстерів.

Кількість солюбілізованих ліпофільних барвників (Судану III, куркуміну) колоїдними розчинами амінофункційних кополієстерів у воді - визначали методом спектрофотометрії за допомогою спектрофотометра «ЮНИКО 1201».

Для кількісної оцінки процесу солюбілізації барвника у водних дисперсіях полімерів будували калібрувальні залежності (калібрувальні криві) оптичної густини розчину барвника (Судану III ($\lambda=500$ нм), куркуміну ($\lambda=430$ нм)) в пропаноні від його концентрації.

Після цього до водних дисперсій флуоресцеїнвмісних кополієстерів з концентраціями в межах $0,0005 \div 0,25$ % додавали наважку барвника у співвідношенні 1:5 і перемішували отриману суміш при кімнатній температурі протягом доби. Попередньо було встановлено, що при перемішуванні через 24 год в такій системі встановлюється стан хімічної рівноваги, який характеризується постійним значенням оптичної густини.

Надлишок барвника відфільтровували і одержані розчини кополієстерів з солюбілізованим барвником, розбавляли пропаном з таким розрахунком, щоб оптична густина D знаходилась в межах $0,2 \div 0,8$. Вимірювання оптичної густини D одержаних розчинів проводили у кюветах товщиною 5,11 мм.

Значення S (г/г), тобто маса барвника, яка солюбілізується 1 грамом кополієстеру визначали з використанням одержаних калібрувальних залежностей.

2.3.10. Методика дослідження перерозподілу Судану III з водного розчину полімера в октанол

Вивільнення барвника у модельне ліофільне середовище 1-октанолу визначали методом спектрофотометрії за допомогою спектрофотометра «ЮНИКО 1201».

Водні дисперсії, які містять солюбілізований судан III, одержували за методикою 2.3.11. У кювету товщиною 5,11 мм поміщали дисперсію із солюбілізованим барвником масою 0,43 г додавали 1-октанол (модельна ліофільна фаза) у кількості 1,8 г. Суміш перемішували з швидкістю 120 об/хв не допускаючи утворення емульсії. Вміст Судану III в 1-октанолі визначали спектрофотометрично за калібрувальною прямою отриманою в октанолі. Результати оформляли графічно, у вигляді графіку залежності кількості вивільненого Судану III (як частки від максимально можливої) від часу.

2.3.11 Дослідження вивільнення флуоресцеїну при гідролізі флуоресцеїнвмісних кополієстерів.

Гідроліз флуоресцеїнвмісних кополієстерів проводили оцінюючи швидкість вивільнення флуоресцеїну у присутності фосфатно-сольового буферу (рН=7,45). Наважку флуоресцеїнвмісного кополієстеру диспергували у воді, створюючи концентрації $0,3 \div 0,5\%$ і додавали фосфатно-сольовий буфер у співвідношенні до дисперсії 1:5. Цей момент вважали початком відліку. Через визначені проміжки часу відбирали проби і розбавляли метилцелозольом 1:1. Вимірювали оптичну густина отриманого розчину в кюветі товщиною 5 мм при довжині хвилі 490 нм. Калібрувальну пряму отримали як залежність оптичної густини (D) у розчині флуоресцеїну в метилцелозольові в присутності фосфатно-сольового буферу від концентрації барвника. За рівнянням калібрувальної прямої встановлювали вміст

флуоресцеїну у пробі і з врахуванням розбавлень будували графік зростання концентрації флуоресцеїну в реакційній суміші у часі.

Швидкість спонтанного гідролізу за відсутності частинок дисперсної фази визначалася аналогічно використовуючи вихідний розчин кополіестеру у метилцелозольві з додаванням фосфатно-сольового буферу.

Для дослідження гідролізу естерних зв'язків у складі комплексів флуоресцеїнвмісних кополіестерів з альбуміном до міцелярних розчинів кополіестеру вносили визначену кількість бичачого сироваткового альбуміну (BSA), витримували 2 год і проводили вимірювання за вище описаною схемою.

Значення швидкості отримували як тангенс кута нахилу при лінійній апроксимації початкових участків залежності концентрації флуоресцеїну від часу.

2.3.12. Дослідження сорбції альбуміну розчинами кополіестерів

Кількість сорбованого альбуміну визначали за зміною провідності розчину на приладі Malvern Zetasizer Nano S. Паралельно реєстрували ζ -потенціал дисперсної фази та її провідність. Для аналізу до 0,15-0,2% міцелярних розчинів вносились визначена кількість води, бичачого сироваткового альбуміну та розчин KCl з концентрацією 4 ммоль/л так, щоб забезпечити задані концентрації компонентів в суміші.

2.3.13. Фракціонування флуоресцеїнвмісних кополіестерів методом діалізу

Розділення кополіестерів методом діалізу проводили використовуючи мембрану з пропускною здатністю 2,5 кДа марки Spectra/Por 6 Dialysis Membrane. Ємність, сформовану з мембрани, з 20 мл дисперсії кополіестеру поміщали у ємність з 500 мл водою і при легкому перемішуванні залишали на 5 днів, замінюючи воду двічі на добу. Водний розчин об'єднували і упарювали на роторному випарнику отримуючи низькомолекулярну фракцію кополіестерів. Вміст діалізного мішка упарювали і отримували основну фракцію кополіестеру.

2.3.14. Дослідження цитотоксичності флуоресцеїнвмісних кополіестерів

Для оцінювання цитотоксичності флуоресцеїнвмісних кополіестерів використовували тест-об'єкт — спермії бугаїв. Сперму бугаїв отримували у Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси». Для дослідження відбирали еякуляти об'ємом 2–6 мл, концентрацією спермійв $0,6\text{--}1,5 \times 10^9$ клітин/мл та активністю 7,5–8,0 бала. Сперму, розріджену лактозо-жовтково-

гліцериним розріджувачем, ділили на частини: одну контрольну — без додавання та три дослідні — з додаванням дисперсій флуоресцеїнівмісних кополієстерів для отримання їх заданих концентрацій. У контрольних і дослідних зразках розрідженої сперми визначали життєздатність клітин за температури 2–4°C у присутності дисперсій за період тривалістю 72 год у порівнянні з контрольними тестами, у які у відповідних кількостях добавлялась дистильована вода. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за Н. А. Плохинським [79].

РОЗДІЛ 3. Особливості синтезу кополієстерів флуоресцеїну за реакцією Стегліха

Використання флуоресцентних зондів є поширеним прийомом в оптичній біомедичній діагностиці [80]. Зокрема речовини, які при дії ферментів є флуорогенними (містять фрагменти які після гідролітичного розкладу макромолекул здатні до флуоресценції), є важливими інструментами для вивчення біологічних та біохімічних процесів. Такі сполуки можуть бути використані для оцінки життєздатності клітин [81], для вимірювання ферментативної активності [82], як флуорогенні маркери для отримання зображень з середовища біологічних об'єктів [83] та виявлення присутності певних іонів [84,85], або як складова частина складних конструкцій для доставки ліків [86]. Ферменти з естеразною активністю, які присутні в організмах та клітинах, здатні каталізувати гідроліз багатьох субстратів з естерною природою зв'язків [87], і тим самим вивільняти з латентної форми фрагмент, молекула якого має флуоресцентні властивості.

Флуоресцентні зонди представлені доволі широким спектром сполук і використовуються в біомедичних дослідженнях, які вимагають здатності до селективного накопичення флуорофорів в певних структурах організму. Цілий ряд субстратів, здатних вивільняти молекулярні флуорофори побудовано за використання барвників ксантенового ряду, одним з найбільш поширених представників яких є флуоресцеїн [88].

Відомо, що для "маскування" функціональних груп полярної природи (гідроксильних) через утворення їх естерів, як у випадку флуоресцеїну, дає можливість отримувати сполуки, які втрачаючи здатність до флуоресценції, при цьому набувають значно покращені можливості до проникнення через ліпідні бішари клітинних мембран [89, 90]. Встановлено, що такі ліпофільні естерні похідні як флуоресцеїндіацетат та флуоресцеїнділаурат після проникнення всередину клітини при дії ензимів гідролізують, внаслідок чого відбувається вивільнення вільного флуоресцеїну. Ці їх властивості використовується для

спостережень методами люмінесцентної фотометрії за функціонуванням клітинних органел [89].

У зв'язку з цим актуальним завданням є синтез нових естерних похідних флуоресцеїну як перспективних флуорогенів із властивостями, які можуть бути зміненими через використання замісників, що покращують розчинність у середовищах різної природи, впливаючи на їх біорозподіл, а також синтез більш складних амфіфільних поліестерних структур, в яких флуоресцеїн входить елементарною ланкою.

Особливий інтерес можуть мати полімери флуоресцеїну і N-заміщених похідних природних двоосновних амінокислот. Такі продукти розглядаються як нові латентні флуорофори, які можуть забезпечити функцію доставки фотоактивної сполуки в тканини і клітини для вивчення ряду біохімічних процесів, які в них відбуваються.

3.1. Особливості синтезу простих кополієстерів флуоресцеїну.

Серед методів, які придатні для отримання полієстерів на основі похідних двоосновних α -амінокислот, в літературі зустрічаються повідомлення про поліконденсацію в розплаві і в розчині. Проте синтези, які проводяться у розплаві, через невисоку термічну стабільність амінокислотних похідних супроводжуються великою кількістю побічних продуктів, є багатостадійними і довготривалими, що визначає їх малоперспективність [91,92,93,94]. Традиційні методи проведення процесу у розчині, пов'язані з вилученням з реакційної суміші води азеотропною відгонкою, також є малоефективними при спробах отримати полієстери амінокислот. Поліконденсація у розчині за використання активуючих агентів є методом більш поширеним і придатним для отримання полієстерів двоосновних N-заміщених амінокислот і діолів поліетиленового та поліпропіленового рядів. Полієстери, які отримані з використанням амінокислот чи їх похідних і відрізняються відсутністю зв'язків пептидної природи, в літературі зустрічаються під назвою «псевдополіамінокислоти» [95]. Проте повідомлень про отримання методом поліконденсації полімерів з використанням флуоресцеїну інших авторів знайти не вдалося. Тому, в першу чергу, варто зупинитися на обґрунтуванні

можливості використання флуоресцеїну, як одного з мономерів у реакції поліконденсації при синтезі поліестерів.

Як відомо реакційна здатність гідроксильних груп фенольного типу є недостатньою для отримання їх естерів у класичних реакціях естерифікації. Разом з тим отримання індивідуальних естерних похідних флуоресцеїну можливе, але при цьому необхідним є використання високореакційноздатних ацилюючих агентів таких як ангідриди або хлорангідриди [96]. Двоосновні карбонові кислоти, в тому числі N-заміщені двоосновні амінокислоти доволі легко утворюють ангідриди, проте як правило внутрішньомолекулярні [97]. Із зрозумілих причин внутрішньомолекулярні ангідриди, які хоча і можуть бути зручними реагентами для синтезу моноестерів і диестерів, для утворення поліестерів непридатні.

Спроби отримати дихлорангідриди двоосновних амінокислот та їх N-заміщених похідних приводять в основному до осмолення реакційної суміші як за використання традиційних методик так і їх численних модифікацій. Наприклад використання реакції Бреннера (яка передбачає отримання хлорангідридів *in situ* в реакційній суміші при дії тіонілхлориду), яку застосовують для синтезу естерів у випадку коли хлорангідрид кислоти важкодоступний у синтезі з використанням двоосновних N-заміщених амінокислот, приводить переважно до утворення їх моно- та диестерів, і полімерних продуктів таким методом отримувати не вдавалося [98,99,100]. Такі методики є ефективними при отриманні індивідуальних естерів, які проводяться у великому надлишку спиртового компонента, проте в умовах еквімольних співвідношень реагентів як це вимагається при синтезі поліестерів, очікуваних продуктів не отримується.

Серед можливих альтернативних реакцій для утворення естерних зв'язків за участі гідроксильних груп флуоресцеїну розглядалися процеси, які пов'язані з підвищенням реакційної здатності карбоксильних груп у реакціях ацилювання. Серед них найбільш цікавою є реакція естерифікації за Стегліхом.

За цим методом отримання естерів відбувається при проведенні синтезу у розчині за температур $265\div 313\text{K}$, з виходами понад 90% [101]. Особливо часто до

його використання вдаються у випадках проведення реакцій з нестійкими, малоактивними субстратами.

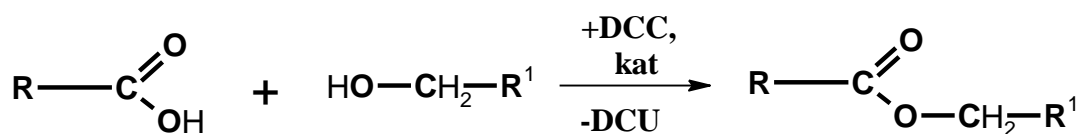


Рис. 3.1 Загальна схема реакції Стегліха

Запропонована Стегліхом каталітична система містить дициклогексилкарбодіїмід (DCC) як активатор карбоксильної групи кислоти і 4-диметиламінопіридин (DMAP) як каталізатор реакції ацилування (рис.3.1). У цьому випадку реакція естерифікації відбувається через активування карбоксильних груп кислоти з утворенням при взаємодії з дициклогексилкарбодіїмідом *in situ* «імідокарбаматів», так званих «активних естерів», що дозволяє уникати необхідності отримувати такі похідні як хлорангідриди. Як більш сильний нуклеофіл ніж гідроксильна група у спиртах, DMAP у цій системі, діє як реагент перенесення ацилу, утворюючи достатньо активний інтермедіат, подальші реакції якого з спиртом приводять до утворення естеру [102,103,104]. У випадку з фенолами і їх похідними реакція імовірно могла би іти одночасно також за схемою загального основного каталізу: DMAP як реагент з вираженою основністю може депротонувати фенольний гідроксил збільшуючи нуклеофільність атома Оксигену і в подальші взаємодії буде вступати уже фенолят-іон [105,106].

Ефективність одночасного використання двох реагентів, які доповнюють один одного при реалізації реакції Стегліха, у літературі продемонстровано для випадку утворення естеру при взаємодії бензойної кислоти з малоактивними гідроксильними групами фенолу [107]. При цьому результати, отримані у порівняльних синтезах, показали що: і) за відсутності активатора (DCC) реакція не відбувається взагалі; ii) при проведенні реакції у 4-диметиламінопіридині, але без активатора, фенілбензиловий естер утворюється, проте з дуже невисоким

виходом (не більше 10%); iii) за використання в одній системі обох реагентів був зафіксований вихід фенілбензилового естеру який сягав 94% [108].

Таким чином є підстави вважати метод Стегліха достатньо обґрунтованим і перспективним для використання при одержанні естерів та поліестерів на основі N-заміщених двоосновних α -амінокислот та флуоресцеїну.

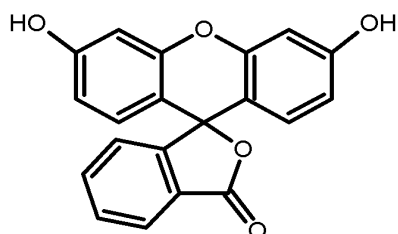


Рис. 3.2. Одна з найбільш імовірних таутомерних форм флуоресцеїну в апротонних розчинниках [109]

При обумовленні використання флуоресцеїну, як комономеру для реакції поліконденсації варто брати до уваги, що він, як відомо, в залежності від властивостей середовища (розчинника) може існувати в декількох різних таутомерних формах [109]. Проте вважається, що в безводних апротонних розчинниках (бензен, метиленхлорид) він практично кількісно перебуває в формі внутрішньомолекулярного лактону і при цьому структура його молекули передбачає наявність двох гідроксильних груп як це зображено на схемі (рис.3.2). Цей факт є важливим оскільки виходячи з загальних уявлень про перебіг реакцій поліконденсації зрозуміло, що отримання макромолекул в цих процесах можливе тільки за використання двофункційних реагентів, і основним при цьому є дотримання співвідношення їх реакційноздатних груп, близького до еквімолярного. Зважаючи на описані властивості флуоресцеїну, можна вважати, що в апротонних розчинниках створення відповідного мольного співвідношення реакційноздатних груп в реакційній суміші у реакції поліконденсації буде забезпечуватись дотриманням заданого співвідношення флуоресцеїну та двоосновної кислоти.

Проведення реакції 2-(додеканоїламіно)пентадієвої кислоти з флуоресцеїном за реакцією Стегліха першочергово здійснювали за умов, які наведені у методиці синтезу амінофункційних кополіестерів на основі N-

заміщених двоосновних амінокислот [110, 111]. Синтез проводився згідно схеми наведеної на рис. 3.3 у бензені при температурі 283-285К за використання 5% мольн. надлишку активатора – дициклогексилкарбодіїмиду (DCC) до кількості карбоксильних груп та каталізатора – диметиламінопіридину (DMAP) у кількості 20% мольн. від кількості активатора.

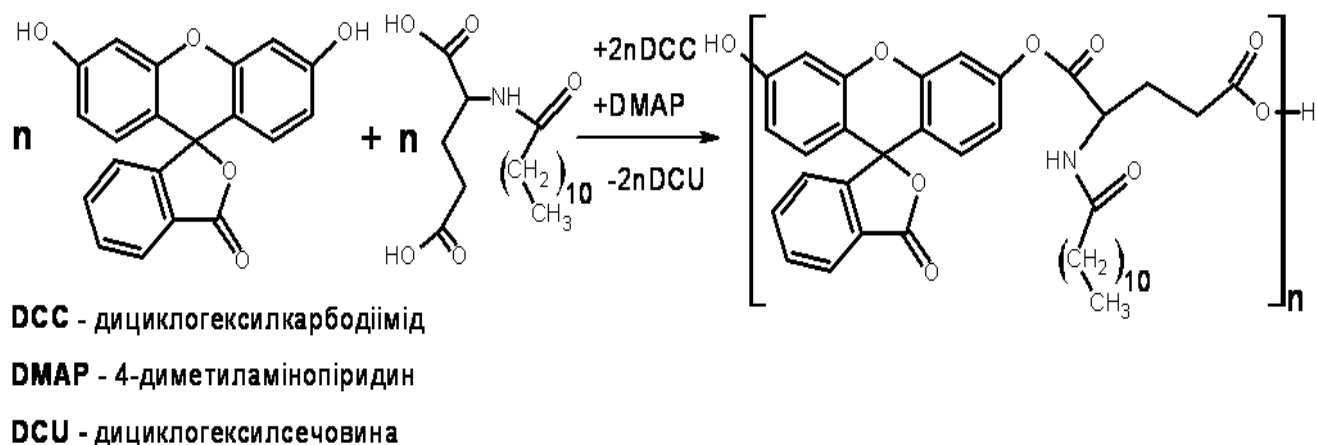


Рис. 3.3. Схема кополіконденсації флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентадіоювою кислотою за реакцією Стегліха.

В результаті, з реакційної суміші було виділено твердий порошкоподібний продукт, світло-жовтого кольору. Проте доволі низький (<50%) практичний вихід спонукав до виявлення причин і викликав необхідність додаткових досліджень, спрямованих на удосконалення методики синтезу. Проведення синтезу в метиленхлориді також не сприяло покращенню виходу продукту конденсації, який за своїми характеристиками практично не відрізняється від продукту отриманого у бензені (Табл. 3.1).

При перебігу реакції Стегліха одним з продуктів є дициклогексилсечовина (DCU), яка утворюється внаслідок зв'язування води молекулою DCC. Ця сполука, є нерозчинною в більшості розчинників і може бути кількісно виділена з реакційної суміші, що дозволяє контролювати перебіг реакції [112]. У синтезах кополієстерів МД1 та МД 1.2 які проводилися в бензені і в метиленхлориді нерозчинного осаду було виділено у кількостях, які значно переважали теоретичні значення кількості дициклогексилсечовини при розрахунку на завантажений DCC. Кількісне визначення його складу дало можливість зробити висновок про

те, що надлишкова кількість осаду спричинена присутністю в ньому флуоресцеїну, який не вступив в реакцію. В такому випадку очевидно, що значна частка завантаженого флуоресцеїну (орієнтовно 65-75% його початкової кількості) була співсаджена з реакційної суміші разом з DCU, яка виділялась в результаті перебігу реакції.

Таблиця 3.1.

Умови синтезу та характеристики поліестерів флуоресцеїну і
2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти.

Шифр продукту	Умови синтезу		Розчинник (масове співвідношення)	Вихід DCU, %	Практичний вихід поліестеру, %	Вміст флуоресцеїну в поліестері, %	Середня ММ
	Температура 288 К, загальна концентрація мономерів 0,178 моль/л						
	Співвідношення реагентів, моль						
	GluLa	F					
МД1	1,00	1,05	Бензен	78,6	44,0	33,8	1130
МД1.2			Метиленхлорид	73,0	41,0	30,7	1072
МД2.3			Бензен:ДМФА (1:1)	68,0	71,0	60,3	1505
МД2.2			Бензен:ДМФА (8:3)	76,0	81,0	58,8	1744
МД2.0				91,0	83,1	56,0	2570
МД2.4			1,0	0,91	Бензен:ДМФА (9:1)	90,5	45,0
МД2.5	1,0	1,15		88,5	84,0	56,3	1791

Внаслідок недостатньої розчинності флуоресцеїну (як у бензені, так і в метиленхлориді) у швидкій реакції, до якої можна віднести реакцію Стегліха, в реакційній суміші створювалися умови відчутної недостачі одного з реагентів (гідроксилвмісного комомеру -флуоресцеїну). Це, в свою чергу, спричинило до суттєвого розбалансування у співвідношенні карбоксильних та гідроксильних груп в реакційному середовищі, а цей чинник є, як відомо, одним з найбільш впливових при синтезі кополіестерів [113].

Виділений олігомерний продукт отриманий за вказаних вище умов (синтез у бензені) за даними ексклюзійної хроматографії має ступінь поліконденсації – 2-3 і характеризується вмістом флуоресцеїну який складає 33,8%. Таке значення може узгоджуватися з вказаним ступенем поліконденсації, але тільки за умови, що фрагменти 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти є кінцевими групами олігомерних продуктів. Це є додатковим підтвердженням того, що хоча умови синтезу по співвідношенню завантажених реагентів передбачали невеликий надлишок флуоресцеїну, проте внаслідок його поганої розчинності поліконденсація, відбувалася в умовах неконтрольованого надлишку кислоти.

При тому зменшення концентрації реагуючих сполук до рівня, при якому би забезпечувалась розчинність флуоресцеїну не може бути рекомендованим, оскільки поліконденсація у розчині при цьому, як правило, супроводжується перебігом реакцій циклізації і часткової втрати функційних груп, що також є однією з причин, яка зменшує виходи кополієстерів [97]. Тому проведення синтезу кополієстерів на основі 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти при використанні флуоресцеїну, як одного з кономерів, в першу чергу вимагало вибору середовища для проведення реакції, в якому би забезпечувалась його розчинність на всіх стадіях синтезу. Однак, рекомендації, які можна знайти у публікаціях, що стосуються особливостей проведення і перебігу реакції Стегліха вносять певні обмеження у виборі розчинника. Сприятливим для її успішного здійснення, згідно літературних даних, вважається використання розчинників із слабкими електронодонорними властивостями, таких як бензен чи метиленхлорид [114]. В свою чергу, розчинність флуоресцеїну може забезпечити тільки невеликий перелік розчинників (серед яких найбільш вживані диметилсульфоксид, диметилформамід), які проте проявляють високі електронодонорні властивості, що відповідно може мати негативний вплив на перебіг реакції Стегліха, який пов'язується з суттєвим погіршенням каталітичної функції DMAP в таких середовищах [105]. В багатьох подібних випадках дієвим засобом є проведення процесу у суміші розчинників. Попередніми дослідженнями було встановлено, що використання наприклад диметилформаміду, як

співрозчинника уже у кількостях 10÷20% у його суміші з бенzenом суттєво збільшує розчинність флуоресцеїну і забезпечує можливість створити його концентрацію у реакційному середовищі в межах 0,18-0,2 моль/л, що є уже достатнім для проведення поліконденсації N-заміщених двоосновних амінокислот за реакцією Стегліха [97].

Тим не менше використання як співрозчинника диметилформаміду через його можливі антибатні впливи вимагало проведення додаткових досліджень. Було проведено ряд порівняльних синтезів при різних співвідношеннях ДМФА-бензен (МД2.0, МД2.2, МД2.3, таблиця 3.1). Беручи до уваги наведені в табл.3.1 характеристики отриманих зразків продуктів видно, що оптимальним можна вважати склад розчинника в якому є 10-15% диметилформаміду. При синтезі кополієстерів у цих умовах досягалися високі (понад 90%) виходи дициклогексилсечовини та доволі високі (понад 80%), практичні виходи кополієстерів. Збільшення кількості диметилформаміду понад 20% у суміші негативно відбивалося на виходах та молекулярній масі кополієстерів (зразки МД2.2, МД2.3, таблиця 3.1, рис.3.4). Крім того за високих значень вмісту ДМФА внаслідок збільшення розчинності також і DCU ускладнюється контроль за ступенем завершеності реакції та стадії виділення та очистки полієстерів [115].

Серед інших умов, які беруться до уваги при проведенні реакції Стегліха можна відзначити температуру та співвідношення реагентів. Щодо температури синтезу то в даному випадку вона не розглядалася як дієвий чинник, оскільки у ряді попередніх робіт, які стосувалися синтезу кополієстерів, а також дослідження реакції ацилування олігосахаридів за реакцією Стегліха було показано, що підвищення температури понад 290К приводить до інтенсивного перебігу побічних реакцій, які понижують ефективність реакції і виходи цільових продуктів [97,116]. Зважаючи на дані, наведені в цих же публікаціях, а також істотно меншу реакційну здатність флуоресцеїну у реакціях ацилування у порівнянні з традиційними спиртовими субстратами зменшення температури нижче 285К також є недоцільним.

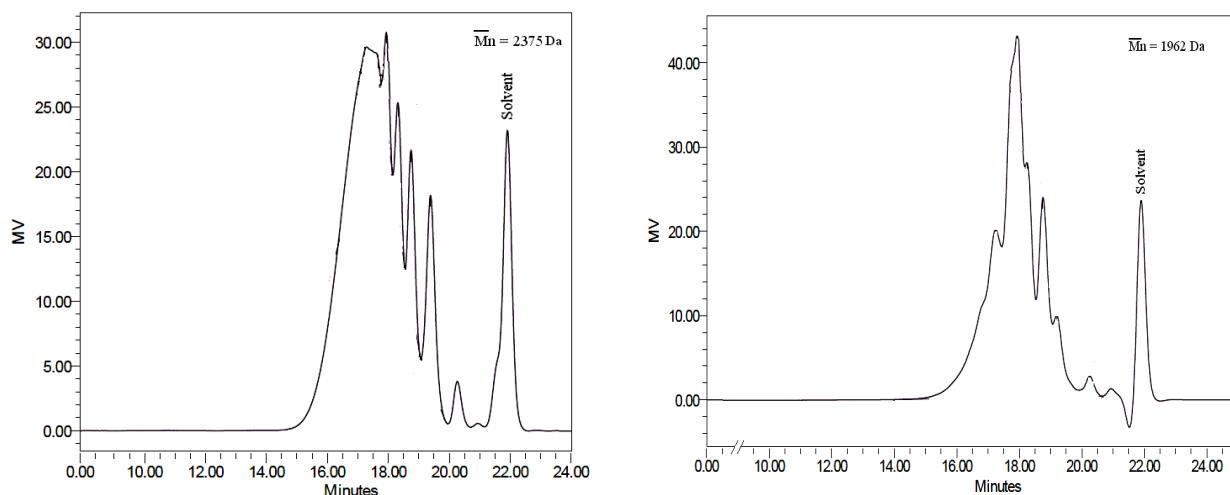


Рис. 3.4. Молекулярно масовий розподіл кополіестеру флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентандіовою кислотою а) синтез при надлишку гідроксильних груп 1,00:1,05 (зразок МД2.0); б) синтез за надлишку карбоксильних груп 1,00:0,91 (зразок МД2.4).

Кількість дициклогексилкарбодііміду у реакції Стегліха однозначно задається кількістю карбоксильних груп, які повинні бути активовані. Тому у всіх синтезах активатора завантажували із розрахунку 5% моль надлишку по відношенню до карбоксильну груп кислоти. Як було показано раніше збільшення надлишку DCC до відчутних ефектів у досліджуваній системі не приводить.

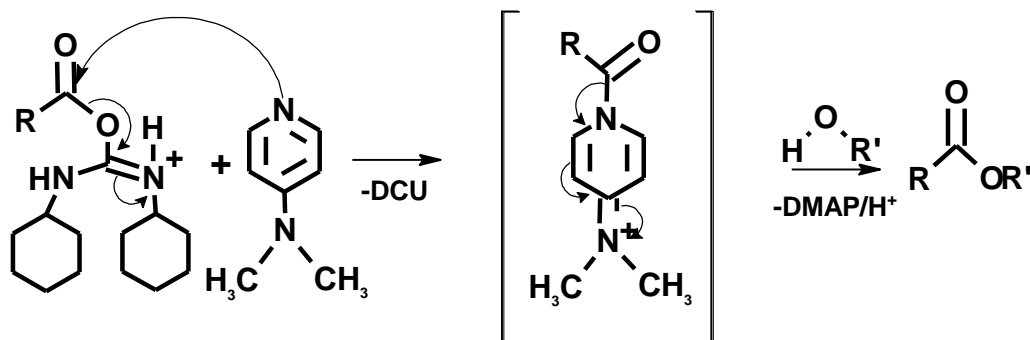


Рис. 3.5 Утворенням проміжної реакційноздатної сполуки при взаємодії активованої дициклогексилкарбодіімідом карбоксильної групи кислоти з 4-диметиламінопіридином.

Роль нуклеофільної добавки, в якості якої використовували DMAP, у системі що розглядається, полягає у взаємодії сильного нуклеофілу з активованою дициклогексилкарбодіімідом карбоксильною групою кислоти, з утворенням

проміжної сполуки з властивостями активного ацилюючого агенту. Механізм такої взаємодії зводиться до схеми наведеної на Рис.3.5. [117]:

В літературних даних немає однозначності щодо кількості цього компоненту, яка необхідна при проведенні реакції Стегліха. Є описані методики в яких рекомендується завантажувати DMAP у кількостях співрозмірних з кількістю активатора і в цих випадках його скоріше можна називати співреагентом а не каталізатором. Тому враховуючи також можливість участі DMAP за схемою загального основного каталізу з утворенням аніону флуоресцеїну було проведено дослідження впливу його кількості на ефективність проведення реакції.

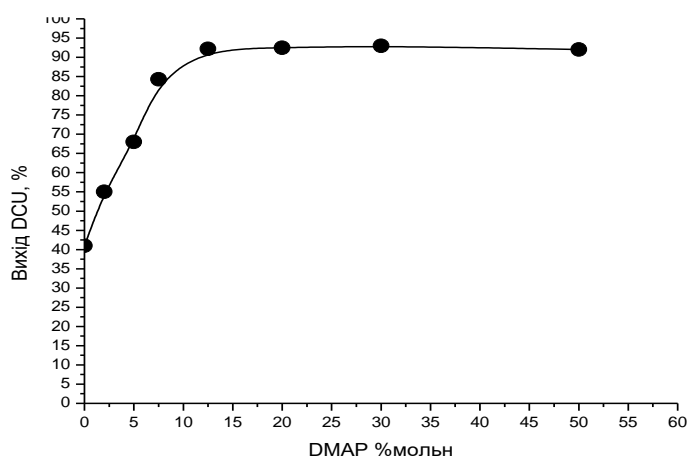


Рис. 3.6. Залежність частки отриманої дициклогексилсечовини (DCU) від теоретично можливої в залежності від мольного співвідношення DMAP/DCC.

При дослідженні кількості DCU, яка виділялася з реакційної маси при реалізації порівняльних синтезів з різною кількістю DMAP у співвідношенні до кількості активатора було отримано залежність, наведену на рис.3.6. З отриманих даних видно, що суттєвий його вплив спостерігається тільки в межах до 15% мольн від DCC у початковій реакційній суміші. Оптимальним можна вважати 20% мольн, оскільки при проведенні синтезів ця кількість забезпечує максимальні значення кількості виділених продуктів реакції (як DCU так і кополієстеру). Із меншими кількостями суттєво зменшується кількість виділеної DCU і відповідно виходи полієстеру, а збільшення до суттєвих змін уже не приводить. Тому синтези полієстерів флуоресцеїну за реакцією Стегліха проводили при кількості

DMAP 20% мольн по відношенню до кількості DCU у початковій реакційній суміші.

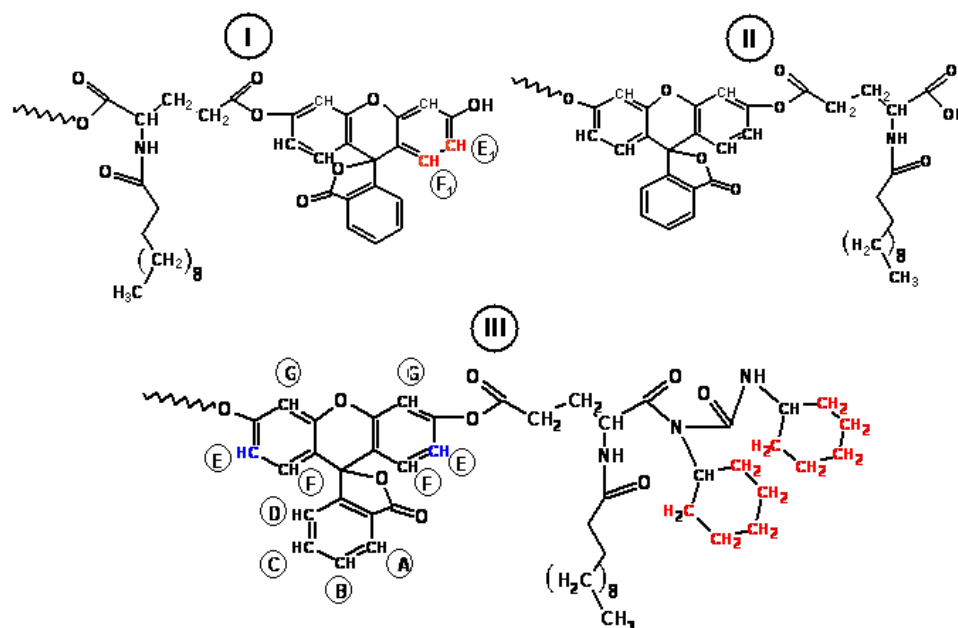


Рис. 3.7 Можливі варіанти кінцевих ланок макромолекул в залежності від природи реагенту взятого у надлишку

Варто зауважити, що проведення синтезів у суміші розчинників, що містить диметилформамід, приводить до неповного виділення DCU з початкового реакційного середовища. Окремі дослідження показали, що при вмісті ДМФА 10-15% до 8-10% утвореної в результаті реакції DCU залишається у розчині і виділяється пізніше при проведенні очищення полімеру згідно методики 2.2.1.

Разом з тим властивості реакційного середовища (розчинник, кількість та природа нуклеофільної добавки) не є єдиними чинниками, які мають вплив на закономірності кополіконденсації та характеристики отриманих продуктів. Використання нетрадиційного мономера (флуоресцеїну), та диметилформаміду як співрозчинника, який може відігравати неоднозначну роль при кополіконденсації за реакцією Стегліха, вимагало проведення досліджень впливу співвідношення реагуючих груп, як одного з найбільш значимих факторів, які визначають ступінь поліконденсації та вихід продукту при отриманні поліестерів.

Для виявлення особливостей перебігу реакції Стегліха в цьому випадку було проведено синтези кополіестерів 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти та флуоресцеїну, отриманих за їх різних, але близьких до еквімольних

співвідношень у початковій реакційній суміші при використанні 10% диметилформаміду як співрозчинника. Отримані продукти охарактеризовано методами ексклюзивної хроматографії, ІЧ- та ЯМР-спектроскопії та елементним аналізом. В табл. 3.1 наведено умови синтезу та характеристики отриманих продуктів (зразки МД2.0, МД2.4, МД2.5).

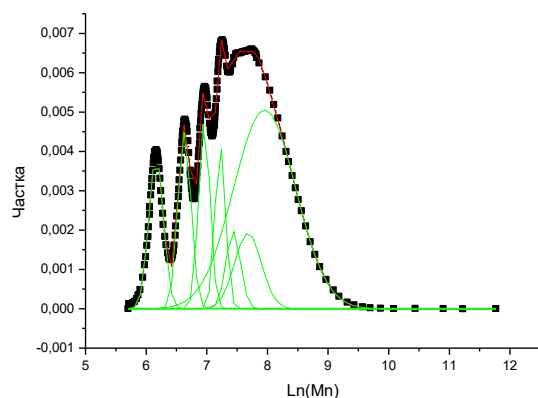


Рис.3.8. Молекулярно-масовий розподіл поліестеру отриманого при співвідношенні 1:1,05 (зразок МД-2.0)

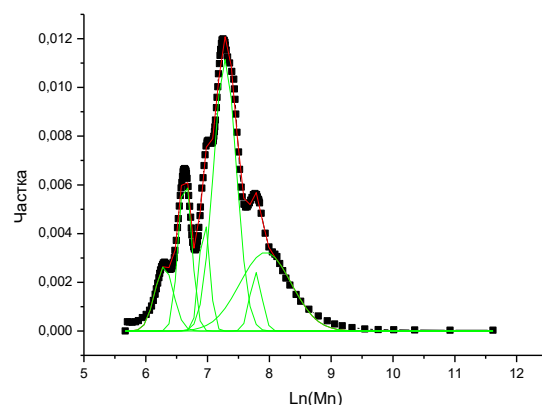


Рис.3.9. Молекулярно-масовий розподіл поліестеру отриманого при співвідношенні 1:0,91 (зразок МД-2.4)

Аналіз даних ексклюзивної хроматографії дозволяє стверджувати, що практично у всіх досліджених умовах отримуються продукти олігомерної природи (рис.3.4). Для більш детального порівняльного аналізу було використано два зразки кополіестерів МД2.4 і МД2.0 отриманих за різних умов. Для зразка МД2.4 передбачали 0,09 мольн надлишку кислоти у співвідношенні реакційноздатних груп різної природи в початковій реакційній суміші, а для - МД2.0 0,05 мольн надлишку флуоресцеїну.

В загальному випадку можна було очікувати, що у реакції кополіконденсації надлишок груп певної природи у початковій суміші мономерів повинен приводити до переважання кінцевих ланок тієї ж природи у олігомерах (рис. 3.7 структури I і II відповідно). Разом з тим у випадку надлишку дикислоти кількість кінцевих карбоксильних груп в олігомерах є суттєво меншою від очікуваної або не спостерігається взагалі (табл. 3.1).

Молекулярно-масовий розподіл зразків кополієстерів МД-2.4 і МД-2.0

№ Фр	Молекулярна маса фракції		Вміст фракції в кополіе стері,%	Склад фракції	Вміст нітрогену, %		
	Розрахо вана	За даним и SEC			Розрахунковий по фр.	Сер. для полімеру	Експериментал ьний
МД-2.4							
1	535	540	5,27	GluLa- DCU	7,84	4,83	4,68
2	758	759	6,24	DCU -GluLa- DCU	9,44		
3	1058	1037	2,76	GluLa-F-GluLa- DMAP	5,2		
4	1370	1409	34,1	DCU -GluLa-F-GluL- DCU	6,14		
5	2413	2390	1,98	[GluLa-F]3-GluLa- DCU	3,48		
6	2727	2785	49,63	DCU -GluLa-[F-GluLa]3-F	3,08		
Сер ММ Mn=1957							
МД-2.0							
1	451	475	1,37	GluLa DMAP	9,3	2,53	2,24
2	758	764	1,19	DCU -GluLa- DCU	9,44		
3	1077	1042	2,55	GluL-F-GluLa DMAP	5,2		
4	1370	1378	1,93	DCU -GluLa-F-GluL- DCU	6,14		
5	1580	1648	2,68	[F-GluLa]2-F	2,22		
6	2209	2161	6,81	[F-GluLa]3-F	1,9		
7	2832	2850	83,44	F-[GluLa-F]4	2,22		
Сер ММ Mn=2570							

Відносно невисока ступінь поліконденсації отриманих олігомерів та відносно велика молярна маса їх мономерних ланок дозволяють провести аналіз даних ексклюзійної хроматографії використовуючи засоби обробки даних Origin (інтерполяція гаусіанами по методу МНК) (рис.3.8 і 3.9). При цьому враховуючи, що чутливість детектора є приблизно однаковою для олігомерів різної

молекулярної маси можна розрахувати у виділеній в результаті синтезів суміші можна отримати вміст індивідуальних олігомерних продуктів, які відрізняються ступенем кополіконденсації. В таблиці 3.2 наведено результати віднесення хроматографічних піків отриманих методом ексклюзійної хроматографії та розраховано склад продуктів кополіконденсації за фракціями та вміст кожної фракції у складі виділеного кополіестеру.

Для того, щоб зробити такі віднесення окрім результатів ексклюзійної хроматографії бралися до уваги ще ряд факторів та результатів додаткових аналізів.

Кількісне визначення кінцевих карбоксильних груп для продуктів, синтезованих у невеликому (1:1,05) надлишку флуоресцеїну (продукт МД2.0) та за більш значного надлишку флуоресцеїну 1:1,15 (зразка МД2.5) не було виявлено, і це можна вважати закономірним наслідком кополіконденсації у вказаних умовах табл.3.1. Найбільш цікавим є те, що у противагу від очікуваного спостерігається також відсутність кінцевих карбоксильних груп у продукті МД2.4, який отримано при проведенні поліконденсації за надлишку 1:0.91 карбоксилвмісного мономеру.

Відсутність карбоксильних груп як кінцевих у макромолекулах полімеру МД2.4, отриманого за умов проведення поліконденсації, які повинні були би закономірно цьому сприяти, дають можливість припустити той факт, що чинник, який приводить до цього пов'язаний з особливостями перебігу реакції Стегліха.

При отриманні індивідуальних естерів високі виходи реакції Стегліха, як і в більшості випадків естерифікації, досягаються при значних надлишках реагента з функційними групами спиртової природи. Проте в умовах коли співвідношення карбоксильних та гідроксильних груп близькі до еквімольних вона супроводжується перебігом ряду побічних реакцій [102,109].

Один з найбільш впливових побічних процесів, який може приводити до блокування карбоксильної групи, був уже описаний раніше при отриманні кополіестерів N-заміщених похідних глютамінової кислоти [97]. Частина карбоксильних груп дикислоти після утворення при дії карбодііміду -

імідокарбаматів (або так званих «активних естерів») може зазнавати перегрупування з утворенням нереакційноздатних N-ацилпохідних дициклогексилсечовини - «пасивних амідів», які не можуть приймати участі в подальших процесах конденсації Рис.3.11 [103].

За результатами елементного аналізу отриманих продуктів видно, що у зразку МД2.4 спостерігається перевищення більш ніж у 2 рази вмісту нітрогену (4.68%) у порівнянні з розрахунком (2,17%), а аналіз вмісту флуоресцеїну ($C_F=34\%$) у ньому суттєво менший від очікуваного ($C_F=52\%$). Це дозволяє зробити висновок про присутність у продукті фрагментів із значно вищим вмістом нітрогену у порівнянні з тим яким би мав характеризуватися кополіестер 2-(додеканоїламіно)пентадієвої кислоти і флуоресцеїну Табл. 3.2.

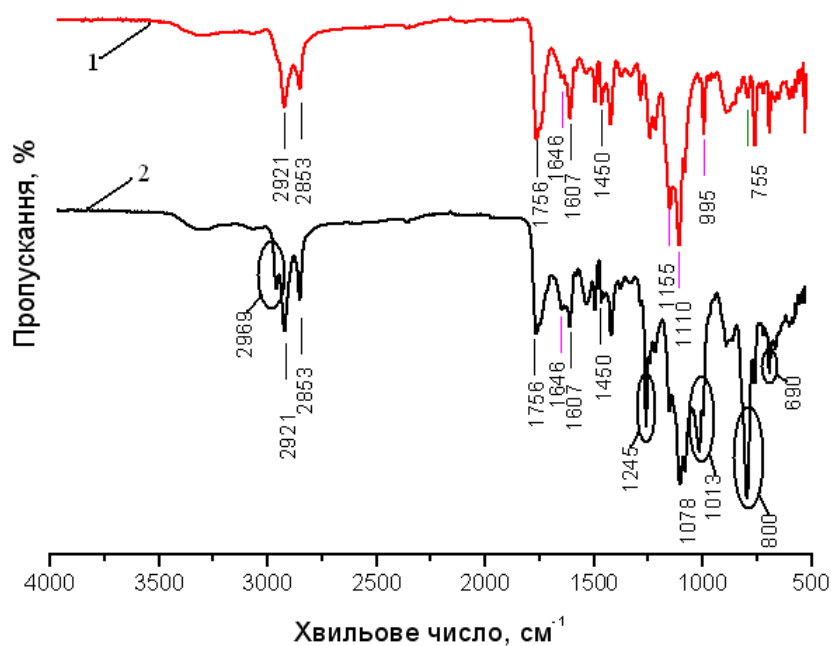


Рис. 3.10. ІЧ-спектри кополіестерів отриманих при різних співвідношеннях карбоксильних до гідроксильних груп (1-МД2.0, отриманого при співвідношенні 1,0:1,05; 2- МД2.4, отриманого при співвідношенні 1,0:0,91).

Порівняльний аналіз FTIR спектрів зразків МД2.4 і МД2.0 демонструє, що в цілому в спектрах присутні сигнали всіх складових кополіестеру (рис. 3.10). Інтенсивні смуги поглинання в області 2921 (va, CH₃), 2853 (vs, CH₂,CH₃), 1450 (δs, CH₂,CH₃) свідчать про присутність ланок 2-(додеканоїламіно)пентадієвої кислоти. Естерні групи у складі молекул підтверджуються наявністю смуг

поглинання 1737 (ν , C=O) та 1180 cm^{-1} (ν , O=C-O-C), які накладаються з сигналами від фрагментів флуоресцеїну (1737 cm^{-1} валентні коливання зв'язку C=O лактону у флуоресцеїні, 1155 cm^{-1} - валентні коливання C-OH та C-O-C зв'язків). Коливання у ароматичному скелеті флуоресцеїну у спектрах проявляються смугами поглинання в області 1607-1650 cm^{-1} та 1450 cm^{-1} (валентні коливання C-O та C-C), валентні коливання C-O, деформаційні коливання C-CH та C-OH в області 1110 cm^{-1} , 1043 cm^{-1} (ν , C-C) та слабковираженими сигналами в області 900-600 cm^{-1} , які відповідають C-H зв'язку.

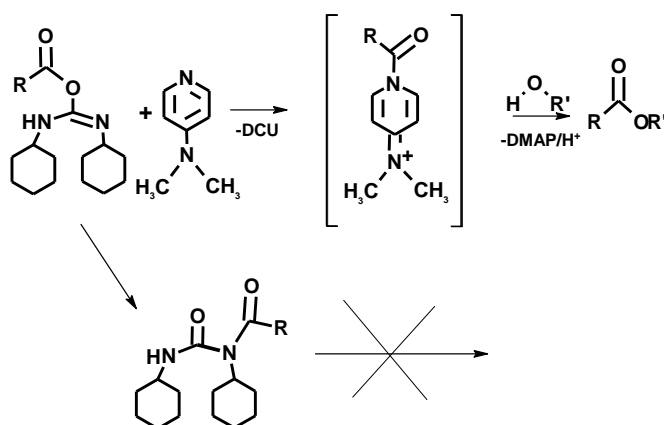


Рис.3.11 Побічний маршрут перетворень активованої дициклогексилкарбодіімідом карбоксильної групи

Разом з тим, в спектрі зразка МД2.4 спостерігаються добре виражені сигнали в області 2969, 1245, 1078 та 800 cm^{-1} , які можна віднести до дициклогексилсечовини, яка входить фрагментом кінцевої ланки олігомеру. Ці сигнали, які добре ідентифікуються в спектрі продукту МД2.4 не проявляються в спектрі продукту МД2.0. У спектрі МД2.4 є також смуги поглинання при 1013 cm^{-1} та 690 cm^{-1} , які можна віднести до коливань C-H зв'язків у диметиламінопіридині.

На рис. 3.12 наведено ^1H ЯМР спектри кополієстеру 2-(додеканоїламіно)пентадієвої кислоти і флуоресцеїну зразків МД2.4 та МД2.0, які отримані у порівняльних умовах проте відрізняються співвідношеннями комономерів у початковій реакційній суміші (Табл.3.1).

Отримані спектри дозволяють віднести всі сигнали протонів та за їх інтенсивністю провести кількісні оцінки, а порівняння спектрів олігомерів отриманих за різних співвідношень реагуючих груп дозволяє отримати

інформацію, яка у співставленні з результатами інших аналізів дає можливість виявити особливості перебігу реакції поліестерифікації 2-(додеканоїламіно)пентадіової кислоти і флуоресцеїну.

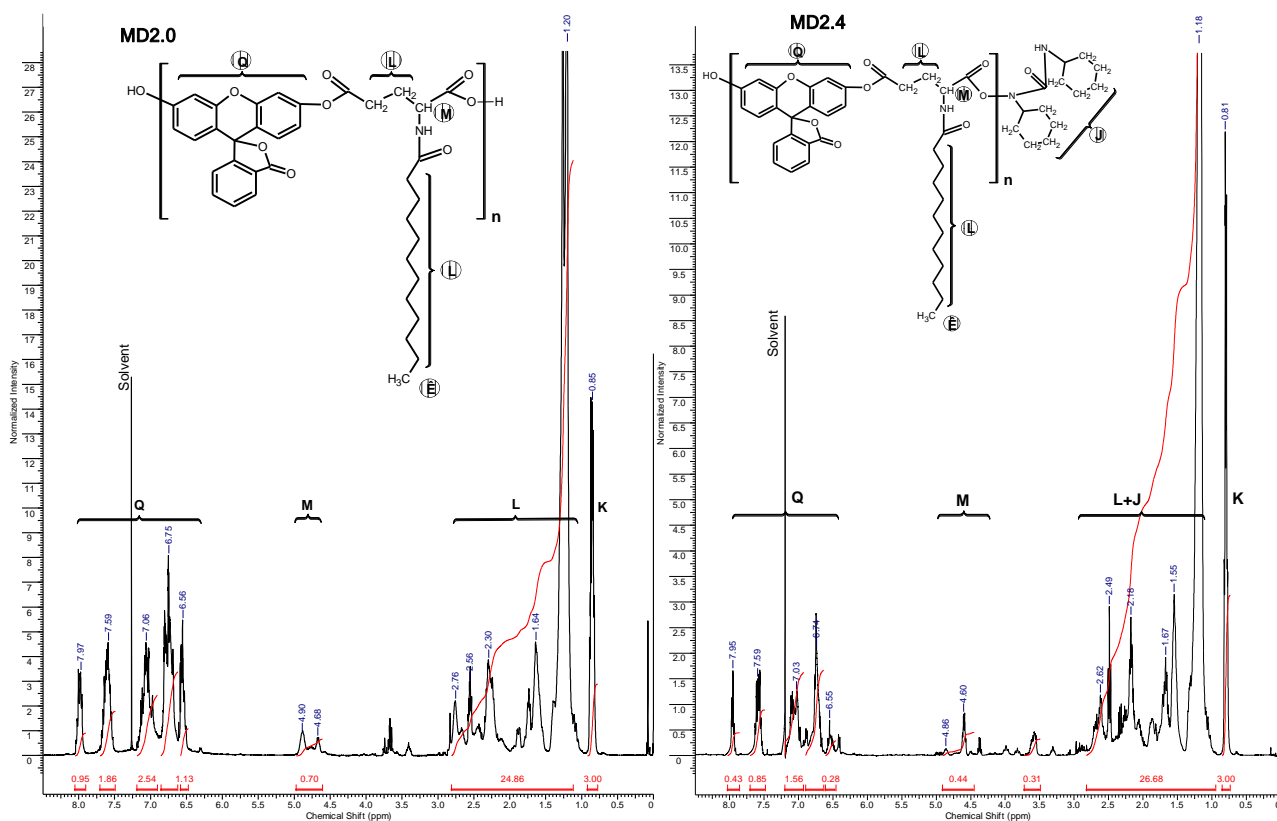


Рис. 3.12. ПМР спектр продукту кополіконденсації флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентадіовою кислотою: а) МД2.0 (співвідношення мономерів 1,0:1,05 б) МД2.4 (співвідношення мономерів 1,0:0,91); CDCl_3 , 400 МГц.

Якщо при аналізі ^1H ЯМР спектру продукту, умови отримання якого передбачали надлишок (0,05 моль) флуоресцеїну опиратися на інтенсивність сигналу від трьох протонів метильної групи в 2-(додеканоїламіно)пентадіовій кислоті у спектрі МД2.0 (сигнал *K* з хімічним зсувом 0,87 м.ч. рис.3.12,б) то видно, що сумарна інтенсивність сигналів від протонів із хімічним зсувом 7,6÷7,95 м.ч. (А, В, С) ланки флуоресцеїну складає $I_K/I_A=3,13$, що добре узгоджується з такою структурою макромолекули олігоестеру, в якому ланки представлені фрагментами флуоресцеїну і фрагментами кислоти у дуже близькому співвідношенні.

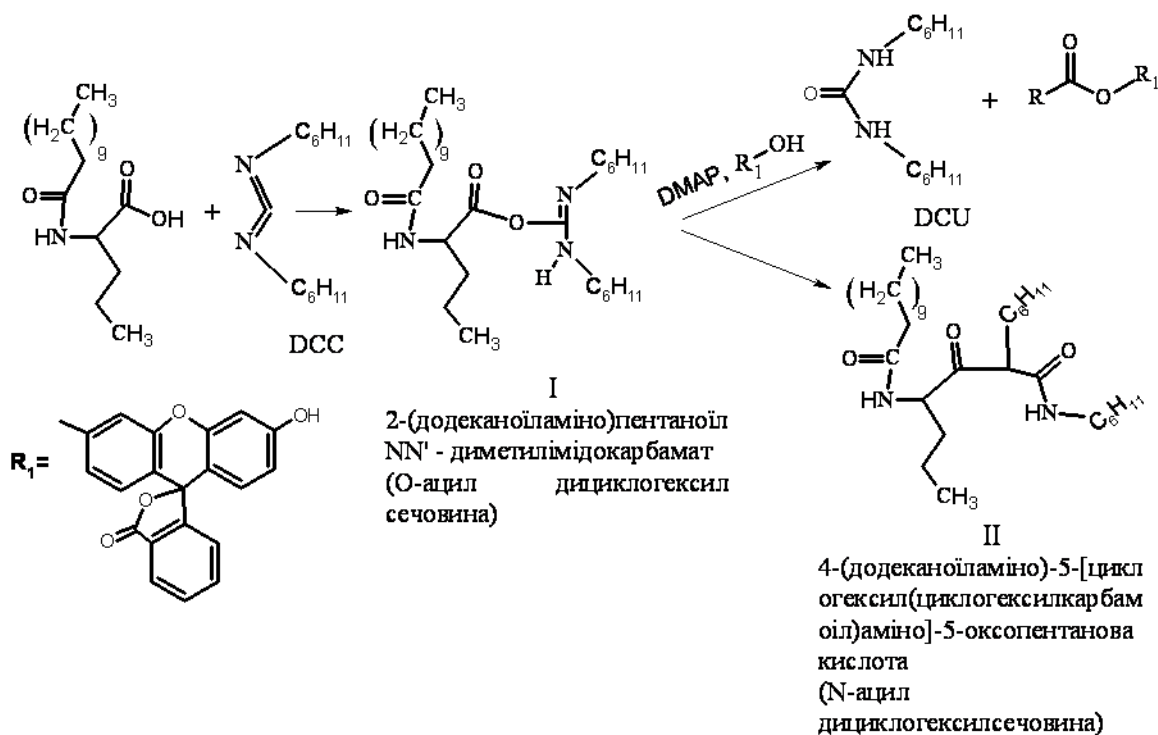


Рис.3.13. Схема перетворень у реакції флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентаноївою кислотою за реакцією Стегліха

Інтенсивність групи сигналів L від протонів метиленових груп, які є у структурі 2-(додеканоїламіно)пентаноївої кислоти, і які у ^1H ЯМР – спектрі проявляються в діапазоні хімічних зсувів 1,0÷2,7 м.ч. в сумі за розрахунком повинна складати $I_L=24$. У спектрі олігомеру МД2.0 рис. 3.12,а спостерігається тільки незначне перевищення цього значення ($I_L(\text{МД2.0})=24,86$). Натомість сумарна інтенсивність сигналів в цій області для МД2.4 (рис. 3.12,б) складає $I_L(\text{МД2.4})=26,68$. Це свідчить про наявність додаткових протонів, сигнали від яких в цій області можна віднести до 20 протонів метиленових груп у двох циклогексильних замісниках сечовини, фрагменти якої ввійшли в склад продукту внаслідок реакції перегрупування з утворенням структури олігомеру, кінцева ланка якого наведена на Рис.3.7. структура III. Такий висновок узгоджується з результатами, отриманими ІЧ спектроскопією та елементним аналізом і також дає можливість пояснити відсутність карбоксильних груп, які повинні були би бути кінцевими у зразку поліестеру МД2.4.

Разом з тим відношення інтенсивності сигналу протонів флуоресцеїну сигнал А Рис. 3.12 із хімічним зсувом 7,95 м.ч. до протонів метильної групи у 2-

(додеканоїламіно)пентандіовій кислоті для зразка МД2.4 складає $I_K/I_A = 7,4$. Проте максимально можливе співвідношення $I_K/I_A = 6$ може спостерігатись для випадку коли продукт є диестером флуоресцеїну 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти. До вищих значень відношення інтенсивностей сигналів цих протонів приводить присутність відносно низькомолекулярних сполук, які є результатом перегрупування активованої дициклогексилсечовиною карбоксильної групи 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти, і входять в склад продуктів, що виділяються разом з кополіестером (Рис.3.13, II). Причому у складі олігомеру було ідентифіковано сполуки, які є продуктами перегрупування як по одній так і по двох карбоксильних групах кислоти. Вони не містять ланок флуоресцеїну і це, відповідно, приводить до збільшення вказаного співвідношення.

Крім того таке співвідношення може спостерігатись тільки у випадку якщо у продукті з невисоким ступенем поліконденсації переважаючими є кінцеві групи 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти. Тоді з врахуванням попередніх висновків є підстави вважати, що в олігомерів із складу отриманого зразка поліестеру МД2.4 кінцевими є ланки 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти у якої кінцева карбоксильна група в результаті перегрупування активованої форми є фрагментом з приєднаною дициклогексилсечовиною, як це зображено на Рис.3.7. структура III.

Підтвердженням цього висновку є наявність у молекулярно-масовому розподілі виділеного продукту добре виражених фракцій з молярною масою 540 Да та 759 Да, які інтерпретовані, як 2-(додеканоїламіно)пентандіова кислота (329 Да) з приєднаним одним або двома фрагментами дициклогексилсечовини (223 Да), які утворилися в результаті перегрупування активного проміжного продукту утвореного взаємодією карбоксильної групи з DCC. Деактивація частини карбоксильних груп через перегрупування, приводить до закономірного обриву матеріальних ланцюгів при проведенні поліконденсації за реакцією Стегліха. Нескладні розрахунки, які дозволяють виключити з розгляду низькомолекулярні похідні приводять до висновку, що практично всі олігомерні молекули, які були отримані у синтезі проведеному у надлишку карбоксильних груп (МД2.4) містять

фрагменти цього перегрупування як кінцеві групи (рис. 3.7 Структура III). Цей висновок добре узгоджується з даними ПМР-спектроскопії, які свідчать що у виділеному продукті міститься 3,6% мольн. фрагментів перегрупування.

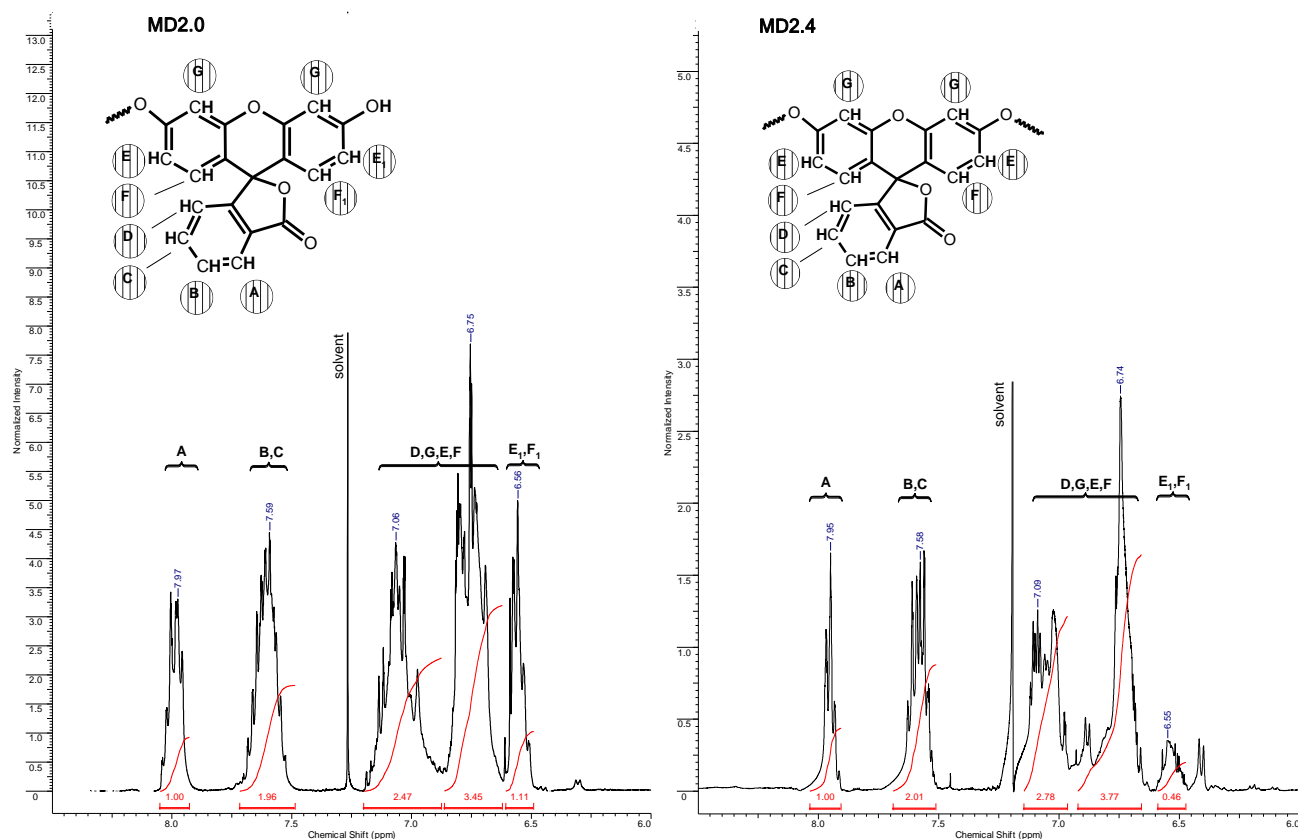


Рис. 3.14. ПМР спектри продуктів кополіконденсації флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентандіовою кислотою у діапазоні виходу сигналів від протонів ланки флуоресцеїну: а) МД2.0 за співвідношення 1,0:1,05 б) МД2.4 за співвідношення 1,0:0,91; CDCl_3 , 400 МГц.

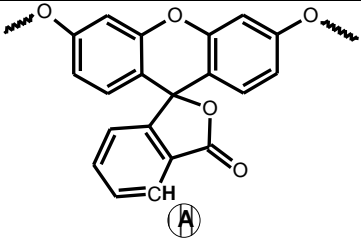
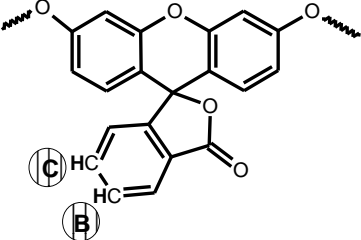
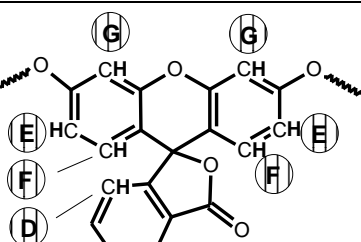
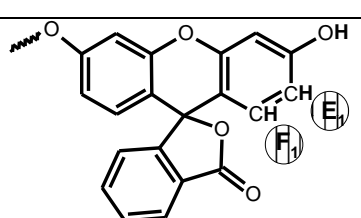
З іншого боку при проведенні поліконденсації у надлишку флуоресцеїну повинні утворюватись макромолекули у яких переважаючими є його фрагменти, як кінцеві ланки. Про це свідчить наприклад той факт, що загальний вміст ланок флуоресцеїну у МД2.4 складає 56%, тоді як при еквімольному співвідношенні це значення повинно бути 52%.

В загальному той факт, що в ЯМР спектрах сигнали від протонів ланок флуоресцеїну представлені в діапазоні хімічних зсувів 6,5-8,0 м.ч., а сигнали від всіх протонів, які містять ланки 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти проявляються в сильному полі, в діапазоні хімічних зсувів 0,8÷4,7 м.ч. дозволяє

окремо провести більш детальний аналіз спектрів в області виходу сигналів від протонів флуоресцеїну.

Таблиця 3.3.

Віднесення сигналів від протонів та їх зміщення у ланці в зразках кополієстерів.

№	Позн	Хімічний зсув, м.ч.	Тип	Віднесення	Кількість протонів	Інтеграл	
						МД2.4	МД2.0
1	A	7,95	T		1	1,00	1,00
2	B,C	7,58	TT		2	2,01	1,96
3	D,G, E,F	6,65÷7,15	ШМ		7	6,55	5,92
4	E ₁ ,F ₁	6,55	ШМ		2	0,46	1,11

Олігомерний характер продуктів приводить до часткового накладання сигналів та уширення піків, особливо в зоні слабого поля де проявляються сигнали протонів флуоресцеїну (6,5÷8,0 м.ч.), що не дає можливості охарактеризувати щеплення. Проте загальний аналіз за інтенсивністю цих сигналів проводити можна. Про це свідчить доволі непогане співпадіння сумарної

інтенсивності сигналів від десяти протонів у фрагменті флуоресцеїну, по відношенню до інтенсивності сигналів від протону А сигнал якого виходить із зміщенням 7.95 м.ч., яка в обох випадках (для зразків МД2.4 та МД2.0) близька до $I_{\phi}=10$ Рис.3.14

При такому представленні ЯМР спектрів видно, що для полімерів, отриманих в умовах різного співвідношення реагуючих груп, є суттєві відмінності.

^1H ЯМР спектр продуктів в діапазоні виходу сигналів від протонів флуоресцеїну у обидвох випадках представлений п'ятьма групами сигналів. Сигнали А, В та С у спектрах обидвох зразків полімерів однакові, що проявляється у відповідному їх зміщенні та співвідношенні інтенсивності в обидвох випадках $I_{(B+C)}/I_A=2$. Відмінності проявляються у значно меншій інтенсивності сигналів Е і F із хімічним зсувом 6,5-6,6 м.ч. у спектрі продукту МД 2.4 у порівнянні зі спектром МД2.0.

Аналіз спектрів незаміщеного флуоресцеїну та його диестерів, які наведені в літературі дає можливість віднести сигнал з хімічним зсувом 6.55 м.ч. у цій області до 4 протонів, які позначені як F₁, E₁ Рис.3.7, табл. 3.3) у випадку присутності вільної гідроксильної групи. У випадку утворення естерної групи (як наприклад у диацетилфлуоресцеїні [118]) діапазон виходу сигналу від вказаних протонів через більш сильний I-ефект ацильної групи і відповідно зменшення електронної густини зазнає зміщення в сторону більш слабкого поля інтегруючись при цьому з сигналами від інших протонів флуоресцеїну. Таким чином ланка флуоресцеїну, яка міститься в макромолекулі кополіестеру як і в диестері, не містить атомів водню, які проявляються сигналом з зсувом 6.55 м.ч. – оскільки обидва гідроксили у нього зв'язані в естерних групах. Зважаючи на те, що за даними ТШХ домішків незв'язаного флуоресцеїну в зразках продуктів виявлено не було, то сигнал з хімічним зсувом 6.55 можна отримати тільки від двох протонів кінцевої флуоресцеїнової ланки олігомерів, яка містить одну гідроксильну групу (Рис.3.7 Структура I).

Це дає можливість оцінити кількісно кінцеві групи флуоресцеїну в отриманих продуктах. Таким чином, виходячи з аналізу наведених спектральних даних, можна зробити висновок, що в продукті МД2.4 отриманого за надлишку карбоксильних груп у початковій реакційній суміші частка ланок флуоресцеїну в олігомері з вільними гідроксильними групами, які є кінцевими фрагментами є незначною і складає близько 17 %.

У зразку поліестеру МД2.0 отриманого за надлишку гідроксильних груп (флуоресцеїну) в реакційній суміші такий аналіз приводить до висновку, що уже при мольному співвідношенні в початковій реакційній суміші 1:1,05 у великій частини олігомерних молекул кінцевими групами є фрагменти флуоресцеїну частка яких складає близько 85%.

Такі розрахунки добре узгоджуються з вмістом у отриманих продуктах індивідуальних олігомерів та їх складом, які наведено в Табл. 3.2. В той же час, розрахунки вмісту флуоресцеїну практично співпадають із експериментально отриманими результатами визначення незалежним фотометричним аналізом після повного гідролізу олігомеру, згідно якого в МД2.0 флуоресцеїну міститься $56 \pm 0,5\%$.

Проведений аналіз та обґрунтування дозволив провести аналіз результатів ексклюзивної хроматографії (рис.3.8 і 3.9, табл.3.2). Відхилення молекулярної маси розрахованої та отриманої експериментально у окремих фракціях, яке складає менше 10% свідчить про вірність запропонованих структур та припущень, закладених в розрахунок.

Проведені дослідження дають можливість стверджувати, що кополіконденсацію флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентандіовою кислотою за реакцією Стегліха більш ефективно проводити за невеликого мольного надлишку гідроксилвмісного мономеру. При цьому спостерігаються вищі виходи (83,1% для МД2.0 проти 45% у МД2.4). При тому, що фракції з максимальною молекулярною масою за результатами ексклюзивної хроматографії у продуктах МД2.4 і МД2.0 відрізняються несуттєво (2785 проти 2850) проте у зразка МД2.4 вона досягається в тому числі завдяки входженню фрагментів перегрупування. Відповідно і

середня молекулярна маса вища у МД2.0 (2570 Да проти 1957 Да у МД2.4). Крім того, фракції з максимальним ступенем поліконденсації у складі продукту МД2.0 міститься біля 83%, а така фракція у продукті МД2.4 складає тільки 49%. І що більш важливо, за проведення поліконденсації за невеликого надлишку флуоресцеїну отримуються більш однорідні олігомерні продукти реакції як за молярною масою так і за функціональністю. Як видно з табл. 3.2 в продукті МД2.4 фрагменти перегрупування присутні практично у кожній макромолекулі, а в МД2.0 загальна частка фракцій, які містять фрагменти перегрупування складає в сумі тільки 3%.

Таким чином поліестерифікація за реакцією Стегліха проведена в умовах співвідношень реагентів близьких до еквімолярних проте за невеликого (0,05%мольн.) надлишку флуоресцеїну, як гідроксилвмісного комономеру, дозволяє отримувати кополіестери з високими виходами з функціональною та структурною однорідністю макромолекул. У протилежному випадку навіть за незначного надлишку карбоксильних груп вихід кополіестеру суттєво зменшується, окрім того спостерігається значна частка продуктів, які утворюються як результат перебігу реакції перегрупування активованої дициклогексилкарбодіімідом карбоксильної групи 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти і входження фрагментів перегрупування в структуру кополіестеру у вигляді кінцевих ланок, які не здатні продовжувати матеріальні ланцюги. Отримані результати підтвердили здатність флуоресцеїну вступати в реакцію незворотньої кополіконденсації за Стегліхом і створили передумови для одержання амфіфільних кополіестерів більш складної будови, в яких флуоресцеїн, при використанні його як частки одного з гідроксилвмісних комономерів, може бути включений у структуру макромолекули.

3.2 Синтез статистичних амфіфільних флуоресцеїнівмісних кополіестерів за реакцією Стегліха

Наносистеми доставки ліків, розвиток яких спостерігається в останній час наділяються тепер багатьма функціями, які необхідні для покращення їх накопичення у заданому органі контрольованому і пролонгованому вивільненні

препаратів, а також забезпечення можливостей виявлення їх розміщення для контролю за їх ефективністю. Створення таких багатофункційних систем передбачає синтез гібридних амфіфільних макромолекул, які б окрім забезпечення перенесення терапевтичних агентів (таких носіїв як ліпосоми, мікроемульсії, міцели), містили би також діагностичні речовини (агенти візуалізації) в одному полімерному матеріалі.

Полімерна основа у такій системі доставки окрім розчинності у воді, нетоксичності і біосумісності, згідно сучасних вимог повинна характеризуватись [119, 120]: i) можливістю пролонгованої циркуляції у крові; ii) здатністю до акумуляції у зоні патологічного процесу; iii) здатністю ефективно переносити молекули ліків речовини у клітину і окремі органи; iv) наявністю візуалізуючого фрагменту у структурі, за допомогою якого можна у реальному часі спостерігати за накопиченням ліків у зонах патологічного процесу; v) передбачуваним періодом елімінації з організму при якому не виникає негативних реакцій організму.

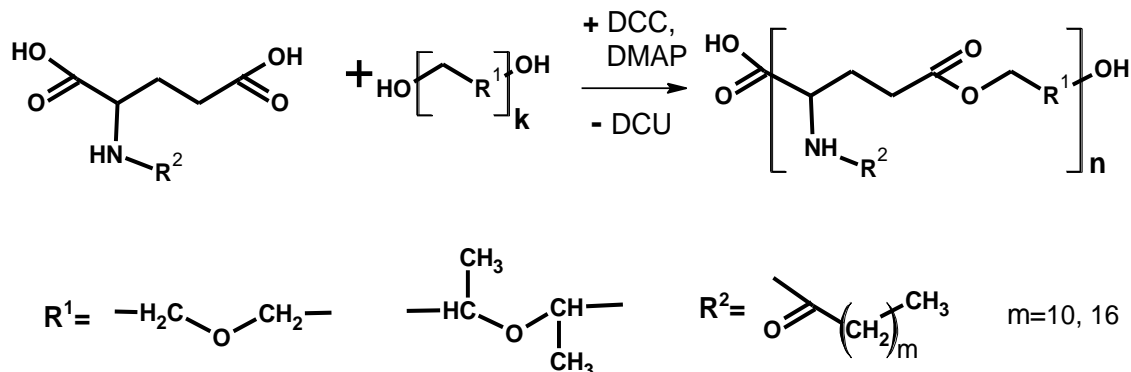


Рис.3.15 Схема утворення кополієстеру за реакцією Стегліха.

В попередніх роботах було повідомлено про синтез кополієстерів методом нерівноважної активованої кополіконденсації кополієстерів N-похідних глутамінової кислоти та діолів поліетиленової і поліпропіленової природи, який здійснювали з використанням реакції Стегліха (рис.3.15) [121,122]. За використанням, як комономеру, гліцерину або полісахаридів за цією схемою синтезували також кополієстери розгалуженої та просторово-структурованої будови [123,124].

До переваг кополієстерів на основі природних амінокислот та їх похідних, які в літературі зустрічаються також під назвою «псевдополіамінокислоти», варто віднести відсутність пептидних зв'язків у їх структурі і, в результаті, на відміну від білкових молекул та синтетичних поліамінокислот, відсутність імунної відповіді організму на їх введення. Окрім загальної біотолерантності, такі кополієстери здатні до біодеградації з утворенням нешкідливих продуктів (амінокислота, поліоксиетиленгліколь), які можуть легко виводитись з організму.

Однак механізм дії нанорозмірних систем доставки ліків до теперішнього часу вивчений недостатньо. Найбільш істотною є проблема, яка супроводжує всі спроби створення реальних систем транспорту біологічно-активних сполук це складність у відслідкуванні поширення їх компонентів та виявлення зон їх накопичення в певних органах чи тканинах організму.

Тому актуальним було завдання розробити методіку синтезу амфіфільних кополієстерів - псевдополіамінокислот, які містили би хромофорні групи, і були здатні, за певних умов, до флуоресценції, і разом з тим зберігали би баланс властивостей притаманних наноносіям.

В попередньому розділі було розглянуто особливості поліконденсації флуоресцеїну за реакцією Стегліха та описано закономірності синтезу кополієстерів з використанням його як мономерної ланки. Разом з тим, практичний інтерес має синтез кополієстерів амфіфільної природи на основі N-похідних глютамінової кислоти та полієтердіолів, в які флуоресцеїн входив би в заданих кількостях як структурна одиниця макромолекули.

Синтез таких статистичних кополієстерів здійснювали в одну стадію через введення певної кількості флуоресцеїну як частини кономерів з гідроксильними функційними групами забезпечуючи задане співвідношення між гідроксильними та карбоксильними групами в реакційній суміші. Перебіг реакції Стегліха в даному випадку можна відобразити схемою на рис.3.16.

В роботі [99], показано що ефективно утворення кополієстеру при кополіконденсації N-заміщеної глютамінової кислоти і полієтердіолів відбувається в вузькому температурному діапазоні від 8°-15°С. При більш високих

температурах, спостерігається перебіг значної кількості реакцій за участю активованої форми карбоксильної групи, які призводять до її пасивування і обриву ланцюга поліконденсації, а при температурах нижчих за 8°C спостерігається суттєве сповільнення процесу (особливо на глибоких стадіях), і зменшення виходів кополієстеру. В межах даної роботи попередніми дослідженнями було показано, що введення в систему нового комономеру - флуоресцеїну, не змінює оптимальної температури синтезу і суттєво не розширює її діапазону. Зважаючи на це температура не розглядалась, як фактор впливу на перебіг процесу, і синтези проводились при температурі 12-15°C.

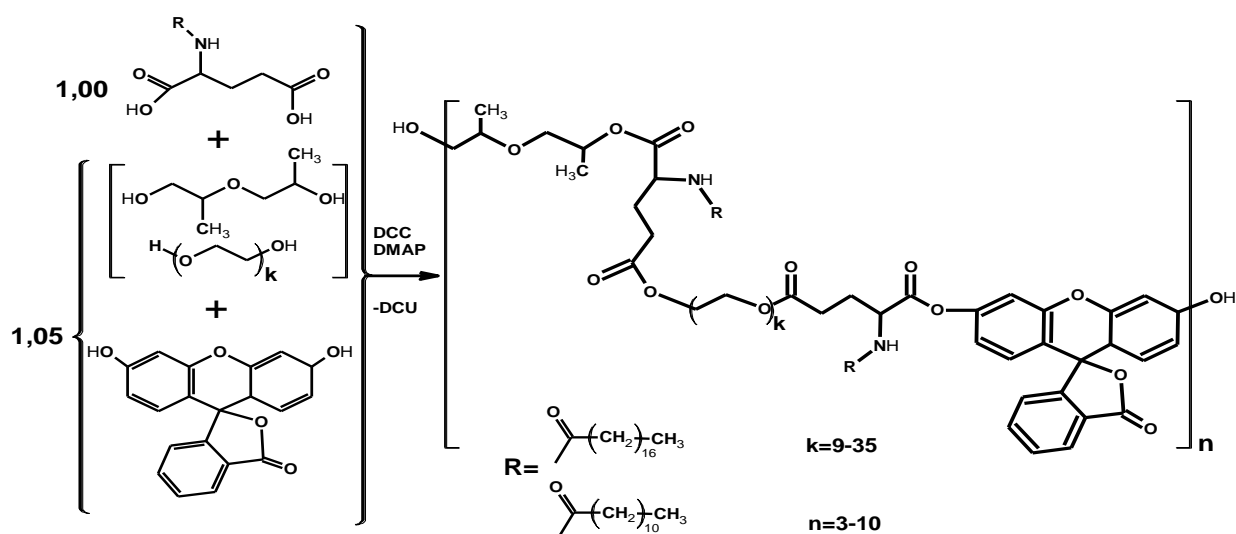


Рис.3.16 Схема отримання флуоресцеїнівмісного кополієстеру при кополіконденсації N-ацилпохідних глутамінової кислоти і полієтердіолів за реакцією Стегліха

Як було показано вище при розгляді закономірностей кополіконденсації GluLa з флуоресцеїном внаслідок обмеженої розчинності флуоресцеїну для створення гомогенного реакційного середовища необхідним було використання співрозчинника диметилформаміду. Флуоресцеїн при кополіконденсації для отримання амфіфільних кополієстерів використовується в менших кількостях тільки як частка у суміші гідроксилвмісних комономерів тому було доцільно провести оптимізацію кількості співрозчинника (ДМФА) в суміші. Раніше було встановлено, що суттєвої різниці у виходах та характеристиках продуктів при використанні метилєну хлористого чи бензену нема, проте більш зручним

виявився бензен, який використовувався на стадії підготовки синтезу для азеотропного видалення залишків води з реакційної суміші.

Умови проведення синтезу флуоресцеїнмісних кополімерів передбачали використання співвідношень реагуючих груп - карбоксильних та гідроксильних- близьких до еквімолярних (1:1,05), проте з невеликим надлишком останніх, а також різної кількості флуоресцеїну, як частки (0,025÷0,5 мольн.) від мономерів з гідроксильними групами при збереженні однаковою (1,05) їх сумарного мольного співвідношення у початковій реакційній суміші.

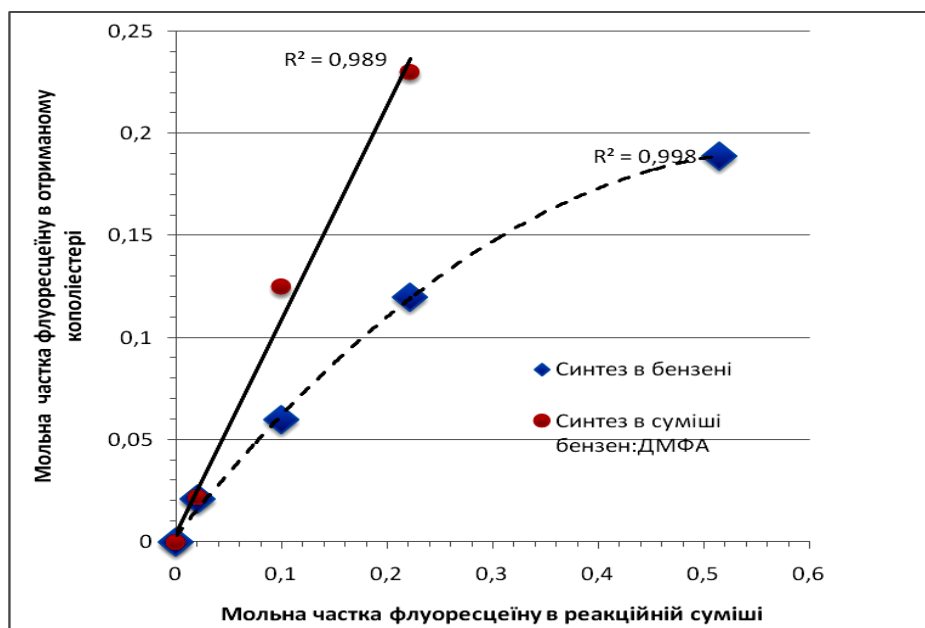


Рис. 3.17. Залежність мольної частки флуоресцеїну в складі кополіестерів від його мольної частки в початковій суміші мономерів при синтезі в різних розчинниках

На рис. 3.17 наведено порівняльний аналіз продуктів, синтезованих на основі 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти, PEG600, DPG і флуоресцеїну при різних частках флуоресцеїну в початковій мономерній суміші в чистому бензені і в бензені у суміші з 10% диметилформаміду. Як видно з представленого графіка, у випадку проведення синтезів у чистому бензені тільки найменші завантаження флуоресцеїну (до 0,025 мольн. частки) у реакційній суміші дозволяють отримувати відповідні кількості його ланок у кополіестері. Із подальшим збільшенням частки флуоресцеїну в початковій суміші мономерів пропорційного збільшення його входження в склад кополіестеру уже не спостерігається (крива 2). У випадку використання ДМФА, як співрозчинника, у

кількості 10% за дотримання тих самих умов синтезу спостерігається доволі добре визначена ($R^2=0.9974$) пряма пропорційна залежність вмісту флуоресцеїну в кополієстері від його мольної частки в початковій мономерній суміші (рис.3.17 крива 1). Причому у цьому випадку можна з задовільними виходами отримувати кополієстери з високим (10÷13%) вмістом флуоресцеїну. Для порівняльних оцінок в тих же умовах синтезувалися і кополієстери без флуоресцеїну.

В результаті було отримано ряд амфіфільних кополієстерів N-ацилпохідних глютамінової кислоти ((2-(октадеканоїламіно)пентандіової (GluSt) або 2-(додеканоїламіно)пентандіової (GluLa)), поліоксиетиленгліколів різної молярної маси, дипропіленгліколю та флуоресцеїну. Умови синтезу ряду зразків кополієстерів та їх основні характеристики наведено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4.

Умови синтезу та характеристики кополієстерів на основі Glu(A)

№	Позначення	Формула	Завантаження, мольна частка			Вихід, DCU, %	Вихід кополієстеру, %	Вміст флуоресцеїну в полімері, %	
			Двоосновна частка	PEG	DPG				F
1	31-МФ	GluLa-PEG400-DPG- F		0,676	0,273	0,10	93,76	78,65	5,53
2	32-МФ	GluLa-PEG400-DPG- F	1.00	0,614	0,2737	0,163	86,6	80,4	9,64
3	27-МФ	GluLa-PEG600-DPG- F		0,678	0,2711	0,10	95,8	92,13	5,2
4	28-МФ	GluLa-PEG600-DPG- F		0,548	0,274	0,232	96,6	86,4	13,07
5	36-МФ	GluLa-PEG1000-DPG- F		0,716	0,2857	0,053	88,1	83,5	1,87
6	33-МФ	GluLa-PEG1000-DPG- F		0,673	0,2685	0,103	93,52	85,1	3,75
7	34-МФ	GluLa-PEG1000-DPG- F		0,613	0,2603	0,165	100,9	90,4	5,56
8	45-МФ	GluLa-PEG1000-DPG		0,751	0,302	0	86,5	81,03	0
9	46-МФ	GluLa-PEG1500-DPG- F		0,68	0,268	0,108	84,5	76,45	3,17
10	39-МФ	GluSt-PEG400-DPG- F		0,6798	0,2734	0,103	98,0	88,4	4,7
11	29-МФ	GluSt-PEG600-DPG- F		0,6761	0,2695	0,101	90,0	73,5	4,03
12	30-МФ	GluSt-PEG600-DPG- F		0,548	0,277	0,226	95,11	86,35	9,69
13	38-МФ	GluSt-PEG1000-DPG- F		0,6788	0,2534	0,10	97,9	86,3	2,87
14	37-МФ	GluSt-PEG1000-DPG- F		0,6102	0,2696	0,165	92,6	72,3	5,87
15	40-МФ	GluSt-PEG1000-DPG		0,749	0,301	0	90,1	77,1	0
16	47-МФ	GluSt-PEG1500-DPG- F		0,68	0,273	0,10	92,55	86,77	2,4

Структуру отриманих макромолекул підтверджували ПМР та ІЧ-спектроскопією, функціональним аналізом та високоефективною ексклюзійною хроматографією.

На рис. 3.18. наведено FTIR-спектри флуоресцеїнвмісного кополієстеру GluSt-DPG-PEG1000-F(5,87%) у порівнянні з його аналогом який не містить флуоресцеїн.

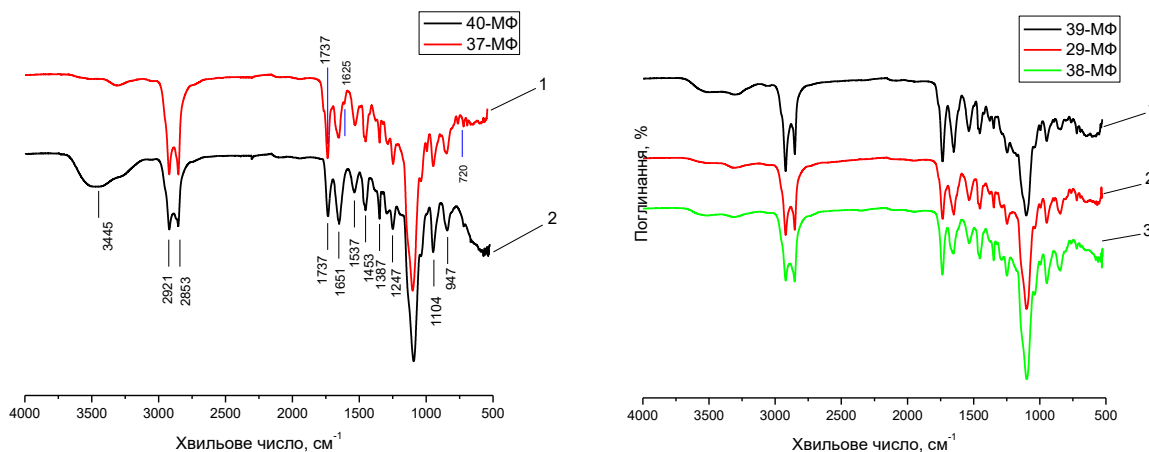


Рис. 3.18. FTIR спектри зразків флуоресцеїнвмісного кополієстеру 1) GluSt-PEG1000-DPG-F(5,87%) (37MF); і його аналогу без флуоресцеїну 2) GluSt-PEG1000-DPG (40MF); FTIR спектри зразків кополієстерів на основі GluSt, які відрізняються величиною молекулярної маси PEG: 1 – 400; 2 – 600; 3 – 1000.

Більшість смуг поглинання якими можна характеризувати флуоресцеїн накладаються на смуги поглинання інших мономерних ланок, які містяться в кополієстері і в окремі сигнали не виділяються. Присутність естерних груп у складі молекул підтверджується наявністю смуг поглинання 1737 (ν , $>C=O$) та 1180 cm^{-1} (ν , $-(O=C)-O-C<$), в свою чергу, відсутність характеристичних смуг з частотами 1680-1735 та 1710-1715 cm^{-1} вказує на те, що полімери не містять карбоксильних груп у вільній формі. Разом з тим, інтенсивність смуги поглинання 1737 cm^{-1} (ν , $>C=O$), збільшується для 37-МФ порівняно з 40-МФ, що підтверджує валентні коливання, які характерні для $>C=O$ зв'язку у лактоні флуоресцеїну. коливанням його ароматичного скелету відповідає невеликий пік в області 1625 cm^{-1} .

В спектрах синтезованих продуктів присутні також смуги поглинання з частотами 2974 (va, -CH₃), 2918 (va, -CH₂-), 2850 (vs, -CH₂-, -CH₃), 1454 (δs, -CH₂-, -CH₃) 1356 (δs, -CH₃) та 1043 см⁻¹ (v, >C-C<), що є підтвердженням наявності аліфатичних фрагментів у складі полімерів, зокрема залишку стеаринової кислоти та фрагментів дипропіленгліколю. Смуга поглинання в області 1454 см⁻¹, одночасно з тим свідчить про присутність >C-O- і >C-C< зв'язків флуоресцеїну. Валентні коливання >C-OH флуоресцеїну в області 1175 см⁻¹, 1183 см⁻¹ накладаються на пік 1104 см⁻¹ (v, >C-O-C<), що призводить до його вираженої асиметрії.

Смуга поглинання 1104 см⁻¹ (v, >C-O-C<), інтенсивність якої зростає з величиною ланцюга PEG, використаного в поліконденсації (рис.6 б.) підтверджує входження поліетерних фрагментів у склад кополімерів.

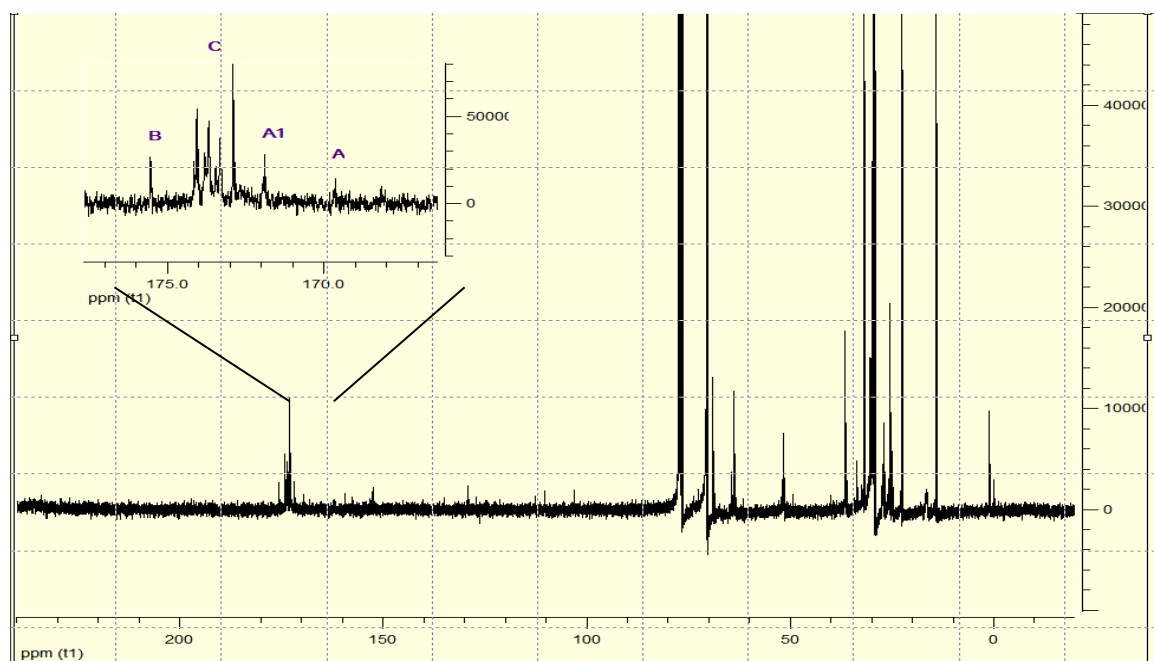


Рис. 3.19 C¹³ ЯМР спектр кополіестеру GluSt-PEG600-DPG-F(4,03%)

У спектрах також присутні інші типові сигнали, що відповідають ланкам PEG (947, 847 см⁻¹), на них накладаються слабовиражені сигнали в області 900÷600 см⁻¹, які відповідають зв'язку C-H в молекулах флуоресцеїну. Окрім того, у спектрах присутні смуги поглинання, характерні для амідної групи, 3300 (vs,a,

карбонільної групи глутамінової кислоти, яка входить в склад кополієстеру утворюючи естерні зв'язки з різними діолами та флуоресцеїном. Серед цих сигналів можна виділити групу сигналів С, яку можна віднести до атомів карбону, які входять до складу естерної групи утвореної α - і ω - карбоксильною групами 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти та поліоксиетиленгліколем і дипропіленгліколем, які через вплив різної віддаленості замісників проявляються на спектрі здвоєними піками. Сигнали А та А1 відносяться до карбону естерної групи макроланцюга, яка утворена за участі гідроксильних груп флуоресцеїну. Сигнал В із зміщенням 175,5 м.ч. можна віднести до карбону карбонільної групи N-замісника глутамінової кислоти (амід додеканоїлової кислоти).

На рис. 3.21 наведено ПМР-спектр зразка 37-МФ (рис.3.20) синтезованого з використанням GluSt, DPG і PEG1000, який містить 5,87 % флуоресцеїну за даними аналізу проведеного згідно методики 2.3.1. В спектрі присутні 6 груп сигналів. Всі сигнали цього спектру мають характерне для зразків полімерних сполук уширення через сегментальне екранування, тому аналіз спектру на рівні щеплення сигналів є неможливим. Інтерпретація проводиться на рівні віднесення та аналізу відношення інтенсивності сигналів.

Таблиця 3.5.

Фрагменти макромолекули, відповідні їм зсуви сигналів протонів та їх інтенсивності у ПМР-спектрах флуоресцеїнвмісних кополієстерів.

Позн.	Зсув	Тип	Віднесення	Фрагмент	Кількість протонів
А	0,88	т	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Stearoyl/Lauroyl	3
В	1,15 ($\alpha 1$)	д	$-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-$	DPG	3,15
	1,22	д	$-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-$		
С	1,26	д	$\text{H}_3\text{C}-\left(\text{CH}_2\right)_{14}-\text{CH}_2-$	Stearoyl/Lauroyl	28/16
Д	1,62	м	$-\left(\text{CH}_2\right)_{14}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{NH}-$	Stearoyl/Lauroyl	2
Е	1,9-2,0	ШМ	$-\text{O}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-$	Glu	2

G	2,21	M	$-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$	Stearoyl/ Lauroyl	2	
H	2,32	M	$-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH})\text{C}(=\text{O})\text{O}-$	Glu	2	
I	3,2	M	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$	DPG	2,1	
	3,5	M	$-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$			
J	3,63	c		PEG	400	31
					600	49
					1000	85,5
					1500	131
L	3,67	M	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$	PEG	2,1	
M	4,23-4,29	ШМ	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$	PEG	2,1	
N	4,63	c	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH})\text{C}(=\text{O})\text{O}-$	Glu	1	
F	7,61-8,0	ШМ		F	3.0	
K	6,3-6,5	Ш	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH})\text{C}(=\text{O})\text{O}-$	Glu	1	
U	1.5-2,2	ШМ		DCU	10.0	

Перша група сигналів *A* (зміщення 0,8-0,95 м.д.) відповідає метильним групам алкільного фрагмента N-замісника глютамінової кислоти, група сигналів *C* і *B* зі зміщенням від 1,0 до 1,45 м.д., це складний мультиплет, який включає 28 протонів метиленових груп цього фрагмента та 6 протонів (*B*) метильних груп від ланки дипропіленгліколю (Iv).

Складний сигнал із зміщенням 1,4 до 2,4 м.д., відноситься до 4 протонів *E*, *H* метиленових груп глютамінової кислоти та 4 протонів *D*, *G* α- та β-метиленових груп її N-ацильного замісника (Ic). Як було показано, при розгляді синтезу кополієстерів флуоресцеїну і 2-(додеканоїламіно)пентандіонової кислоти частина карбоксильних груп, які активовані DCC паралельно до утворення естерного зв'язку можуть перегруповуватися з утворенням пасивного амідів, в

результаті чого в подальшому ця карбоксильна група вилучається з процесу формування поліестерного ланцюга. Ця побічна реакція призводить до включення в поліестерний ланцюг в якості кінцевої групи фрагменту, який може бути відображений схемою рис. 3.11. Таким чином утворена кінцева група включає в себе два циклогексильних залишки кожен з яких містить 11 протонів, з яких 10 відносяться до груп $-CH_2-$. Згідно табличних даних, в ПМР спектрах такі протони проявляються у вигляді широкого мультиплету (U) в діапазоні зміщень від 1.5 до 2,2 м.д. Ці протони, які самостійного сигналу не формують або, через уширеність не ідентифікуються як самостійні, є причиною завищених значень інтенсивності сигналів які проявляються у цій області.

В групі сигналів J знаходяться сигнали протонів метиленових груп поліоксиетиленгліколю (крім сигналів α -метиленових протонів естерної групи) і сигнали протонів метиленових груп ланки дипропіленгліколю L . В групі сигналів N знаходяться протон глутамінової кислоти, біля третинного атома карбону, та сигнали протонів метиленових груп поліоксиетиленгліколю і дипропіленгліколю в α -положенні до карбонільної групи M . Група сигналів F із зміщенням 7.61-8.0 відповідає 3 протонам фрагменту флуоресцеїну (Табл.3.5).

Відносні інтенсивності сигналів у спектрі дозволяють оцінити співвідношення ланок кономерів в кополіестері. Так, якщо позначити інтенсивність сигналів групи B і C як I_B , значення інтенсивності сигналів від протонів груп D, E, G, H як I_C , значення сигналів протонів груп I, J, L, M, N – I_D+I_E , а значення сигналів протонів групи F – I_F , відповідно та врахувати, що метильна група A включає в свій склад 3 протони, то по проведеному віднесенню можна скласти ряд балансових рівнянь:

$$I_C = 2 \cdot n_1 + 2 \cdot n_2 + z \cdot 20 \quad (1.1)$$

$$I_B = n_7 \cdot 2 + 6 \cdot q \quad (1.2)$$

$$I_D + I_E = \left(\frac{M_{PEG}}{44}\right) \cdot 2 \cdot n_3 \cdot l + (2 \cdot 2 \cdot n_4 + 2 \cdot 1 \cdot n_5) \cdot q + 1 \cdot 1 \cdot n_6 \quad (1.3)$$

$$I_F = g \cdot 3 \quad (1.4)$$

де $n_1 = 2$ – кількість протонів метиленових груп глутамінової кислоти, $n_2 = 2$ – протони α - та β - метиленових груп алкільного замісника, $n_3 = 2$ – кількість протонів метиленових груп поліоксиетиленгліколю в групі сигналів L і M , n_4 і n_5 – відповідають одному протону метиленових груп дипропіленгліколю в групі сигналів I , а $n_6 = 1$ – третинний протон залишку глутамінової кислоти, $n_7 = 14$ (для кополієстерів на основі GluSt) і $n_7 = 8$ (для кополієстерів на основі GluLa), l , q , g – частка PEG, DPG і F в структурі кополієстеру відповідно, z – кількість перегрупованих фрагментів.

В такому випадку рішення системи рівнянь (1.1)÷(1.4) приводить до рівнянь, за якими можна визначити частки залишків комономерів в складі кополієстеру:

$$l = 11 \cdot \frac{I_D + I_E - I_B + 2 \cdot n_7 - 1}{M_{PEG}}$$

$$q = 0.167 \cdot I_B - k \quad (1.5)$$

$$z = \frac{I_C - 8}{20}$$

$$g = \frac{I_F}{3}$$

де $k = 4.67$ (для кополієстерів на основі GluSt), $k = 2.67$ (для кополієстерів на основі GluLa)

Проведення кополіконденсації в певних умовах, її ефективність з точки зору отримання кополімерів заданої структури визначається можливістю виявлення чинників, які мають найбільш суттєвий вплив на властивості кополієстеру. До переваги процесів нерівноважної поліконденсації можна віднести те, що в них нема необхідності застосування значних температурних впливів, вакуумування і т.п. як в рівноважній поліконденсації для зміщення рівноваги в сторону утворення полімерного ланцюга. Можливість здійснення нерівноважної поліконденсації в розчині, при невисоких температурах, дозволяє використовувати термічно нестійкі мономерні (похідні амінокислот), зберігати в макромолекулах, що утворюються, реакційно здатні групи (флуоресцеїн), уникаючи термічних

деструктивних перетворень і відкриває широкі перспективи цілеспрямованого синтезу кополімерів визначеної будови.

Таблиця 3.6.

Склад кополієстерів загальної формули $\text{Glu(A)}_{1,0}\text{-(PEG)}_l\text{-(DPG)}_q\text{-(F)}_g$

Шифр зразка	Структурна формула	Мольні частки мономерних ланок в кополієстері			Кількість перегрупованих, мольн. частки
		<i>l</i>	<i>q</i>	<i>g</i>	
31-МФ	GluLa-PEG400-DPG-F	0,564	0,381	0,055	0
32-МФ	GluLa-PEG400-DPG-F	0,512	0,388	0,15	0,0038
27-МФ	GluLa-PEG600-DPG-F	0,527	0,415	0,135	0,0015
28-МФ	GluLa-PEG600-DPG-F	0,465	0,355	0,22	0,015
45-МФ	GluLa-PEG1000-DPG	0,631	0,415	0	0,0075
36-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,62	0,375	0,06	0,02
33-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,6	0,345	0,1	0,026
34-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,524	0,371	0,155	0,055
46-МФ	GluLa-PEG1500-DPG-F	0,573	0,375	0,07	0,0335
43-МФ	GluLa-PEG1000-F	0,782	-	0,18	0,054
44-МФ	GluLa-PEG1000-DEG-F	0,853	-	0,14	0,0245
39-МФ	GLuSt-PEG400-DPG-F	0,654	0,287	0,08	0,009
29-МФ	GluSt-PEG600-DPG-F	0,538	0,366	0,11	0,017
30-МФ	GluSt-PEG600-DPG-F	0,488	0,278	0,225	0,043
40-МФ	GluSt-PEG1000-DPG	0,651	0,362	0	0,018
38-МФ	GluSt-PEG1000-DPG-F	0,620	0,298	0,075	0,049
37-МФ	GluSt-PEG1000-DPG-F	0,516	0,324	0,105	0,0895
47-МФ	GluSt-PEG1500-DPG-F	0,604	0,238	0,125	0,067

Можливості нерівноважної поліконденсації надають велику кількість ступенів свободи як з точки зору залучення в поліконденсаційний процес речовин

різноманітної хімічної будови, так і досягнення різноманітності хімічних структур полімерів, які одержуються цим методом.

Проведення нерівноважної поліконденсації за реакцією Стегліха дозволяє отримувати поліестери та кополіестери з використанням мономерних ланок, які в свою чергу є доволі складними молекулами, якими є ацилпохідні двоосновних амінокислот (GluLa, GluSt), а також таких, як поліетердіоли (PEG), які самі уже характеризуються певним ступенем полімеризації. Наведені в таблиці 3.6 дані свідчать про те, що всі використані комомери входять у склад продукту поліконденсації. В загальному, якщо порівнювати склад мономерної суміші і склад кополіестеру, то виявляється, що найбільший дефект щодо вмісту в кополімерах має найбільш високомолекулярний компонент (PEG). Можна припустити, що в даному випадку найбільш впливовим є стеричний чинник.

Разом з тим, як було показано у попередніх роботах, а також як свідчать результати, отримані при вивченні кополіконденсації 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти і флуоресцеїну, характерним для реакції Стегліха є перегрупування карбоксильної групи активованої DCC у неактивну ацилсечовину. Саме це перетворення є побічним процесом, завдяки якому може відбуватися розбалансування у співвідношенні реакційноздатних груп, що в свою чергу негативно впливає на виходи та молекулярну масу кополіестерів.

Результати обробки ПМР-спектрів дають можливість виявити кількість фрагментів, які є наслідком перегрупування карбоксильних груп N-заміщеної глутамінової кислоти і містяться в макромолекулах кополіестеру. Це дозволяє прослідкувати взаємозв'язок умов проведення реакції поліконденсації з отриманими в результаті характеристиками кополіестерів.

В дослідженнях, пов'язаних з синтезом кополіестерів за реакцією Стегліха, здійснених раніше, не було встановлено суттєвого впливу молекулярної маси діолів (PEG) на ступінь поліконденсації одержаних поліестеретерів [97].

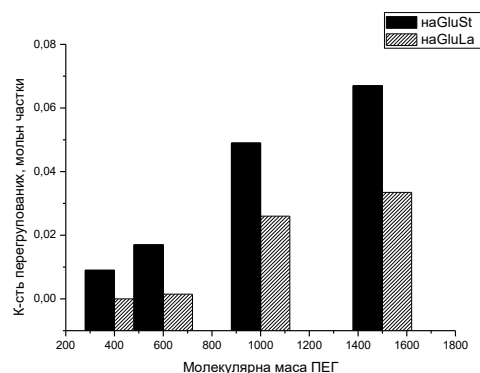


Рис. 3.22 Залежність кількості фрагментів перегрупування карбоксильних груп у кополіестерах на основі GluSt і GluLa від молекулярної маси PEG.

Проте аналіз результатів отриманих при дослідженнях кополіестерів з флуоресцеїном дає можливість стверджувати про існування впливу молекулярної маси PEG на кількість карбоксильних груп, які зазнають перегрупування рис. 3.22. Як видно з рисунка, збільшення величини ММ PEG призводить до збільшення кількості фрагментів перегрупування, що очевидно пов'язано з посиленням стеричних перешкод у випадку проведення реакції з PEG вищої молекулярної маси.

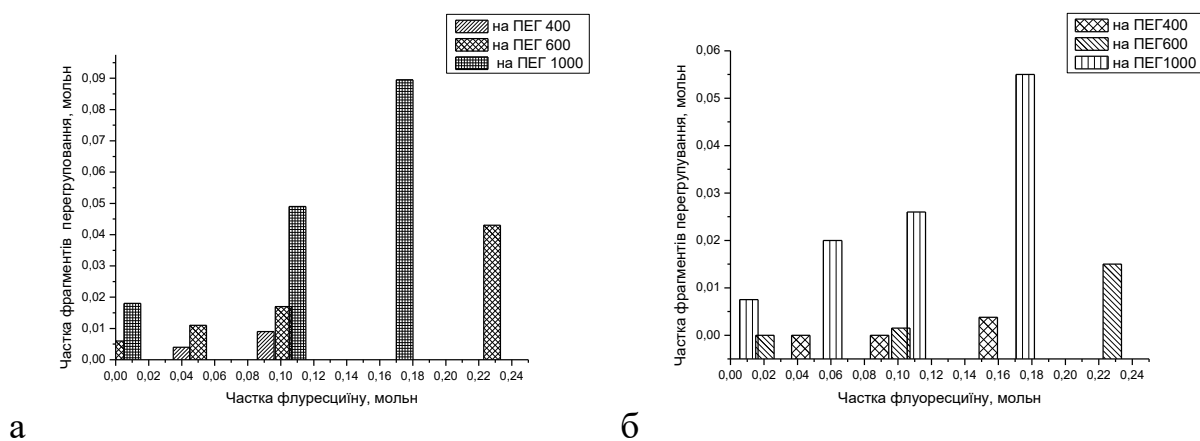


Рис. 3.23 Кількості фрагментів перегрупування карбоксильних груп у кополіестерах на основі GluSt (а) і GLuLa (б) і поліетердіолів різної молекулярної маси в залежності від частки флуоресцеїну в початковій реакційній суміші мономерів.

Такий самий висновок можна зробити при порівнянні вмісту фрагментів перегрупування в продуктах реакції, отриманих при кополіконденсації кислоти з

різною величиною замісника. З наведених даних видно, що за однакових умов синтезу при рівних значеннях ММ PEG кополіестери на основі GluSt містять фрагментів перегрупування в середньому в 1,5 рази більше, ніж кополіестери на GluLa (рис. 3.23).

Вивчення методом ПМР функціональної однорідності отриманих кополіестерів дає можливість стверджувати, що зростання частки флуоресцеїну в початковій реакційній суміші призводить до певного збільшення кількості фрагментів перегрупованих карбоксильних груп у продуктах реакції, як для кополіестерів на основі GluSt (рис. 3.23 а), так і для кополіестерів на основі GluLa (рис. 3.23 б). Ця тенденція посилюється із збільшенням молекулярної маси PEG. Можна припустити, що збільшення в суміші мономерів частки сполуки, яка має менш виражені властивості спиртів ускладнює швидке перетворення активованої DCC карбоксильної групи мономеру кислотної природи і приводить до часткової втрати функціональності через її перегрупування.

3.2.1. Визначення флуоресцеїну, який є кінцевою ланкою кополіестеру

Найбільш цікавим з точки зору функційності отриманих кополіестерів є встановлення локалізації флуоресцеїну у цих макромолекулах. Як уже було зазначено в розділі 3 при розгляді ПМР спектрів флуоресцеїнівмісних кополіестерів сигнал з хімічним зсувом 6.55 у ^1H ЯМР дає можливість оцінити кількість флуоресцеїну у макромолекулі, який є її кінцевим фрагментом (рис 3.7 структура II).

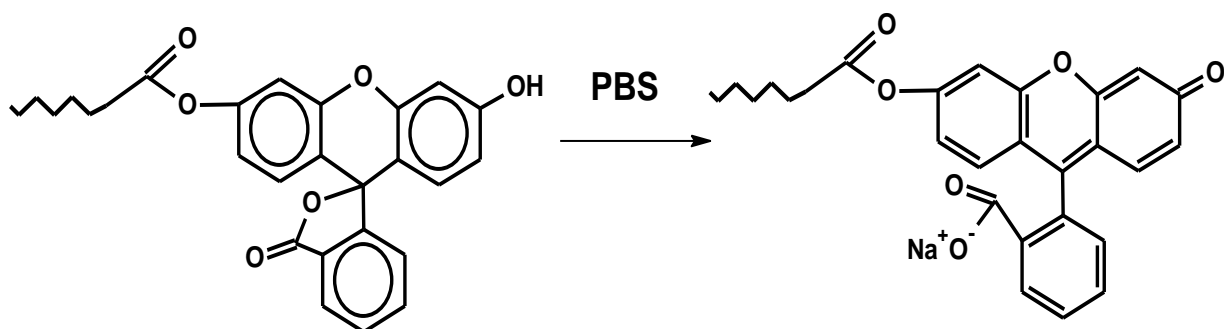


Рис. 3.24 Структура кінцевої ланки флуоресцеїну у присутності фосфатно-сольового буферного розчину

Разом з тим флуоресцеїн, який є кінцевим фрагментом макромолекули у фосфатно-сольовому буферному розчині (рН=7,45) набуває таутомерної форми з відновленою системою спряжених кратних зв'язків, яка здатна до поглинання світла у його видимому діапазоні з максимумом при $\lambda=490$ нм (рис.3.24). Це дозволяє кількісно визначати його при використанні відповідної калібрувальної кривої методом спектрофотометрії.

Дані, які наведені в таблиці 3.7, отримані за двома різними методами (ПМР спектроскопія, спектроскопія у видимій області), добре корелюють між собою. З отриманих даних можна зробити висновок, що флуоресцеїн виступає як мінімум одним з кінцевих фрагментів макроланцюгів кополієстерів. Те, що весь флуоресцеїн, який був завантажений вступає в реакцію конденсації і входить в структуру кополієстеру, як показано в табл. 3.4 і табл. 3.6, але більш часто виступає кінцевою ланкою, може означати, що він є менш реакційноздатним, порівняно з іншими гідроксилвмісними мономерами, і входячи в структуру кополієстеру утруднює приєднання наступної мономерної одиниці.

Таблиця 3.7.

Визначення флуоресцеїну, який є кінцевим фрагментом в макромолекулах кополієстерів

Шифр зразка кополієстеру	Структурна формула	Вміст флуоресцеїну в кополієстері, %	К-сть флуоресцеїну, який є кінцевим фрагментом в кополієстері по відношенню до загальної к-сті флуоресцеїну	
			За ПМР, %	Одержано спектрофотометрично, %
31-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG400] _{0.282} -[DPG] _{0.195} -[F] _{0.025}	5,53	74,0	50,6
27-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG600] _{0.264} -[DPG] _{0.205} -[F] _{0.065}	5,2	32,0	34,2
36-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.31} -[DPG] _{0.187} -[F] _{0.03}	1,87	42,0	40,6
33-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.3} -[DPG] _{0.172} -[F] _{0.05}	3,87	40,5	30,0
34-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.262} -[DPG] _{0.185} -[F] _{0.077}	5,56	32,0	31,9
46-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG1500] _{0.286} -[DPG] _{0.187} -[F] _{0.035}	3,18	53,0	28,6
29-МФ	[GluSt] _{0.5} -[PEG600] _{0.269} -[DPG] _{0.183} -[F] _{0.055}	4,026	73,2	75,6
37-МФ	[GluSt] _{0.5} -[PEG1000] _{0.258} -[DPG] _{0.162} -[F] _{0.05}	5,87	59,5	62,1
47-МФ	[GluSt] _{0.5} -[PEG1500] _{0.302} -[DPG] _{0.119} -[F] _{0.062}	2,4	59,1	46,0

3.2.2. Дослідження молекулярно-масового розподілу отриманих кополієстерів

Властивості полімерів значною мірою визначаються їх молекулярно-масовим розподілом. При цьому середня молекулярна маса полімеру, зазвичай характеризує його недостатньо повно. Можливість охарактеризувати молекулярні розподіли полімерів визначається тим, наскільки вдається досягти розділення фракцій за ступенем полімеризації n і визначити їх кількість для кожної молекулярної маси (або кожного значення n), та відповідно розрахувати всі молекулярно-масові характеристики.

Розділення (сепарація) полімерів за допомогою ексклюзивної хроматографії (Size-exclusion Chromatography - SEC) є складною проблемою, яка пов'язана з характеристиками, як хроматографічної колонки, так і можливостей приладу. Донедавна обмеженість системи SEC не дозволяла досягати поділу між окремими полімергомологами у суміші. Проте в останні кілька років розроблено колонки, які заповнені насадкою з частинок ВЕН (bridged ethylene hybrid) розміром 1,7 мкм. За використання колонки з такою насадкою вдається досягати більш ефективного розділення фракцій полімерів та проводити аналіз пофракційно.

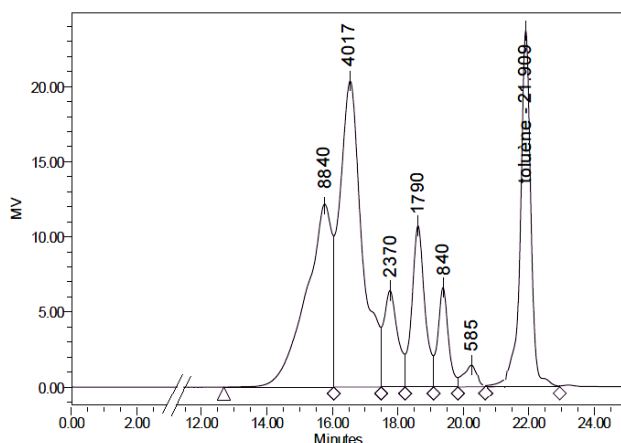


Рис.3.25. Гель-проникна хроматографія зразка кополієстеру GluSt-PEG1000-DPG-F(2,87%).

Завдяки використанню ефективної ексклюзивної хроматографії, а також доволі високих молекулярних мас мономерів було отримано молекулярно-масові розподіли для кополієстерів, які дають можливість кількісно визначити його фракційний склад (рис.3.25). Результати ексклюзивної хроматографії, після

проведення їх обробки в програмному забезпеченні Origin, дозволяють оперувати такими даними, як вміст фракцій кополієстерів у відсотках від загальної кількості полімеру. Така обробка даних SEC дає можливість аналізувати відмінності у молекулярно-масових розподілів для кополієстерів, які одержані за різних умов.

На рис. 3.26 наведено фракційний склад кополієстеру GluSt-DPG-PEG1000, який було отримано без флуоресцеїну. Видно, що він характеризується відносно високомолекулярною фракцією (ММ=8880 Да) частка якої складала 89,7%. Введення у реакційну суміш флуоресцеїну (0,1 мольн частки) приводить до появи у складі виділеного продукту олігомерних фракцій із значно нижчими молекулярними масами. Їх формування, очевидно, відбувається за рахунок частки високомолекулярної фракції, яка із появою флуоресцеїну зменшується до 49 %.

При збільшенні частки флуоресцеїну до 0,22 моль в початковій суміші мономерів відчутно зменшується середня молекулярна маса, для кополієстеру 30-МФ GluSt-PEG600-DPG-F(9,69%), який містить 9,69 % флуоресцеїну вона складає 4135 Да, а для схожого за структурою 29-МФ GluSt-PEG600-DPG-F(4,03%), але синтез якого проводився при частці флуоресцеїну 0,1 моль середня молекулярна маса становить 5055 Да (табл.3.8).

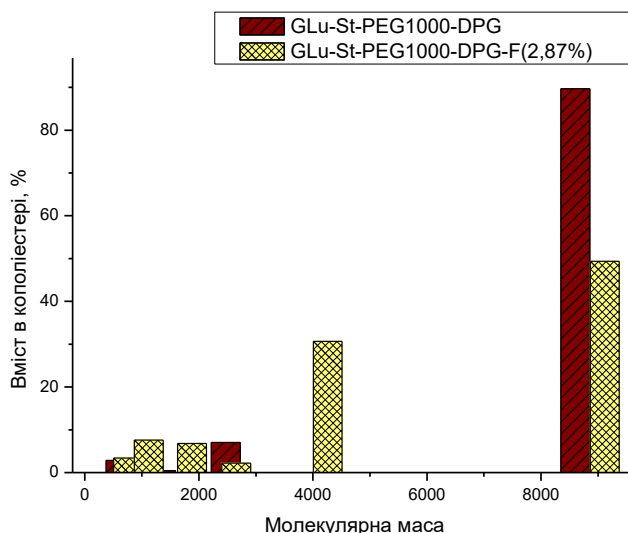


Рис. 3.26. Молекулярно-масовий розподіл кополієстерів з флуоресцеїном 38-МФ [GluSt-PEG1000-DPG-F(2,87%)] і без 40-МФ [GluSt-PEG1000-DPG].

Порівняльні ММР кополієстерів GluSt синтезованих з використанням PEG600 та DPG за різного початкового вмісту флуоресцеїну

29-МФ GluSt-PEG600-DPG-F(4,03%)		30-МФ GluSt-PEG600-DPG-F(9,69%)	
ММ	Вміст фракції, %	ММ	Вміст фракції, %
590	1,7	598	3,8
795	8,3	840	10,5
1610	15,7	1235	0,3
3785	29,4	1795	28,7
6660	4,8	4150	29,8
8600	40,1	7135	9,4
		8540	17,5

При такому ж аналізі кополієстерів на основі GluLa видно, що характер молекулярно-масового розподілу в межах точності його визначення є однаковим для кополієстерів отриманих в присутності різної кількості флуоресцеїну. Тобто збільшення частки флуоресцеїну до 0,165 мольн частки у початковій суміші комономерів практично не впливає ні на зміну молекулярної маси фракцій, ні на їх вміст у виділеному продукті (табл.3.9). Проте така залежність спостерігається тільки у ряді кополієстерів GluLa, отриманих при кополіконденсації з PEG1000.

Таблиця 3.9.

Порівняльні ММР кополієстерів GluLa синтезованих з використанням PEG1000 за різного вмісту флуоресцеїну

45-МФ GluLa- PEG1000-DPG		36-МФ GluLa-PEG1000- DPG-F(1,87%)		33-МФ GluLa-PEG1000- DPG-F(3,87%)		34-МФ GluLa-PEG1000- DPG-F(5,56%)	
ММ	Вміст фракції, %	ММ	Вміст фракції, %	ММ	Вміст фракції, %	ММ	Вміст фракції, %
522	0,4	514	1,3	500	1,9	497	2,1
775	0,2	810	0,9	770	0,3	747	0,4
2265	8,5	2150	11,8	1350	4,9	1000	3,0
4270	1,1	4505	0,4	2430	3,5	2325	9,2
7620	89,8	6380	85,6	4425	0,5	4580	0,6
				6370	88,9	5950	84,7

У випадку використання PEG600 видно, що в результаті збільшення частки флуоресцеїну у початковій реакційній у суміші спостерігається зменшення частки

фракції з максимальною визначеною молекулярною масою (9300) з 30 % при завантаженні 0,1 мольн частки до 20 % при завантаженні 0,22 мольн частки у виділеній суміші олігомерів (табл.3.10).

Таблиця 3.10.

Порівняльні ММР кополіестерів GluLa синтезованих з використанням PEG600 за різного вмісту флуоресцеїну

27-МФ GluLa-PEG600-DPG-F(5,2%)		28-МФ GluLa-PEG600-DPG-F(13,07%)	
ММ	Вміст фракції, %	ММ	Вміст фракції, %
532	0,7	527	1,6
755	5,4	770	4,0
1100	3,1	1135	4,6
1800	10,7	1670	4,8
3590	40,5	2140	4,5
6425	9,3	3800	34,3
9245	30,3	6850	25,8
		9300	20,4

У молекулярно масових розподілах кополіестерів також добре ідентифікується фракція з молекулярною масою 500-520 Да, яка при встановленні закономірностей поліконденсації флуоресцеїну і 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти (зразки серії МД) була інтерпретована, як 2-(додеканоїламіно)пентандіова кислота з приєднаним фрагментом перегрупування (ацилсечовина). Помітно, що збільшення фракції з молекулярною масою 500-520 Да, є симбатним із збільшенням частки флуоресцеїну у початковій мономерній суміші, що може свідчити про його меншу реакційну здатність у реакції Стегліха. Утворення під час синтезу продуктів, нездатних до зародження або продовження ланцюга кополіконденсації закономірно, зменшує молекулярну масу отриманих кополіестерів.

Можна зробити висновок, що у всіх випадках збільшення молекулярної маси використаних для синтезу мономерів, як гідроксилвмісних (PEG) так і карбоксилвмісних (N-ацилпохідних глютамінової кислоти), спостерігається збільшення частки фрагментів перегрупування.

Тим не менш, варто зазначити, що загальна частка фракцій у складі отриманих продуктів, що містить фрагменти перегрупування, в загальному не є високою і не впливає на властивості отриманих кополієстерів.

У розділі 3.1 описано причини і критерії вибору додаткового розчинника для одержання кополієстерів [GluLa-F]_n. Однак при синтезах кополієстерів амфіфільної будови вміст флуоресцеїну в реакційній суміші значно менший, ніж при синтезах зразків серії МД. У зв'язку з цим доцільно було оцінити можливість уникнення використання співрозчинника при одержанні статистичних кополієстерів, оскільки його введення в реакційну суміш було необхідним тільки для забезпечення розчинення флуоресцеїну. Для цього було проведено порівняльні синтези з однаковим співвідношенням реагентів в реакційній суміші, які відрізнялись присутністю додаткового розчинника ДМФА (табл.3.11, рис. 3.27).

Таблиця 3.11.

Характеристики флуоресцеїнвмісних кополієстерів отриманих в різних розчинниках, частка флуоресцеїну в реакційній суміші 0,1 моль.

Шифр зразка	Структура кополієстеру	Розчинник	Вміст F, %	Практичн. Вихід, %	Теоретичн. вихід (DCU), %
12-МФ	GluSt-PEG600 DPG-F	Бензен	2,91	73,5	99,8
29-МФ	GluSt-PEG600- DPG-F	Бензен- ДМФА	4,03	82,1	90,1
24-МФ	GluLa-PEG600- DPG-F	Бензен	4,67	72,52	101,1
27-МФ	GluLa-PEG600- DPG-F	Бензен- ДМФА	5,2	92,13	95,8

Отримані результати вказують на те, що з введенням в систему ДМФА збільшується вихід кополієстерів, але зменшується вихід DCU. Зменшення виходу DCU пов'язане із частковою розчинністю її у реакційній суміші. А збільшення виходу кополієстеру свідчить про те, що з введенням ДМФА і покращенням розчинності флуоресцеїну забезпечується більш строге дотримання співвідношення реакційноздатних груп мономерів у реакційній суміші.

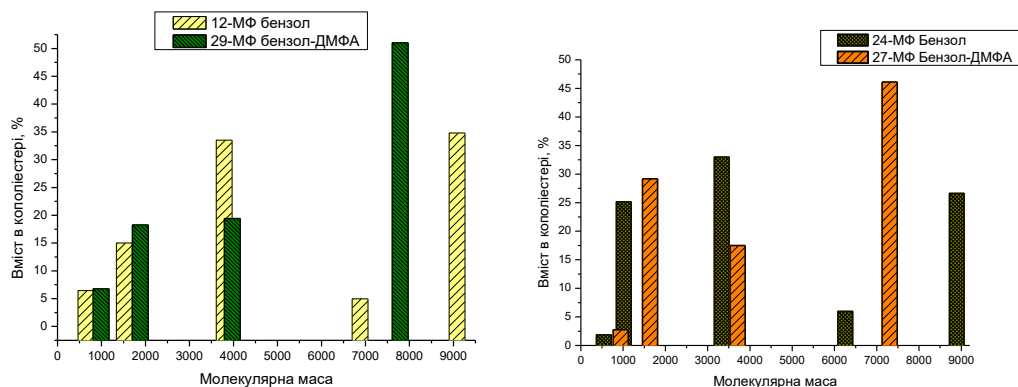


Рис. 3.27. Залежність молекулярної маси фракцій кополієстру у бензені та у його суміші з ДМФА для кополієстерів: а) GluSt-PEG600-DPG-F(0.1); б) GluLa-PEG600-DPG-F(0.1)

Попри те введення додаткового розчинника впливає не тільки на вихід полімеру, але і на співвідношення окремих фракцій у його складі. Ефект відносного збільшення частки фракції з максимальною молекулярною масою при цьому помітний як на кополієстерах на основі GluLa, так і GluSt (рис.3.27).

РОЗДІЛ 4. Колоїдно-хімічні властивості флуоресцеїнвмісних кополієстерів

4.1. Поверхнево-активні властивості амфифільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів

Створення систем доставки ліків на основі нанорозмірних частинок продовжує бути актуальним завданням на сучасному етапі розвитку хімії [125,126]. Полімери, які використовуються для одержання сучасних наноконтейнерів, окрім біосумісності та нетоксичності повинні мати певні властивості, основними з яких є: 1) поверхнева активність і здатність до самоорганізації у нанорозмірні частинки; 2) здатність до формування стабільних дисперсних систем і їх функціонування, як наноконтейнерів; 3) забезпечувати адресне націлювання у патологічну зону (мішень); 4) наявність у макромолекулах фрагментів, які забезпечують можливість їх відслідковування в організмі.

Аналіз досліджень в області створення систем доставки ліків показав, що основна увага зосереджується на синтезі кополімерів амфифільної природи, які дають можливість створювати агрегатно стійкі нано- та мікророзмірні колоїдні системи з заданими властивостями [127]. Введення в їх макроланцюги ліпофільних і гідрофільних фрагментів у певному співвідношенні надає їм здатність формувати у водному середовищі ієрархії самоорганізованих міцелярних структур. При цьому зміною природи елементарних ланок вихідних мономерів можна створювати задану хімічну будову макромолекул, керувати розподілом функційних груп та формувати міцелярні структури різноманітної морфології [128]. Результати досліджень закономірностей незворотньої кополіконденсації з використанням реакції естерифікації Стегліха показали, що в цьому методі є широкі можливості для конструювання макромолекул кополієстерів визначеної будови та заданої функціональності [46].

Найбільш простою і доступною є схема синтезу, яка передбачає використання комономерів відповідної природи у статистичній кополіконденсації. Через такий шлях було отримано цілий ряд кополієстерів, макромолекули яких відрізняються кількістю різних мономерних ланок за

використання у синтезі суміші діолів різної природи. На рис. 4.1 наведено схематичні зображення структур отриманих амфіфільних кополіестерів різних типів, що містять фрагменти з хромофорними групами у макроланцюгу та їх аналоги без хромофорів.

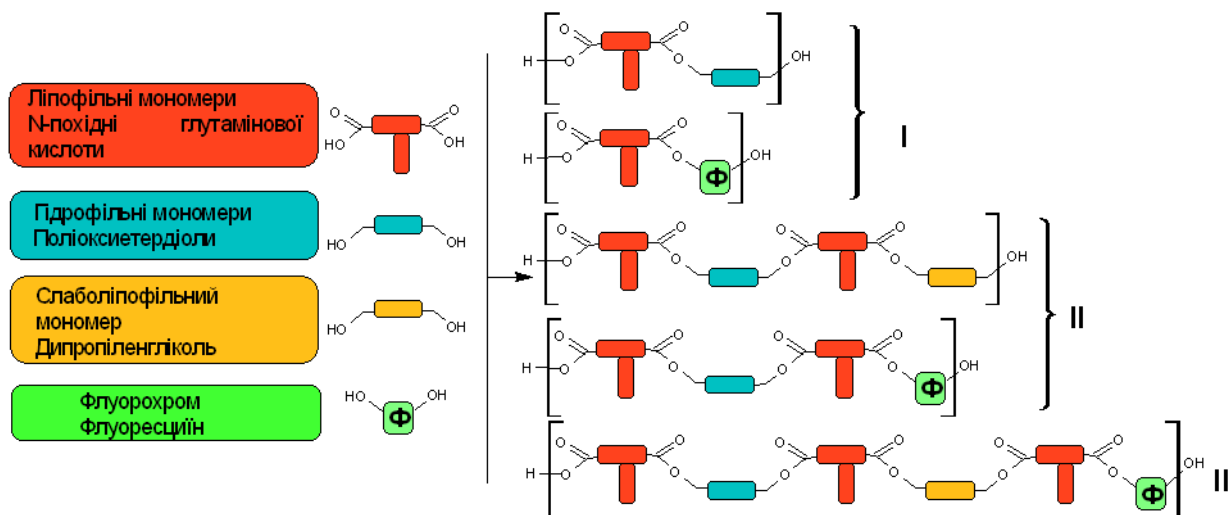


Рис.4.1 Схематичне зображення структур амфіфільних кополіестерів

Попередніми дослідженнями було показано, що прості кополіестери, які отримувались на основі N-ацилпохідних глутамінової кислоти ((2-(додеканоїламіно)пентандіоївої кислоти та 2-(октадеканоїламіно)пентандіоївої кислоти)) та одного поліетердіолу, хоча і завдяки чергуванню гідрофільних та ліпофільних ланок є за визначенням амфіфільними речовинами і понижають поверхневий натяг у водних розчинах, проте отримати стабільні дисперсні системи за їх використання не вдається. За цим критерієм більш перспективними виявилися потрійні кополіестери, в яких як гідроксилвмісні мономери використовувалися суміш олігодіолів оксиетиленової та оксипропіленової природи. Такі кополіестери понижають поверхневий натяг у їх водних розчинах до $35 \div 37 \text{ мН/м}$, та здатні до утворення стабільних полімерних дисперсій. Колоїдно-хімічні, хімічні та біологічні властивості таких кополімерів роблять їх доволі цікавими об'єктами для створення носіїв у системах доставки ліків, полімерних ад'ювантів при створенні вакцин, стабілізаторів косметичних емульсій та компонентів фармацевтичних композицій і т.п.

Вирішення проблеми візуалізації, яка є однією з ключових проблем у дослідженні ефективності кополієстерів, як основи наносистем транспорту ліків, полягало у введенні в структуру макромолекул фрагментів сполук з хромофорними групами. Проведення кополієстерифікації за реакцією Стегліха дозволило отримати кополієстери, в яких хромофорний фрагмент (флуоресцеїн) входить, як ковалентно зв'язана структурна одиниця макроланцюга. Особливості синтезу та характеристики отриманих кополієстерів розглянуті в розділі 3.

Варто відзначити, що кополієстери, при синтезі яких, як гідроксилвмісний мономер використовувався виключно флуоресцеїн (кополієстери МД), є ліпофільними нерозчинними у воді сполуками (рис.4.1 структура I).

Більш складні потрібні кополієстери N-похідних глутамінової кислоти, флуоресцеїну та поліоксиетиленгліколів, як і їх аналоги, отримані без флуоресцеїну, хоча і понижають поверхневий натяг їх розчинів у воді, проте стабільність дисперсій утворених ними доволі незначна (рис.4.1, структури II).

Найбільш цікавими з практичної точки зору є кополієстери отримані з використанням суміші олігодіолів (поліоксиетиленової природи і дипропіленгліколю), в якій як комономер вводився флуоресцеїн у заданих співвідношеннях до гідроксилвмісних комономерів (структури III, рис. 4.1). В розділі 2.2.2 описано метод синтезу, за яким забезпечується отримання кополієстерів з заданим вмістом флуоресцеїну від 1 до 13%.

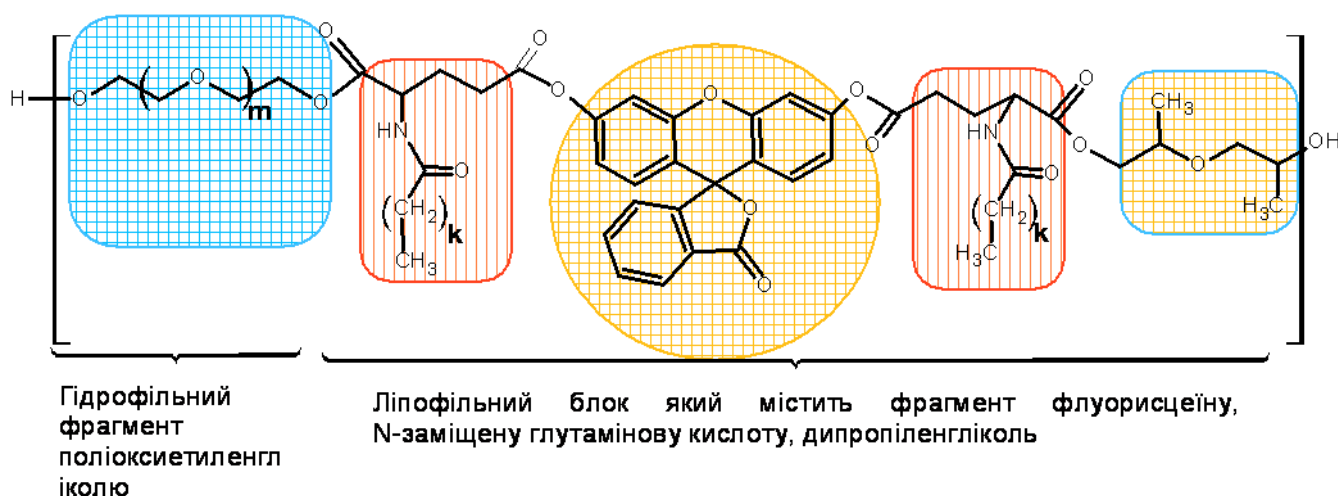


Рис. 4.2. Узагальнена схема структури елементарної ланки кополієстеру

Як було описано в розділі 3, синтезовано ряд амфифільних кополіестерних продуктів, в яких статистично розподілені ланки гідрофільних поліетердіолів оксиетиленового ряду, дипропіленгліколь та флуоресцеїн. Структура таких амфифільних флуоресцеїнівмісних кополіестерів може бути відображена схемою на рис. 4.2.

Невід'ємною властивістю амфифільних сполук, яка їх характеризує, є здатність понижати поверхневий натяг на межі розділу фаз у їх водних розчинах та утворювати стабільні дисперсії полімерних наночастинок.

У таблиці 4.1 наведено колоїдно-хімічні характеристики водних дисперсій синтезованих флуоресцеїнівмісних кополіестерів, які мають різний вміст флуоресцеїну.

Таблиця 4.1

Колоїдно-хімічні характеристики водних дисперсій синтезованих кополіестерів.

Шифр і структура кополіестеру	Вміст флуоресцеїну в кополіестері, %	ККМ, %	ККА, %	Максимальне пониження поверхневого натягу, мН/м	Поверхнева активність при ККМ, g/l
27-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG600] _{0.264} -[DPG] _{0.205} [F] _{0.065}	5,2	0,0069	0,0403	36,05	3362,32
36-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.31} -[DPG] _{0.187} -[F] _{0.03}	1.87	0,0094	0,2391	35,7	3106,38
33-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.3} -[DPG] _{0.172} -[F] _{0.05}	3.75	0,009	0,093	36,3	2817,20
34-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.262} -[DPG] _{0.185} -[F] _{0.077}	5.56	0,0105	-	36,6	3020
45-МФ [GluL] _{0.5} -[PEG1000] _{0.315} -[DPG] _{0.207}	0	0,0095	0,45	37,4	3000
46-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG1500] _{0.286} -[DPG] _{0.187} -[F] _{0.035}	3,18	0,0095	0,1	41,1	2652,6
44-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG1000][DEG] _{0.426} -[F] _{0.07}	6,815	0,0107	0,082	41,5	2168,22

43-МФ [GluLa] _{0,5} -[PEG1000] _{0,391} -[F] _{0,09}	5.32	0,0095	0,0776	42	2600
39-МФ [GluSt] _{0,5} -[PEG400] _{0,327} -[DPG] _{0,144} -[F] _{0,04}	4,7	0,0131	0,0448	45,7	1541,98
29-МФ [GluSt] _{0,5} -[PEG600] _{0,269} -[DPG] _{0,183} -[F] _{0,055}	4,03	0,0096	0,0415	44,7	1843,75
38-МФ [GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,31} -[DPG] _{0,15} -[F] _{0,037}	2,87	0,0128	0,236	41,6	1421,88
37-МФ [GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,258} -[DPG] _{0,162} -[F] _{0,05}	5,87	0,0052	0,031	46,5	2538,46
40-МФ [GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,325} -[DPG] _{0,18}	0	0,0109	0,084	49,7	1623,85
47-МФ [GluSt] _{0,5} -[PEG1500] _{0,302} -[DPG] _{0,119} -[F] _{0,062}	2,4	0,007	0,065	48,2	2742,8

Аналіз ізотерм поверхневого натягу у воді для кополіестерів на основі 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти дозволяє стверджувати, що у випадку використання флуоресцеїну, як одного з мономерів при його вмісті в кополіестерах до 10% поверхнево-активні властивості змінюються по різному в залежності від величини гідрофільного комономеру PEG (рис.4.3, 4.4). Про це свідчать значення плато максимального пониження поверхневого натягу.

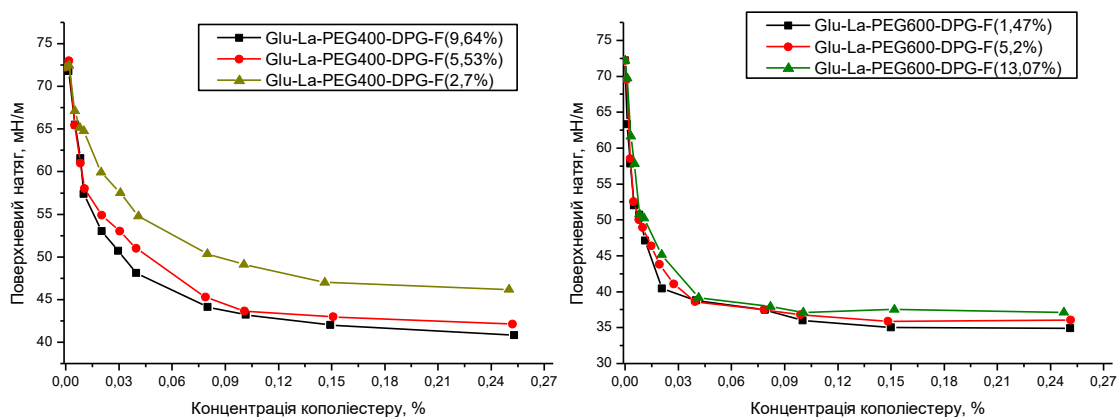


Рис. 4.3. Ізотерми поверхневого натягу кополіестерів GluLa і поліоксиетиленгліколів PEG400 (а) та PEG600 (б) з різним вмістом флуоресцеїну.

Варто зазначити, що у випадку використання, як гідрофільного комономера PEG400 отримані продукти хоча і проявляють поверхневу активність, проте ізотерми їх поверхневого натягу не мають чітко вираженого зламу і плато максимального пониження поверхневого натягу має доволі високі значення $\sigma=43-47$ мН/м. Збільшення вмісту флуоресцеїну в складі таких кополієстерів приводить до незначного пониження значень плато хоча загальний вигляд ізотерм при цьому не міняється (рис.4.3а). Незначна величина гідрофільних поліоксидетиленових фрагментів у складі цих кополієстерів не здатна забезпечити стабільність дисперсій отриманих за їх використання.

Дещо інші залежності були виявлені при дослідженні флуоресцеїнівмісних кополієстерів, отриманих з використанням поліоксидетиленгліколів з вищою молекулярною масою. З наведених даних видно, що плато максимального пониження поверхневого натягу для кополієстерів як з PEG600, так і з PEG1000 однакове і складає 35-37 мН/м, і збільшення вмісту флуоресцеїну в складі кополієстерів його змін практично не викликає (рис.4.3 б, рис.4.4).

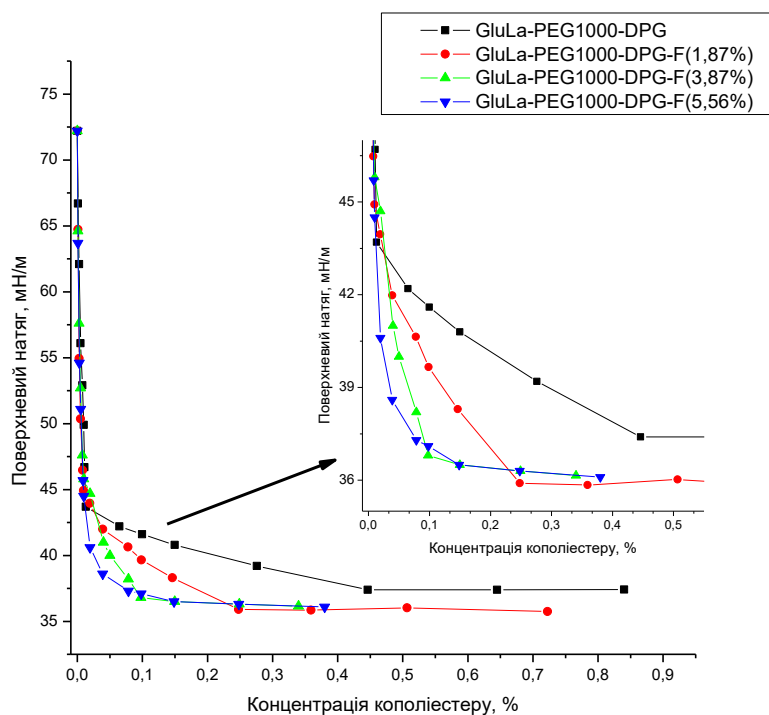


Рис. 4.4. Ізотерми поверхневого натягу у воді для кополієстерів на основі GluLa, DPG і PEG1000 з різним вмістом флуоресцеїну.

Разом з тим, в залежності від вмісту флуоресцеїну, спостерігаються зміни характеру ізоTERM поверхневого натягу кополієстерів в залежності від вмісту флуоресцеїну. Найбільш явно ці зміни можна прослідкувати у ряді кополієстерів, у синтезі яких, як гідрофільний комономер використано PEG1000. Для ряду кополієстерів цього типу, але синтезованих без флуоресцеїну, було встановлено характерний вид ізоТЕРМИ поверхневого натягу на якій спостерігається два злами (рис. 4.5) [129].

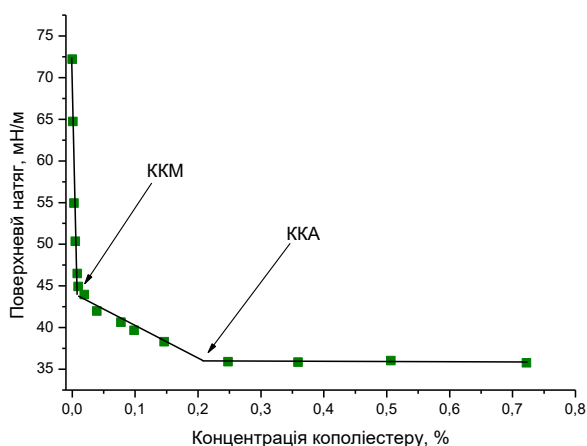


Рис. 4.5. ІзоТЕРМА поверхневого натягу характерна для кополієстерів N-заміщеної глутамінової кислоти, DPG і PEG1000.

Інтерпретація цих зламів була проведена опираючись на дослідження розмірів частинок методами DLS і SANS [97]. Перший злам відповідає істинному значенню концентрації, при якій у розчині з'являються міцели (ККМ). Другий злам був інтерпретований, як концентрація при якій спостерігається закінчення організованої перебудови міцелярної фази, яка полягала у агрегуванні первинних частинок у частинки більшого розміру (ККА). Саме концентрація, при якій відбуваються перетворення первинних частинок дисперсної фази, зазнає змін із збільшенням вмісту флуоресцеїну у кополієстерах.

Якщо значення ККМ для всіх флуоресцеїнвмісних кополієстерів на основі GluLa, синтезованих з використанням PEG1000 практично однакові, лежать у межах близьких до 0,01%, і цей параметр від вмісту флуоресцеїну в кополієстері практично не залежить, то для значень ККА спостерігається інша картина. Якщо

для кополіестеру 45МФ (GluLa-PEG1000-DPG), отриманого за тією ж методикою синтезу, але без флуоресцеїну, процеси, які можна віднести до перебудови міцелярної фази спостерігаються до концентрації 0,45%, то, як видно з наведеного графіка (рис. 4.4), введення флуоресцеїну, не приводячи до суттєвих змін у значеннях плато максимального пониження поверхневого натягу, суттєво міняє значення ККА. Зміну ККА у ряді кополіестерів на основі 2-(додеканоїламіно)пентандієвої кислоти та PEG1000 з різним вмістом флуоресцеїну продемонстровано на рис. 4.6. Збільшення вмісту флуоресцеїну у кополіестері однозначно приводить до зменшення концентрації, після перевищення якої уже не відбувається процесів перебудови частинок дисперсної фази.

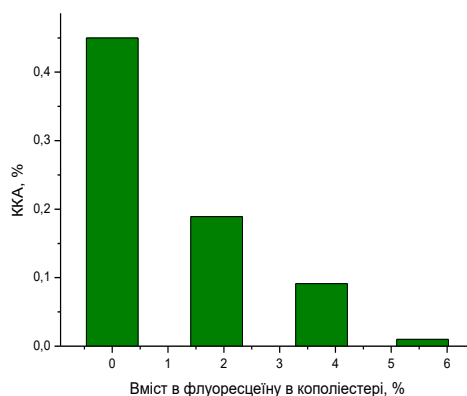


Рис. 4.6. Зміна значень ККА в кополіестерах на основі GluLa і PEG1000 в залежності від вмісту флуоресцеїну в кополіестері.

Для кополіестеру синтезованого з вмістом флуоресцеїну 5,56% можна вважати, що ККА взагалі не спостерігається (рис. 4.4). Ефект, який спостерігається в цьому випадку, може бути пояснено функціональною і молекулярно-масовою неоднорідністю, що очевидно і приводить до менш чітких і однозначних змін на збільшення концентрації кополіестеру у розчині. У даному випадку на ізотермі їх поверхневого натягу чітко вираженого зламу не спостерігається і вона має вигляд більш характерний для полімерних продуктів.

Крім того варто також брати до уваги, що флуоресцеїн, який в цілому має не надто суттєвий вплив на загальний ГЛБ макромолекул, проте формує

високогідрофобні участки –Glu(A)-Ф-Glu(A)- в їх складі, а при входженні кінцею ланкою схильний до електростатичних взаємодій і може прискорювати процеси самоагрегації первинних міцел в колоїдному розчині, які утворилися при збільшенні концентрації амфифільного кополіестеру (концентраціях кополіестеру вищих за ККМ).

Дослідженнями поверхневого натягу методом Дю-Нуї було також показано, що використання дипропіленгліколю (DPG), як додаткового слаболіпофільного комомера, вклад якого в загальний ГЛБ макромолекули малопомітний, має доволі великий вплив на поверхневу активність флуоресцеїнвмісних кополіестерів. На рис. 4.7 наведено ізотерми поверхневого натягу водних розчинів кополіестерів з близьким вмістом флуоресцеїну в структурі макромолекули, які проте відрізняються наявністю або відсутністю DPG або його заміною на більш гідрофільний діетиленгліколь (DEG).

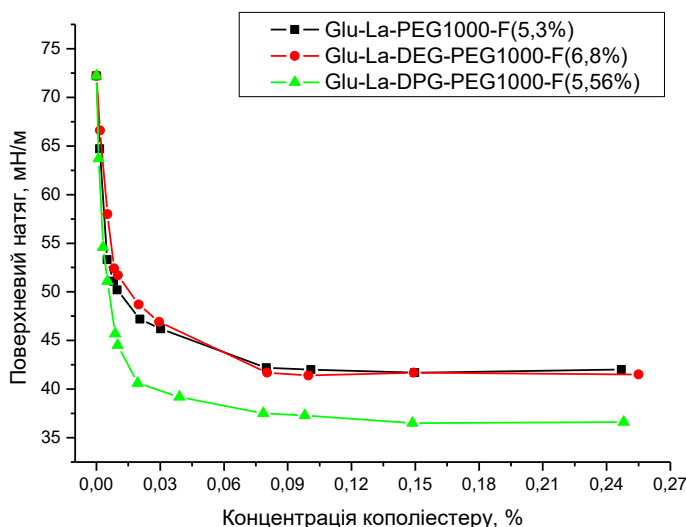


Рис. 4.7. Ізотерми поверхневого натягу кополіестерів GluLa і PEG1000 з близькими значеннями вмісту флуоресцеїну (5-7%).

Як видно з наведеного графіка, в цілому ізотерми поверхневого натягу для цих кополіестерів є однаковими, тобто не спостерігається відмінностей у значеннях ККМ та ККА для різних кополіестерів. Разом з тим кополіестер синтезований з використанням, як комомера DPG проявляє вищу поверхневу активність і понижає поверхневий натяг до 36 мН/м, у той час як кополіестери, які

синтезовані або за відсутності третього гідроксивмісного комономеру (43МФ) або із його заміною на еквімолярну кількість DEG (44МФ) понижають поверхневий натяг на плато тільки до 42 мН/м (табл.4.1). Підвищення поверхневої активності кополієстерів, що містять флуоресцеїн у макроланцюгу добре узгоджується з такими ж залежностями, отриманими раніше для статистичних кополієстерів аналогічного типу, але без флуоресцеїну – введення слаболіпофільного мономера дипропіленгліколю сприяло пониженню значень поверхневого натягу на плато ізотерми та підвищенню стабільності дисперсної системи на їх основі [130].

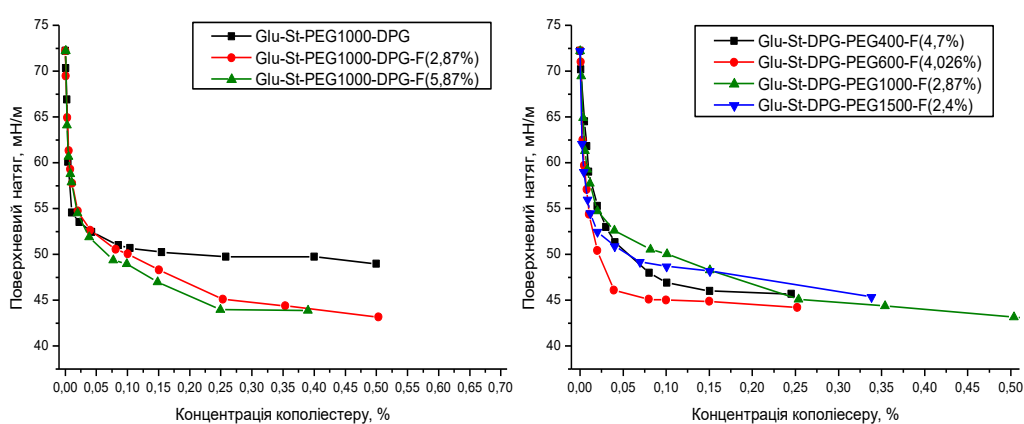


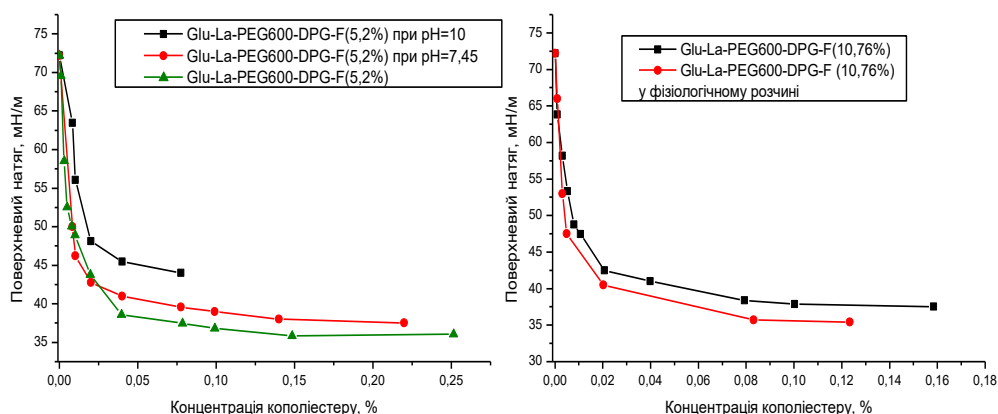
Рис. 4.8. Ізотерми поверхневого натягу кополієстерів GluSt, PEG1000 з різним вмістом флуоресцеїну (а), GluSt і поліетилендіолів різної молекулярної маси (б)

Збільшення величини молекулярної маси ацильного замісника атома нітрогену у глутаміновій кислоті закономірно приводить до збільшення ліпофільності полімерів, що проявляється у погіршенні їх колоїдної розчинності у воді. Значення ККМ кополієстерів синтезованих з використанням GluSt, як і для GluLa, в межах похибки визначення, є близько 0,01%. Проте значення плато максимального пониження поверхневого натягу для цих продуктів є вищим від їх аналогів на GluLa і складає 42-45 мН/м (рис.4.8).

Практичне використання дисперсій отриманих кополієстерів пов'язане з перспективою введення їх в живі організми. Препарати, які вводяться парентерально, зазвичай розбавляються фізрозчином, а дослідження на живих клітинах, таких наприклад як спермії, проводяться у буферному розчині. Тому

поверхнево-активні властивості кополієстерів були досліджені також і в цих середовищах (рис.4.9).

Як видно з наведених графіків, хоча синтезовані кополієстери і відносяться до неіоногенних ПАВ, є певний вплив природи середовища на їх поверхнево-активні властивості.



а

б

Рис. 4.9. Ізотерми поверхневого натягу кополієстеру GluLa-PEG600-DPG-F(5.2%) у воді, фосфатно-сольовому буферному розчині (рН=7,4) і у розчині з рН=10,2 (а) та GluLa-PEG600-DPG-F(10,76%) у воді та у фізіологічному розчині (б)

У фізіологічному розчині при збереженні загального вигляду ізотерми поверхневого натягу спостерігається незначне на 1-2 мН/м пониження значень плато (рис.4.9 б). У буферному розчині при рН=7,4 спостерігається зворотня тенденція – відбувається незначне збільшення значень плато (рис.4.9 а). Найбільш суттєві зміни спостерігаються при використанні розчину з рН=10. В цьому випадку спостерігається суттєве погіршення поверхнево-активних властивостей – збільшення значень плато до 44-46 мН/м та збільшення значення ККМ. Можна припустити, що у розчині при рН=10 відбувається часткове відкриття лактонного циклу у фрагменті флуоресцеїну. Поява значної кількості іонізованих груп (карбоксильних), закономірно має значний вплив на загальний гідрофільно-ліпофільний баланс макромолекули і відповідно на її поверхневу активність.

4.2. Впливу складу кополієстерів на поверхнево-активні властивості та стабільність їх дисперсій.

Завдяки доволі високій молекулярній масі мономерних ланок та використанню ефективної ексклюзійної хроматографії, було отримано молекулярно-масові розподіли для кополієстерів, які дають можливість кількісно визначити їхній фракційний склад. Як видно з даних SEC в їх молекулярно-масовому розподілі присутні фракції з невисокою молекулярною масою - 1100-2400 Да. В середньому їх частка в кополієстері є невисокою і складає до 20 %, однак ступінь відтворення їх складу та властивостей у відповідності до основної фракції кополієстеру викликає інтерес. Для вивчення властивостей низькомолекулярних фракцій проводили фракціонування кополієстерів методом діалізу, використовуючи мембрану з пропускною здатністю 2,5 кДа.

В таблиці 4.2 наведено зміну вмісту фракцій кополієстеру до і після діалізу. З отриманих даних видно, що після діалізу відбулося закономірне зменшення фракції з ММ=2150 Да на 10,5%. В результаті було отримано кополієстер в якому фракція з ММ=6380 складає практично 97% (Табл. 4.2). Як видно з таблиці результатів через мембрану не відбулося відділення від ліпофільних низькомолекулярних фракцій з ММ 514 і 810, які є результатом перегрупування активованих DCC карбоксильних груп GluLa (розділ 3) і очевидно залишаються солубілізованими в частинках дисперсії кополієстеру.

Таблиця 4.2

Порівняльні ММР кополієстеру GluLa-PEG1000-DPG-F(1,87%) до і після діалізу.

36-МФ GluLa-PEG1000-DPG-F(1,87%)		
ММ фракції	До діалізу	Після діалізу
	Вміст фракції, %	Вміст фракції, %
514	1,3	1,3
810	0,9	0,3
2150	11,8	1,2
4505	0,4	0,4
6380	85,6	96,8

Важливо зазначити той факт, що поверхнево-активні властивості низькомолекулярної фракції ММ=2150 Да і кополіестеру, в якому основну частку складає фракція з ММ=6380 Да, є ідентичними про, що можна судити по відтворенню їх ізотерм поверхневого натягу (рис. 4.10).

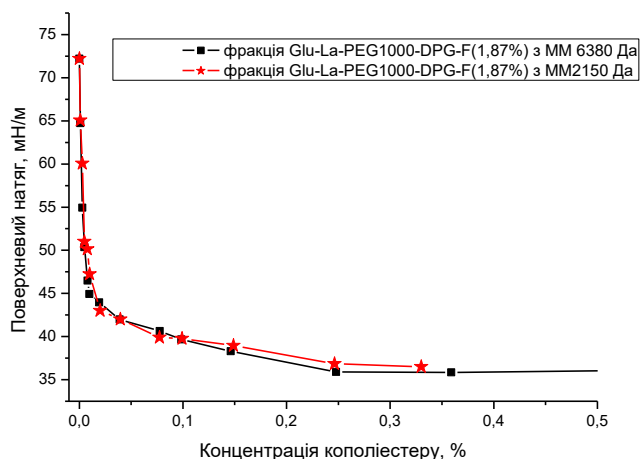


Рис. 4.10. Ізотерми поверхневого натягу фракцій кополіестеру GluLa-PEG1000-DPG-F(1,87%) з ММ 6380 Да і 2150 Да.

Це з одного боку свідчить про те, що поверхнево-активні властивості кополіестеру мало залежать від його молекулярної маси, а з іншого, що склад різних фракцій у кополіестері немає відмінностей. Для підтвердження таке ж дослідження було проведено для кополіестеру на основі GluSt і PEG600 (табл. 4.3.). В даному випадку встановлено гравіметрично, що при фракціонуванні методом діалізу через мембрану пройшло 21% від завантаженого в діалізну ємність кополіестеру. Методом SEC підтверджено, що в результаті вміст фракції з ММ=1795 Да зменшився в чотири рази. При цьому вміст флуоресцеїну в кополіестері після діалізу зменшилась з 9,69 % до 7,88 %. Нескладні розрахунки, а також зведення балансу дали змогу оцінити, що фракція, яка зменшилась при діалізі містить 17,4% флуоресцеїну. Це дає змогу припустити її структуру. Молекулярній масі 1795 Да з вказаним вмістом флуоресцеїну з припустимою точністю відповідає фракція кополіестеру структура якої відображається наступною послідовністю мономерних ланок F-GluSt-DPG-GluSt-PEG600. Можна зауважити, що дана фракція містить всі мономери, які були використані в

початковій реакційній суміші для синтезу. Це дає підстави стверджувати, що окремі фракції у складі кополієстерів є доволі однорідними за складом і властивостями, що дозволяє використовувати кополієстери без додаткових стадій очистки.

Таблиця 4.3

Порівняльні ММР кополієстеру GluSt-PEG600-DPG-F(9,69%) до діалізу і після.

30-МФ GluSt-PEG600-DPG-F(9,69%)		
ММ фракції	До діалізу	Після діалізу
	Вміст фракції, %	Вміст фракції, %
598	3,8	4,1
840	10,5	10,1
1235	0,3	0,3
1795	28,7	7,7
4150	29,8	39,0
7135	9,4	12,4
8540	17,5	26,4

Таким чином кополієстери, які отримані з використанням N-ацилпохідних глютамінової кислоти та PEG, в структурі макромолекул яких є фрагменти флуоресцеїну, зберігають властивості амфіфільних сполук, проявляють поверхнево-активні властивості та здатність до стабілізації дисперсної фази в водних середовищах. Найвищу поверхневу активність і здатність до самостабілізації проявляють флуоресцеїнвмісні кополієстери, макромолекули яких містять окрім ланок PEG одночасно також фрагменти DPG. Флуоресцеїн в структурі таких макромолекул, не впливаючи на загальну здатність понижати поверхневий натяг у водних розчинах, прискорює процеси перебудови в системі первинних міцел, що проявляється в зменшенні значень ККА зі збільшенням його вмісту у кополієстері.

Одним з способів оцінки стабільності частинок колоїдної дисперсій є використання даних ζ -потенціалу. За стабільністю дисперсії наночастинок класифікуються згідно із значеннями ζ -потенціалу: $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV і $\pm 20-30$ mV і понад ± 30 mV, вони є дуже нестійкі, відносно стабільні, помірно

стабільні і високостабільні, відповідно [131]. Ця класифікація не є абсолютною і не може враховувати всі можливі особливості, пов'язані із стабільністю Але, беручи до уваги значення ζ -потенціалу, можна проводити порівняння колоїдної стабільності кополієстерів у ряді один відносно одного.

Таблиця 4.4

Значення ζ -потенціалу дисперсій амфифільних кополієстерів

Кополієстер	Φ , %	ККМ	Концентрація, %	ζ - потенціал, mV
34-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.262} - [DPG] _{0.185} -[F] _{0.077}	5,56	0,0105	0,007	-25,7
			0,050	-14,6
			0,112	-9,3
45-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.315} - [DPG] _{0.207}	0	0,0095	0,005	-23,1
			0,054	-20,0
			0,327	-16,8
46-МФ [GluLa] _{0.5} -[PEG1500] _{0.286} - [DPG] _{0.187} -[F] _{0.035}	3,18	0,0095	0,008	-22,2
			0,050	-17,2
			0,104	-15,3
37-МФ [GluSt] _{0.5} -[PEG1000] _{0.258} - [DPG] _{0.162} -[F] _{0.05}	5,87	0,0052	0,004	-25,0
			0,007	-25,2
			0,083	-27,0
40-МФ [GluSt] _{0.5} -[PEG1000] _{0.325} - [DPG] _{0.18}	0	0,0109	0,007	-17,2
			0,004	-19,6
			0,111	-30,0
47-МФ [GluSt] _{0.5} -[PEG1500] _{0.302} - [DPG] _{0.119} -[F] _{0.062}	2,4	0,007	0,063	-23,0
			0,131	-21,0
			0,259	-23,7

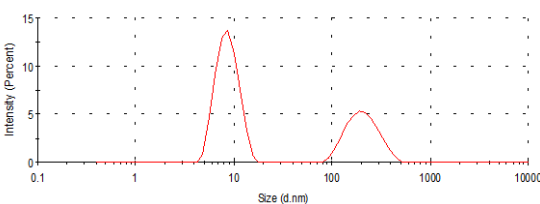
Як видно з таблиці 4.4, у кополієстері 34-МФ на основі GluLa і з вмістом флуоресцеїну 5,56% зі збільшенням концентрації кополієстеру ζ -потенціал зменшується з -25 до -9 mV, що свідчить про зменшення стабільності такої колоїдної системи. Порівнюючи його з кополієстером 40-МФ, який є його аналогом, але не містить флуоресцеїну, помітно, що флуоресцеїн незначно, але впливає на стабільність дисперсії. Попри те, як видно з таблиці, збільшення молекулярної маси PEG при цьому нівелює вплив флуоресцеїну, оскільки

значення ζ -потенціалу кополієстерів 45-МФ GluLa-PEG1000-DPG і 46-МФ GluLa-PEG1500-DPG-F(3,17%) є практично однаковими.

У дисперсіях кополієстерів GluSt концентрація не впливає на ζ -потенціал, а у 40-МФ GluST-PEG1000-DPG, де флуоресцеїн відсутній, збільшення концентрації кополієстеру, навпаки збільшує ζ -потенціал. Варто відмітити, що такого ж ефекту впливу збільшення ММ PEG у даному випадку не спостерігається, і ζ -потенціал для таких флуоресцеїнвмісних кополієстерів знаходиться в межах $-22 \div -25$ mV, що є вищим ніж для кополієстерів на основі GluLa. Можна зробити висновок, що дисперсії кополієстерів на основі GluSt є стабільнішими і їх віднести до помірно стабільних, а кополієстери GluLa за цією класифікацією можна віднести до відносно стабільних.

4.3. Дослідження розміру частинок дисперсної фази.

Дослідження залежності розмірів частинок дисперсної фази від складу кополієстеру та його концентрації у воді проводили методом динамічного світлорозсіювання (DLS). Як було описано в попередньому розділі, найвищу поверхневу активність і здатність до самостабілізації проявляють флуоресцеїнвмісні кополієстери, макромолекули яких містять одночасно фрагменти двох діолів PEG1000 та DPG. Тому дослідження розмірів частинок дисперсної фази було зосереджено саме для таких кополієстерів.

№	Гістограми розподілу за розміром частинок дисперсної фази кополієстеру ККМ=0,0128%, ККА=0,236%	d_1 , nm (частка фракції)	d_2 , nm (частка фракції)	Конц. кополієстеру, %	pdi
1		9 (74,5%)	214 (25,5%)	0,0054	0,299

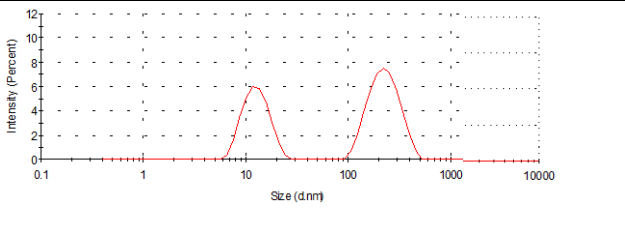
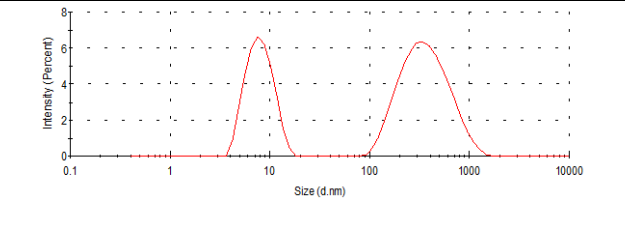
2		13 (38,2%)	232 (61,8%)	0,013	0,253
3		8 (37,3%)	400 (62,7%)	0,075	0,495

Рис.4.11. Гістограми розподілу частинок дисперсної фази у воді флуоресцеїнвмісного кополіестеру GluSt-DPG -PEG1000-F(3,87%) при різних його концентраціях у воді.

На рис.4.11 наведено гістограми розподілу розмірів частинок дисперсної фази самостабілізованої водної дисперсії кополіестеру GluSt-DPG-PEG1000-F(3,87%), який характеризується значенням ККМ, яке становить 0,0128%.

Перша гістограма отримана при концентрації кополіестеру, меншій за ККМ демонструє факт того, що у розчині спостерігається наявність частинок, які мають гідродинамічний діаметр 9 нм (74,5%). Друга гістограма отримана при концентрації полімеру, що незначно переважає ККМ, а третя гістограма отримана при концентрації, що наближається до ККА. Видно, що для всіх трьох гістограм розподіл має бімодальний характер. Причому з наближенням до ККА зростає частка частинок більшої фракції, збільшується їх гідродинамічний діаметр та коефіцієнт полідисперсності, що може свідчити про процеси надмолекулярної перебудови і зміни морфології частинок.

На рис 4.12 для порівняння наведені гістограми розподілу частинок дисперсної фази кополіестеру 40-МФ без флуоресцеїну і кополіестеру з максимальним вмістом флуоресцеїну 37-МФ. З наведених даних видно, що введення флуоресцеїну не змінює загального бімодального вигляду гістограм розподілу. Помітно, що в межах точності визначення значення гідродинамічного діаметру частинок першої моди в обидвох випадках лежать в межах 7-12 нм. Вплив флуоресцеїну можна прослідкувати у зміні максимумів значень діаметрів частинок другої моди, які збільшуються на 70-85 нм для кополіестерів, які містять

у складі макромолекул флуоресцеїн. Крім того спостерігається уширення піків, які відповідають другій моді, що означає збільшення полідисперсності.

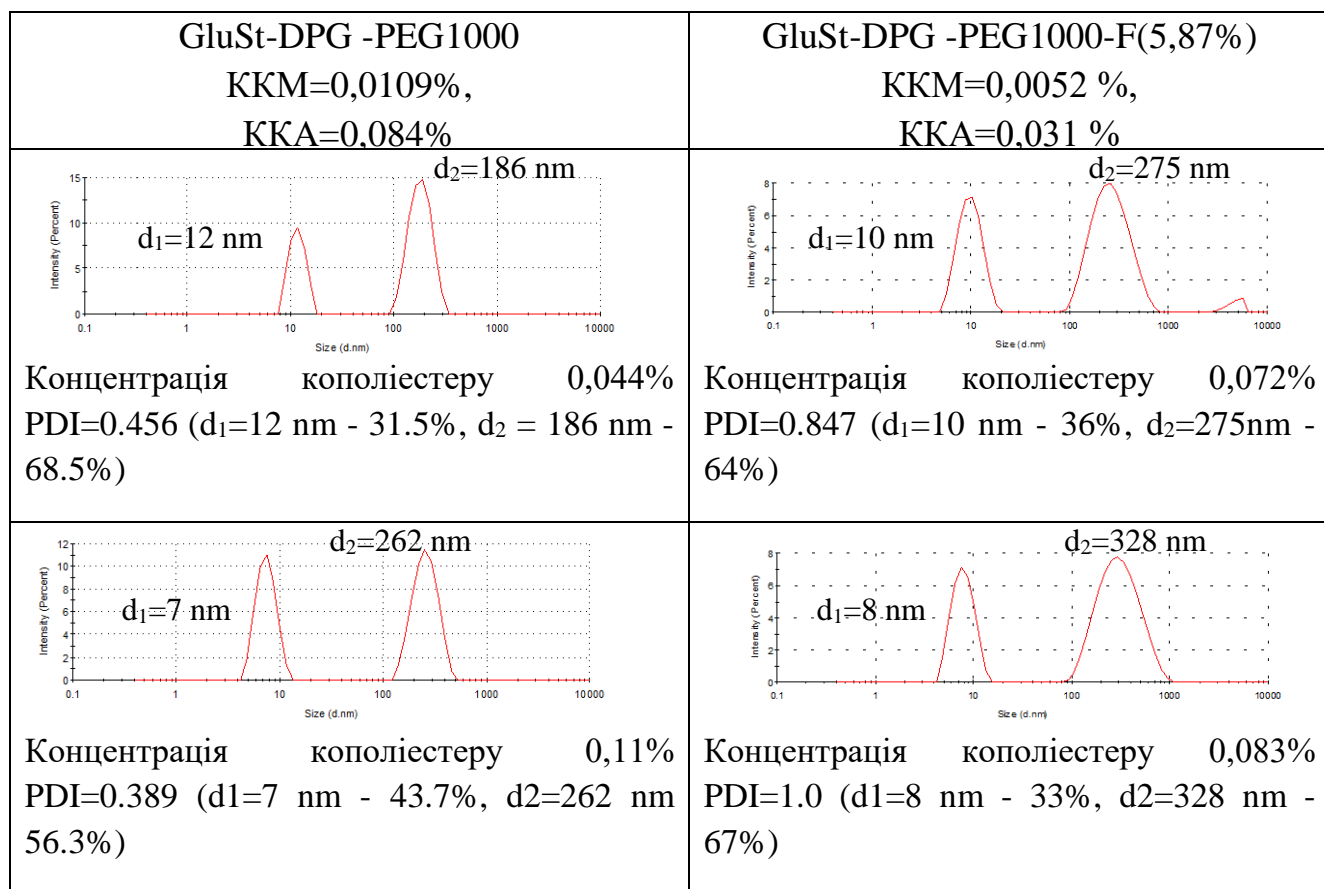


Рис.4.12. Порівняння гістограм розподілу частинок дисперсної фази кополієстерів з флуоресцеїном та без нього GluSt-DPG -PEG1000 і GluSt-DPG -PEG1000-F(5.87%).

Подібна картина змін в розмірах дисперсної фази спостерігається і для дисперсій кополієстерів, які отримані на основі GluLa. Так на рис.4.13 наведені гістограми розподілу розмірів дисперсної фази кополієстеру 34-МФ GluLa-PEG1000-DPG-F(5,56%), які також отримані при різних концентраціях полімеру. Вказаний кополієстер містить доволі велику кількість ланок флуоресцеїну (5,56%) і як було показано раніше у дослідженнях поверхнево-активних властивостей ККА для нього взагалі не спостерігається, а значення ККМ становить 0,0105 %. Хоча у даного кополієстеру нема двох перегинів на ізотермі поверхневого натягу, однак з ростом концентрації все ж спостерігається незначна зміна розміру частинок дисперсної фази від 200 нм до 288 нм при його концентраціях набагато вищих за ККМ.

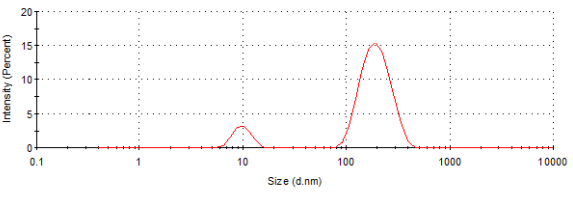
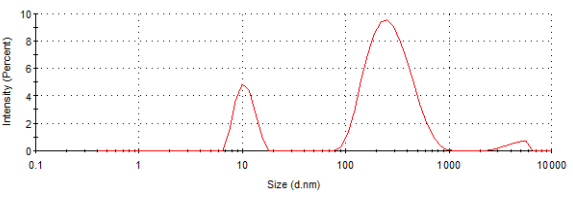
GluLa-DPG-PEG1000-F(5,56%) ККМ=0,0105%	Гідродинамічний діаметр		Конц. кополіестеру, %	pdi
	d ₁ , nm	d ₂ , nm		
	(частка фракції)	(частка фракції)		
	10 (11%)	198 (89%)	0,05	0.579
	10,7 (18%)	288 (79.4%)	0,112	1.0

Рис.4.13. Гістограми розподілу частинок дисперсної фази кополіестерів GluLa-DPG -PEG1000-F(5,56%) при різній концентрації полімеру.

4.4. Вплив температури на розмір частинок дисперсної фази

Враховуючи те, що дисперсії на основі синтезованих флуоресцеїнвмісних кополіестерів є перспективними для створення засобів доставки ліків, то важливо було оцінити зміни, які відбуваються у них при зростанні температури до 36,6÷40°C. Дослідження, проведені для дисперсії кополіестеру GluSt-DPG-PEG1000-F(5,87%), при його концентрації між ККМ і ККА.

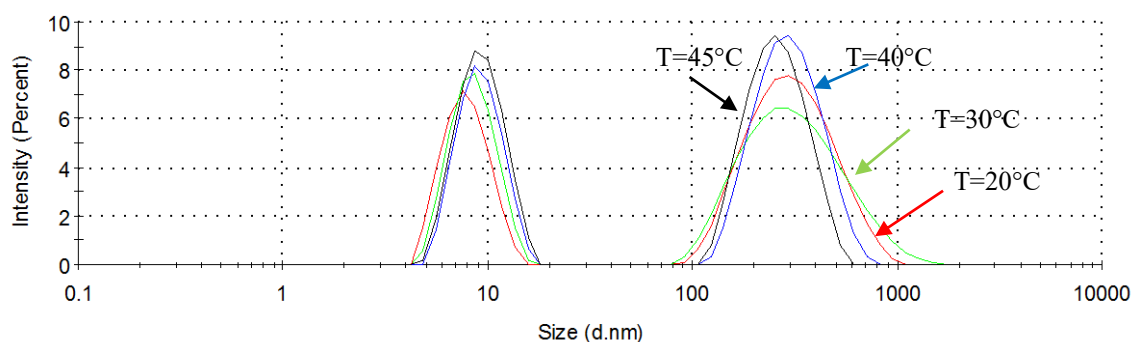


Рис. 4.14. Гістограми розподілу частинок дисперсної фази кополіестеру GluSt-DPG -PEG1000-F(5,87%) при різних температурах і концентраціях вищій за ККМ

Як видно з рис. 4.14 при збільшенні температури від 20 до 45°C хоча і можна помітити незначні зміни у характері гістограм розподілу проте середні розміри частинок дисперсної фази залишаються практично незмінними.

4.5. Солюбілізація нерозчинних у воді речовин міцелами флуоресцеїнвмісних кополієстерів

Серед розроблених лікарських препаратів близько 40% є гідрофобними сполуками [132]. Їх низька розчинність у воді є серйозною проблемою у фармацевтичній промисловості, яка призводить до обмеження кількості лікарських засобів після їх схвалення та збільшення витрат на розробку. Незважаючи на величезний прогрес у передових технологіях, спрямованих на покращення розчинності, кількість гідрофобних сполук, які передбачають внутрішньовенний шлях введення, все ще невелика [133]. Допоміжні речовини, які використовуються у препаратах для покращення розчинності діючої речовини часто характеризуються токсичними побічними ефектами (димексид, бензилбензоат, Cremophor EL®/ethanol in Taxol® [134]). Тому існує постійний інтерес до практичних підходів з використанням нанорозмірних систем особливо на основі амфіфільних полімерів, який багато в чому визначається їх здатністю до утворення міцел і солюбілізації ними гідрофобних сполук [135]. Полімерні міцели можна розглядати як наноконтейнери для доставки ліків і пролонгування їх дії [136,137,138]. До переваг амфіфільних полімерів у порівнянні з низькомолекулярними ПАР можна віднести їх меншу токсичність і вищу стабільність міцел в середовищах *in vivo* [139].

На сьогодні вивчення процесів солюбілізації (підвищення розчинності важкорозчинних або практично нерозчинних сполук) відкриває нові можливості у використанні нерозчинних і важкорозчинних у воді речовин і дозволяє підвищити їх ефективність і тим самим знизити дозу біологічно активних речовин, уникнути використання співрозчинника, змінювати шляхи введення ліків на більш безпечні та зручні для людини. Солюбілізовані лікарські препарати у полімерних міцелах демонструють значний потенціал для розвитку наприклад пероральної доставки терапевтичних молекул [140].

Полімерні міцели у дисперсіях амфіфільних кополієстерів на основі N-заміщених двоосновних амінокислот і полієтердіолів виявилися ефективними

носіями для гідрофобних препаратів [97]. Вони утворюють міцели у водному середовищі з структурою ядро – оболонка при перевищенні їх критичних міцелярних концентрацій (ККМ) у водних розчинах. Гідрофобне ядро таких міцел служить вантажним простором для включення ліпофільних терапевтичних сполук, в той час як гідрофільна поліоксietiленова оболонка, забезпечуючи стабільність міцели в дисперсному стані, зменшує небажані взаємодії з клітинами і білками.

Практичне використання кополієстерів, синтезованих в даній роботі, передбачає використання їх у системах доставки індивідуально або у суміші як речовин-репортерів, тому важливим було встановити відмінності у їх властивостях, які викликані введенням флуоресцеїну в склад макромолекул.

Здатність до солюбілізації частинками дисперсної фази кополієстерів досліджували з використанням малорозчинного у воді барвника Судан III, який є типовим об'єктом для моделювання терапевтичних препаратів. Результати досліджень проведених для кополієстерів різного складу наведені у таблиці 4.5.

Таблиця 4.5.

Солюбілізаційні характеристики амфифільних флуоресцеїнівмісних кополієстерів

Назва	Структурна формула	Вміст F в кополієстері, %	Максимальна солюбілізація, г судану/ г кополієстеру	Солюбілізація судану при концентраціях більших за ККА, г судану/г кополієстеру	Концентрація кополієстеру, при якій досягається максимальна ефективність солюбілізації, %
27-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG600] _{0.264} -[DPG] _{0.205} -[F] _{0.065}	5,2	2,4	0,90	0,04
36-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.31} -[DPG] _{0.187} -[F] _{0.03}	1,87	5,87	0,95	0,20
33-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.3} -[DPG] _{0.172} -[F] _{0.05}	3,75	5,34	0,50	0,30
34-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.262} -[DPG] _{0.185} -[F] _{0.077}	5,56	5,85	0,69	0,13
46-МФ	[GluLa] _{0.5} -[PEG1500] _{0.286} -[DPG] _{0.187} -[F] _{0.035}	3,18	4,57	0,87	0,10
39-МФ	[GluSt] _{0.5} -[PEG400] _{0.327} -[DPG] _{0.144} -[F] _{0.04}	4,7	2,2	1,09	0,10

29-МФ	[GluSt] _{0.5} -[PEG600] _{0.269} - [DPG] _{0.183} -[F] _{0.055}	4,03	3,57	1,0	0,15
38-МФ	[GluSt] _{0.5} -[PEG1000] _{0.31} - [DPG] _{0.15} -[F] _{0.037}	2,87	6,0	0,93	0,06
37-МФ	[GluSt] _{0.5} -[PEG1000] _{0.258} - [DPG] _{0.162} -[F] _{0.05}	5,87	3,9	1,0	0,04
47-МФ	[GluSt] _{0.5} -[PEG1500] _{0.302} - [DPG] _{0.119} -[F] _{0.062}	2,4	6,88	1,38	0,15

Побудовані криві сольобілізації для кополієстерів GluLa, які синтезовані за однакового завантаження флуоресцеїну проте різною величиною молекулярної маси поліетердіолу (рис.4.15) дозволяють переконатись, що в області малих концентрацій (співрозмірних з ККМ) залежність має яскраво виражений екстремальний характер з максимумом. Значення концентрації кополієстеру, для яких спостерігається максимум сольобілізації, знаходяться в доволі вузькому концентраційному проміжку, за межами якого крива отримує пологий характер з виходом на плато.

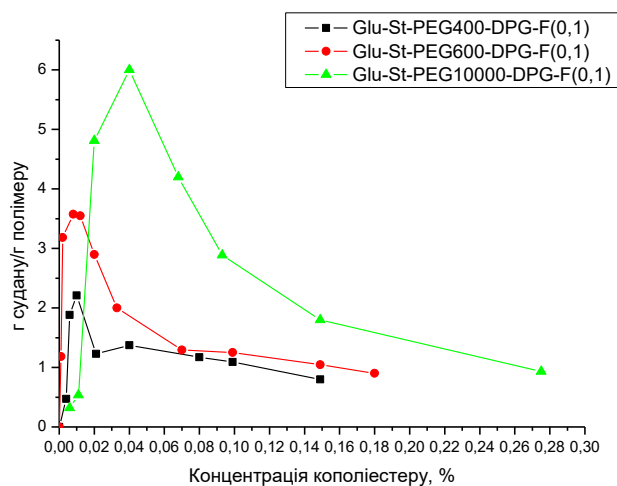


Рис. 4.15 Залежність кількості сольобілізованого судану на одиницю маси кополієстеру від концентрації кополієстеру на основі GluSt і ПЕГ різної ММ.

З даних, наведених на рис. 4.15 можна побачити, що максимальна кількість сольобілізованого судану коливається в межах від 2,3 до 6 г на один грам кополієстеру і залежить від його структури. Як видно на рис. 4.15 вплив на максимальне значення сольобілізації судану має ММ поліоксиетиленового фрагмента, зі збільшенням якого в області малих концентрацій сольобілізація

судану суттєво зростає. Кількість солюбілізованого судану при вищих концентраціях, які відповідають становить в середньому 1÷2 г на грам поліестеру.

Більш наглядно охарактеризувати властивості кополієстерів можна аналізуючи не тільки кількість солюбілізованої речовини на одиницю маси полімеру, а також і зміну концентрації речовини солюбілізованої у дисперсії від концентрації кополієстеру (рис. 4.16). Таким чином побудовані залежності солюбілізації дозволяють переконатись, що в області концентрацій кополієстерів, більших за значення ККМ, солюбілізаційна здатність кополієстерів не втрачається, однак їхня ефективність з збільшення концентрації кополієстеру виходить на плато. Це пояснюється тим що при збільшенні концентрації кополієстеру вище ККА, в дисперсії з первинних частинок утворюються більш великі агрегати первинних частинок, солюбілізація в яких визначається очевидно зменшенням доступності для барвника внутрішніх гідрофобних областей у їх ядрі.

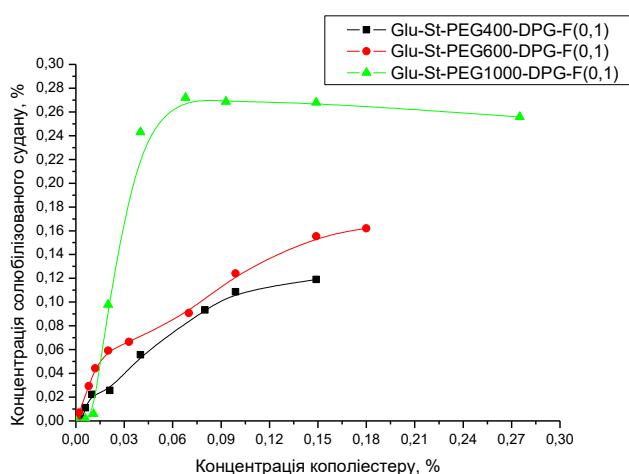
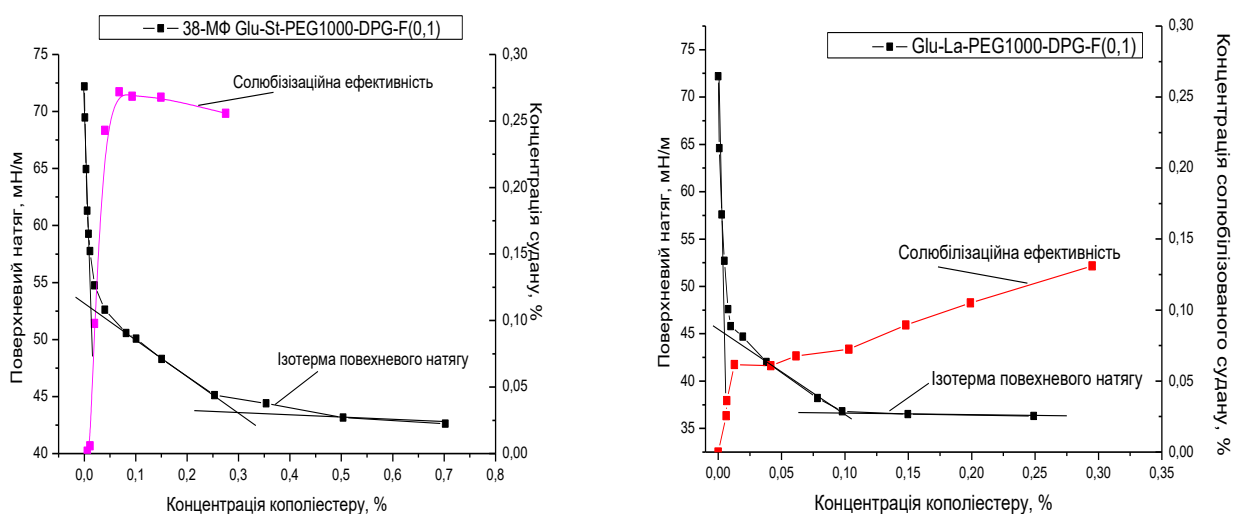


Рис. 4.16. Залежність концентрації солюбілізованого судану від концентрації кополієстеру на основі GluSt.

Також варто зазначити, що солюбілізаційна ефективність також залежить від ММ поліоксиетиленового фрагменту у кополієстері. Як видно з рис.4.16 найбільш ефективною є дисперсія кополієстеру GluSt-PEG1000-DPG-F(3,87%) при концентрації кополієстеру в дисперсії 0,075%. Якщо співставити ефективність солюбілізації даного кополієстеру з його кривою поверхневого

натягу (рис.4.17а) то стає зрозумілим, що різке збільшення ефективності сольобілізації спостерігається тоді коли в розчині починають формуватись первинні міцели. Вони характеризуються максимальним співвідношенням об'єму внутрішніх областей до площі поверхні і відповідно їх гідрофобне ядро є найбільш доступне для проникнення молекул судану. При подальшому збільшенні концентрації кополіестеру, яке за даними DLS супроводжується збільшенням величини міцелярних агрегатів крива виходить на плато.



а

б

Рис. 4.17. Сольобілізаційна ефективність флуоресцеїнвмісних кополіестерів, які містять гідофільною складовою PEG1000 у співставленні з їх ізотермами поверхневого натягу.

Схожий ефект спостерігається і для кополіестеру 33-МФ, який синтезовано на основі GluLa (рис.4.17б). Однак як видно з рисунка його сольобілізаційна ефективність є значно меншою. Це можна пояснити тим, що зменшення величини гідрофобного фрагмента у складі кополіестеру ускладнює формування ядра частинки, а також зменшує силу гідрофобних взаємодій з молекулами барвника, що в загальному приводить до зменшення здатності до його сольобілізації. Тим не менш у цьому випадку спостерігається невелике збільшення ефективності сольобілізації також і після досягнення концентрації кополіестеру ККА, однак ці значення є нижчими ніж для кополіестеру GluSt-PEG1000-DPG-F(0.1).

Зменшення величини ММ PEG в загальному зменшує здатність до сольобілізації. Наприклад, для кополіестеру 27-МФ синтезованого з використанням PEG 600, як видно з рис. 4.18, при досягненні концентрації кополіестеру, яка відповідає ККМ сольобілізації судану не відбувається. І хоч за даними ДЛС у дисперсії міцели уже сформувались, максимальна ефективність сольобілізації спостерігається тільки при концентрації, яка на ізотермі поверхневого натягу відповідає ККА.

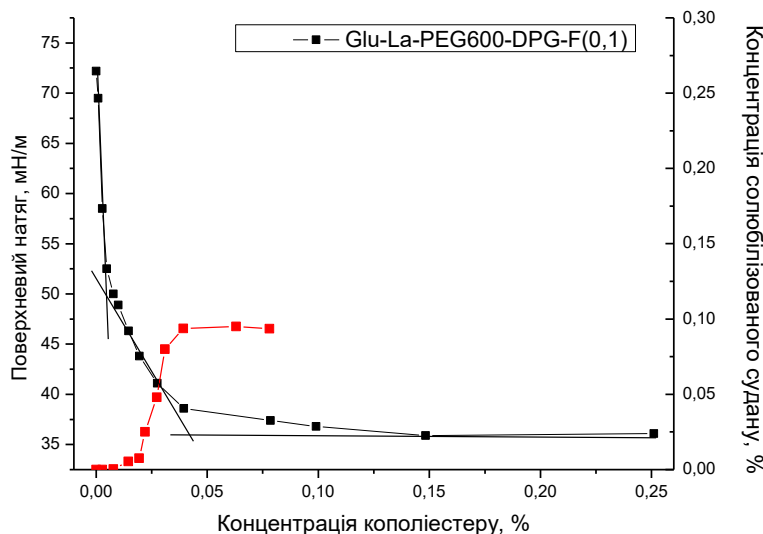


Рис. 4.18. Сольобілізаційна ефективність флуоресцеїнвмісних кополіестерів, які містять гідофільною складовою PEG600 у співставленні з їх ізотермами поверхневого натягу.

Присутність у молекулі кополіестеру фрагментів флуоресцеїну, які є ліпофільними і входять в склад макромолекул на заміну більш гідрофільних поліоксиетиленгліколів та дипропіленглікою, на сольобілізуючу здатність впливає слабо у порівнянні з їх аналогами, які флуоресцеїну не містять [129].

Як видно з рис. 4.19 для кополіестерів на основі GluLa впливу флуоресцеїну не спостерігається. Помітне тільки зміщення максимуму сольобілізації для кополіестеру з високим вмістом флуоресцеїну (5,56%). Це може пояснюватися тим, що для цих кополіестерів характерно зміщення ККМ в сторону більш

високих концентрацій у порівнянні з кополіестерами з невисоким вмістом флуоресцеїну.

Інший ефект спостерігається для кополіестерів на основі GluSt та PEG1000. Тут помітним є явний вплив збільшення кількості флуоресцеїну, що призводить до зменшення максимуму солюбілізації (рис.4.20), при тому жодних зміщень концентрації, при якій відбувається максимальна солюбілізація не спостерігається.

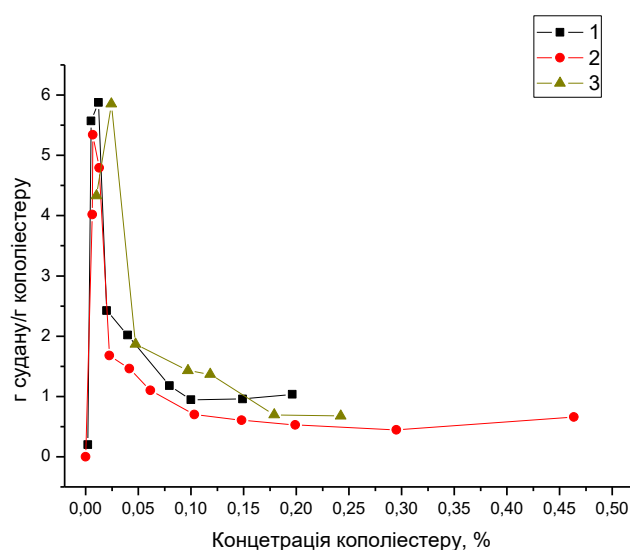


Рис. 4.19. Залежність кількості солюбілізованого судану від концентрації кополіестерів з різним вмістом флуоресцеїну. 1- GluLa-PEG1000-DPG-F(1.87 %), 2- GluLa-PEG1000-DPG-F(3.87 %), 3- GluLa-PEG1000-DPG-F(5.56 %).

Таким чином проведені дослідження показують, що флуоресцеїнівмісні кополіестери здатні солюбілізувати малорозчинні у воді сполуки причому введення флуоресцеїну у структуру макромолекул по-різному впливає на солюбілізаційну здатність. Для кополіестерів на основі GluLa впливу практично не помітно, а для кополіестерів на основі GluSt, які містять флуоресцеїну понад 5% проявляється зниження солюбілізаційної здатності,. При менших вмістах F їх властивості є порівняльними з структурними аналогами, які флуоресцеїну не містять, що дозволяє використовувати їх для маркування наночастинок і моніторингу їх поширення з ліками.

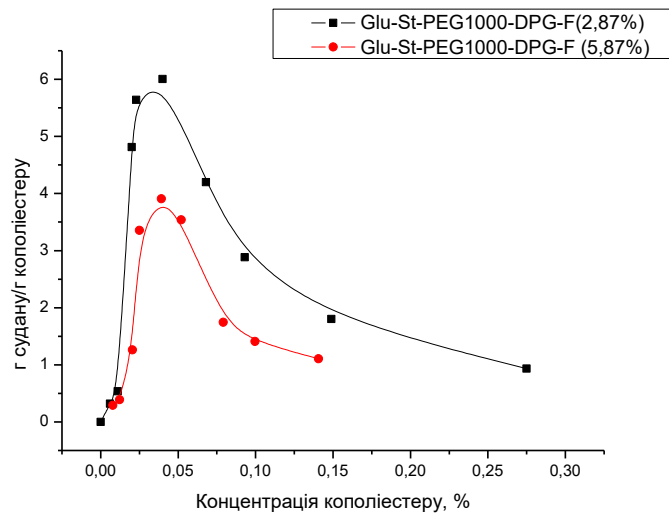


Рис. 4.20. Залежність кількості солюбілізованого судану від концентрації кополієстерів з різним вмістом флуоресцеїну: 1 - GluSt-PEG1000-DPG-F(2.87 %), 2 - GluSt -PEG1000-DPG-F(5.87 %).

Важливою характеристикою при дослідженні солюбілізаційної здатності частинок водних дисперсій водонерозчинних сполук є їх здатність до вивільнення солюбілізованої сполуки в ліофільне середовище. На механізм вивільнення лікарського засобу і швидкість його поширення можуть впливати різні чинники: структура міцелярних агрегатів, сумісність ядра міцел з біоактивною сполукою, початкове завантаження препарату, його локалізація в структурі міцел та дифузійні параметри. Структура кополієстеру (наприклад, співвідношення гідрофільних і гідрофобних фрагментів, довжина ланцюга і ступінь його розгалуженості) також береться до уваги при розгляді питань пов'язаних з ефективністю завантаження лікарського засобу та закономірності його вивільнення [141]. Всі ці фактори, окрім того, мають високу ступінь взаємозалежності, і привести закономірності вивільнення солюбілізованого судану у залежність від структури кополієстерів, наведених на рис. 4.21, не вдалося. Варто тільки зазначити, що для кополієстерів, які відрізняються складом і структурою мономерних ланок, є доволі значні відмінності у швидкості вивільнення Судану III. Повне вивільнення для досліджених дисперсій спостерігається в інтервалі від 16 до 33 годин.

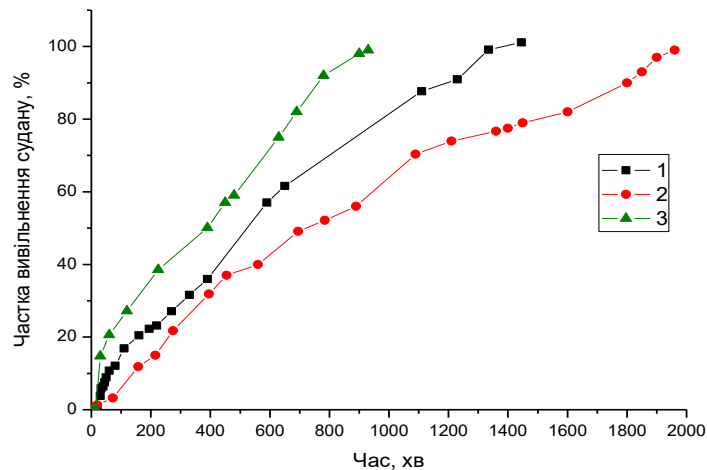


Рис.4.21. Вивільнення Судану (III), солюбілізованого частинками водних дисперсій зразків 1. GluLa-PEG1000-DPG- F(3,87%) 2. GluST-PEG600-DPG-F(4,03%) 3. GluST-PEG1500-DPG –F(2,4%).

Здатність дисперсій кополієстерів солюбілізувати модельні малорозчинні у воді барвники є дуже важливою характеристикою, однак не менш важливим є дослідити їх здатність солюбілізувати сполуки, які є біологічно активними і визнаються лікарськими препаратами.

Застосування наприклад фітохімічних речовин як лікарських засобів є новим напрямком досліджень, і останнім часом зростає інтерес до використання таких препаратів як хіміопрофілактичних та хімотерапевтичних засобів [142]. Куркумін є сполукою поліфенольного типу, і виділяється з кореневища багаторічної трави, куркуми (*Curcuma Longa*). Він широко використовується в традиційній індійській лікарській системі Аюрведи для лікування різних захворювань. Протягом останніх трьох десятиліть його фармакологічні властивості досліджуються дуже широко, і виявлені ефекти такі як антиоксидантна, протизапальна та протипухлинна активність на молекулярному рівні засвідчують про його великий потенціал у лікуванні широкого спектру захворювань, включаючи рак, діабет, серцево-судинні захворювання, артрит, хвороба Альцгеймера, псоріаз та ін. [143,144]. Він є нетоксичним і завдяки цим перевагам був тестований у клінічних випробуваннях його, як терапевтичного засобу, при різних захворюваннях, включаючи рак [145].

Але проблемою, як і для більшості гідрофобних сполук, є надзвичайно низька розчинність куркуміну у воді, що обмежує його застосування при внутрішньовенному введенні, а також погане всмоктування в кишечнику при пероральному застосуванні. Куркумін зазнає швидкої деградації ферментами в кишечковому тракті, що призводить до його низької біодоступності [146]. Для подолання проблем розчинності, стабільності та біодоступності куркуміну, все більше уваги приділяється розробці нових наносистем його доставки [147]. Одним з можливих способів підвищення розчинності у воді і стабільності куркуміну є інкапсуляція препарату в частинках полімерних міцелярних наноносів [148, 149].

При використанні для цього флуоресцеїнвмісних кополієстерів з'являється можливість моніторингу наночастинок в організмі і прогнозуванні терапевтичних ефектів від їх накопичення в певних зонах організму.

Солюбілізацію куркуміну проводили з використанням кополієстерів, які створювали стійкі дисперсії та характеризувалися високими солюбілізаційними характеристиками щодо Судану III.

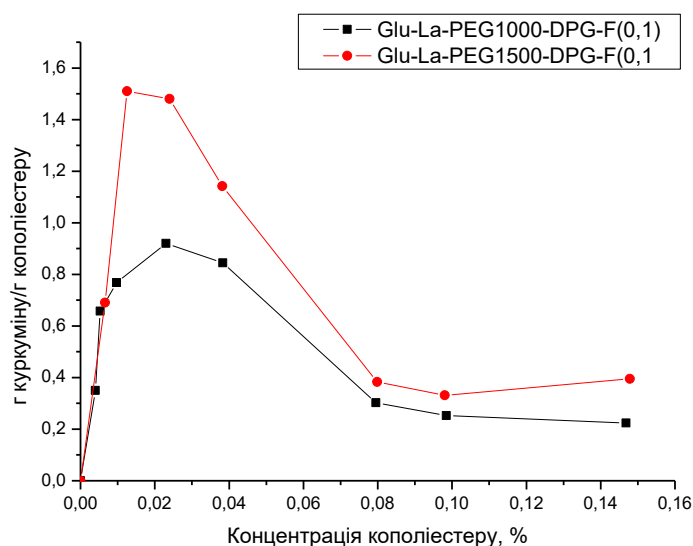


Рис. 4.22. Залежність кількості солюбілізованого куркуміну від концентрації флуоресцеїнвмісних кополієстерів.

Як видно з рис. 4.22, солюбілізуюча здатність отриманих флуоресцеїнвмісних кополієстерів щодо куркуміну є нижчою ніж для судану, і характеризується максимумом, який знаходиться в межах від 0,9 до 1,5 г куркуміну на 1 г кополієстеру.

Таким чином, включення малорозчинних у воді сполук у гідрофобне ядро міцел флуоресцеїнвмісних кополієстерів призводить до підвищення їх розчинності у водному середовищі, а також буде сприяти біодоступності та стабільності лікарських препаратів. Це робить отримані кополієстери привабливим об'єктом для створення багатофункційних систем доставки ліків, які, крім функції транспорту, забезпечать можливість моніторингу їх локалізації в організмі.

4.6. Дослідження амфіфільних властивостей кополієстерів з хромофорними групами

При створенні лікарських форм на основі нових класів хімічних сполук одним з основних є питання про механізми їх проникнення в живі клітини та про взаємодію цих сполук з клітинними мембранами. Ідеальним є збалансоване співвідношення гідрофільних та ліпофільних властивостей препарату або його носія, завдяки чому він однаково добре розчинний і у водному, і в ліпідному середовищах. Оцінка біорозподілу сполук у модельних системах є важливим етапом при створенні та визначенні ефективності засобів доставки ліків, які зможуть досягати місця ураження, проникаючи крізь біологічні бар'єри.

Здатність речовини проникати через мембрану клітин, яка є вирішальним фактором при виборі ефективних лікарських сполук і їх лікарських форм визначається їх ліпофільністю [150]. Зручним методом, який дозволяє чисельно охарактеризувати ступінь ліпофільності сполук є вивчення розподілу речовини між 1-октанолом (модель фосфоліпідної мембрани) і водою (міжклітинна рідина). У випадку ковалентного зв'язування барвника в структурі макромолекул концентрація кополієстеру після перерозподілу однозначно корелює з вмістом флуоресцеїну в кожній з фаз.

Варто зауважити, що у колоїдних розчинах синтезованих амфифільних кополієстерів концентрація флуоресцеїну у перерахунку на вільний барвник може бути збільшена більш ніж на порядок ($C_F=0.03\%$) у порівнянні з його власною розчинністю у воді ($C_{F_{H_2O}}=0.005\%$). Цей факт, а також високий молярний коефіцієнт поглинання флуоресцеїну (88000) дали можливість розробити методику аналізу вмісту кополієстеру у кожній з фаз з використанням відносно простого спектрофотометричного обладнання.

В отриманих кополієстерах співвідношення молекулярної маси гідрофільних та ліпофільних фрагментів, яке визначає їх колоїдно-хімічні властивості та області застосування відображається числом HLB [151].

За методикою 2.3.7 експериментально отримано значення коефіцієнту розподілу ($P_{o/w}$) синтезованих кополієстерів. Їх $HLB_{експ}$ та $HLB_{розрах}$ визначено за методикою 2.3.8. Результати наведені в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6

Колоїдно-хімічні характеристики кополієстерів на основі N-ацилпохідних глутамінової кислоти, поліетердіолів і флуоресцеїну

№	Узагальнена структурна формула	Конц F у полімері, %	Експериментальні значення			$HLB_{розрах}$
			$P_{o/w}$	$\log P_{o/w}$	$HLB_{експ}$	
1	$[GluLa]_{0.5}-[PEG400]_{0.282}-[DPG]_{0.195}-[F]_{0.025}$	5.53	2.03	0,31	6,75	6,15
2	$[GluSt]_{0.5}-[PEG400]_{0.327}-[DPG]_{0.144}-[F]_{0.04}$	4.67	2.83	0,45	6,63	4,84
3	$[GluLa]_{0.5}-[PEG600]_{0.264}-[DPG]_{0.205}-[F]_{0.065}$	5.20	2.85	0,45	6,63	7,096
4	$[GluSt]_{0.5}-[PEG600]_{0.269}-[DPG]_{0.183}-[F]_{0.055}$	4.03	2.86	0,46	6,72	5,38
4a	$[GluSt]_{0.5}-[PEG600]_{0.31}-[DPG]_{0.21}$	0	3,05	0,48	6,2	5,7
5	$[GluLa]_{0.5}-[PEG600]_{0.232}-[DPG]_{0.177}-[F]_{0.11}$	13.07	1.90	0.28	6.77	6,30
6	$[GluSt]_{0.5}-[PEG600]_{0.244}-[DPG]_{0.139}-[F]_{0.113}$	9.69	1.52	0.181	6.85	5,21

7	[GluLa] _{0,5} -[PEG1000] _{0,3} - [DPG] _{0,172} -[F] _{0,05}	3.75	1.45	0,16	6,87*	8,68
7a	[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,325} - [DPG] _{0,18}	0	0,06	-1,19	7,9	8,44
8	[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,31} - [DPG] _{0,15} -[F] _{0,037}	2.87	2.36	0,37	6,74	6,71
9	[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,258} - [DPG] _{0,162} -[F] _{0,05}	5.87	0.68	-0.17	7.14	6,3
10	[GluLa] _{0,5} -[PEG1000] _{0,262} - [DPG] _{0,185} -[F] _{0,077}	5.56	1.45	0.16	6,86*	8,27
11	[GluLa] _{0,5} - [PEG1000][DEG] _{0,426}	6.82	0.31	-0,58	7,48	7,62
12	[GluLa] _{0,5} -[PEG1000] _{0,391} - [F] _{0,09}	5.32	1.76	0,245	6,80	7,41
13	[GluLa] _{0,5} -[PEG1500] _{0,286} - [DPG] _{0,187} -[F] _{0,035}	3,182	6,05	0,78	6,35*	8,87

*- утворення стійкої емульсії

Результати визначення логарифма коефіцієнта розподілу для ряду кополієстерів наведено на рис. 4.23. Невеликий діапазон зміни значень $\text{Log}P_{o/w}$ від -0,5 до 0,5 при доволі суттєвій зміні молярної маси (400÷1500 Да) гідрофільного фрагмента поліетердіолу (PEG) у складі кополієстерів спонукало до проведення додаткових розрахунків, які б опиралися на незалежні дані.

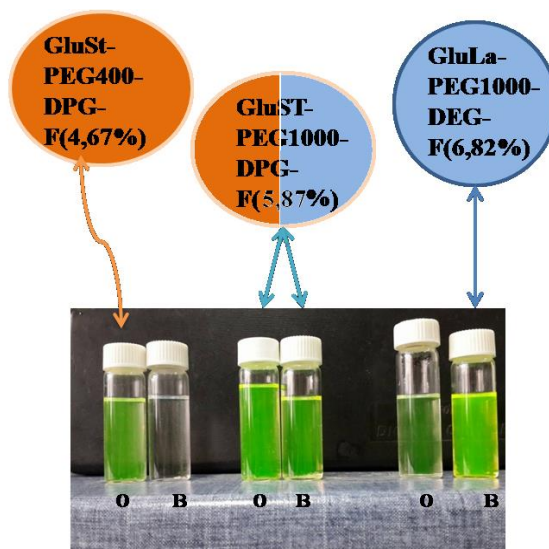


Рис. 4.23. Розподіл флуоресцеїнвмісних кополієстерів між фазами н-октанолу (O) та водою (B) в залежності від їх складу.

При цьому видно що розраховані значення HLB близькі до експериментально визначених (табл.4.6) [152]. Разом з тим, задовільної кореляції між ними не спостерігається. Це добре ілюструється діаграмою розсіювання експериментальних та розрахованих значень HLB, яка наведена на рис. 4.24. На відсутність кореляції вказує значне відхилення даних від діагоналі діаграми.

Причиною такого неспівпадіння може бути те, що при розрахунку HLB за адитивною схемою для елементарної ланки полімеру не враховуються такі важливі фактори, як структура макроланцюга, його сегментальна рухливість, функціональна, структурна неоднорідність кополієстеру та природа кінцевих груп. Вплив одночасно декількох факторів, які не обов'язково є лінійними, ускладнює проведення аналізу залежності HLB від складу кополієстерів.

Для того, щоб за таких умов можна було виявити характер впливу всіх факторів і їх вагомість, доцільно провести множинний регресійний аналіз та побудувати інтерполяційне рівняння коефіцієнту ліпофільності від параметрів, які характеризують якісний та кількісний склад кополієстеру.

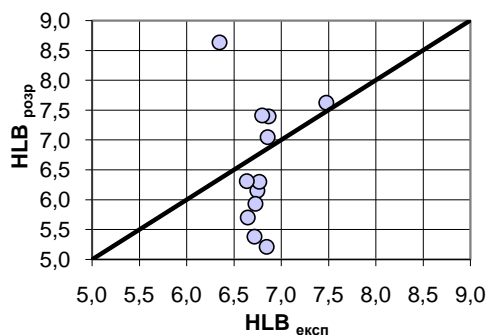


Рис.4.24. Діаграма розсіювання експериментальних значень $P_{o/w}$ від їх оціночних значень отриманих за розрахунком.

Як показано вище, розрахункове і експериментальне значення HLB оцінюється по відповідних експериментальному та розрахунковому значенню коефіцієнту ліофільності $P_{o/w}$. Тому, для зменшення накопичення похибки, в регресійному аналізі використовували значення коефіцієнту $P_{o/w}$, а не оцінені по них значення чисел HLB.

Оскільки в даній роботі аналізуються кополіестери $[\text{Glu}(\text{La}, \text{St})_{0.5}(\text{PEG}, \text{DPG}, \text{F})_{0.5}]$ в складі яких кількість залишків N-похідного глутамінової кислоти, фрагментів поліетердіолів, та діолу невисокої молярної маси змінюється не суттєво, тому в якості параметрів регресійного аналізу ці фактори виступати не можуть. Натомість фактором інтерполяційного рівняння може бути така якісна характеристика цих фрагментів як HLB. Число HLB, яке для GluSt дорівнює 1.8, а для GluLa – 4.44 визначено як параметр G, що характеризує їх вплив на коефіцієнт ліпофільності в інтерполяційному рівнянні. Фрагмент поліетердіолу в складі кополіестеру найкраще характеризувати величиною P, яка в інтерполяційне рівняння входить коефіцієнтом, який пропорційний його молярній масі – $P = M_{\text{PEG}}/1000$. Низькомолекулярний діол, як складова частина кополіестеру, може бути охарактеризований параметром N чисельно рівним значенню групового вкладу його ланки в HLB за адитивною схемою. У відповідності до цього для залишку DPG – $N = -0,15$, а DEG – $N = 0,3$ [151]. У випадку, відсутності в складі кополіестеру ланок низькомолекулярного діолу – $N = 0$. І тільки фрагмент флуоресцеїну може бути охарактеризований параметром F, який відповідає його вмісту в кополіестері у відсотках (таблиця 4.6).

Вид інтерполяційного рівняння множинної регресії підбирали добиваючись максимального значення множинного коефіцієнту лінійної кореляції R. Максимальне значення цього коефіцієнту, $R = 0.9795$, реалізується рівнянням, яке має наступний вигляд:

$$P_{o/w} = a_0 + a_p \cdot P + a_{pp} \cdot P^2 + a_N \cdot N + a_G \cdot G + a_F \cdot F + a_{GF} \cdot GF \quad (1)$$

Значення коефіцієнтів інтерполяційного рівняння (1) з їх довірчими околами, оціненими на 90% довірчому рівні, наведені в табл.4.7.

Аналіз значень коефіцієнтів та їх околів довіри, дозволяє зробити висновок, що всі коефіцієнти значимі за обраної довірчої ймовірності. Про якість кореляції можна зробити висновок за діаграмою розсіювання експериментальних значень $P_{o/w}$ від їх оціночних значень отриманих за рівнянням (1) рис.4.25.

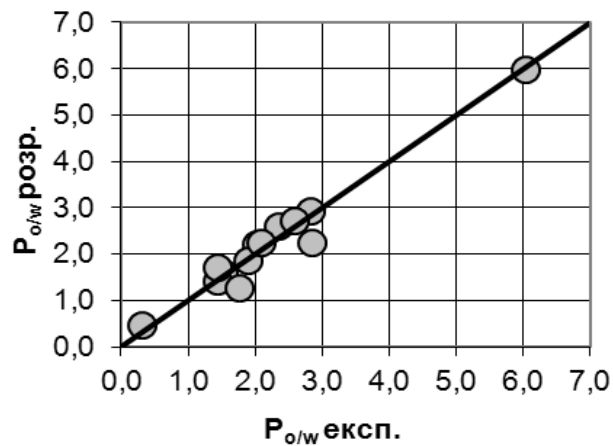


Рис. 4.25. Діаграма розсіювання експериментальних значень $P_{o/w}$ від їх оціночних значень отриманих за рівнянням (1)

Аналіз рівняння (1) більш зручно проводити в його спрощеному вигляді (2).

$$P_{o/w} = 7.2 - 10.7P + 7.0P^2 - 2.8N - 0.6G + (0.06 \cdot G - 0.22) \cdot F \quad (2)$$

Отриманий вираз є прогностичним рівнянням, яке описує залежність коефіцієнту розподілу $P_{o/w}$ від молярної маси фрагментів PEG (P), значення чисел HLB N-похідних глутамінової кислоти (G), вкладів в адитивну схему розрахунку низькомолекулярних спиртових компонентів (N), відсоткового вмісту флуоресцеїну (F) в складі кополіестеру та змішаним параметром факторів G і F, що характеризує їх синергічний вплив.

Таблиця 4.7.

Коефіцієнти регресійного рівняння з довірчими околами, та їх відносна похибка.

Коефіцієнт	a0	aP	aPP	aN	aG	aF	aGF
Значення	7.2	-10.7	7.0	-2.8	-0.6	-0.22	0.06
Окіл довіри*	±0.6	±1.0	±0.6	±0.6	±0.1	±0.06	±0.02
Віносна похибка, %	8	10	9	20	18	24	25

* окіл довіри значень коефіцієнтів визначенні на 90% довірчому рівні

В ході проведеного аналізу встановлено, що в отриманій кореляційній залежності обрані параметри мають неоднакову вагомість. Це означає, що різні фактори мають різний за потужністю вплив на розподіл кополіестеру між фазами. Найбільший (близько 65%) вклад в регресію має параметр P. При тому в рівнянні

2 цей параметр представлений двома членами - лінійним та квадратичним, що вказує на складну залежність значень $P_{o/w}$ від молярної маси блоків PEG. Такий характер впливу є основною причиною, яка приводить до ускладнення при встановленні прямого зв'язку між чинниками за даними таблиці 4.6. Оцінка впливу молярної маси PEG у складі макромолекул за рівнянням (2) на значення $P_{o/w}$ наведено на рисунку 4.26.

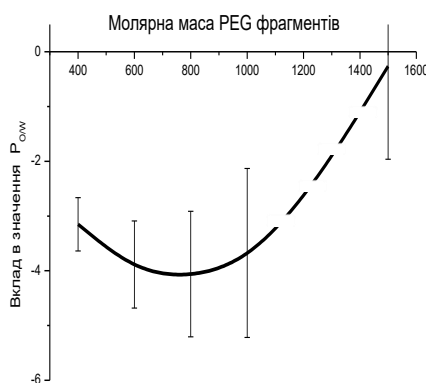


Рис.4.26.Залежність значень $P_{o/w}$ від молярної маси PEG у складі макромолекул кополіестеру (за рівнянням 2)

Можна побачити, що збільшення молярної маси PEG від 400 до 800 Да приводить до статистично значимого зменшення значень $P_{o/w}$. Тобто введення в склад кополіестеру PEG залишків з більшою молярною масою у цьому діапазоні приводить до закономірного збільшення частки кополіестеру який перерозподілюється у водну фазу. В діапазоні молярних мас PEG фрагментів 800 і більше очікуваного збільшення гідрофільності уже не спостерігається. При цьому для макромолекул кополіестеру, який отриманий за використання PEG з молярною масою 1500 Да зміни у перерозподілі, очевидно пов'язані з ефектами мікроемульгування і утворення зворотної міцелярної фази в октанолі. Тим не менше зі збільшенням молярної маси фрагментів PEG включно до 1500 Да зростає здатність до самостабілізації у водному середовищі частинок дисперсної фази кополіестерів [121,123]. Тому, з точки зору отримання самостабілізованих дисперсій кополіестерів в водному середовищі, які при тому мають здатність до

перерозподілу в олеофазу в складі кополієстеру, доцільно використовувати фрагменти PEG з молярною масою 1000÷1500 Да.

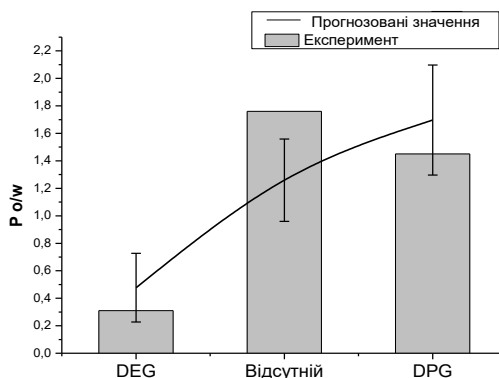


Рис.4.27. коефіцієнт розподілу $P_{o/w}$ кополієстерів: 1. GluLa-PEG1000-DEG-F, 2. GluLa-PEG1000-F, 3. GluLa-PEG1000-DPG-F

Наступний по вагомості (20%) вклад в регресію має параметр N, який характеризує природу низькомолекулярного діолу, використаного в складі кополієстеру. Як видно з рис.4.27 наявність у структурі фрагмента дигліцеролу чи його відсутність не приводить до значних змін HLB кополієстеру, і він проявляє незначні ліпофільні властивості (бари 2 і 3), однак при введенні у структуру кополієстеру більш гідрофільного діетиленгліколю спостерігається зменшення значення $P_{o/w}$ і HLB макромолекули зростає (бар 1). Це добре співпадає зі значенням, яке отримано за прогнозом по інтерполяційному рівнянню.

Аналогічний вплив має і фактор G. Збільшення HLB від 1,8 в GluSt до 4,44 в GluLa приводить до пропорційного зменшення значень $P_{o/w}$ і відповідно до зміни у перерозподілі кополієстеру між водною і олеофазою в користь водної. Проте вклад цього параметру в регресію є відносно невисокий, і не перевищує 10%.

Найменший вклад в регресію, але статистично вагомий, має вміст фрагментів флуоресцеїну в кополієстері (F). В інтерполяційному рівнянні його вплив на значення $P_{o/w}$ проявляється двома членами – лінійним F та змішаним $G \cdot F$. Поява змішаного члена в інтерполяційному рівнянні пов'язана з тим, що F є єдиним фактором, який кількісно характеризує склад кополієстеру. Сумарний вклад цих

членів не перевищує 5%, але виключення їх з інтерполяційного рівняння зменшує значення коефіцієнту множинної кореляції до $R=0,94$, а більшість коефіцієнтів регресії в такому випадку зберігають значимість лише на 80% довірчому рівні.

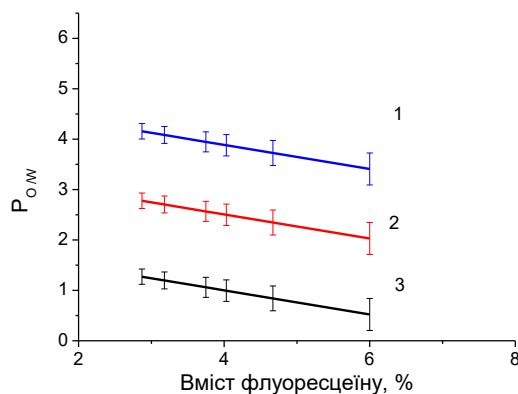


Рис.4.28. Залежність коефіцієнту розподілу $P_{o/w}$ від вмісту ланок флуоресцеїну.

На рис. 4.28. відображено вплив даного фактора при $G=4.44$ (GluLa, лінії 1,3), та $G=1.8$ GluSt (лінія 2). Отримані залежності, візуально дозволяють оцінити значимість впливу цього фактора на значення $P_{o/w}$ на різних рівнях фактора G і P . При тому слід відмітити, що збільшення вмісту фрагменту флуоресцеїну у всіх випадках приводить до незначного пониження значень $P_{o/w}$.

Виявлені залежності та оцінка значимості впливу якісних характеристик фрагментів кополіестеру дозволяє більш точно, ніж розрахунок HLB за формулою Девіса, прогнозувати здатність кополіестеру до перерозподілу між водною та олеофільною фазами.

Кополіестери, які містять в структурі макромолекули ліпофільні фрагменти, здатні солюбілізувати у наночастинках на їх основі лікарські препарати та взаємодіяти з мембранами клітин, в той же час його гідрофільні фрагменти гідратованих поліетердіолів стабілізують дисперсну фазу у водному середовищі і сприяють доставці їх з потоком крові і міжклітинної рідини до органів- мішеней. Задовільне співпадіння колоїдно-хімічних характеристик отриманих експериментально та розрахованих виходячи із складу кополіестерів отриманого за даними ^1H ЯМР спектроскопії дозволяє прогнозувати їх властивості в залежності від вибору компонентів реакційної суміші на стадії синтезу.

Таким чином, реакція Стегліха дозволяє отримувати флуоресцеїнвмісні кополіестери визначеного складу та будови з керованим гідрофільно-ліпофільним балансом і, відповідно, їх розподілом між водною та ліпофільною фазами, що є одним з важливих факторів, які беруться до уваги при створенні та дослідженні систем транспорту ліків[153].

4.7. Вивчення гідролітичних властивостей флуоресцеїновмісних кополіестерів

До особливостей отриманих кополіестерів слід віднести те, що для естерних зв'язів, які пов'язують фрагменти флуоресцеїну у макромолекулах характерною є схильність як до гідролітичного, так і ензимного гідролізу. Швидкість цього процесу буде залежати від багатьох факторів: хімічного складу, структури полімеру та морфології надмолекулярних асоціатів. Залишок флуоресцеїну, який міститься в структурі макромолекули флуоресцентних властивостей не має. Це можна використати для досліджень швидкості гідролізу внаслідок якого флуоресцеїн вивільняючись з структури макромолекули утворює таутомерну форму яка характеризується поглинанням світла у видимій області спектра з максимумом при 490 нм і легко аналізується методом спектрофотометрії (Рис.4.29). На цьому ефекті, з використанням відомих естерних похідних флуоресцеїну побудовано велику кількість біохімічних досліджень [154,155,156].

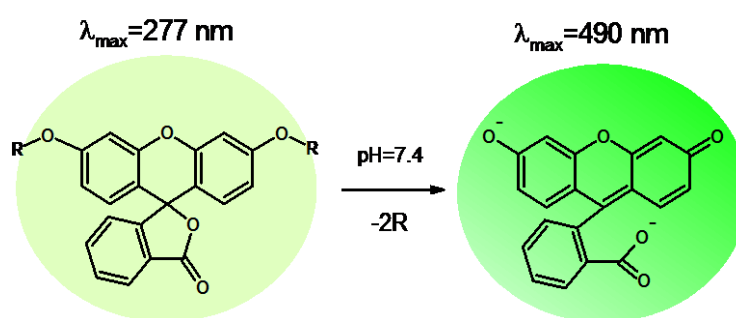


Рис. 4.29 Гідроліз естерних зв'язків у макромолекулі кополіестеру і вивільнення флуоресцеїну.

Швидкість спонтанного гідролізу флуоресцеїнвмісних кополіестерів досліджували аналізуючи збільшення концентрації вільного флуоресцеїну в часі при рН 7,45 у фосфатному буферному розчині, згідно методики 2.3.11.

Результати, що відображають швидкість наростання концентрації флуоресцеїну, який вивільняється наведено в таблиці 4.8. Порівняння отриманих даних (зразки 2, 3 табл.4.8) демонструє, що швидкість гідролізу естерних зв'язків з флуоресцеїном сповільнюється у випадку, коли цей процес відбувається зі складу кополієстерів, які містяться в частинках дисперсної фази. Проведення гідролізу за методикою, яка передбачає відсутність міцелярної фази, тобто з істинного розчину кополієстеру прискорює вивільнення флуоресцеїну в 3,3 рази.

Таблиця 4.8.

Швидкість гідролізу макромолекул флуоресцеїнівмісних кополієстерів в залежності від їх будови.

№	Структурна формула	Концентрація кополієстеру,	Швидкість гідролізу*10 ³ ,хв-1
1.	[GluLa] _{0.5} -[PEG400] _{0.282} -[DPG] _{0.195} -[F] _{0.025}	0,033	9,1
2.	[GluLa] _{0.5} -[PEG600] _{0.264} -[DPG] _{0.205} -[F] _{0.065}	0,038	7,1
3.	[GluLa] _{0.5} -[PEG600] _{0.264} -[DPG] _{0.205} -[F] _{0.065} ¹	0,038	23,54
4.	[GluLa] _{0.5} -[PEG1000] _{0.3} -[DPG] _{0.172} -[F] _{0.05}	0,05	2,69
5.	[GluLa] _{0.5} -[PEG1500] _{0.286} -[DPG] _{0.187} -[F] _{0.035}	0,057	0,90
6.	[GluSt] _{0.5} -[PEG600] _{0.269} -[DPG] _{0.183} -[F] _{0.055}	0,048	0,45
7.	[GluSt] _{0.5} -[PEG1000] _{0.31} -[DPG] _{0.15} -[F] _{0.037}	0,063	0,11
8.	[GluSt] _{0.5} -[PEG1500] _{0.302} -[DPG] _{0.119} -[F] _{0.062}	0,072	0,12
9.	[GluLa] _{0.5} -[F] _{0.525} ¹	0,0048	8,14
10.	Fluoresceindi(5-phenyl pentanoate) ¹		107,0 [157]
11.	Fluorescein di(2-(4-methoxy phenyl) acetate) ¹		252,7 [157]

¹ умови проведення гідролізу передбачають відсутність міцелярної фази

При дослідженні вивільнення флуоресцеїну з кополієстерів отриманих за використання GluLa за умов коли полімер знаходиться в міцелярній формі спостерігається ефект зменшення швидкості гідролізу при збільшенні довжини ланцюга поліоксиетиленових фрагментів (рис.4.30). Ця залежність є симбатною з покращенням стабільності колоїдних розчинів кополієстерів із зростанням ПЕГ і очевидно пов'язана з утворенням більш щільної оболонки, яка складається з гідратованих ланок поліетердіолу на поверхні частинок.

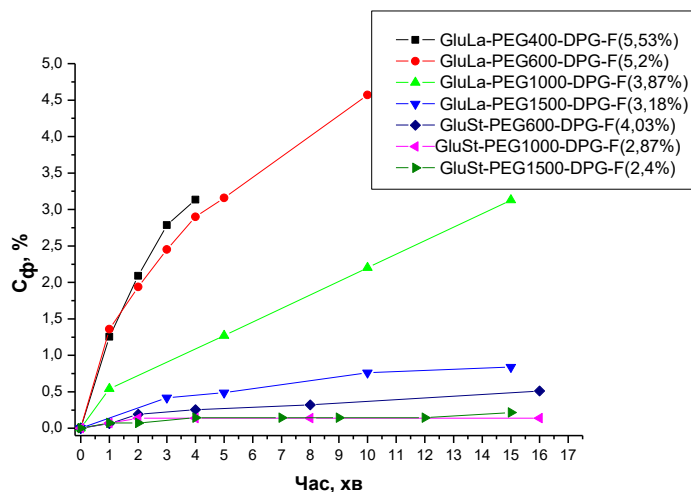


Рис.4.30 Спонтанний гідроліз флуоресцеїнвмісних кополієстерів різного складу на основі GluLa і GluSt.

Порівняння швидкості гідролізу кополієстерів на основі GluSt і GluLa дозволяє зробити висновок про те, що вивільнення флуоресцеїну зі складу кополієстерів, які містять більш ліпофільні фрагменти GluSt відбувається більш ніж на порядок повільніше, ніж на GluLa (рис.4.30).

В цілому отримані флуоресцеїнвмісні кополієстери характеризуються значно вищими (більш ніж на 2 порядки якщо порівнювати з кополієстерами на основі GluSt) показниками стійкості до спонтанного гідролітичного розщеплення, аніж відомі естери флуоресцеїну Табл.4.8 зразки 10,11. Це дозволяє очікувати на збереження стабільними їх властивостей при використанні у дисперсних системах доставки ліків.

4.8.Зв'язування альбуміну з наночастинками флуоресцентних кополієстерів

При створенні полімерних систем доставки ліків, для обґрунтування оптимального їх складу та вибору технології виробництва, забезпечення якості ліків та зручності їх використання необхідно прогнозувати їх поведінку в такому складному середовищі як живий організм. Внутрішньовенне введення дисперсій передбачає, що полімерні наночастинки вступають в контакт з біологічними рідинами, які містять значну кількість білків, основним з яких є альбумін (у крові 3,3÷4% альбуміну). Здатність його молекул до оборотного зв'язування лігандів різної хімічної структури впливає на їх фізико-хімічні властивості, змінюючи такі

параметри як розмір, поверхневий заряд та функціональність і без сумніву може мати вплив на їх біорозподіл.

Взаємодію наночастинок з білками слід ретельно досліджувати, щоб передбачити всі нові властивості отриманих полімерних комплексів, які можуть стати основою для систем доставки і візуалізації. У зв'язку з цим молекулярні та колоїдно-хімічні аспекти їх взаємодії з білками перебувають в полі зору фахівців, які займаються розробкою нових лікарських препаратів та носіїв.

Метою даного етапу роботи є вивчення змін в деяких колоїдно-хімічних характеристиках водних дисперсій кополієстерів на основі N-ацилпохідних глютамінової кислоти і полієтердіолів, які містять в складі макромолекул флуоресцентні маркери після взаємодії з бичачим сироватковим альбуміном (BSA).

Здатність взаємодіяти з білковими молекулами була виявлена для макромолекул структурних аналогів амфіфільних кополієстерів які флуоресцеїну не містять в умовах гельелектрофорезу. Для прикладу наведено електрофоретичні дослідження рухливості альбуміну в присутності частинок дисперсної фази у поліакриламідному гелі. Видно, що певна частка водорозчинного білка зв'язується частинками кополієстерів (рис 4.31) внаслідок чого їх електрофоретична рухливість зменшується [122].

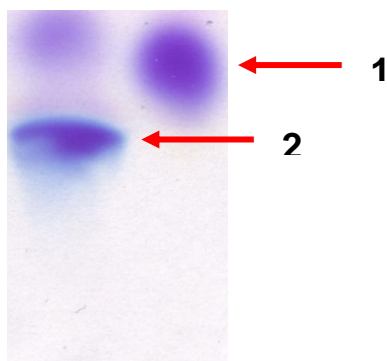


Рис. 4.31. Гельелектрофорез у 5% поліакриламідному гелі (1 – BSA; 2 – BSA у комплексі з кополієстером GluLa-DPG-PEG600-F).

Для виявлення, як саме кополієстери, що містять фрагменти флуоресцеїну взаємодіють з макромолекулами білка, було досліджено зміни гідродинамічного

діаметру наночастинок дисперсій в залежності від вмісту альбуміну в їх колоїдному розчині.

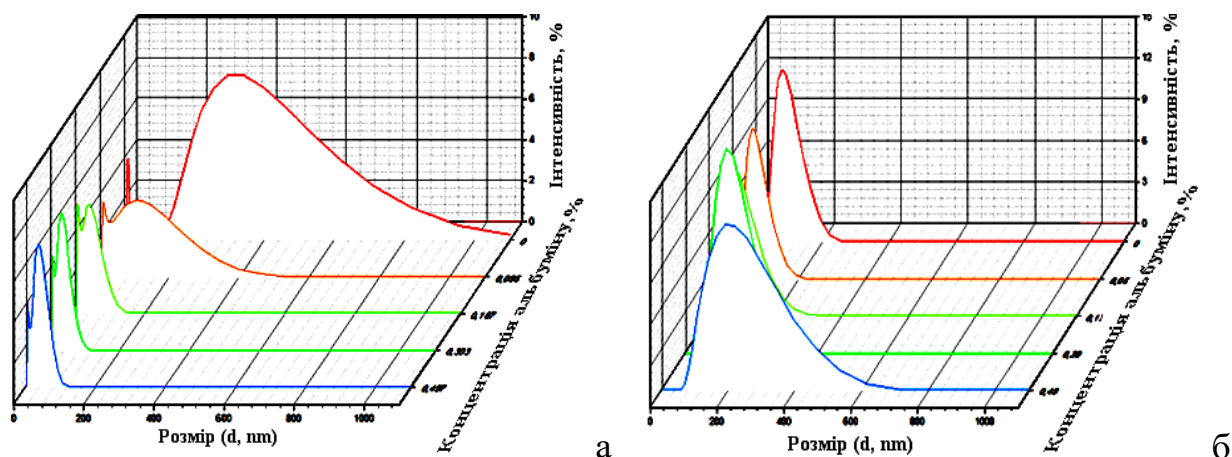


Рис.4.32. Зміни розподілу за розміром дисперсій кополієстерів в залежності від концентрації БСА 37-МФ [GluSt-PEG1000-DPG-F(5,87%)] (а) і 34-МФ [GluLa-PEG1000-DPG-F(5,56%)] (б)

Дослідження проводили при концентрації у розчині 0,14-0,16%, що є значно вище значень ККМ для двох груп кополієстерів синтезованих на основі GluSt і GluLa. Виявлено, що розмір наночастинок кополієстерів суттєво змінюється при їх взаємодії з BSA (рис.4.32). Як видно з рисунка, є значна різниця у розподілах цих кополієстерів в залежності від зростаючої кількості альбуміну. В найбільшій мірі це стосується частинок другої моди у розподілі з розмірами 300-400 нм. Розміри частинок дисперсної фази всіх кополієстерів на основі GluSt незалежно від їх складу в присутності альбуміну зменшуються (рис.4.32а). При концентрації альбуміну нижче 0,05-0,07% у дисперсійному середовищі частинок зменшення їх розмірів ще не спостерігається. При вищих концентраціях альбуміну спостерігається зменшення середнього діаметру частинок і досягає значень близьких до 30-40 нм. Збільшення концентрації альбуміну понад 0,5% уже не впливає на розмір частинок. Такий характер змін свідчить про утворення «шуби» сорбованого білку на поверхні частинок, що надає їм додаткової стабілізації. В такому разі можна вважати, що частинки з розмірами 300-400нм є агрегатами частинок меншого розміру, які при додатковій стабілізації альбуміном дезагрегують з утворенням більшої кількості значно менших частинок. Очевидно,

що частинки розміром 30-40 нм, які уже не здатні до подальшого поділу, поверхня яких покрита стабілізуючим шаром альбуміну і забезпечують максимальні значення його сорбції.

Більш складні залежності спостерігаються для дисперсій кополієстерів на основі GluLa. Для кополієстеру на основі GluLa, який не містить у своєму складі флуоресцеїну в розчині BSA ще явно проявляється залежність схожа з описаною вище (для кополієстерів GluSt) однак інтенсивність цього впливу є значно меншою. Однак для кополієстерів, що містять у складі макромолекул фрагменти флуоресцеїну спостерігається зворотня тенденція – із збільшенням кількості присутнього в розчині альбуміну розміри частинок другої моди збільшуються з 90-200нм до 300-600нм і при цьому суттєво зростає коефіцієнт полідисперсності. В даному випадку спостерігається часткова дестабілізація дисперсної системи, що приводить до агрегування частинок і збільшення їх розмірів (рис.4.32б).

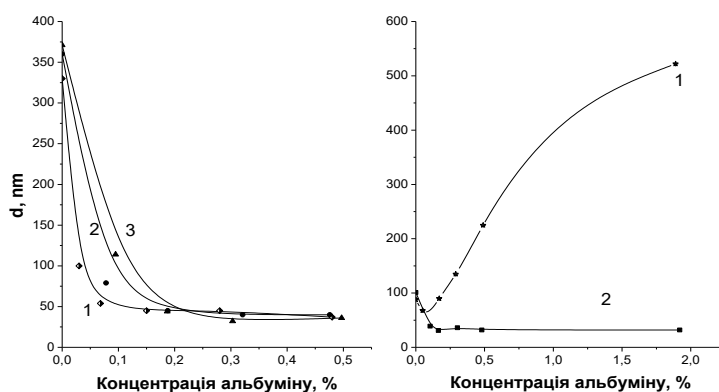


Рис.4.33 Залежність зміни середнього розміру фракції 2 із збільшенням концентрації альбуміну для дисперсій кополієстерів різного складу: (а) на основі GluSt: 1. Glu-St-PEG1000-DPG; 2. Glu-St-PEG1000-DPG-F(2.868%); 3. Glu-St-PEG1000-DPG-F(5.87%); (б) на основі GluLa: 1. GluLa-PEG1000-DPG-F(5.56%); 2. GluLa-PEG1000-DPG

Утворення комплексів з альбуміном та можлива перебудова і зміна морфології частинок приводить до змін у їх діаметрі і збільшення в результаті їх загальної поверхні. Це пояснює збільшення кількості доступних для

гідролітичних взаємодій ланок полімеру з фрагментами флуоресцеїну, які до цього були у внутрішніх областях частинок більшого розміру.

Для кількісної оцінки сорбції альбуміну частинками дисперсної фази кополієстерів було проведено дослідження дисперсної фази, аналізуючи зміни ζ -потенціалу та провідності. Для аналізу до 0.15-0,2% колоїдних розчинів полімерів вносились визначена кількість бичачого сироваткового альбуміну з розчином КСІ при концентрації 4 ммоль/л так, щоб забезпечити задані концентрації компонентів в суміші. В таблиці 4.9 наведені концентрації кожного з компонентів в розчинах, що тестувались та відповідні результати досліджень.

Як видно з наведених результатів, найбільша кількість альбуміну, а саме 60-70% сорбується з розчину вже при його концентрації 0,05-0,07%. При збільшенні концентрації альбуміну, частка його, сорбованого на частинках, зменшується, що пояснюється насиченням поверхні і припиненням процесів, пов'язаних із зменшенням розмірів частинок.

Таблиця 4.9.

Результати ДЛС досліджень характеристик дисперсій кополієстерів за різної концентрації альбуміну

Кополієстер	Концентрація		ζ -потенціал	Провідність, mS/cm	Частка альбуміну сорбованого, %	г сорбованого альбуміну/ г кополієстеру
	кополієстеру,	BSA,%				
GluSt-PEG1000-DPG-F(0)	0,15	0	-8.5	0,167	0	0
	0,15	0,068	-18.4	0,188	60	0.277
	0,15	0,15	-22.1	0,192	35,8	0.365
	0,15	0,28	-21	0,202	26,4	0.496
	0,15	0,48	-22.8	0,228	21,9	0.72
	0,15	1,85	-20.5	0.383	17,36	2.15
GluSt-PEG1000-DPG-F(2.87)	0,146	0	-24.66	0.3	0	0
	0,144	0,078	-23.1	0.33	71,66	0.389
	0.144	0,187	-22.13	0.34	32,16	0.412
	0,146	0,32	-22.36	0.36	20,25	0.444
	0,147	0,476	-22.46	0,38	18,84	0.79

	0,146	1,8	-19.53	0.54	16,6	1.9
GluSt- PEG1000- DPG- F(5.87)	0,158	0	-14,05	0,155	0	0
	0,158	0,096	-24.56	0,185	70,11	0.42
	0,16	0,187	-23.16	0,201	42,23	0.5
	0,16	0,303	-22.56	0,209	31,01	0.59
	0,161	0,497	-23.96	0,232	23,93	0.74
	0,158	1,91	-22.53	0.291	6,6	0.837
GluLa- PEG1000- DPG-F(0)	0,152	0	-17.97	0,186	0	0
	0,152	0,104	-18.8	0,199	4,5	0.03
	0,153	0,165	-22.66	0,21	6,96	0.074
	0,153	0,303	-22.76	0,224	8,91	0.176
	0,155	0,484	-23.13	0,252	9,78	0.309
	0,155	1,92	-15.83	0.416	10,87	1.37
GluLa- PEG1000- DPG-F (5,56)	0,159	0	-14,5	0,169	0	0
	0,163	0,0535	-17,4	0,177	4,63	0,015
	0,163	0,1727	-19,5	0,193	1,34	0,014
	0,165	0,2898	-17,7	0,208	0,74	0,013
	0,165	0,4895	-15,4	0,239	0,39	0,0116
	0,163	1,89	-12,4	0,424	0,008	-

Альбумін, як відомо, краще зв'язує довголанцюгові жирні кислоти з кількістю атомів вуглецю $C_{16}\div C_{18}$ і практично не зв'язує їх гомологи з C_8 [158]. Можна припустити, що суттєве зменшення сорбції альбуміну кополіестерами, які синтезовані на основі GluLa, яка містить залишок додеканоїлової кислоти (C_{12}) пов'язана саме із пониженням гідрофобних сил взаємодії з відповідними фрагментами макромолекули альбуміну. Кількість сорбованого альбуміну частинками дисперсій кополіестерів GluLa практично на порядок нижча ніж для кополіестерів GluSt (табл. 4.9).

Аналіз впливу флуоресцеїну на сорбцію частинками кополіестерів на основі GluSt дозволяє стверджувати, що в загальному збільшення вмісту флуоресцеїну зменшує сорбцію альбуміну, яка є максимальною для кополіестеру, який флуоресцеїну не містить (Табл.4.9.). Цей факт добре корелює із залежністю розмірів частинок від вмісту альбуміну для кополіестерів на GluSt, в яких міститься різна кількість флуоресцеїну (Рис.4.33). Видно, що збільшення кількості

флуоресцеїну в кополієстері зменшує вплив альбуміну на зміни у розмірах частинок.

Кількість фрагментів флуоресцеїну, які містяться в макромолекулах кополієстерів має для частинок кополієстеру на основі GluLa ще більш виражену дію. Очевидно, що флуоресцеїн при його наявності у макромолекулах кополієстерів в основному перешкоджає зв'язуванню альбуміну з частинками, створюючи стеричні перешкоди для такої взаємодії.

Як уже зазначалось вище, дослідження біорозподілу компонентів систем транспорту ліків в модельних системах є важливим етапом при створенні та визначенні ефективності засобів доставки ліків, які зможуть досягати місця ураження проникаючи крізь біологічні бар'єри. Тому проведення перерозподілу в присутності альбуміну дає можливість оцінити ступінь його впливу на цей показник і прогнозувати поведінку кополієстерів в умовах використання в біологічних середовищах. Результати цих досліджень наведені в таблиці 4.10.

Як видно з результатів, наведених у таблиці, отримані кополієстери як у вільному стані, так і в комплексі з альбуміном мають здатність до перерозподілу з води в модельне середовище *n*-октанолу. При цьому альбумін незначно, але впливає на колоїдно-хімічні властивості кополієстерів. Помітне у всіх випадках збільшення значень їх ГЛБ, визначених експериментально через коефіцієнт розподілу, означає підвищення їх гідрофільності. Цей факт є доволі очікуваним оскільки альбумін будучи водорозчинним транспортним білком додатково стабілізує частинки кополієстеру у водному середовищі і покращує їх спорідненість до гідрофільної фази. Проте відхилення від діапазону значень ГЛБ, отриманих для дисперсій кополієстерів у присутності альбуміну, складає не більше 10%, що вказує на доволі незначний вплив альбуміну. Очевидно, за відсутності в макромолекулах кополієстеру іоногенних груп взаємодія з альбуміном визначається не надто сильними гідрофобними взаємодіями, які в присутності октанолу легко руйнуються.

Варто зазначити, що згідно отриманих даних спостерігається більш сильна взаємодія альбуміну з кополієстерами на основі GluSt у порівнянні з їх аналогами

на основі GluLa (табл.4.10), про що свідчить більша статистично значима зміна їх ГЛБ.

Здатність синтезованих кополієстів у комплексі з альбуміном до розподілу між водною та ліпофільною фазами у близьких співвідношеннях дає підстави вважати їх перспективною основою для систем доставки ліків, які завдяки фрагментам флуоресцеїну здатні до їх візуалізації, що дає можливість розробляти нові діагностичні наноінструменти.

Важливо було також дослідити, який вплив має альбумін на процеси гідролізу кополієстеру і вивільнення флуоресцеїну з наночастинок.

Таблиця 4.10

Біорозподіл кополієстерів та комплексів кополієстер-альбумін

Кополієстер	Вміст. Ф в полімері, %	K _{o/w}		Lg K		ГЛБ за формулою Девіса	
		Д*	ДА**	Д	ДА	Д	ДА
BSA***	0	0,0085		-2,07		8,71	
[GluLa] _{0,5} -[PEG400] _{0,282} - [DPG] _{0,195} -[F] _{0,025}	5,53	2,03	0,63	0,3	-0,197	6,74	7,16
[GluLa] _{0,5} -[PEG600] _{0,232} - [DPG] _{0,177} -[F] _{0,11}	13,07	1,9	0,88	0,28	-0,056	6,77	7,05
[GluLa] _{0,5} -[PEG1000] _{0,3} - [DPG] _{0,172} -[F] _{0,05}	3,75	1,45	0,4	0,163	-0,39	6,86	7,32
[GluLa] _{0,5} -[PEG1500] _{0,286} - [DPG] _{0,187} -[F] _{0,035}	3,18	2,34	0,727	0,37	-0,14	6,7	7,11
[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,325} - [DPG] _{0,18}	0	0,06		-1,19		7,9	
[GluSt] _{0,5} -[PEG600] _{0,269} - [DPG] _{0,183} -[F] _{0,055}	4,03	2,2	1,39	0,34	0,14	6,71	6,88
[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,31} - [DPG] _{0,15} -[F] _{0,037}	2,87	2,08	0,28	0,32	-0,55	6,74	7,45
[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,258} - [DPG] _{0,162} -[F] _{0,05}	5,87	0,68	0,126	-0,16	-0,898	7,13	7,74

[GluSt] _{0.5} -[PEG1500] _{0.302} - [DPG] _{0.119} -[F] _{0.062}	2,4		0,416		-0,38		7,31
--	-----	--	-------	--	-------	--	------

Д* дисперсія без альбуміну

ДА** - дисперсія в присутності альбуміну

***- літературні дані [159]

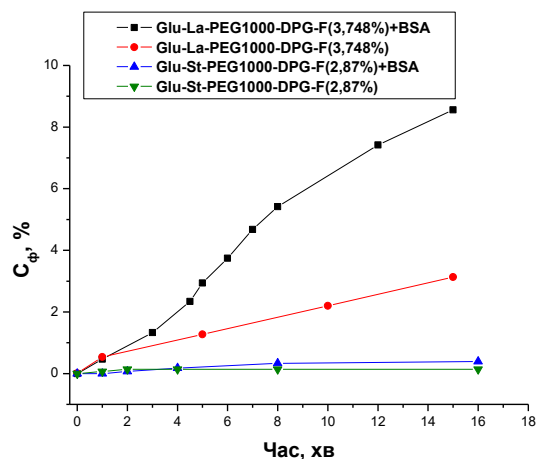


Рис.4.34. Спонтанний гідроліз кополієстерів різного складу та їх комплексів з альбуміном.

Спонтанний гідроліз кополієстерів та комплексів кополієстер-альбумін з вивільненням флуоресцеїну досліджували, визначаючи зміну оптичної густини розчинів у буферному середовищі з рН=7,45 яке є характерним для крові. Як видно з рис.4.34, присутність альбуміну збільшує швидкість гідролізу флуоресцеїнівмісних кополієстерів. Тобто альбумін, зв'язуючись з гідрофобними фрагментами макромолекул, збільшує їх доступність для гідролізу і зменшує захисну роль гідратованої поліоксиетиленової оболонки на поверхні частинок. Однак в загальному ці значення є меншими у порівнянні з швидкістю гідролізу відомих естерів флуоресцеїну, які використовуються в біомедичних дослідженнях [160].

На підставі отриманих даних можна вважати, що альбумін зв'язуючись з амфифільними кополієстерами за допомогою гідрофобних взаємодій утворює агрегати, які є більш гідрофільним у порівнянні з самими кополієстерами, про що свідчить невелике збільшення їх ГЛБ, визначене за коефіцієнтом розподілу в присутності альбуміну.

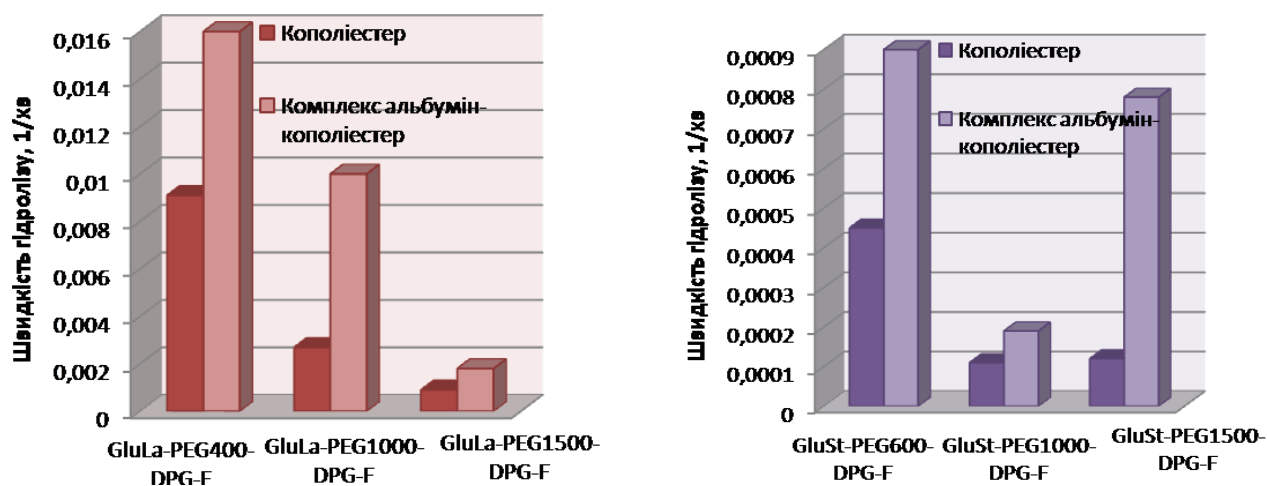


Рис.4.35. Швидкість гідролізу кополієстерів та комплексів кополієстер-альбумін з вивільненням флуоресцеїну.

Очевидно, що зміна морфології частинок при зв'язуванні з альбуміном призводить до прискорення гідролізу у випадку кополієстерів на основі GluLa в 1,5-4 рази в той час як для кополієстерів на основі GluSt цей параметр збільшується в 2,5-6,5 разів (рис 4.35). Це корелює з більш суттєвими змінами розмірів частинок у дисперсіях кополієстерів на основі GluSt у присутності альбуміну та вищими значеннями їх сорбційних характеристик [161].

Розділ 5. Напрямки практичного застосування одержаних амфіфільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів

Розроблені в межах даної роботи амфіфільні кополієстери похідних природних двоосновних амінокислот з поліетердіолами і флуоресцеїном утворюють у воді стабільні нанорозмірні дисперсії, і їх використання передбачається як засобів біохімічного та біомедичного спрямування. В даному розділі викладено результати, в яких продемонстровано перспективність флуоресцеїнвмісних кополієстерів в дослідженнях *in vitro*.

5.1. Нові олігомерні похідні флуоресцеїну як перспективні засоби для створення діагностикумів в біохімічних дослідженнях

Використання полімерних матеріалів є сьогодні одним з найбільш перспективних напрямків розвитку нанотехнологій, що пов'язано із створенням систем доставки та вивільнення лікарських засобів в організмі. В останній час ці системи суттєво ускладнюються і повинні виконувати, окрім функції доставки, також і інші завдання, такі наприклад, як активне націлювання, можливість візуалізації, магніто- та/або фоточутливість. З цієї позиції полімери є зручним об'єктом досліджень, адже, формуючи певну структуру макромолекули через природу її структурних одиниць та функціональність, створюються можливості управління їх хімічними, колоїдно-хімічними, оптичними та іншими властивостями. Нові амфіфільні кополієстери N-ацилпохідних глютамінової кислоти та поліетердіолів, утворюючи самостабілізовані міцелярні розчини у водних середовищах, можуть розглядатися як основа для створення систем транспорту ліків [129]. Введення фрагментів, здатних до флуоресценції, в такі полімери розширює можливості їх використання, оскільки дозволяє візуалізувати їх місцезнаходження, а також досліджувати процеси, пов'язані з ферментативною активністю клітинних органел [129]. Кополієстери здатні гідролітично розщеплюватися (в тому числі під дією ензимів живої клітини), і в результаті вивільнення фрагменту флуоресцеїну з латентного стану стає можливим

проведення спостережень за здатністю макромолекул кополіестеру до взаємодії з клітинними мембранами і проникнення через них всередину клітин. Висока інтенсивність флуоресценції в діапазоні довжин хвиль видимого світла, яка характерна для флуоресцеїну, відсутність власної флуоресценції тканин у діапазоні довжин хвиль максимуму його випромінювання дозволяє легко проводити візуальний мікроскопічний контроль цього процесу.

5.1.1. Вивчення цитотоксичності кополіестерів

Основними вимогами до матеріалів, для яких передбачається прямий контакт з тканинами живих організмів, в першу чергу, є їх нетоксичність і біологічна сумісність. Тому першочерговим завданням є прогнозування та експериментальна оцінка їх впливу на організм та його складові. Одним зі способів прогнозування та оцінювання речовин різного походження є встановлення їх впливу на процеси метаболізму живих клітин та їх життєздатність *in vitro*. Можливість прижиттєвого спостереження за допомогою мікроскопування робить культури живих клітин зручною моделлю для проведення досліджень у галузі біології, медицини, фармакології та косметології. Першим етапом таких досліджень, як правило, є спостереження за змінами у життєдіяльності модельних клітин, таких, наприклад, як живі статеві клітини (спермії). Розроблені в Інституті біології тварин м.Львів, методики дозволяють виявляти зміни у перебігу обмінних процесів у них та їх життєздатність у відповідь на дію доданих фармакологічних й інших чинників [162].

Метою досліджень, наведених в даному розділі, було вивчити цитотоксичність амфифільних кополіестерів на основі N-похідних глутамінової кислоти та поліетердіолів, макромолекули яких містять ковалентно зв'язаний флуоресцеїн *in vitro*. А також оцінити здатність амфифільних кополіестерів до проникнення в клітину і можливість забезпечення контролю за цим процесом використовуючи ефект люмінесценції флуоресцеїну, який вивільнився внаслідок гідролітичних процесів розкладу кополіестеру всередині клітини.

Полімери, які містять гідрофобні та гідрофільні фрагменти, (Рис.4.2) закономірно відносяться до сполук амфифільної природи. Це полімерні поверхнево-активні речовини неіоногенного типу, які у водних середовищах понижають поверхневий натяг та утворюють самостабілізовані дисперсії з частинками нанометричних розмірів (див. Розділ 4).

Відомо, що полімери неіоногенної природи проявляють значно нижчі рівні токсичності по відношенню до живих клітин, аніж амфифільні іоногенні сполуки. Варто зауважити, що згідно даних FDA поліетердіоли, які є структурними одиницями кополієстерів, цитотоксичності не проявляють і допущені до використання без обмежень в харчових і медичних цілях. Тому окремих досліджень їх цитотоксичності не проводилося.

Об'єктами дослідження були дві групи амфифільних кополієстерів (рис.5.1), які синтезовані на основі різних за ліпофільністю N-похідних глютамінової кислоти: 2-(додеканоїламіно)пентандіової (GluLa) і 2-(октадеканоїлоїламіно)пентадіонової (GluSt). У кожній групі кополієстери відрізнялися молярною масою поліетиленетердіолів (PEG400, PEG 600, PEG1000, PEG1200, PEG1500) та вмістом флуоресцеїну. Для порівняння досліджувались кополієстери аналогічного складу, але які не містили в своєму складі ланок флуоресцеїну. Естерний характер зв'язків у полімерах передбачає можливість його гідролітичної деструкції, особливо в присутності ензимів, тому окремо тестувались кислоти, які є мономерними ланками у кополієстерах, та флуоресцеїн, а також кополієстер флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентандіовою кислотою (MD-2.0).



Рис.5.1. Дисперсії кополієстерів на основі різних N-похідних глютамінової кислоти.

Вибрані кополіестери мають доволі значні відмінності у співвідношенні величини їх гідрофільних і гідрофобних складових. Це відповідно відображається в значеннях їх гідрофільно-ліпофільного балансу (HLB), які знаходяться в широкому діапазоні від 2 до 10 (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Структура та колоїдно-хімічні властивості флуоресцеїнівмісних кополієстерів

N п/п	Шифр зразка	Структура кополієстеру	Вміст флуоресцеїну, %	HLB розрахований за ф-лою Девіса	С _{ККМ} , %	С _{ККА} , %	Молекулярна маса, М _{псер}
1	GluL	GluL	0	4,44	-	-	329.4
1.1	46-MF	[GluL] _{0,5} -[PEG1500] _{0,287} -[DPG] _{0,186} -[F] _{0,035}	3.18	8,87	0,0095	0,108	7320
1.2	34-MF	[GluL] _{0,5} -[PEG1000] _{0,26} -[DPG] _{0,185} -[F] _{0,075}	5.56	8,27	0,0105	-	5330
1.3	33-MF	[GluL] _{0,5} -[PEG1000] _{0,3} -[DPG] _{0,17} -[F] _{0,05}	3.75	8,68	0,0093	0,093	5845
1.4	27-MF	[GluL] _{0,5} -[PEG600] _{0,26} -[DPG] _{0,206} -[F] _{0,067}	5.2	7,096	0,0069	0,0403	4340
1.5	35-MF	[GluL] _{0,5} -[PEG400] _{0,29} -[DPG] _{0,19} -[F] _{0,015}	2.7	6,86	0,028	-	3770
1.6	45-MF	[GluL] _{0,5} -[PEG1000] _{0,315} -[DPG] _{0,207}	0	9,53	0,0095	0,45	7070
2.	GluSt	GluSt	0	1,81	-	-	413.6
2.1	47-MF	[GluSt] _{0,5} -[PEG1500] _{0,3} -[DPG] _{0,119} -[F] _{0,062}	2,4	7,68	0,007	0,065	7750
2.2	F-4	[GluSt] _{0,5} -[PEG1200] _{0,33} -[DPG] _{0,16} -[F] _{0,012}	0,55	7,23	0,05	0,17	6240
2.3	38-MF	[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,31} -[DPG] _{0,15} -[F] _{0,037}	2,87	6,71	0,0128	0,236	5750
2.4	37-MF	[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,258} -[DPG] _{0,162} -[F] _{0,05}	5,87	6,3	0,0052	0,031	6150

2.5	40-MF	[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,325} - [DPG] _{0,18}	0	8,44	0,0109	0,084	8180
3	F	Флуоресцеїн	99	3,618	-	-	332.3
4	МД- 2.0	[GluSt] _{0,5} -[F] _{0,52}	56	4,21	-	-	2570

Відповідні дози дисперсій кополієстерів вводилися у приготовані згідно методики 2.3.17 еякуляти бугая для створення їх заданих концентрацій, і визначалася життєздатність клітин у їх присутності за період тривалістю 72 год у порівнянні з контрольними тестами, у які у відповідних кількостях добавлялась дистильована вода.

Залежність кількості клітин, що вижили, від концентрації полімера описується S подібною кривою, як показано на прикладі визначення цитотоксичності кополієстеру 40МФ (рис. 5.2). Цитотоксичність сполук можна характеризувати їх концентрацією, при якій гине 50% клітин (C_{50}), оскільки це величина, яка найбільш точно визначається на S подібній кривій.

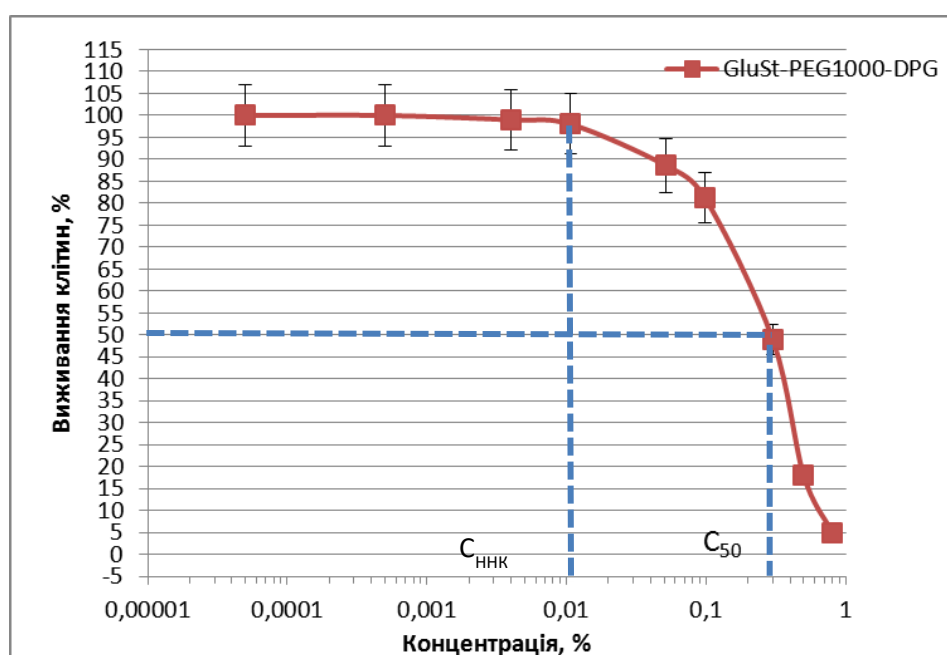


Рис.5.2. Залежність кількості клітин, що вижили від концентрації кополієстеру 40МФ з вказаними найбільшою недіючою концентрацією $C_{ннк}$ і концентрацією половинного виживання клітин C_{50} .

Однак для подальшого вивчення здатності кополімерів взаємодіяти з клітинами, необхідно було створювати їх концентрації, при яких вони не мають токсичної дії, щоб забезпечити максимальну кількість живих клітин, які поступають на дослідження, пов'язані з виявленням флуоресценції після проникнення в них макромолекул флуоресцеїнвмісних кополієстерів. Тому при аналізі впливу полімерів було також оцінено діапазон їх концентрації, в якому вони не проявляють або мають мінімальну власну цитотоксичність. У якості такої характеристики була обрана максимальна концентрація полімеру, яка ще не викликає загибелі клітин - найбільшу нетоксичну концентрацію ($C_{\text{ннк}}$). Її визначали як концентрацію, перевищення якої супроводжувалося різким зниженням кількості живих клітин (рис. 5.2).

Таблиця 5.2

Значення найбільшої нетоксичної концентрації кополієстерів $C_{\text{ннк}}$ та концентрація при якій спостерігається загибель половини клітин C_{50} в залежності від структури та складу кополієстерів

№п/п	Шифр кополієстеру	Кислота	ММ PEG	Вміст Φ , %	$C_{\text{ннк}}$, %	C_{50} , %
1	46-MF	GluL	1500	3,18	0,027	0,13
2	34-MF		1000	5,56	0,017	0,11
3	33-MF		1000	3,75	0,022	0,13
4	27-MF		600	5,2	0,0063	0,078
5	35-MF		400	2,7	0,0013	0,03
6	45-MF		1000	0	0,018	0,13
7	МД-2.0		-	56	0,0001	0,009
8	GluL				0,002	0,022
9	47-MF	GluSt	1500	2,4	0,0109	0,4
10	F-4		1200	0,55	0,0106	0,30
11	38-MF		1000	2,87	0,006	0,11
12	37-MF		1000	5,87	0,004	0,11
13	40-MF		1000	0	0,011	0,28

14	GluSt				0,002	0,015
15	Fluorescein				0,0001	0,0078
16	29-MF	GluSt	600	4.03	0.055 (0,046*)	

*- значення розраховане за формулою 5.2

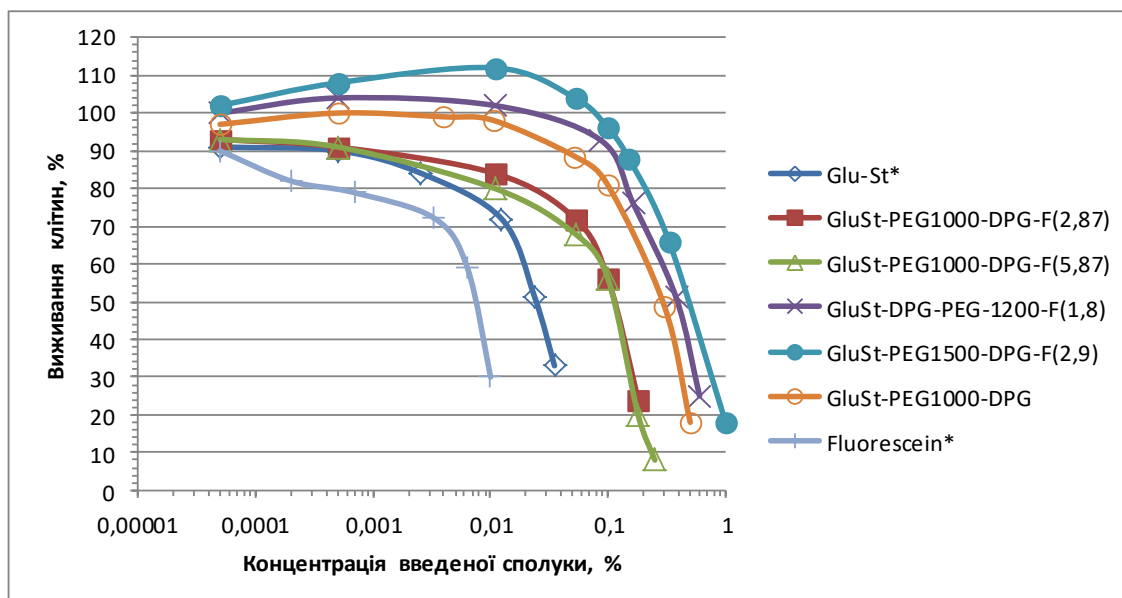


Рис. 5.3. Залежність кількості клітин, що вижили від концентрації кополіестеру на основі 2-(октадеканоїлоїламіно)пентадіонової (GluSt) кислоти.

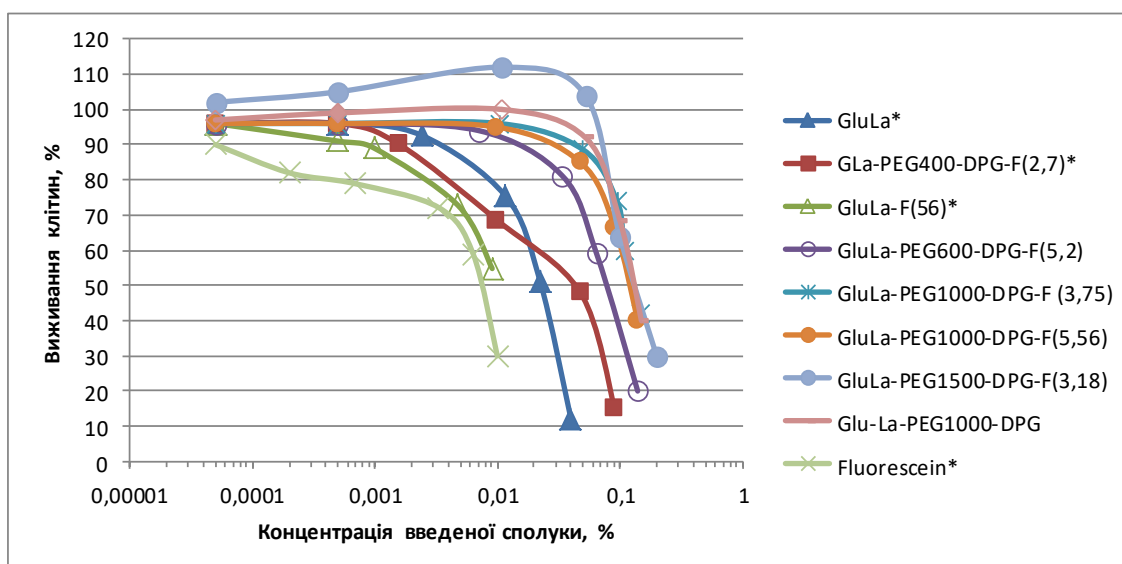


Рис. 5.4. Залежність кількості клітин, що вижили від концентрації кополіестерів на основі 2-(додеканоїламіно)пентадіонової (GluLa) кислоти.

Так, $C_{\text{HНК}}$ кополіестеру 40МФ, який не містив флуоресцеїну і вирізнявся високим рівнем виживання клітин, складала $C_{\text{HНК}}=0,011\pm 0,003\%$, а C_{50} становила $0,28\pm 0,04\%$.

Використовуючи таку методику було охарактеризовано всі кополіестери, а також їх найбільш впливові складові, які можуть вивільнятися при їх гідролізі.

При аналізі отриманих результатів можна зробити висновок, що найбільш сильний негативний вплив на клітини, якщо судити по значеннях $C_{\text{HНК}}$, мають гідрофобні складові кополіестерів у вільному стані. Їх токсична дія спостерігається уже при найменших досліджуваних концентраціях. Причому як видно з рис.5.3 і рис.5.4, що також впливовим на виживання клітин є присутність флуоресцеїну. Близьким до нього по дії на живі клітини є кополіестер МД-2.0, макромолекули якого містять тільки флуоресцеїн і GluLa. Продовжують цей ряд менш токсичні мономерні GluSt і GluLa, а кополіестери, які містять також і поліоксиетиленові фрагменти характеризуються уже значно меншим рівнем токсичності. Причому видно, що зростання величини поліетиленгліколю приводить до зменшення токсичності отриманих продуктів. Для обидвох груп кополіестерів, які синтезовані з використанням GluSt і GluLa мінімальну токсичну дію мають кополіестери 47-MF і 46-MF з максимальною (PEG 1500) величиною гідрофільної складової у їхньому складі. Для цих кополіестерів при їх невисокій концентрації спостерігається ефект протилежний до токсичності, який проявлявся у збільшенні клітин, які вижили у порівнянні з контролем. Подібні залежності були виявлені при додаванні водорозчинних кополімерів також для найбільш поширених амфифільних триблоккополімерів поліпропілену і поліетилену торгової марки «Pluronic», які широко досліджуються для використання в медико-біологічних цілях. Є підтвержені літературні дані про те, що високогідрофільні полімери цього типу можуть відігравати захисну функцію при контакті з клітинами. Наприклад полімер Pluronic F68, який містить у своєму складі фрагменти поліетергліколю з $MM=3200$ у зв'язку з його яскраво вираженими захисними властивостями по відношенню до клітин запропоновано використовувати в якості кріопротекторного компонента середовищ для

заморожування клітин, а також у складі емульсій для низькотемпературного консервування органів і тканин [163,164]. В даному випадку очевидно використовується здатність поліетерних фрагментів полімеру зв'язувати значну кількість молекул води, і внаслідок цього в мікрооточенні клітин при кріоконсервуванні кристалізація води не відбувається, що запобігає руйнуванню клітинних мембран. Крім того, ця властивість може бути обумовлена також збільшенням еластичності клітинної мембрани і полегшувати процес її відновлення після пошкоджень, викликаних процесами заморожування - відтавання. Здатність гідрофільних полімерів цього типу збільшувати міцність і еластичність клітинних мембран пояснює їх успішне використання при лікуванні опікових ран при зовнішньому застосуванні [165, 166]. Наприклад використання Pluronic F127 на ранній стадії опікових уражень стимулює зростання епітеліальної тканини і значно прискорює процес загоєння ран [167].

Можна стверджувати, що кополіестери N-ацилпохідних глутамінової кислоти, які було синтезовано з використанням поліетердіолів молекулярною масою понад 1000, при контакті із статевими клітинами також виконують певну захисну функцію. Це проявляється у збільшенні кількості клітин, які вижили у діапазоні концентрацій C_{HNC} на 10-20% у порівнянні з контролем, у який полімери не вводилися взагалі рис.5.3 і 5.4 46-MF, 47-MF.

Серед ряду кополіестерів, які досліджувалися, максимальна токсична дія виявлена для продукту 35-MF, який синтезовано з використанням низькомолекулярного поліетердіолу PEG400. Така залежність (збільшення цитотоксичності із зменшенням величини молекулярної маси гідрофільного поліетерного фрагменту у кополімері) співпадає з даними літератури щодо токсичності триблоккополіестерів Pluronic [168].

Таким чином, оскільки спостерігається залежність як від гідрофобної, так і від гідрофільної складових макромолекул, можна припустити, що існує кореляція з гідрофільно ліпофільним балансом (HLB) кополіестерів. Використовуючи дані, які наведені в розділі 4 щодо HLB кополіестерів, було побудовано залежність їх концентрації, при якій виживає 50% клітин C_{50} від HLB (Рис.5.5). Отримані

залежності для кополієстерів кожної групи (Табл.5.2) можуть бути описані наступними рівняннями:

$$\text{Кополієстери GluL: } C_{50} = 0,0027 * e^{0,5637 * \text{HLB}}. \quad (5.1)$$

$$\text{Кополієстери GluSt: } C_{50} = 0,0016 * e^{0,5003 * \text{HLB}} \quad (5.2)$$

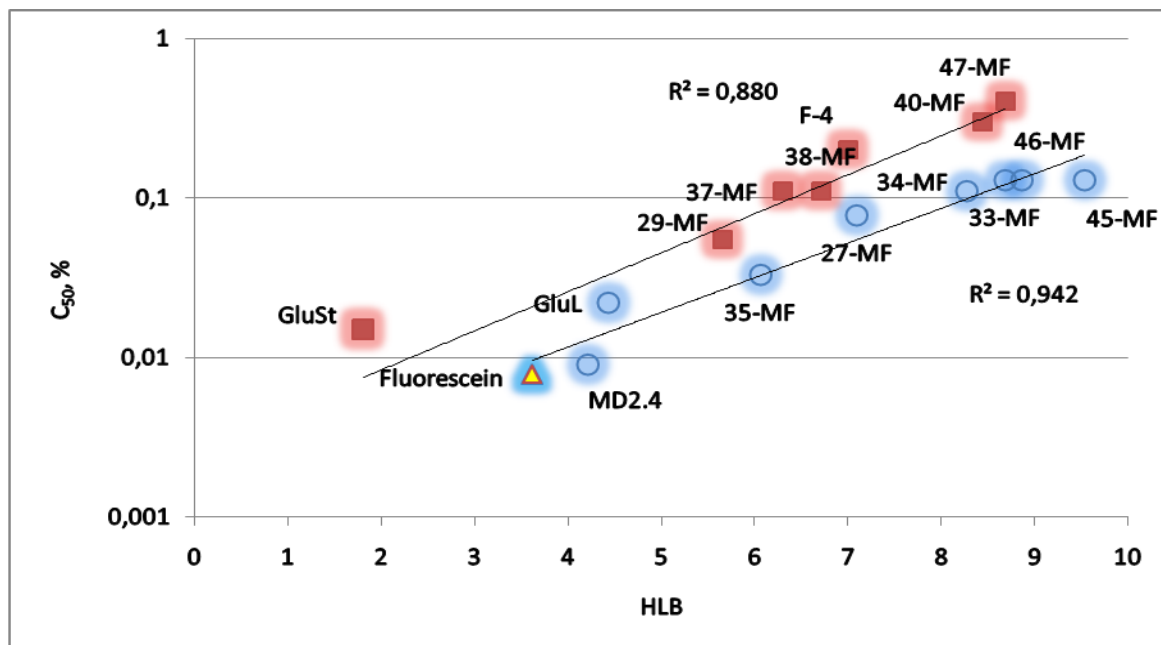


Рис. 5.5 Залежність концентрації сполук при якій спостерігається виживання 50% клітин (C_{50}) від HLB.

Про прямий зв'язок між гідрофільно-ліпофільним балансом полімеру і його цитотоксичністю свідчить задовільна кореляція між значеннями C_{50} і HLB полімерів в логарифмічних координатах ($R^2 = 0,88$ для кополієстерів GluSt і $R^2=0.94$ для кополієстерів GluLa).

Використання отриманих виразів дозволяє розрахувати орієнтовні значення концентрації половинного виживання клітин C_{50} при використанні кополієстерів N-заміщених двоосновних кислот з поліетердіолами та флуоресцеїном. Можливість попереднього розрахунку діапазону концентрацій, при яких спостерігається токсична дія, істотно прискорює експериментальне визначення C_{50} для нового полімеру у цих рядах. Зазвичай таке дослідження є доволі тривалим, оскільки в силу варіабельності цього параметра для різних полімерів його визначення вимагає проведення 3 - 4 дослідів. Однак після попереднього розрахунку C_{50} , є достатньо одного експерименту для перевірки і поточнення цієї

характеристики полімеру. Для прикладу значення C_{50} розраховані за рівнянням 5.2 для кополіестеру 29-MF (GluSt-PEG600-DPG-F) складає 0,046%, для якого величину HLB наведено в розділі 4 табл.4.6. А за результатами дослідження цитотоксичності значення C_{50} для цього кополіестеру складає 0,055%. Отримано доволі близькі величини, що свідчить про те, що характеристики C_{50} , отримані через розрахунок, відтворюють залежність отриману з експериментальних даних.

Добре узгоджуються також дані, отримані для мономерних GluSt і GluLa, які можуть бути метаболітами при біодеструкції кополіестерів. Стеароїлглутамінова кислота GluSt, як сполука найбільш гідрофобна в даній системі, проявляє і максимальні значення C_{50} . Лауроїлглутамінова кислота GluLa відповідно менш гідрофобна і закономірно менш цитотоксична. Однак у складі кополіестерів ця тенденція дещо порушується. Можна відмітити, що зміна величини гідрофобного фрагмента у синтезованих кополіестерах має неоднаковий вплив на значення їх $C_{\text{ннк}}$ і C_{50} . Це добре видно для найбільш гідрофільних кополіестерів, отриманих з використанням PEG1200 і 1500. Якщо концентрація половинного виживання C_{50} є приблизно однаковою для двох груп полімерів аналогів, які відрізняються гідрофобною мономерною ланкою кислот GluSt і GluLa і лежить в межах 0,1-0,4%, то значення найбільшої недіючої концентрації $C_{\text{ннк}}$ для всіх кополіестерів GluLa є приблизно в два рази більші за цю характеристику кополіестерів GluSt.

Проте не все так однозначно, якщо брати ці ж параметри в залежності від HLB, то можна виявити цілком протилежну картину. І це можна прослідкувати за даними рис. 5.5 де наведено концентрація половинного виживання клітин C_{50} в залежності від параметра, який визначається співвідношенням гідрофільної і гідрофобної складових макромолекул. У протипагу до очікуваного так представлені дані демонструють слабо визначену, але все ж характерну тенденцію - для всіх кополіестерів GluSt концентрація C_{50} має вищі значення, аніж для кополіестерів GluLa. Цей висновок входить також в суперечність з закономірністю виявленою для блоккополімерів Pluronic, для яких збільшення

величини гідрофобного блоку поліпропіленоксиду підвищує рівень їх токсичності для клітин [168].

Аналіз результатів щодо цитотоксичності кополієстерів не може бути повним без висвітлення впливів флуоресцеїну. Флуоресцеїн у вигляді діаніону (Уранін А) доволі широко використовується для різноманітних медико-біохімічних досліджень і вважається, що він не проявляє цитотоксичних властивостей. Наприклад його введення в організм (в кров чи певні тканини), дозволяє з'ясувати проникність судин, кровопостачання у різних ділянках шкіри при її трансплантації тощо [169].

Проте отримані дані свідчать про те, що флуоресцеїн, який знаходиться в контакті з живими статевими клітинами все ж проявляє до них цитотоксичні властивості. Про це свідчить його невеликі концентрації $C_{\text{ннк}}$ і C_{50} при тестуванні на виживання спермійв. Цей факт хоча і узгоджується з невисоким НЛВ флуоресцеїну, проте варто брати до уваги також і інші механізми, які очевидно посилюють взаємодію такої функціональної молекули з клітиною. Флуоресцеїн містить йоногенні групи - карбоксильну ($pK_a \approx 4$) і гідроксильні ($pK_a \approx 6,5$) і може ефективно зв'язуватися з транспортними білками, які виконують в клітині функцію перенесення негативно заряджених кислот (α -кетоглютарової, глутамінової, аспарагінової) [170, 171]. Разом з тим флуоресцеїн, який міститься як мономерна ланка у складі макромолекул уже такого впливу не має. Строго визначеної залежності виживання від його вмісту в полімерах виявити не вдалося проте важливо, що кополієстери, які містять флуоресцеїн проявляють значно нижчі рівні цитотоксичності (вищі значення C_{50}) при порівнянні їх впливу з такою ж концентрацією флуоресцеїну у вільному стані.

Слід зазначити, що відомості про цитотоксичність навіть для таких поширених і досліджуваних полімерів як блоккополімери «Pluronic» мають в літературі фрагментарний характер. Спостерігається суттєвий розкид результатів цього аналізу для одного і того ж кополімеру згідно різних літературних джерел. Це очевидно обумовлено різними умовами, в яких проводилися експерименти. Одна з основних відмінностей полягає у тривалості інкубування клітин з

полімером [172, 173]. Відповідно мінімальна токсична концентрація $C_{\text{ннк}}$ блоккополімеру P85 яка рівна 0,001% була визначена як і в нашому випадку, при інкубуванні в його присутності впродовж 72 год., тоді як в більшості випадків, інкубування з полімерами проводиться 1 год після чого середовище замінюється на живильне і спостереження ведуться на протязі тих же тьох діб [174]. Крім того нема сумніву, що різні типи клітин, які використовуються в різних дослідженнях, можуть по різному реагувати на присутність ксенобіотиків, тому порівнювати дані, отримані для різних полімерів є доволі складно. Проте для полімеру P85 (HLB=16 за даними виробника), який тестувався у схожих умовах видно, що кополіестери N-ацилпохідних глутамінової кислоти, навіть ті, які мають HLB значно нижчі (HLB =5÷7), характеризуються схожими значеннями $C_{\text{ннк}}$, а кополіестери у яких проявляється захисна функція (HLB=8÷10), переважають його за цією характеристикою практично на порядок (Табл 5.2).

Таким чином, проведений аналіз цитотоксичності кополімерів різного складу, показав, що їх вплив на статеві клітини визначається загальним співвідношенням ліпофільної і гідрофільної складових у макромолекулі. Ця закономірність добре узгоджується з класичними роботами Hansch С., який на прикладі великої кількості органічних сполук показав, що токсичність речовин корелює з їх коефіцієнтом розподілу в системі октанол/вода і відповідно HLB сполуки (див. розділ 4) [175,176].

5.1.2.Зв'язок фізико-хімічних властивостей кополіестерів з їх цитотоксичністю

При розгляді взаємозв'язку між структурою полімеру, його фізико-хімічними властивостями і цитотоксичністю важливим було встановити, в якій формі полімер є токсичним для клітин - у вигляді унімерних макромолекул чи міцелярних агрегатів. Для відповіді на це питання було співставлено значення $C_{\text{ккм}}$ полімерів і їх концентрації, вище яких вони стають токсичними для клітин ($C_{\text{ннк}}$).

Для прикладу на рис.5.6 наведено співставлення кривої виживання клітин з ізотермою поверхневого натягу для кополіестеру 33-MF. З наведених даних добре

видно, що після досягнення концентрації, яка відповідає $C_{\text{ККМ}}$ настає лавиноподібне зменшення кількості клітин, які вижили. Цей результат свідчить про те, що цитотоксичність цього полімеру проявляється у концентрації, при якій у розчині відбувається масове утворення його міцел.

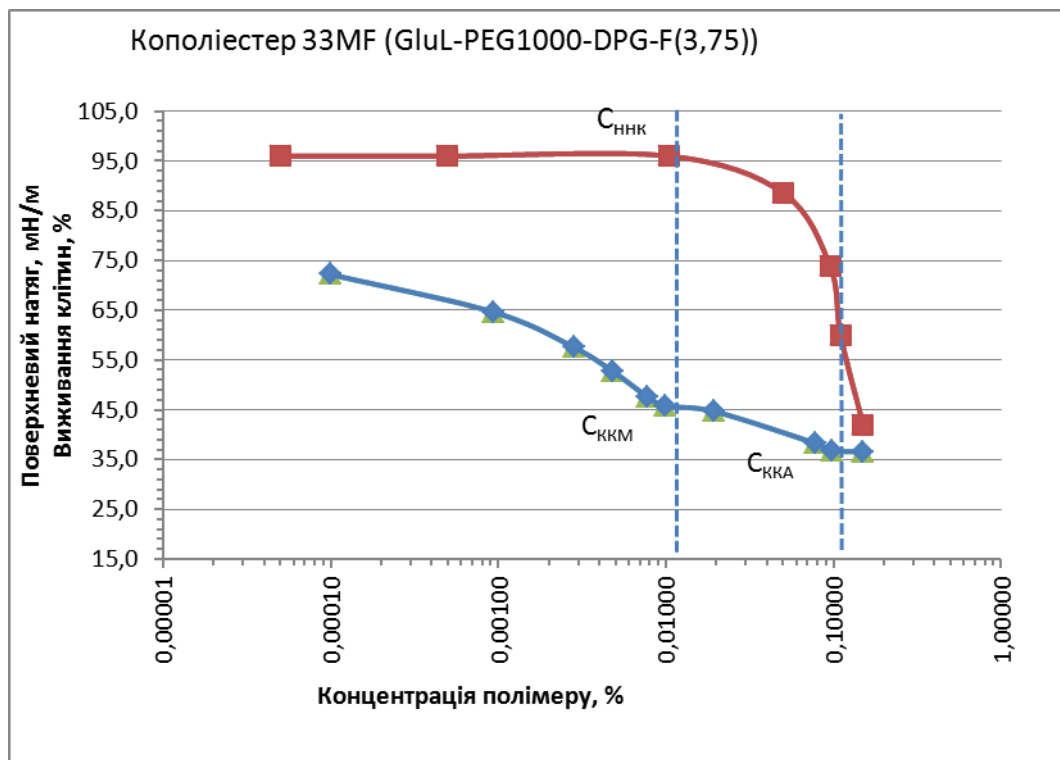


Рис. 5.6 Порівняння цитотоксичності кополімеру 33MF (GluL-PEG1000-DPG-F) і його поверхневого натягу від концентрації.

Причому токсичність проявляють уже первинні надмолекулярні утворення, і ця дія посилюється з утворенням більш великих агрегатів, формування яких завершується при концентрації кополіестеру яка відповідає $C_{\text{ККА}}$. З наведених даних видно, що при концентрації $C_{\text{ККА}}$ через 72 год, клітин, які вижили практично не спостерігається. Проте при концентраціях, нижчих за $C_{\text{ККМ}}$, токсичної дії нема і виживання клітин зберігається на рівні контролю.

При концентраціях вище $C_{\text{ККМ}}$ всі досліджені в роботі кополімери проявляли певний рівень токсичної дії. Таким чином, утворення міцел є необхідною умовою для виявлення цитотоксичності флуоресцеїнівмісних неіоногенних кополімерів, гідрофобний блок яких представлений 2-(додеканоїламіно)пентадіоновою кислотою (GluLa), а гідрофільний складається з ланок поліоксиетиленгліколю.

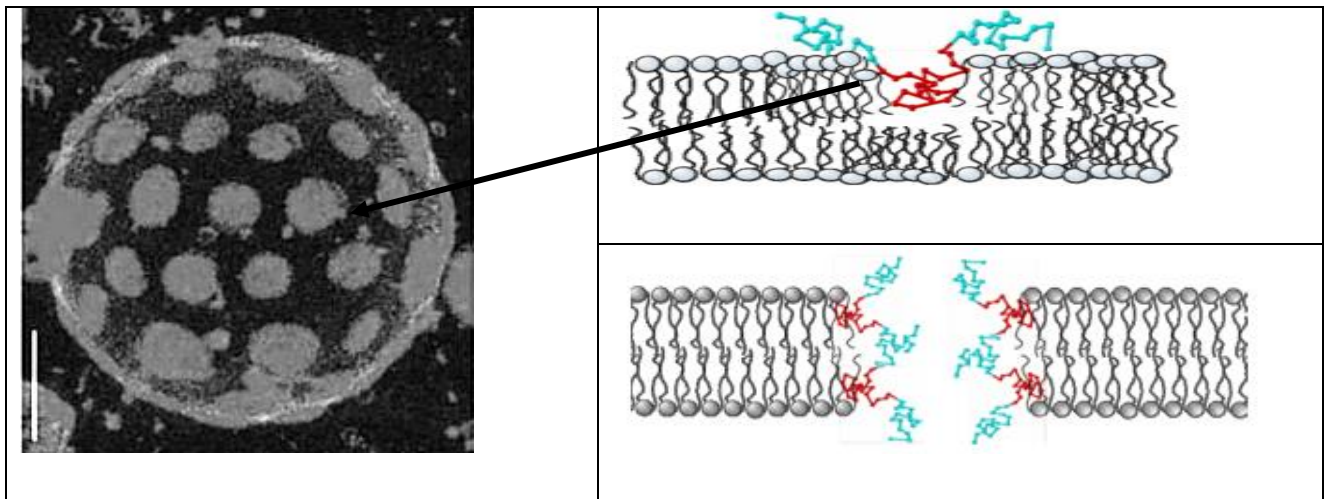
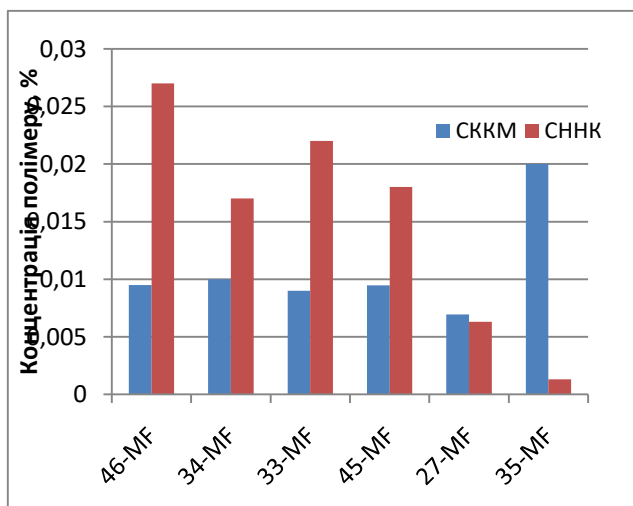
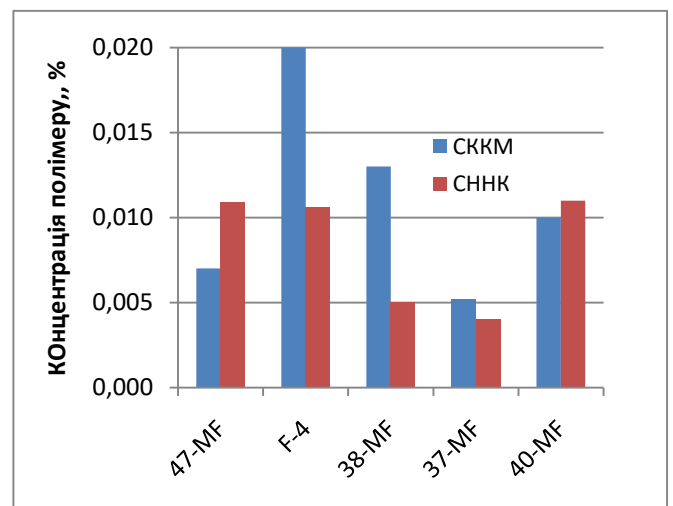


Рис. 5.7 Ліпідні порти на плазматичній мембрані клітини (а). Схематичне зображення утворення дефекту мембрани після взаємодії з амфіфільним кополімером (б) [177].

Можна припустити, що одночасна взаємодія відносно великої кількості кополімеру в вигляді міцели призводить до локального багатоцентрового зв'язування гідрофобних фрагментів у складі полімеру з так званими «ліпідними портами» клітинної мембрани (Рис.5.7 а). Збільшення кількості контактів може призводити до вигинання клітинної мембрани і формування обернених міцел полімеру, орієнтованих гідрофобними ділянками в ліпідний шар мембрани, а гідрофільними - в наскрізний отвір, який при цьому утворюється. Це спричиняє викид водорозчинного вмісту клітини, що і призводить до її загибелі (Рис.5.7.б).



а



б

Рис. 5.8 Діаграма порівняння $C_{нкк}$ і $C_{ккм}$ для двох груп кополіестерів синтезованих на основі різних кислотних мономерів GluLa (а) і GluSt (б).

Таке припущення узгоджується з результатами досліджень інших авторів, які показали, що інкубування клітин з амфифільними блоккополімерами типу «Pluronic» при концентрації, яка перевищує $C_{\text{ККМ}}$ призводить до різкого «вивільнення» вмісту клітин в навколишнє середовище. Цей результат вказує на утворення отворів у зовнішній клітинній мембрані, розміри яких є достатньо великі для проходження через них навіть таких молекул як гемоглобін $MW=68000$ з еритроцитів і лактатдегідрогенази $MW=140000$ з епітеліальних клітин [168,178]. Можна вважати, що утворення такого наскрізного пошкодження мембрани можливе тільки при певній високій концентрації молекул амфифільного полімеру на поверхні клітини, яка може бути досягнута локально при приєднанні амфифільного кополімеру у вигляді міцели або міцелярного агрегату (Рис.5.7).

Проте такі закономірності характерні не для всіх флуоресцеїнвмісних кополієстерів. На рис. 5.8 наведено порівняння $C_{\text{ККМ}}$ і $C_{\text{ННК}}$ для двох груп кополієстерів які синтезовані на основі GluSt і GluLa. З наведених даних можна зробити висновок, що для більшості кополієстерів на основі GluL концентрація $C_{\text{ННК}}$ вища за $C_{\text{ККМ}}$. Проте для кополієстеру 27-МФ ці значення уже практично однакові, а для найбільш гідрофобного кополієстеру з цього ряду 35-МФ, який синтезовано з використанням PEG400 прояви цитотоксичності виявлено ще до досягнення $C_{\text{ККМ}}$. При тому для другої групи кополієстерів, синтезованих з використанням GluSt, тільки найбільш гідрофільний представник ряду - 47-МФ, для синтезу якого використано PEG 1500, як і для більшості кополієстерів GluL, синтезованих за використанням PEG600÷PEG1500, $C_{\text{ННК}} > C_{\text{ККМ}}$. Всі інші флуоресцеїнвмісні кополієстери GluSt мають ознаки взаємодії з живими клітинами ще до досягнення концентрації, що визначає їх міцелоутворення ($C_{\text{ККМ}}$). Це означає, що дані сполуки можуть взаємодіяти з клітинами, коли вони присутні в розчині також і у вигляді окремих молекул (унімерів). Цьому очевидно сприяє висока термодинамічна сумісність вуглеводневого фрагмента стеаринової кислоти у молекулі амфифільного кополієстеру на основі GluSt з залишками жирних кислот у ліпідній мембрані. Виявлений ефект, дозволяє стверджувати, що кополієстери на GluSt здатні проникати в клітину за мінімальних їх концентрацій,

що є дуже важливим з позиції їх практичного застосування, адже у реальних умовах при введенні дисперсії в середовище організм не можна створити їх концентрацію, яка би була вища за $C_{\text{ккм}}$.

Таким чином, в даній роботі було вперше проведено систематичне дослідження цитотоксичності у ряді нових амфифільних кополімерів, що містять флуоресцеїн як мономерну ланку і показано, що концентрації, при яких вони цитотоксичні, визначаються співвідношенням гідروفільних і гідрофобних фрагментів у структурі макромолекули і є порівняльними з триблоккополімерами «Pluronic».

Цитотоксичність кополієстерів GluL як і для більшості амфифільних кополімерів обумовлена утворенням міцел, які здатні взаємодіяти з плазматичною мембраною клітин. Кополієстери GluSt хоча і взаємодіють з клітинами на рівні окремих макромолекул проте характеризуються вищими значеннями концентрації C_{50} , що свідчить про вищу їх толерантність до живих організмів яка проявляється у більш пологих залежностях кількості клітин які вижили від концентрації кополієстеру.

Узагальнюючи результати проведених досліджень на основі вивчення впливів амфифільних кополієстерів N-похідних глютамінової кислоти та їх аналогів з флуорофором в макромолекулі на живі статеві клітини можна стверджувати, що у дослідженнях, які передбачають ефективну взаємодію з клітиною (наприклад визначення активності ферментів) можна рекомендувати використання кополієстерів на основі 2-(октадеканоїлоїламіно)пентадіонової кислоти (GluSt), які проявляють ознаки взаємодії ще до досягнення $C_{\text{ккм}}$ і разом з тим характеризуються доволі високими значеннями C_{50} . У інших випадках найбільш доцільно використовувати кополієстери макромолекули яких складаються з додеканоїламінопентадіонової кислоти (GluL), поліетердіолів з молекулярною масою 1000-1200. Такі кополієстери практично не проявляють цитотоксичності, а в деяких випадках за їх мінімальних концентрацій навіть дещо підвищують життєздатність клітин виявляючи протекторну функцію. Що без

сумніву вказує на перспективність їх використання у наносистемах доставки для вивчення їх поширення і локалізації в організмі.

5.2. Дослідження взаємодії флуоресцеїнвмісних кополієстерів з живими клітинами *in vitro*

Нові флуоресцеїнвмісні кополієстери можна розглядати як цікаві флуоресцентні маркери, які містять флуоресцеїн у латентній формі. Хромофорний фрагмент (флуоресцеїн) у структурі макромолекул таких кополієстерів флуоресцентних властивостей не проявляє, але в живих клітинах після гідролізу кополієстеру (в тому числі за участі клітинних ензимів) і вивільнення флуоресцеїну його здатність до фотолюмінісценції дає змогу розглядати такі макромолекули як перспективну основу для діагностичних систем в біохімічних дослідженнях(рис.5.9).

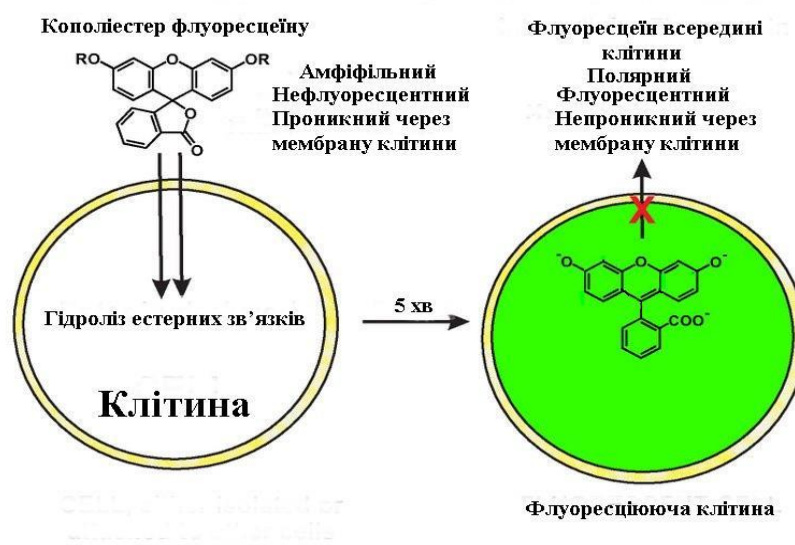


Рис.5.9 Схематичне зображення біохімічних процесів при взаємодії флуоресцеїнвмісних кополієстерів з клітинами.

Для вивчення здатності кополієстерів до проникнення в клітину проводили мікроскопування зразків спермійів інкубованих протягом 1 год при концентрації полімеру, що не перевищує $C_{нк}$. Проведені дослідження показали, що кополієстери зв'язуються з мембранами клітин і проникають у сперматозоїди, але є відмінності у їх локалізації. З мікрофотографій, наведених на рис. 5.10, можна

побачити, що зв'язування кополієстеру (що проявляється у характерному забарвленні) відбувається переважно з головками і шийками сперміїв і в меншій степені з їх хвостами. Різний характер локалізації флюоресценції, який при цьому спостерігається, залежить від структури кополієстеру. Кополієстер 47-MF, отриманий за використання більш гідрофільного PEG-1500, в більшій мірі забарвлює передній край голівки, шийку і хвіст, а більш гідрофобний кополієстер 35-MF у складі якого міститься PEG-400, зв'язуючись з усією поверхнею клітин, і забарвлює в основному центральну частину голівки. Така різниця може свідчити про різні рівні взаємодії кополієстерів з клітинною мембраною та можливо про відмінності у механізмі проникнення їх всередину клітин.

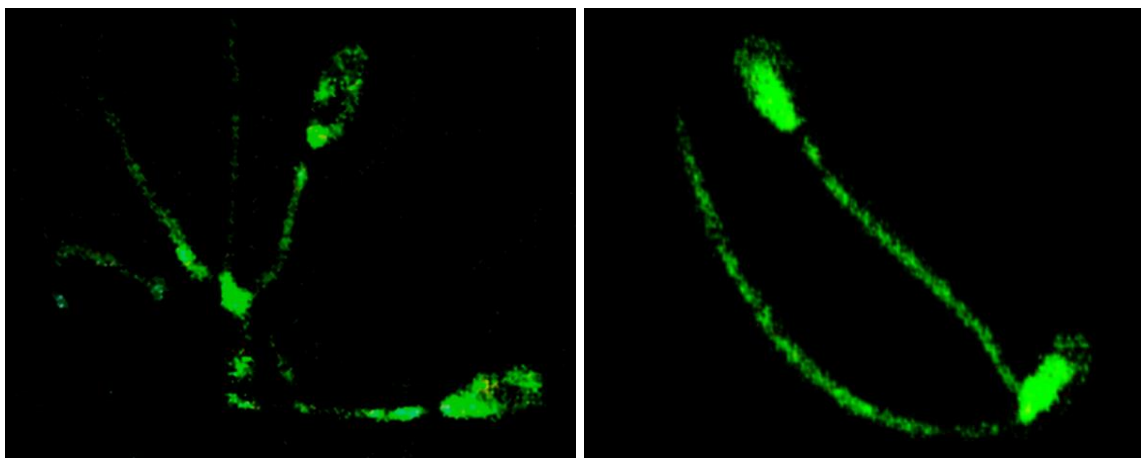


Рис. 5.10. Мікрофотографії сперміїв після обробки дисперсією кополієстерів 47-MF GluL-PEG1500-DPG-F та 35-MF GluL-PEG400-DPG-F (доза 10 мкл/мл витримка 1 год).

Більш детальні дослідження взаємодії амфифільних флуоресцентних кополієстерів були проведені для полімеру F-4 (GluSt-DPG-PEG-1200-F), який інкубувався при концентрації, меншій за $C_{ннк}$, із статевими клітинами бугая. Методом люмінесцентної мікроскопії було виявлено здатність кополієстеру взаємодіяти з її мембраною (рис. 5.11, 3) проникати у клітину і локалізуватись в органелах: голівці (рис. 5.11, 2), шийці (рис. 5.11, 4) і тілі (рис. 5.11, 5).

Як видно з отриманих результатів (рис.5.11), полімер, проникаючи в клітину через мембрану, локалізується в зоні мітохондрій, де його гідролітичне розщеплення відбувається найбільш активно. Менш інтенсивно кополієстер

зв'язується з акросомою (рис. 5.11, 1) та центральними осьовими волокнами хвоста (рис. 5.11, 6) - внутрішній акросомальний простір і центральні осьові волокна зафарбовуються слабше, порівняно з іншими структурними елементами.

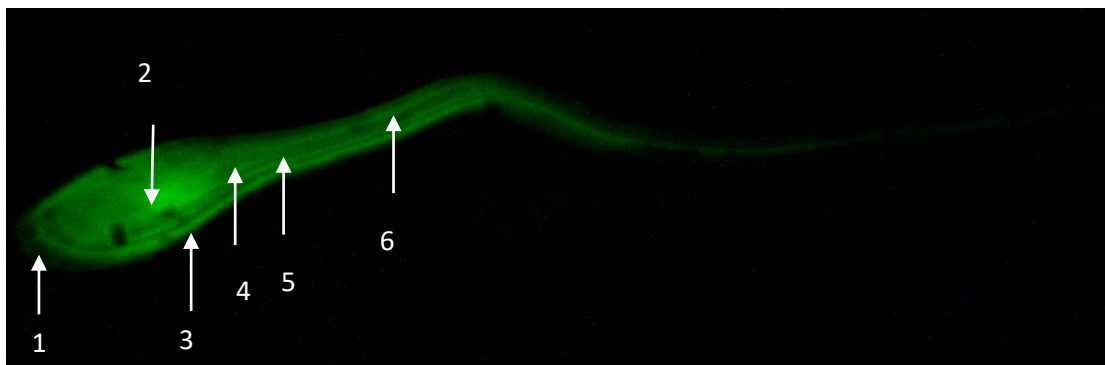


Рис. 5.11 Мікрофотографія люмінесцентної мікроскопії статевої клітини бугая за впливу флуоресцеїнвмісного полімеру F-4 (GluSt- DPG-PEG-1200-F); (доза 10 мкл/мл витримка 1 год, збільшення 900).

Отримані результати засвідчують можливість використання флуоресцеїнвмісних кополієстерів у дослідженнях пов'язаних з живими об'єктами. Навіть за порівняно невисокого вмісту флуоресцеїну у кополієстері (F-4 містить 0,55% флуоресцеїну) внаслідок його гідролітичного вивільнення можна отримувати якісні зображення при дослідженні клітин та функціонування їх органел.

Таким чином, беручи до уваги викладені в даному розділі результати досліджень цитотоксичності дозволяють зробити висновок, про можливість їх використання в якості полімерних матеріалів медичного та біомедичного застосування. Зокрема, для досліджень пов'язаних із створенням дисперсних систем доставки ліків.

5.3. Використання флуоресцеїнвмісних кополієстерів як маркерів для вивчення поширення дисперсних систем транспорту ліків

Полімери неіоногенної природи характеризуються значно меншим рівнем токсичності в порівнянні з поверхнево-активними речовинами іоногенної природи, тому вони є об'єктами для досліджень в галузі біомедицини [179]. Однак при тестуванні на тваринах було виявлено, що внутрішньовенне введення

амфифільного неіоногенного блоккополімеру Pluronic F127 лабораторним мишам викликає підвищення рівня ліпідів і ліпопротеїнів у крові (гіперліпідемію), збільшує вміст холестерину, що сприяє формуванню атеросклеротичних пошкоджень аорти [180], а його накопичення клітинами печінки призводить до їх вакуолізації і набухання [181]. Pluronic F68, у складі препарату, який розроблявся для лікування інфаркту міокарду, на початкових етапах клінічних випробувань не викликав ускладнень навіть у високих дозах [182]. Однак пізніше цей препарат був знятий з випробувань в зв'язку з його токсичністю для нирок [183]. Сильний токсичний ефект *in vivo* було виявлено у гідрофобного Pluronic L101, який при спробах використати його в якості імуноад'юванта (підсилювача імунної відповіді), викликав добре виражену запальну реакцію [184]. Причину проявів токсичності для полімерів типу Pluronic для організму поки що не з'ясовано. Але зв'язок між структурою блоккополімерів і їх токсичністю була продемонстрована на тваринах при кількісній оцінці рівня ферменту креатинфосфокінази в крові після ін'єкції кополімеру. Тестування різних полімерів «Pluronic» (F88, F127, P105 і P123) виявило, що гідрофобні P105 і P123, які характеризуються значеннями HLB=8, підвищували рівень ферменту в крові і були визнані значно більш токсичними, ніж F127 і F88 з HLB=22. Більш детальне вивчення цього питання привело до висновку, що має місце закономірність яка була виявлена і при дослідженні цитотоксичності: чим більш гідрофільний кополімер, тим нижча його токсичність [185].

В попередньому розділі було охарактеризовано синтезовані флуоресцеїнвмісні кополіестери з точки зору їх цитотоксичності. Проведені дослідження показали, що хоча HLB отриманих кополіестерів є меншим за 10, рівень їх цитотоксичності є порівняльним з більш гідрофільними полімерами «Pluronic», які характеризуються значно вищими числами HLB (15-25) і вважаються малотоксичними. Цей факт дозволяє розраховувати на позитивні результати при використанні флуоресцеїнвмісних кополіестерів для маркування наночастинок для спостереження їх поширення в організмі тварин.

Для вивчення поширення частинок кополіестеру GluLa-DPG-PEG600 в організмі лабораторних тварин (щурів) використовували його дисперсію в суміші з його флуорисцеїнвмісним аналогом 27MF (GluLa-DPG-PEG600-F) при вмісті останнього 30%.

Після внутрішньовенного введення, на 5 годину, локалізацію флуоресцеїну було виявлено у тканині нирок у корковому шарі та у просвіті вени в області проксимальних звитих каналців а також у селезінці дослідної групи щурів (рис. 5.12, Б.). У контрольній групі тварин в цих зонах характерної люмінесценції виявлено не було (рис. 5.12, А.). Цей факт можна вважати позитивною характеристикою оскільки в селезінці відбувається антигенна диференціація лімфоцитів та утворення антитіл. Це зокрема може забезпечити швидку та ефективну імунну відповідь організму на антигени вакцин і дозволяє використовувати дисперсію кополіестеру як ад'юванта для вакцин [186].

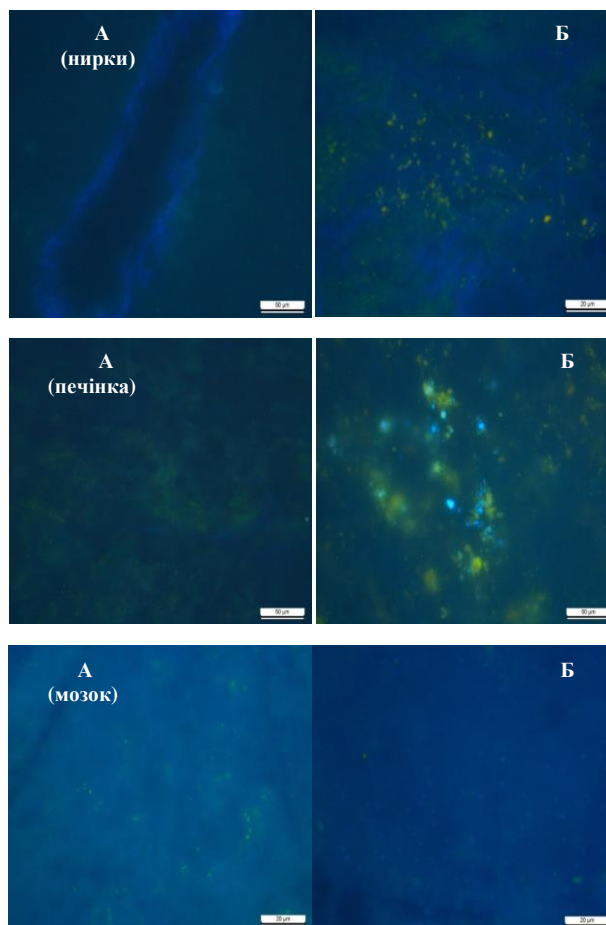


Рис. 5.12. Виявлення кополіестеру GluLa-DPG-PEG600-F у нирках щурів на 5 годину після внутрішньовенного введення та у печінці і мозку на 16 годину після

внутрішньом'язевого введення (Дослідження проведені в інституті Біології тварин НААН України).

Встановлено також, що на 16 годину після внутрішньом'язевого введення кополіестер 27MF GluLa-DPG-PEG600-F було виявлено також у ділянці печінки поруч з печінковою судиною (рис. 5.12 Б.). В печінці контрольної групи щурів, структури з подібною люмінесценцією були відсутніми (рис. 5.12,Б.). Локалізація кополіестеру у печінці дослідних тварин свідчить про здатність його включатись у метаболізм ксенобіотиків.

Частинки дисперсії кополімерів цього класу при внутрішньовенному введенні взаємодіючи з білками плазми крові (альбуміном) зазнають подрібнення до частинок з гідродинамічним діаметром від 5 до 10 нм. За даними наведеними в літературі частинки такого розміру здатні долати гематоенцефалічний бар'єр. Проте достовірного підтвердження цьому у зрізах мозку піддослідних тварин, яким вводилося дисперсію кополіестеру отримати не вдалося.

В межах цього експерименту через дослідження біохімічних маркерів структурного і функціонального стану печінки та нирок здійснювали також оцінку токсичності кополіестеру GluLa-DPG-PEG600 на організм щурів. Результати цих досліджень покази, що на 21 добу експерименту після двох введень кополіестеру у вигляді стерильної дисперсії у воді негативного впливу на структуру і функціональний стан печінки та нирок щурів не виявлено. Короткочасний слабовиражений токсичний ефект тривав до 7 доби експерименту з подальшим зменшенням його проявів. Отриманий результат може свідчити про швидке адаптування організму тварин до присутності кополіестеру GluLa-DPG-PEG600, оскільки вже на 14 та 21 добу токсичний вплив на їх печінку та нирки був відсутній.

Дослідження функціонального та структурного стану печінки та нирок лабораторних тварин виявило тільки незначний та короткочасний токсичний вплив кополіестеру на організм. Це свідчить про безпечність та можливість використання кополіестерів цього типу як самостійних біохімічних маркерів так і в складі наносистем транспорту ліків.

Висновки

У дисертаційній роботі вирішено науково-практичні завдання щодо розроблення методу синтезу нових амфифільних кополієстерів, які містять фрагмент флуоресцеїну як ланку макромолекули через нерівноважну поліконденсацію за реакцією Стегліха, досліджені їх властивості та запропоновані шляхи застосування:

1. Обґрунтовано можливість використання флуоресцеїну, як мономеру, і за розробленим методом нерівноважної поліконденсації за реакцією Стегліха, синтезовано та охарактеризовано полієстер флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентандіовою кислотою.
2. Через кополіконденсацію N-ацилпохідних глютамінової кислоти, полієтердіолів та флуоресцеїну за реакцією Стегліха одержано та охарактеризовано нові амфифільні кополієстери, які містять фрагменти хромофору в макроланцюгу, підтверджена їх будова, встановлено співвідношення мономерних ланок та окреслено особливості реакції Стегліха при синтезі кополієстерів з використанням флуоресцеїну.
3. Показано, що фізико-хімічні властивості поверхнево-активних кополієстерів синтезованих на основі різних N-ацилпохідних глютамінової кислоти та полієтердіолів і флуоресцеїну, їх здатність до утворення міцел та міцелярних агрегатів у водних розчинах, розміри та стабільність водних дисперсій на їх основі визначається природою та співвідношенням мономерів, їх ГЛБ і вмістом флуоресцеїну;
4. Показано, що кополіконденсація за реакцією Стегліха дозволяє отримувати флуоресцеїнвмісні кополієстери визначеного складу та будови з керованими параметрами їх гідрофільно-ліпофільного балансу, параметрами розподілу між водною та ліпофільною фазами, здатністю до солюбілізації малорозчинних у воді сполук різної природи та їх вивільнення у неполярне середовище н-

октанолу, закономірностями гідролітичного розкладу з вивільненням флуоресцеїну у водних середовищах та вплив на ці характеристики водорозчинних білків плазми крові;

5. Проведена оцінка ступеню впливу амфифільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів на живі клітини (спермії бика) в залежності від їх будови та колоїдно-хімічних характеристик та отримано емпіричну залежність між їх гідрофільно-ліпофільним балансом (ГЛБ) і цитотоксичністю
6. Показано, що амфифільні флуоресцеїнвмісні кополієстери при взаємодії з мембранами клітин, проникають через них, здійснюючи доставку флуоресцентного маркера у внутрішні області клітини і її органели, що може бути використано в біохімічних дослідженнях.
7. Фізіологічні дослідження на тваринах (лабораторних щурах) показали, що одержані продукти не проявляють системної токсичності і можуть бути використані як полімерні маркери при створенні систем доставки ліків для їх візуалізації в органах чи тканинах.

Список використаної літератури

- 1 Patterson J.P., Kelley E.G., Murphy R.P., Moughton A.O., Robin M.P., Lu A., Epps T.H. Structural characterization of amphiphilic homopolymer micelles using light scattering, SANS, and Cryo-TEM. *Macromol.* 2013. Vol. 46. P. 6319-6325.
- 2 Crassous J.J., Rochette C.N., Wittemann A., Schrinner M., Ballauff M., Drechsler M. Quantitative analysis of polymer colloids by cryo-transmission electron microscopy. *Langmuir.* 2009. Vol. 25. P. 7862-7871.
- 3 Shokri N., Akbari Javar H., Fouladdel Sh., Khalaj A., Khoshayand M.R., Dinarvand R., Atyabi F., Nomani A., Azizi E. Preparation and evaluation of poly (caprolactone fumarate) nanoparticles containing doxorubicin HCl. *Daru.* 2011. Vol. 19. P. 12-22.
- 4 Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. nanotechnol.* 2007. Vol. 2. P. 761-770.
- 5 Abhilash M. Potential applications of nanoparticles. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2010. Vol. 1., Iss. 1. P. 1-12.
- 6 Kayser O., Lemke A., Hernandez-Trejo N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2005. Vol. 6., Iss. 1. P. 3-5.
- 7 Crassous J.J., Ballauff, M., Drechsler M., Schmidt J., Talmon, Y. Imaging the volume transition in thermosensitive core-shell particles by cryo-transmission electron microscopy. *Langmuir.* 2006. Vol. 22. P. 2403-2406.
- 8 Murthy S.K. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *Int. J. Nanomed.* 2007. Vol. 2., Iss. 2. P. 129-141.
9. Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polymer Science.* V. 51., № 1. P. 135-145.
- 10 Халатур П.Г. Самоорганизация полимеров. *Соросовский образовательный журнал.* 2001. Т. 7., № 4. С. 36-43.
- 11 Yu K., Eisenberg A. Bilayer morphologies of self-assembled crew-cut aggregates of amphiphilic PS-b-PEO diblock copolymers in solution. *Macromol.* 1998. Vol.31., Iss. 11. P. 3509-3518.

- 12 Ding J., Liu G. Water-soluble hollow nanospheres as potential drug carriers. *J. of Phys. Chem. B*. 1998. Vol.102., Iss. 31. P.6107-6113.
- 13 Ananiy Kohut, Ivan Hevus,Stanislav Voronov, Andriy Voronov. Amphiphilic Invertible Polymers and Their Applications. *Industrial Applications for Intelligent Polymers and Coatings*. 2016. pp 399-415
- 14 Kabanov A.V., Alakhov V.Y. Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2002. Vol.19., Iss. 1. P. 72.
- ¹⁵ Antonietti M., Foerster S. Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids. *Adv. Mater.* 2003. Vol.15., Iss. 16. P. 1323-1333.
- 16 Zhang L., Eisenberg A. Multiple morphologies of "crew-cut" aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block copolymers. *Science*. 1995. Vol. 268., Iss. 5218. P. 1728-1731.
- 17 Choucair A., Eisenberg A. Control of amphiphilic block copolymer morphologies using solution conditions. *Eur. Phys. J.* 2003. Vol. 10., Iss. 1. P. 37-44.
- 18 Kwon G. S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2003 Vol. 20., Iss. 3. P. 357-403.
- 19 Chris Oerlemans, Wouter Bult, Mariska Bos, Gert Storm, J. Frank W. Nijssen and Wim E. Hennink Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release. *Pharm Res.* 2010. Vol. 27(12). P. 2569–2589.
- 20 Katayose S., Kataoka K. Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(Llysine) block copolymer. *J. Pharm. Sci.* 1998. Vol. 87., Iss. 2. P. 160-163.
- 21 Harada A., Kataoka K. Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core. Preparation of narrowly-distributed micelles from lysozyme and poly(ethyleneglycol)-poly(aspartic acid) block copolymer in aqueous medium. *Macromol.* 1998. Vol. 31., Iss. 2. P. 288-294.

- 22 Kwon G.S., Naito M., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. Block copolymer micelles for drug delivery: loading and release of doxorubicin. *J. Control. Release*. 1997. Vol. 48., Iss. 2. P. 195-201.
- 23 Jeong Y.I., Cheon J.B., Kim S.H., Nah J.W., Lee Y.M., Sung Y.K. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro. *J. Control. Release*. 1998. Vol. 51., Iss. 2. P. 169-178.
- 24 Kim S.Y., Shin I.G., Lee Y.M., Cho C.G., Sung Y.K. Methoxy poly(ethylene glycol) and (α -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviors. *J. Control. Release*. 1998. Vol. 51., Iss. 1. P. 13-22.
- 25 Hagan S.A., Coombes A.G. A., Garnett M. C. Polylactide-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery systems. 1. Characterization of water dispersible micelle-forming systems. *Langmuir*. 1996. Vol. 12., Iss. 9. P. 2153-2161.
- 26 Sergiy Varvarenko, Ihor Tarnavchuk, Andriy Voronov, Nataliia Fihurka, Iryna Dron, Nataliia Nosova, Roman Taras, Volodymyr Samaryk, Stanislav Voronov. Synthesis and colloidal properties of polyesters based on glutamic acids and glycols of different nature. *Chemistry and Chemical Technology*. 2013. Vol. 7., Iss. 2. P. 164-168.
- 27 Штильман М. И. Полимеры медико-биологического назначения. М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. 400 с.
- 28 Shtilman M.I. Polymeric biomaterials. Part I. Utresht-Tokyo: VSP, 2000. 247 p.
- 29 Shtilman M.I. Biodegradation. In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials. Boca Raton: CRC Press, 2015. P. 804-816.
- 30 Liechty W.B., Kryscio D.R., Slaughter B.V., Peppas N.A. Polymers for drug delivery systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2010. Vol. 1. P. 149-173.
- 31 Chhaya Engineer, Jigisha Parikh and Ankur Raval. Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. *Trends Biomater. Artif. Organs*. 2011. Vol. 25., Iss. 2. P. 79-85.
- 32 Liechty W.B., Kryscio D.R., Slaughter B.V., Peppas N.A. Polymers for drug delivery systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2010. Vol. 1. P. 149-173.

- 33 Hasegawa I., Hirashima N. Styrene maleic acid neocarzinostatin transcatheter embolization for hepatocellular carcinoma – third report. *Gan to kagaku ryoho Cancer Chemother.* 2002. Vol. 29., Iss. 2. P. 253-259.
- 34 Shtilman M.I. Immobilization on polymers. Utresht-Tokyo: VSP, 1993. 479 p.
- 35 Koksel H., Ozturk S., Kahraman K., Basman A., Ozbas O.O., Ryu G.H. Evaluation of molecular weight distribution, pasting and functional properties, and enzyme resistant starch content of acid-modified corn starches. *Food Sci. Biotechnol.* 2008. Vol. 17., Iss. 4. P. 755-760.
- 36 Gaur U., Sahoo S.K., De Tapas K., Ghosh P.C., Maitra A., Ghosh P.K. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int. J. Pharm.* 2000. Vol. 202., Iss. 1. P. 1-10.
- 37 Yokoyama M., Fukushima S., Uehara R., Okamoto K., Kataoka K., Sakurai Y., Okano, T. Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor. *J. Control. Release.* 1998. Vol. 50., Iss. 1. P. 79-92.
- 38 Speiser P.P. Nanoparticles and liposomes: a state of the art. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1991. Vol. 13., Iss. 5. P. 337-342.
- 39 Neradovic D., Soga O., Van Nostrum C.F., Hennink W.E. The effect of the processing and formulation parameters on the size of nanoparticles based on block copolymers of poly (ethylene glycol) and poly (N-isopropylacrylamide) with and without hydrolytically sensitive groups. *Biomaterials.* 2004. Vol. 25., Iss. 12. P. 2409-2418.
- 40 Bharali D.J., Sahoo S.K., Mozumdar S., Maitra A. Cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles: a potential carrier for hydrophilic drugs. *J. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 258., Iss. 2. P. 415-423.
- 41 Magee W.E., Talcott M.L., Straub S.X., Vriend C.Y. A comparison of negatively and positively charged liposomes containing entrapped polynucleic· polycytidylic acid for interferon induction in mice. *BBA - Gen. Subjects.* 1976. Vol. 451., Iss. 2. P. 610-618.

- 42 Webber M.M., Sansi P. Thrombosis detection using radionuclide techniques. *CRC Crit. Rev. Clin. Radiol. Nucl. Med.* 1976. Vol. 7., Iss. 3. P. 263-290.
- 43 Biswas S., Torchilin V.P. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014. Vol.66. P. 26-41
- 44 Koren E., Apte A., Jani A., Torchilin V.P. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *J. Control. Release.* 2014. Vol.160., Iss. 2. P. 264-273.
- 45 Bao G, Mitragotri S, Tong S. Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng.*2013. Vol. 15. P. 253-282. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071812-152409.
- 46 Stephens D. J., Allan V. J. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300. 2003. P. 82–86. doi:10.1126/science.1082160
- 47 М.С. Жаркова, Н.Л. Шимановский. Перспективы развития флуоресцентных методов молекулярной визуализации в современной диагностике. *Медицинская визуализация.* 2006. № 2. С. 136-143.
- 48 Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические процессы. *Соросовский образовательный журнал.* 1999. № 6. С. 25–32.
- 49 Пучков Е.О. Флуоресцентные репортеры и их репортажи. *Химия и Жизнь.*2014. № 9. С. 8–13.
- 50 X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science.*2005. Vol. 307(5709). P. 538-544.
51. Yi Zhang and Jian Yang. Design strategies for fluorescent biodegradable polymeric biomaterials. *J. Mater. Chem. B.* 2013. Vol. 1. P. 132.
52. Johnson I. Fluorescent probes for living cells. *Histochem. J.* 1988. Vol. 30. P. 123–140.
- 53 Mullins J.M. Overview of fluorochromes. *Methods Mol. Biol.* 1999. Vol. 115. P. 97–105.

- 54 Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P., Bishop-Stewart J., Bhalgat M.K., Millard P.J., Mao F., Leung W.Y., Haugland R.P. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* 1999. Vol. 47. P. 1179–1188.
- 55 Guan, Y.; Yu, S.H.; Antonietti, M.; Böttcher, C.; Faul, C.F. Synthesis of supramolecular polymers by ionic self-assembly of oppositely charged dyes. *Chem. Eur. J.* 2005. Vol. 11. P. 1305–1311.
- 56 Ozmen, E.Y.; Sezgin, M.; Yilmaz, A.; Yilmaz, M. Synthesis of β -cyclodextrin and starch based polymers for sorption of azo dyes from aqueous solutions. *Bioresour. Technol.* 2008. Vol. 99. P. 526–531.
- 57 Yilmaz, A.; Yilmaz, E.; Yilmaz, M.; Bartsch, R.A. Removal of azo dyes from aqueous solutions using calix[4]arene and β -cyclodextrin. *Dyes Pigments.* 2007. Vol. 74. P. 54–59.
- 58 Guan, Y.; Yu, S.H.; Antonietti, M.; Böttcher, C.; Faul, C.F. Synthesis of supramolecular polymers by ionic self-assembly of oppositely charged dyes. *Chem. Eur. J.* 2005. Vol. 11. P. 1305–1311.
- 59 Şolpan, D.; Duran, S.; Saraydin, D.; Güven, O. Adsorption of methyl violet in aqueous solutions by poly (acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. *Radiat. Phys. Chem.* 2003. Vol. 66. P. 117–127.
- 60 Dawson, D. Polymeric dyes. *Aldrichim. Acta.* 1981. Vol. 14. P. 23–29.
- 61 Robello, D.R. Linear polymers for nonlinear optics. I. Polyacrylates bearing aminonitro-stilbene and-azobenzene dyes. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 1990. Vol. 28. P. 1–13.
- 62 Maradiya, H.R.; Patel, V.S. Synthesis, characterization and application of monomeric and polymeric dyes based on N-arylmaleimides. *High Perform. Polym.* 2000. Vol. 12. P. 335–348.
- 63 Dawson, D. Polymeric dyes. *Aldrichim. Acta.* 1981. Vol. 14. P. 23–29.

- 64 Dawson, D.J.; Otteson, K.M.; Wang, P.C.; Wingard, R.E., Jr. Soluble functional polymers. 2. Utilization of water-insoluble chromophores in water-soluble polymeric dyes. *Macromolecules*. 1978. Vol. 11. P. 320–324.
65. Christopher J Cheng^{1,2} and W. Mark Saltzman Enhanced siRNA delivery into cells by exploiting the synergy between targeting ligands and cell-penetrating peptides // *Biomaterials*. Sep 2011; 32(26): 6194–6203.
- 66 Milliken Chemical. Available online: <http://millikenchemical.com/versatint-water-soluble-colorant/> (accessed on 21 February 2015).
- 67 Shiba, M.; Hiramasa, H.; Nakano, H.; Kawano, Y.; Shigeri, Y.; Kondo, T. Synthesis of high polymers with a light absorption band in the visible region by interfacial polycondensation reaction. *Polym. J.* 1973. Vol. 4. P. 366–371.
- 68 Ghassemi, H.; Hay, A.S. Red pigmentary polyimides from N,N'-diamino-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic acid bisimide. *Macromolecules*. 1994. Vol. 27. P. 4410–4412.
- 69 Alemdaroglu, F.E.; Alexander, S.C.; Ji, D.; Prusty, D.K.; Borsch, M.; Herrmann, A. Poly(BODIPY)s: A new class of tunable polymeric dyes. *Macromolecules*. 2009. Vol. 42. P. 6529–6536.
- 70 Wang, M.; Wu, L.-G.; Zheng, X.-C.; Mo, J.-X.; Gao, C.-J. Surface modification of phenolphthalein poly(ether sulfone) ultrafiltration membranes by blending with acrylonitrile-based copolymer containing ionic groups for imparting surface electrical properties. *J. Colloid Interface Sci.* 2006. Vol. 300. P. 286–292.
- 71 Kiskan, B.; Antonietti, M.; Weber, J. Teaching new tricks to an old indicator: pH-Switchable, photoactive microporous polymer networks from phenolphthalein with tunable CO₂ adsorption power. *Macromolecules*. 2012. Vol. 45. P. 1356–1361.
- 72 Ji He, Huixin Chen, Yanjia Guo, Liang Wang, Lingli Zhu, H. Enis Karahan and Yuan Chen. Polycondensation of a Perylene Bisimide Derivative and L-Malic Acid as Water-Soluble Conjugates for Fluorescent Labeling of Live Mammalian Cells. *Polymers*. 2018. Vol. 10. P. 559. doi:10.3390/polym10050559
73. А. Вайсберг, Э. Проскауэр, Д. Риддис. Органические растворители. М.: Иностранная литература, 1976. 541 с.

- 74 Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971, 264 с.
75. Белами Л. [пер. с английского Акимова В.М., Пентина Ю.А., Тетерина Ю.Г. под ред. Пентина Ю.А.]. Инфракрасные спектры сложных молекул. М.: Издательство иностранной литературы, 1963. 590 с.
76. Workman J. Handbook of Organic Compounds. Ni, Ir, Raman, and Uv-Vis Spectra Featuring Polymers and Surfcicants. San Diego: Buckram Pablisher. Academic Press, 2001. 428 p.
77. А.М. Торощева, К.В. Белогородская, В.М. Бондаренко Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений. Л.: Химия, 1976. 415 с.
- 78 . http://www.acdlabs.com/software/logp/logp_prediction_software.php
- 79 Плохинский Н.А. Бицметрия. М.: МГУ, 1970. С. 53–60.
- 80 L. D. Lavis, R. T. Raines. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* 2008. Vol. 3. P. 142–155.
- 81 R. P. Haugland, M. T. Z. Spence, I. D. Johnson and A. Basey. The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies [10th edn]. Eugene, OR: Molecular Probes. 2005.
- 82 J.-P. Goddard, J.-L. Reymond. Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004. Vol. 15. P. 314
- 83 L. D. Lavis, T.-Y. Chao and R. T. Raines. Fluorogenic Label for Biomolecular Imaging. *ACS Chem. Biol.* 2006. Vol. 1. P. 252–260.
- 84 R. Y. Tsien. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature.* 1981. Vol. 290. P. 527–528.
- 85 J. Kao, A. Harootunian and R. Tsien. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 8179–8184.
- 86 Sneha S. Kelkars and Theresa M. Reineke. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjugate Chem.* 2011. Vol. 22., Iss. 10. P. 1879–1903.
- 87 L. D. Lavis. Ester Bonds in Prodrugs. *ACS Chem. Biol.* 2008. Vol. 3. P. 203–206.

- 88 A. Baeyer. Ueber Eine Neue Klasse Von Farbstoffen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1871. Vol. 4. P. 555–558.
- 89 B. Rotman and B. W. Papermaster. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1966. Vol. 55. P. 134–141.
- 90 B. Testa and J. M. Mayer. *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology.* Verlag Helvetica Chimica Acta. Zürich. Switzerland. 2003. P. 780.
91. R. M. Tadros, H. Nouredini, D. C. Timm. Z-Protected Glutamic Acid-Based Biodegradable Thermoplastic and Thermosetting Polyesters: Synthesis and Characterization. *J. of Ap. Pol Sc.* 1999. Vol. 73., Iss. 6. P. 869-880.
- 92 . Michael E. Gelbin and Joachim Kohn. Synthesis and Polymerization of N-Z-L-Serine- α -lactone and Serine Hydroxybenzotriazole Active Esters. *J. Am. Chem. Soc.* 1992. Vol. 114., Iss. 10. P. 3962–3965. DOI: 10.1021/ja00036a051
- 93 . Won C.Y., Chu C.C., Lee J.D. Synthesis and characterization of biodegradable poly(L-aspartic acid-co-PEG). *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* 1998. Vol. 36., No.16. P. 2949-2959.
94. Chee-Youb Wona, Chih-Chang Chua and Jong Doo Leeb. Novel biodegradable copolymers containing pendant amine functional groups based on aspartic acid and poly(ethylene glycol). *Polymer Elsevier Science Ltd.* 1998. Vol. 39., No. 25. P. 6677–6681.
- 95 Kohn J. and R. Langer. Non-peptide polyamino acid bioerodible polymers. U. S. Patent No. 4,538,045. 1985.
96. Feng-YanGe, Li-GongChen, Xiao-LiZhou, Hui-YingPan, Fan-YongYan, Guo-YiBai, Xi-LongYan. Synthesis and study on hydrolytic properties of fluorescein esters. *Dyes and Pigments.* 2007. Vol.72., No. 3. P.322-326.
97. Варваренко С. М. Амінофункційні поліестери природніх двоосновних амінокислот і поліетердіолів : дисертація на здобуття наукового ступеня доктора хімічних наук : 02.00.06 – хімія високомолекулярних сполук / Сергій

Миколайович Варваренко; Національний університет "Львівська політехніка". - Львів, 2014. – С. 92-95.

98 Brenner M., Huber W. Herstellung von α -aminosäureestern durch Alkoholise der Methylester. *Helv. Chim. Acta*. 1953. Vol. 36., Iss. 5. P. 1109-1115.

99 Фігурка Н. В. Поверхнево-активні псевдо-полі(амінокислоти) на основі дикарбонових α -амінокислот та їх колоїдно-хімічні властивості : дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук : 02.00.06 – хімія високомолекулярних сполук / Наталія Володимирівна Фігурка ; Національний університет "Львівська політехніка". - Львів, 2013. - 22 с.

100 Fihurka, N., Tarnavchuk, I., Samaryk, V., Varvarenko, S., Nosova, N., Voronov, A., Nagornyak, M., Ferens, M., Voronov, S. A Study of an Irreversible Condensation of Glutamic Acid and Polyoxyethylene/Polyoxypropylene Diols Using Thionyl Chloride. *Organic Preparations and Procedures International*. 2018. Vol. 50., Iss. 5. P. 502-508.

101 B. Neises. W. Steglich Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1978. Vol. 17., Iss. 7. P. 522–524.

102. Donald J. Berry, Charles V. DiGiovanna, Stephanie S. Metrick, Ramiah Murugan. Catalysis by 4-dialkylaminopyridines. *General Papers ARKIVOC*. 2001. P. 201-226.

103 Christian A., G. N. Montalbetti and Virginie Falque. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005. Vol. 61. P.10837-10838.

104 Eric F. V. Scriven. 4-Dialkylaminopyridines: Super Acylation and Alkylation Catalysts. *Chem. Soc. Rev.* 1983. Vol. 12. P. 129-161

105 Бендер М., Бергерон Р., Комняма М. Биоорганическая химия ферментативного катализа. М.: Мир, 1987. 352 с.

106 S. Xu, I. Held, B. Kempf, H. Mayr, W. Steglich, H. Zipse. The DMAP-Catalyzed Acetylation of Alcohols - A Mechanistic Study (DMAP = 4-(dimethylamino)-pyridine). *Chem. Eur. J.* 2005. Vol. 11., Iss. 16. P. 4751–4757.

107 Shelkov R., Nahmanya M., Melman A. Selective esterifications of alcohols and phenol through carbodiimide couplings. *Org. Biomol. Chem.* 2004. № 2. P.397-401.

108. W. Steglich, G. Höfle. German Patent 1958954.9. 1969.

- 109 Мчедлов-Петросян Н.О. Флуоресцеиновые красители в растворах – хорошо изученные системы? *Вісник Харківського національного університету*. 2004. № 626. Хімія., Вип. 11(34). С. 221–312.
- 110 Sergiy Varvarenko, Ihor Tarnavchuk, Andriy Voronov, Nataliia Fihurka, Iryna Dron, Nataliia Nosova, Roman Taras, Volodymyr Samaryk, Stanislav Voronov. Synthesis and colloidal properties of polyesters based on glutamic acids and glycols of different nature. *Chemistry & Chemical Technology*. 2013. Vol. 7., No. 2. P. 161-168.
- 111 Варваренко С.М., Самарик В.Я., Влізло В.В., Остапів Д.Д., Носова Н.Г.,Тарнавчик І.Т., Фігурка Н.В., Ференс М.В., Нагорняк М.І.,Тарас Р.С., Яремчук І.М., Воронов А.С., Воронов С.А. Флуоресцеїновмісні тераностики на основі псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення лікарських засобів. *Полімерний журнал*. 2015. Т.37., №2. С.193-199.
112. Варваренко С.М., Фігурка Н.В., Самарик В.Я., Воронов А.С., Тарнавчик І.Т., Носова Н.Г, Дронь І.А., Тарас Р.С., Воронов С.А. Синтез та поверхнево-активні властивості нових поліестерів – псевдополіамінокислот на основі природних двоосновних α -амінокислот. *Доповіді НАН України*. 2013. № 5. С.131-139
- 113 Варваренко С.М., Фігурка Н.В., Самарик В.Я., Воронов А.С., Тарнавчик І.Т., Дронь І.А., Носова Н.Г., Воронов С.А. Нові амфіфільні поліестери псевдополіамінокислоти на основі природних двоосновних амінокислот та діолів, одержані через реакцію естерифікації Стегліха. *Полімерний журнал*. 2013. Т. 35., № 3. С.282-290.
- 114 Jeffrey S. Moore, Samuel I. Stupp Room temperature polyesterification. *Macromolecules*. 1990. Vol.23., No. 1. P.65-70.
115. С. М. Варваренко, М. В. Ференс, В. Я. Самарик, Н. Г. Носова, Н. В. Фігурка, Д. Д. Остапів, С. А. Воронов. Одержання кополіестерів флуоресцеїну і 2-(додеканаміно)пентадіонової кислоти за реакцією Стегліха. *Вопросы химии и химической технологии*. 2018. № 2 (117). С. 5–15.
- 116 Нагорняк М. І. Синтез та дослідження властивостей поліестерів на основі N-похідних глютамінової кислоти та полісахаридів : дисертація на здобуття

наукового ступеня кандидата хімічних наук : 02.00.06 – хімія високомолекулярних сполук / Нагорняк Михайло Ігорович ; Національний університет "Львівська політехніка". - Львів, 2017.

117. S. Xu, I. Held, B. Kempf [et.al.] The DMAP-Catalyzed Acetylation of Alcohols - A Mechanistic Study (DMAP=4-(dimethylamino)-pyridine). *Chemistry - A European Journal*. 2005. № 11. P. 4751-4757.

118 https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

119. Torchilin. V. P. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug. Ddiv. Rev.* 2006. Vol. 59., Iss. 14. 1532-1555.

120. Gross L., Ringsdorf H., Schupp H. Polymeric Anti-Tumor Agents on a Molecular and on a Cellular Level. *Angrew. Chem. Int. Edit.* 1981. Vol. 20., Iss. 4. P. 305-325.

121. Varvarenko S.M., Tarnavchuk I.T., Voronov A.S., Fihurka N.V., Dron I.A., Nosova N.G., Taras R.S., Samaryk V. Ya., Voronov S.A. Synthesis and colloidal properties of polyesters based on glutamic acids and glycols of different nature. *Chemistry and Chemical Technology*. 2013. Vol.7., N.2. P.164-168.

122. Chekh B.O., Ferens M.V., Ostapiv D.D., Samaryk V.Y., Varvarenko S.M., Vlizlo V.V. Characteristics of novel polymer based on pseudo-polyamino acids GluLa-DPG-PEG600: binding of albumin, biocompatibility, biodistribution and potential crossing the blood-brain barrier in rats. *Ukr.Biochem.J.* 2017. Vol. 89., Issue 4. P. 13-21.

123. Nagornyak M.I., Fihurka N.V., Samaryk V.Ya., Varvarenko S.M., Ferens M.V., Oleksa. V.V. Modification of polysaccharides by N-derivates of glutamic acid using Steglich reaction. *Chemistry and Chemical Technology*. 2016. Vol. 10., No. 4. P.23-27.

124. Тарас Р.С. Синтез псевдополіамінокислот розгалуженої будови та формування водних нанорозмірних дисперсій / Тарас Роман Степанович // Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук. НУ «ЛП», Львів.-2016.

125. K.Y. Lee, D.J. Mooney. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews*. 2001. Vol. 101, №7. P. 1869-1879.

126. J.A. Hubbel Bioactive biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999. Vol. 10. P.123-129.
127. L.G. Griffith. Polymeric biomaterials. *Acta materialia*. 2000. Vol. 48. P.263-277.
128. Todd R. Hoare, Daniel S. Kohane. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008. Vol. 49., Iss. 8. P. 1993-2007.
- 129 Варваренко С.М., Самарик В.Я., Влізло В.В., Остапів Д.Д., Носова Н.Г., Тарнавчик І.Т., Фігурка Н.В., Ференс М.В., Нагорняк М.І., Тарас Р.С., Яремчук І. М., Воронов А.С., Воронов С.А. Флуоресцеїновмісні тераностики на основі псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення лікарських засобів. // Полімерний журнал. - 2015. - т. 37, № 2. – Р. 193-199.
- 130 Фігурка Н. В. Поверхнево-активні псевдо-полі(амінокислоти) на основі дикарбонових А-амінокислот та їх колоїдно-хімічні властивості / Фігурка Наталія Володимирівна // Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук. НУ «ЛП», Львів.-2013.
131. Sourav Bhattacharjee. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016. Vol. 235. P. 337–351.
- 132 Lipinski C. Poor aqueous solubility - an industry wide problem in drug discovery. *Am.Pharm.Rev*. 2002.Vol. 5. P. 82–85.
- 133 Di, L., Fish, P., and Mano, T. Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discov.Today*. 2011. Vol. 17. P. 486–495.
- 134 Marupudi, N., Han, J., Li, K., Renard, V., Tyler, B., and Brem, H. Paclitaxel. A review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2007. Vol. 6. P. 609–621.
- 135 Myers D. Surfactants Science and Technology. New Jersey: Wiley, 2006. 400 p.
- 136 Rangel-Yagui C.O., Pessoa A., jr., Tavares L.C. H J. Micellar solubilization of drugs. *Pharm. Pharm. Sei*. 2005. Vol. 8., № 2. P. 147.
- 137 Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. H J. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Pharm. Sci*. 2003. Vol. 92., № 7. P. 1343.

- 138 Torchilin V.P., Lukyanov A.N., Gao Z, Papahadjopou-los-Stemberg B. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. Vol. 100., № 10. P. 6039-6044.
- 139 Torchilin V.P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J. Controlled Release*. 2001. Vol. 73., №2-3. P. 137-172.
- 140 Bromberg, L. Polymeric Micelles in Oral Chemotherapy. *J. Contr. Release*. 2008. Vol. 128. P. 99–112.
- ¹⁴¹Li Tao, Jennifer W Chan and Kathryn E Uhrich. Drug loading and release kinetics in polymeric micelles: Comparing dynamic versus unimolecular sugar-based micelles for controlled release. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2015. P.1–15. DOI: 10.1177/0883911515609814.
- 142 Howells, L.M., Moiseeva, E.P., Neal, C.P. et al. Predicting the Physiological Relevance of In Vitro Cancer Preventive Activities of Phytochemicals. *Acta Pharmacol. Sin*. 2007. Vol. 28. P. 1274–1304.
- 143 Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J. and Srimal, R.C. Multiple Biological Activities of Curcumin: A Short Review. *Life Sci*. 2006. Vol. 78. P. 2081–2087.
- 144 Aggarwal, B.B. and Harikumar, K.B. Potential Therapeutic Effects of Curcumin, the Anti-inflammatory Agent, Against Neurodegenerative, Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic, Autoimmune and Neoplastic Diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2009. Vol. 41. P. 40–59.
- 145 Sharma, R.A., Gescher, A.J. and Steward, W.P. Curcumin: The Story So Far. *Eur. J. Cancer*. 2005. Vol. 41. P. 1955–1968.
- 146 Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A. and Aggarwal, B.B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol. Pharm*. 2007. Vol. 4. P. 807–818.
- 147 Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S. et al. Polymeric Nanoparticle-encapsulated Curcumin (Nanocurcumin): A Novel Strategy for Human Cancer Therapy. *J. Nanobiotechnology*. 2007. Vol. 5. P. 3.

- 148 Sahu, A., Bora, U., Kasoju, N. and Goswami, P. Synthesis of Novel Biodegradable and Self-assembling Methoxy Poly (Ethylene Glycol) Palmitate Nanocarrier for Curcumin Delivery to Cancer Cells. *Acta Biomater.* 2008. Vol. 4. P. 1752–1761.
- 149 Anand P., Ajaikumar B., Kunnumakkara R. American Chemical Society Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol. Pharmaceutics.* 2007. V. 4., Iss. 6. P. 807–818.
- 150 H. Zheng, X.-Q. Zhan, Q.-N. Bian and X.-J. Zhang. Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors. *Chemical Communications.* 2013. Vol. 49. P. 429. doi: 10.1039/c2cc35997a.
- 151 J. T. Davies. A quantitative kinetic theory of emulsion type. 1. Physical chemistry of the emulsifying agent [in:] *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces, Proceedings of 2nd International Congress Surface Activity.* Butterworths, London, 1957. 426–438.
152. М. В. Ференс, Н. В. Фігурка, Т. М. Васи́лишин, О. В. Майкович, С. М. Варваренко. Дослідження амфифільних властивостей кополієстерів з хромофорними групами в системі вода-октанол. *Chemistry, Technology and Application of Substance=Хімія, технологія речовин та їх застосування.* 2018. Vol. 1., № 1. P. 145–151.
153. Mariia Yakoviv, Nataliia Fihurka, Nataliya Nosova, Volodymyr Samaryk, Taras Vasylyshyn, Svitlana Hermanovych, Stanislav Voronov, Sergiy Varvarenko. Researches of amphiphilic properties of copolyesters with chromophore groups. *Chemistry & Chemical Technology.* 2018. Vol. 12, № 3. P. 318–325.
- 154 Sontag W. A Comparative kinetic study on the conversion of fluoresceindiacetate to fluorescein in living cells and in vitro. *Radiat. Environ. Biophys.* 1977. Vol. 14., № 1. P.1–12.
155. Synthesis and study on hydrolytic properties of fluorescein esters. 2007. Vol. 72., No. 3. P. 322–326.
- 156 B. Rotmanand, B. W. Papermaster. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of National Academy of Sciences.* 1966. Vol. 55., Iss. 1. P. 134–141.

- 157 Hossein Eshghi, Fatemeh Ghafoorian, Mahdi Mehdi Bakavoli. Fluorometric assay of lipase by some new synthesized fluorescein aralkyl esters. *Res Chem Intermed.* 2015. Vol. 41. P. 5439–5449. DOI 10.1007/s11164-014-1671-0.
- 158 Ji-Kyung Choi, Jet Ho, Curry S, Qin D, Bittman R, Hamilton J. Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin. *Journal of Lipid Research.* 2002. Vol. 43. P. 1000-1010. DOI 10.1194/jlr.M200041-JLR200.
- 159.Разживина И.А., Чернышева М.Г., Соболева О.А., Бадун Г.А.Специфика взаимодействия альбумина человека и поверхностно-активных веществ в системе смешивающихся гидкостей. *Структура и динамика молекулярных систем.* 2011. №10. А.
- 160.Hossein Eshghi, Fatemeh Ghafoorian, Mahdi Mehdi Bakavoli. Fluorometric assay of lipase by some new synthesized fluorescein aralkyl esters. *Res Chem Intermed.* 2015. Vol. 41. P. 5439–5449. DOI 10.1007/s11164-014-1671-0.
161. Yakoviv M.V., Nosova N.G., Samaryk V.Y., Pasetto P., Varvarenko S.M. Study of physical interactions of fluorescein-containing amphiphilic copolyesters with albumin in aqueous dispersions. *Applied Nanoscience.* P. 1-9
162. В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін, Д. О. Мельничук, Л. І. Апуховська, В. Л. Галяс, В. І. Головаха, В. В. Сахнюк, В. А. Томчук. Ветеринарна клінічна біохімія. Біла Церква : Білоцерк. держ. аграр. ун-т, 2002. 399 с.
- 163 Kerleta V., Andrlík I., Braunmüller S., Franke T., Wirth M., Gab F. Poloxamer 188 Supplemented Culture Medium Increases the Vitality of Caco-2 Cells after Subcultivation and Freeze. *ALTEX.* 2010. V. 27., № 3. P. 191-197.
- 164 Segel L.D., Minten J.M., Schweighardt F.K. Fluorochemical emulsion APE-LM substantially improves cardiac preservation. *American J. Physiology.* 1992. V. 263., № 3. P. 730 – 739.
- 165 Yuhua S., Ligen L., Jiake C., Tongzhu S. Effect of Poloxamer 188 on deepening of deep second-degree burn wounds in the early stage. *Burns.* 2012. V. 38., № 1. P. 95 - 101

- 166 Paustian P. W., McPherson J. C., Haase R. R., Runner R. R., Plaoman K. M., Ward D. F., Nguyen F. H. Intravenous Pluronic F127 in early burn wound treatment in rat. *Burns*. 1993. V. 19., № 3. P. 187 - 191
- 167 Schmolka I. R. Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J. Biomed. Mater. Res.* 1972. V. 6., № 6. P. 571 – 582.
- 168 Redhead M., Mantovani G., Nawaz S., Carbone P., Gorecki D. C., Alexander C., Bosquillon C. Relationship between the Affinity of PEO-PPO-PEO Block Copolymers for Biological Membranes and Their Cellular Effects. *Pharm. Res.* 2012. V. 29., № 7. P. 1908 – 1918.
169. Барский И. Я-, Поляков Н. И., Якубскас В. А. Контактная микроскопия. М.: Медицина, 1976. 159 с.
- 170 Shchepinova M. M., Denisov S. S., Kotova E. A., Khailova L. S., Knorre D. A., Korshunova G. A., Tashlitsky V. N., Severin F. F., Antonenko Y. N. Dodecyl and octyl esters of fluorescein as protonophores. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1837., № 1. P. 149 – 158.
- 171 Terlouw O., Tanriseven O., Russel F. G., Masereeuw R. Metabolite anion carriers mediate the uptake of the anionic drug fluorescein in renal cortical mitochondria. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. V. 292., № 3. P. 968 – 973.
- 172 Zhang W., Shi Y., Chen Y., Yu S., Hao J., Luo J., Sha X., Fang X. Enhanced antitumor efficacy by Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed micelles against non-small cell lung cancer based on passive tumor targeting and modulation of drug resistance. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2010. V. 75., № 3. P. 341 – 353.
- 173 Nawaz S., Redhead M., Mantovani G., Alexander C., Bosquillon C., Carbone P. Interactions of PEO–PPO–PEO block copolymers with lipid membranes: a computational and experimental study linking membrane lysis with polymer structure. *Soft Matter.* 2012. V. 8., № 25. P. 6744 – 6754.
- 174 Wei Z., Yuan S., Hao J., Fang X. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by Pluronic P123/F127 block copolymers: Relationship between

copolymer concentration and inhibitory activity. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013. V. 83., № 2. P. 266 –274.

175 Hansch C., Dunn W.J. Linear relations between lipophilic character and biological activity of drugs. *J. Pharm. Sci.* 1972. Vol. 61. P. 1-19.

176 Hansch C. Quantitative approaches to pharmacological structure-activity relationships. In: Cavallito CJ (ed.). *Structure-Activity Relationships*. Oxford:Pergamon, 1973. Vol. 1. P. 75-165.

177 Batrakova E. V., Shu Li, Vinogradov S. V., Alakhov V. Y., Miller D. W., Kabanov A. V. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001. V. 299., № 2. P. 483 – 493.

178 Demina T, Grozdova I, Krylova O, Zhirnov A, Istratov V, Frey H, Kautz H, Melik-Nubarov N. Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their ability to disturb lipid bilayers. *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. P. 4042-4054.

179 Moghimi S. M., Hunter A. C. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.* 2000. V.18., № 10. P. 412 - 420

180 Palmer W. K., Emeson E. E., Johnston T. P. Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57BL/6 mouse. *Atherosclerosis*. 1998. V. 136., № 1. P. 115 – 123.

181 Warren A., Benseler V., Cogger V.C., Bertolino P., Le Couteur D.G. The impact of poloxamer 407 on the ultrastructure of the liver and evidence for clearance by extensive endothelial and kupffer cell endocytosis. *Toxicol Pathol.* 2011. V. 39., № 2. P. 390 – 397.

182 Schaer G.L., Spaccavento L. J., Browne K. F., Krueger K. A., Krichbaum D., Phelan J. M., Fletcher W. O., Grines C. L., Edwards S., Jolly M. K., Gibbons R. J. Beneficial effects of RheothRx injection in patients receiving thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation*. 1996. V. 94., № 3. P. 298 – 307.

183 Toth K., Bogar L., Juricskay I., Keltai M., Yusuf S., Haywood L. J., Meiselman H. J. The effect of RheothRx injection on the hemorheological parameters in patients with acute myocardial infarction – (CORE trial substudy). *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1997. V. 17., № 2. P. 117 – 125.

184 Hunter R., Strickland F., Kézdy F. The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. I. The role of hydrophile-lipophile balance. *J. Immunol.* 1981. V. 127., № 3. P. 1244 – 1250.

185 Johnston T. P., Miller S.C. Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. *J. Parenter. Sci. Technol.* 1985. V. 39., № 2. P. 83 – 89.

186 Emerich DF, Thanos CG. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. *Biomolecular engineering.* 2006. Vol. 23., Iss. 4. P. 171-84.

Додаток

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Дослідження амфифільних властивостей кополієстерів з хромофорними групами в системі вода-октанол / **М. В. Ференс**, Н. В. Фігурка, Т. М. Васишин, О. В. Майкович, С. М. Варваренко // Chemistry, Technology and Application of Substance=Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2018. Vol.1, № 1. P. 145–151. (*Особистий внесок: дослідження перерозподілу кополієстерів в системі вода-октанол, обговорення результатів, написання статті*).
2. Модифікація поліакриламідних гідрогелів із застосуванням поверхнево-активних псевдополіамінокислот / **М. В. Ференс**, В. Ф. Кір'янчук, А. В. Вороновська, С. М. Варваренко, С. А. Воронов // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2016. № 841. С. 444–450. (*Особистий внесок: синтез псевдополіамінокислот, дослідження їх колоїдно-хімічних характеристик, обговорення результатів*).
3. Флуоресцеїновмісні тераностики на основі псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення лікарських засобів. / С. М. Варваренко, В. Я. Самарик, В. В. Влізло, Д. Д. Остапів, Н. Г. Носова, І. Т. Тарнавчик, Н. В. Фігурка, **М. В. Ференс**, М. І. Нагорняк, Р. С. Тарас // Полімерний журнал. 2015. Т. 37, № 2. С. 193–199. (*Особистий внесок: дослідження поверхнево-активних властивостей флуоресцеїновмісних псевдополіамінокислот, обговорення результатів, участь у написанні статті*).
4. Флуоресцеїновмісні кополієстери глютамінової кислоти та поліетердіолів / **Ференс М. В.**, Н. Г. Носова, Н. В. Фігурка, С. М. Варваренко, В. Ф. Кір'янчук, С. А. Воронов // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2015. № 812. С. 443–448. (*Особистий внесок: синтез флуоресцеїновмісних кополієстерів, обговорення результатів, участь у написанні статті*).

5. Реакційна здатність гідроксильних груп зі складу сахарози в реакції Стегліха / М. І. Нагорняк, В. Я. Самарик, **М. В. Ференс**, І. А. Дронь. Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2015. № 812. С. 69–73. *(Особистий внесок: інтерпретація спектральних даних, обговорення результатів, участь у написанні статті)*.

6. Amphiphilic aminofuncional diesterethers as dispersed system stabilizers / **M. V. Ferens**, N. G. Nosova, N. V. Fihurka, I. A. Dron, S. M. Varvarenko // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». 2014. № 787: Хімія, технологія речовин та їх застосування. С. 358–361. *(Особистий внесок: дослідження поверхнево-активних властивостей отриманих діестеретерів, обговорення результатів, участь у написанні статті)*.

Статті у наукових фахових виданнях України, які входять до міжнародних наукометричних баз:

7. Researches of amphiphilic properties of copolyesters with chromophore groups / **Mariia Yakoviv**, Nataliia Fihurka, Nataliya Nosova, Volodymyr Samaryk, Taras Vasylyshyn, Svitlana Hermanovych, Stanislav Voronov, Sergiy Varvarenko // Chemistry & Chemical Technology. 2018. Vol. 12, № 3. P. 318–325. *(Особистий внесок: одержання кополіестерів, дослідження їх властивостей, обговорення результатів, написання статті)*

8. Одержання кополіестерів флуоресцеїну і 2-(додеканоїламіно)пентадіонової кислоти за реакцією Стегліха / С. М. Варваренко, **М. В. Ференс**, В. Я. Самарик, Н. Г. Носова, Н. В. Фігурка, Д. Д. Остапів, С. А. Воронов // Вопросы химии и химической технологии. 2018. № 2 (117). С. 5–15. *(Особистий внесок: виконання експериментальної роботи, обговорення результатів, написання статті)*

9. Characteristics of novel polymer based on pseudo-polyamino acids GluLa-DPG-PEG600: binding of albumin, biocompatibility, biodistribution and potential crossing the blood-brain barrier in rats / В. О. Chekh, **M. V. Ferens**, D. D. Ostapiv, V.Y.Samaryk, S.M. Varvarenko, V.V.Vlizlo // The Ukrainian Biochemical Journal.

2017. Vol. 89, iss. 4. P. 13–21. *(Особистий внесок: синтез псевдополіамінокислот різної структури, обговорення результатів, участь у написанні статті)*

10. Modification of polysaccharides by N-derivatives of glutamic acid using Steglich reaction / Mykhailo Nagornyak, Natalia Figurka, Volodymyr Samaryk, Serhiy Varvarenko, **Maria Ferens**, Victoria Oleksa // Chemistry & Chemical Technology. 2016. Vol. 10, № 4. P. 423–427. *(Особистий внесок здобувача: виконання частини експериментальної роботи, інтерпретація спектральних даних, обговорення результатів)*

Статті у закордонних виданнях, які входять до міжнародних наукометричних баз даних:

11. A study of an irreversible condensation of glutamic acid and polyoxyethylene/polyoxypropylene diols using thionyl chloride / Nataliia Fihurka, Ihor Tarnavchuk, Volodymyr Samaryk, Sergiy Varvarenko, Nataliya Nosova, Andriy Voronov, Mykhaylo Nagornyak, **Mariia Ferens**, Stanislav Voronov // Organic Preparations and Procedures International. 2018. Vol. 50, iss. 5. P. 502–508. *(Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

Статті у інших наукових періодичних виданнях України:

12. GluLa-DPG-PEG600 nanopolymer binds proteins and spreads to rats' organs and tissues / B. O. Chekh, **M. V. Ferens**, Y. V. Martyn, D. D. Ostapiv, V. V. Vlizlo. Біологічні студії=Studia Biologica. 2016. Т. 10, № 3/4. С. 17–24. *(Особистий внесок здобувача: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

13. Nanopolymer GluLa-DPG-PEG600-F can Penetrate into Cells and Deposit in Rats Body / B. Chekh, **M. Ferens**, N. Susol, S. Varvarenko, D. Ostapiv, V. Vlizlo // Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Біологічні науки. 2016. № 12. С. 138–142. *(Особистий внесок: синтез флуоресцеїнвмісних кополієстерів, обговорення результатів)*

14. Functional and structural state of rats' kidneys and liver under the influence of nanopolymer based on pseudopolyamino acids / B. O. Chekh, **M. V. Ferens**, Y. V. Martyn, D. D. Ostapiv, V. V. Vlizlo // Біологія тварин= The Animal biology. 2016. Т. 18, № 3.

С. 107–113. *(Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів, участь у написанні статті)*

Патенти на корисну модель:

15. № 119660 Спосіб одержання амфифільних кополієстерів природних двоосновних амінокислот та поліалкілендіолів розгалуженої будови та дисперсних середовищ на їх основі / Самарик В.Я., Тарас Р.С., Нагорняк М.І., Соловйова О.О., Козак І. А., Варваренко С.М., Носова Н.Г., **Ференс М.В.**, Воронов А.С., Тарнавчик І.Т., Воронов С.А. Патент опубліковано 10.10.2017, бюл. № 19/2017 *(Особистий внесок: апробація методик синтезу, синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

16. № 98749 Спосіб одержання кополієстерів двоосновних α -амінокислот та поліетергліколів / Варваренко С.М., Самарик В.Я., Воронов А.С., Носова Н.Г., Тарнавчик І.Т., Фігурка Н.В., Дронь І.А., **Ференс М.В.**, Нагорняк М.І., Тарас Р.С., Воронов С.А. Патент опубліковано 12.05.2015, бюл. № 9/2015 *(Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

Публікації у збірниках матеріалів та тез доповідей міжнародних і вітчизняних наукових конференцій:

17. **Mariia Yakoviv**, Olha Maikovych, Stanislav Voronov, Pamela Pasetto, Sergiy Varvarenko Multi-functional self-fluorescent micelles for controlled drug delivery and bioimaging // EastWest Chemistry Conference 10-12 October, 2018, Lviv, p. 111

18. **Yakoviv M.V.**, Nosova N.G., Samaryk V.Y., Varvarenko S.M., Pasetto P. Study of physical interactions of amphiphilic copolyester of fluorescein with albumin in aqueous dispersions // International conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018), 27 - 30 August, Kyiv, P.398.

19. **Yakoviv M.V.**, Pasetto P., Varvarenko S.M. Researches in amphiphilic properties of copolyesters with chromophore groups // II Всеукраїнська науково-практична конференція "Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості" – Херсон: ХНТУ, Україна, 22-23 травня 2018, с.35-36

20. **Яковів М.В.**, Варваренко С.М. Дослідження амфифільних властивостей кополієстерів з хромофорними групами в системі вода-октанол // II Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи», - Житомир, Україна, 16 травня, 2018, с.338
21. Василюшин Т.М., **Яковів М.В.**, Фігурка Н.В., Остапів Д.Д., Варваренко С.М. Синтез та властивості афифільних кополієстерів з спеціальними властивостями // XIX Міжнародна конференція студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії", – Київ, Україна, 22-24 травня, 2018,с.140.
22. Olha Maikovych, **Maria Ferens**, Taras Vasylyshyn, Serhiy Varvarenko. Porous polyacrylamide hydrogels – preparation and properties // 20th JCF-Frühjahrssymposium Jung Chemiker Forum, Konstanz, Germany, 2018, March 21st – 24th, p. 216.
23. **Ференс М. В.**, Варваренко С. М., Фігурка Н. В., Майкович О. В. Особливості кополіконденсації флуоресцеїну в умовах реакції Стегліха // I Міжнародна (XI Українська) наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених “Хімічні проблеми сьогодення 2018” – Вінниця, Україна, 27–29 березня, 2018, с.336.
24. **Ференс М.В.**, Майкович О.В., Берчук Н.С., Стасюк А.В., Василюшин Т.М. Застосування амінофункційних дієстерів глютамінової кислоти для створення парфумерно-косметичних засобів // IV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених і студентів «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості»– Херсон: ХНТУ, Україна, 30-31 жовтня, 2017, с. 61
25. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Nataliya Nosova, Nataliia Berchuk, Semen Khomyak, Stanislav Voronov. Amphiphilic fluorescent copolyesters for monitoring in drug delivery // IX International conference in chemistry Kyiv-Toulouse (ICKT-9), Kyiv, Ukraine, June 4-9, 2017, p.52.
26. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Stanislav Voronov and Dmytro Ostapiv. Copolyesters based on natural aminoacids with special properties for drug delivery system // 19th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium), Mainz, Germany, 2017, March 29th - April 1st, p. 106.

27. **Ференс М.В.**, Носова Н.Г., Кірянчук В.Ф., Вороновська А.В., Варваренко С.М., Воронов С.А. Поверхово-активні поліестеретери та композиції гідрогелів на їх основі // Міжнародна науково-технічна конференція «Сучасні технології одержання та переробки полімерних матеріалів», Львів, Україна, 21-23 вересня, 2016, С.98.
28. **Ференс М.В.**, Тарас Р.С., Товарницький А.І., Варваренко С.М. Синтез нанорозмірного магнетиту, модифікованого структурованими псевдополіамінокислотами поліестерного типу для доставки лікарських препаратів // III Міжнародна науково-практична конференція «Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво», Шостка, Україна, 23-25 листопада 2016 р., С. 104.
29. **Марія Ференс**, Сергій Варваренко, Володимир Самарик, Наталія Носова, Анна Вороновська, Станіслав Воронов, Богдан Чех, Дмитро Остапів. Флуоресцеїновмісні псевдополіамінокислоти – нові наносистеми для транспорту ліків // II Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми хімії та хімічної технології», Національний університет харчових технологій, Київ, Україна, 21-23 листопада 2016 р., С. 156-157
30. Voronovska A., Tovarnitskyi A., Zelenyak O., Ranevska M., Stasiuk A., **Ferens M.**, Fihurka N., Tarnavchuk I. Poly(ethylene glycol) and poly(propylene glycol) – containing aminofunctional copolyesters for biomedical application // International youth science forum «LITTERIS ET ARTIBUS», Lviv, Ukraine, 24-26 November 2016, P. 442.
31. Тарас Р.С., Нагорняк М.І., **Ференс М.В.**, Солодкий І.Т., Варваренко С.М., Самарик В.Я. Одержання амфифільних кополієстерів природних двоосновних амінокислот та поліалкілендіолів розгалуженої будови// Міжнародна науково-технічна конференція «Сучасні технології одержання та переробки полімерних матеріалів», Львів, Україна, 21-23 вересня, 2016, С.96.
32. **Ференс М.В.**, Нагорняк М.І., Цап В.Р., Варваренко С.М. Амінофункційні кополієстери із спеціальними властивостями для систем доставки ліків //XXIV

Українська конференція з органічної хімії, Полтава, Україна, 19-23 вересня, 2016, С. 261.

33. **M.V. Ferens**, S.M. Varvarenko, B.O. Chekh, N.G. Nosova, A.V. Panchenko. The introduction of fluorescein into the structure of pseudo-poly(amino acids) and study of their colloidal-chemical properties // International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO – 2016), Lviv, Ukraine, August 24-27, 2016, p.68.

34. **Mariia Ferens**, Roman Taras, Iryna Kozak, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Bogdan Chekh. Synthesis nanoscale magnetite, modified structured pseudopoliaminoacids polyester type for the delivery of drugs // 18th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium), Kiel, Germany, 2016, March 16-19, p. 184.

35. Chekh B. O., **Ferens M.**, Vlizlo V. V. Testing of P-116 based of nano-polymer system containing pseudo polyamino acids.// Abstract book for Conference for young scientist 2015, Kyiv, 2015, p. 117.

36. **Ференс Марія**, Кір'янчук Василина, Варваренко Сергій, Носова Наталя, Панченко Анна, Воронов Станіслав. Синтез та дослідження властивостей тераностичних систем доставки ліків з флуоресцеїновим фрагментом // Тези доповідей II Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми хімії та технології органічних хрещовин» (APCTOS2)». - Львів, Україна, 5–7 листопада 2015 р. С. 79.

37. **Марія Ференс**, Наталя Носова, Анна Панченко, Василина Кір'янчук, Сергій Варваренко, Станіслав Воронов. Флуоресцеїновмісні системи транспорту ліків на основі кополієстерів глютамінової кислоти та полієтердіолів // Тези доповідей XV наукової конференції “Львівські хімічні читання – 2015”. - м.Львів, 24–27 травня 2015 р. - С. 130.

38 **Ferens M.V.**, Ilchuk V.V., Nagornyak M.I., Panchenko A.V., Varvarenko S.M., Samaryk V.J. Synthesis and study of surface-active properties of aminofunctional fluorescent copolyesters. // Abstracts of the All-Ukrainian scientific-practical

conference "The concept of sustainable development and its implementation," Ternopil, Ukraine, 2015, April 16-18, P.126-127.

39. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Nataliia Fihurka, Stanislav Voronov. Synthesis of novel pseudo-poly(amino acid)s with fluorescein fragments and study of their properties // 17th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium), Munster, Germany, 2015, March 25-28, p. P2-034.

40. R.S.Taras, **M.V. Ferens**, V.Y. Samaryk, M.I.Nagornyak , V.V. Ilchuk, S.A.Voronov. Getting cross-stitched polyester type pseudopoliaminoacid.// VIII Ukrainian-Polish Conference "Polymer special applications" Bukovel, Ukraine, October 1-4, 2014.

41. **Mariia Ferens**, Nataliya Nosova, Iryna Dron, Viktoriya Ilchuk, Sergiy Varvarenko. Aminofunctional diesterethers as stabilizers dispersed phase. VIII Ukrainian-Polish Conference "Polymer special applications" Bukovel, Ukraine, October 1-4, 2014.

42. Nagornyak Mykhaylo, Fihurka Natalia, **Ferens Mariia**. Polyesters based on glutamic acid as potential polymer for biomedical application.// 16th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium), Jena, Germany, 2014, March 26-29, p. 181.