

УДК 544.77.022.532:544.022.51

## Міцели подвійних гідрофільних блок-кополімерів для доставки погано розчинних вітамінів у живих організмах

Н.М. Пермякова<sup>1</sup>, Т.Б. Желтоножська<sup>1</sup>, М.В. Ігнатівська<sup>2</sup>, В.І. Максін<sup>2</sup>, О.М. Якубчак<sup>2</sup>, Д.О. Климчук<sup>3</sup>, М.Я. Поліян<sup>1</sup>, Л.М. Гріщенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка

60, вул. Володимирська, Київ, 01033, Україна

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів та природокористування України

15, вул. Героїв Оборони, Київ, 03041, Україна

<sup>3</sup>Інститут Ботаніки, НАН України

2, вул. Терещенківська, Київ, 01601, Україна

*Розроблено нові ефективні біосумісні і частково біодеградабельні міцелярні наноконтейнери для інкапсуляції та доставки в живих організмах вітаміну Е та його аналогів, які є продуктами самозбірки асиметричних блок-кополімерів з хімічно комплементарними блоками (метокси)поліетиленоксиду та поліакрилової кислоти. Методами спектrophотометрії, пружного світлорозсіювання й електронної мікроскопії (ТЕМ) вивчено умови формування міцелярних структур, їх параметри і морфологію. Показано, що процес міцелоутворення розвивається у водному середовищі в області рН<5 за рахунок утворення в макромолекулах блок-кополімерів інтрамолекулярних полікомплексів з подальшою сегрегацією гідрофобних ділянок зв'язування блоків. Інкапсуляція синтетичного аналогу вітаміну Е –  $\alpha$ -токоферолацетату в розроблені міцелярні наноконтейнери дає змогу різко знизити терапевтичні дози препарату.*

**Ключові слова:** блок-кополімер, інтрамолекулярний полікомплекс, міцела,  $\alpha$ -токоферолацетат, інкапсуляція.

### Вступ.

Використання міцел гетерополімерів (міцелярних наноконтейнерів) як засобів інкапсуляції і транспортування токсичних та/або погано розчинних лікарських субстанцій в живих організмах – “гаряча тема” сучасної полімерної науки, біології, медицини та фармакології [1–6]. Для доставки погано розчинних у воді вітамінів, таких зокрема як вітамін Е, найчастіше використовують міцели природних поверхнево-активних речовин та їх модифікованих поліетиленоксидом похідних (звичайні та “невидимі” або “stealth” ліпосоми) [7–9], а також міцелярні структури амфифільних блок-кополімерів, утворені за рахунок самозбірки гідрофобних блоків [9]. Такі міцелярні структури містять гідрофільну “корону” (як правило, з блоків поліетиленоксиду) та гідрофобне “ядро”, яке формують блоки поліпропіленоксиду, поліамінокислот, поліестерів, полілактонів тощо [9]. У поданій роботі показано принципово новий тип міцелярних наносистем для доставки погано розчинних вітамінів, які є продуктами самозбірки асиметричних блок-кополімерів з хімічно комплементарними біосумісними і одним біодеградабельним блоками (метокси)поліетиленоксиду та поліакрилової кислоти (МОПЕО-*b*-ПАК і ПАК-*b*-ПЕО-*b*-ПАК). Встановлено їх високу ефективність при інкапсуляції

модельного синтетичного аналога вітаміну Е –  $\alpha$ -токоферолацетату ( $\alpha$ -ТОКА). На основі випробувань *in vivo* міцелярної системи  $\alpha$ -ТОКА/МОПЕО-*b*-ПАК на сімействах білих мишей показана можливість різкого зниження терапевтичної дози препарату завдяки інкапсуляції в міцелярні наноконтейнери.

### Експериментальна частина.

Асиметричні диблок- і триблок-кополімери (ДБК і ТБК) МОПЕО-*b*-ПАК та ПАК-*b*-ПЕО-*b*-ПАК з різною довжиною блоків синтезували методом радикальної блок-кополімеризації ПАК з (метокси)поліетиленгліколем (МО)ПЕГ за методикою [10, 11]. При цьому використовували МОПЕГ з  $M_n=5,3$  кДа, ПЕГ з  $M_n=6,0$  і 35,0 кДа, акрилову кислоту (АК) виробництва компанії “Fluka” (Germany) та діамонійгексанітратоцерат (ініціатор) від фірми “Aldrich” (USA). Мольні співвідношення компонентів у синтезах ДБК становили:  $[Ce^{IV}]/[МОПЕГ]=1$  та  $[Ce^{IV}]/[АК]=2,8 \cdot 10^{-2} \div 4,8 \cdot 10^{-3}$ , а в синтезах ТБК, відповідно:  $[Ce^{IV}]/[ПЕГ]=2$  і  $[Ce^{IV}]/[АК]=2,8 \cdot 10^{-2} \div 4,0 \cdot 10^{-3}$ . У попередніх роботах було встановлено матричний характер синтезу даних ДБК і ТБК, який полягав у вищій швидкості блок-кополімеризації порівняно з гомополімеризацією АК, проведеною за аналогічних експериментальних умов, що зумовлено кооперативною

Таблиця 1. Молекулярні характеристики диблок- і триблок-кополімерів

Кополімер	$M_{n(МО)ПЕО}$ , кДа	$M_{nПАК}$ , кДа	$M_{ДБК/ТБК}$ , кДа	$n^*$
ДБК1	5,3	7,8	13,1	0,9
ДБК2	5,3	9,3	14,6	1,1
ДБК3	5,3	17,6	22,9	2,0
ТБК1	6,0	5,8	17,6	0,6
ТБК2	35,0	28,3	91,6	0,5

\*Співвідношення ланок у блоках ПАК і (МО)ПЕО, осн-моль·(осн-моль)<sup>-1</sup>.

взаємодією зростаючих “дочірніх” ланцюгів ПАК з матрицями – блоками (МО)ПЕО [11]. Хоча обидва компоненти блок-кополімерів були гідрофільними, однак, на відміну від ПАК, зразки ДБК і ТБК у Н-формі не розчинялись у воді [11]. Тому ми переводили їх після синтезу у Na-форму добавками NaOH і ліофільно сушили. Хімічну будову синтезованих кополімерів і молекулярну масу блоків ПАК та макромолекул у цілому визначали методом <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопії як у роботах [12, 13]. Отримані результати наведені в табл. 1.

Процес міцелоутворення у розчинах синтезованих кополімерів досліджували фотографічним і спектрофотометричним методами, а також методом пружного світлорозсіювання. Оптичну густину міцелярних розчинів вимірювали за кімнатної температури і  $\lambda=500$  нм на спектрофотометрі Cary 50 Scan фірми “Varian” (USA), використовуючи кварцову кювету з  $l=1$  см. Величину мутності розчинів ( $\tau$ ) визначали за формулою  $\tau=D/l$ , де  $D$  – оптична густина розчинів за  $\lambda=500$  нм, а  $l$  – довжина кювети. Критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ) визначали методом пружного світлорозсіювання. Інтенсивність розсіювання вертикально поляризованого світла вимірювали на модернізованому приладі ФПС-3 (Росія) за  $\lambda=520$  нм і кута розсіювання  $\theta=90^\circ$  з використанням світлодіода WP7113VGC/A від “Kingbright”, контролера ADC-CPU™ фірми “Insoftus” (Україна) та програми “WINRECORDER”. Стандартну вільну енергію міцелоутворення Гіббса розраховували за відомою формулою:  $\Delta G^\circ \approx RT \cdot \ln KKM$  [14].

Морфологічні дослідження міцелярних структур проводили методом проникної (трансмисійної) електронної мікроскопії (ТЕМ) за допомогою електронного мікроскопа JEM-1230 фірми “JEOL” (Японія) за напруги 90 кВ. Для цього використовували розбавлені міцелярні розчини кополімерів, отримані у деіонізованій воді за рН=2,5÷3,5. Малі краплини ( $1 \cdot 10^{-4}$  см<sup>3</sup>) розбавлених міцелярних розчинів кополімерів наносили на мідні сіточки, вкриті плівкою формвару та вуглецю, і далі швидко висушували протягом ~0,5–1,0 хв. на повітрі, а потім у вакуум-ексикаторі за кімнатної температури.

Поведінку міцел ДБК і ТБК при зменшенні або підвищенні рН розчину досліджували методом оберненого потенціометричного титрування. Потенціометричне титрування водних розчинів синтезованих кополімерів у Na-формі 0,2 н. HCl проводили в термостатованій комірці при перемішуванні магнітною мішалкою

і постійному тоці аргону. Температура становила  $25 \pm 0,1$  °С. Е.р.с. комірки (скляний і хлорсрібний електроди) вимірювали на рН-метрі П-215 (Білорусь). Значення е.р.с. переводили в одиниці рН аналітичним способом за коефіцієнтами калібрувальної прямої, яку отримували за стандартними буферними розчинами. Точність визначення рН становила 0,02 одиниці. За аналогічних умов проводили титрування деіонізованої води (“холостого розчину”).

Ефективність інкапсуляції  $\alpha$ -ТОКА міцелами блок-кополімерів визначали методом УФ-спектроскопії, використовуючи явище фазового розділення сумішей  $\alpha$ -ТОКА з міцелами блок-кополімерів за низьких рН. Осад міцелярної фази з інкапсульованим  $\alpha$ -ТОКА, отриманий за рН=2,5÷3,0, відокремлювали центрифугуванням за швидкості  $6 \cdot 10^3$  об·хв<sup>-1</sup>. Спектри поглинання вихідних водно/спиртових розчинів блок-кополімерів і  $\alpha$ -ТОКА, а також відповідних супернатантів у системах  $\alpha$ -ТОКА/блок-кополімер знімали за кімнатної температури в області  $\lambda=200$ –1000 нм, використовуючи Varian Cary 50 scan UV/VIS спектрофотометр.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Раніше нами було показано, що макромолекули ДБК і ТБК утворюють у розбавлених водних розчинах інтрамолекулярні полікомплекси (ІнтраПК) [11, 15]. Разом з тим, взаємодія блоків ПАК і (МО)ПЕО за рахунок Н-зв’язків реалізується тільки в області низьких значень рН, де значна частина –COOH-груп блоків ПАК неіонізована. При взаємодії хімічно комплементарних блоків формуються гідрофобні ділянки зв’язування, подальша самозбірка яких у водному середовищі приводить до утворення міцелярних структур. Цей факт підтверджують фотографії розчинів ДБК і ТБК за різних рН та відповідні криві зміни оптичної густини (рис. 1, 2). Отримані результати дали змогу визначити області рН у розчинах кополімерів, де існувала міцелярна дисперсія. Так, у розчинах усіх зразків ДБК (незалежно від довжини блоків ПАК) утворення міцел спостерігали в області рН<3,5, а за рН~2,0 відбувалось навіть фазове розділення систем, що супроводжувалось зниженням їх мутності (рис. 2а). На відміну від цього, міцелоутворення у розчинах ТБК починалось за дещо вищих рН (рис. 1, 2б), що вказувало на більшу стабільність міцел цих блок-кополімерів.

Процес міцелоутворення характеризували двома параметрами: ККМ і стандартною вільною енергією міцелоутворення Гіббса. На рис. 3 наведені приклади

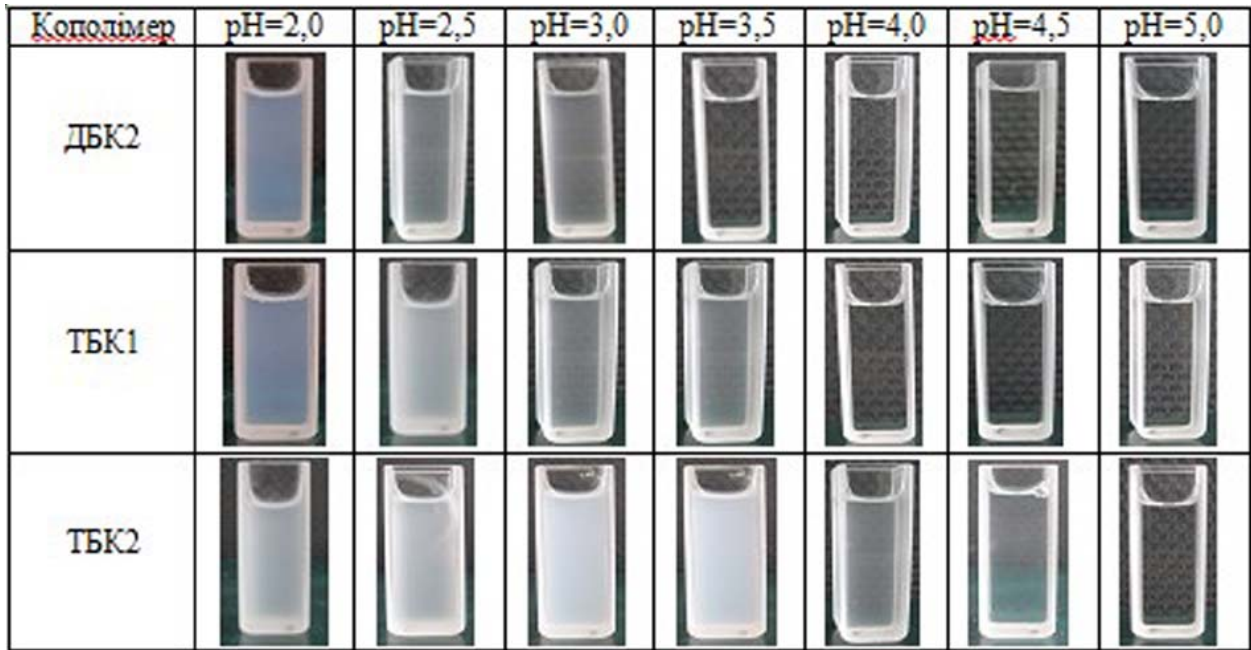


Рис. 1. Фотографії розчинів кополімерів за різної рН.  $C_{\text{ДБК/ТБК}}=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$

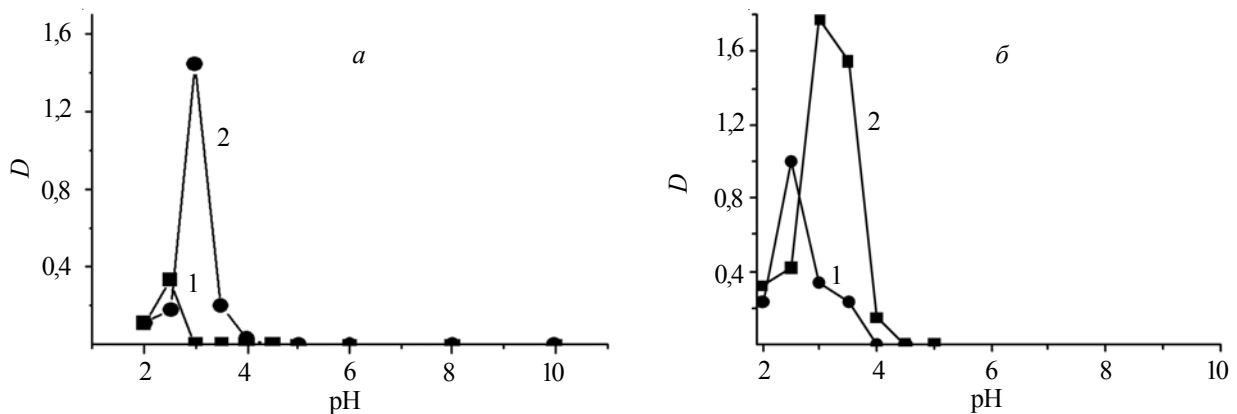


Рис. 2. Залежність оптичної густини розчинів ДБК3 за концентрації 1 (1) і 2  $\text{кг}\cdot\text{м}^{-3}$  (2) (а) та ТБК1 (1) і ТБК2 (2) за концентрації 1  $\text{кг}\cdot\text{м}^{-3}$  (б) від рН.  $\lambda=500 \text{ нм}$ ,  $T=22 \text{ }^\circ\text{C}$

визначення ККМ у розчинах ДБК і ТБК, а в табл. 2 наведені розраховані термодинамічні параметри. Видно, що

в ряду ДБК збільшення довжини іоногенного блоку призводить до зростання ККМ і зниження вільної енергії

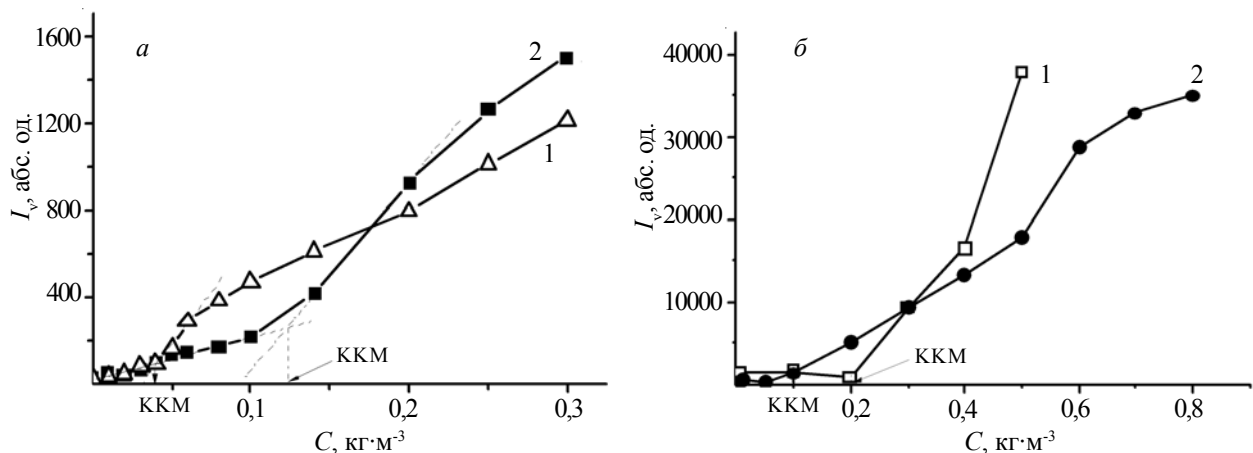


Рис. 3. Концентраційні залежності інтенсивності розсіювання вертикально поляризованого світла в розчинах ДБК1 (1) (а) і ДБК3 (2) (а) за рН=2,5 та ТБК1 (1) (б) за рН=3,5 і ТБК2 (2) (б) за рН=4,0.  $T=22 \text{ }^\circ\text{C}$

Таблиця 2. Термодинамічні параметри міцелоутворення диблок- і триблок-кополімерів

Кополімер	pH	$n^*$	ККМ · 10 <sup>6</sup> , моль · дм <sup>-3</sup>	-ΔG°, кДж · моль <sup>-1</sup>
ДБК1	2,5	0,9	2,9	31,3
ДБК2		1,1	4,1	30,4
ДБК3		2,0	4,2	30,4
ТБК1	3,5	0,6	4,7	30,1
ТБК2	4,0	0,5	1,8	32,4

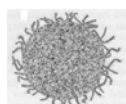
\*Співвідношення ланок у блоках ПАК і (МО)ПЕО, осн-моль · (осн-моль)<sup>-1</sup>.

міцелоутворення, тобто до зменшення стабільності міцел. Особливо різка зміна обох параметрів відбувається при переході від ДБК1 до ДБК2 (табл. 2), що повністю узгоджується зі змінами відносної довжини блоків (МО)ПЕО і ПАК, від якої залежить морфологія міцелярних структур. Зокрема, в макромолекулах ДБК1 блоки (МО)ПЕО довші, ніж у ПАК, тому надлишкові (незв'язані) ланки саме цих неіоногенних блоків утворюють "корону" міцел. У макромолекулах ДБК2 (і ДБК3) ситуація обернена, тому в "короні" сформованих ними міцелярних структур перебувають надлишкові частково заряджені ланки довших блоків ПАК, і їх електростатичне відштовхування зменшує стабільність міцел. У ряду триблок-кополімерів стабільність міцел ТБК2, макромолекули якого мають більшу довжину центрального і бічних блоків, виявилась набагато вищою, ніж міцел ТБК1 (табл. 2). Це можна пояснити формуванням більш розвинутих гідрофобних ділянок зв'язування хімічно комплементарних блоків при зростанні

їхньої довжини [16].

Отже, визначальним фактором процесу міцелоутворення у розчинах ДБК і ТБК є внутрішньомолекулярна кооперативна взаємодія блоків (МО)ПЕО і ПАК, яка реалізується в області pH < 4 і призводить до подальшої сегрегації гідрофобних ділянок зв'язування у водному середовищі. Морфологію міцелярних структур ДБК і ТБК можна прогнозувати, аналізуючи відносну довжину взаємодіючих блоків. Дійсно, оскільки комплексне "ядро" міцел складається зі зв'язаних водневими зв'язками сегментів обох блоків, то його розмір буде визначатися довжиною більш короткого блоку. Водночас розмір і будова гідрофільної "корони", яка формується з надлишкових незв'язаних ланок довших блоків, буде визначатися типом блок-кополімеру (ДБК або ТБК) і відотною довжиною взаємодіючих блоків. У випадку ДБК, якщо різниця між довжиною блоків (МО)ПЕО і ПАК невелика (параметр  $n$  в табл. 1, 2 близький до одиниці), у розчинах кополімерів будуть

"Обрізані" міцели



"Волохаті" міцели



"Квітковоподібні" міцели

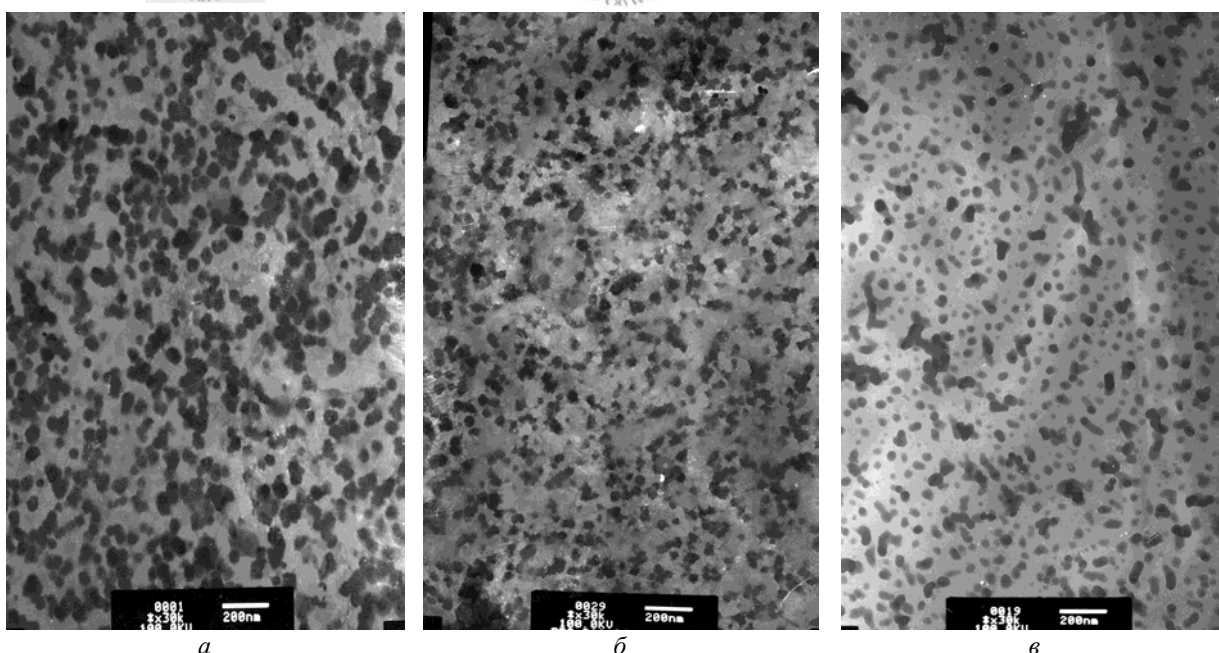
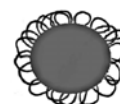


Рис. 4. Схематична будова "обрізаної", "волохатої" і "квітковоподібної" міцел та електронні мікрофотографії міцел ДБК2 (а) і ДБК3 (б), отриманих за pH=2,5 та ТБК1 (в), отриманих за pH=3,5.  $C_{\text{ДБК/ТБК}}=0,5$  (а, б) і 1,0 кг · м<sup>-3</sup> (в)



Таблиця 3. Розміри міцелярних структур блок-кополімерів

Кополімер	pH	$C$ , $\text{кг}\cdot\text{м}^{-3}$	$d_{\text{MMM}}$ *, нм	$d_{\text{ПММ}}$ ** , нм
ДБК2	2,5	0,5	4÷8	12÷68
ДБК3	2,5	0,5	2÷4	8÷31
ТБК1	3,5	1	4÷16	24÷58

\*Діаметр мономолекулярних міцел. \*\*Діаметр полімолекулярних міцел.

утворюватись так звані “обрізані” міцели з невеликою “коронаю” [15, 17]. Появу таких міцел слід очікувати у розчинах ДБК1 і ДБК2, однак, як обговорювалось вище, вони будуть мати різну стабілізуючу “корону”: або з надлишкових ланок (МО)ПЕО (в міцелах ДБК1), або з надлишкових ланок ПАК (у міцелах ДБК2). Разом з тим, якщо різниця у довжині обох блоків велика (як у зразку ДБК3), то будуть формуватись “волохаті” міцели з розвинутою “коронаю” [17].

Більш складний характер будуть мати міцели ТБК, оскільки утворення ІнтраПК в їх макромолекулах відбувається з обох боків довгих ланцюгів ПЕО. Таке комплексотворення призводить до утворення протяжних гідрофобних ділянок зв’язування на кінцях ПЕО, подальшої сегрегації цих ділянок у водному середовищі за рахунок гідрофобних взаємодій і, нарешті, до формування “квіткоподібних” міцел, стабілізованих “петлями” з надлишкових незв’язаних ланок довших блоків ПЕО. Утворення “квіткоподібних” міцел гідрофільними полімерами, які мають на обох кінцях гідрофобні групи або блоки і називаються “телехелевими”, добре відомо з літератури [18]. Схематичні зображення “обрізані”, “волохаті” та “квіткоподібні” міцел наведені у верхній частині рис. 4.

Реальну морфологію і розміри міцел ДБК і ТБК демонструють електронні мікрофотографії на рис. 4. Як видно з рисунка, макромолекули ДБК2 з малим співвідношенням  $n$  довжин полімерних блоків (табл. 1) утворюють переважно сферичні полімолекулярні міцели (рис. 4а), розміри яких подані в табл. 3. Вони мають невелику “корону”, що дає змогу віднести їх до міцел “обрізаного” типу. На відміну від цього, міцелярні структури ДБК3, які показані на мікрофотографії рис. 4б і мають також переважно сферичну морфологію, містять

розвинуту “корону”, що особливо яскраво проявляється при сильному збільшенні зображення. Отже, їх дійсно можна віднести до “волохатих” міцел. Характерно, що розміри “волохатих” міцел менші, ніж “обрізаних” (табл. 3), що підтверджує попередній висновок про меншу стабільність цих міцел за рахунок відштовхування заряджених ланок ПАК у розвинутій “короні”. Відрізняються від інших і міцели ТБК1 (рис. 4в), які мають найбільш гладку поверхню, що притаманно міцелам “квіткоподібного” типу [18].

Разом з тим, на мікрофотографіях рис. 4 було помічено багато маленьких темних точок, що вказувало на існування у розчинах кополімерів поряд з міцелами полімолекулярного типу (ПММ) також мономолекулярних міцел (МММ), які є фактично окремими ІнтраПК [19]. Розміри МММ також наведені в табл. 3.

Характер утворення/руйнування міцел ДБК і ТБК при зменшенні або підвищенні рН розчину, а саме: кооперативний (за принципом “все або нічого”) або поступовий (рівноважний) встановлювали на основі аналізу даних оберненого титрування водних розчинів кополімерів у Na-формі 0,2 н. HCl. За даними титрування розраховували криві поглинання протонів (рис. 5а) за відомою методикою [20], а також залежності від’ємного логарифма ефективної константи дисоціації –COOH-груп ДБК і ТБК (рК) від ступеня їх дисоціації  $\alpha$  [20,21] (рис. 5б). Таким чином було встановлено плавне зростання рК від  $\alpha$  для всіх зразків кополімерів, що характерно для слабких полікислот, які не мають конформаційного переходу у процесі іонізації кислотних груп. Це свідчить про поступовий (рівноважний) механізм процесу утворення/руйнування міцел ДБК і ТБК. Схематичне зображення процесів поступового руйнування міцел блок-кополімерів при

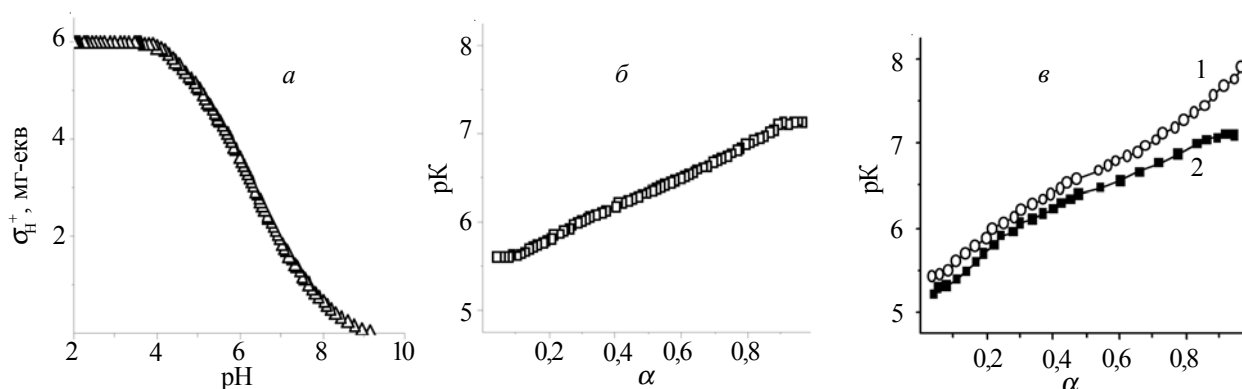


Рис. 5. Приклади залежностей величини поглинання протонів від рН (а) та рК від  $\alpha$  (б, в) для розчинів ДБК3 (а, б), ДБК2 (1) (в) та системи  $\alpha$ -ТОКА/ДБК2 (2) (в).  $C_{\text{БК}} = 1,0 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

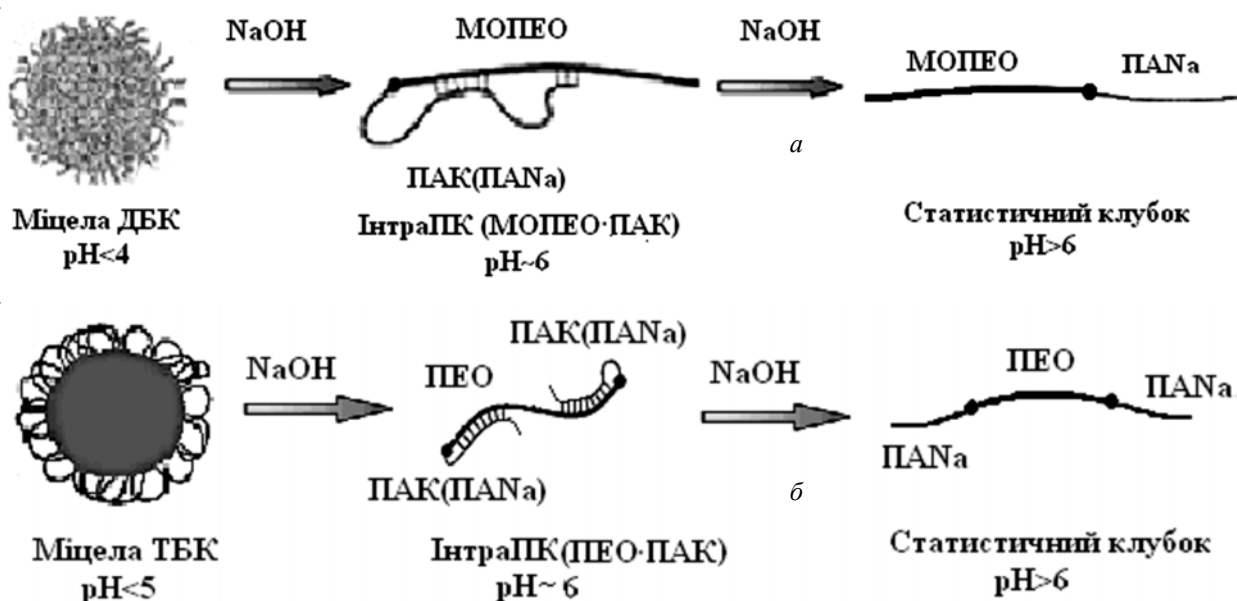


Рис. 6. Схеми руйнування міцел ДБК (а) і ТБК (б) при іонізації –COOH-груп блоків ПАК

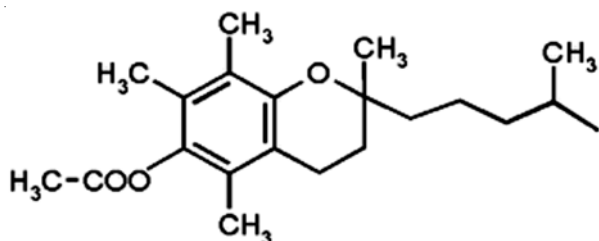


Рис. 7. Структурна формула  $\alpha$ -токоферолацетату

підвищенні рН розчину подано на рис. 6.

Для вивчення інкапсулюючої здатності міцел ДБК і ТБК щодо погано розчинних у воді вітамінів було обрано модельний препарат – синтетичний аналог вітаміну Е (DL-форма  $\alpha$ -токоферолацетату,  $\alpha$ -ТОКА) (рис. 7), який було синтезовано за розробленою методикою [22]. В цих експериментах використовували зразки ДБК2, ТБК1 і ТБК2 (табл. 1, 2). Гомогенне змішування

невеликого об'єму спиртового розчину  $\alpha$ -ТОКА з міцелами блок-кополімерів у воді проводили за рН~3–4. Співвідношення між компонентами системи складало  $\varphi=0,1$  моль  $\alpha$ -ТОКА  $\cdot$  (осн-моль  $_{\text{ПАК}})^{-1}$ . Взаємодія міцел блок-кополімерів з  $\alpha$ -ТОКА викликала посилення мутності дисперсій і, навіть, їх фазове розділення через 24 год. Додаткова гідрофобізація міцелярних систем, зумовлена взаємодією з  $\alpha$ -ТОКА, була підтверджена даними оберненого потенціометричного титрування розчину ДБК2 та суміші  $\alpha$ -ТОКА/ДБК2 (рис. 5в). Характер залежності рК від  $\alpha$  для суміші (крива 2) нагадував конформаційний перехід типу *глобула-клубок*, який відбувається в макромолекулах поліелектролітів, що мають за низьких  $\alpha$  специфічну компактну конформацію [21]. Це свідчило про стабілізацію структури міцел за рахунок інкапсуляції препарату.

Ступінь інкапсуляції  $\alpha$ -ТОКА міцелами блок-кополімерів визначали методом УФ-спектроскопії,

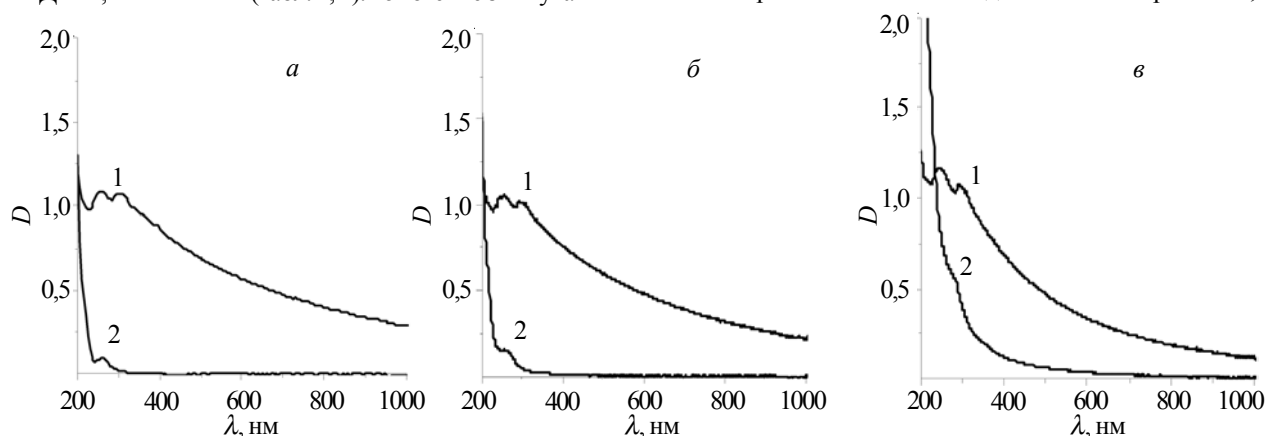


Рис. 8. УФ-спектри  $\alpha$ -ТОКА (1) і супернатантів у системах:  $\alpha$ -ТОКА/ДБК2 (2) (а),  $\alpha$ -ТОКА/ТБК1 (2) (б) та  $\alpha$ -ТОКА/ТБК2 (2) (в). Розчинник: EtOH/H<sub>2</sub>O=5/95 % об.; рН=2,543,0;  $C_{\alpha\text{-ТОКА}}=0,08$  кг·м<sup>-3</sup>;  $C_{\text{ДБК/ТБК}}=1$  кг·м<sup>-3</sup>;  $\varphi=0,1$  моль  $\alpha$ -ТОКА  $\cdot$  (осн-моль  $_{\text{ПАК}})^{-1}$

Таблиця 4. Ефективність інкапсуляції  $\alpha$ -ТОКА міцелами блок-кополімерів

Система	$C_{\text{ДБК/ТБК}}$ , кг·м <sup>-3</sup>	$C_{\alpha\text{-ТОКА}}$ , кг·м <sup>-3</sup> (вихідна)	$C_{\alpha\text{-ТОКА}}$ , кг·м <sup>-3</sup> (супернатант)	$X_{\alpha\text{-ТОКА}}$ *, % мас.
$\alpha$ -ТОКА/ДБК2	1,0	0,25	0,003	98,8
$\alpha$ -ТОКА/ТБК1	1,0	0,25	0,005	98,2
$\alpha$ -ТОКА/ТБК2	1,0	0,24	0,002	99,0

використовуючи описане вище явище фазового розділення сумішей за низьких рН. УФ-спектри вихідного водно/спиртового розчину  $\alpha$ -ТОКА та відповідних супернатантів подані на рис. 8. УФ-спектр вихідного розчину  $\alpha$ -ТОКА містив широку смугу поглинання з  $\lambda_{\text{max}} \sim 260$  нм (рис. 8, спектри 1), яка відповідала електронному переходу  $\pi-\pi^*$  в бензолному кільці [23]. Аналогічну смугу, але дуже малої інтенсивності, спостерігали і в спектрах супернатантів (рис. 8, спектри 2). Ефективність інкапсуляції  $\alpha$ -ТОКА розраховували з цих даних шляхом порівняння інтегральних інтенсивностей вказаної смуги у вихідних розчинах  $\alpha$ -ТОКА та у супернатантах; результати подані в табл. 4. Ступінь зв'язування  $\alpha$ -ТОКА був дуже високий (близько 100 % мас.), тобто практично весь введений  $\alpha$ -ТОКА (за обраної концентрації та співвідношення  $\phi$ ) зв'язувався міцелами блок-кополімерів. Найбільшу зв'язувальну здатність демонстрували міцели ТБК2, які, згідно з табл. 2, були найбільш стабільними у кислому середовищі. Випробування *in vivo* біологічної активності  $\alpha$ -ТОКА, інкапсульованого в міцели ДБК2, у порівнянні з дією індивідуального аналога вітаміну Е, проводили на сімействах білих мишей віком 45 діб. Для цього використовували 4 групи мишей по 10 у кожній. Дві групи були контрольними. В 1-ій мишам давали тільки їжу і питну

воду, в 2-ій додавали також чистий  $\alpha$ -ТОКА у вигляді водної дисперсії за концентрації 0,25 кг·м<sup>-3</sup>. Інші 2 групи мишей були дослідними, яким крім їжі і питної води додавали міцелярну систему  $\alpha$ -ТОКА/ДБК2 за двох концентрацій аналога вітаміну Е ( $C=0,25$  і  $0,01$  кг·м<sup>-3</sup> у 1-ій та 2-ій дослідних групах відповідно).

Стан мишей: загальний вигляд, життєдієвість, густину шерстки та приріст ваги тварин контролювали протягом 3-х місяців. Після цього визначали вагу окремих органів тварин: печінки, селезінки, правої та лівої нирки, і досліджували комплекс біохімічних показників сироватки крові, таких як вміст аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ) і лужної фосфатази, коефіцієнт Рітіса, загальний білірубін, загальний білок, а також вміст глюкози, амілази, креатиніну та сечовини. Ці показники дали змогу оцінити біологічну дію чистого  $\alpha$ -ТОКА та міцелярної системи на процеси метаболізму в організмах мишей, а також діяльність печінки, підшлункової залози та нирок.

Загальним позитивним результатом було те, що використання міцелярної системи  $\alpha$ -ТОКА/ДБК2 за обох її концентрацій не призводило до погіршення загального стану тварин та їхньої активності. Протягом усього часу випробувань жодна тварина не захворіла і не загинула. Тварини мали добрий апетит і вільне

Таблиця 5. Зміна живої маси мишей в контрольних і дослідних групах

Період вимірювань	Жива маса тіла, г			
	Контрольні групи		Дослідні групи	
	1-а	2-а	1-а	2-а
На початку дослідю	21,6 $\pm$ 0,72	20,9 $\pm$ 0,82	22,6 $\pm$ 0,82	23,0 $\pm$ 1,23
Через 1 місяць	26,5 $\pm$ 0,92	26,4 $\pm$ 1,36	28,7 $\pm$ 0,62	28,0 $\pm$ 1,23
Через 2 місяці	31,3 $\pm$ 3,69	32,2 $\pm$ 0,51	33,4 $\pm$ 0,51	33,7 $\pm$ 1,02
Через 3 місяці	33,5 $\pm$ 0,92	33,9 $\pm$ 0,51	34,6 $\pm$ 0,82	34,6 $\pm$ 1,03

Таблиця 6. Біохімічні показники сироватки крові мишей через 90 діб

Показники	Групи мишей			
	Контрольні		Дослідні	
	1-а	2-а	1-а	2-а
АлАТ*, Од·дм <sup>-3</sup>	119,0 $\pm$ 0,21	110,3 $\pm$ 3,29	89,0 $\pm$ 2,88	104,7 $\pm$ 3,08
АсАТ**, Од·дм <sup>-3</sup>	159,0 $\pm$ 4,01	146,7 $\pm$ 5,04	118,4 $\pm$ 3,49	139,5 $\pm$ 9,56
Коефіцієнт Рітіса***	1,34	1,33	1,33	1,33
Лужна фосфатаза, Од·дм <sup>-3</sup>	113,00 $\pm$ 8,12	107,00 $\pm$ 6,99	76,33 $\pm$ 0,72	97,00 $\pm$ 1,23
Загальний білірубін, мкмоль·дм <sup>-3</sup>	16,00 $\pm$ 0,72	12,00 $\pm$ 0,51	11,67 $\pm$ 0,51	10,67 $\pm$ 0,31
Загальний білок, г·дм <sup>-3</sup>	60,90 $\pm$ 0,99	59,37 $\pm$ 0,68	62,67 $\pm$ 0,64	62,67 $\pm$ 0,03
Глюкоза, ммоль·дм <sup>-3</sup>	7,10 $\pm$ 0,05	8,90 $\pm$ 0,12	8,90 $\pm$ 0,15	8,97 $\pm$ 0,17
Амілаза, Од·дм <sup>-3</sup>	4506 $\pm$ 36,17	2698 $\pm$ 9,66	2986 $\pm$ 23,84	3299 $\pm$ 116,4
Креатинін, ммоль·дм <sup>-3</sup>	40,00 $\pm$ 1,03	17,33 $\pm$ 0,72	21,67 $\pm$ 2,36	25,00 $\pm$ 3,39
Сечовина, ммоль·дм <sup>-3</sup>	19,00 $\pm$ 0,69	7,83 $\pm$ 0,28	9,60 $\pm$ 0,65	10,47 $\pm$ 1,09

\*Вміст аланінамінотрансферази. \*\*Вміст аспартатамінотрансферази. \*\*\*Співвідношення між АсАТ і АлАТ.

Таблиця 7. Маса органів мишей через 90 діб

Орган	Маса, г			
	Контрольні групи		Дослідні групи	
	1-а	2-а	1-а	2-а
Печінка	1,74 $\pm$ 0,10	1,76 $\pm$ 0,67	2,10 $\pm$ 0,09	1,95 $\pm$ 0,05
Селезінка	0,21 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02
Права нирка	0,27 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01
Ліва нирка	0,25 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01

напування досхоchu. Вже через місяць від початку досліду у 2-х дослідних групах мишей спостерігали позитивні відмінності щодо стану шерстного покриву: шерстка була густа, добре прилягала до тіла, була блискуча і міцно зафіксована в шкірі. У контрольних групах лабораторних тварин, яким не давали препарат або застосовували його дисперсію у воді без міцелярного носія, шерстний покрив був дещо тьмянний.

Приріст ваги тварин при додаванні чистого  $\alpha$ -ТОКА та того ж препарату, але інкапсульованого в міцели ДБК2, відображають дані табл. 5. Протягом 3-х місяців у всіх групах мишей спостерігали позитивну динаміку приросту ваги, проте у дослідних групах результати були істотно кращі у порівнянні як з 1-ю, так і з 2-ю контрольними групами. Важливим висновком було також те, що у 25 разів менша концентрація системи  $\alpha$ -ТОКА/ДБК2 (у 2-ій дослідній групі) забезпечувала такий самий приріст ваги мишей, як і висока її концентрація (табл. 5). Це відкрило перспективу зниження ефективної дози  $\alpha$ -ТОКА у 25 разів за рахунок використання міцелярного носія.

Біохімічні показники сироватки крові мишей, а також середня вага їхніх органів, які були визначені після 3-х місяців відгодовування тварин, подані в табл. 6 і 7.

Існує декілька біохімічних показників (маркерів), які характеризують роботу печінки та жовчовивідних шляхів: вміст ферментів, таких як АлАТ, АсАТ і лужна фосфатаза, а також вміст білка та білірубину. Головним показником роботи підшлункової залози та її протоків є вміст у сироватці крові ферменту амілази, який виробляється головним чином у клітинах цієї залози [24]. Вміст глюкози є показником вуглеводного обміну в організмі і стану підшлункової залози, в той час як вміст креатиніну і сечовини, які є продуктами обміну білків і виводяться через нирки, характеризує діяльність нирок і сечовивідних протоків [24, 25]. Важливим показником стану організму є також коефіцієнт Рітиса (співвідношення між АсАТ і АлАТ), який для здорового організму повинен дорівнювати 1,33.

У відповідності з даними табл. 6, систематичне введення чистого  $\alpha$ -ТОКА в організм мишей протягом 3-х місяців викликало такі зміни біохімічних показників сироватки крові порівняно з аналогічними показниками для 1-ої контрольної групи. Спостерігали невелике зниження вмісту АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази,

білірубину та вмісту загального білка. Спостерігали також істотне зниження вмісту амілази (на 40,1%), креатиніну (на 56,7%) та сечовини (на 58,8%) і підвищення вмісту глюкози (на 25,4%). Оскільки ферменти АлАТ і (меншою мірою) АсАТ та лужна фосфатаза, а також білірубін, білки та продукти їх обміну (креатинін і сечовина) виробляються клітинами печінки, одночасне зниження їх вмісту у сироватці крові свідчить про певне пригнічення функції печінки в результаті тривалого введення  $\alpha$ -ТОКА. Водночас відзначене підвищення вмісту глюкози і зниження вмісту амілази вказують на незначне порушення під впливом тривалого використання препарату роботи підшлункової залози.

Застосування міцелярної системи  $\alpha$ -ТОКА/ДБК2 призводило до додаткового зниження показників АлАТ і АсАТ у сироватці крові мишей (разом зі зниженням вмісту лужної фосфатази) за невеликого збільшення вмісту білка і практично незмінного рівня білірубину (табл. 6). Цей ефект помітно зростав при збільшенні концентрації системи у 25 разів, але за малої її концентрації додаткове зменшення показників було незначним (5,1; 4,9 і 9,3% для показників АлАТ, АсАТ і лужної фосфатази відповідно). Щодо інших показників сироватки крові, то вони при використанні міцелярної системи  $\alpha$ -ТОКА/ДБК2 або залишались на тому ж рівні, як вміст глюкози, або навіть покращувались порівняно з ефектом від чистого  $\alpha$ -ТОКА. Це такі показники як вміст амілази, креатиніну і сечовини (табл. 6). При використанні міцелярної системи, особливо високої концентрації, була помітна слабка тенденція до збільшення середньої ваги печінки мишей порівняно з 1-ю контрольною групою (табл. 7), проте порівняно з 2-ю контрольною групою, якій додавали чистий  $\alpha$ -ТОКА, ніяких змін у межах експериментальної похибки не було. Постійне значення (1,33) у 2-ох дослідних і 2-ій контрольній групах мишей мав також важливий коефіцієнт Рітиса (табл. 6).

#### Висновки.

Проведені дослідження показали, що міцели ДБК – це ефективні наноконтейнери для інкапсуляції і доставки аналога вітаміну Е в живих організмах, які забезпечують повне засвоєння тваринами інкапсульованого  $\alpha$ -ТОКА та відкривають реальну можливість зниження активної концентрації препарату у 25 разів при збереженні ефективності його дії. При використанні таких міцелярних наноконтейнерів, заповнених  $\alpha$ -ТОКА, не відбувалось істотних розладів у процесах метаболізму мишей порівняно з дією чистого препарату. Крім того, міцелярні носії на основі ДБК добре “віддавали”  $\alpha$ -ТОКА в організмах мишей, а потім виводилися з нього. Можна прогнозувати, що такі міцелярні наноконтейнери будуть мати таку ж високу ефективність і в процесах інкапсуляції та доставки інших погано розчинних у воді вітамінів, зокрема таких як вітаміни А, D і К.



## Література

1. *Torchilin V.P.* (Ed.) Nanoparticulates as drug carriers. – London, Imperial College Press, 2006. – 754 p.
2. *Kwon G.S., Forrest M.L.* Amphiphilic block copolymer micelles for nanoscale drug delivery // *Drug. Develop. Res.* – 2006. – **67**. – P. 15-22.
3. *Желтоножська Т.Б., Недашківська В.В., Федорчук С.В., Парцевська С.В., Пермякова Н.М., Костенко Л.С.* Мицелярні наноконтейнери на основі блок-кополімерів з хімічно комплементарними компонентами для токсичних нерозчинних у воді лікарських субстанцій // *Доп. НАН України.* – 2011. - № 6. - С. 143-150.
4. *Ohya Y., Takahashi A., Nagahama K.* Biodegradable polymeric assemblies for biomedical materials // *Adv. Polym. Sci.* – 2012. – **247**. – P. 65-114.
5. *Zhang Q., Ko N.R., Oh J.K.* Recent advances in stimuli-responsive degradable block copolymer micelles: synthesis and controlled drug delivery applications // *Chem. Commun.* – 2012. – **48**. – P. 7542-7552.
6. *Letchford K., Burt H.* A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2007. – **65**. – P. 259-269.
7. Pat. USA 5567433 A. Liposome preparation and material encapsulation method / Collins D. – Publ. 1996.
8. *Torchilin V.P.* Multifunctional nanocarriers // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2006. – 58. P. 1532–1555.
9. Patent USA 8173167 B2. Micelle composition of polymer and passenger drug/ Kwon G.S., Forrest M.L. – Publ. 2012.
10. *Долгопlock Б.А., Тинякова Е.И.* Окислительно-восстановительные системы как источники свободных радикалов. – М.: Наука, 1972. – 240 с.
11. *Пермякова Н.М.* Кінетичні закономірності блок-кополімеризації полі-акрилової кислоти з монометилловим етером поліетиленгліколю // *Полімер. журн.* – 2008. – **30**, № 3. – С. 222-226.
12. *Li P., Li Z., Huang J.* Water-soluble star brush copolymer with four arms composed of poly(ethylene oxide) as backbone and poly(acrylic acid) as side chain // *Macromolecules.* -2007. – **40**. – P. 491-498.
13. *Poe G. D., Jarrett W.L., Scales C.W., McCormick C.L.* Enhanced coil expansion and intrapolymer complex formation of linear poly(methacrylic acid) containing poly(ethylene glycol) graft // *Macromolecules.* – 2004. – **37**. – P. 2603-2612.
14. *Shen H., Zang L., Eisenberg A.* Thermodynamics of crew-cut micelle formation of polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) diblock copolymers in DMF/H<sub>2</sub>O mixtures // *J. Phys. Chem. Part B.* – 1997. – **101**. – P. 4697-4708.
15. *Permyakova N., Zheltonozhskaya T., Revko O., Grischenko L.* Self-assembly and metalation of pH-sensitive double hydrophilic block copolymers with interacting polymer components // *Macromol. Symp.* – 2012. – **317-318**, № 1. – P. 63-74.
16. *Кабанов В.А., Патисов И.М.* Комплексообразование между комплементарными синтетическими полимерами и олигомерами в разбавленных растворах // *Высокомолекулярные соединения. Сер. А.* – 1979. – **21**, № 2. – С. 243-281.
17. *Riess G.* Micellization of block copolymers // *Prog. Polym. Sci.* – 2003. – **28**. – P. 1107–1170.
18. *Alexandridis P., Hatton T.A.* Block Copolymers. Polymer materials encyclopedia 1. – Boca Raton: CRC Press, 1996. – P. 743-754.
19. *Zheltonozhskaya T., Partsevskaya S., Fedorchuk S., Klymchuk D., Gomza Yu., Permyakova N., Kunitskaya L.* Micellar nanocontainers based on PAAm-*b*-PEO-*b*-PAAm triblock copolymers for poorly soluble drugs // *Europ. Polym. J.* – 2013. – **49**, № 2. – P. 405-418.
20. *Кенчингтон А.* Аналитические методы белковой химии. Кривые титрования – М.: Иностран. л-ра, 1963. – С. 394-423.
21. *Желтоножская Т.Б., Поп Г.С., Еременко Б.В., Усков И.А.* Исследование свойств и конформаций в растворе сополимера стирола с N,N-диэтиламинопропилмоноамидом малеиновой кислоты // *Высокомолекулярные соединения. Сер. А.* – 1981. – **23**, № 11. – С. 2425-2435.
22. *Маковецкий В.П., Максін В.І., Курапова Т.М., Власенко С.О.* Дослідження антирадикальної та антиокиснювальної активності сполук МВ-похідних оксихроманів та триметилфенолів. // *Біоресурси і природокористування.* – 2010. – № 1-2. – С. 28-33.
23. *Преч Э., Бюльманн Ф., Аффельтер К.* Определение строения органических соединений. – Москва: Мир; Бинном. Лаборатория знаний. – 2006. – 438 с.
24. *Левченко В.І.* Ветеринарна клінічна біохімія. – Біла Церква, 2002. – 400 с.
25. *Приходько О.О.* Морфофункціональні зміни периферичної крові в умовах дії екзогенних чинників хімічної природи // *Вісник Сумськ. держ. ун-ту. Сер. медицина.* – 2010. – № 2. – С. 42-47.

Надійшла до редакції 16 листопада 2015 р.

## Мицеллы двойных гидрофильных блок-сополимеров для доставки плохо растворимых витаминов в живых организмах

Н.М. Пермякова<sup>1</sup>, Т.Б. Желтоножская<sup>1</sup>, М.В. Игнатовская<sup>2</sup>, В.І. Максін<sup>2</sup>, О.М. Якубчак<sup>2</sup>, Д.О. Климчук<sup>3</sup>, М.Я. Поляян<sup>1</sup>, Л.М. Грищенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
60, ул. Владимирская, Киев, 01033, Украина

<sup>2</sup>Национальный университет биоресурсов и природоиспользования Украины  
15, ул. Героев Оборона, Киев, 03041, Украина

<sup>3</sup>Институт Ботаники НАН Украины  
2, ул. Терещенковская, Киев, 01601, Украина

*Разработаны новые эффективные биосовместимые и частично биodeградируемые мицеллярные наноконтейнеры для инкапсуляции и доставки в живых организмах витамина E и его аналогов, которые являются продуктами самосборки асимметричных блок-сополимеров с химически комплементарными блоками (метокси)полиэтиленоксида и полиакриловой кислоты. Методами спектрофотометрии, упругого светорассеяния и электронной микроскопии (ТЭМ) изучены условия формирования мицеллярных структур, их параметры и морфология. Показано, что процесс мицеллообразования развивается в водной среде в области pH<5 за счет образования в макромолекулах блок-сополимеров интрамолекулярных поликомплексов с последующей сегрегацией гидрофобных областей связывания блоков. Инкапсуляция синтетического аналога витамина E – α-токоферолацетата в разработанные мицеллярные наноконтейнеры позволяет резко снизить терапевтические дозы препарата.*

**Ключевые слова:** блок-сополимер, интрамолекулярный поликомплекс, мицелла, α-токоферолацетат, инкапсуляция

## Double-hydrophilic block copolymer micelles for drug delivery of poorly soluble vitamins in living organisms

N.M. Permyakova<sup>1</sup>, T.B. Zheltonozhskaya<sup>1</sup>, M.V. Ignatovskaya<sup>2</sup>, V.I. Maksin<sup>2</sup>, O.N. Iakubchak<sup>2</sup>, D.O. Klymchuk<sup>3</sup>, M.Ya. Poliyani<sup>1</sup>, L.N. Grishchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Taras Shevchenko University of Kiev, Faculty of Chemistry  
60, Vladimirska str., Kyiv, 01033, Ukraine

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine  
17, Heroyiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine

<sup>3</sup>Institute of Botany NAS of Ukraine  
2, Tereshchenkivska str., Kyiv, 01601, Ukraine

*New effective biocompatible and partly biodegradable micellar nanocontainers for encapsulation and delivery of the vitamin E and its analogues in the living organisms were created. Such micellar nanocarriers are products of self-assembly of asymmetric block copolymers with chemically complementary (methoxy)poly(ethylene oxide) and poly(acrylic acid) blocks. The conditions of micellar structures formation, their parameters and morphology were studied by UV-Vis spectroscopy, static light scattering and transmission electron microscopy (TEM). It was shown, that the micellization process develops in aqueous media at pH<5 due to hydrophobic interactions between non-polar bound segments of both blocks. The encapsulation of synthetic analogue of the vitamin E – α-Tocopherol acetate in created micellar nanocontainers could dramatically reduce the therapeutic doses of medication.*

**Keywords:** block copolymer, intramolecular polycomplex, micelle, α-Tocopherol acetate, encapsulation.