



<https://doi.org/10.15407/polymerj.42.04.292>
УДК 544.77.051.62:591.133.16

Н.М. ПЕРМЯКОВА,

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, 48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна,
ORCID: 0000-0002-7622-1059
e-mail: permyakova@ukr.net

Т.Б. ЖЕЛТОНОЖСЬКА,

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, 48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна
ORCID: 0000-0001-5272-4244
e-mail: zheltonozhskaya@ukr.net

В.І. КАРПОВСЬКИЙ,

Національний університет біоресурсів та природокористування України, 15, вул. Героїв Оборони, Київ, 03041,
Україна
ORCID: 0000-0003-3858-0111

Р.В. ПОСТОЙ,

Національний університет біоресурсів та природокористування України, 15, вул. Героїв Оборони, Київ, 03041,
Україна
ORCID: 0000-0001-5278-2102

В.І. МАКСІН,

Національний університет біоресурсів та природокористування України, 15, вул. Героїв Оборони, Київ, 03041,
Україна
ORCID: 0000-0001-8903-6744

С.В. ПАРЦЕВСЬКА,

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 60, вул. Володимирська, Київ, 01033, Україна
ORCID: 0000-0002-2055-6765

Л.М. ГРІЩЕНКО,

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 60, вул. Володимирська, Київ, 01033, Україна
ORCID: 0000-0002-0342-4859

Д.О. КЛИМЧУК,

Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України, 2, вул. Терещенківська, Київ, 01004, Україна
ORCID: 0000-0002-7076-8213

В.В. КЛЕПКО,

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, 48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна
ORCID: 0000-0001-8089-8305
e-mail: klepko_vv@ukr.net

**КОМПОЗИЦІЯ α -ТОКОФЕРИЛАЦЕТАТУ З МІЦЕЛЯРНИМИ
НАНОНОСІЯМИ ТА МОЖЛИВОСТІ ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ ЯК
БІОЛОГІЧНОАКТИВНОЇ ДОБАВКИ**

На основі асиметричного диблок-кополімеру (ДБК) поліетиленоксид/поліакрилова кислота отримано ефективні біосумісні і біодеградабельні міцелярні носії для доставки аналога вітаміну Е – α -токоферилацетату (α -ТОКА) в живих організмах. Показано стабільність міцел ДБК у часі за рН=3,5, часткову дезагрегацію міцел за рН=9 і

Цитування: Пермякова Н.М., Желтоножська Т.Б., Карповський В.І., Постой Р.В., Максін В.І., Парцевська С.В., Гріщенко Л.М., Климчук Д.О., Клепко В.В. Композиція α -токоферилацетату з міцелярними наноносіями та можливості її використання як біологічно-активної добавки. *Полімерний журнал*. 2020. **42**, № 4. С. 292—306.
<https://doi.org/10.15407/polymerj.42.04.292>

посилення їх агрегації у фізіологічному розчині. Досліджено власні мицели α -ТОКА у середовищі вода/етанол (95/5 % об), які стійкі в широкій області рН, але стабільність яких значно менша, а чутливість до наявності NaCl значно більша, ніж мицел ДБК. Встановлено високу стабільність сформованої *in situ* композиції α -ТОКА/ДБК у часі в області рН=3,5–9,0 і істотне зменшення в її розчинах ефектів висолювання за наявності NaCl. Доведена можливість забезпечення тривалого керованого виділення α -ТОКА в організмі завдяки використанню мицел ДБК. На базі випробувань *in vivo* біологічної дії композиції на порослих свиниматках встановлено її високу біодоступність, швидке всмоктування, активне використання в процесах обміну речовин і позитивний вплив на репродуктивні якості свиниматок порівняно з чистим α -ТОКА, що сприяє підвищенню збереженості та продуктивності народжених порослят.

Ключові слова: диблок-кополімер, α -токоферилацетат, мицелярний носій, інкапсуляція/виділення, біологічна дія.

Вступ

Останнім часом особлива увага наукового світу приділяється розробці нанорозмірних систем доставки погано розчинних та/або токсичних лікарських субстанцій [1–6]. Серед багатьох форм таких носіїв гідне місце посідають мицелярні наноконтейнери, утворені блок-кополімерами з нетоксичними біосумісними та біодеградабельними складовими [5, 6]. Створення ефективних носіїв лікарських субстанцій на основі мицел гетерополімерів передбачає, по-перше, вивчення будови, розмірів і поведінки самих наноносіїв у розчині залежно від молекулярних параметрів окремих компонентів і зовнішніх факторів (рН середовища, концентрації солі, температури, розбавлення розчину тощо), які будуть діяти за умов їх майбутнього застосування в живому організмі [7]. Другим напрямом є визначення оптимального шляху введення конкретної лікарської речовини в мицелярний наноносій: у процесі або після утворення мицел (методи *in situ* або *ex situ*), який забезпечить найбільший ступінь інкапсуляції досліджуваної речовини [5]. Третім важливим аспектом є вивчення швидкості та механізму інкапсуляції/виділення лікарської субстанції певним наноносійом у модельних експериментах (*in vitro*) і в живому організмі (*in vivo*) за умов, що відповідають введенню мицелярних композицій пероральним або парентеральним способом [1, 7]. Здатність наноносія контролювати вихід лікарської речовини в організмі під дією внутрішніх факторів (зміни рН, концентрації солі, температури при запаленні, наявності ферментів тощо) або деяких зовнішніх факторів (локального нагрівання або охолодження, електричного, магнітного та механічного полів) є такою ж важливою вимогою для його успішного використання, як і

його здатність зв'язувати й утримувати лікарський препарат [7–10].

Раніше було показано [11–13], що макромолекули подвійних гідрофільних диблок- та триблок-кополімерів з асиметричними хімічно комплементарними блоками (метокси) поліетиленоксиду та поліакрилової кислоти (МОПЕО-*b*-ПАК і ПАК-*b*-ПЕО-*b*-ПАК) утворюють у водних розчинах у діапазоні рН<5 інтрамолекулярні полікомплекси (ІнтраПК) за рахунок кооперативних водневих зв'язків між –COOH групами ПАК та атомами кисню (МО)ПЕО. Сформовані ІнтраПК самозбираються у специфічні мицелярні структури з комплексним “ядром”. У попередніх роботах були встановлені термодинамічні параметри мицелоутворення залежно від довжини блоків, а також морфологія і розміри мицелярних структур [13]. Такі мицелярні носії показали високу інкапсулюючу здатність до модельного аналога вітаміну Е – малорозчинного гомолога α -токоферилацетату (α -ТОКА) [12, 13]. Отримана таким чином мицелярна композиція α -ТОКА/МОПЕО-*b*-ПАК виявила підвищену біологічну активність порівняно з дією чистого препарату. Це зумовлено особливою будовою мицел таких блок-кополімерів, зокрема, здатністю комплексного “ядра”, стабілізованого системою водневих зв'язків, до самоналаштування в процесі інкапсуляції лікарської речовини, рН-чутливістю мицел [12, 13], а також біодеградабельністю не тільки блоків (МО)ПЕО, а й ПАК [14, 15]. Випробування біологічної дії композиції α -ТОКА/МОПЕО-*b*-ПАК на білих мишах [12, 13] і кролях [16, 17] у варіанті додавання її до питної води тварин (тобто найбільш природним пероральним методом) довели нетоксичність носіїв і можливість різкого, до 25 разів, зниження дози аналога вітаміну Е зі збереженням його ефективності. Було

зафіксовано також покращення якості хутра і м'яса кролів [16, 17], що показало перспективність використання такої композиції як ефективної біодобавки в тваринництві.

Для більш чіткого розуміння процесів, що відбуваються під час інкапсуляції/виділення міцелами диблок-кополімерів аналога вітаміну Е (та інших малорозчинних у воді вітамінів) і подальшого розкриття перспектив використання розробленої композиції як біологічно-активної добавки, продовжено дослідження модельної міцелярної системи α -ТОКА/МОПЕО-*b*-ПАК. Охарактеризовано міцелоутворення самого α -ТОКА у розчині та особливості утворення його композиції з наночасинками, досліджено вплив факторів часу, зміни рН і наявності NaCl на стан міцелярних дисперсій окремих компонентів і кінцевої міцелярної композиції, проведено порівняння процесів виділення α -ТОКА з міцел МОПЕО-*b*-ПАК і власних міцел. Виконано також окремий цикл біологічних досліджень *in vivo* зі встановлення біологічної дії композиції α -ТОКА/МОПЕО-*b*-ПАК на групу великих тварин – поросних свиноматок.

Експериментальна частина

Матеріали.

Подвійний гідрофільний диблок-кополімер (ДБК) МОПЕО-*b*-ПАК отримували методом радикальної матричної блок-кополімеризації поліакрилової кислоти з метоксиполіетиленгліколем (МОПЕГ), описаним у наших попередніх роботах [12, 13]. Для цього використовували МОПЕГ з $M_n=5,3$ кДа фірми "Fluka" (Німеччина), діамонійгексанітратоцерат (сіль Se^{IV}) фірми "Aldrich" (USA) та акрилову кислоту (АК) виробництва компанії "Fluka" (Німеччина), яку переганяли перед синтезом. Концентрації МОПЕГ і солі Se^{IV} в реакційній суміші становили $3,5 \cdot 10^{-2}$ і $4,0 \cdot 10^{-3}$ кг·м⁻³ відповідно. Кінцевим продуктом синтезу була Na-сіль ДБК (МОПЕО-*b*-ПАНа) [11–13], яку

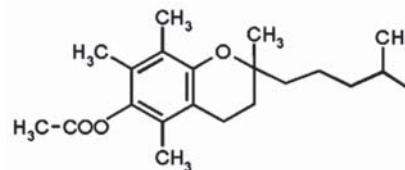


Рис. 1. Хімічна будова α -ТОКА

виділяли з водного розчину методом ліофільного сушіння. Уточнена ММ вихідного зразка МОПЕГ та основні молекулярні характеристики отриманого зразка ДБК, що були визначені методом ¹H ЯМР як у роботі [18], наведені в табл. 1.

Як модельний препарат у роботі використовували малорозчинний у воді, але добре розчинний в етанолі α -ТОКА, який було синтезовано методом, описаним у [19]. За класифікацією IUPAC цей препарат має назву 2,5,7,8-тетраметил-2-(4-метилпентил)-3,4-дигідро-2H-хромон-6-іл. Його хімічна структура, підтверджена методом FTIR спектроскопії [20], показана на рис. 1.

Формування і дослідження композиції α -ТОКА з міцелами диблок-кополімеру.

Композицію α -ТОКА з міцелами ДБК готували методом *in situ* інкапсуляції, тобто шляхом "включення" препарату в міцели кополімеру в процесі їх формування. Для цього спочатку змішували водний розчин кополімеру у Na-формі ($C_{ДБК}=1$ кг·м⁻³) з невеликим об'ємом (5 % об) спиртового розчину α -ТОКА за концентрації $C_{\alpha\text{-ТОКА}}=0,25$ кг·м⁻³, а потім створювали міцелярні структури з інкапсульованим препаратом, додаючи 0,2 н розчин HCl до рН=3,5. Готову композицію витримували впродовж 30 хв. Співвідношення компонентів у композиції становило $\phi=0,1$ моль $\alpha\text{-ТОКА} \cdot (\text{осн-моль}_{ПАК})^{-1}$.

Дослідження впливу факторів часу, зміни рН розчину від 3,5 до 9,0 і додавання NaCl за концентрації $C=9,0$ кг·м⁻³ (як у фізіологічному розчині) на стан композиції α -ТОКА/ДБК і поведінку окремих компонентів, тобто водної

Таблиця 1. Молекулярні параметри диблок-кополімеру за даними ЯМР

Зразок	$M_{n\text{МОПЕГ}}$, кДа	$M_{n\text{ПАНа}}$, кДа	$M_{n\text{ПАК}}$, кДа	$M_{n\text{ДБК}}$ *, кДа	n **
ДБК	5,3	12,1	9,3	14,6	1,1

* $M_{n\text{ДБК}}=M_{n\text{МОПЕО}}+M_{n\text{ПАК}}$ ** Співвідношення ланок ПАК(ПАНа) та МОПЕО у диблок-кополімері (осн-моль_{ПАК(ПАНа)}/осн-моль_{МОПЕО}), яке характеризує ступінь асиметрії блоків.}

міцелярної дисперсії ДБК і водно/етанольної (95/5 % об) дисперсії α -ТОКА, проводили методом електронної спектроскопії. Спектри екстинкції записували за кімнатної температури через кожні 2 хв впродовж 90 хв на спектрофотометрі Cary 50 Scan фірми "Varian" (США) в діапазоні $\lambda=200-800$ нм, використовуючи кварцову комірку розміром l 1 см. Загальний об'єм композиції та розчинів окремих компонентів становив 10 см^3 . Зміни у стані композиції та індивідуального α -ТОКА під дією вказаних факторів контролювали за змінами в часі інтегральної інтенсивності (S) смуг двох близьких $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів у молекулах α -ТОКА в області $\lambda \sim 270-290$ нм [20], а також мутності (τ) дисперсій за $\lambda=500$ нм, яку розраховували за формулою:

$$\tau = 2,303 \cdot D/l, \quad (1)$$

де: D – значення оптичної густини (екстинкції) в електронному спектрі за $\lambda=500$ нм; l – довжина вимірювальної комірки. Величину S знаходили з відповідних спектрів методом графічного інтегрування з проведенням базової лінії і використанням програми Origin. Поведінку в часі окремої міцелярної дисперсії ДБК за $\text{pH}=3,5$, а також у разі підвищення її pH до 9,0 і додавання до неї NaCl оцінювали лише за зміною її мутності за $\lambda=500$ нм, яку визначали за наведеною вище формулою.

Для встановлення впливу часу, зміни pH і наявності солі композицію, отриману за $\text{pH}=3,5$, і водно/етанольну дисперсію чистого α -ТОКА за $\text{pH}=3,5$ і 5,6 розводили в 5 разів для забезпечення запису спектра в коректному діапазоні значень оптичної густини. Спектри індивідуальної міцелярної дисперсії ДБК за $\text{pH}=3,5$ знімали одразу після приготування без розведення. Необхідні зміни pH і концентрації NaCl у сформованій композиції, а також дисперсіях індивідуальних компонентів створювали шляхом додавання 0,2 н NaOH до $\text{pH}=9,0$ або невеликого об'єму (1 см^3) концентрованого розчину солі. В усіх експериментах використовували деіонізовану воду з іонообмінної колонки.

Морфологію і розміри міцелярних структур, утворених у композиції α -ТОКА/ДБК у водно/етанольному середовищі, визначали методом проникної (трансмісійної) електронної мікроскопії (ТЕМ) за допомогою електронного мікроскопа JEM-1230 фірми "JEOL" (Японія) за напруги 90 кВ. Малі краплини ($\sim 1 \cdot 10^{-4} \text{ см}^3$)

композиції наносили на мідні сіточки, вкриті плівкою формвару та вуглецю, і далі швидко висушували впродовж $\sim 0,5-1,0$ хв на повітрі, а потім у вакуум-ексикаторі за кімнатної температури.

Характеристика міцелоутворення α -ТОКА у водно/етанольній суміші

При створенні водно/етанольного (95/5 % об) розчину чистого α -ТОКА за тієї ж концентрації, як і при формуванні композиції з ДБК, була помічена його слабка опалесценція. З урахуванням поганої розчинності α -ТОКА у воді та дифільної структури його молекул (рис. 1) це вказувало на можливість утворення препаратом власних міцел у змішаному розчиннику і зумовлювало необхідність проведення окремого дослідження. Критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ) чистого α -ТОКА у суміші вода/етанол (95/5 % об) визначали методом пружного світлорозсіювання. Інтенсивність розсіювання вертикально поляризованого світла в розчинах α -ТОКА різної концентрації 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". За величиною ККМ розраховували стандартну вільну енергію міцелоутворення ($-\Delta G^\circ$), використовуючи формулу (2), в якій R – газова стала, T – абсолютна температура [21]:

$$-\Delta G^\circ \cong RT \cdot \ln \text{ККМ}. \quad (2)$$

Морфологію міцелярних структур α -ТОКА у змішаному розчиннику вивчали методом ТЕМ за аналогічною методикою, як і в описаних вище дослідженнях композиції.

Дослідження процесів виділення α -ТОКА з міцелярних композицій і власних міцел

Виділення α -ТОКА з міцелярної композиції та міцел самого препарату в деіонізовану воду ($\text{pH}=5,6$), у водно/лужне середовище ($\text{pH}=9,0$) і сольовий розчин, що імітував фізіологічний, вивчали шляхом діалізу (метод *in vitro*). Кожну композицію або дисперсію чистого α -ТОКА об'ємом 20 мл вносили в стандартну посудину для діалізу, в якій плоске дно замінювала напівпроникна целюозна мембрана діаметром $\sim 3,5$ см. Цю посудину занурювали на певну глибину в склянку, поставлену на магнітну мішалку і заповнену деіонізованою водою за $\text{pH}=5,6$

чи 9,0 або розчином NaCl об'ємом 100 см³, і через певний час відбирали з неї проби зовнішньої рідини (діалізату) об'ємом 5 см³ впродовж кількох днів. Перед кожним відбором проби діалізат повільно перемішували впродовж 15 хв за допомогою магнітної мішалки, щоб зрівняти концентрацію виділеного препарату по всьому об'єму. Проби досліджували методом електронної спектроскопії як описано вище. В результаті отримували ряд спектрів екстинкції, за якими визначали зміну в часі інтегральної інтенсивності (S_t) смуг $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів у молекулах α -ТОКА, виділених із міцелярної композиції або власних міцел. Цю величину, яка пропорційна концентрації виділеного препарату в діалізаті (C_t), використовували далі для розрахунку ступеня виходу препарату ($Y_{\alpha\text{-ТОКА}}$) в кожній системі за певний час. Для цього величину S_t визначену в конкретній системі за певного значення t , відносили до інтегральної інтенсивності смуг $\pi \rightarrow \pi^*$ переходів у спектрі індивідуального α -ТОКА (S_0), концентрація якого у розчині дорівнювала гранично можливій концентрації препарату в діалізаті (C_0) у разі його 100 %-вого виділення з вихідної міцелярної композиції:

$$Y_{\alpha\text{-ТОКА}} = f(t) = C_t / C_0 = S_t / S_0 \quad (3)$$

Випробування *in vivo* біологічної активності композиції на поросних свиноматках

Біологічну дію міцелярної системи доставки погано розчинного α -ТОКА досліджували на свиноматках великої білої породи 3-річного віку. В процесі випробувань міцелярної системи, сформованої шляхом *in situ* інкапсуляції, використовували 3 групи свиноматок по 10 голів у кожній за методом аналогів. Одна група була контрольною, яка отримувала лише основний раціон, а дві – дослідними, яким крім основного раціону додавали міцелярну систему з інкапсульованим α -ТОКА (I дослідна) або чистий α -ТОКА у вигляді водної дисперсії (II дослідна). Умови утримання, раціон і кратність годівлі для всіх тварин були однаковими. Кормову добавку свиноматкам давали впродовж 5 діб до та 25 діб після запліднення.

Продуктивність свиноматок контролювали впродовж 2-ох місяців за показниками: кількості (у головах) живих поросят при народженні (багатоплідність), кількості (гол) відлучених поросят через 28 діб, середньої маси одного поросяти (кг) при народженні (велико-

плідність) та через 28 і 60 діб, маси гнізда (кг), тобто маси народжених поросят від кожної свиноматки, при народженні та через 28 діб, а також збереженості приплоду (%) через 28 діб. Крім того, на початку і наприкінці введення міцелярної системи та чистого α -ТОКА у свиноматок проводили відбір зразків крові для морфологічних і біохімічних досліджень. Для контролю показників обміну ліпідів у свиней в плазмі крові визначали вміст холестеролу та триацилгліцеролів. Контролювали також показники продуктивності та збереженості поросят протягом доби і всього дослідного періоду.

Результати фізико-хімічних досліджень і їх обговорення

Процеси самозбирання макромолекул асиметричних ДБК у водних розчинах з утворенням специфічних міцелярних структур, а також параметри та морфологія таких міцел досліджені й описані нами раніше [11–13]. Зокрема, було показано, що визначальним фактором міцелоутворення диблок-кополімерів у водних розчинах є кооперативна взаємодія хімічно комплементарних блоків МОПЕО і ПАК у діапазоні рН < 5, наслідком якої було самозбирання гідрофобних ділянок зв'язування полімерних блоків і формування міцел з комплексним “ядром” [12, 13]. Гідрофільну “корону” таких міцел складали надлишкові незв'язані сегменти довших блоків [12, 13]. В отриманому і використаному зразку ДБК довжина блоку ПАК була дещо вищою, ніж довжина блоків МОПЕО (табл. 1), тому “корона” утворених міцел була невелика за розміром і містила незв'язані ланки полікислоти. Такі міцели за своєю морфологією були віднесені нами до “обрізаного” (“crescent-cut”) типу [21]. У розчинах кополімерів спостерігали міцели як моно-, так і полімолекулярного типів. Було досліджено також окремі аспекти зв'язування аналога вітаміну Е міцелами ДБК методами *in situ* та *ex situ* інкапсуляції і показано, що однаково високий (майже 100 %-вий) ступінь інкапсуляції ($X_{\alpha\text{-ТОКА}}$) досягався в обох випадках, тобто отримана міцелярна композиція α -ТОКА/ДБК була термодинамічно рівноважною [12]. Було відзначено, що інкапсуляція α -ТОКА міцелами ДБК розвивається за рахунок гідрофобних

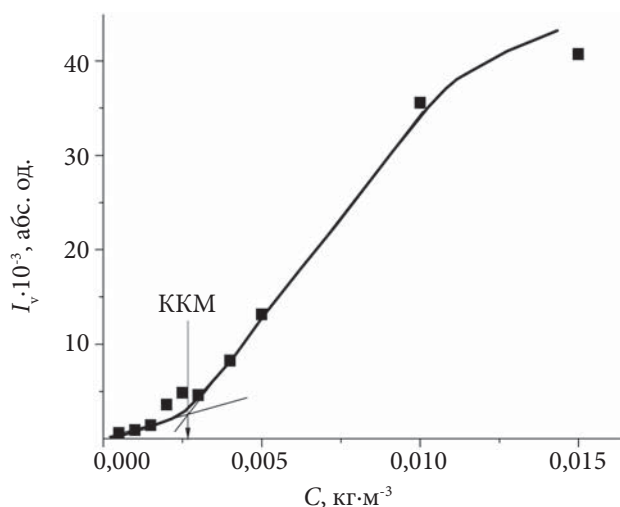


Рис. 2. Зміна інтенсивності розсіювання вертикально поляризованого світла від концентрації α -ТОКА. $H_2O/EtOH=95/5$ % об; $\lambda=520$ нм; $\theta=90^\circ$; $T=22$ °C

взаємодій та окремих водневих зв'язків між ацетатними групами препарату і протонованими -COOH-групами в міцелярній "короні". Разом з тим, у попередніх дослідженнях ми мали обмежені уявлення про сам процес інкапсуляції, оскільки не мали даних про міцелоутворення самого α -ТОКА.

Відомо, що молекули вітаміну Е, завдяки своїй дифільній природі, здатні самі утворювати міцели у водному середовищі [22]. Проте детальні відомості про термодинамічні параметри, розміри і морфологію таких міцел у літературі відсутні. Таких даних бракувало і для використаного нами аналога вітаміну Е, хоча було помічено, що його розчини у суміші вода/етанол=95/5 % об (в якій створювали композиції α -ТОКА/ДБК) мають виражену опалесценцію. Тому, перш за все, в цій роботі охарактеризували міцелоутворення чистого α -ТОКА у зазначеному змішаному розчиннику. Результати визначення ККМ методом пружного світлорозсіювання показані на рис. 2. Крива зміни інтенсивності розсіювання вертикально поляризованого світла (I_v) за кута розсіювання $\theta=90^\circ$ залежно від концентрації α -ТОКА мала

типовий вигляд і дала можливість знайти ККМ за перетином двох лінійних ділянок початкового повільного і подальшого різкого зростання I_v як функції $C_{\alpha\text{-ТОКА}}$. Використовуючи значення ККМ і співвідношення (2), знаходили стандартну вільну енергію міцелоутворення α -ТОКА. Обидві характеристики подані в табл. 2.

Якщо порівняти значення ККМ і $-\Delta G^\circ$ для міцел α -ТОКА з термодинамічними параметрами міцел ДБК, визначеними у водному середовищі і наведеними в роботі [13], стає очевидно значно менша стабільність міцел α -ТОКА порівняно з міцелами диблок-кополімеру. А це означає, що хоча спочатку при додаванні α -ТОКА до водного розчину ДБК у Na-формі (у процесі *in situ* інкапсуляції) можна очікувати утворення власних міцел препарату, але потім, при підкисленні композиції до значення рН=3,5, буде відбуватися руйнування цих міцел і вбудовування молекул препарату в міцели ДБК за рахунок гідрофобних взаємодій і водневих зв'язків.

Цікаву додаткову інформацію дало дослідження морфології міцелярних дисперсій α -ТОКА, ДБК та їх композиції, яке проводили методом ТЕМ (рис. 3). На мікрознімках водно/етанольних дисперсій чистого α -ТОКА (рис. 3а, б) були наявні його міцелярні структури різного розміру і форми, а також окремі агрегати міцел. Розміри міцел чистого препарату, розраховані за даними рис. 3а, лежали в межах від 3 до 34 нм. Багато з них мали класичну сферичну форму, але зустрічались також еліпсоїдальні міцели і структури без чітко вираженої форми. На мікрофотографії міцелярної дисперсії ДБК (рис. 3в) спостерігали сферичні "обрізані" міцели моно- та полімолекулярного типу [12] розмірами в межах 2–16 і 8–68 нм відповідно. Аналогічна картина зберігалась і на мікрофотографії композиції α -ТОКА з міцелами ДБК (рис. 3г), проте було помітно, що включення α -ТОКА в міцелярні носії призводить до посилення їх агрегації. Це може бути результатом

Таблиця 2. Термодинамічні параметри міцелоутворення α -ТОКА*

Зразок	ККМ·10 ³ , кг·м ⁻³	ККМ·10 ⁶ , моль·дм ⁻³	$-\Delta G^\circ$, кДж·моль ⁻¹
α -ТОКА	2,67	7,9	28,9

* Розчинник: $H_2O/EtOH=95/5$ % об.

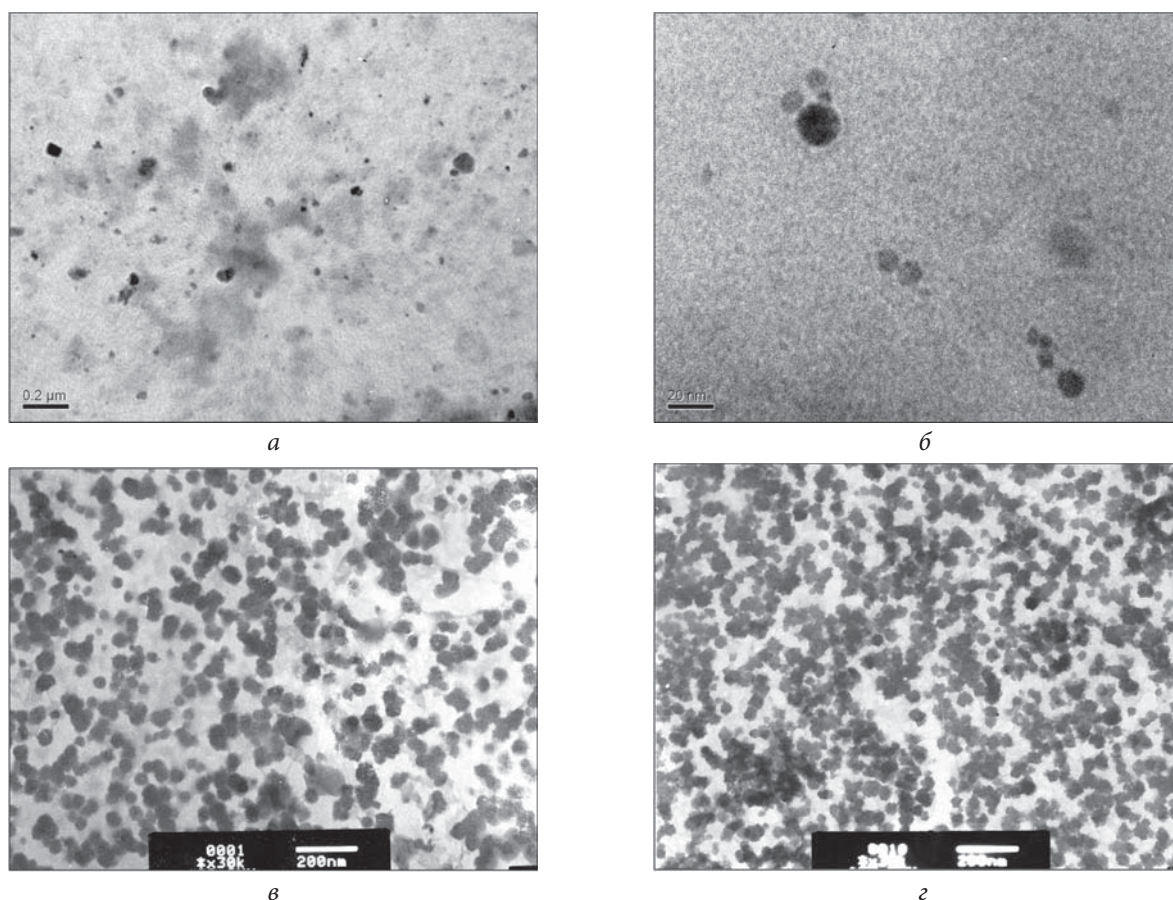


Рис. 3. ТЕМ мікрознімки міцел α -ТОКА у середовищі вода/етанол за рН=3,5 (а, б), міцел ДБК у воді за рН=2,7 (в) та міцелярної композиції α -ТОКА/ДБК (г), отриманої у водно/етанольному розчині *in situ*. $H_2O/EtOH=95/5$ % об; $C_{\alpha\text{-ТОКА}}=0,25 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$; $C_{\text{ДБК}}=0,5 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$; $\varphi=0,1 \text{ моль}_{\alpha\text{-ТОКА}}/\text{осн}\cdot\text{моль}_{\text{ПАК}}$; $T=20 \text{ }^\circ\text{C}$

певної гідрофобізації поверхні міцел внаслідок взаємодії з препаратом. Подібне явище спостерігали раніше в дослідженнях інкапсуляції малорозчинного лікарського препарату преднізолону міцелами асиметричного триблок-кополімеру на основі ПЕО та поліакриламід [23].

Утримання та виділення лікарських препаратів полімерними міцелами – складні процеси, в яких багато різноманітних факторів, таких як молекулярна маса, температура, структура полімерної матриці, природа її взаємодії з лікарським препаратом, рН середовища, наявність солей та інші можуть бути визначальними і впливати на результат. Тому в наступній частині роботи досліджували вплив факторів часу, зміни рН середовища та наявності NaCl за $C=9,0 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ як у фізіологічному розчині на стан індивідуальних міцел ДБК і α -ТОКА та їх міцелярну композицію. Вплив першого фактора важливий з погляду прогнозування ста-

більності утворених міцелярних систем. Вибір другого і третього факторів зумовлений тим, що вони діють у внутрішньому середовищі

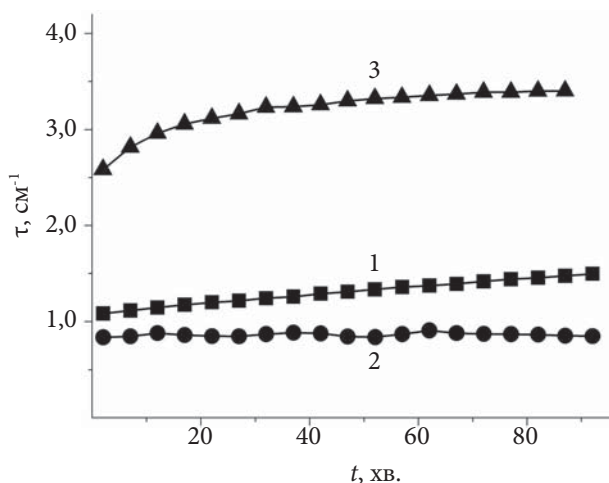


Рис. 4. Зміна в часі мутності міцелярної дисперсії ДБК за рН=3,5 (1); рН=9,0 (2) та за наявності NaCl (3). $C_{\text{ДБК}}=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$; $C_{\text{NaCl}}=9,0 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$; $T=22 \text{ }^\circ\text{C}$

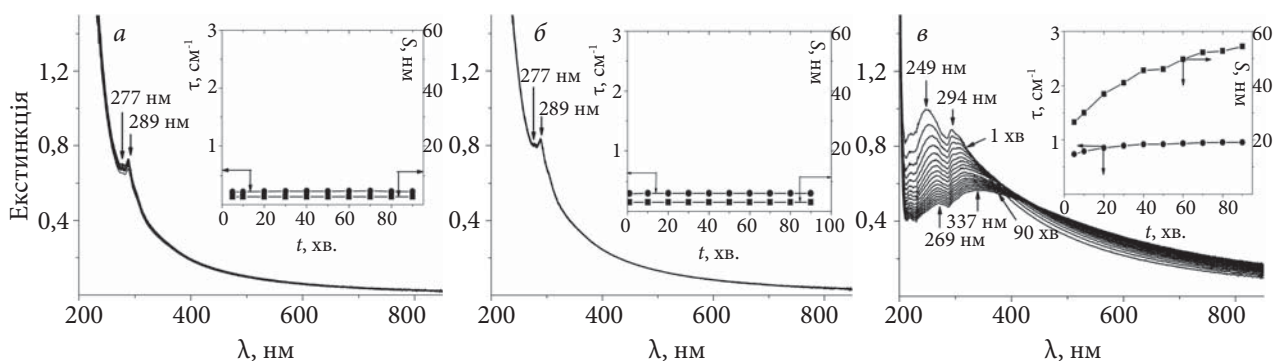


Рис. 5. Спектри екстинкції водно/етанольної дисперсії α -ТОКА за рН=3,5 (а), рН=9,0 (б) і при введенні NaCl за рН=5,6 (в) впродовж 90 хв. На вставках – розраховані зміни в часі мутності системи та інтегральної інтенсивності смуг $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів. $H_2O/EtOH=95/5$ % об; $C_{\alpha\text{-ТОКА}}=0,05$ кг·м⁻³; $C_{NaCl}=1,8$ кг·м⁻³; $T=22$ °С

живих організмів. Зокрема, розчин NaCl за $C=9,0$ кг·м⁻³ є ізотонічним розчином до плазми крові, кисле середовище існує в шлунку, а середовище за рН~9 – у кишківнику, де відбувається біоабсорбція лікарських препаратів шаром епітелію, коли препарати доставляються пероральним методом.

Розглянемо спочатку вплив зазначених факторів на поведінку мицелярних дисперсій окремих компонентів. Стан мицел ДБК у часі за різних рН і за наявності NaCl контролювали методом електронної спектроскопії за змінами величини мутності (τ) розчинів за $\lambda=500$ нм. Ці дані наведені на рис. 4. Для мицелярної дисперсії ДБК за рН=3,5, що містить “обрізані” мицели з короткою “короною” з нез’язаних сегментів ПАК, спостерігали достатньо високе значення τ та її подальше повільне зростання з часом (рис. 4, крива 1), що можна пояснити поступовим установами у системі термодинамічної рівноваги. У разі підвищення рН до 9,0 τ дисперсії ДБК одразу дещо знижувалась, що свідчило про часткове руйнування (деагрегацію) мицелярної системи, але потім залишалась незмінною в часі (рис. 4, крива 2), тобто в цілому система зберігала стабільність впродовж дослідженого інтервалу часу (90 хв). Додавання NaCl ($C=9,0$ кг·м⁻³) до дисперсії ДБК з рН=3,5 призводило до погіршення термодинамічної якості води як розчинника за рахунок ефекту висолювання [24], тому τ дисперсії одразу різко збільшувалась у понад 2 рази і далі додатково зростала в часі до постійного значення (рис. 4, крива 3). Таким чином, під впливом NaCl відбувалось посилення

агрегації мицел ДБК, утворених у кислому середовищі.

Вплив перерахованих вище факторів на водно/етанольну дисперсію чистого α -ТОКА відображає рис. 5. За даними рисунка була встановлена незмінність у часі електронних спектрів препарату і отриманих з них значень τ і S при досліджених значеннях рН (рис. 5а, б), що засвідчило стабільність мицел α -ТОКА в широкому діапазоні рН від 3,5 до 9,0. Однак додавання NaCl істотно змінювало електронні спектри препарату і розраховані значення τ і S (рис. 5в). Зокрема, спостерігали різке зростання τ мицелярної дисперсії (у початковий момент і далі впродовж 90 хв), відбувались помітні зміни положень та інтегральної інтенсивності смуг $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів α -ТОКА, які зростали у часі. Описані зміни були зумовлені, очевидно, взаємодією іонів солі з молекулами α -ТОКА і впливом NaCl на термодинамічну якість води як розчинника (ефектом висолювання) [24]. Вже через 1 хв після додавання NaCl у спектрах екстинкції фіксували синій (гіпсохромний) і червоний (батохромний) зсув смуг $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів у молекулах препарату, що вказувало на утворення комплексів між іонами Na^+ і бензольними кільцями α -ТОКА, кон’югованими з ацетатними групами. Подібні комплекси Na^+ -іонів з π -електронною системою бензольних кілець добре відомі з літератури [25]. Нові смуги $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів відповідали значенням $\lambda_{max}=249$ і 294 нм (рис. 5в), однак їх положення неухильно зміщувалися в бік більших λ впродовж 90 хв, що свідчило про

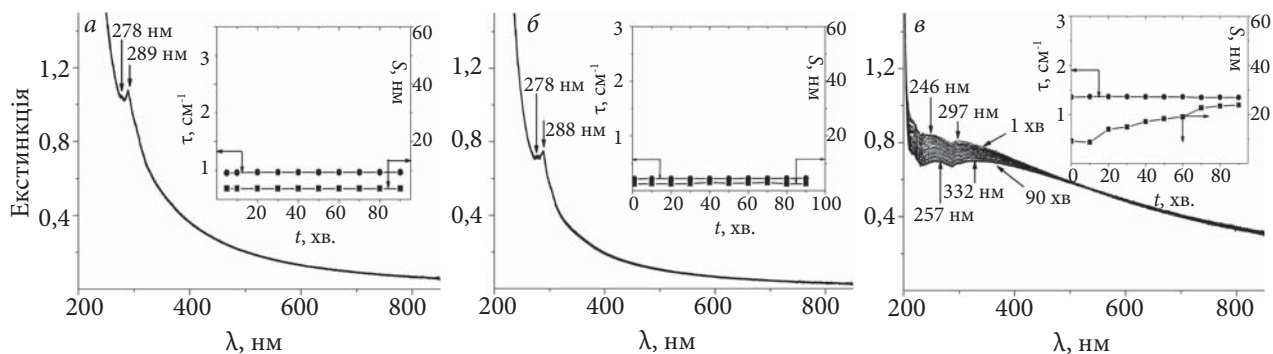


Рис. 6. Спектри екстинкції композиції α -ТОКА з ДБК у суміші вода/етанол за рН=3,5 (а), рН=9,0 (б) і при введенні NaCl за рН=3,5 (в). На вставках – розраховані зміни в часі мутності системи та інтегральної інтенсивності електронних переходів у молекулах α -ТОКА. $H_2O/EtOH=95/5$ % об; $C_{ДБК}=0,2$ кг·м⁻³; $C_{\alpha\text{-ТОКА}}=0,05$ кг·м⁻³; $C_{NaCl}=1,8$ кг·м⁻³; $T=22$ °С

подальший розвиток процесу комплексоутворення в часі.

Розглянемо тепер поведінку міцелярної композиції α -ТОКА/ДБК за різних рН і за наявності солі. Моніторинг змін у часі τ та S електронних переходів у молекулах α -ТОКА в утвореній композиції за різних умов відображає рис. 6. Сформована методом *in situ* міцелярна композиція за рН=3,5 була стабільною у часі (рис. 6а), про що свідчили постійні значення τ системи та S електронних переходів у молекулах α -ТОКА впродовж 90 хв (вставка). При підвищенні рН середовища до 9,0 міцелярна система також демонструвала стабільність (рис. 6б), але її τ дещо знижувалась порівняно зі значенням τ для композиції за рН=3,5. Це явище може бути пов'язано із зарядженням окремих карбоксильних груп міцелярних “корон” і, внаслідок цього, з частковою дезагрегацією міцелярної системи. Ефекти взаємодії з іонами солі і висолювання, які проявлялися у водно/етанольній дисперсії чистого α -ТОКА при додаванні NaCl (рис. 5в), були характерні і для композиції α -ТОКА/ДБК (рис. 6в). В електронних спектрах композиції наявні солі також фіксували помітні зміни положення та інтегральної інтенсивності смуг $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів у молекулах α -ТОКА, які збільшувались з часом (рис. 6в, вставка). Однак, у порівнянні з дисперсією чистого α -ТОКА (рис. 5в), описані ефекти у випадку композиції були меншими. Це можна пояснити розташуванням значної кількості молекул інкапсульованого препарату (принаймні, їх неполярних фрагментів з бензольними кільцями) в “ядрі”

міцел ДБК, внаслідок чого вони були недоступні для комплексоутворення з іонами Na⁺ і висолювання під дією цього низькомолекулярного електроліту.

В подальшій серії експериментів методом діалізу досліджували виділення α -ТОКА з міцел ДБК у чисту деіонізовану воду (рН=5,6), водно/лужне (рН=9,0) і водно-сольове ($C_{NaCl}=9$ кг·м⁻³) середовища. Для порівняння вивчали також виділення препарату у воду з власних міцел; ці результати наведені на рис. 7. Зазначимо, що рушійною силою процесів виділення був градієнт концентрацій (хімічних потенціалів) α -ТОКА в діалізній посудині та діалізаті, тобто по різні боки від напівпроникної целюлозної мембрани. Як видно, вже через 1 добу

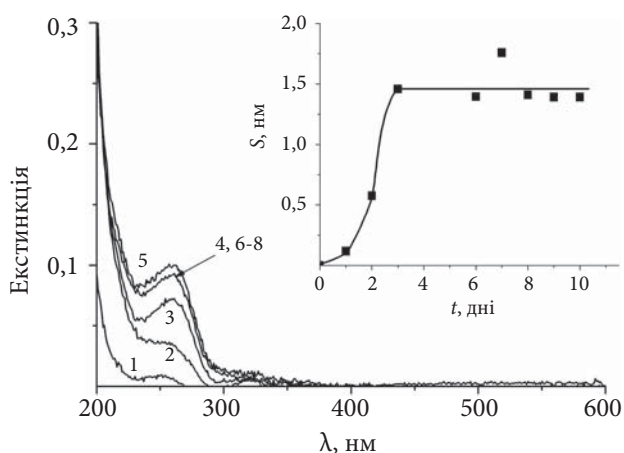


Рис. 7. Спектри екстинкції, отримані при діалізі проти води дисперсії α -ТОКА через 1 (1); 2 (2); 3 (3); 6 (4); 7 (5); 8 (6); 9 (7) і 10 діб (8). На вставці – розрахована крива зміни в часі величини S . $H_2O/EtOH=95/5$ % об; рН=5,6; $C_{\alpha\text{-ТОКА}}=0,25$ кг·м⁻³; $T=22$ °С

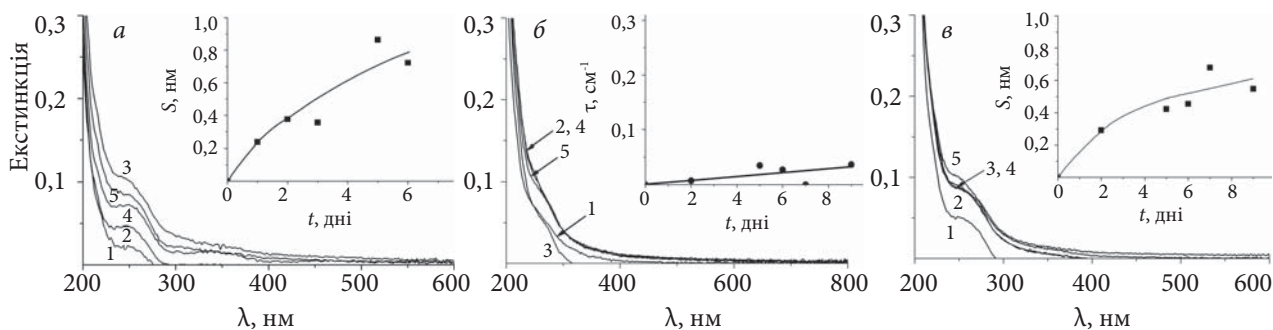


Рис. 8. Спектри екстинкції проб, відібраних при діалізі композиції α -ТОКА з ДБК проти води за $\text{pH}=5,6$ (а) через 1 (1); 2 (2); 3 (3); 5 (4) і 6 діб (5), водно/лужного розчину з $\text{pH}=9,0$ (б) через 2 (1), 5 (2), 6 (3), 7 (4) і 9 діб (5) та водно/солевого розчину з $C_{\text{NaCl}}=9,0 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ (в) через 2 (1); 5 (2); 6 (3); 7 (4) і 9 діб (5). На вставках – криві зміни величини S або τ в часі. $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}=95/5$ % об; $C_{\text{ДБК}}=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$; $C_{\alpha\text{-ТОКА}}=0,25 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$; $\varphi=0,1 \text{ моль}_{\alpha\text{-ТОКА}}/\text{осн}\cdot\text{моль}_{\text{ПАК}}$; $T=23$ °C

після початку діалізу дисперсії чистого α -ТОКА проти води в спектрі відповідної проби (рис. 7, спектр 1) починала проявлятися смуга з $\lambda_{\text{max}} \sim 277$ нм малої інтенсивності, яка відповідала одному з $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів у молекулах препарату і свідчила про вихід невеликої їх кількості з власних міцел. Через 2 доби в спектрі діалізної проби (рис. 7, спектр 2) проявлялись вже обидві смуги електронних переходів молекул α -ТОКА. Інтегральна інтенсивність цих смуг, пропорційна концентрації препарату в діалізаті, зростала впродовж 3-х днів, а потім залишалась практично незмінною (рис. 7, вставка). Це свідчило про досягнення в системі термодинамічної рівноваги, яку визначав заданий в експерименті градієнт концентрацій α -ТОКА.

Електронні спектри проб, відібраних у ході діалізу композиції α -ТОКА/ДБК за $\text{pH}=3,5$ проти деіонізованої води ($\text{pH}=5,6$), водно/лужного розчину та розчину NaCl , наведені на рис. 8. А розраховані з цих даних кінетичні криві зміни величин S і τ в часі показані на вставках. При діалізі композиції проти води вихід молекул α -ТОКА проявлявся у вигляді появи в спектрах екстинкції спочатку одного, а з часом і другого $\pi \rightarrow \pi^*$ електронного переходу. Сумарна інтегральна інтенсивність цих переходів, пропорційна концентрації α -ТОКА в діалізаті, неухильно зростала в часі впродовж 6 діб і досягала значення $S=0,79$ нм (рис. 8а, вставка). Це значення виявилось майже вдвічі меншим за постійну величину $S=1,40$ нм, яка досягалась вже через 3 доби у разі діалізу дисперсії чистого α -ТОКА проти води (рис. 7, вставка). Отже,

за умов дії однакового заданого градієнта концентрацій швидкість та ефективність виходу молекул α -ТОКА з міцел ДБК у воду була значно меншою, ніж вихід цього препарату з власних міцел. У разі діалізу композиції проти деіонізованої води за $\text{pH}=9,0$ (рис. 8б) спостерігали тільки незначне збільшення τ системи з часом, але цей ефект, який свідчив про виділення частини молекул α -ТОКА у зовнішнє середовище, був дуже незначним. Це явище можна було пояснити встановленою раніше стабільністю міцелярних наноносіїв у лужному середовищі (рис. 8б) завдяки зарядженню карбоксильних груп ПАК у «короні» міцелярних носіїв.

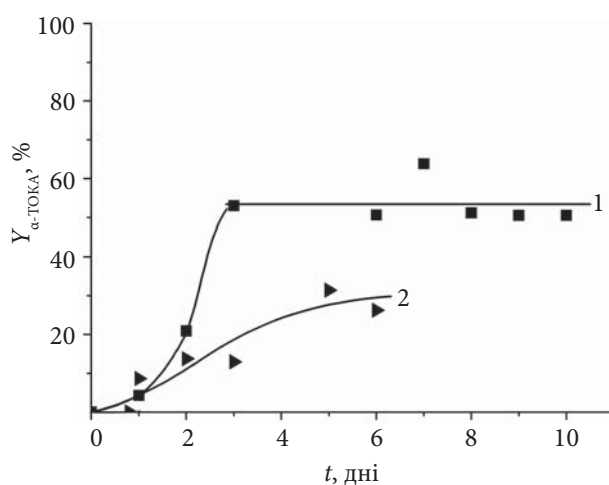


Рис. 9. Зміна в часі ступеня виділення α -ТОКА з власних міцел (1) та міцел ДБК, отриманих за $\text{pH}=3,5$ (2), в процесах діалізу проти води за $\text{pH}=5,6$. $C_{\text{ДБК}}=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$; $C_{\alpha\text{-ТОКА}}=0,25 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$; $\varphi=0,1 \text{ моль}_{\alpha\text{-ТОКА}}/\text{осн}\cdot\text{моль}_{\text{ПАК}}$; $T=22$ °C

Таблиця 3. Гематологічні показники свиноматок при застосуванні композиції

Період досліджень	Групи тварин (n=10)		
	I дослідна	II дослідна	Контрольна
	Еритроцити, г/л		
До згодовування добавки	5,36±0,21	5,34±0,17	5,52±0,25
Після згодовування добавки	6,10±0,05 ²⁾	5,87±0,10*	5,84±0,22
	Лейкоцити, г/л		
До згодовування добавки	12,74±0,32	11,94±0,30	12,56±0,83
Після згодовування добавки	13,58±0,16*	12,42±0,41	13,04±0,62
	Гемоглобін, г/л		
До згодовування добавки	107,0±2,02	112,2±3,64	113,80±4,14
Після згодовування добавки	122,4±4,15**	120,0±3,02	120,80±3,26

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ до початкового рівня.

При діалізі композиції проти сольового розчину процес виходу α -ТОКА з міцел ДБК ще більше уповільнювався. Початкова швидкість виходу препарату, оцінена за тангенсом кута нахилу початкових лінійних ділянок кривих $S=f(t)$ на рис. 8а, в, знижувалась в 1,6 раза. В результаті через 6 діб значення S досягало лише 0,52 нм (рис. 8в), тобто кількість α -ТОКА, виділеного за цей час у фізіологічний розчин, була в 1,5 раза меншою, ніж у чисту воду. Такий ефект зумовлений, очевидно, проникненням іонів NaCl через целюлозну мембрану у діалізну посудину і проявом їх комплексної дії на міцелярну композицію, що було розглянуто вище (рис. 6в). Зрозуміло, що аналогічний ефект зниження швидкості та ефективності виділення α -ТОКА з міцел ДБК слід очікувати і при введенні міцелярної композиції в живий організм.

На основі даних рис. 7 і 8, а також співвідношення (3) були розраховані кінетичні криві зміни ступеня виділення α -ТОКА у воду з власних міцел і міцел ДБК (рис. 9). Отримати аналогічні криві для випадків виходу препарату в сольовий розчин було неможливо, оскільки наявність NaCl істотно змінювала параметри (положення та інтегральну інтенсивність) $\pi \rightarrow \pi^*$ електронних переходів у молекулах α -ТОКА, як це розглядали вище. Порівнюючи кінетичні криві на рис. 9 можна дійти однозначного висновку про можливість досягнення тривалого поступового (керованого) виділення аналога вітаміну Е (і, очевидно, самого вітаміну) за рахунок використання розроблених міцелярних наноносіїв.

Випробування біологічної дії міцелярної композиції *in vivo*

Відомо, що продуктивність тварин залежить від кількості та співвідношення вітамінів, макро- і мікроелементів, а також інших біологічно активних речовин [26]. Позитивний вплив жиророзчинних вітамінів на метаболічні процеси в організмі сільськогосподарських тварин загальноновизнаний, внаслідок чого вони широко використовуються в тваринництві з профілактичною і лікувальною метою [26]. Для визначення ефективності біологічної дії α -ТОКА, інкапсульованого в міцели ДБК, на метаболічні процеси в організмах великих тварин – поросних свиноматок у цій частині роботи вивчали вплив міцелярної форми препарату на гематологічні показники сироватки крові, інтенсивність обміну ліпідів і продуктивність поросних свиноматок, а також збереженість народжених порослят.

Результати тестування показників крові свиноматок, наведені в табл. 3, показали, що при введенні поросним свиноматкам чистого α -ТОКА та того ж препарату, інкапсульованого в міцели ДБК, вміст еритроцитів у крові підвищувався. Зокрема, у свиноматок I-ої дослідної групи вміст еритроцитів зростав на 12,1 %, а у свиноматок II-ої дослідної групи – на 9,02 % порівняно з початковим рівнем. У свиноматок контрольної групи спостерігали підвищення кількості еритроцитів лише на 5,48 %. Вміст лейкоцитів зростав у свиноматок I-ої дослідної групи на 6,18 %, II-ої дослідної групи – на 3,87 %, а у свиноматок контрольної групи – на

Таблиця 4. Показники обміну ліпідів у плазмі крові свиней

Показники	Групи тварин (n=10)		
	Відомий аналог *	Контрольна	I дослідна
Холестерол, ммоль/л	2,93±0,07**	2,68±0,12	2,30±0,11**
Триацилгліцероли, ммоль/л	0,34±0,04**	0,59±0,03	0,39±0,07**

* Дія цитрату хрому на ліпідний обмін в організмі свиноматок; ** $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Таблиця 5. Відтворювальні якості свиноматок при застосуванні композиції

Показники	Групи тварин (n=10)		
	I дослідна	II дослідна	Контрольна
При народженні			
Багатоплідність, гол.	11,0±0,45*	10,6±0,45	9,4±0,55
Маса гнізда, кг	14,18±1,04*	12,70±0,53*	10,32±0,73
Великоплідність, кг	1,22±0,62	1,20±0,42	1,17±0,63
Кількість поросят, гол.	10,4±0,45*	10,0±0,25*	8,6±0,55
При відлученні через 28 діб			
Маса гнізда, кг	84,75±3,48	81,60±5,61	71,10±4,49
Середня маса поросяти, кг	8,15±0,38	8,13±0,37	8,07±0,27
Збереженість поросят, %	94,55	94,34	93,61
Середня маса однієї голови за 60 діб, кг	20,21±0,15	20,18±0,16	20,10±0,13

* $p < 0,05$ порівняно з контролем.

3,68 % порівняно з вихідним станом. Значне (на 12,58 %) підвищення вмісту гемоглобіну у сироватці крові було зафіксоване лише у свиноматок I-ої групи, яким давали α -ТОКА в інкапсульованому стані. У тварин інших груп спостерігали лише тенденцію до збільшення гемоглобіну: на 6,5 % у II-ій дослідній групі та 5,8 % у контрольній групі порівняно з вихідним показником.

Далі виявили, що щоденний прийом свиноматками композиції α -ТОКА/ДБК сприяє покращенню ліпідного обміну в їх організмах. Зокрема, пероральне введення міцелярної форми α -ТОКА дало змогу за період дослідження досягти істотного зниження вмісту метаболітів у плазмі крові тварин: холестеролу на 14,2 % та триацилгліцеролів на 33,9 % порівняно з показниками контрольної групи (табл. 4). Отже, у свиноматок I-ої дослідної групи процеси обміну ліпідів розвивалися інтенсивніше, ніж у тварин з контрольної групи. Цей позитивний факт відкриває можливість корегувати ліпідний обмін у порослих свиноматок і підтримувати високий рівень їх продуктивності.

Було встановлено також ефективнішу біологічну дію α -ТОКА у складі композиції на репродуктивні якості свиноматок (табл. 5). Саме від свиноматок I-ої дослідної групи було

отримано найбільшу кількість живих поросят за опорос. Цей показник на 14,55 % вищий порівняно зі свиноматками контрольної групи і на 3,63 % більший порівняно зі свиноматками II-ої дослідної групи. Найбільша кількість поросят при відлученні (через 28 діб) також була зафіксована у випадку свиноматок I-ої дослідної групи, яким додавали α -ТОКА, інкапсульований у міцелярні носії. Цей показник перевищував на 17,31 і на 3,84 % кількість відлучених поросят у контрольній та II-ій дослідній групах відповідно. Отже, свиноматки, яким додавали міцелярну систему α -ТОКА/ДБК, показали вищу багатоплідність, вищу масу гнізда при народженні та більшу кількість поросят при відлученні.

Великоплідність є особливим показником відтворювальної здатності свиноматок, оскільки жива маса народженого поросяти є величиною, яка зумовлює енергію росту та розвитку тварин, їх скороспілість і відгодівельні якості. За цим показником істотних відмінностей у різних групах тварин не спостерігали. Разом з тим, у свиноматок I-ої дослідної групи жива маса народженого поросяти була в середньому вищою на 4,1 і 1,6 %, ніж у свиноматок контрольної та II-ої дослідної груп відповідно (табл. 5). Крім того, середня маса поросяти при

відлученні (через 28 діб) і після двох місяців (60 днів) також була найвищою у I-ій дослідній групі.

У свиноматок I-ої дослідної групи встановлено переваги і за масою гнізда (сумарною масою народжених поросят від однієї свиноматки) при народженні та відлученні. Так, показник маси гнізда при народженні в цій групі був вищий, ніж у контрольній та II-ій дослідній групах, на 27,22 і 10,43 % відповідно, в той час як маса гнізда при відлученні у I-ій дослідній групі перевищувала цей показник у контрольній та II-ій дослідній групах на 12,87 і 3,72 % відповідно. Отже, свиноматки I-ої дослідної групи, яким додавали α -ТОКА в міцелярному носії, майже за всіма показниками репродуктивності переважали тварин з інших піддослідних груп.

Висновки

Отримано міцелярні наноносії “обрізаного” типу з близькою до сферичної морфологією на основі асиметричних гідрофільних диблок-кополімерів МОПЕО-*b*-ПАК, які демонструють високу ефективність у процесах інкапсуляції, керованого виділення та доставки аналога вітаміну Е – α -ТОКА в живих організмах. Показано, що такі міцелярні структури стабільні в часі у кислому (рН=3,5), слабко лужному (рН=9,0) середовищах і за наявності NaCl (у фізіологічному розчині). Разом з тим, підвищення рН дисперсії від 3,5 до 9,0 викликало часткову дезагрегацію міцелярних структур за рахунок зарядження –COOH-груп у “короні” міцел, а введення NaCl – прояв ефекту висолювання ДБК під дією низькомолекулярного електроліту.

Встановлено факт міцелоутворення чистого α -ТОКА у водно/етанольному (95/5 % об) середовищі, в якому формували композицію α -ТОКА/ДБК, і визначено термодинамічні параметри цього процесу. Міцели α -ТОКА зберігали стійкість у часі в широкому діапазоні рН від 3,5 до 9,0, однак за наявності NaCl посилювали свою агрегацію за рахунок комплексоутворення з іонами Na^+ та ефекту висолювання.

Визначено сферичну та еліпсоїдальну форми міцел α -ТОКА розмірами 3–34 нм, а також їх меншу стабільність у розчині, ніж міцел ДБК. Останній результат дав змогу розширити уявлення про механізм *in situ* інкапсуляції препарату міцелами диблок-кополімеру.

Відзначено ефект посилення агрегації міцел ДБК внаслідок інкапсуляції α -ТОКА, що було пов'язано, очевидно, з певною гідрофобізацією поверхні міцел блок-кополімеру завдяки взаємодії з препаратом. Отримана міцелярна композиція α -ТОКА/ДБК демонструвала високу стабільність у часі в діапазоні рН=3,5–9,0. Крім того, в розчинах композиції спостерігали істотне зменшення ефектів висолювання за наявності NaCl порівняно з дисперсією чистого препарату. Це вказувало на проникнення неполярних (ароматичних) ділянок молекул α -ТОКА в “ядро” міцел ДБК, що захищало їх від взаємодії з іонами Na^+ та зменшувало висоложуючий ефект.

На основі порівняльних досліджень процесів виділення α -ТОКА з власних міцел і міцел ДБК у воду в режимі *in vitro* встановлено важливий факт більш поступового та керованого виходу препарату з міцелярних наноносіїв під дією градієнта його концентрацій. Показано, що за умов наявності одного й того ж градієнта концентрацій α -ТОКА в системі швидкість та ефективність виділення препарату з міцел ДБК у фізіологічний розчин була нижчою в 1,6 і 1,5 раза відповідно, порівняно з його виходом у чисту воду. Причиною цього був описаний вплив NaCl на стан міцелярної системи.

Випробування біологічної дії композиції α -ТОКА/ДБК *in vivo* на групах поросних свиноматок показало багатоплановий позитивний вплив міцелярної форми препарату на метаболічні процеси в організмах тварин (зокрема, покращення ліпідного обміну), а також зростання продуктивності свиноматок і збереженості народжених поросят. Внаслідок цього розроблена композиція з аналогом вітаміну Е (і самим вітаміном Е) перспективна для використання як біологічно активна добавка у тваринництві.

REFERENCES

- Mishra M. K. Applications of Encapsulation and Controlled Release. CRC Press, 2019: 474. <https://doi.org/10.1201/9780429299520>
- Howard A.K., Vorup-Jensen T., Peer D. Nanomedicine. New York: Springer, 2016: 378. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3634-2>
- Parveen S., Misra R., Sahoo S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nano-medicine*, 2012, **8**: 147–166. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>
- Sounderya N., Zhang Y. Use of core/shell structured nanoparticles for biomedical applications. *Rec. Patent Biomed. Eng.* 2008, **1**: 34–42. <https://doi.org/10.2174/1874764710801010034>
- Zheltonozhskaya T.B., Permyakova N.M., Kunitskaya L.R., Stojka R.S., Klymchuk D.O., Maksin V.I., Iakubchak O.N. Bagatofunkcional`ni nanomateriali dlya biologii i medicini: molekulyarnij dizajn, sintez i zastosuvannya. *Rozdil 6.4*. Pod red. R.S. Stojki. Kiiv: Nauk. Dumka, 2017, 266–300.
- 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**: 405–418. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.10.028>
- Grigor`eva M.V. Polimerny`e sistemy` s kontroliruemym vy`svobozhdeniem biologicheskii aktivny`x soedinenij. *Biotexnologiya*, 2011, **4**, no. 2: 9–23.
- Bajpai A.K., Shukla S.K., Bhanu S., Kankane S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progr. Polym. Sci.*, 2008, **33**: 1088–1118. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005>
- Xu M.-M., Liu R.-J., Yan Q. Biological Stimuli-responsive Polymer Systems: Design, Construction and Controlled Self-assembly. *Chinese J. Polym. Sci.* 2018, **36**: 347–365. <https://doi.org/10.1007/s10118-018-2080-4>
- Fundueanu G., Constantin M., Ascenzi P. Preparation and characterization of pH and temperature-sensitive pullulan microspheres for controlled release of drugs. *Biomaterials*, 2008, **29**: 2767–2775. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.025>
- 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**, no. 1: 63–74. <https://doi.org/10.1002/masy.201100079>
- Permyakova N., Zheltonozhskaya T., Ignatovskaya M., Maksin V., Iakubchak O., Klymchuk D. Stimuli-responsive properties of special micellar nanocarriers and their application for delivery of vitamin E and its analogues. *Coll. & Polym. Sci.*, 2018, **296**: 295–307. <https://doi.org/10.1007/s00396-017-4242-2>
- Permyakova N.M., Zheltonozhskaya T.B., Ignatovskaya M.V., Maksin V.I., Iakubchak O.N., Klymchuk D.O., Polyan M.Ya., Grishchenko L.N. Miceli podvijnix gidrofil`nix blok-kopolimeriv dlya dostavki pogano rozchinnix vitaminiv v zhivix organizmax. *Polimernij zhurn.*, 2016, **38**, no. 1: 81–90.
- Cleaver G., Agilent Technologies, Inc. Biodegradable polymers. Analysis of biodegradable polymers by GPC/SEC. Application compendium. Agilent Technologies, Inc., US, 2015: 19.
- Jing Z., Xu A., Liang Y.-Q., Zhang Z., Yu C., Hong P., Li Y. Biodegradable poly(acrylic acid-co-acrylamide)/poly(vinyl alcohol) double network hydrogels with tunable mechanics and high self-healing performance. *Polymers*, 2019, **11**: Art.952. <https://doi.org/10.3390/polym11060952>
- Ignatovskaya M.V., Iakubchak O.N., Maksin V.I., Zheltonozhskaya T.B., Permyakova N.M. Vpliv vitaminu E u vodorozhchinnij formi na prrist zhivoi masi kroliiv. *Naukovij visnik Nacizional`nogo universitetu bioresursiv i prirodokoristuvannya Ukraïni. Seriya «Veterinarna medicina, yakist` i bezpeka produkczii tvarinnictva»*, 2015, no. 221: 87–91.
- Maksin V I., Iakubchak O. M., Ignatovska M. V., Zheltonozhska T. B., Permyakova N.M., Kaplunenka V.G. Quality rabbit through the use of vitamin E in the diet in water soluble form. *Industrial technologies and engineering*, 2015, **22**, no. 3: 373–376.
- 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**: 491–498. <https://doi.org/10.1021/ma0621324>
- Shen H., Zang L., Eisenberg A. Thermodynamics of crew-cut micelleformation of polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) diblockcopolymers in DMF/H₂O mixtures. *J. Phys. Chem. B.*, 1997, **101**: 4697–4708. <https://doi.org/10.1021/jp970105x>
- Makovetskiy V., Maksin V., Kurapova T., Vlasenko S. The investigation of antiradical and antioxidant activity of oxychroman and trimethylphenol MV-Derivatives. *Life and Environmental Sciences*, 2010, **1-2**: 28–33, <https://journals.nubip.edu.ua>
- Dibbern H-W., Müller R.M., Wirbitzki E. UV and IR spectra. Pharmaceutical substances (UV and IR) and pharmaceutical and cosmetic excipients (IR). Aulendorf (Germany): ECV - Editio Cantor Verlag, 2002: 1434.
- Amazan D., Cordero G., López-Bote C. J., Lauridsen C., Rey A. I. Effects of oral micellized natural vitamin E (D- α -tocopherol) v. synthetic vitamin E (DL- α -tocopherol) in feed on α -tocopherol levels, stereoisomer distribution, oxidative stress and the immune response in piglets. *Animal*, 2014, **8-3**: 410–419. <https://doi.org/10.1017/S1751731113002401>
- Zheltonozhskaya T., Partsevskaya S., Gorchev V., Klymchuk D. Processes of encapsulation and crystallization of prednisolone in PAAm-*b*-PEO-*b*-PAAm micellar solutions. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 2014, **590**: 140–148. <https://doi.org/10.1080/15421406.2013.874155>

24. Gordon Dzh. Organicheskaya ximiya rastvorov e`lektrolitov. M.: Mir, 1979: 712.
25. Kolakkandy S., Pratihari S., Aquino A.J.A., Wang H., Hase W.L. Properties of Complexes Formed by Na⁺, Mg²⁺, and Fe²⁺ Binding with Benzene Molecules J. Phys. Chem. A., 2014, **118**: 9500–9511. <https://doi.org/10.1021/jp5029257>
26. Salami I. S. A., Guinguina A., Agboola J. O., Omede A. A., Agbonlahor E. M. Tayyab U. Review: In vivo and postmortem effects of feed antioxidants in livestock: a review of the implications on authorization of antioxidant feed additives. Animal, 2016, **10**, no. 8: 1375–1390. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002967>

Received 22.09.2020

N.M. Permyakova,

Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine, 48, Kharkivske shose, Kyiv, 02160, Ukraine

e-mail: permyakova@ukr.net

T.B. Zheltonozhskaya,

Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine, 48, Kharkivske shose, Kyiv, 02160, Ukraine

e-mail: zheltonozhskaya@ukr.net

V.I. Karpovskiy,

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 17, Heroiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine

R.V. Postoi,

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 17, Heroiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine

V.I. Maksin,

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 17, Heroiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine

S.V. Partsevskaya,

Faculty of Chemistry, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 60, Volodymyrska str., Kyiv, 01033, Ukraine

L.N. Grishchenko,

Faculty of Chemistry, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 60, Volodymyrska str., Kyiv, 01033, Ukraine

D.O. Klymchuk,

M.G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine, 2, Tereshchenkivska str., Kyiv, 01004, Ukraine

V.V. Klepko,

Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine, 48, Kharkivske shose, Kyiv, 02160, Ukraine

e-mail: klepko_vv@ukr.net

COMPOSITION OF α -TOCOPHERYL ACETATE WITH MICELLAR NANOCARRIERS AND THE POSSIBILITY OF ITS USE AS A BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVE

Based on the asymmetric diblock copolymer (DBC) poly(ethylene oxide)/polyacrylic acid, effective, biocompatible and biodegradable micellar carriers were obtained for the delivery of vitamin E analogue, α -tocopheryl acetate (α -TOCA), in living organisms. The monitoring of the stability of micellar structures of the block copolymer and its composition with α -TOCA over time, in a saline solution and when the pH of the solution changes, was carried out. The stability of DBC micelles over time at pH = 3.5, partial disaggregation of micelles at pH = 9 and an increase in their aggregation in physiological solution were shown. The high stability of the α -TOCA/DBC composition formed *in situ* in time in the range of pH=3.5-9 and a significant decrease in its solutions of salting out effects in the presence of NaCl were established. The thermodynamic parameters of the process of the micelle formation of the pure α -TOCA in water/ethanol solution (95/5 v/v) as well as the size and morphology of its micellar structures were determined by light scattering and TEM methods. The initial α -TOCA micelles in water/ethanol solution were stable over a wide pH range, but their stability was much lower and the sensitivity to the presence of NaCl was much higher than that of DBC micelles. The dialysis method revealed the gradual release of the drug from the micellar carrier through a semipermeable membrane into the surrounding aqueous and aqueous-saline media. However, the rate and efficiency of α -TOCA release from the DBC micelles in an aqueous medium were significantly lower compared to a similar process of drug release from the pure α -TOCA dispersion. Thus, a possibility of providing of long-term controlled release of α -TOCA in the living organism due to the use of DBC micelles has been proven. Based on *in vivo* tests of the biological action of the composition on pregnant sows, its high bioavailability, rapid absorption, active participation in metabolic processes and positive effect on the reproductive qualities of sows compared to pure α -TOCA, were displayed, which improves the safety and productivity of newborn piglets.

Key words: diblock copolymer, α -tocopheryl acetate, micellar carrier, encapsulation/release, biological action.