

УДК 541.64:547(391+745)

## НОВЫЕ АМФИФИЛЬНЫЕ СОПОЛИМЕРЫ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА С МЕТАКРИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ РАЗВЕТВЛЕННОГО СТРОЕНИЯ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

© 2022 г. С. В. Курмаз<sup>a,\*</sup>, И. И. Иванова<sup>a</sup>, Н. В. Фадеева<sup>a</sup>, Е. О. Перепелицина<sup>a</sup>, М. А. Лапшина<sup>b</sup>, А. А. Балакина<sup>a</sup>, А. А. Терентьев<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup> Институт проблем химической физики Российской академии наук  
142432 Черноголовка Московской обл., пр. Акад. Семенова, 1, Россия

<sup>b</sup> Институт физиологически активных веществ Российской академии наук  
142432 Черноголовка Московской обл., Северный проезд, 1, Россия

<sup>c</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
Факультет фундаментальной физико-химической инженерии, 119991 Москва, Ленинские горы, Россия

<sup>d</sup> Научно-образовательный центр Московского государственного областного университета  
141014 Мытищи Московской обл., ул. Веры Волошиной, 24, Россия

\*e-mail: skurmaz@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 31.03.2022 г.

После доработки 08.06.2022 г.

Принята к публикации 01.07.2022 г.

Амфифильные сополимеры N-винилпирролидона и метакриловой кислоты, разветвленные диметакрилатом триэтиленгликоля, синтезированы радикальной сополимеризацией в толуоле и в этаноле; определены их основные физико-химические характеристики (мономерный состав, абсолютная средневесовая молекулярная масса, полидисперсность и гидродинамический радиус в воде и водных средах с различным значением pH). Показано наличие у растворов сополимеров в слабощелочных средах нижней критической температуры, которая сдвигается в область высоких значений в нейтральных и щелочных водных буферных растворах. Получены водорастворимые наноразмерные системы флуоресцирующего в красной области спектра тетрафенилпорфирина цинка с гидродинамическим радиусом около 50 нм (в водном нейтральном буферном растворе), стабильные в физиологически важном диапазоне температур. С помощью МТТ теста на различных линиях клеток — нормальных (FetMSC, Vero) и опухолевых (HepG2, HeLa) показано, что тройные сополимеры являются малотоксичными. Изучена динамика накопления полимерных частиц, загруженных красителем, в клетках HeLa и Vero с помощью флуоресцентной микроскопии. Сделан вывод о перспективности полученных сополимеров как носителей и средств доставки биологически активных соединений.

DOI: 10.31857/S2308112022700146

### ВВЕДЕНИЕ

Поливинилпирролидон (ПВП) (коммерческое название — поливидон/повидон) относится к числу наиболее востребованных полимеров в биомедицинской практике. Он обладает уникальными физико-химическими свойствами: химически инертен, бесцветен, термостоек и pH-стабилен, хорошо растворим в воде и в органических растворителях различной полярности, отличается хорошими сорбционными свойствами [1–4]. Данный полимер признан безопасным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и в связи с этим широко применяется в медицине, косметике, в фармацевтике и т.д. [5–9]. ПВП использует-

ся для разработки различных систем доставки лекарств, предназначенных как для перорального, местного, трансдермального и внутривенного введения [10], представляет интерес для доставки генов [11–15], адресной доставки биологически активных соединений различной природы [16, 17], может быть использован в регенерационной медицине [18–20]. Полимер обеспечивает контролируемое высвобождение лекарственного средства, улучшает биодоступность плохо растворимых в воде лекарственных средств, защищает активное соединение от внешних факторов (pH, температура и кислород).

В настоящее время амфифильные полимеры сложной архитектуры (дендримеры [21], сверхразветвленные, звездообразные и другие [22–24])

активно изучаются как носители и средства доставки биологически активных соединений. Благодаря своей топологии они обеспечивают пролонгированное действие лекарств, изменяют их распределение в организме, снижают токсичность и т.д. Амфифильные полимеры сложной архитектуры аналогично амфифильным линейным блок-сополимерам самоорганизуются в различные надмолекулярные структуры в растворах или на границах раздела фаз [23, 24]. Обычно они образуют мономолекулярные мицеллы размером менее 10 нм в растворе и мультимолекулярные мицеллы нано- и микронного размера [24]. Полимерные мицеллы, чувствительные к окружающей среде, могут изменить объем, структуру, свойства под действием различных факторов, таких как pH, температура, ионная сила. Так, мицеллы, содержащие термочувствительные сегменты цепи, претерпевают термоиндуцированный фазовый переход из водорастворимого в водонерастворимое состояние, что позволяет реализовать “умную” доставку биологически активных соединений. Внутриклеточные или внешние факторы, например связанные с изменением pH и температуры, используются для контролируемого высвобождения лекарств, загруженных в мицеллы.

Хеморазлагаемые терполимеры разветвленно-го строения были синтезированы посредством взаимодействия первичных гидроксильных групп в линейных терполимерах N-винилпирролидон (ВП) – кротоновая кислота–2-гидроксиэтилметакрилат с 1,6-гексаметилендиизоцианатом и показана возможность их применения в качестве носителей антибиотиков различных классов [25]. Амфифильные сополимеры ВП с диметакрилатами с контролируемой молекулярной массой, амфифильностью, размером макромолекулы и способностью к самоорганизации были получены радикальной сополимеризацией в растворах в одну стадию [26–32]. На их основе разработаны наноразмерные системы гидрофильного метформина, известного антидиабетического средства [27], липофильных органических комплексов платины (IV) с противоопухолевой активностью [28–30], тетрафенилпорфирина цинка как средства визуализации процесса внутриклеточного накопления [31, 32]. *In vitro* показана высокая биосовместимость полимерных носителей и их способность проникать в клетки HeLa и Vero; отсутствие токсичности у сополимера ВП с диметакрилатом триэтиленгликоля и его комплекса с метформин-ом установлено *in vivo* [27].

Для модулирования физико-химических свойств в сополимеры ВП с диметакрилатом триэтиленгликоля (ДМТЭГ) могут быть легко введены звенья нетоксичных, иммуногенных и биосовместимых функциональных мономеров, в частности метакриловой кислоты (МАК). Ее полимеры и сополимеры используются в различных биомеди-

цинских приложениях: от адресной доставки лекарств до микроинкапсулированного катализа и сенсоров [33]. Синтетические (со)полимеры МАК в качестве носителей лекарственных средств не оказывают токсического действия на клетки иммунной системы, не изменяют метаболической активности макрофагов и, таким образом, перспективны для создания новых лекарственных форм [34]. Кроме того, по функциональным группам COOH (со)полимеров могут быть ковалентно присоединены молекулы биологически активного соединения или получены их комплексы за счет невалентных взаимодействий (водородная связь, электростатические силы и т.д.). Линейные (со)полимеры МАК как полиэлектролиты при определенных значениях pH, соответствующих высокой степени ионизации групп COOH, могут разворачиваться в результате отталкивания их заряженных групп, вызывая резкий рост вязкости раствора [35]. Данный эффект практически полностью нивелируется в растворах разветвленной ПМАК благодаря архитектуре ее макромолекул [36]. С учетом этого новые тройные амфифильные сополимеры ВП–МАК–ДМТЭГ разветвленной топологии представляют значительный научный и практический интерес.

Цель настоящей работы – синтезировать тройные амфифильные сополимеры N-винилпирролидона с метакриловой кислотой, разветвленные диметакрилатом триэтиленгликоля, определить их основные физико-химические характеристики (мономерный состав, средневесовые молекулярные массы и гидродинамический радиус в водных средах) и изучить поведение в водных средах при варьировании температуры и pH для прогнозирования механизма высвобождения биологически активных соединений; оценить их цитотоксичность на клетках различных линий (нормальных и опухолевых) и получить наноразмерные системы флуоресцентного красителя 5,10,15,20-тетрафенил-21Н,23Н-порфирина цинка (ZnТФП)–сополимер для изучения способности полимерных частиц проникать во внутриклеточное пространство.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали N-винилпирролидон (99%, “Acros Organics”), который предварительно очищали вакуумной перегонкой. ДМТЭГ (95%, “Aldrich”) и МАК (99.5%, “Acros Organics”) применяли без предварительной очистки. Инициатором служил ДАК, очищенный перекристаллизацией из этанола. В работе также использовали растворители – этанол, толуол (ч.д.а) и *n*-гексан (х.ч.), изопропиловый спирт (о.с.ч.). Этанол очищали перегонкой.

Сополимеры ВП–МАК–ДМТЭГ синтезировали в толуоле из мономерной смеси мольного

состава 98 : 2 : 2 (1) и в этаноле из мономерных смесей 98 : 2 : 2 (2) и 95 : 5 : 2 (3). Процесс осуществляли в трехгорлой колбе, снабженной обратным холодильником и термометром, при непрерывном барботировании аргоном в течение 2 ч при 80°C в термостате. Все компоненты реакционной смеси вводили одновременно. Содержание реагентов в растворителе составляло ~20 мас. %. Концентрация инициатора 0.02 моль/л.

В ходе синтеза в толуоле сополимер 1 частично осаждался из реакционной смеси. Растворимый в толуоле сополимер 1 выделяли осаждением в десятикратный избыток гексана и получали фракцию Ф-1. Не растворимую в толуоле фракцию Ф-2 сополимера 1 растворяли в хлороформе и также высаживали избытком гексана. Затем ее повторно пересаждали гексаном и получали фракцию Ф-2\* сополимера 1. Из этанольных растворов десятикратным избытком осадителя *n*-гексана высаживали сополимеры 2 и 3. Сополимеры сушили от остатков растворителя и осадителя до постоянной массы на воздухе и в вакууме при 60°C. Выход сополимера 1 составлял ~92%, сополимеров 2 и 3 – около 98%. Фракции Ф-1 и Ф-2, Ф-2\* сополимера 1 представляли собой аморфные порошки. Сополимеры 2 и 3 представляли собой стеклообразные продукты.

С помощью элементного анализа определяли содержание СНН в полученных сополимерах ВП на приборе анализатор “Vario cube” (“Elementar GmbH”). Содержание азота (%) во фракциях Ф-1, Ф-2 и Ф-2\* сополимера 1, а также сополимеров 2 и 3 составляет  $11.98 \pm 0.01$ ,  $9.95 \pm 0.01$ ,  $10.19 \pm 0.07$ ,  $9.83 \pm 0.15$ ,  $9.81 \pm 0.02$  соответственно. Оно закономерно снижается в данном ряду сополимеров в результате увеличения содержания (ди)метакрилатных звеньев.

Потенциометрическое титрование водных растворов сополимеров 2 и 3 выполняли с помощью иономера “Мультитест ИПЛ-201”; титрант – 0.01 моль/л раствор NaOH.

ИК-спектры сополимеров записывали в режиме нарушенного полного внутреннего отражения на приборе FTIR “Bruker  $\alpha$ ” в интервале 400–4000  $\text{см}^{-1}$ , число сканирований 16.

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  растворов сополимеров в дейтерированном хлороформе (6 мг/мл) регистрировали на сверхпроводящем импульсном широкополосном двухканальном спектрометре “ЯМР AVANCE III 500 MHz” (“Bruker Biopin”).

Абсолютную молекулярную массу сополимеров ВП–МАК–ДМТЭГ определяли методом эксклюзионной хроматографии с помощью жидкостного хроматографа “Waters” (2 колонки PS-gel, 5 мкм, MIXED-C, 300  $\times$  7.5 мм), снабженного рефрактометрическим детектором и детектором многоугольного светорассеяния “WYATT DAWN HELEOS II” (“Wyatt”),  $\lambda = 658$  нм. Элюентом

служил МП с добавкой хлорида лития (1 мас. %), который препятствует агрегации макромолекул в полярном растворителе. Температура измерения 70°C, скорость элюирования 1 мл/мин. Значения  $dn/dc$  определяли из данных детектора многоугольного светорассеяния. Все растворы полимеров предварительно фильтровали через фильтры с диаметром пор 0.2 мкм. Абсолютную среднемассовую молекулярную массу сополимера получали из данных детектора светорассеяния с помощью программного обеспечения Astra, версия 5.3.2.20.

Методом ДРС исследовали поведение сополимеров в водных растворах в диапазоне температуры 20–60°C при значениях pH 5, 6.8, 9.5, 12.5, а также наноструктур ZnТФП в водном буферном растворе. Перед измерениями виалы многократно промывали очищенным через фильтр PES 0.45 мкм растворителем, заполняли растворами и термостатировали при заданной температуре в течение 20 мин. Точность термостатирования  $\pm 0.1^\circ$ . Измерения проводили на установке “Photocor Compact” (“Photocor Instruments Inc.”, США), оснащенной диодным лазером ( $\lambda$  654 нм), при угле детектирования 90°. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения DynaLS, версия 2.8.3. Гидродинамический радиус сополимеров и наноструктур ZnТФП рассчитывали по формуле Стокса–Эйнштейна.

Критическую концентрацию агрегатообразования сополимеров в воде находили из зависимости интенсивности рассеянного света от логарифма концентрации сополимеров в воде при 22°C; точку излома интерпретировали как критическую концентрацию агрегатообразования сополимера в воде. Из зависимости интенсивности рассеянного света и гидродинамического радиуса рассеивающих центров от температуры делали выводы о стабильности водных растворов сополимеров.

В работе использовали флуоресцирующий в красной области спектра краситель ZnТФП (“Aldrich”), не растворимый в воде, но растворимый в хлороформе, бензоле, ацетоне и ДМСО. Инкапсулирование ZnТФП проводили по следующей методике: в 4 мл раствора сополимеров 2 (3 мг/мл) и 3 (2 мг/мл) в изопропиловом спирте вводили 0.3 мл раствора красителя в толуоле (0.7 мг/мл) при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Получали визуально прозрачные растворы сиреневого цвета, испаряли органические растворители. Полученные полимерные пленки сополимеров 2 и 3, содержащие 1.8 и 2.6 мас. % красителя, растворяли в 8 мл водного нейтрального буферного раствора (PBS, pH 6.8). Концентрация сополимеров в растворе составляла 1.5 мг/мл.

Для биологических тестов готовили полимерную композицию, используя раствор сополимера 2 в изопропиловом спирте (2 мг/мл) и ZnТФП в толуоле (0.7 мг/мл). К 200 мл раствора сополимера по каплям при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки вводили 15 мл раствора красителя. Органические растворители отгоняли в вакууме при комнатной температуре, полимерные пленки сушили на воздухе и в вакууме. В полимерных композициях содержание ZnТФП составляло 2.6 мас. % в расчете на сополимер.

Спектры поглощения водных растворов инкапсулированного в полимерные частицы красителя регистрировали с помощью сканирующего спектрофотометра “СПЕКС ССП-705-1”. Толщина кюветы 0.1 или 0.2 см.

Цитотоксичность тройного сополимера исследовали *in vitro* на культуре нормальных клеток – FetMSC (фибробласты человека), Vero (почка зеленой африканской марышки) и опухолевых – HeLa (аденокарцинома шейки матки человека, клон М-HeLa) и HepG2 (карцинома печени человека), полученных из коллекции Института цитологии Российской академии наук.

Культивирование клеток проводили в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37°C в среде EMEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Цитотоксические свойства сополимера 2 изучали с использованием МТТ-теста. Исследуемые линии клеток рассеивали в культуральные 96-луночные планшеты в концентрации  $5 \times 10^4$  клеток/мл. Соединения вносили в культуральную среду через 24 ч после посева. Краситель МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) добавляли в инкубационную среду через 72 ч после введения сополимера в концентрации 0.5 мг · мл<sup>-1</sup>. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100% ДМСО. Оптическую плотность измеряли при основной длине волны 570 нм и фоновой длине волны 620 нм с использованием многофункционального микропланшетного ридера “Spark 10M” (“Tecan”, США).

Клеточную аккумуляцию полимерных частиц, нагруженных флуоресцентным красителем, исследовали на клетках HeLa и Vero, полученных из коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург). Клетки HeLa были выращены в среде Игла MEM, клетки Vero – в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащей 10%-ную эмбриональную сыворотку (“Biowest”, Франция), пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мг/мл) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C.

Клетки, выращенные на покровных стеклах размером 24 × 24 мм, при плотности клеточной культуры  $15 \times 10^4/2$  мл в шестилуночных планше-

тах, инкубировали с растворенными в PBS<sub>x1</sub> наночастицами ZnТФП–сополимер 2. Конечная концентрация в инкубационной среде ZnТФП–сополимер 2 составляла 50 мкг/мл. Инкубацию с наночастицами проводили в течение 24 ч. Далее клетки отмывали от остатков среды раствором PBS<sub>x1</sub> и фиксировали раствором 4%-ного параформальдегида 30 мин при комнатной температуре. Затем проводили пермеабиллизацию в 0.5%-ном растворе Triton X-100 в PBS<sub>x1</sub> в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее образцы выдерживали в окрашивающем растворе DAPI (“Serva”, Германия) в течение 10 мин и после промывания в деионизованной воде сушили при комнатной температуре в темноте. После этого образцы помещали на предметное стекло в каплю фиксатора Fluoromount (“Sigma-Aldrich”, Германия). По периметру стекла заклеивали лаком.

Накопление и локализацию наночастиц в клетках изучали с помощью флуоресцентного микроскопа “Axio Scope.A1” (“Carl Zeiss”, Германия), используя объектив N-Achroplan 100×/1.25 Oil M27. Образцы фотографировали с применением разных флуоресцентных светофильтров: Fs 49 DAPI (EX G 365, EM BP 445/50), Fs 45 HQ TexasRed (EX BP 560/40, EM BP 630/75), используя цифровую камеру высокого разрешения Axio-Cam MRc 5 и программное обеспечение для обработки и анализа изображений Zen 2012 (blue edition).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Синтез и характеристики сополимеров ВП–МАК–ДМТЭГ*

Радикальная сополимеризация моно- и бифункциональных мономеров в условиях ограничения роста первичных полимерных цепей с помощью обычных и каталитических передатчиков является одним из наиболее эффективных способов синтеза разветвленных полимеров [26, 36, 37]. Ранее мы показали, что сополимеры ВП–ДМТЭГ могут быть получены в отсутствие передатчика цепи при содержании бифункционального мономера (разветвляющего агента) не более 5 мол. % [31]. Это важно для получения биосовместимых сополимеров, не содержащих в своем составе токсичных концевых групп передатчика цепи, в частности 1-декантиола, который применяется для контроля их молекулярной массы. Данный подход был использован при синтезе сополимеров ВП–МАК–ДМТЭГ.

Константы сополимеризации ВП (M<sub>1</sub>) и МАК (M<sub>2</sub>) равны  $r_1 = 0.04$  и  $r_2 = 0.56$  [38], МАК (M<sub>1</sub>) и ММА (M<sub>2</sub>) – монофункционального аналога ДМТЭГ –  $r_1 = 0.32$  и  $r_2 = 0.60$  [39], следовательно метакриловые мономеры более активны в радикальной сополимеризации, чем ВП. На началь-

ных стадиях сополимеризации все радикалы присоединяют более реакционноспособные мономеры ДМТЭГ и МАК, и образуются полимерные цепи, обогащенные этими мономерами. Распределение звеньев МАК и ДМТЭГ в них является статистическим, что приводит к ограничению вероятности межмолекулярного сшивания и образованию сшитого макрогеля. После полимеризации (ди)метакрилатов образуется полимерная структура с “подвешенными” связями С=С звеньев ДМТЭГ, по которым присоединяются растущие цепи ПВП. В результате формируется трехмерная структура с областями, состоящими в основном из метакрилатных фрагментов и образованными цепями ПВП. Эти предположения основаны на ранее полученных нами данных по изучению кинетики сополимеризации в широком диапазоне конверсий ВП и диметакрилата этиленгликоля (ДМЭГ), а также анализа мономерного состава образующихся сополимеров методами ИК-спектроскопии и изотермической калориметрии [26]. Из зависимостей конверсии мономеров ДМЭГ и ВП от времени, рассчитанных по убыли интенсивности соответствующих полос поглощения в ИК-спектрах, следовало, что скорость превращения ВП существенно ниже, чем диметакрилата. Зависимость приведенной скорости сополимеризации ВП и ДМЭГ от конверсии в этаноле носила двухступенчатый характер. Первый участок кинетической кривой, лежащий в области начальных и средних конверсий (до ~0.3) был связан с радикальной сополимеризацией ДМЭГ с ВП. Второй участок обусловлен протеканием привитой полимеризации ВП к сополимеру, содержащему “подвешенные” связи С=С, в результате чего увеличивалось содержание звеньев ВП в сополимере.

Сополимеры 1–3 синтезированы в различных по полярности растворителях – толуоле и этаноле. Процесс, протекавший в толуоле, носил гетерогенный характер, и имело место фазовое разделение реакционной смеси. Между тем, в этаноле реакция проходила в гомогенных условиях; фазовое разделение отсутствовало, и полимерные продукты были полностью растворимы в этаноле. Причиной таких различий, очевидно, является термодинамическое качество растворителя и его сродство с сополимером. В “хорошем” растворителе сополимер демонстрирует высокую растворимость; между протонным растворителем и функциональными группами мономерных звеньев – донорами электронов, подобно сополимерам ВП–ДМТЭГ [40], образуется водородная связь. Кроме того, при полимеризации в этаноле возможна передача цепи на растворитель, в результате которой на концах полимерных цепей появляются полярные группы, что повышает взаимодействие сополимеров с растворителем.

Растворимость полученных сополимеров исследовали в полярных растворителях – воде, водном буферном растворе (рН 6.8) и изопропиловом спирте. При концентрации 10 мг/мл растворы сополимеров 1–3 в воде (рН ~ 5) опалесцировали в разной степени в зависимости от их состава. Ограниченная растворимость в воде, по-видимому, обусловлена сильными межмолекулярными взаимодействиями полимерных цепей, содержащих звенья МАК, ВП и ДМТЭГ. Между тем, в водных нейтральных буферных растворах сополимеры были полностью растворимы. Это связано с образованием солевой формы звеньев МАК, ее диссоциацией и появлением ионизированных групп  $\text{COO}^-$  в полимерных цепях.

Сополимер 3 частично растворялся в изопропиловом спирте в отличие от других сополимеров, поскольку в его составе содержится не растворимая в спирте фракция с высоким содержанием метакрилатных звеньев, о чем свидетельствуют данные ИК-спектроскопии. Это позволяет сделать предположение о композиционной неоднородности данного сополимера.

В табл. 1 приведено содержание звеньев ВП в сополимерах, рассчитанное по содержанию в них азота, а также суммарное содержание звеньев МАК и ДМТЭГ. Видно, что фракция Ф-2 сополимера 1 обогащена (ди)метакрилатами и заметно отличается по мономерному составу от фракции Ф-1. В составе фракции Ф-2\* незначительно снижается доля макромолекул, обогащенных (ди)метакрилатами. Увеличение содержания МАК в мономерной смеси приводит к росту метакрилатной составляющей в сополимере 3. Об этом свидетельствуют также данные потенциометрического титрования: содержание МАК звеньев в сополимерах 2 и 3 составляет – 3.8 и 6.7 мас. %.

Сополимеры были идентифицированы с помощью ИК-спектроскопии (рис. S1, Дополнительный материал) по полосам поглощения, относящимся к валентным колебаниям групп С=О метакрильных и ВП-звеньев при волновых числах  $\sim 1720 \text{ см}^{-1}$  и  $\sim 1665 \text{ см}^{-1}$  соответственно. Разрешение и интенсивность полосы поглощения валентных колебаний связи С=О метакрильных групп зависит от мономерного состава сополимеров. Следует отметить, что идентифицировать звенья МАК по этой полосе невозможно из-за ее перекрывания с соответствующей полосой поглощения звеньев ДМТЭГ. В ИК-спектрах всех сополимеров в области  $3600\text{--}3000 \text{ см}^{-1}$  присутствует широкая полоса поглощения, характерная для валентных колебаний групп ОН адсорбированной воды, связанной водородной связью с амфифильными сополимерами [40]. Поглощение воды в данной области спектра препятствует идентификации звеньев МАК по соответствующим полосам поглощения.

**Таблица 1.** Мономерный состав сополимеров ВП–МАК–ДМТЭГ, их абсолютные среднемассовые молекулярные массы  $M_w$ , критические концентрации агрегатообразования и гидродинамические радиусы

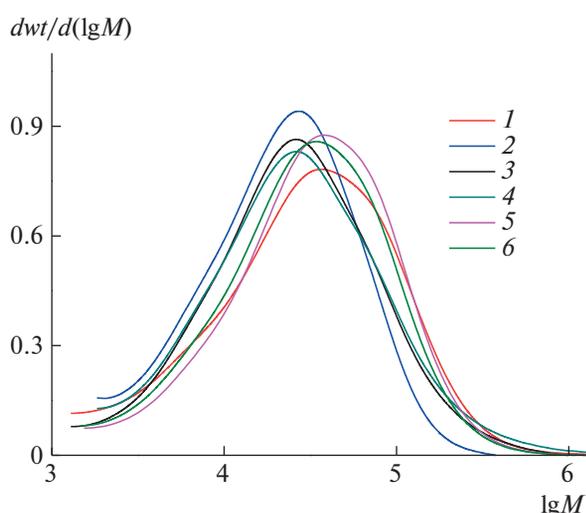
Сополимер	Содержание ВП и метакрилатных звеньев (ДМТЭГ и МАК) в сополимерах 1–3, мол. %	Метод эксклюзионной хроматографии (RI + MALLS)*		Критическая концентрация агрегатообразования, мг/мл (22°C)	$R_h^{**}$ , нм (25°C)
		$M_w \times 10^{-4}$	$\bar{D}$		
Ф-1	97.0 : 3.0	3.9	1.6	2.0	4; 57
Ф-2	86.3 : 13.7	19.6	5.4	0.1	–
Ф-2*	87.6 : 12.4	19.9	3.4	–	27; 408
2	85.6 : 14.4	7.6	2.1	5.0	7; 104
3	81.9 : 18.1	8.7	2.6	3.0	5; 57

\*Для линейного ПВП  $M_w = 6.5 \times 10^4$ ,  $\bar{D} = 1.8$ ,  $dn/dc = 0.052$  мл/г; для фракций Ф-1, Ф-2, Ф-2\* сополимера 1, а также для сополимеров 2 и 3 инкременты показателя преломления  $dn/dc$  равны соответственно 0.049, 0.046, 0.052, 0.049 и 0.050 мл/г;

\*\* Определены при концентрациях сополимеров в воде 5 мг/мл, для фракции Ф-2\* сополимера 1 – 0.5 мг/мл при 25°C.

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  метакриловой кислоты протон группы ОН регистрируется при  $\delta = 11$  м.д., однако в спектрах сополимеров такой сигнал не наблюдается (рис. S2, Дополнительный материал), по-видимому, вследствие низкого содержания этих звеньев в полимерных цепях или недостаточной концентрации сополимеров в растворах. Вместе с тем, регистрируются характерные сигналы протонов звеньев ВП и ДМТЭГ. Так, в спектрах наблюдаются две группы сигналов, относящиеся к звеньям ВП. Первая группа включает сигналы  $\text{NCH}_\alpha$  протонов в полимерной цепи и

фрагментов  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$  пирролидона при  $\delta = 3.0\text{--}4.0$ . Вторая группа представлена сигналами  $\text{CH}_2$  протонов в полимерной цепи и  $\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$  и  $\text{NCH}_2$  фрагментов пирролидона при  $\delta = 1.4\text{--}2.4$  м.д. Сигналы протонов группы  $\text{CH}_3$  ДМТЭГ звеньев детектировались в спектре сополимеров при  $\delta \sim 0.9$  м.д. В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  проявляется широкий сигнал при  $\delta = 4.1$  м.д., соответствующий атомам водорода во фрагменте  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  прореагировавшего ДМТЭГ. Однако при  $\delta \sim 5.6$  и  $6.2$  м.д. наблюдаются слабые сигналы протонов “подвешенных”  $\text{C}=\text{C}$ -связей ДМТЭГ.



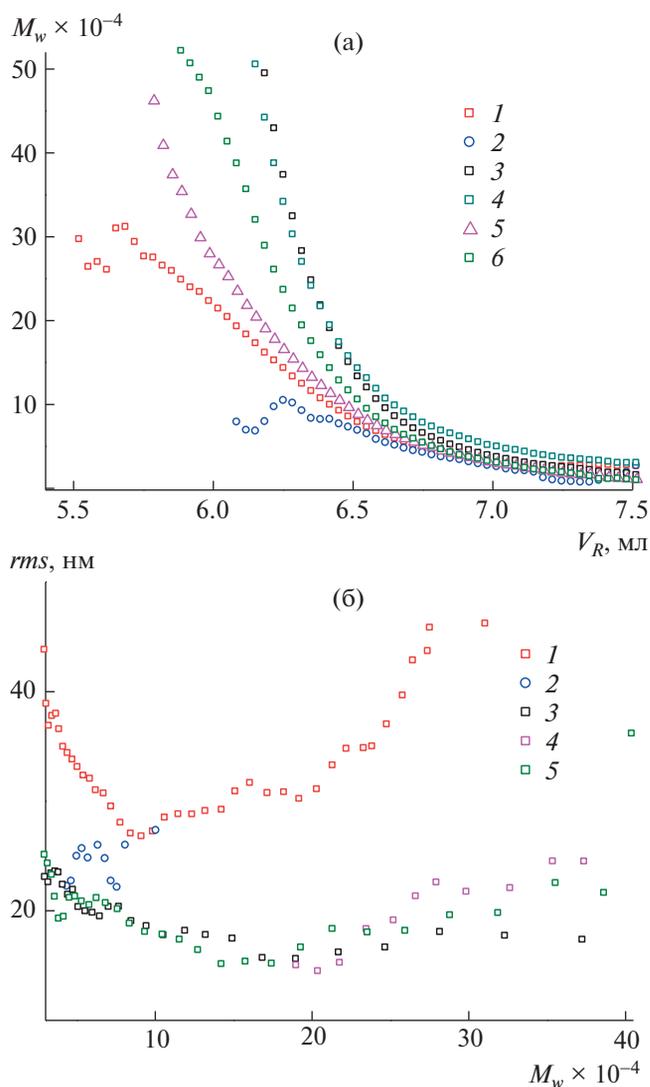
**Рис. 1.** Кривые молекулярно-массового распределения ПВП (1), фракций Ф-1 (2), Ф-2 (3), Ф-2\* (4) сополимера 1 и сополимеров 2 (5), 3 (6). Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

В табл. 1 приведены значения абсолютных среднемассовых молекулярных масс  $M_w$  сополимеров, полученные методом эксклюзионной хроматографии. Сополимеры, синтезированные по данной методологии, как правило, обладают широким ММР, поскольку представляют собой смесь макромолекул различной молекулярной массы и архитектуры [36, 37]. Так, например, сополимер МАК с дивинилбензолом, синтезированный в условиях передачи цепи на додекантиол при мольном соотношении 100 : 2 : 1, характеризуется значением  $P \sim 55$  [36]. Тройные сополимеры ВП–МАК–ДМТЭГ подобно ПВП имеют узкое молекулярно-массовое распределение, о чем свидетельствуют унимодальные пики на кривых ММР с максимумами при  $M \sim 10^{4.5}$  (рис. 1). Фракция Ф-1 сополимера 1 отличается от Ф-2 низкой величиной  $M_w$  и узким коэффициентом полидисперсности. В свою очередь сополимер 2 обладает меньшей молекулярной массой и более узким ММР, чем фракции Ф-2 и Ф-2\* сополимера 1 близкого мономерного состава. Это может быть обусловлено передачей цепи на растворитель

(этанол) в процессе его синтеза. Об уровне ветвления полученных сополимеров можно судить по зависимостям молекулярной массы от элюентного объема  $V_R$  и среднеквадратичного радиуса инерции  $rms$  от  $M_w$  (рис. 2). Кривые  $M_w(V_R)$  (рис. 2а) фракций  $\Phi$ -2,  $\Phi$ -2\* сополимера 1 и сополимеров 2, 3 лежат значительно выше эталонного образца – линейного ПВП. Это означает, что при любом заданном  $V_R$  элюируются сополимеры с одинаковым гидродинамическим объемом, но с большей молекулярной массой. Исключение составляет фракция  $\Phi$ -1 сополимера 1, для которой зависимость  $M_w(V_R)$  лежит ниже, чем линейного ПВП. Возможно, ее макромолекулы имеют топологию наногелей, образующихся в результате внутрицепной циклизации макромолекул и плохо набухающих в элюенте. Вместе с тем фракции  $\Phi$ -2 и  $\Phi$ -2\* сополимера 1 характеризуются высокими молекулярными массами, а их макромолекулы отличаются высокой плотностью молекулярной упаковки полимерных цепей. В пользу этого свидетельствуют также зависимости  $rms$  от  $M_w$  (рис. 2б), полученные из данных детектора светорассеяния. Значения  $rms$  макромолекул сополимеров существенно ниже, чем у ПВП. Фактор Зимма  $g'$ , рассчитанный для макромолекул с  $M_w \sim 10^5$  как отношение его среднеквадратичного радиуса инерции и линейного полимера ВП указывает на разветвленный характер сополимера. Так, для макромолекул фракций  $\Phi$ -2 сополимера с  $M_w \sim (0.5–1.0) \times 10^5$  и  $2.5 \times 10^5$  значение  $g'$  изменяется от 0.6–0.7 до 0.45, т.е. с ростом молекулярной массы увеличивается их степень разветвления.

*Поведение сополимеров ВП-МАК-ДМТЭГ в водных средах*

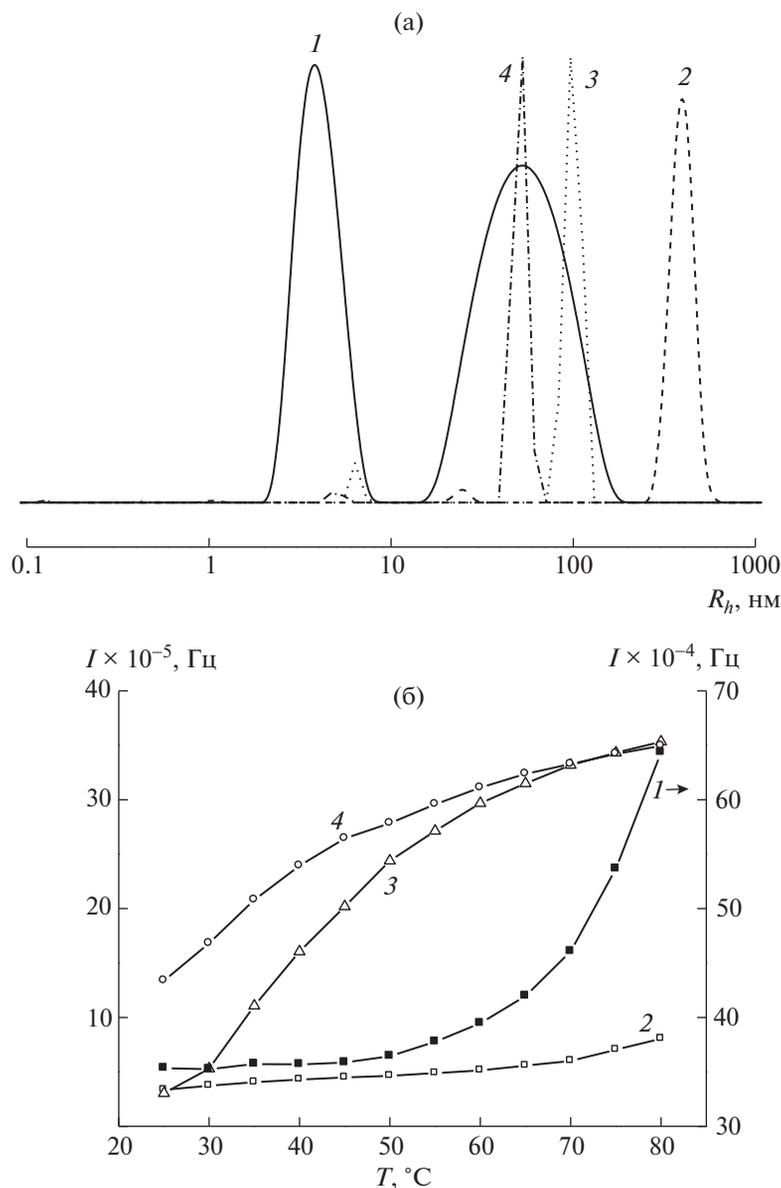
В разбавленных растворах отдельные макромолекулы сополимеров, по-видимому, могут быть рассмотрены как мицеллоподобные структуры, в которых можно выделить малополярные и высокополярные части, образованные звеньями (ди)метакрилатов и ВП соответственно. При увеличении концентрации сополимеров в растворе они самоорганизуются в мультимолекулярные мицеллы [23, 24]. В пользу этого свидетельствуют зависимости интенсивности рассеяния света  $I$  водных растворов сополимеров от концентрации в полулогарифмических координатах. Точки излома на этих зависимостях были интерпретированы как критические концентрации агрегатообразования сополимеров (табл. 1). Фракция  $\Phi$ -2 сополимера 1 характеризуется низкой величиной критической концентрации агрегатообразования и агрегирует в воде уже при малых концентрациях вследствие высокого содержания в полимерных цепях метакрилатных звеньев.



**Рис. 2.** Зависимости молекулярной массы  $M_w$  от элюентного объема  $V_R$  ПВП (1), фракций  $\Phi$ -1 (2),  $\Phi$ -2 (3),  $\Phi$ -2\* (4) сополимера 1 и сополимеров 2 (5), 3 (6) (а), а также среднеквадратичного радиуса инерции  $rms$  от  $M_w$  ПВП (1), фракций  $\Phi$ -1 (2),  $\Phi$ -2 (3) сополимера 1 и сополимеров 2 (4), 3 (5) (б).

Фракция  $\Phi$ -1 сополимера 1 с высоким содержанием звеньев ВП агрегирует при значительно более высокой концентрации в воде. Сополимеры 2 и 3 менее склонны к агрегации, чем фракция  $\Phi$ -1 сополимера 1, несмотря на более высокую молекулярную массу и содержание (ди)метакрилатных звеньев. Возможно, это обусловлено наличием в данных сополимерах молекул этанола, образующих Н-связь с полярными группами сополимеров, или его остатков на концах полимерных цепей в результате передачи цепи на растворитель.

Зависимости на рис. 3а получены путем обработки результатов измерения флуктуаций интен-



**Рис. 3.** Кривые распределения интенсивности рассеяния света по размерам рассеивающих центров в водных растворах фракций Ф-1 (1), Ф-2\* (2) сополимера 1 и сополимеров 2 (3), 3 (4) при 25°C (а), а также зависимости интенсивности  $I$  рассеяния света от температуры водными растворами соответствующих сополимеров (б). Концентрация сополимеров 5 мг/мл.

сивности рассеяния (Intensity Distribution) водными растворами сополимеров 1–3. В растворе фракции Ф-1 сополимера 1 распределение по размерам частиц является полимодальным, имеющиеся два типа рассеивающих центров следует отнести, по-видимому, к отдельным макромолекулам и их агрегатам. В растворах фракции Ф-2 сополимера 1 и сополимеров 2, 3 распределение практически унимодальное, гидродинамический радиус  $R_h$  рассеивающих центров основных пиков лежит в нанометровом диапазоне (табл. 1). Размеры макромолекул и их агрегатов (полимер-

ных частиц) в водных средах удовлетворяют основным критериям, предъявляемым к средствам доставки и касающихся их выведения из организма почками и селезенкой [41–43]. Кроме того, частицы этого размера будут достаточно время циркулировать в кровотоке, что повысит эффективность действия инкапсулированных лекарств.

На рис. 3б видно, что интенсивность рассеяния света водного раствора фракции Ф-1 сополимера 1 на порядок выше, чем у водных растворов фракции Ф-2 сополимера 1 и сополимеров 2, 3. Интенсивность рассеяния света всех

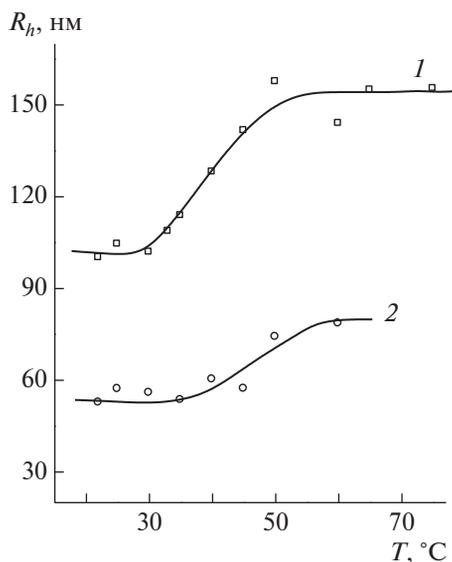


Рис. 4. Зависимость гидродинамического радиуса рассеивающих центров водных растворов сополимеров 2 (1) и 3 (2) от температуры. Концентрация сополимеров 5 мг/мл.

водных растворов сополимеров возрастает с увеличением температуры, что указывает на усиление процессов агрегации макромолекул. Причиной этого, по-видимому, является разрушение водородных связей между молекулами воды и функциональными группами сополимера [40], коллапс полярной оболочки и рост гидрофобных взаимодействий таких макромолекул.

Анализируя зависимости  $I(T)$  и  $R_h(T)$ , оценивали стабильность водных растворов исследованных сополимеров. Зависимости  $I(T)$  (рис. 3б) свидетельствуют о том, что точка помутнения водных растворов фракций Ф-1 и Ф-2\* сополимера 1 сильно смещена в область высоких значений, как следствие, интенсивность рассеяния света их водными растворами практически не изменяется до 50°C. Между тем, сополимеры 2 и 3 сильно реагировали на изменение температуры. В отличие от фракций сополимера 1 резкий рост значения  $I$  имел место уже при ~30°C, и их водные растворы начинали опалесцировать вследствие агрегации макромолекул. Этот процесс был обратимым, и при охлаждении растворы снова становились прозрачными. Таким образом, сополимеры 2 и 3 обладают высокой “чувствительностью” к температуре при достаточно низких ее значениях. Следует отметить, что ПВП не относится к числу термочувствительных полимеров и растворяется в воде в широком диапазоне температур. Появление термочувствительности у сополимеров ВП–МАК–ДМТЭГ, безусловно, связано с содержанием в их полимерных цепях метакрилатных звеньев. Интервал термочувствительности полученных сополимеров не связан только с

их мономерным составом. Из сравнения зависимостей  $I(T)$  (рис. 3б) фракции Ф-2\* сополимера 1 и 2, имеющих близкий состав, можно заключить, что сополимер 2, полученный в этаноле, сильнее реагирует на изменение температуры. Вероятно, это обусловлено присутствием на концах полимерных цепей групп  $\text{CH}_3\text{СНОН}$ , которые появляются в результате обрыва полимерных радикалов на молекулах растворителя. Водные растворы фракции Ф-1 сополимера 1, полученного в толуоле, являются стабильными в более широком интервале температуры.

На рис. 4 приведены зависимости  $R_h(T)$  водных растворов сополимеров 2 и 3. Температурный диапазон, в котором наблюдается резкий рост размеров рассеивающих центров, у водных растворов этих сополимеров заметно отличается. Для сополимера 2 он составляет 30–50°C, а для сополимера 3 – 40–60°C. Точки перегиба, соответствующие точкам начала помутнения растворов, на указанных зависимостях составляют ~40 и ~50°C, т.е. у сополимера 3 она смещается в область более высоких температур в результате изменения состава макромолекул и их физико-химических характеристик. Таким образом, сополимеры 2 и 3 являются термочувствительными в подходящем диапазоне температуры и представляют интерес как “умные” средства доставки биологически активных соединений. С повышением температуры макромолекулы сначала уменьшаются в размерах из-за разрушения водородной связи между цепями ПВП и растворителем, а затем объединяются из-за усиления их гидрофобного взаимодействия. Такие структурные

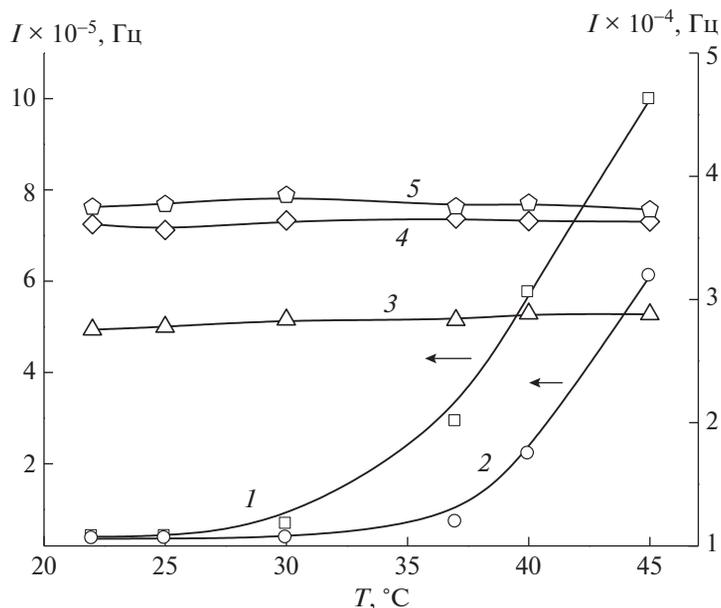


Рис. 5. Кривые зависимости интенсивности рассеянного света от температуры сополимера 2 в воде (1) и в водных буферных растворах при рН 5.1 (2), 6.8 (3), 9.5 (4) и 12.5 (5). Концентрация сополимера 5 мг/мл.

изменения будут способствовать высвобождению биологически активных соединений. Из двух потенциальных носителей биологически активных соединений термочувствительный в области физиологически важных температур сополимер 2 представляет наибольший интерес.

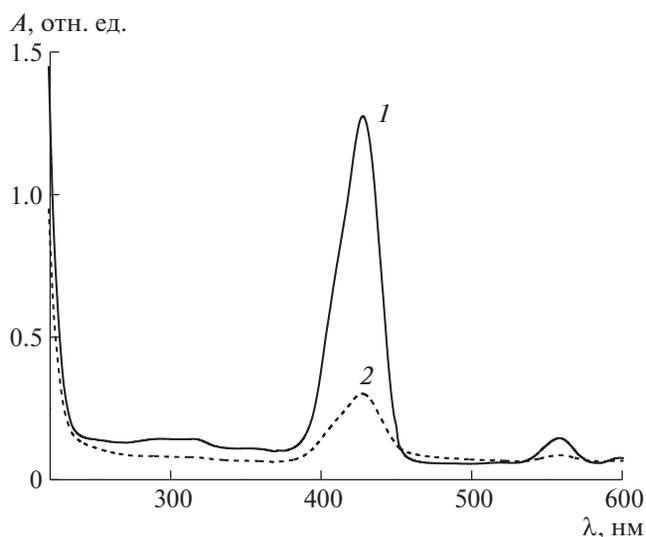
Между тем, термочувствительность полимерного носителя зависит от рН среды. На рис. 5 приведены зависимости интенсивности рассеяния света водными растворами сополимера 2 при различных значениях рН. Видно, что водные и слабо кислые растворы (рН 5.1) сополимера сильнее рассеивают свет: значение  $I$  на порядок больше, чем у водных растворов сополимера с высокими значениями рН. С повышением температуры увеличивается интенсивность рассеяния света этих растворов вследствие агрегации полимерных частиц. Это свидетельствует об образовании водородных связей между функциональными группами сополимера и молекулами воды в данных средах при температуре ниже 30°C и их разрушении при более высоких температурах.

Интенсивность рассеяния света нейтрально/слабо щелочного и щелочного водного раствора сополимера 2 в исследованном диапазоне температур практически не изменяется и существенно ниже, чем в слабо кислых растворах, т.е. агрегация полимерных частиц подавлена. Таким образом, значение рН водного раствора оказывает заметное влияние на интенсивность рассеяния света и, по-видимому, сдвигает точку помутнения в область более высоких температур. В фосфатно-солевом буфере и в щелочных растворах

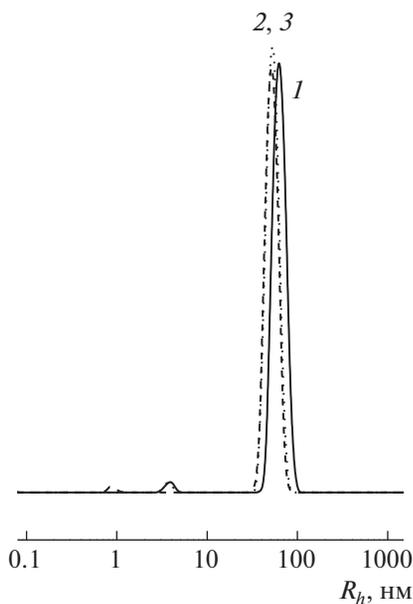
существуют стабильные в физиологически важном интервале температур полимерные частицы с гидродинамическим радиусом менее 10 нм. Увеличение размера макромолекул и отсутствие их агрегации в этих средах обусловлено появлением заряженных карбоксильных групп звеньев МАК, что, по-видимому, приводит к разворачиванию полимерных цепей и стабилизации их растворов. Полученный результат позволяет прогнозировать механизм выделения инкапсулированного биологически активного соединения в сополимер при изменении рН среды при физиологической температуре.

#### Полимерные композиции ZnТФП в водном буферном растворе

Коллоидные растворы полимерных композиций ZnТФП на основе сополимеров 2 и 3 (1.5 мг/мл) заметно опалесцировали. Из водного буферного раствора композиции ZnТФП–сополимер 3, содержащего 2.6% красителя, со временем осаждались крупные частицы. Однако раствор композиции ZnТФП–сополимер 2 аналогичного состава был стабильным. На рис. 6 приведены электронные спектры поглощения соответствующих водных буферных растворов; в спектре поглощения растворов имеется полоса поглощения  $Sore$  при длине волны 429 нм и  $Q$ -полосы в области 530–630 нм красителя. Это свидетельствует о присутствии в растворе водорастворимой формы красителя, который сохраняет свою структуру, и, как следствие, наблюдаются его характерные элек-



**Рис. 6.** Спектры поглощения водных буферных растворов ZnТФП, инкапсулированного в сополимеры 2 (1) и 3 (2). Кювета 0.2 см.

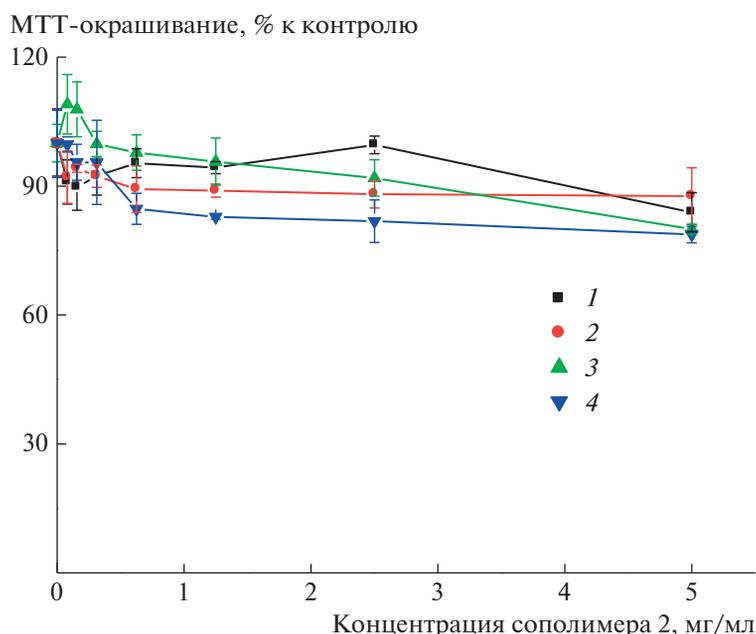


**Рис. 7.** Кривые распределения интенсивности рассеяния света по размерам рассеивающих центров водным буферным раствором наноструктур ZnТФП на основе сополимера 2 (0.4 мг/мл) при 25 (1), 37 (2) и 42°С (3).

тронные переходы. Форма и значение оптической плотности полосы Sore зависят от типа полимерного носителя. Ее значение существенно ниже в водном буферном растворе композиции на основе сополимера 3, что может быть обусловлено осаждением ее некоторой части и/или сильной агрегацией молекул красителя, локализованного в полярных областях полимерных частиц. Очевидно, что полученные водорастворимые

формы ZnТФП на основе сополимеров ВП–МАК–ДМТЭГ будут флуоресцировать в красной области спектра [31, 32]. Это позволит визуализировать изображение в экспериментах по изучению внутриклеточного накопления полимерных частиц методом флуоресцентной микроскопии.

В работе исследовали поведение наноструктур ZnТФП на основе сополимера 2 в водном буфер-



**Рис. 8.** Кривые доза–эффект для клеток HeLa (1), HepG2 (2), FetMCS (3) и Vero (4) при их обработке сополимером 2 в течение 72 ч.

ном растворе в диапазоне температур 25–42°C. На кривых ДРС (рис. 7) имеется интенсивный пик; значение  $R_h$  в его максимуме составляет ~50 нм. С увеличением температуры положение пика изменяется несущественно, что указывает на стабильность структур ZnТФП–сополимер 2 в исследованном диапазоне температур и возможности их применения в экспериментах по накоплению полимерных частиц в клетках.

#### Цитотоксичность сополимера ВП–МАК–ДМТЭГ

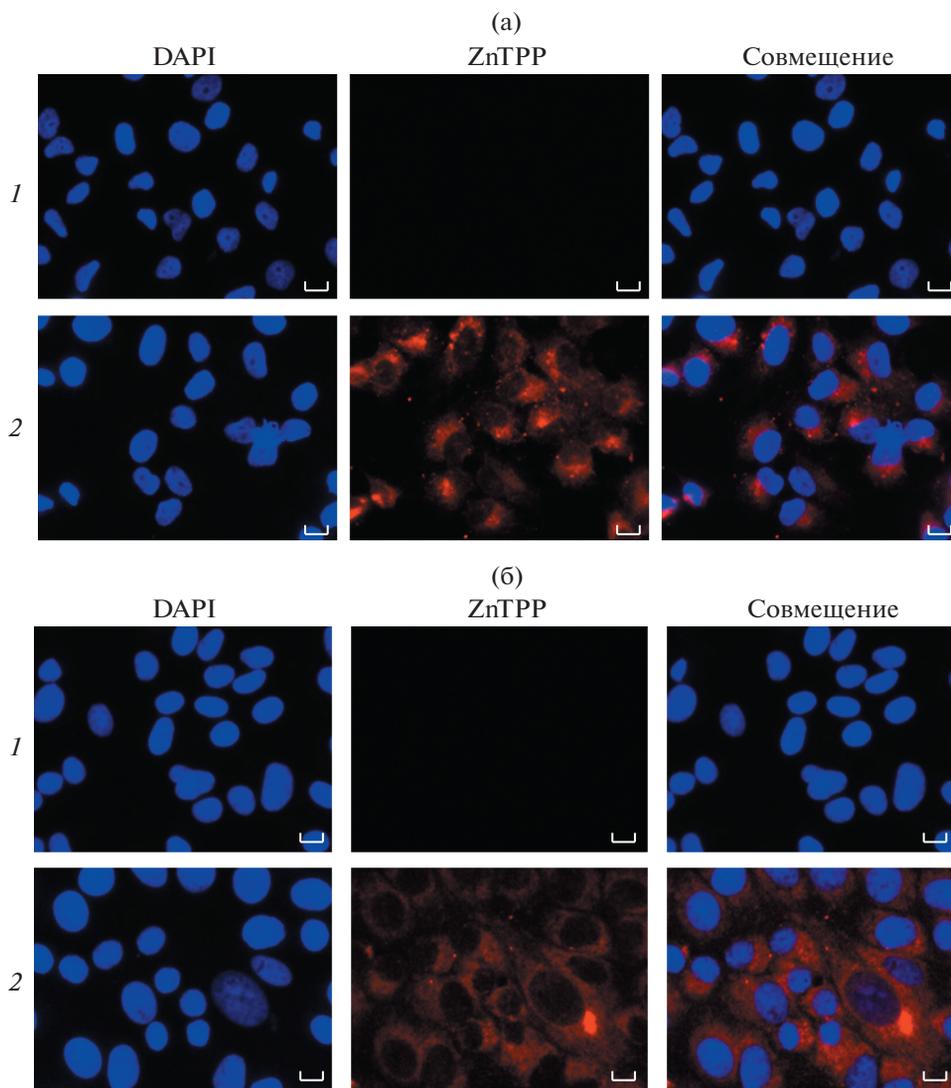
Использование полимеров для биомедицинских целей предполагает их низкую токсичность. Для оценки токсичности полученных сополимеров *in vitro* исследовали их влияние на жизнеспособность культивируемых клеток различных линий. Как видно на рис. 8, сополимер 2 в концентрации до 5 мг/мл оказывает незначительное влияние на жизнеспособность клеток; эффект сополимера не превышает 20%, что позволяет сделать предположение об инертности исследованного сополимера как платформы биологически активного соединения. В пользу этого свидетельствуют результаты исследования токсичности сополимеров ВП–ДМТЭГ и систем сополимер–биологически активное соединение *in vivo* [27], что, очевидно, справедливо и для других сополимеров ВП близкого мономерного состава, полученных в настоящей работе. Как следует из результатов исследования цитотоксичности сопо-

лимеров ВП–ДМТЭГ различного мономерного состава [24], высокое содержание звеньев ДМТЭГ во фракции 2 сополимера 1 не приведет к снижению его биосовместимости.

#### Внутриклеточное накопление полимерных частиц, загруженных ZnТФП

С применением метода флуоресцентной микроскопии была изучена способность проникать и накапливаться в клетках человека и животных наночастиц сополимера 2, загруженных гидрофобным красителем ZnТФП (рис. 9). В контрольных образцах флуоресценция отсутствует при возбуждении лазерной линией при 560–630 нм (рис. 9, ряды 1). Для клеток Vero характерно более равномерное распределение наночастиц сополимера с инкапсулированным ZnТФП в пределах цитоплазмы клеток (рис. 9б) по сравнению с клетками HeLa, где наночастицы образуют отдельные конгломераты, и интенсивность регистрируемого сигнала значительно выше. Следовательно, полимерные частицы проникают и накапливаются в клетках.

Применив методику окрашивания клеточных ядер красителем DAPI, мы пришли к выводу, что в данной концентрации наночастицы не токсичны и не нарушают целостность ядер, что указывает на отсутствие нарушений клеточной морфологии. Таким образом, методом радикальной сополимеризации в толуоле и этаноле синтезированы



**Рис. 9.** Флуоресцентная микроскопия клеток HeLa (а) и Vero (б) при совместной инкубации в течение 24 ч с наночастицами сополимера 2, загруженного ZnТФП. 1 – не обработанные клетки; 2 – клетки, обработанные наночастицами сополимера 2 с ZnТФП, в конечной концентрации 50 мкг/мл. Шкала бар 10 мкм.

тройные сополимеры N-винилпирролидона с метакриловой кислотой и диметакрилатом триэтиленгликоля различного мономерного состава и молекулярной массы; в водных средах они присутствуют в виде отдельных макромолекул малого размера и/или их агрегатов, реагирующих на изменение температуры и pH среды. На основе сополимера ВП–МАК–ДМТЭГ получены водорастворимые формы гидрофобного красителя с гидродинамическим радиусом около 50 нм, стабильные в физиологически важном диапазоне температуры в фосфатно-солевом растворе. Методом МТТ на различных линиях клеток человека и животных показано, что сополимер ВП–МАК–ДМТЭГ малотоксичен и, по данным флуорес-

центной микроскопии, проникает в клетки HeLa и Vero, локализуясь в цитоплазме. Предложено использовать новые амфифильные сополимеры ВП–МАК–ДМТЭГ как носители и средства доставки биологически активных соединений, обеспечивающие их контролируемое выделение.

В отличие от ПВП в боковых полимерных цепях сополимеров ВП содержатся сложноэфирные группы ДМТЭГ; по нашим данным, в кислой и щелочной среде по связям С–О олигомерного блока диметакрилата протекает гидролиз, и образуются полимерные цепи с концевыми группами ОН. В результате снижается молекулярная масса полимерных цепей в ответвлениях и всей макромолекулы. В организме эффективность процесса

деградации под действием ферментов, очевидно, будет возрастать. Молекулярную массу сополимеров, получаемых радикальной сополимеризацией, легко регулировать с помощью специально подобранных соединений – ограничителей роста полимерных цепей, или условий синтеза – концентрации мономеров в растворе, инициатора, соотношения мономеров, природы растворителя. Изменяя соотношение сомономеров, легко управлять мономерным составом сополимеров, их функциональностью, амфифильностью, процессом самоорганизации и возможностями реагировать на температуру или pH среды, инкапсулировать в гидрофобные части макромолекул частично и полностью нерастворимые биологически активные соединения, получать наноразмерные системы, стабильные в водных средах. Отдельные макромолекулы и агрегаты в воде имеют малый размер, что важно для их эффективного клеточного и тканевого поглощения. Полученные результаты позволяют сделать вывод о необходимости проведения дальнейших исследований в области разработки полимерных 3D структур на основе ВП и оптимизации их характеристик.

Работа выполнена по теме государственного задания АААА-А19-119041090087-4 и АААА-А19-119071890015-6 с использованием оборудования АЦКП ИПХФ РАН <https://equipments.icp.ac.ru/ru/equipments/ckp/acfp>.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кириш Ю.Э.* Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды. М.: Наука, 1998.
2. *Панарин Е.Ф., Лавров Н.А., Соловский М.В., Шальнова Л.И.* Полимеры-носители биологически активных веществ. СПб.: Профессия, 2014.
3. *Сидельковская Ф.П.* Химия N-винилпирролидона и его полимеров М.: Наука, 1970.
4. *Foltmann H., Quadir A.* // Drug Deliv. Technol. 2008. V. 8. P. 22.
5. *Bothiraja C., Shinde M.B., Rajalakshmi S., Pawar A.P.* // J. Pharm. Pharmacol. 2009. V. 61. P. 1465.
6. *Martins R.M., Pereira S.V., Siqueira S., Salomão W.F., Freitas L.A.P.* // Food Res. Int. 2013. V. 50. P. 657.
7. *Rasekh M., Karavasili C., Soong Y.L., Bouropoulos N., Morris M., Armitage D., Li X., Fatouros D.G., Ahmad Z.* // Int. J. Pharm. 2014. V. 473. P. 95.
8. *Fogaça R., Catalani L.H.* // Soft Mater. 2013. V. 11. P. 61.
9. *Del Consuelo I.D., Falson F., Guy R.H., Jacques Y.* // J. Control. Release. 2007. V. 122. P. 135.
10. *Franco P., De Marco I.* // Polymers. 2020. V. 12. P. 1114.
11. *Zheng X., Zhang T., Song X., Zhang L., Zhang C., Jin S., Xing J., Liang, X.-J.* // J. Mater. Chem. B. 2015. V. 3. P. 4027.
12. *Zhang L., Liang Y., Meng L., Wang C.* // Polym. Adv. Technol. 2009. V. 20. P. 410.
13. *Song Y., Zhang T., Song X., Zhang L., Zhang C., Xing J., Liang X.-J.* // J. Mater. Chem. B. 2015. V. 3. P. 911.
14. *Saxena A., Mozumdar S., Johri A.K.* // Biomaterials. 2006. V. 27. P. 5596.
15. *Sheu S.-J., Chou L.-C., Bee Y.-S., Chen J.-F., Lin H.-C., Lin P.-R., Lam H.-C., Tai M.-H.* // Exp. Eye Res. 2005. V. 81. P. 673.
16. *Ramalingam V., Varunkumar K., Ravikumar V., Rajaram R.* // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 1.
17. *Rose P.A., Praseetha P., Bhagat M., Alexander P., Abdeen S., Chavali M.* // Technol. Cancer Res. Treat. 2013. V. 12. P. 463.
18. *Hu M., Li C., Li X., Zhou M., Sun J., Sheng F., Shi S., Lu L.* // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2018. V. 46. P. 1248.
19. *Hecold M., Buczkowska R., Mucha A., Grzesiak J., Rac-Rumijowska O., Teterycz H., Marycz K.* // J. Nanomater. 2017. V. 2017. P. 8706921.
20. *Goetten de Lima G., de Lima D.W., de Oliveira M.J., Lugão A.B., Alcántara M.S., Devine D.M., de Sá M.J.* // ACS Appl. Bio Mater. 2018. V. 1. P. 1842.
21. *Besrou H., Tangour B., Linguerrri R., Hochlaf M.* // Spectrochim. Acta A. 2019. V. 217. P. 278.
22. *Zeng X., Zhang Y., Wu Z., Lundberg P., Malkoch M., Nyström A.M.* // J. Polym. Sci., Polym. Chem. 2011. V. 50. P. 280.
23. *Zhou Y., Yan D.* // Chem. Commun. 2009. V. 9. P. 1172.
24. *Zhou Y., Huang W., Liu J., Zhu X., Yan D.* // Adv. Mater. 2010. V. 22. P. 4567.
25. *Solovskij M.V., Nikolskaya N.V., Tarabukina E.B., Denisov V.M., Adamov A.V., Klenin S. I.* // Desig. Monomers Polym. 2004. V. 2. P. 83.
26. *Kurmaz S.V., Pyryaev A.N.* // Polymer Science B. 2010. T. 52. № 1. С. 1.
27. *Kurmaz S.V., Fadeeva N.V., Soldatova Y.V., Faingold I.I., Poletaeva D.A., Ignat'ev V.M., Emel'yanova N.S., Shilov G.V., Kotelnikova R.A.* // J. Polym. Res. 2021. V. 28. P. 345.
28. *Kurmaz S.V., Sen' V.D., Kulikov A.V., Konev D.V., Kurmaz V.A., Balakina A.A., Terent'ev A.A.* // Russ. Chem. Bull. 2019. V. 68. P. 1769.
29. *Kurmaz S.V., Fadeeva N.V., Fedorov B.S., Kozub G.I., Emel'yanova N.S., Kurmaz V.A., Manzhos R.A., Balakina A.A., Terentyev A.A.* // Mendeleev Commun. 2020. V. 30. P. 22.
30. *Kurmaz S.V., Fadeeva N.V., Fedorov B.S., Kozub G.I., Kurmaz V.A., Ignat'ev V.M., Emel'yanova N.S.* // Russ. Chem. Bull. 2021. V. 70. P. 1832.
31. *Kurmaz S.V., Obraztsova N.A., Balakina A.A., Terent'ev A.A.* // Russ. Chem. Bull. 2016. V. 65. P. 2097.
32. *Kurmaz S.V., Fadeeva N.V., Komendant A.V., Ignatiev V.M., Emel'yanova N.S., Shilov G.V., Stupina T.S., Filatova N.V., Lapshina M.A., Terentyev A.A.* // Polym. Bull. 2021. V. 10.

33. *Zelikin A.N., Price A.D., Stadler B.* // *Artificial Organelles Small.* 2010. V. 6. P. 2201.
34. *Zhukova O.V., Arkhipova E.V., Kovaleva T.F., Ryabov S.A., Ivanova I.P., Golovacheva A.A., Zykova D.A., Zaitsev S.D.* // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 4855.
35. *Leyte J.C., Mandel M.J.* // *J. Polym. Sci. A.* 1964. V. 2. P. 1879.
36. *Graham S., Cormack P.A.G., Sherrington D.C.* // *Macromolecules.* 2005. V. 38. P. 86.
37. *O'Brien N., McKee A., Sherrington D.C., Slark A.T., Titterton A.* // *Polymer.* 2000. V. 41. P. 6027.
38. *Bianco G., Gehlen H.H.* // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2002. V. 149. P. 115.
39. *Gergiev G., Dakova I.* // *Colloid Polym. Sci.* 1994. V. 272. P. 938.
40. *Kurmaz S.V., Fadeeva N.V., Ignat'ev V.M., Kurmaz V.A., Kurochkin S.A., Emel'yanova N.S.* // *Molecules.* 2020. V. 25. P. 6015.
41. *Irvin-Choy N'Dea S., Nelson K.M., Gleghorn J.P., Day E.S.* // *J. Mater. Chem. B.* 2020. V. 8. P. 6548.
42. *Blanco E., Shen H., Ferrari M.* // *Nat. B.* 2015. V. 33. P. 941.
43. *Hoshyar N., Gray S., Han H., Bao G.* // *Nanomedicine.* 2016. V. 11. P. 673.