

ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ И ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. А.Е. АРБУЗОВА –
ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»»

На правах рукописи

СЕРГЕЕВА ТАТЬЯНА ЮРЬЕВНА

**НАНОКОНТЕЙНЕРЫ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ РЕЗОРЦИНАРЕНОВ ДЛЯ
УПРАВЛЯЕМОГО СВЯЗЫВАНИЯ/ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ И СТАБИЛИЗАЦИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА**

Специальность 02.00.04 – ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Диссертация на соискание ученой степени кандидат химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Зиганшина А.Ю.

Казань – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОКОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ И СОЗДАНИИ КОМПОЗИЦИОННЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ (литературный обзор).....	9
1.1. Липосомы и их применение в качестве наноконтейнеров.....	9
1.2. Полимерные наноконтейнеры	10
1.3. Стимул-чувствительные наноконтейнеры	11
1.3.1. рН чувствительные наноконтейнеры	12
1.3.2. Термочувствительные наноконтейнеры.....	15
1.3.3. Редокс-чувствительные наноконтейнеры	16
1.3.4. Фоточувствительные наноконтейнеры.....	19
1.3.5. Ультразвуковое высвобождение субстрата.....	21
1.3.6. Магнитночувствительные наноконтейнеры.....	23
1.3.7. Фермент-чувствительные наноконтейнеры	25
1.3.8. Глюкоза-чувствительные наноконтейнеры.....	25
1.4. Применение полимерных наноконтейнеров в других сферах.....	29
1.5. Неорганно-органические наноконкомпозиты.....	31
1.5.1. In-situ формирование неорганических частиц	32
1.5.2. Ex-situ формирование неорганических наночастиц.....	35
1.5.3. Одновременное образование неорганических наночастиц и полимерной матрицы.....	38
1.6. Наноконтейнеры на основе резорцинаренов.....	39
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	42
2.1. Супрамолекулярные и полимерные наноконтейнеры	43

2.2.	Нанокompозиты на основе карбоксилатных наноконтeйнеров и наночастиц серебра.....	51
2.2.1.	Нанокompозит на основе ферроцен-резорциарена и наночастиц серебра	59
2.3.	pH- и глюкоза-управляемые полимерные наноконтeйнеры на основе сульфонатного резорциарена SRA.....	64
2.3.1.	pH -чувствительный полимерный наноконтeйнер p(SRA-B).....	65
2.3.2.	Глюкоза чувствительные полимерные наноконтeйнеры на основе сульфонатного резорциарена и фенилбороновой кислоты	73
2.4.	pH-управляемый полимерный наноконтeйнер на основе N-метилглюкаминового резорциарена p(MEGRA-B).....	81
2.5.	Редокс-чувствительная полимерная наносфера на основе сульфонатного виологен кавитанда (p(SVCA-SS)).....	91
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ		101
3.1.	Приборы и методы	101
3.2.	Получение исходных реагентов.....	103
3.2.1.	Получение C ₁₀ H ₂₁ RA.....	103
3.2.2.	Получение C ₁₀ H ₁₉ RA.....	104
3.2.3.	Получение C ₃ H ₆ OH-RA.....	104
3.2.4.	Получение SRA	105
3.2.5.	Получение MEGRA.....	105
3.2.6.	Получение натрий сульфонатопропил виологена (SV).....	106
3.2.7.	Получение SVCA-OH.....	106
3.2.8.	Получение SVCA	107
3.3.	Получение и исследование супрамолекулярных и полимерных наноконтeйнеров	107
3.3.1.	Супрамолекулярные и полимерные наноконтeйнеры на основе карбоксилатных производных резорциаренов.....	107
3.4.	Получение и исследование нанокompозитов с наночастицами серебра	110

3.4.1.	Получение наночастиц серебра, стабилизированных амфифильными резорцинаренами	110
3.4.2.	Получение наночастиц серебра, стабилизированных полимерными наноконтейнерами $p(C_3H_6OH-B-OI)$ и $p(C_3H_6OH-B-St)$	110
3.4.3.	Катализ восстановления п-нитрофенола в присутствии $Ag@C_{10}H_{21}RA$ и $Ag@C_{10}H_{19}RA$	111
3.4.4.	Катализ восстановления п-нитрофенола в присутствии $Ag@p(C_3H_6OH-B-OI)$ и $Ag@p(C_3H_6OH-B-St)$	111
3.4.5.	Определение константы скорости реакции и каталитической активности	111
3.5.	Исследование полимерных наноконтейнеров с инкапсулированными субстратами	112
3.5.1.	Получение и исследование $p(SRA-B)$	112
3.5.2.	Получение и исследование $p(6SRA-5B)$	114
3.5.3.	Получение и исследование $p(MEGRA-B)$	118
3.5.4.	Получение и исследование $p(SVCA-SS)$	119
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ		122
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ		123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		126

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Благодаря развитию методов и средств исследования наноматериалы нашли широкое применение во многих сферах деятельности – сельском хозяйстве, строительстве, различных отраслях промышленности и науке. Важной областью использования наноматериалов является медицина, где они разрабатываются для диагностики, создания искусственных материалов, и в адресной доставке лекарственных средств. В диагностических целях чаще всего применяются химически стабильные неорганические наночастицы. Это наночастицы серебра и золота, магнитные частицы на основе лантаноидов и элементов подгруппы железа, а также квантовые точки в роли люминесцентных маркеров. Для адресной доставки лекарственных веществ создаются наноконтейнеры органической природы. Векторные наноконтейнеры необходимы для транспорта лекарств в очаги поражения, улучшения их биодоступности и стабильности, для преодоления биологических барьеров. В качестве таких наноконтейнеров создаются супрамолекулярные и полимерные ансамбли с модифицированной рецепторными группами поверхностью, которые способны связываться с целевыми участками организма, и фрагментами, способными изменить структуру носителя с последующим высвобождением лекарства. Такие наноконтейнеры могут быть использованы и для стабилизации и адресной доставки неорганических частиц для диагностики. Выбор того или иного типа наноконтейнера зависит от области назначения и характера решаемой проблемы, что важно учитывать при их разработке. Несмотря на многочисленные исследования, тема наноконтейнеров актуальна в наши дни. Она интенсивно развивается, и ведущие лаборатории предлагают свои подходы в решении проблемы создания эффективных наноконтейнеров для медицинского применения.

Наноконтейнеры исследуются при создании композиционных материалов в качестве подложки для неорганических частиц для немедицинского применения. Введение наночастиц в органическую матрицу увеличивает прочность и стабильность материала, изменяет оптические и электрические характеристики, улучшает каталитическую активность. Усовершенствование характеристик композиционных материалов важны для развития нанотехнологий и создания новых материалов.

Степень разработанности. Хотя концепция адресной доставки лекарств не нова, она до сих пор находится на стадии разработки. На данный момент не разработаны наноконтейнеры, отвечающие

необходимым требованиям для широкого практического применения. Например, для медицинского применения наноконтейнеры должны обладать следующими свойствами: эффективно связывать субстраты с формированием стабильных структур при нормальных показателях организма и легко выпускать их при отклонении от нормы. Наноконтейнеры и продукты их распада должны быть био- и иммуносовместимыми. Для применения в катализе наноконтейнеры должны стабилизировать неорганические частицы, препятствуя их агрегации, увеличивать доступность к каталитическим центрам и улучшать диффузию реагентов и продуктов реакции. В диссертационной работе представлены результаты по созданию наноконтейнеров для лекарственных средств и для создания композиционных материалов.

Цель работы. Создание наноконтейнеров для связывания, хранения и доставки лекарственных средств, а также для иммобилизации, стабилизации и активации металлических наночастиц. В качестве объектов исследования использованы амфифильные производные резорцинарена. Задачами исследования были: создание супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров на основе резорцинаренов; исследование и сравнение их инклюзивных характеристик по отношению к субстратам различной структуры; получение наноконтейнеров для связывания и доставки лекарственных средств (инсулина и доксорубицина); создание композиционных материалов с наночастицами серебра и изучение их каталитической активности наночастиц в реакциях восстановления.

Научная новизна.

В ходе выполнения диссертационной работы предложен новый и простой в исполнении метод создания полимерных наноконтейнеров, заключающийся в сшивании хвостов амфифильных резорцинаренов эфирами фенилбороновой кислоты. Получение наноконтейнеров проводили в микроэмульсионной среде на границе раздела фаз «масло в воде». Производные резорцинарена выступали в качестве эмульгатора микроэмульсии, а их полимеризация проходила без непосредственного ковалентного взаимодействия с органической фазой. Использование данного метода позволяет получать полимерные наноконтейнеры в мягких условиях, без добавления дополнительных компонент и поверхностно-активных веществ.

Теоретическая и практическая значимость.

На основании предложенного метода разработаны методики создания двух типов полимерных наноконтейнеров: наносферы и нанокапсулы. Проведен сравнительный анализ инклюзивных характеристик полимерных наноконтейнеров и их супрамолекулярных аналогов. Показано преимущество полимерных наноконтейнеров в связывании гидрофобных и гидрофильных

органических соединений. Установлено, что стабильность и каталитическая активность композитов с наночастицами серебра значительно выше при использовании супрамолекулярных наноконтейнеров, чем полимерных. Редокс-активное карбоксилатное производное резорцина с ферроценовыми группами было применено для получения гибридных нанокомпозитов с наночастицами серебра без применения восстанавливающих реагентов. Показана высокая каталитическая активность композитов в реакциях восстановления нитрофенолов.

Синтезированы полимерные наноконтейнеры, чувствительные к эндогенным изменениям в организме, таким как повышенный уровень глюкозы, пониженное значение pH и избыточное количество восстановителя глутатиона. Разработан глюкоза-чувствительный наноконтейнер для высвобождения инсулина. Показана стабильность контейнера с инкапсулированным инсулином при нормальном уровне глюкозы и его диссоциация и высвобождение инсулина при повышенном уровне глюкозы. Получены наноконтейнеры, декорированные векторными виологеновыми и N-метилглюкаминовыми группами, для доставки доксорубина в раковые клетки. Данные контейнеры диссоциируют в среде раковых тканей, т.е. при высоком содержании глутатиона и при повышенной кислотности. Использование контейнеров улучшает проникновение доксорубина в раковые клетки и вызывает разрушение ядра раковых клеток.

Методология и методы исследований.

Для синтеза исходных соединений и для создания полимерных наноконтейнеров использованы стандартные методы органического синтеза. Для физико-химического исследования полученных систем применяли методы ЯМР, ИК, УФ-видимой, флуоресцентной, энергодисперсионной рентгеновской, атомно эмиссионной спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма, масс-спектрометрии MALDI, динамического, статического и электрофоретического светорассеяния, атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии, порошковой рентгеновской дифракции, проточной цитометрии, кондуктометрии и pH-метрии.

Положения, выносимые на защиту

Создание полимерных наноконтейнеров на основе производных резорцина для pH-, редокс- и глюкоза-управляемой доставки субстратов. Исследование их биологической активности и возможности применения в контролируемой доставке лекарственных средств (инсулина и доксорубина).

Проведение оценки инклюзивных характеристик супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров для стабилизации органических и неорганических субстратов. Выявление

факторов, влияющих на каталитическую активность композитов на основе супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров и наночастиц серебра.

Степень достоверности и апробации результатов.

Результаты работы докладывались и обсуждались на II и IV Всероссийских конференциях с международным участием: «Современные проблемы химической науки и фармации» (Чебоксары, 2014, 2015); XXI Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, 2014); XXVI международной Чугаевской конференции по координационной химии (Казань, 2014); IX международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев 2015» (Санкт-Петербург, 2015); VII Международном симпозиуме «Дизайн и синтез супрамолекулярных Architectures» II молодежной школе по супрамолекулярной и координационной химии (Казань, 2016); XVI международном семинаре соединений включения (ISIC 16) и 3 молодежной школе по супрамолекулярной и координационной химии (Казань, 2017); VII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2017» (Москва, 2017); XX молодежной школе-конференции по органической химии (Казань, 2017); Первом российско-китайском семинаре по органической и супрамолекулярной химии (Казань, 2018); VII всероссийской школе-конференции молодых ученых «Органические и гибридные наноматериалы» (Иваново, 2019).

Публикации.

По результатам работы опубликовано 27 тезисов докладов и 7 статей, 6 из которых входят в список журналов, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в изучении и обобщении литературы по теме диссертации, в постановке задачи, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных данных и формулировке выводов, написании и оформлении статей. Все представленные в диссертации результаты получены автором лично, либо при его непосредственном участии.

ГЛАВА 1. ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОКОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ И СОЗДАНИИ КОМПОЗИЦИОННЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

В последние годы разработаны эффективные методы получения наноразмерных систем, так называемых «наноконтейнеров», для связывания и доставки органических и неорганических субстратов. Такие системы обладают большим потенциалом для применения в биотехнологии в качестве замкнутых нанореакторов, защитных оболочек для белков, ловушек продуктов биотрансформации, а также для создания наноразмерных композиционных материалов.

Наноконтейнеры широко исследуются в медицине в качестве переносчиков лекарственных средств при химиотерапии. Они необходимы для направленной доставки лекарств в очаги поражения, для улучшения проникновения лекарств через биологические барьеры, регулирования циркуляции в крови, уменьшения токсичности по отношению к здоровым нормальным тканям.

В литературном обзоре рассмотрены примеры наноконтейнеров для лекарственных веществ. Показаны их преимущества и недостатки. Особый упор сделан на управляемые контейнеры, высвобождающие лекарство под внешним или внутренним воздействием.

1.1. Липосомы и их применение в качестве наноконтейнеров

Интерес к наноконтейнерам возник в 60-х годах прошлого века с началом интенсивного исследования везикул и липосом [1,2]. Везикулы представляют собой сферические замкнутые липидные бислои, возникающие за счет самопроизвольно протекающих процессов самоорганизации [3]. Липосомы являются искусственно созданными везикулами. Везикулы образуются в естественных условиях во время биологических процессов, а липосомы получают синтетически, хотя в последние десятилетия развиваются методы управляемого создания везикулярных систем в лабораториях [4].

Липосомы нашли применение в различных областях науки и техники. Вначале они исследовались в качестве модельных систем биологических мембран [5], а затем стали важными объектами в биофизике, химии, коллоидной химии, биохимии и биологии [5-9]. Модели липосом интенсивно изучаются в математике и теоретической физике [10, 11]. В косметической

промышленности липосомы используются при создании средств по уходу за кожей и волосами [12,13], а в пищевой промышленности – в качестве стабилизаторов и эмульгаторов [14,15]. Начиная с 70-х годов липосомы стали исследоваться в медицине в качестве векторов для адресной доставки лекарственных средств (противогрибковых, противораковых препаратов, вакцин) и невирусных генов [16,17].

Несмотря на широкое применение липосом, их главным недостатком является непродолжительное время жизни, вызванное коллоидной и биологической нестабильностью [18,19]. Из-за этого липосомы не задерживаются в кровотоке, что значительно ограничивает их применение в биомедицине. Одним из решений проблемы является создание более стабильных систем, функционально сходных с липосомными структурами [20-22]. Перспективными представителями являются полимерные наноконтейнеры. Благодаря ковалентной сборке они более прочные, чем липосомы, а их структура не так чувствительна к изменениям окружающей среды. В настоящее время разрабатываются различные формы лекарственных препаратов на основе полимерных наноконтейнеров для применения в диагностике и лечении широкого спектра заболеваний, начиная от рака, вирусных инфекций, сердечно-сосудистых заболеваний до инфекций легких и мочевых путей [23-25].

1.2. Полимерные наноконтейнеры

Выдающиеся результаты, полученные в химии полимеров в последние годы, позволили начать интенсивную разработку и исследование полимерных наноконтейнеров. Это стало возможным благодаря открытию методов контроля над процессами полимеризации, что позволило управлять ростом полимерной цепи, ее молекулярно-массовым распределением, создавать блок-сополимеры с заданной вторичной структурой. Стало осуществимым создание многофункциональных полимерных архитектур определенного строения, формы, размера и функциональности [26,27].

Правильный выбор строительных блоков для полимерных наноконтейнеров очень важен при разработке лекарственных форм препаратов. Для повышения биодоступности и эффективности лекарств, наноконтейнеры должны совмещать в себе способность к адресной доставке и избирательному высвобождению лекарства в очаге поражения. Поэтому важной задачей в синтезе наноконтейнеров является не только проектирование лигандных фрагментов, нацеленных на целевые участки, но и конструирование стимул-чувствительных блоков, реагирующих на действие внешних или внутренних раздражителей [28]. При разработке наноконтейнеров необходимо учитывать и методы введения препаратов. Основным методом введения лекарственных форм на

основе полимерных наноконтейнеров является внутривенная инъекция, но существуют и другие, менее инвазивные способы, такие как дермальные/трансдермальные, пероральные или через слизистые оболочки. В этих случаях наноконтейнеры должны содержать функциональные компоненты, обеспечивающие прохождение через различные биологические барьеры, такие как кожа, слизь, кровь, а также через клеточные и межклеточные барьеры [29,30].

1.3. Стимул-чувствительные наноконтейнеры

При преждевременном и быстром высвобождении лекарства из наноконтейнера возникает множество побочных эффектов. При этом чрезмерное уменьшение скорости выхода лекарства снижает эффективность препарата в целевом участке. Поэтому наноконтейнеры должны прочно удерживать лекарство в условиях здоровых тканей и быстро высвободить его в очаге поражения [31, 32]. Выход лекарства должен осуществляться при воздействии на стимул-чувствительные фрагменты контейнера, приводящие к изменению структуры контейнера или его распаду. Стимул-чувствительные фрагменты могут давать отклик на специфические эндогенные стимулы, такие как интерстициальный рН, повышенный уровень ферментов, аномальное содержание окислителей или восстановителей, или на экстракорпоральные внешние воздействия, такие как изменение температуры, воздействие инфракрасного или ультрафиолетового облучения, магнитное поле или ультразвуковая обработка. Для терапевтического применения более перспективными являются наноконтейнеры, чувствительные к внутренним раздражителям (рН, окислительно-восстановительный потенциал или уровень глюкозы), чем контейнеры, реагирующие на свет, магнитное поле или ультразвук [33]. В последние годы широко разрабатываются методы создания наноконтейнеров, которые реагируют на изменение температуры и рН. Как правило, структура таких наноконтейнеров меняется при рН ниже физиологического значения или при температурах выше нормальной температуры тела (37 °С) [34,35].

Во многих исследованиях описаны полимерные наноконтейнеры, у которых под воздействием раздражителя изменяются гидрофобно-гидрофильные свойства отдельных участков наноконтейнеров. При этом меняется вторичная структура наноконтейнера, его растворимость, или появляются пористые или «рваные» структуры, способствующие выходу лекарств [36].

1.3.1. pH чувствительные наноконтейнеры

Внутри организма pH варьируется от кислых до слабощелочных значений. Например, в желудочно-кишечном тракте человека pH меняется от 2 в желудке до 5-8 в кишечнике, что нужно учитывать при оральном введении лекарства [37]. Разница в значениях pH в тканях и в клеточных органеллах менее существенная и составляет от 1 до 3 единиц. В раковых клетках pH внеклеточной жидкости более кислое, чем в нормальных тканях, и находится в диапазоне 5,0 – 7,2. В цитозоле pH равен 7,4, в эндосоме около 5,0 – 6,5, а в лизосоме среда более кислая и pH составляет 4,5-5,0 [37-40]. Разница в pH позволяет создавать наноконтейнеры, которые высвобождают лекарство в определенных тканях (например, раковых) или в конкретной клеточной органелле.

В последние годы разработан широкий круг наноконтейнеров на основе pH чувствительных полимеров. Это мицеллярные структуры, капсулы, гидрогели [41-45]. Обычно pH чувствительные полимеры имеют в своем составе кислотные или основные группы. В качестве кислотных групп используют карбоксилатные или сульфонатные фрагменты, а в качестве основных выступают первичные, вторичные и третичные амины [46]. Изменение структуры наноконтейнера происходит вследствие протонизации или депротонизации pH чувствительных групп. Ниже приведены наиболее интересные примеры pH чувствительных наноконтейнеров.

Научная группа под руководством Проф. Л. Мей создала pH чувствительный наноконтейнер на основе амфифильного сополимера поли(L-гистидин)-поли(лактид-*co*-гликозид)токоферола-полиэтиленгликоль сукцината (PLH-PLGA-TPGS, Рис. 1.1) [47]. Контейнер высвобождает субстрат при понижении pH среды от 8 до 5. В течение первых пяти часов происходит быстрый выход субстрата, а затем наблюдается пролонгированное высвобождение при понижении pH. По мнению исследователей, данный наноконтейнер может быть использован в качестве биосовместимого носителя лекарственных средств в химиотерапии. Наноконтейнер PLH-PLGA-TPGS показал высокую эффективность в связывании лекарственного препарата доксорубицина (DOX). PLH-PLGA-TPGS с инкапсулированным DOX оказался эффективным в уничтожении раковых клеток MCF-7 (клеточная линия карциномы молочной железы человека) и MCF-7/ADR (клеточная линия, устойчивая к воздействию лекарственных веществ).

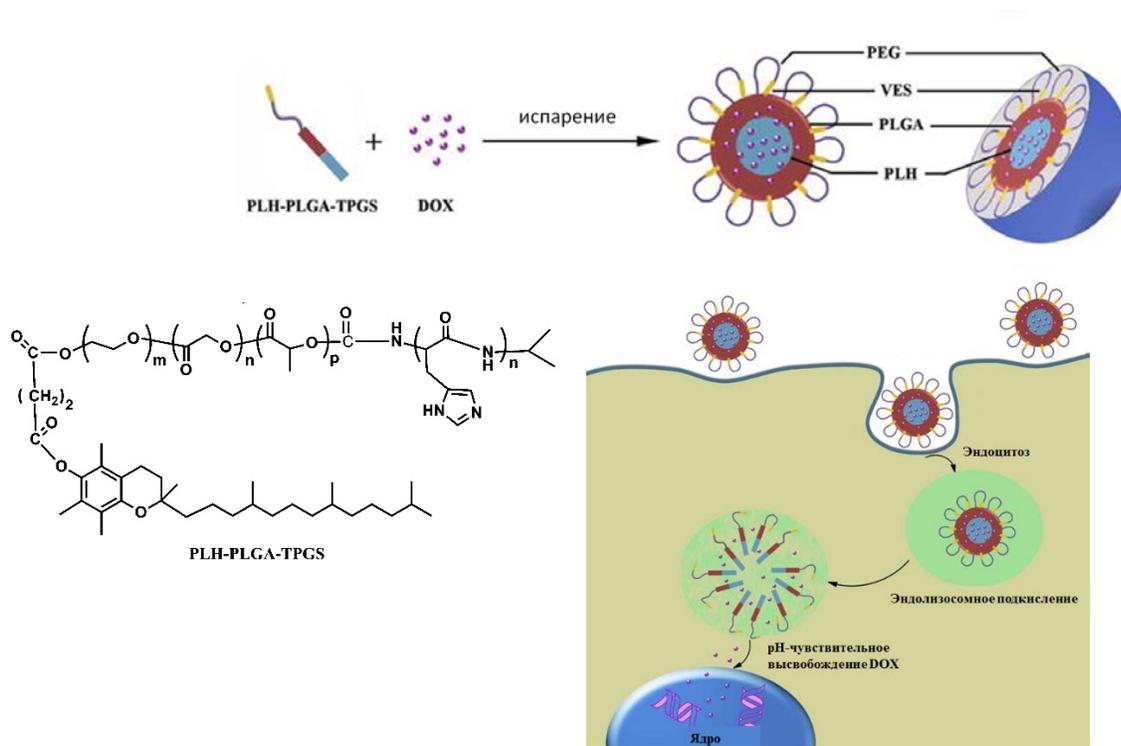


Рис. 1.1. Схема получения pH чувствительного наноконтейнера PLH-PLGA-TPGS, загруженного DOX, и модель поведения наноконтейнера в живой клетке.

В работе Проф. К. Браухле представлен метод получения pH чувствительного наноконтейнера на основе силикатных наночастиц [48]. Для его создания мезопористые силикатные наночастицы (MSN) модифицировали поли-3-винилпиридином (PVP), а затем полиэтиленгликолем (PEG) (MSN-PVP-PEG, Рис. 1.2). Благодаря наличию основных пиридиновых групп MSN-PVP-PEG чувствителен к изменению pH. В щелочной среде пиридиновые группы не заряжены и между ними отсутствует сильное электростатическое отталкивание. При понижении до слабокислого pH пиридиновые группы приобретают положительный заряд и между ними возникает сильное электростатическое отталкивание, что увеличивает расстояние между полимерными цепочками и способствует образованию пор. Увеличение размеров пор подтверждается экспериментами по сорбции азота. MSN-PVP-PEG высвобождает субстрат при понижении pH от 7 до 5, что показано на примере красителя конго. Кроме того, методами флуоресцентной микроскопии продемонстрировано эффективное поглощение наноконтейнера раковыми клетками (Рис. 1.2).

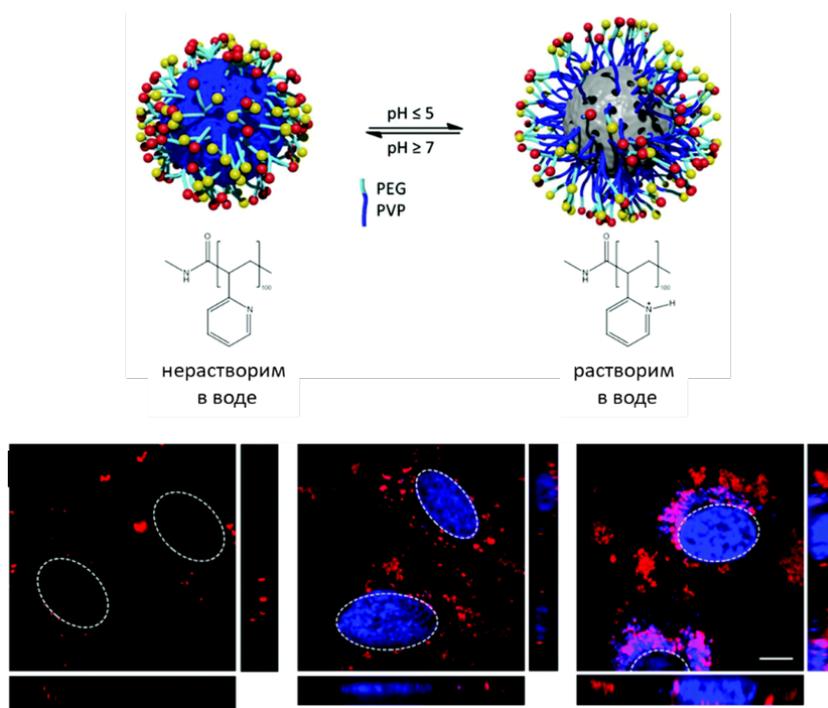


Рис. 1.2. Схема действия MSN-PVP-PEG при изменении pH. Флуоресцентная микроскопия клеток HeLa, инкубированных с 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлоридом, содержащим MSN-PVP-PEG, через 15 минут, 15 часов и 46 часов после инкубации клетками.

В группе Проф. К. Чэнь создан pH-чувствительный наноконтейнер на основе полисахарида декстрана [49]. Декстран был соединен с DOX в полимерный наноконтейнер с использованием цисплатина в качестве сшивающего агента. Введение цисплатина значительно увеличило поверхностный заряд и стабильность контейнера. Наноконтейнер показал высокую емкость по отношению к DOX, хорошую фармакокинетику *in vivo*, биораспределение и противоопухолевую эффективность, а также уменьшение побочных эффектов, связанных с токсичностью DOX. Введение наноконтейнера через внутривенную инъекцию значительно ингибировало рост опухоли в мышинной модели ксенотрансплантата A549 благодаря длительному кровообращению, накоплению лекарства в опухоли и быстрому внутриклеточному высвобождению доксорубицина (Рис. 1.3).

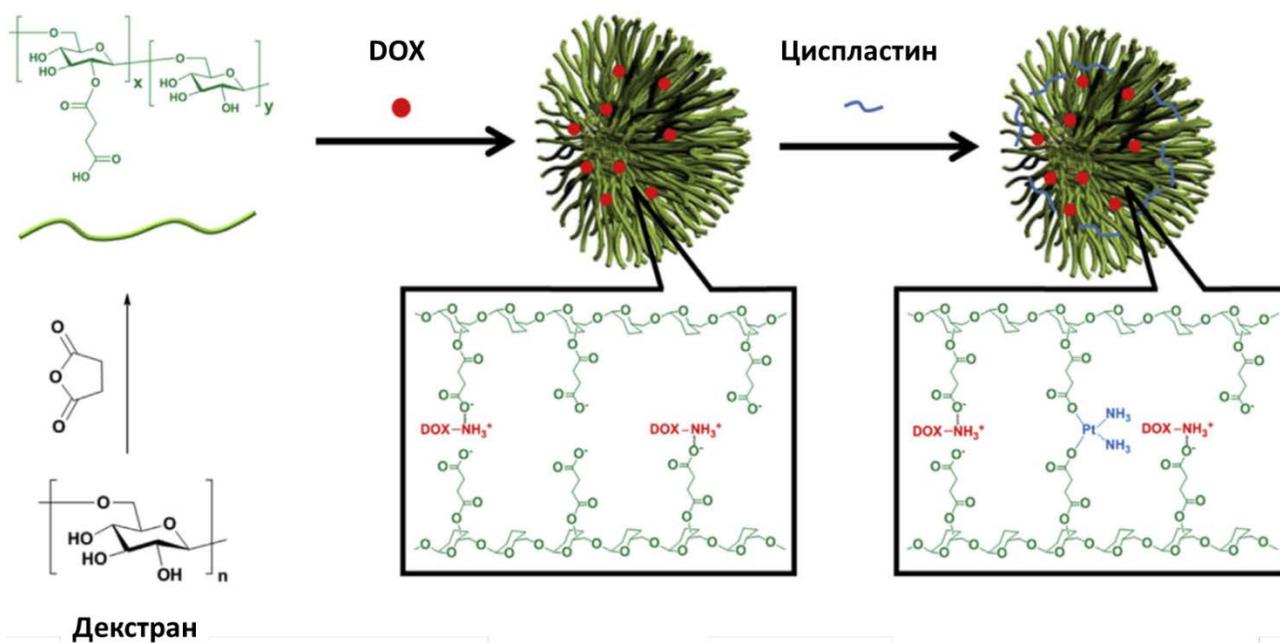


Рис. 1.3. Схема создания pH чувствительного наноконтейнера на основе декстрана и цисплатина.

1.3.2. Термочувствительные наноконтейнеры

Термоуправляемая доставка лекарственных средств является одной из самых разработанных стратегий и интенсивно исследуется в онкологии. Обычно в термочувствительных наноконтейнерах при изменении температуры происходит фазовый переход одной из составляющих с последующим изменением структуры контейнера [50,51]. В идеальном случае термоуправляемые наноконтейнеры должны связывать лекарство и удерживать его при температуре тела ($\sim 37^\circ\text{C}$) и быстро локально высвобождать в нагретых очагах поражения ($\sim 40\text{--}42^\circ\text{C}$) для предотвращения нежелательного вымывания лекарства в здоровых тканях и клетках [52,53].

В группе Проф. С. Риела получили термочувствительный биосовместимый наноконтейнер на основе нанотрубок галлуазита, функционализированных поли(*N*-изопропил акриламидом) [54]. Изучение термических характеристик наноконтейнера показало, что поли(*N*-изопропил акриламид) претерпевает фазовый переход от структуры «катушка» к структуре «глобула» при температуре 33°C (нижняя критическая температура растворения (НКТР)). Полученный наноконтейнер использовали для управляемой инкапсуляции и высвобождения куркумина. В слабощелочной среде при стандартной температуре куркумин инкапсулируется в полимерную оболочку. При температуре

выше температуры НКТР происходят процессы дегидратации полимера. Выход субстрата зависит от рН окружающей среды. В кислой среде при рН 1 в течение первого часа субстрат не выходит из оболочки, а после часа наблюдается незначительный выход вещества. При увеличении рН до слабокислой резко повышается количество высвобождаемого субстрата. Такое поведение наноконтейнера позволяет использовать желудочно-кишечный тракт как предполагаемый путь доставки лекарственного вещества (Рис. 1.4).

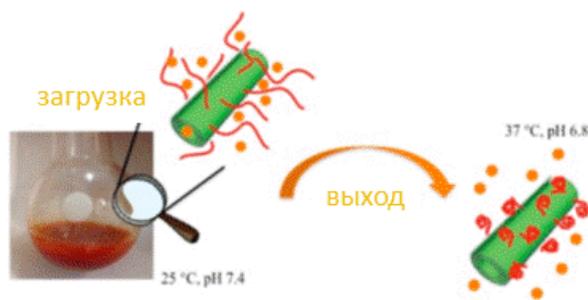


Рис. 1.4. Схема инкапсуляции и высвобождения субстрата куркумина из термочувствительных наноконтейнеров.

В следующей работе предложен простой метод создания термочувствительной капсулы, поставляющей лекарственное средство при повышении температуры [55]. Для ее создания использовали твердые частицы дексаметазона размером около 20 нанометров, которые покрывали поли(диаллилметиламмоний хлоридом) и поли(стиролсульфонатом) методом послойного осаждения (LbL). Варьированием условий синтеза (число слоев, ионная сила среды, последовательность нанесения полимеров) были созданы полиэлектролитные капсулы с оболочками различной проницаемости. При повышении температуры от 37 до 60 °C оболочка капсул расширяется, провоцируя высвобождение лекарственного препарата из полости наноконтейнеров. При использовании полиэлектролитной капсулы удалось уменьшить негативное воздействие дексаметазона на организм.

1.3.3. Редокс-чувствительные наноконтейнеры

Разница в окислительно-восстановительных потенциалах между нормальными и пораженными тканями, а также между межклеточным и внутриклеточным пространствами может быть использована в качестве стимула при создании контейнеров для доставки лекарств [56]. Внутриклеточное пространство поврежденных клеток зачастую обладает большим восстановительным потенциалом из-за наличия внутри клеток избыточного количества тиолов

(глутатиона, гомоцистеина и свободного цистеина). Использование тиол-чувствительных блоков в наноконтейнерах позволяет высвобождать лекарственные средства внутри патологических клеток. Классическим примером редокс-чувствительных наноконтейнеров являются контейнеры с дисульфидными связями, выпускающие лекарство при восстановлении тиолами [57- 64].

В качестве примера можно привести глутатион-чувствительный наноконтейнер, разработанный в лаборатории Проф. Ч. Лю [65]. Ядро наноконтейнера представляет собой координационный полимер, состоящий из дитиогликолевой кислоты и ионов марганца (Mn-SS). В мезопористую структуру Mn-SS инкапсулировали DOX и допамин, а затем наноконтейнер стабилизировали слоем PEG. В присутствии избытка глутатиона дисульфидные связи в ядре диссоциируют, что вызывает распад контейнера и высвобождение DOX (Рис. 1.5). Наноконтейнер с инкапсулированным DOX показал высокую эффективность в химиотерапии, которая в несколько раз превышала эффективность свободного DOX. При этом количество побочных эффектов, вызванных воздействием препарата, было значительно меньше.

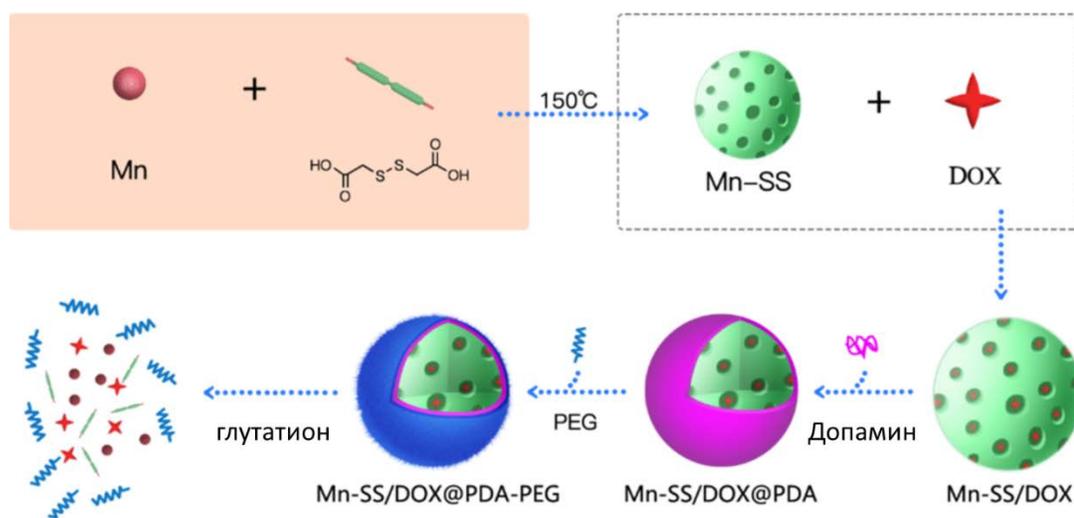


Рис. 1.5. Схема получения наноконтейнера с инкапсулированным DOX и выхода субстрата из полости в присутствии глутатиона.

В литературе известно несколько примеров наноконтейнеров, чувствительных к активным формам кислорода (АФК). АФК являются продуктами нормального метаболизма кислорода в живой клетке, однако повышенная концентрация АФК может возникать при аэробном гликолизе, являющимся характерной чертой раковых клеток. Такое поведение было использовано для высвобождения лекарств при взаимодействии наноконтейнера с избыточным количеством АФК [66- 68]. В качестве основного строительного блока наноконтейнера использовали органические

сульфиды, которые при повышенном содержании АФК окисляются до гидрофильных сульфоксидов и сульфонов [69].

Еще одним известным соединением, используемым для создания АФК-чувствительных наноконтейнеров, является ферроцен, который легко окисляется до ферроцений иона. Ферроценсодержащие полимеры являются наиболее изученными среди множества управляемых полимеров. Материалы на их основе нашли применение как в биомедицине, так и в электронике в качестве сенсоров, приводов, аккумуляторов и в жидких кристаллах [70- 74].

В качестве примера ферроценсодержащего наноконтейнера можно привести нанокапсулу, полученную в группе Проф. Д. Креспи [75]. Капсула содержит гидрофобное ядро, покрытое гидрофильной оболочкой из редокс-чувствительного полимера – поли(винилферроцен)-блок-поли(метилметакрилата) (PVFc-*b*-PMMA). При окислении нанокапсулы происходит гидрофобно-гидрофильный переход, что вызывает изменения в структуре капсулы - появление полярных фрагментов и ее набухание. Нанокапсулу успешно использовали для высвобождения гидрофобного субстрата, инкапсулированного в ядро капсулы (Рис. 1.6).

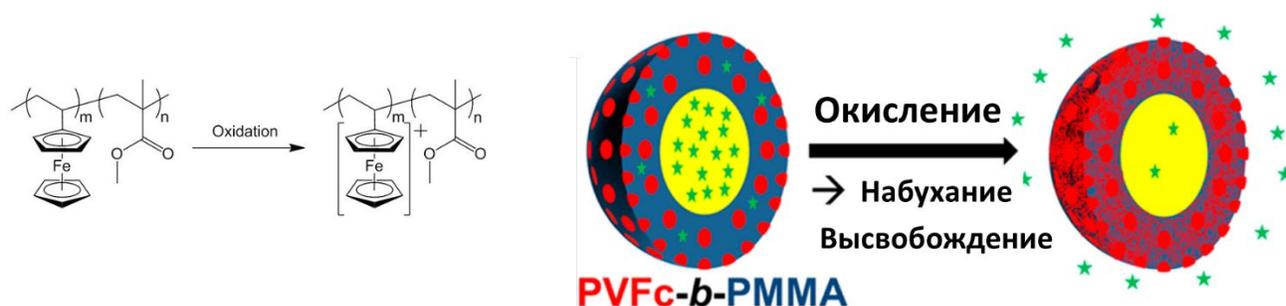


Рис. 1.6. Схема выхода субстрата из наноконтейнера PVFc-*b*-PMMA.

Другим примером ферроценсодержащего наноконтейнера является капсула, полученная в группе Проф. Ю. Ванко [76]. Капсулу получали методом осаждения LbL на коллоидных микрочастицах с последующим удалением сердцевин. В качестве основных строительных блоков использовали силановые поликатионы и полианионы, содержащие ферроценовые фрагменты. Проницаемость капсулы зависит от степени окисления. При химическом окислении капсула расширяется и ее проницаемость резко увеличивается (Рис. 1.7).

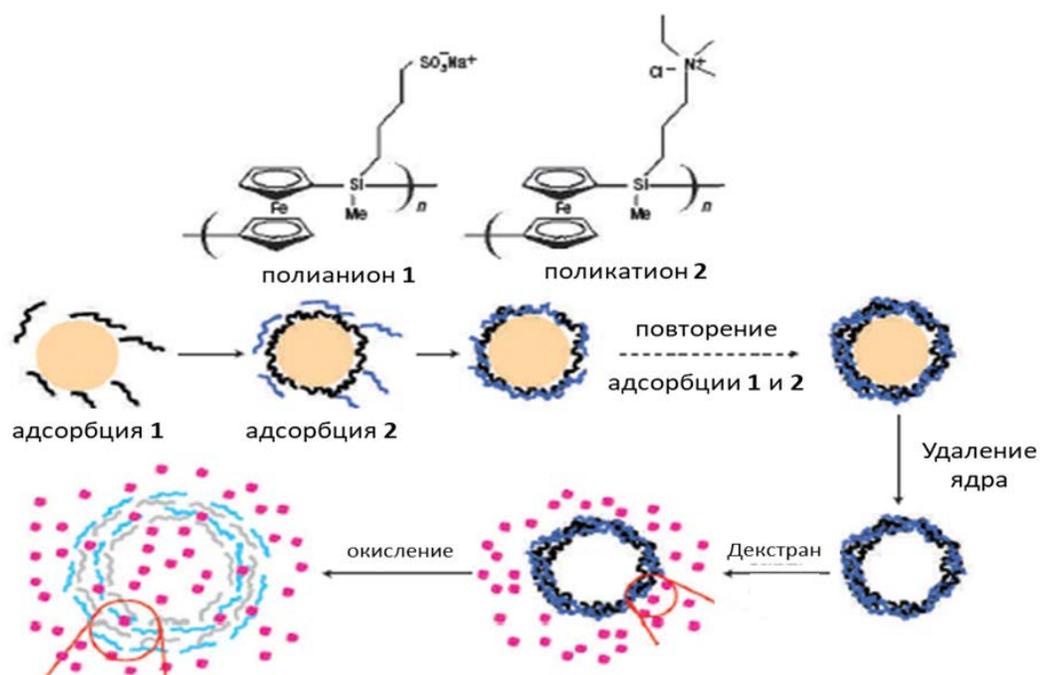


Рис. 1.7. Схема создания полиэлектролитной нанокapsулы на основе ферроцен-содержащих полисиланов и редокс-контролируемой загрузки субстрата.

1.3.4. Фоточувствительные наноконтейнеры

Высвобождение лекарства под действием света является одним из перспективных и многообещающих подходов. Воздействие света может быть локализовано на небольшом участке в течение длительного времени, что является привлекательным в терапии. Процессы, происходящие в организме под воздействием света, как правило, запускаются и останавливаются всего лишь при включении/выключении источника света, что позволяет минимизировать количество побочных эффектов. К тому же свет является экстракорпоральным источником воздействия и не требует использования реагентов. Во время терапии можно регулировать интенсивность и длину волны облучения, что позволяет контролировать ход терапии [77]. Одним из ключевых факторов, который надо учитывать при создании светочувствительных наноконтейнеров, является глубина проникновения света в организм, определяемый не только интенсивностью облучения, но и длиной волны. Для наружного применения можно использовать наноконтейнеры, работающие при любой длине волны. Однако для внутреннего биомедицинского применения необходимо учитывать глубину, на которую может проникнуть облучение. Например, ультрафиолетовое (УФ) и видимое излучение имеют малую глубину проникновения в несколько микрометров и могут использоваться

только для наружного применения. Ближнее инфракрасное излучение (ИК) может проникнуть на несколько миллиметров, что позволяет применять его в качестве стимула в терапии более глубоких слоев организма [78]. Для получения светочувствительных наноконтейнеров чаще всего в их структуру вводят хромофорные фрагменты, такие как азобензол, спиропиран, трифенилметан или стильбен [79].

Группа исследователей под руководством Проф. С. Янь и Проф. В. Тан создали светочувствительный наноконтейнер с использованием молекул ДНК, модифицированных азобензольными фрагментами. Их наносили на поверхность мезопористых силикатных частиц (Рис. 1.8) [80]. При УФ-облучении азобензол переходит из транс-состояния в цис-состояние. Обратный переход протекает при облучении видимым светом. При переходах между конфигурационными изомерами разрушалась двухцепочечная структура ДНК, что приводило к открытию силикатных пор. Полученный контейнер может быть использован для фотоконтролируемого высвобождения субстрата, что продемонстрировано на примере противоракового лекарства DOX.

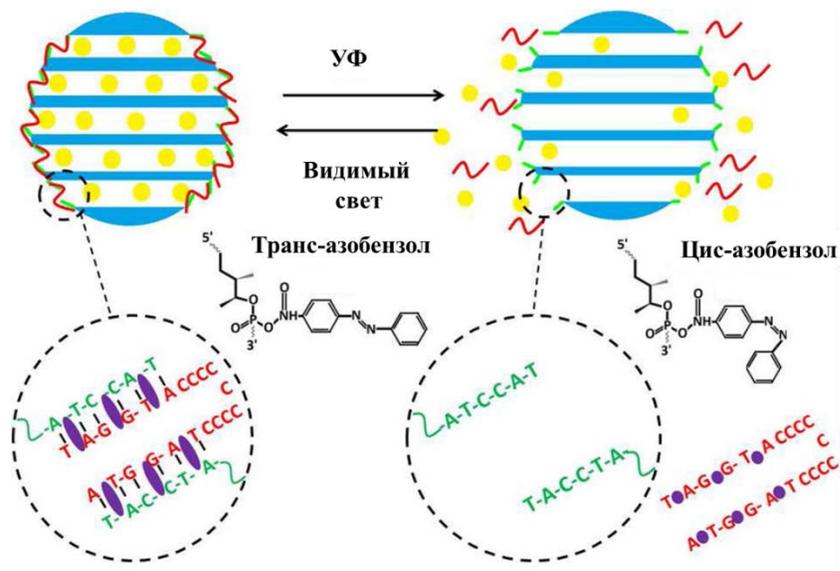


Рис. 1.8. Схема фотоиницируемого высвобождения DOX из пор силикатных наночастиц.

Группа сотрудников под руководством Проф. Менг создала ИК- и УФ- чувствительный наногель для высвобождения DOX [81]. Основой наногеля является гиалуроновая кислота, функционализированная 7-*N,N*-диэтиламино-4-гидроксикумарином. Наногель эффективно инкапсулирует DOX. При воздействии УФ и ближнего ИК облучения происходит распад уретановых связей, соединяющих цепочку гиалоурановой кислоты с функциональной группой, что, в свою очередь, вызывает распад наноконтейнера и выход DOX (Рис. 1.9).

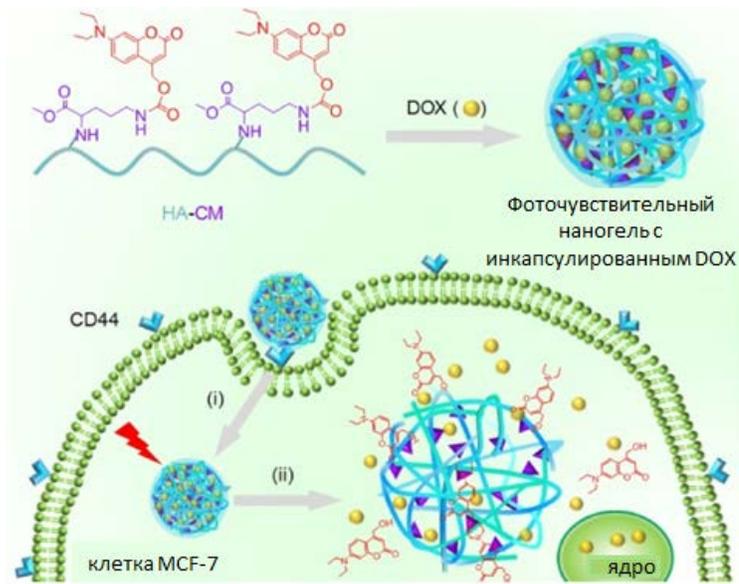


Рис. 1.9. Получение наногеля с инкапсулированным DOX. Схема фотоконтролируемого высвобождения DOX из наногели в клеточной среде.

Одним из популярных методов получения ИК-чувствительных контейнеров является создание гибридных наноматериалов на основе наночастиц золота, стабилизированных полимерной матрицей. Например в работе Проф. Ф. Карусо сообщается о полиэлектролитной нанокапсуле, состоящей из нескольких слоев поли(стиролсульфоната) и поли(аллиламин гидрохлорида) [82]. Нанокапсула связывает наночастицы золота при длительном перемешивании, а при pH 5 инкапсулирует препарат декстрин, меченый изотиоцианатом флуоресцеина. Образованный гибридный наноконтейнер разрушается под воздействием ИК облучения (длина волны 1064 нм) с высвобождением инкапсулированного субстрата.

1.3.5. Ультразвуковое высвобождение субстрата

Ультразвуковые волны хорошо проникают в мягкие ткани и практически безобидны для организма. Они широко используются в диагностике внутренних органов. В последние годы наряду с диагностическими целями ультразвук широко изучается в качестве стимула для доставки лекарств к поврежденным участкам [83 - 85]. Преимуществами ультразвука являются доступность, дешевизна, портативность, возможность с высокой точностью фокусировать на целевом участке организма. Результаты последних исследований показали, что ультразвук является

многообещающим подходом в лечении некоторых тяжело доступных и неоперабельных форм рака [86,87].

При воздействии ультразвука на терапевтический участок вследствие микропузырьковой кавитации на стенках кровеносных сосудов и межклеточной мембраны образуются временные или постоянные поры, через которые проникает терапевтический препарат [88]. Такая доставка лекарств считается безопасной, поскольку процесс разрушения/восстановления клеточной мембраны и сосудов обратимый. Клеточные мембраны обычно возвращаются в исходную форму в течение нескольких секунд [89]. Лечение происходит только в тех областях, на которые воздействует ультразвук [90,91].

В группе Проф. К. Ким и Проф. И. Квон разработали наноконтейнер, который разрушается под воздействием ультразвука с образованием газообразного CO_2 [92]. Ядро контейнера состоит из поли(*D,L*-молочной-*co*-гликолевой кислоты) и газообразующего полимера, полученного полимеризацией γ -бутиролактона холестерилкарбоната и пропиленоксида. Оболочка контейнера состоит из неионогенного поверхностно-активного полимера плуроника F68. Под действием ультразвука в результате гидролиза ядра образуется газообразный CO_2 , который способствует высвобождению лекарства из ядра и его проникновению через клеточную мембрану (Рис. 1.10).

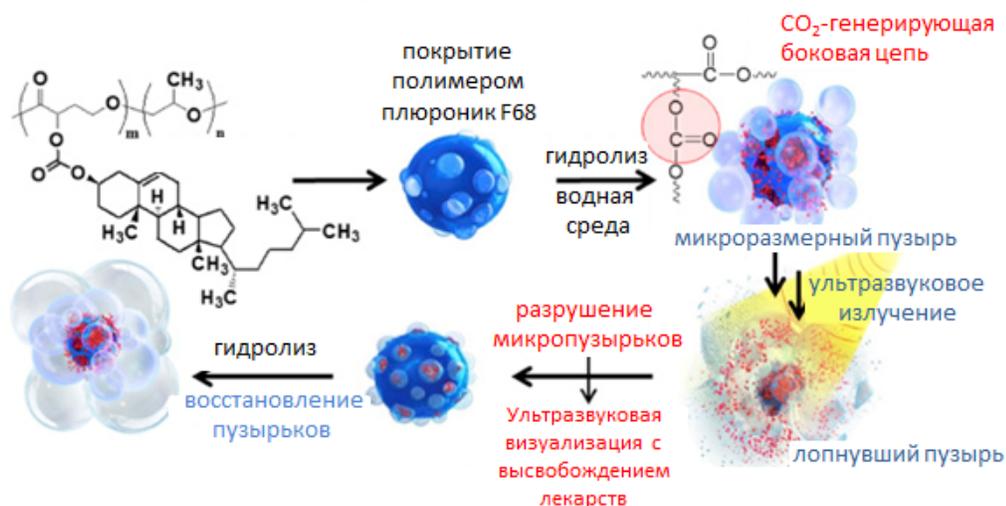


Рис. 1.10. Схематическое представление принципа действия наноконтейнера под действием ультразвука с последующим высвобождением лекарства.

1.3.6. Магнитночувствительные наноконтейнеры

В течение последних двух десятилетий широко распространилось применение микро- и наноразмерных магнитных частиц в биомедицине. В первую очередь магнитные частицы используются для визуализации в магнитной томографии, а также для магнитной сепарации клеток при иммуноанализе. В последние годы ведутся научные работы по изучению возможности применения магнитных частиц в гипертермической терапии злокачественных опухолей и в контролируемой адресной доставке лекарственных веществ и терапевтических генов [93-95]. Общей стратегией использования магнитных наночастиц в адресной доставке лекарств заключается в их включение в состав наноконтейнеров с последующим транспортом в целевую область под действием магнитного поля [96,97].

Первые примеры использования магнитных наночастиц в адресной доставке датируются концом 1970-х годов. Проф. К. Виддер с коллегами описали метод получения магнитных микро- и наночастиц с прикрепленными к ним цитотоксическими препаратами [98, 99]. Полученные композиты внутривенно вводились в организм, где под действием высоко градиентного магнитного поля удалось достичь их накопления в целевой области. Высвобождение лекарства проводили изменением pH и температуры.

В качестве наноконтейнеров часто применяют термоуправляемые полимеры, фазовые переходы которых происходят при температурах, ненамного отличающихся от физиологических. Так, в работе [100] предложено использование термочувствительного полимера декстран-*g*-поли(*N*-изопропилакриламид-*co-N,N*-диметилакриламидом) в качестве наноконтейнера магнитных наночастиц и лекарства DOX. Нижняя температура фазового перехода полимера равна 37 °С. Система медленно выпускает DOX при температурах ниже температуры фазового перехода, но при температуре 37 °С и выше скорость выхода субстрата резко возрастает. Данная система была использована для магнитно-контролируемой доставки DOX в очаг поражения с последующим термоуправляемым высвобождением DOX (Рис. 1.11).

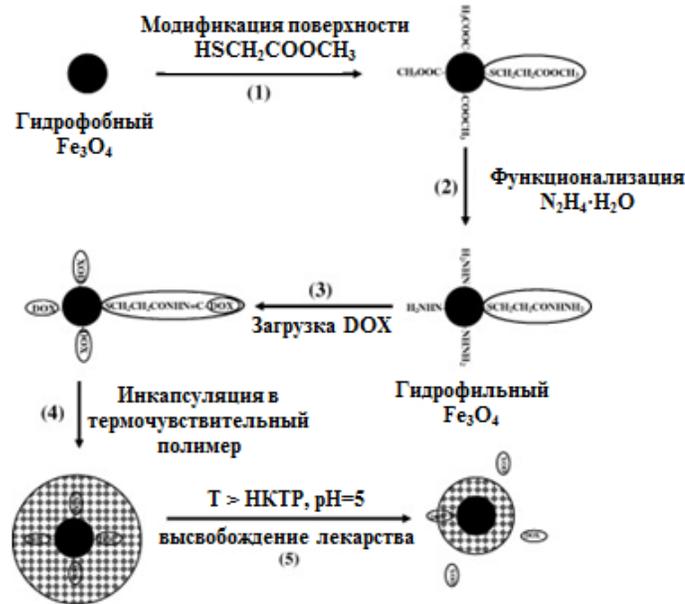


Рис. 1.11. Схема создания магнитного наноконтейнера с использованием термочувствительного полимера. Контролируемое высвобождение лекарственного субстрата при температуре выше 37°C .

Группа исследователей под руководством Проф. М. Кима и Дж. Юна показала возможность применения магнитных частиц для преодоления гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [101]. Это физиологический барьер между кровеносной и центральной нервной системами. Главная функция ГЭБ заключается в поддержании гомеостаза мозга. Он защищает нервную ткань от циркулирующих в крови микроорганизмов, токсинов, клеточных и гуморальных факторов иммунной системы, которые воспринимают ткань мозга как чужеродную. ГЭБ задерживает переход из кровеносной системы в нервную систему лекарственных веществ, что затрудняет лечение многих заболеваний центральной нервной системы. Авторы в работе показали возможность применения магнитных наночастиц, функционализированных карбоксилатными группами, в качестве контейнеров, способных к преодолению ГЭБ. Методами флуоресцентной спектроскопии показано, что наночастицы переходят из кровеносной системы мышей в центрально-нервную систему под воздействием сильного внешнего магнитного поля с величиной магнитной индукции 28 и 79,8 мТс. При воздействии переменного магнитного поля наблюдалось более эффективное поглощение магнитных наночастиц. В будущем авторы планируют использовать полученные результаты в разработке препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера.

1.3.7. Фермент-чувствительные наноконтейнеры

Ферменты играют ключевую роль в метаболических процессах клеток и тканей, а нерегулируемая экспрессия ферментов обычно связана с многочисленными заболеваниями. Избыточное количество ферментов в патогенных зонах организма может быть использовано в качестве стимула для высвобождения лекарств. Ферменты обладают рядом преимуществ, а именно специфичностью, регио- и стереоселективностью. Ферменты могут расщеплять различные натуральные и синтетические полимеры, например, полисахариды, белки и пептиды.

Группа исследователей под руководством Проф. С. Таяманавана получила наноконтейнер на основе дендримера, который разрушается под воздействием специфических белков [102]. Дендример состоит из гидрофильных и гидрофобных фрагментов, соединенных между собой фермент-чувствительными сложноэфирными связями. Полученный дендример самоорганизуется в водной среде в мицеллярные структуры. Под воздействием белка эстеразы печени свиней происходит расщепление сложноэфирных связей, разрушение мицелл и нарушение гидрофильно-гидрофобного баланса, что вызывает выход гидрофобного субстрата из полости наноконтейнера (Рис. 1.12).

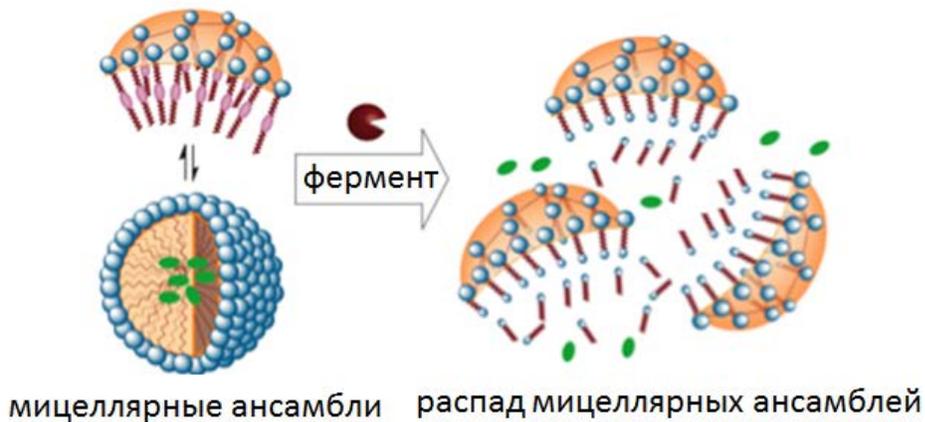


Рис. 1.12. Схема разрушения мицеллярной структуры дендримера при ферментативном расщеплении сложноэфирной связи.

1.3.8. Глюкоза-чувствительные наноконтейнеры

В последние годы большой интерес проявляется к созданию глюкоза-чувствительных систем доставки лекарств, которые могли бы регулировать высвобождение лекарственного средства в зависимости от концентрации глюкозы в организме. Такие саморегулируемые платформы

необходимы для лечения диабета [103]. Созданные в последние годы глюкоза-чувствительные наноконтейнеры обычно содержат фермент глюкозооксидазу (GOx), конканавалин А или производные фенилбороновой кислоты (ВА) [104- 112].

В наноконтейнерах, основанных на использовании GOx, действующими фрагментами являются рН чувствительные функциональные группы. GOx вызывает окисление глюкозы до глюконовой кислоты, что приводит к понижению рН. Кроме того, при окислении глюкозы выделяется пероксид водорода, который при создании дополнительных условий может выступить ещё одним стимулом для высвобождения субстрата [113,114].

Проф. Виллалонга совместно с коллегами создал наномотор для глюкоза-инициируемого высвобождения инсулина [115]. Наномотор состоит из золотых нанопроволок, прикрепленных к мезопористому диоксиду кремния, и наноклапанов с инкапсулированным инсулином. Клапаны покрыты рН-чувствительным полимером с ферментом GOx и фенилбороновой кислотой. Под воздействием GOx происходит окисление глюкозы до глюконовой кислоты и образование пероксида водорода. Понижение рН вызывает распад наноклапанов и высвобождение инкапсулированного инсулина. Образующийся пероксид водорода также может вызывать дополнительное высвобождение субстрата из-за разрушения связи углерод-бор в фенилбороновой кислоте. Воздействие ультразвука улучшает эффективность наномотора, по сравнению со статическими условиями (Рис. 1.13).

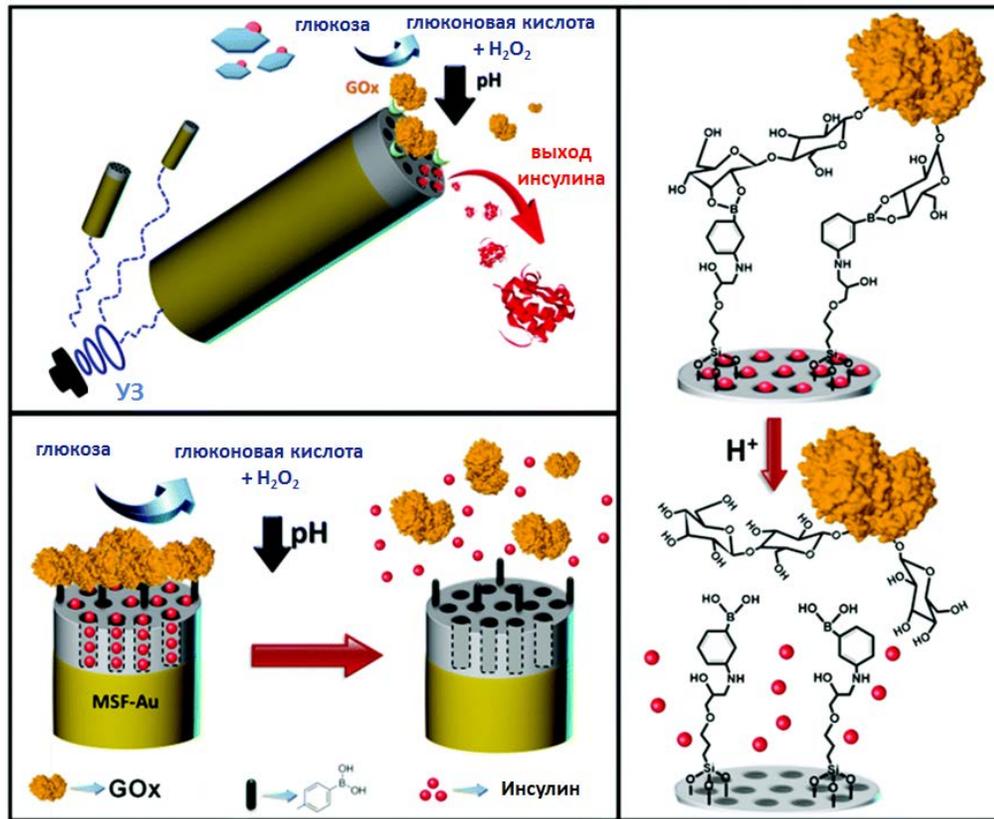


Рис. 1.13. Схемы, показывающие высвобождение инсулина из наномотора в присутствии глюкозы.

Конканавалин А – это белок, добываемый из бобовых. В его структуре имеются четыре центра связывания глюкозы и других углеводов [116-118]. Стратегия его использования в глюкозочувствительных наноконтейнерах заключается в следующем: конканавалин А вводят в состав структуры контейнера, который состоит из гликополимеров, полисахаридов или материалов с гликолизированными остатками. Субстрат включается в наноконтейнеры либо непосредственно в ходе синтеза, либо после получения частиц. При увеличении концентрации глюкозы происходит конкурентный обмен гликолизидных фрагментов полимеров на глюкозу. Это вызывает распад контейнера и выход субстрата из полости. Ниже приведено несколько примеров наноконтейнеров на основе данного белка.

Группа Проф. В. Ву создала глюкозочувствительный наногель на основе конканавалина А и поли(*N*-изопропилакриламида) [119]. Конкавалин А, добавленный к трехмерной полимерной структуре, увеличивает чувствительность к глюкозе в диапазоне концентраций 0–20 мМ при физиологических рН и температуре. Полупроводящий структурированный наногель может подвергаться обратимому и быстрому объемному и фазовому переходу при изменении концентрации глюкозы. Что еще более важно, наногель благодаря сетевой пористой структуре

обеспечивает высокую емкость для инсулина и с хорошей стабильностью может модулировать *in vitro* доставку предварительно загруженного инсулина в зависимости от концентрации глюкозы (Рис. 1.14).

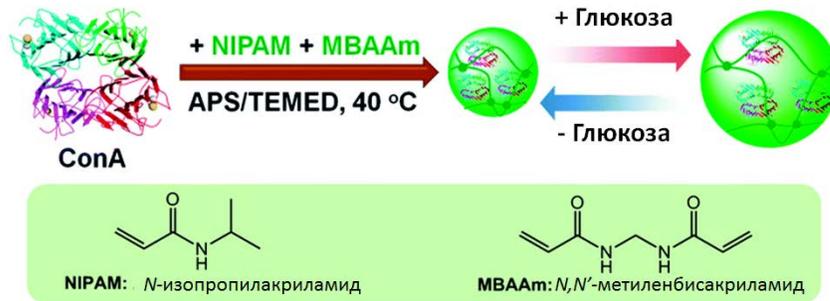


Рис. 1.14. Схема получения чувствительных к глюкозе гидрогеля на основе конканавалина А (APS – $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, TEMED – тетраметилэтилендиамин).

Проф. К. Ду с соавторами показал возможность использования конканавалина А в создании систем для глюкоза-управляемого высвобождения инсулина [120]. Они функционализировали мезопористые силикатные частицы фрагментами маннозы. Тетрамеры конканавалина А прикрепили к силикатным наночастицам через маннозные фрагменты, тем самым связав субстрат в порах силикатных частиц. При уменьшении рН или при высокой концентрации глюкозы связи между конканавалином А и углеводами разрушаются и происходит высвобождение субстрата (Рис. 1.15).

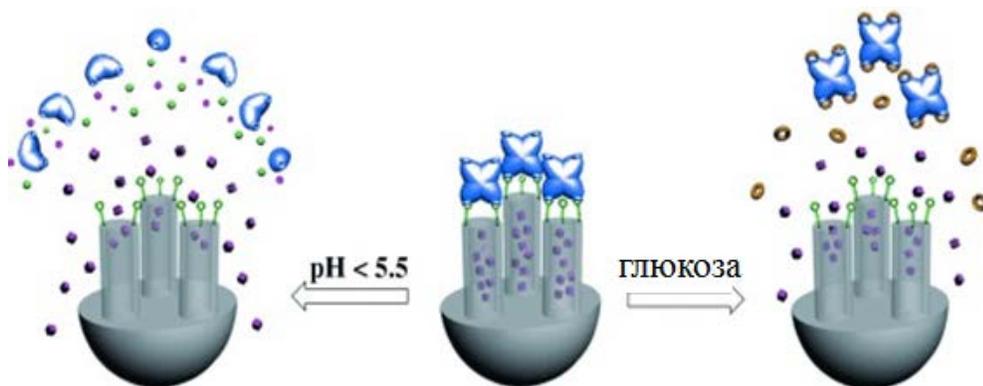


Рис. 1.15. Схема контролируемого высвобождения субстрата из функционализированных мезопористых силикатных частиц.

В настоящее время самым распространенным методом создания глюкоза-чувствительных наноносителей является создание структур на основе производных фенолбороновой кислоты (ВА).

Фенилбороновая кислота и ее производные могут обратимо и конкурентно образовывать циклические эфиры с цис-диольными соединениями [121,122].

Группой исследователей под руководством Проф. Р. Ма и Л. Ши были созданы полимерные везикулы [123]. Они состоят из сополимеров поли(этиленгликоль)-*b*-поли(аспарагиновая кислота-*co*-аспартилглюкозамина) (PEG₄₅-*b*-p(Asp-*co*-AspGA)) и поли(этиленгликоль)-*b*-поли(аспарагиновая кислота-*co*-аспартамидофенилбороновой кислоты) (PEG₁₁₄-*b*-p(Asp-*co*-AspBA)). Используя циклодекстрин вначале получали везикулярные структуры из PEG₄₅-*b*-P(Asp-*co*-AspGA), а затем их сшивали сополимером PEG₁₁₄-*b*-P(Asp-*co*-AspBA) взаимодействием глюкозаминового фрагмента с фенилбороновыми группами. Циклодекстрин удаляли из ядра везикул диализом. Методами динамического светорассеяния, и на примере бактериального антибиотика ванкомицина показано, что данные структуры выпускают субстрат при содержании в среде низших углеводов глюкозы и фруктозы (Рис. 1.16).

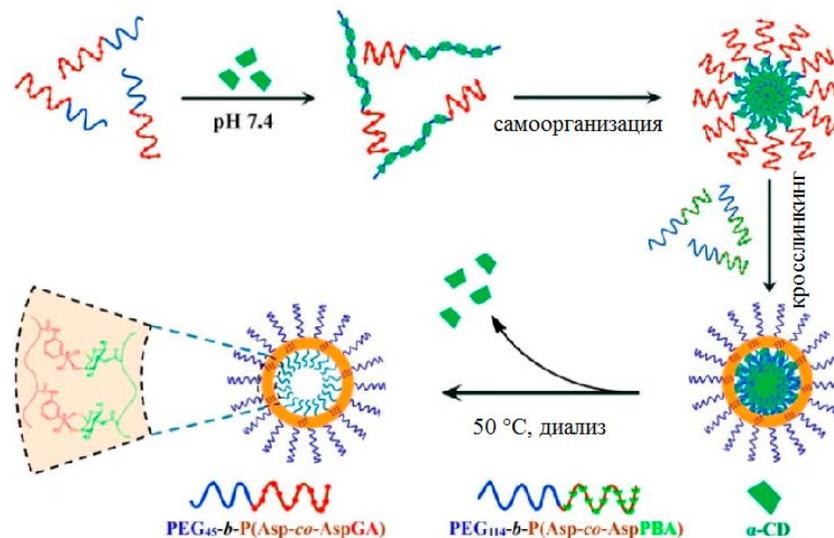


Рис. 1.16. Схема создания полимерных везикул на основе сополимеров PEG₄₅-*b*-p(Asp-*co*-AspGA) и PEG₁₁₄-*b*-p(Asp-*co*-AspBA).

1.4. Применение полимерных наноконтейнеров в других сферах

Помимо медицины, полимерные наноконтейнеры нашли применение в самых разных областях: в сельском хозяйстве, строительстве, электронике и в нанотехнологиях [124,125].

Ф. Фрацето с коллегами создали биodeградируемую полимерную микросферу на основе поли(3-гидроксibuтират-*co*-гидроксивалерата) и поли(3-гидроксibuтирата) [126]. Данную сферу

использовали для доставки гербицида аметрина. Высвобождение субстрата происходит в процессе диффузии гербицида через мембрану и частичной диффузии через заполненные водой поры микрочастиц. Инкапсулирование аметрина в наноконтейнеры обеспечивает более медленное и продолжительное высвобождение гербицида по сравнению со свободным веществом. Это позволяет снизить вредное воздействие гербицида на экосистему, здоровье человека и окружающую среду. Использование контейнера также позволяет уменьшить токсическое воздействие гербицида на семена растений и повышает химическую и биологическую стабильность субстрата.

Проф. Д.Г. Щукин с соавторами использовали наноконтейнеры для создания коррозионно-устойчивых покрытий [127]. Авторами созданы полиэлектролитные капсулы с инкапсулированным ингибитором коррозии бензтриазолом. Полученные наноконтейнеры вместе с ZrO_2 и органосилановыми золями наносились на модельную поверхность алюминиевого сплава. При уменьшении pH среды, возникающем в результате процессов электрохимической коррозии алюминиевого сплава, разрушается полиэлектролитная капсула и происходит высвобождение бензтриазола, который значительно уменьшает скорость коррозии. Наноконтейнеры увеличивают долговременную антикоррозионную защиту подложки и обеспечивают эффективное хранение ингибитора и его длительное выделение при необходимости.

Проф. Ч. Лицунь с коллегами продемонстрировал новый метод создания композитных покрытий для металлов [128]. Метод заключается в совместном нанесении меди и микрокапсулы, содержащей жидкую органосиликатную смолу, на катод из углеродистой стали. При проведении испытаний на износ трения происходит разрушение капсулы и смазывание органической жидкостью поверхности металла, что положительно сказывается на износостойкости материала (Рис. 1.17).



Рис. 1.17. Микрофотографии просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) поперечных сечений нормального медного покрытия и композитного покрытия медь/микрокапсула на поверхности углеродного электрода.

1.5. Неорганно-органические нанокомпози́ты

Благодаря квантовым эффектам неорганические наночастицы обладают рядом свойств, отличным от их макроразмерных аналогов [129, 130]. Особенно важными для практического применения являются следующие характерные особенности наночастиц:

- *ферромагнетизм и суперпарамагнетизм* – проявляются у всех наночастиц металлов, включая диамагнитные, и зависят от размеров частиц;
- *поверхностный плазмонный резонанс* – возникает у наночастиц серебра, золота, меди, и ответствен за окрашивание коллоидных растворов металлов;
- *фото- и термолюминесценция* – люминесцентное свечение, возникающее в процессе облучения или нагревания наночастиц; используется для контроля ионизирующего излучения, так как зависимость интенсивности люминесценции линейно зависит от дозы облучения;
- *каталитическая активность* – из-за большого отношения поверхности к объему наночастицы характеризуются необычайной высокой каталитической активностью и селективностью, по сравнению с макроаналогами.

Наноразмерные неорганические частицы являются термодинамически неравновесными. Они обладают низкой химической, физической и седиментационной стабильностью [131, 132]. При этом для практического применения наночастиц в катализе, оптике, магнетизме необходимы стабильные и однородные частицы. Одним из методов стабилизации наночастиц является создание гибридных нанокомпози́тов [133]. Неорганно-органические нанокомпози́ты – это новый класс материалов, которые обладают улучшенными характеристиками, по сравнению с отдельными составляющими. Они объединяют свойства органических и неорганических компонент в одном материале, а также проявляют новые свойства, образованные за счет конъюгации органической и неорганической фаз. Для создания гибридных нанокомпози́тов широко используются различные органические структуры: поверхностно-активные вещества (ПАВ), полимеры, полиэлектролиты и дендримеры [134, 135].

Химические методы создания гибридных неорганно-органических нанокомпози́тов можно подразделить на три вида:

- метод *in-situ*; в состав органической матрицы внедряются ионы металлов или другие прекурсоры неорганических наночастиц, которые впоследствии формируются в наночастицы химическими, термическими методами или облучением;
- метод *ex-situ*; в состав органической матрицы внедряются готовые неорганические наночастицы;

- Синтез и формирование полимерной матрицы и неорганических наночастиц происходит одновременно.

1.5.1. In-situ формирование неорганических частиц

Для образования неорганических наночастиц *in-situ* в состав органической матрицы внедряются прекурсоры неорганических наночастиц, которые в результате последующих химических или фотохимических реакций переходят в целевые неорганические наночастицы. Органические матрицы необходимы для предорганизации прекурсоров и их структурирования [136]. Использование микро- и наноразмерных структур в качестве темплатов и стабилизаторов имеет ряд преимуществ: [137]

- наличие ограниченного субмикронного и наномикронного реакционного объема позволяет получить частицы такой морфологии и размеров, которые невозможно получить в чистом растворителе;
- минимизирование побочных эффектов влияния повышенной локальной концентрации реагентов и локального перегрева в реакторе при добавлении исходных реагентов;
- процесс получения наночастиц в предорганизованной системе является моделированием и мимикрией биологических процессов, в частности, биоминерализации.

Существует несколько типов субмикронных реакторов для получения наноразмерных неорганических частиц: мицеллы, эмульсионные капли, везикулы, липосомы [137].

Самыми первыми стали использовать микроэмульсии [138-140]. Применение прямых и обратных мицелл позволяет получить эмульсии размером от 50 нм до десятков микрометров. Для получения наночастиц реагенты растворяют в одной или в обеих фазах дисперсионной среды. Иногда один из прекурсоров выступает одновременно и как реагент, и как стабилизатор микроэмульсии и наночастиц [141,142].

Другой метод основан на процессах так называемого мицеллярного обмена. В этом случае смешивают два дисперсионных раствора, содержащие растворенные реагенты. В результате микрокапли объединяются с образованием более крупных капель, внутри которых образуются целевые наночастицы [143]. Данным методом можно получить широкий ряд неорганических наночастиц. Чаще всего на его основе создаются наночастицы оксидов металлов (оксиды титана, кремния, циркония, железа, сложные титанаты, магнетиты и цеолиты) [144,145].

Наличие небольшого реакционного объема позволяет использовать мицеллы в качестве темплата для получения квантовых точек. Ионообменными методами с использованием анионных ПАВ получены квантовые точки состава ZnSe, CdS, CdSe, CdTe, PbS, ZnS [146,147].

Мицеллы также были использованы для синтеза металлических наночастиц, что показано на примере кобальта, меди, палладия, железа, серебра и золота [148,149]. Размер наночастиц металлов определяется размером мицелл и используемым восстановителем.

Дж. Хопвуд и С. Манн использовали обратные мицеллы и микроэмульсию для получения наночастиц сульфата бария [150]. При использовании мицелл, ионы бария растворяли в мицеллярной среде и затем добавляли сульфат ионы. В ходе реакции образовывались термодинамически нестабильные сферические наночастицы размером 2-4 нм (Рис. 1.18). Для получения наночастиц в микроэмульсиях, в дисперсионной среде создавались микроэмульсии, содержащие отдельно сульфат-ионы и ионы бария. При смешивании микроэмульсий образовывались более крупные эмульсии, в которых формировались наночастицы $BaSO_4$. В ходе микроэмульсионного синтеза получились вытянутые наночастицы сульфата бария либо нитевидные структуры (Рис. 1.18).

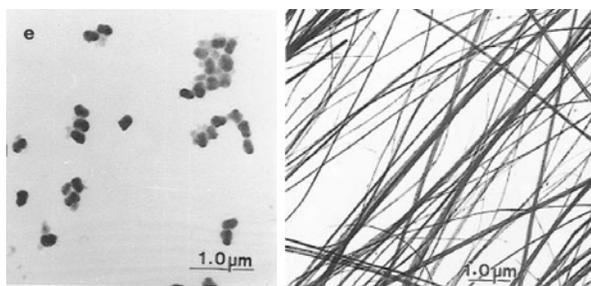


Рис. 1.18. ПЭМ снимки наночастиц сульфата бария, полученные в мицеллах, и нанонитей $BaSO_4$, полученные в микроэмульсии.

Е. Дуглас с соавторами создали квантовые точки CdS с использованием поли(стирол-блок-2-винилпиридина) в качестве стабилизатора [151]. Полимер при добавлении ионов кадмия организовывался в мицеллы. При продувании газообразным сероводородом образовывались наночастицы CdS. Рост наночастиц CdS был ограничен размером ядра мицелл. Полученные наночастицы обладают сильным эффектом квантового удержания и хорошей коллоидной стабильностью (Рис. 1.19).

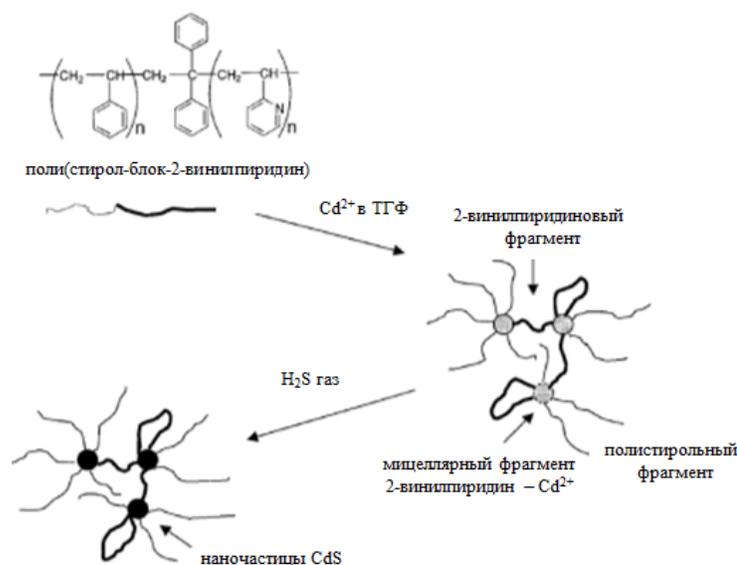


Рис. 1.19. Схематическое изображение образования мицеллы и получения наночастиц CdS в ядре мицеллы.

Многослойные органические пленки также используют в качестве стабилизаторов в синтезе неорганических наночастиц. В состав полимерной матрицы внедряют ионы металлов, которые затем восстанавливают до наночастиц [152,153]. Одним из методов получения полимерной оболочки является поэтапная сборка методом LbL [154]. Этот метод позволяет послойно адсорбировать различные компоненты и формировать многослойные решетки с нанометровой точностью [155]. Изменением pH среды во время многослойной сборки можно контролировать толщину слоя, проницаемость, поверхностную смачиваемость и количество несвязанных функциональных групп [156].

Р. Коэн применил метод LbL для получения полиэлектролитных многослойных нанопленок на различных поверхностях, которые затем использовали для управляемого получения наночастиц металлов или халькогенидов [152]. На примере серебра показано, что варьированием условий синтеза (pH, число циклов) можно получить наночастицы различного размера и концентрации, что подтверждено данными оптической спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии.

Проф. Г. Сухоруков с коллегами использовали полиэлектролитные капсулы на основе поли(стиролсульфоната натрия) и поли(аллиламин гидрохлорида) в качестве микрореакторов для фотохимического синтеза наночастиц серебра [157]. Наночастицы серебра получали фотоиндуцированным восстановлением ионов серебра, предварительно загруженных в структуру оболочки полиэлектролитных капсул. Полученные наночастицы стабильны, не агрегируют ни в ходе синтеза, ни при хранении. Полиэлектролитные капсулы, содержащие в своем составе фторид-ионы,

были использованы для селективного связывания ионов иттрия из водных растворов [158]. Образующие нанокристаллы фторида иттрия находятся на внутренней стороне стенки полиэлектролитной оболочки и имеют размер 6-9 нм.

А. Скиртак с соавторами создали новые полиэлектролитные капсулы, способные разрушаться под воздействием ИК-облучения [159]. В структуру полиэлектролитных капсул, состоящих из поли(4-стиролсульфонат натрия) и поли(аллиламин гидрохлорида), были внедрены наночастицы серебра, способные поглощать ИК облучение. Синтез наночастиц серебра проводилось на поли(аллиламин гидрохлоридной) поверхности реакцией серебряного зеркала. Для стабилизации наночастицы покрывали полиэлектролитными слоями поли(4-стиролсульфоната натрия) и поли(аллиламин гидрохлорида). Полученные наночастицы серебра имеют размер около 8 нм и имеют адсорбционный пик в области 380-500 нм. Наночастицы серебра способны аккумулировать ИК-облучение. При облучении нанокапсул с инкапсулированными серебряными наночастицами постоянным ИК облучением длиной волны 840 нм и мощностью 25 мВт происходит распад капсул. Такое поведение также может найти применение в контролируемом высвобождении (Рис. 1.20).

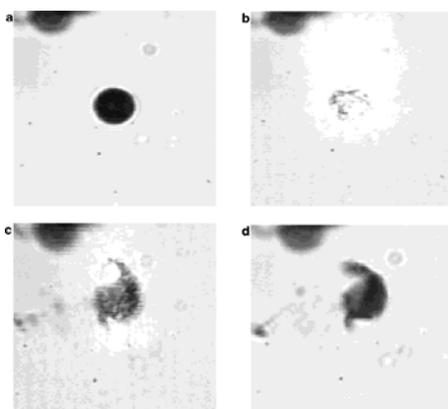


Рис. 1.20. ПЭМ изображение процесса разрушения полиэлектролитной капсулы, функционализированной серебряными наночастицами, под воздействием ИК облучения.

1.5.2. *Ex-situ* формирование неорганических наночастиц

Стабилизация полученных *ex-situ* неорганических наночастиц также является одним из распространенных методов создания гибридных неорганно-органических нанокомпозитов. Известно множество примеров получения нанокомпозитов с использованием в качестве органической составляющей ПАВ, полимеров, полиэлектролитных капсул. Ниже приведены несколько примеров.

Ю. Канг и Т. Татон использовали полимерные амфифилы поли(стирол-блок-акриловую кислоту) и поли(метилметакрилат-блок-акриловую кислоту) для стабилизации предварительно

полученных наночастиц золота [160]. Амфифильные полимеры самоорганизуются вокруг наночастиц золота в мицеллярные структуры с образованием структур «ядро-оболочка». Создание органической оболочки вокруг наночастиц золота вызывает изменение оптических свойств наночастиц золота, вызванное уменьшением энергии поверхностного плазмонного резонанса.

Проф. О. Сандре со соавторами использовал блок-сополимер полибутадиен-со-поли(глутаминовой кислоты) для стабилизации магнитных наночастиц Fe_3O_4 [161]. В зависимости от соотношения фрагментов бутадиена и глутаминовой кислоты образуются либо мицеллярные, либо везикулярные структуры с инкапсулированными магнитными наночастицами. Гибридные наноконструкции реагируют на изменение магнитного поля, что открывает большие возможности их использования в биомедицинском приложении и доставке лекарственных веществ (Рис. 1.21).

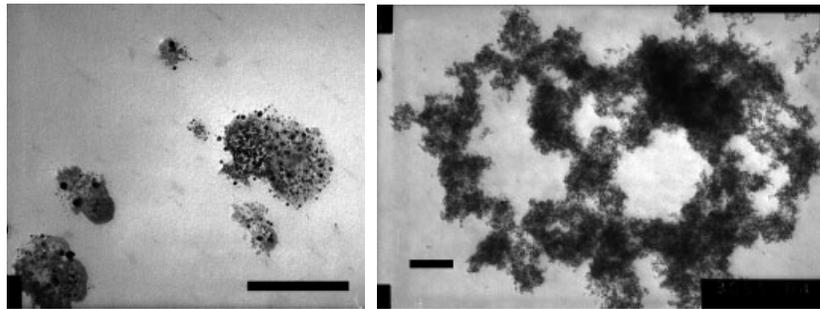


Рис. 1.21. Изображения ПЭМ для мицелл и везикул, состоящих из полибутадиен-блок-поли(глутаминовой кислоты) и магнитных наночастиц Fe_2O_3

Эмульсионная полимеризация нашла широкое применение в создании неорганно-органических гибридных наночастиц. В данном методе наночастицы покрывают полимерной оболочкой, которая предотвращает агрегацию неорганических частиц и увеличивает их совместимость с органической средой [162-164].

Одними из методов создания гибридных наноструктур являются инкапсуляции неорганических наночастиц в полиэлектролитные капсулы методом соосаждения, либо сразу после синтеза. Включение в оболочки капсул неорганических наночастиц позволяет придать капсулам оптические и магнитные свойства. В статье [165] описывается создание магнитно-чувствительных наноконтейнеров для управляемой инкапсуляции и высвобождения субстратов. В структуру полиэлектролитной капсулы, образованной методом LbL с использованием поли(4-стиролсульфоната натрия) и поли(аллиламин гидрохлорида), были внедрены предварительно образованные ферромагнитные наночастицы $Co@Au$. Полученные нанокапсулы образуют устойчивую водную дисперсию. Под влиянием внешнего электромагнитного поля с частотой 100-

300 Гц и напряженностью магнитного поля 1200 Ое изменяется структура оболочки капсулы и увеличивается их проницаемость для макромолекул. Такое поведение позволяет использовать полученные нанокapsулы для магнитно-контролируемой инкапсуляции субстрата (Рис. 1.22).

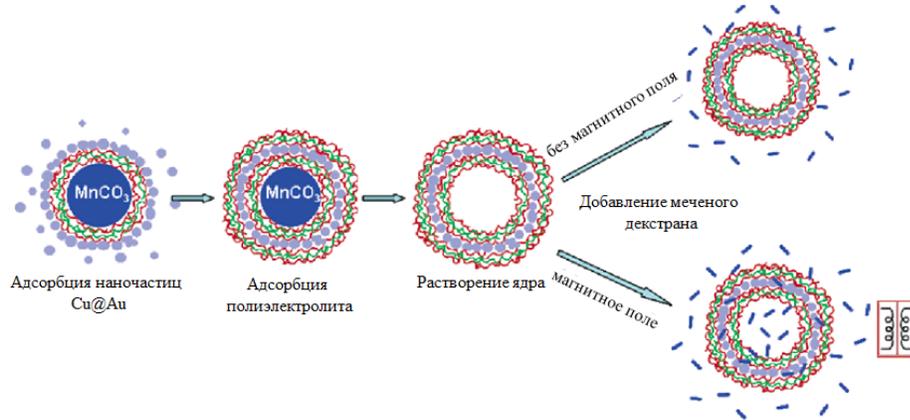


Рис. 1.22. Схема сборки магнитно-чувствительной нанокapsулы и изменение проницаемости оболочки под воздействием магнитного поля.

В следующей работе показан метод создания полых полиэлектролитных капсул, функционализированных золотыми наночастицами [166]. Процесс создания гибридных нанокomпозитов включала следующие стадии: (1) присоединение дендримеров к поверхности сферических силикатных наночастиц; (2) комплексообразование между дендримерами на поверхности силикатных наночастиц с ионами золота (III); (3) восстановление ионов золота боргидридом натрия; (4) сборка методом LbL на поверхности модифицированных силикатных наночастиц полиэлектролитной оболочки, состоящей из поли(4-стиролсульфоната натрия) (PSS) и поли(аллиламин гидрохлорида) (PAH); (5) удаление силикатного ядра обработкой HF. Полученная система показала высокую каталитическую активность в реакции восстановления нитрофенола (Рис. 1.23).

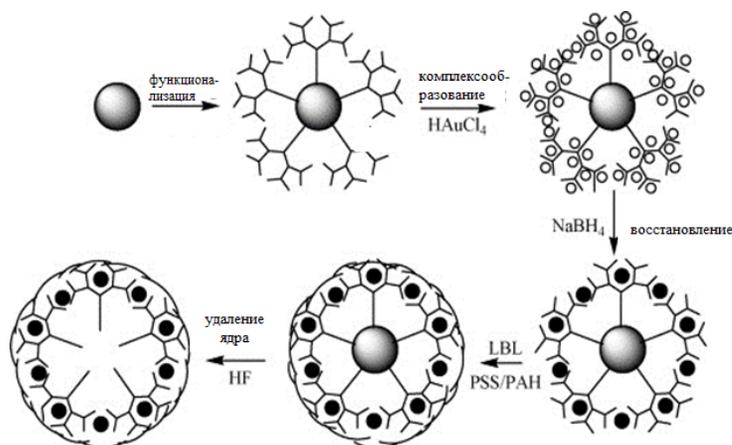


Рис. 1.23. Схема создания полой полиэлектролитной капсулы, функционализированной наночастицами золота.

1.5.3. Одновременное образование неорганических наночастиц и полимерной матрицы

Одновременное создание полимерной органической матрицы и неорганических наночастиц не нашло такого широкого использования, как предыдущие два метода.

Группа под руководством Проф. Ф. Бертино разработали метод одностадийного синтеза нанокомпозитов на основе полианилина и наночастиц серебра или золота [167]. Композиционные материалы синтезированы с помощью радиолиза. Водные растворы анилина, окислителя и солей металлов облучались γ -лучами. Под воздействием γ -лучей в присутствии окислителя анилин полимеризовался в тонкие волокна. Наночастицы металлов также образовывались под воздействием радиационного облучения. Размер и форма образующихся частиц металлов зависела от молярного соотношения анилина и солей металлов, и варьировалась от сфер нанометрового размера до дендритов микронного размера (Рис. 1.24).

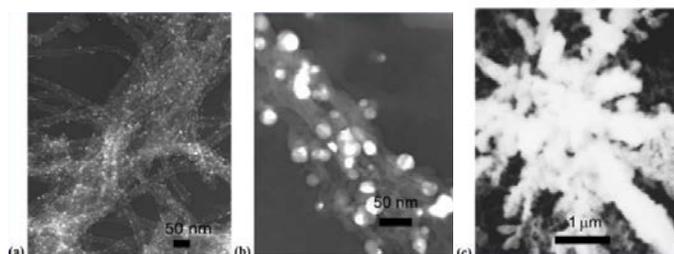


Рис. 1.24. Изображения ПЭМ для полианилиновых нановолокон при различных соотношениях анилина и нитрата серебра.

К. Маллик и др. разработали метод получения гибридных композитов на основе наночастиц меди и поли(о-толуидина) [168]. Они продемонстрировали одностадийный синтез создания полимерных нанокомпозитов с использованием в качестве прекурсоров сульфата меди и о-толуидина. При полимеризации о-толуидина высвобождается свободный электрон, который участвует в восстановлении ионов меди до атомарного состояния. Впоследствии атомы объединяются с образованием коллоидных наночастиц меди. Данные рентгеноструктурного анализа показали наличие в композитах наряду с наночастицами меди невосстановленных ионов меди. Авторы использовали данную систему и для получения наночастиц золота.

1.6. Наноконтейнеры на основе резорцинаренов

Резорцинарены являются известным классом макроциклических соединений, аналогами каликс[4]аренов [169]. Они состоят из четырех резорциновых фрагментов, соединенных между собой метиленовыми мостиками [170]. Из-за наличия внутримолекулярных водородных связей между гидроксильными группами резорцинарены демонстрируют свойства кислот Бренстеда с $pK_a \sim 5.0$ [171]. В качестве кислот Бренстеда резорцинарены нашли применение в катализе [172,173].

Верхний и нижний ободы резорцинаренов могут быть модифицированы различными функциональными фрагментами. Модифицированные резорцинарены используют в хроматографии в качестве неподвижной фазы для разделения субстратов [174].

Резорцинарены склонны образовывать разнообразные трехмерные супрамолекулярные структуры за счет водородных связей, гидрофобных взаимодействий и формирования комплексов «гость-хозяин» [175,176]. Впервые образование супрамолекулярной капсулы описал Джерри Этвуд в 1997 году [177]. Капсула состояла из шести резорцинаренов, соединенных между собой водородными связями (Рис. 1.25).

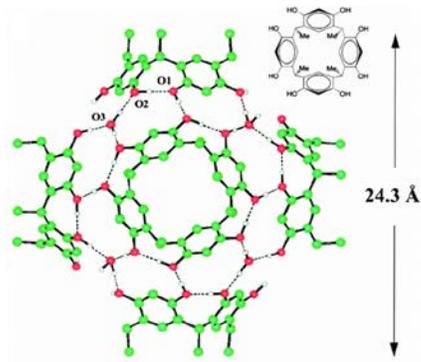


Рис. 1.25. Супрамолекулярная капсула, образованная за счет водородного связывания четырех молекул резорциарена.

Существует несколько подходов для создания молекулярных наноконтейнеров на основе резорциаренов. Первый заключается в создании липосомных структур с использованием амфифильных резорциаренов [178]. Данные структуры мало стабильны и существуют только при низких концентрациях резорциаренов. Вторым подходом является формирование смешанных ассоциатов «резорциарен – ПАВ». Стабильность таких ассоциатов выше, но также чувствительна к множеству факторов. К тому же влияние ПАВ на организм часто бывает негативным. Перспективным является создание дендримерных полимерных структур за счет функционализации восьми гидроксильных групп резорциаренов. Недостатком данного подхода следует отметить сложность функционализации дендримеров и малый выход продуктов реакции. Также многообещающей стратегией представляется создание молекулярных капсул за счет сшивания резорциаренов динамическими ковалентными связями (Рис. 1.26, [179]). Такие капсулы стабильны в различных средах, а их внутренний объем достаточен для инкапсулирования небольших молекул [180]. К сожалению, емкость молекулярных капсул невелика, и капсулы нельзя использовать для включения больших объемных молекул.

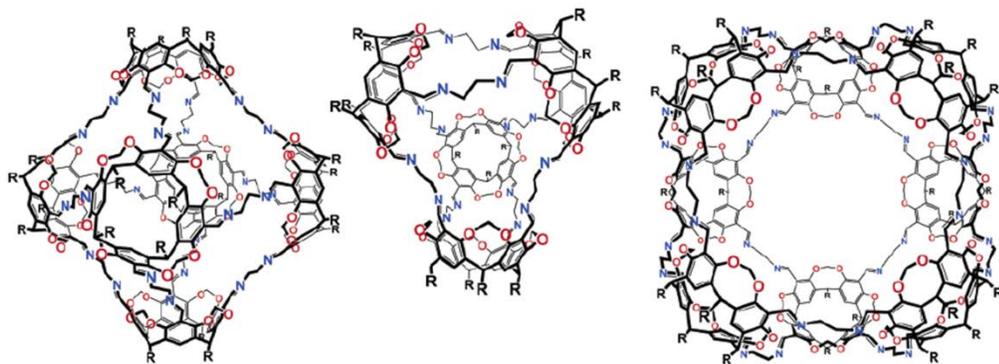


Рис. 1.26. Полимерные капсулы, полученные сшиванием резорциаренов кавитандов динамическими связями.

В последние годы в нашей лаборатории разрабатывается микроэмульсионный метод получения стабильных полимерных наноконтейнеров [181 , 182]. Для этого резорцинарены предорганизуют на границе раздела фаз микроэмульсии, а затем сшивают стимул-чувствительными фрагментами. Наноконтейнеры, полученные микроэмульсионным методом, показали хорошую растворимость в воде, большую емкость, а также хорошую управляемость в доставке субстратов. Их можно использовать в качестве подложки для стабилизации наночастиц металлов и получении композиционных наноматериалов [183,184].

Изучение литературных данных показал, что создание полимерных наноконтейнеров важно для развития множества отраслей, но первостепенной задачей наноконтейнеров является управляемая доставка лекарственных веществ. Резорцинарены являются перспективными строительными блоками для создания молекулярных наноконтейнеров. Их синтез прост в исполнении, протекает с использованием доступных реагентов, а верхний и нижний ободы резорцинаренов могут быть легко модифицированы. Резорцинареновая платформа предорганизует функциональные группы для формирования трехмерных структур.

Целью диссертационной работы являлось создание наноконтейнеров для связывания, хранения и доставки субстратов и лекарственных средств. В качестве строительного блока предполагалось использовать производные резорцинарена. Планировалось разработать методики синтеза наноконтейнеров, сравнить характеристики полимерных наноконтейнеров с их супрамолекулярными аналогами, оценить преимущества и недостатки полимерных и супрамолекулярных наноконтейнеров в связывании и высвобождении субстратов, а также в создании композиционных наноматериалов с металлическими наночастицами. Полученные наноконтейнеры предполагалось исследовать на возможность использования в управляемой доставке лекарств – доксорубицина и инсулина.

ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для получения полимерных управляемых наноконтейнеров использовали принцип самосборки резорцинаренов в микроэмульсионной среде по типу «масло-в-воде». Резорцинареновая платформа малополярна, и поэтому преимущественно растворяется в органической среде. Введение гидрофильных групп по верхнему ободу придает резорцинаренам амфифильные свойства. Они организуются на границе раздела фаз микроэмульсии. Полярные группы направлены в воду, а ароматическая платформа с хвостами по нижнему ободу в органическую фазу. Сшиванием хвостов стимул-чувствительными мостиками можно создавать наноразмерные полимерные частицы с управляемой структурой и свойствами (Рис. 2.1). При воздействии на стимул-чувствительные мостики наноконтейнеры распадаются или трансформируются, что может быть использовано для управляемой доставки субстратов и лекарств.

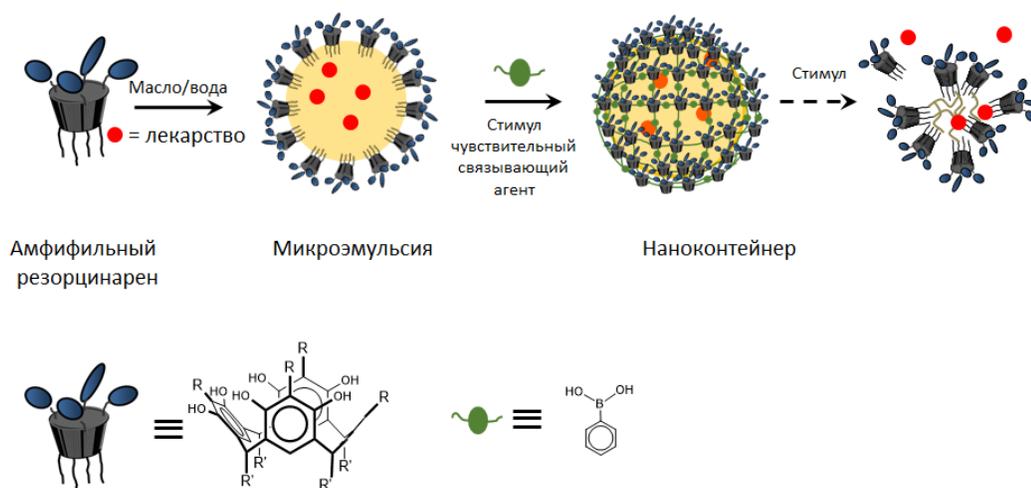


Рис. 2.1. Схематическое изображение получения управляемых наноконтейнеров.

В работе показан новый, простой в исполнении способ получения полимерных наноконтейнеров путем сшивания пропиольных хвостов амфифильных резорцинаренов фенолбороновой кислотой с образованием динамической боронатной связи (Рис. 2.2). Данный подход использован для создания полимерных нанокапсул и наносфер, формирование которых определяется условиями проведения реакции полимеризации. Для наноконтейнеров охарактеризованы инклюзивные свойства по отношению к органическим и неорганическим

субстратам и проведено их сравнение с супрамолекулярными аналогами. На основе метода разработаны методики создания рН и глюкоза-чувствительных полимерных наноконтейнеров, которые были применены для связывания, хранения и стимул-управляемого высвобождения лекарственных субстратов.

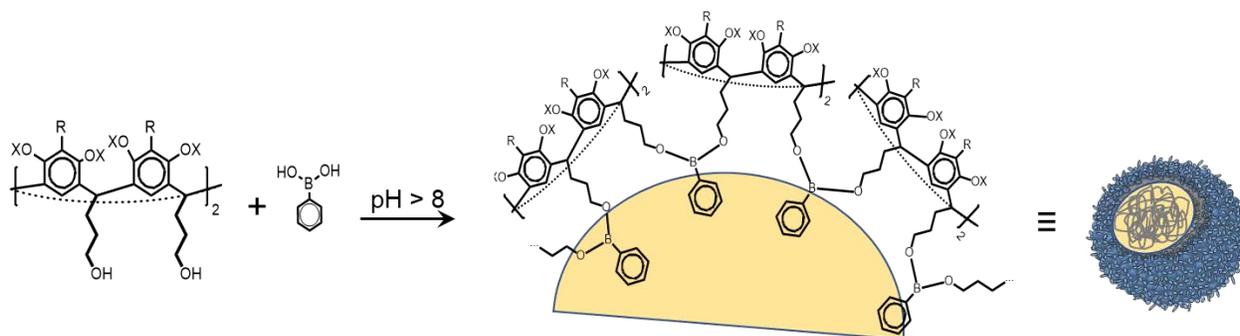


Рис. 2.2. Схематичное представление образования наноконтейнеров методом микроэмульсионной полимеризации сшиванием резорцинаренов фенол боронатными связями.

2.1. Супрамолекулярные и полимерные наноконтейнеры

Обзор научной литературы показал, что наиболее исследованными и разработанными являются наноконтейнеры на основе ПАВ, формирование которых основано на межмолекулярных взаимодействиях. Такие системы применяют как в доставке лекарственных средств, так и в качестве молекулярной подложки для стабилизации неорганических субстратов (наночастиц металлов, оксидов, сульфидов и т.д.). Их синтез прост в исполнении: нередко для формирования наноконтейнеров достаточно всего лишь растворить ПАВ в воде. В качестве основного недостатка контейнеров на основе ПАВ следует отметить их малую стабильность и неконтролируемый выход субстрата за счет диффузии. Полимерные наноконтейнеры, полученные ковалентным связыванием строительных блоков, более стабильны и прочнее удерживают субстраты. При этом их структура более жесткая и хуже адаптируется под окружающую среду. Каждый из типов наноконтейнеров (супрамолекулярный и полимерный) имеет свои достоинства и недостатки. В ходе исследования необходимо учитывать их особенности и выбирать наиболее подходящий для решения той или иной задачи.

В данной подглаве исследованы супрамолекулярные и полимерные наноконтейнеры на основе карбоксилатных производных резорцинарена. В работе проведено сравнение их

инклюзивных характеристик по отношению к субстратам различной гидрофобности. На их основе созданы гибридные наноконпозиты с наночастицами серебра и сопоставлена их каталитическая активность в реакции восстановления п-нитрофенола. Для создания супрамолекулярных наноконтейнеров использовали амфифильные карбоксилатные производные резорцинарена с децильными ($C_{10}H_{21}RA$) и деценильными ($C_{10}H_{19}RA$) группами на нижнем ободе (Рис. 2.3). Для создания полимерных наноконтейнеров применяли производное с пропиольными группами по нижнему ободу (C_3H_6OH-RA) (Рис. 2.3).

Синтез резорцинаренов производили в три стадии. На первой стадии реакцией конденсации резорцина с альдегидами получили резорцинарены [185 - 187]. На второй стадии реакцией нуклеофильного замещения получили эфиры резорцинаренов. На третьей стадии щелочным гидролизом выделили натриевые соли октакарбоксилатных производных резорцинаренов. Структура соединений доказана комплексом физико-химических методов. Спектральные характеристики представлены на Рис. S1 – Рис. S3 в приложении.

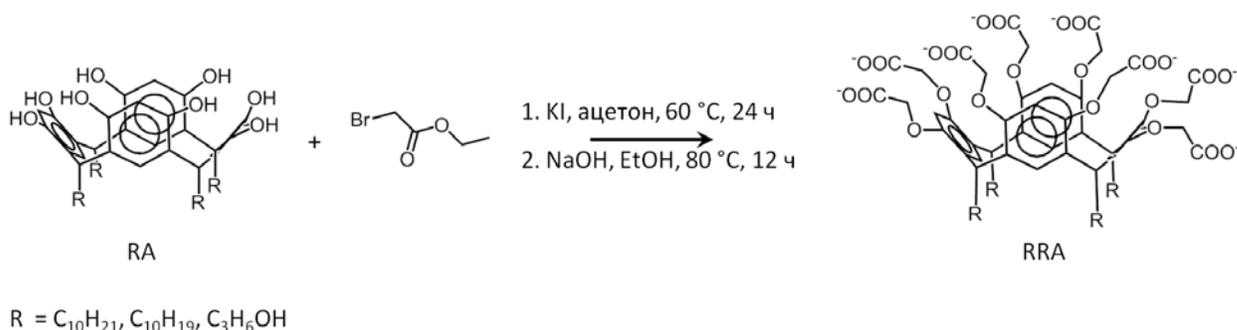


Рис. 2.3. Схема синтеза резорцинаренов $C_{10}H_{21}RA$, $C_{10}H_{19}RA$ и C_3H_6OH-RA .

$C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$ обладают амфифильными свойствами. Этому способствует наличие в структуре резорцинаренов отрицательно заряженного гидрофильного верхнего обода с восьмью карбоксилатными группами и объемной гидрофобной части, состоящей из длинных углеводородных радикалов и четырех ароматических колец. В структуре $C_{10}H_{19}RA$ также имеются концевые неопределенные связи на нижнем ободе, влияющие на его агрегационные свойства. При растворении в воде $C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$ агрегируют в супрамолекулярные структуры. При агрегации изменяется электропроводность растворов, что проявляется в появлении точки излома в прямой зависимости электропроводности от концентрации (Рис. 2.4(A)). Точка излома соответствует критической концентрации агрегации (ККА). Согласно данным электропроводности ККА для $C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$ практически не различаются и равны 0,54 мМ и 0,64 мМ, соответственно.

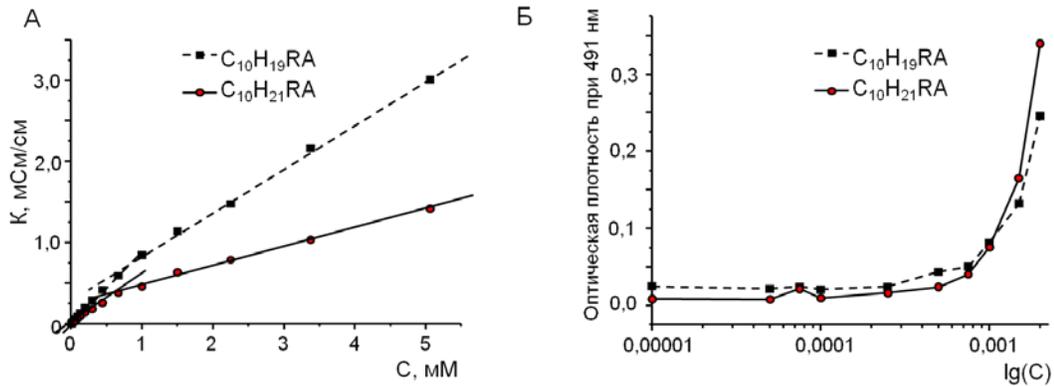


Рис. 2.4. (А) Изменение электропроводности растворов $C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$ в зависимости от концентрации, $C(RRA) = 0,01 \div 5$ мМ, H_2O , 25 °С; (Б) Изменение оптической плотности растворов Orange OT при 491 нм в зависимости от концентрации RRA, $C(RRA) = 0,01 \div 5$ мМ, H_2O .

Образование гидрофобной полости в результате агрегации подтверждается солубилизацией нерастворимых в воде субстратов. Одним из таких субстратов является Orange OT (1-(*o*-толилазо)-2-нафтол). Солубилизация красителя детектировалась по значению оптической плотности раствора красителя при 491 нм. Результаты показали, что Orange OT незначительно растворяется в присутствии резорцинаренов $C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$ при концентрации ниже ККА (Рис. 2.4(Б)). При увеличении концентрации $C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$ выше ККА растворимость Orange OT значительно возрастает.

Резорцинарен C_3H_6OH-RA использовали для создания полимерных наноконтейнеров. Синтез проводили в фосфатном буфере (ФБ) методом микроэмульсионной полимеризации по типу «масло в воде» с использованием фенилбороновой кислоты (ВА) в качестве сшивателя пропиольных хвостов резорцинаренов (Рис. 2.5).

Получены два типа полимерных наноконтейнеров: наносфера ($p(C_3H_6OH-B-OI)$) и нанокапсула ($p(C_3H_6OH-B-St)$), отличающиеся между собой наличием и отсутствием органического ядра, соответственно. Для создания полимерной наносферы с органическим ядром сшивку C_3H_6OH-RA и ВА выполняли при температуре, не превышающей 37 °С, а в качестве органической фазы использовали триолеин (OI). После выдерживания микроэмульсии в течение трех дней, частицы диализировали и промывали ацетоном. Выход составил около 67 % от суммы исходных компонентов (C_3H_6OH-RA , ВА и OI).

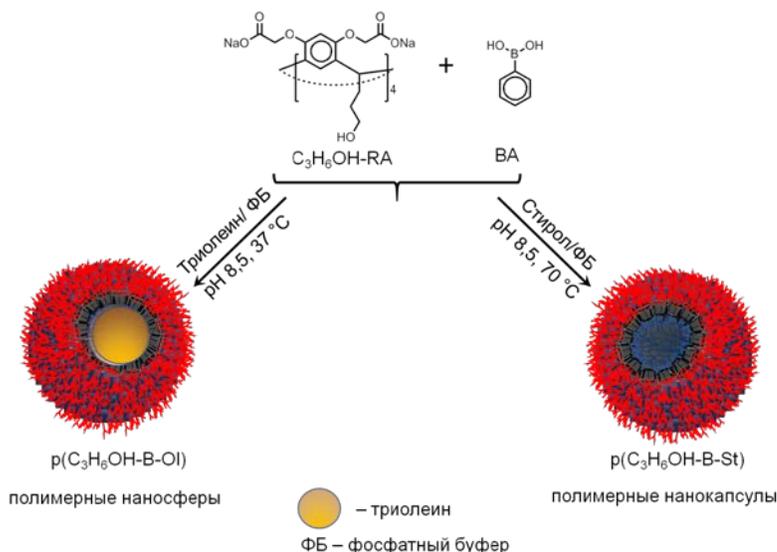


Рис. 2.5. Схема получения $\text{p(C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI)}$ и $\text{p(C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St)}$.

Для получения нанокапсулы реакцию проводили при 70°C , а в качестве дисперсной фазы использовали стирол (St) (Рис. 2.5). По окончании реакции смесь охлаждали до комнатной температуры, очищали диализом, избыток органической фазы, состоящей из полимеризованного стирола, удаляли многократной промывкой ацетоном. Выход равен 22% от суммы исходных компонентов ($\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}$, BA и стирол). Гораздо меньший выход полимерных капсул, а также данные ЯМР спектроскопии и элементного анализа показывают получение полимерных нанокапсул, в которых полистирол содержится в остаточном количестве, в отличие от триолеина в случае полимерных наносфер.

Причиной образования полимерных наноконтейнеров различной структуры при использовании стирола и триолеина является разница в температуре, при которой проводились реакции. Полимерную капсулу получали при 70°C . После охлаждения до комнатной температуры частицы сжимаются, что приводит к изменению их размера и образованию пор в структуре оболочки [181,188]. Полистирольные цепочки легко вымываются при обработке ацетоном через лабильную оболочку наноконтейнера с образованием капсульной структуры без ядра $\text{p(C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St)}$. Полимерные сферы получали при 37°C . При такой небольшой разнице с комнатной температурой после охлаждения образуется более жесткая оболочка и масло не может выйти из плотной полимерной оболочки. Использование триолеина при повышенной температуре не привело к успеху из-за образования полидисперсных полимерных частиц, плохо растворимых в воде.

По данным ПЭМ, размер наносферы $\text{p(C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI)}$ составляет 135 ± 20 нм (Рис. 2.6(A)). При этом гидродинамический диаметр, полученный по методу динамического светорассеяния (ДСР),

равен 255 ± 20 нм (Рис. 2.6(В)). Молекулярная масса рассчитана из графика Дебая, полученного методом статического светорассеяния (ССР). Молекулярная масса составляет 3770 ± 116 кДа (Рис. 2.6(Г)).

На изображении ПЭМ полимерных нанокapsул $p(C_3H_6OH-B-St)$ присутствуют наночастицы размером 45 ± 10 нм, которые находятся в агрегатах диаметром около 140 нм (Рис. 2.6(Б)). Согласно данным ДСР, в растворе наночастиц присутствуют агрегаты с гидродинамическим диаметром около 60 и 400 нм. Гидродинамический диаметр 60 нм соответствует отдельным частицам, а 400 нм – это гидродинамический диаметр агрегатов частиц. Молекулярная масса $p(C_3H_6OH-B-St)$, определенная из данных ССР, составляет 220 ± 30 кДа (Рис. 2.6(В,Г)).

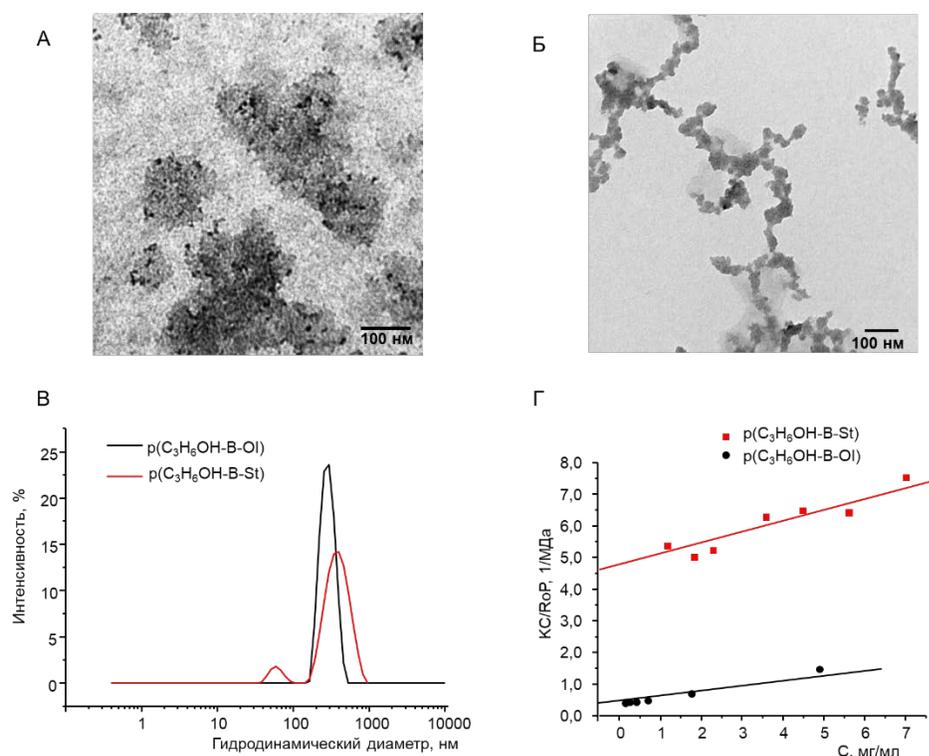


Рис. 2.6. Изображения ПЭМ для (А) $p(C_3H_6OH-B-OI)$ и (Б) $p(C_3H_6OH-B-St)$; (В) графики распределения гидродинамического радиуса для $p(C_3H_6OH-B-St)$ и $p(C_3H_6OH-B-OI)$; (Г) графики Дебая для $p(C_3H_6OH-B-St)$ и $p(C_3H_6OH-B-OI)$.

На ИК-спектре $p(C_3H_6OH-B-St)$ и $p(C_3H_6OH-B-OI)$ присутствуют полосы валентных колебаний связей О—Н в области $3300-3500$ cm^{-1} , связей С—Н в области $3000-2800$ cm^{-1} , полосы симметричных и асимметричных колебаний карбоксилатных групп при 1611 и 1425 cm^{-1} . В области $1400-1500$ cm^{-1} проявляются полосы валентных колебаний ароматического кольца. В области $950-850$ cm^{-1} проявляются полосы деформационных колебаний С—Н ароматического кольца и полосы

деформационных колебаний связанных О—Н связей при $700\text{--}600\text{ см}^{-1}$ (Рис. S4 см. в приложении). На ^1H ЯМР спектре $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$ и $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ наблюдаются сигналы $\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}$, ВА, стирола и триолеина (Рис. S5 см. в приложении). Кроме того, в области 4,1 м.д. имеется пик, относящийся к протону метиленовой группы при эфирной группе между гидроксильными группами $\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}$ и фенолбороновой кислотой, что подтверждает наличие в структуре полимерных наноконтейнеров боронатных связей. На ^{13}C ЯМР спектрах полимерных наноконтейнеров также наблюдаются сигналы отдельных компонентов наноконтейнеров $\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}$, ВА, стирола и триолеина (Рис. S6 см. в приложении).

Полимерные и супрамолекулярные структуры использованы в качестве контейнеров для связывания субстратов различной гидрофильности – родамина Б (RhB) и флуоресцеина (Fl) (Рис. 2.7). Оба субстрата имеют сходное строение, но у RhB в структуре имеются две аминогруппы, которые положительно заряжены в водной среде, что значительно увеличивает его растворимость в водной среде. RhB и Fl обладают объемной структурой и из-за стерических факторов не могут связываться в гидрофобную полость резорцинарена. Положительно заряженный RhB способен связываться по верхнему ободу резорцинарена через взаимодействие с предорганизованными карбоксилатными группами. Связывание обоих субстратов легко наблюдать по УФ-видимым и флуоресцентным спектрам.

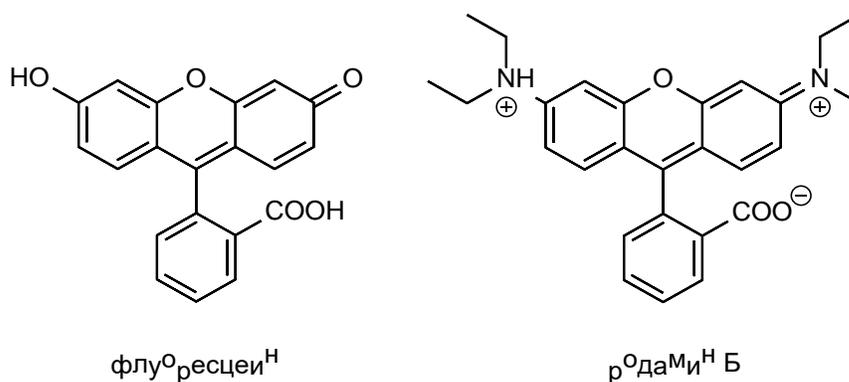


Рис. 2.7. Структура флуоресцеина и родамина Б.

Для биологического применения необходимо использование низких концентраций наноконтейнеров для уменьшения их влияния на биологические системы и возникновения побочных эффектов. Часто введение субстратов способствует агрегации ПАВ и уменьшению значения ККА [189]. Для исследования связывания красителей использовали две концентрации супрамолекулярных резорцинаренов: до ККА – 0,17 мг/мл (1 мМ) и после ККА – 1,7 мг/мл (0,1 мМ). Для этого растворы $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{RA}$ и $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$ концентрацией 1,7 мг/мл перемешивали в течение 24 часов

при температуре 70 °С в водном растворе красителей (10 мМ). Затем провели диализ наноконтейнеров концентрацией 1,7 и 0,17 мг/мл для удаления несвязанного красителя, и таким образом, получили супрамолекулярные наноконтейнеры с красителем (Dye@C₁₀H₂₁RA и Dye@C₁₀H₁₉RA, где Dye – RhB или Fl).

Связывание красителя полимерными наноконтейнерами p(C₃H₆ОН-B-St) и p(C₃H₆ОН-B-Ol) производилась аналогично. В водном растворе красителей в течение 24 часов при температуре 70 °С перемешивали наночастицы p(C₃H₆ОН-B-St) (и p(C₃H₆ОН-B-Ol)), в которых суммарная концентрация C₃H₆ОН-RA и ВА составляло 1,4 мг/мл, что эквивалентно 1 мМ супрамолекулярных красителей. После трехдневного диализа полученных растворов исходного раствора и разбавленного в 10 раз, выделили полимерные наноконтейнеры с красителем: Dye@p(C₃H₆ОН-B-St) и Dye@p(C₃H₆ОН-B-Ol). Количество связанного красителя определяли по данным УФ-видимой спектроскопии.

Флуоресцеин является амфифильным красителем, у которого преобладают гидрофобные свойства. В УФ-видимом спектре красителя в органической среде наблюдается интенсивная полоса поглощения при 490 нм. В водной среде спектр поглощения флуоресцеина зависит от pH среды. При нейтральном pH у красителя проявляются полосы поглощения при 450 и 470 нм слабой интенсивности. Результаты показали, что Fl связывается как супрамолекулярными наноконтейнерами, так и полимерными – нанокapsулами и наносферами. Емкость связывания (LC%) супрамолекулярными структурами невелика и равна 1,4 и 1,6 % при использовании концентраций ниже ККА для C₁₀H₁₉RA и C₁₀H₂₁RA, соответственно (Таблица 2.1). В УФ-видимом спектре Fl@C₁₀H₁₉RA до ККА наблюдается максимум поглощения при 490 нм. Вид спектра свидетельствует о преимущественном расположении Fl в гидрофобной области супрамолекулярных агрегатов резорцинарена. На УФ-видимом спектре Fl@C₁₀H₂₁RA до ККА проявляется максимумы поглощения красителя при 450 и 470 нм, что характерно для УФ-спектра красителя в водной среде. По-видимому, Fl способствует ассоциации C₁₀H₁₉RA, внедряясь в неполярную часть супрамолекулярного контейнера, в то время как взаимодействие с C₁₀H₂₁RA происходит по верхнему ободу резорцинарена. При концентрации выше ККА LC% возрастает до 1,8 % и 2 % (для C₁₀H₁₉RA и C₁₀H₂₁RA, соответственно). Для обоих наноконтейнеров наблюдается связывание Fl преимущественно в гидрофобной полости (Рис. 2.8).

Для молекулярных наносфер p(C₃H₆ОН-B-Ol) емкость связывания больше и равна 4,0 и 4,5 % как при низкой концентрации наносферы, так и при ее десятикратном увеличении. Очевидно, что структура наносферы является благоприятной для связывания гидрофобных субстратов. Fl

инкапсулируется в гидрофобное ядро, что проявляется в появлении характерной полосы поглощения при 490 нм (Рис. 2.8).

Емкость связывания для полимерных нанокapsул $p(C_3H_6OH-B-St)$ не превышает 1,9 % и сравнима с емкостью супрамолекулярных наноконтейнеров. Вероятно, отсутствие гидрофобного ядра не выгодно для связывания FI.

Таблица 2.1. Емкость связывания полимерных и супрамолекулярных наноконтейнеров по отношению к FI и RhB до и после ККА. *

	До ККА		После ККА	
	LC%, FI	LC%, RhB	LC%, FI	LC%, RhB
$C_{10}H_{19}RA$	1,4	0,3	1,8	7,7
$C_{10}H_{21}RA$	1,6	0,3	2,0	6,5
$p(C_3H_6OH-B-OI)$	4,0	0,7	4,3	16,4
$p(C_3H_6OH-B-St)$	1,4	7,5	1,9	22,5

* Ошибка определения, связанная с точностью используемого метода, составляет 5 %.

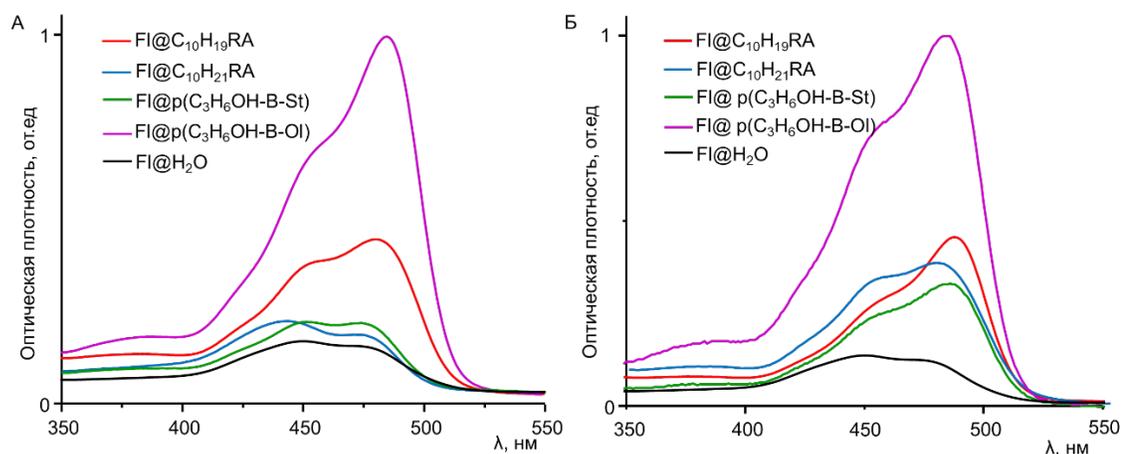


Рис. 2.8. УФ-видимые спектры растворов $FI@C_{10}H_{21}RA$, $FI@C_{10}H_{19}RA$, $FI@p(C_3H_6OH-B-St)$, $FI@p(C_3H_6OH-B-OI)$ и $FI@H_2O$ при концентрациях до ККА (А) и при концентрациях выше ККА (Б).

Поведение наноструктур меняется при использовании гидрофильного родамина Б. При низких концентрациях (0,14 мг/мл) полимерные нанокapsулы показали высокую емкость связывания – 7,5 %. Однако при этом и полимерные наносферы, и супрамолекулярные контейнеры практически не связывают RhB и их емкость связывания в данных случаях ниже одного процентов (Рис. 2.9).

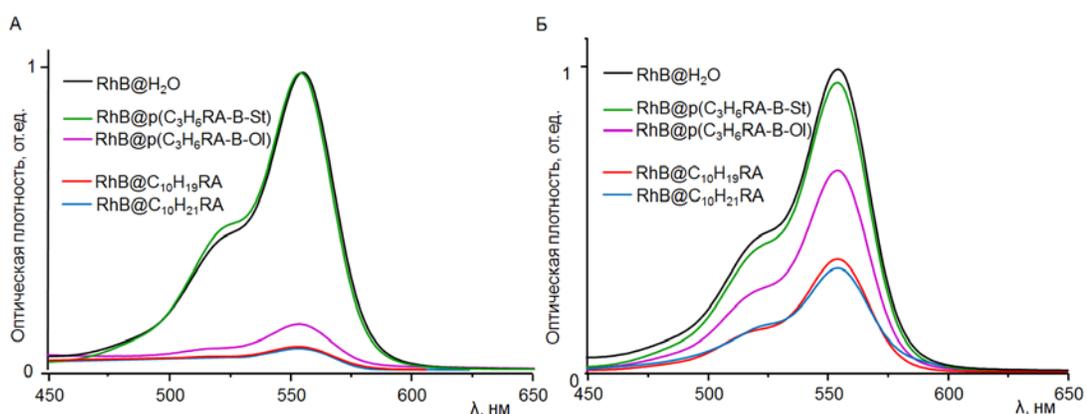


Рис. 2.9. УФ-видимые спектры растворов RhB@C₁₀H₂₁RA, RhB@C₁₀H₁₉RA, RhB@p(C₃H₆OH-B-St), RhB@p(C₃H₆OH-B-OI) и RhB@H₂O при концентрациях до ККА (А) и при концентрациях выше ККА (Б).

При увеличении концентрации наноконтейнеров в десять раз значительно увеличивается емкость связывания и достигает 7,7 и 6,5 % для супрамолекулярных наноконтейнеров C₁₀H₁₉RA и C₁₀H₂₁RA, соответственно, и 16,4 % в случае полимерных наносфер. При использовании полимерных нанокапсул емкость равно 22,5 %. По-видимому, положительно заряженный родамин Б связывается по поверхности наноконтейнеров посредством координации по карбоксилатным группам за счет электростатического взаимодействия. При этом большая локализация отрицательного заряда на поверхности полимерных наноконтейнеров увеличивает связывающую способность этого типа частиц по сравнению с супрамолекулярными наноконтейнерами.

Таким образом полученные результаты показали, что при высоких концентрациях как полимерные, так и супрамолекулярные наноконтейнеры являются эффективными системами для связывания субстратов. После трех дней диализа наблюдается высокая емкость связывания красителей. Супрамолекулярные наноконтейнеры и полимерные наносферы инкапсулируют флуоресцеин в неполярной области, а гидрофильный родамин Б по поверхности. При низких концентрациях эффективными оказались полимерные наноконтейнеры. Наносферы предпочтительно инкапсулируют гидрофобный субстрат в органическое ядро, а нанокапсулы – гидрофильный родамин Б.

2.2. Наноконкомпозиты на основе карбоксилатных наноконтейнеров и наночастиц серебра

Супрамолекулярные и полимерные наноконтейнеры использовали для создания каталитически активных наноконкомпозитов на основе наночастиц серебра. Наночастицы получали

химическим восстановлением нитрата серебра в присутствии стабилизирующих агентов: амфифильных резорцинаренов и полимерных наноконтейнеров.

Для получения супрамолекулярных нанокомпозитов $\text{Ag}@C_{10}H_{21}RA$ и $\text{Ag}@C_{10}H_{19}RA$ смешивали водный раствор $C_{10}H_{21}RA$ или $C_{10}H_{19}RA$ (0,025 мМ) с десятикратным избытком нитрата серебра (0,25 мМ), и затем добавляли восстановитель боргидрид натрия в двадцатикратном избытке (5 мМ). В результате реакции образуются стабильные в воде коллоидные структуры наночастиц серебра желтого цвета (Рис. 2.10). Растворы диализовали три дня для удаления исходных реагентов. Выход металлического серебра, согласно данным атомно-эмиссионной спектроскопии, составил 72-73 % (Таблица 2.2). При использовании деценильного резорцинарена формируются наночастицы серебра со средним размером 19 ± 6 нм, а в случае децильного – средний размер образующихся наночастиц серебра меньше и составляет 15 ± 5 нм (Рис. 2.11(А,Б)). На УФ спектре водных растворов частиц наблюдается полоса локализованного плазмонного резонанса при 420 нм (Рис. 2.11(В)).

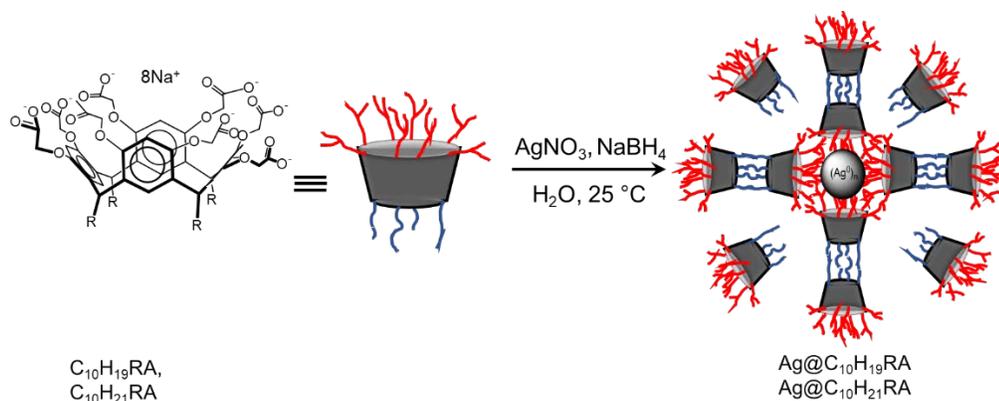


Рис. 2.10. Создание гибридных нанокомпозитов $\text{Ag}@RRA$.

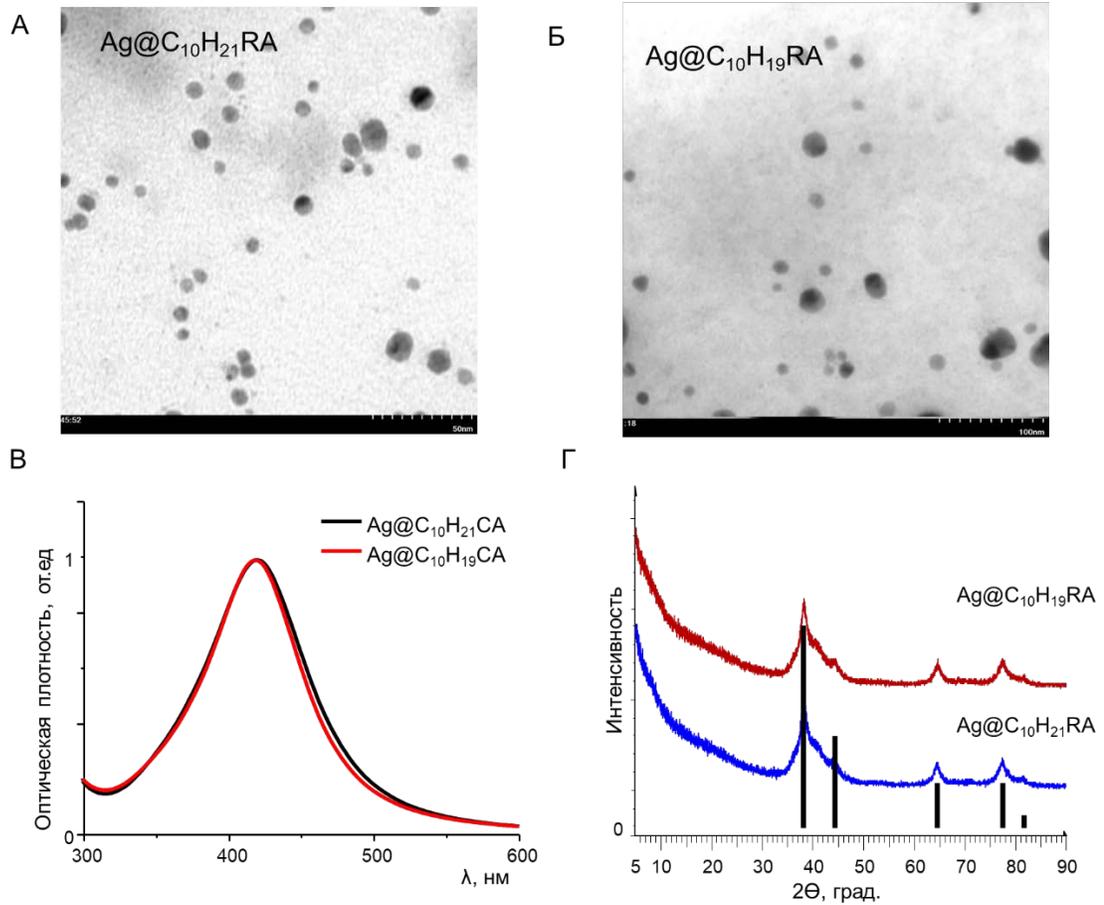


Рис. 2.11. Изображения ПЭМ для (А) $\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{21}\text{RA}$ и (Б) $\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$; (В) УФ спектры $\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{21}\text{RA}$ и $\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$, $C(\text{RRA}) = 0,025$ мМ, $C(\text{Ag}^0) = 0,25$ мМ, H_2O , 25 °С; (Г) порошковые дифрактограммы для $\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{21}\text{RA}$ (синяя) и $\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$ (красная).

Таблица 2.2. Данные атомно-эмиссионной спектроскопии для нанокмозитов с наночастицами серебра.

	$C(\text{Ag})_{\text{теор.}}$, мг/л	$C(\text{Ag})_{\text{практ.}}$, мг/л	Выход, %
$\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{21}\text{RA}$	8,99	6,49	72
$\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$	8,99	6,57	73
$\text{Ag@p}(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$	12,4	7,96	64
$\text{Ag@p}(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$	12,4	8,05	65
Ag@FcRA	8,99	6,51	72

Образование наноразмерных серебра подтверждены данными рентгенодифракционных исследований. Нанокристаллиты серебра имеют кубическую форму с размером от 4,1 до 6,9 нм по разным кристаллографическим граням. Содержание металлического серебра в структурах

варьируется от 54 до 65 %. $C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$ в наночастицах находится в аморфной разупорядоченной форме. (Рис. 2.11(Г), Таблица 2.3).

Таблица 2.3. Размеры кристаллитов серебра, рассчитанные из параметров пиков, для $Ag@C_{10}H_{19}RA$ и $Ag@C_{10}H_{21}RA$.

	Индексы	111	200	220	311	222
	Миллера пика					
$Ag@C_{10}H_{19}RA$	угол 2θ , °	38.240(9)	44.29(3)	64.63(1)	77.58(2)	81.37(5)
	CrySizeG (нм)	6.2(2)	4.5(2)	6.2(2)	4.6(1)	6.9(6)
$Ag@C_{10}H_{21}RA$	угол 2θ , °	38.22(1)	44.28(4)	64.66(1)	77.59(2)	81.18(5)
	CrySizeG (нм)	5.6(2)	3.9(2)	6.2(2)	5.4(1)	6.6(7)

Сравнение ИК-спектров свободных резорцинаренов и нанокомпозитов позволяют установить строение стабилизирующей оболочки. На ИК-спектре $Ag@C_{10}H_{21}RA$ и $Ag@C_{10}H_{19}RA$ наблюдается смещение полос симметричных и асимметричных валентных колебаний карбоксилатных групп на 10 см^{-1} в сторону меньших частот (Рис. S7 см. в приложении). Кроме того, наблюдается усиление интенсивности полос колебаний карбоксилатных групп относительно полос колебаний других функциональных групп. Эти данные свидетельствуют о взаимодействии карбоксилатных групп с поверхностью наночастиц серебра. Отрицательный дзета-потенциал доказывает расположение на поверхности нанокомпозитов отрицательно заряженных карбоксилатных групп (Рис. 2.12). Таким образом, можно предположить следующее строение нанокомпозитов: в ядре наносистем находятся наночастицы серебра, которые окружены стабилизирующей оболочкой, состоящей из би- или полислюев резорцинарена, при этом часть карбоксилатных групп находится в непосредственном контакте с поверхностью наночастиц, а другая часть находится на поверхности гибридных систем, взаимодействуя с гидрофильным окружением и тем самым стабилизируя систему в воде.

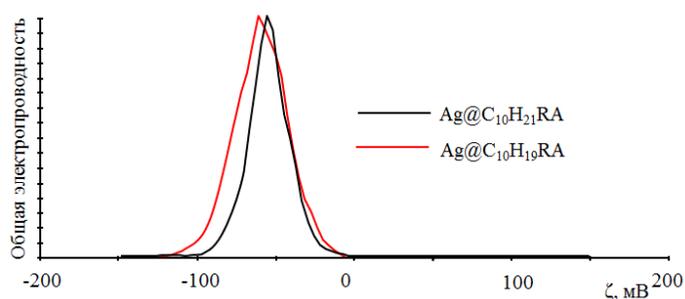


Рис. 2.12. Распределение дзета-потенциала в системах $\text{Ag}@C_{10}H_{21}RA$ и $\text{Ag}@C_{10}H_{19}RA$.

Для получения металлических наноконпозитов на основе полимерных наночастиц нитрат серебра (1 мМ) восстанавливали аскорбиновой кислотой (5 мМ) в присутствии полимерных наночастиц (0,14 мг/мл). В результате реакции образуются кинетически нестабильные коллоидные растворы наночастиц серебра черного цвета, которые осаждаются в течение недели. Выход наночастиц серебра, определенный из данных атомно-эмиссионной спектроскопии, равен 53-65 %. Изображения ПЭМ показывают, что кластеры наночастиц серебра стабилизированы внутри полимерных наноконтейнеров (Рис. 2.13(А,Б)). При этом внутри одного контейнера могут находиться один или несколько наночастиц серебра. Размер наночастиц, инкапсулированных в структуру полимерной нанокапсулы ($\text{Ag}@p(C_3H_6OH-B-St)$), согласно ПЭМ, составляет 60 ± 15 нм, а в случае полимерной наносферы ($\text{Ag}@p(C_3H_6OH-B-OI)$) – 65 ± 10 нм. На УФ-видимом спектре коллоидных наночастиц наблюдается уширенная полоса поглощения низкой интенсивности при 350-550 нм (Рис. 2.13(В)). Рентгеноструктурный анализ подтверждает образование кристаллических форм наноразмерного серебра (Рис. 2.13(Г)). Размер кристаллитов составляет от 12 до 23 нм для наночастиц $\text{Ag}@p(C_3H_6OH-B-St)$ и 16–29 нм для $\text{Ag}@p(C_3H_6OH-B-OI)$ по разным кристаллографическим граням (Таблица 2.4). В спектрах энергодисперсионного анализа для образцов $\text{Ag}@p(C_3H_6OH-B-St)$ и $\text{Ag}@p(C_3H_6OH-B-OI)$ наблюдаются линии серебра, что указывает на присутствие на поверхности наноконпозитов атомов серебра. Это обстоятельство является одной из причин кинетической нестабильности наноконпозитов, помимо большого размера и массы конпозитов. (Рис. 2.13(Д,Е)).

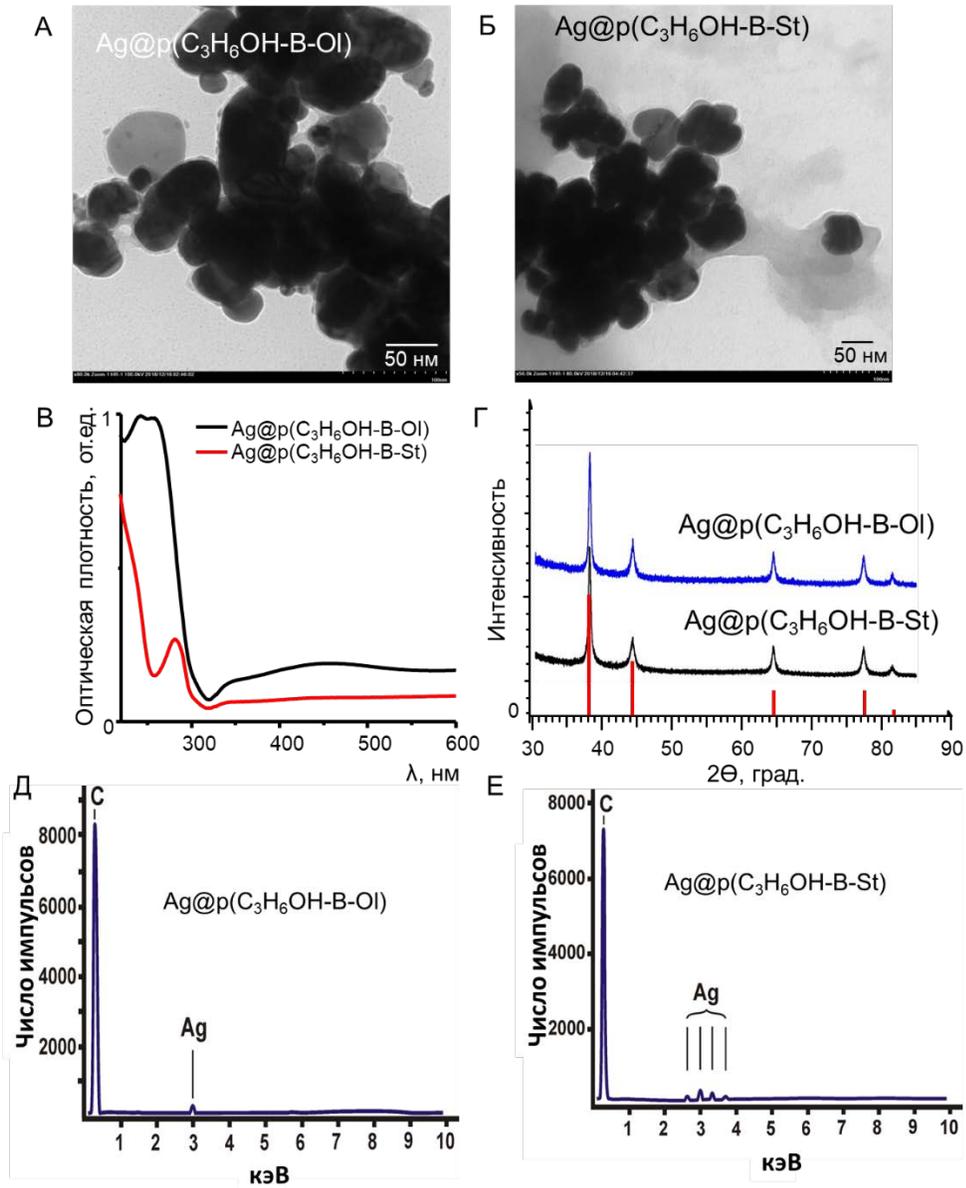


Рис. 2.13. Изображения ПЭМ для (А) $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ и (Б) $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$; (В) УФ спектры $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ и $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$, $C(p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})) = 0,72$ мг/мл, $C(p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})) = 0,24$ мг/мл, $C(\text{Ag}^0) = 1$ мМ; (Г) порошковые дифрактограммы для $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ (синяя) и $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$ (красная); спектры ЭДС для (Д) $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ и (Е) $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$.

Таблица 2.4. Размеры кристаллитов серебра, рассчитанные из параметров пиков, для Ag@p(C₃H₆OH-B-St) и Ag@p(C₃H₆OH-B-St).

	Индексы	111	200	220	311	222
	Миллера пика					
Ag@ p(C ₃ H ₆ OH-B-St)	угол 2θ, °	38.204(1)	44.332(4)	64.538(4)	77.460(3)	81.563(9)
	CrySizeL (нм)	23.4(2)	12.8(2)	17.8(3)	18.8(3)	17.1(7)
Ag@ p(C ₃ H ₆ OH-B-OI)	угол 2θ, °	38.227(1)	44.370(4)	64.549(4)	77.470(3)	81.589(8)
	CrySizeL (нм)	28.9(3)	16.2(3)	19.9(4)	20.1(4)	19.1(9)

Полученные наноконпозиты обладают каталитической активностью, которую исследовали на примере модельной реакции восстановления п-нитрофенола боргидридом натрия. Реакция не идет в отсутствии металлических наночастиц. Ход реакции легко контролируется по данным УФ-видимой спектроскопии. В УФ-спектре п-нитрофенола в щелочной среде присутствует интенсивный пик поглощения при 405 нм, который относится к фенолятной форме п-нитрофенола и уменьшается при восстановлении, что позволяет следить за процессом реакции (Рис. 2.14(A)).

Для изучения каталитической активности наноконпозитов реакция восстановления п-нитрофенола (0,1 мМ) проводилась избытком боргидрида натрия (5 мМ) в присутствии каталитического количества наночастиц серебра (13 или 14 мкМ) в воде при комнатной температуре.

На Рис. 2.14 А и Б приведены кинетические и логарифмические кривые реакции восстановления нитрофенола. Из этих данных видно, что наноконпозиты на основе супрамолекулярных и полимерных структур обладают различным каталитическим поведением. В Таблица 2.5 приведены кинетические параметры реакции восстановления п-нитрофенола как реакции псевдопервого порядка по п-нитрофенолу, так как второй реагент боргидрид натрия находится в большом избытке. Для конпозитов на основе полимерных структур Ag@p(C₃H₆OH-B-OI) и Ag@p(C₃H₆OH-B-St) наблюдается индукционный период 210 и 140 секунд, соответственно. Удельная мольная каталитическая активность составляет $1,8 \times 10^5$ и $1,2 \times 10^5$ (моль·сек)⁻¹, соответственно. Наноконпозиты на основе амфифильных резорцинаренов Ag@C₁₀H₁₉RA и Ag@C₁₀H₂₁RA обладают большей каталитической активностью. Для данных структур удельная каталитическая активность составляет $3,4 \times 10^5$ и $2,2 \times 10^5$ (моль·сек)⁻¹, соответственно. При использовании наноконпозитов на основе супрамолекулярных структур отсутствует индукционный период.

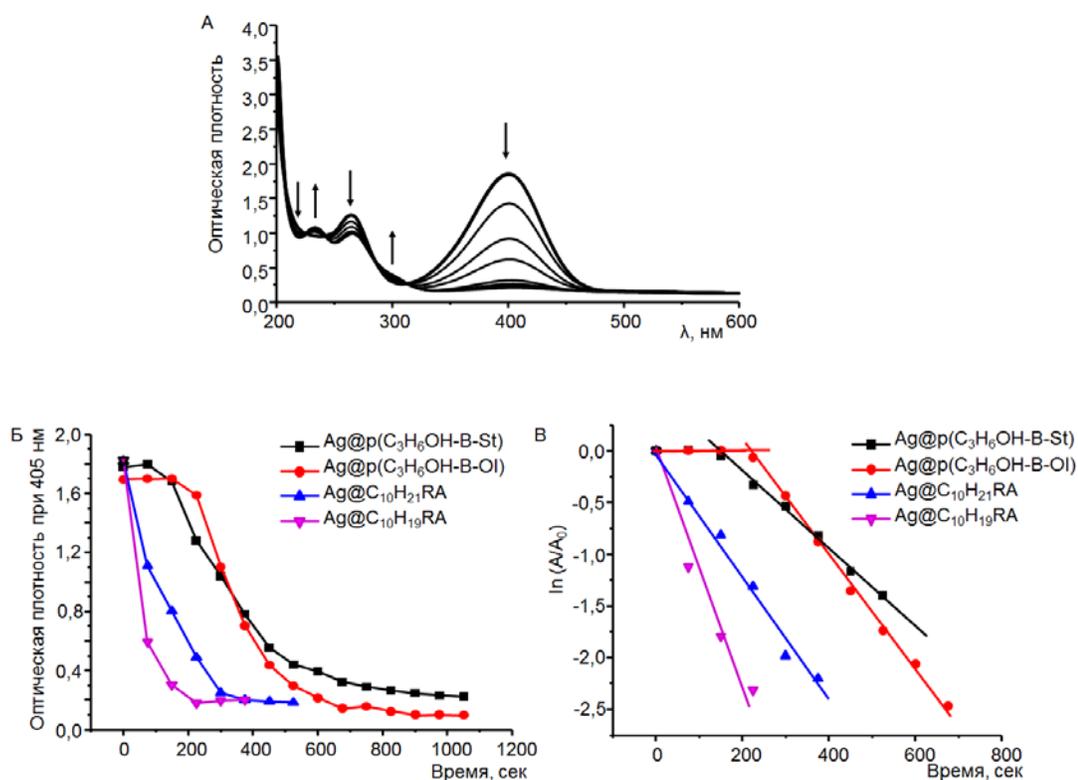


Рис. 2.14. (А) Изменение УФ-видимых спектров п-нитрофенола в реакции восстановления боргидридом натрия в присутствии металлических катализаторов; (Б) кинетические и (Б) логарифмические кривые восстановления п-нитрофенола в присутствии каталитических композитов $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-Oil})$ и $\text{Ag}@RRA$, $C(\text{п-нитрофенол}) = 0,1 \text{ мМ}$, $C(\text{NaBH}_4) = 5 \text{ мМ}$, $C(\text{Ag}^0) \approx 14 \text{ мкМ}$ для $\text{Ag}@RRA$ или 13 мкМ для $\text{Ag}@p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-Oil})$.

Таким образом результаты исследований показали, что композиты на основе супрамолекулярных контейнеров показали лучшие каталитические характеристики, по сравнению с полимерными контейнерами. Реакция восстановления в их присутствии протекает без индукционного периода, а наблюдаемая константа реакции больше, чем у композитов на основе полимерных наноконтейнеров. Различия в каталитической активности композитов главным образом связаны с проницаемостью и лабильностью стабилизирующей оболочки, а также большую роль играет размер образующихся наночастиц. Лабильностью оболочки определяется наличие индукционного периода. Супрамолекулярный стабилизирующий слой, состоящий из децильного и деценильного резорцинарена, способствует быстрому проходу п-нитрофенола к активной поверхности металлических наночастиц, на которых осуществляется реакция восстановления п-нитрофенола. Небольшая разница в наблюдаемой константе реакции вызвано наличием небольшого электростатического отталкивания между двойными связями хвоста деценильного резорцинарена,

что способствует более быстрому проникновению субстрата к поверхности металла. В случае композитов на основе полимерных наноконтейнеров наблюдается индукционный период, который намного больше в случае полимерных наносфер. Эта разница также связана с лабильностью оболочки, которая в свою очередь определяется температурой проведения реакции получения наноконтейнеров.

Таблица 2.5. Кинетические параметры реакции восстановления п-нитрофенола боргидридом натрия как реакции псевдопервого порядка в присутствии каталитических композитов Ag@p(C₃H₆OH-B-Oil) и Ag@RRA, C(п-нитрофенол) = 0,1 мМ, C(NaBH₄) = 5 мМ, C(Ag⁰) ≈ 14 мкМ для Ag@RRA или 13 мкМ для Ag@p(C₃H₆OH-B-Oil).

	Индукционный период, сек	Константа скорости реакции, сек ⁻¹	Удельная мольная каталитическая активность, моль·сек ⁻¹
Ag@p(C ₃ H ₆ OH-B-St)	140	0,0036	184 615
Ag@p(C ₃ H ₆ OH-B-Ol)	210	0,0054	276 923
Ag@C ₁₀ H ₂₁ RA	0	0,0064	304 762
Ag@C ₁₀ H ₁₉ RA	0	0,0101	480 952

2.2.1. Нанокompозит на основе ферроцен-резорцинарена и наночастиц серебра [190,191]

Использование редокс-активных поверхностно-активных веществ позволяет создавать гибридные неорганно-органические структуры без добавления дополнительных восстанавливающих реагентов. Для создания таких композитов нами был использован резорцинарен с редокс-активными ферроценовыми группами по нижнему ободу (FcRA) [192]. Ферроценовые производные благодаря их гидрофобности широко используются для создания молекулярных и надмолекулярных структур в процессах самосборки. Наличие редокс-активного ферроценового фрагмента позволяет проводить процессы восстановления ионов металлов без добавления добавочных восстановителей. Амфифильность FcRA, способность к самоорганизации в воде и хорошая растворимость позволяет использовать в качестве стабилизаторов коллоидных растворов металлических частиц (Рис. 2.15).

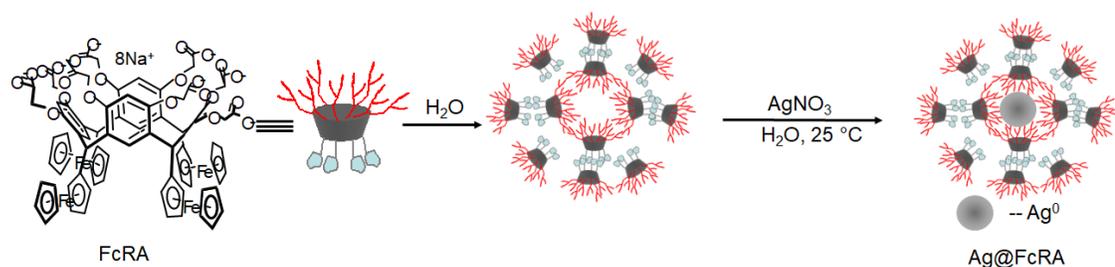


Рис. 2.15. Получение гибридных нанокомпозитов Ag@FcRA.

Для получения Ag@FcRA в воде смешивали раствор FcRA (0,025 мМ) и AgNO₃ (0,25 мМ). В результате образуется желтый раствор, УФ-видимом спектре которого присутствует полоса поверхностного плазмонного резонанса с максимумом при 440 нм, что свидетельствует об образовании наноразмерных частиц серебра. Согласно данным атомно-эмиссионной спектроскопии выход наночастиц серебра составляет 72 % (Таблица 2.2).

По данным ПЭМ, средний размер металлических частиц равен 25±7 нм (Рис. 2.16(А)). Согласно АСМ, размер агрегатов составляет 60±20 нм (Рис. 2.16(Б)). Гидродинамический диаметр совпадает с данными АСМ и равен 60 нм. По полученным данным можно сделать вывод, что в гибридной системе Ag@FcRA наночастицы Ag⁰ окружены оболочкой резорцинарена FcRA и продуктами его распада.

Рентгендифракционные исследования подтверждают образование кристаллических форм серебра. Основные интерференционные пики соответствуют кубической форме кристаллического серебра (Silver, syn., No. 01-087-0720 in the PDF database). Диффузионный характер большинства дифракционных пиков свидетельствует о наноразмерности серебряных частиц. Средние размеры кристаллитов, вычисленные по ширине интерференционных пиков, составляет 12-23 нм (Рис. 2.17).

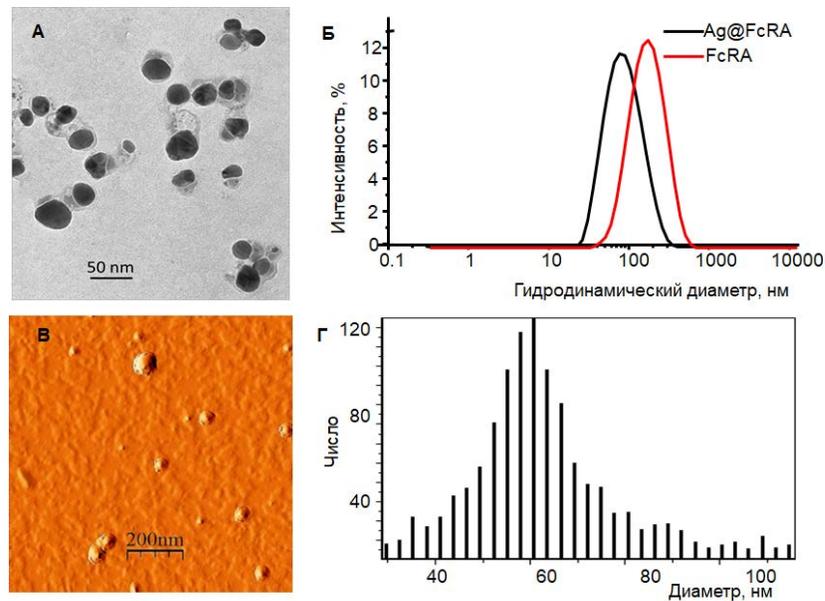


Рис. 2.16. (А) Изображение ПЭМ для Ag@FcRA; (Б) распределение гидродинамического диаметра для FcRA и Ag@FcRA; (В) изображение АСМ для Ag@FcRA и (Г) распределение частиц по размерам, определенных из данных АСМ.

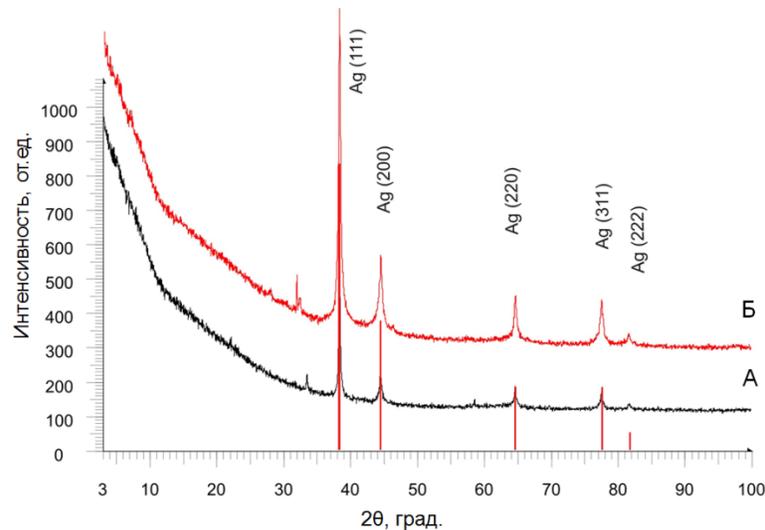


Рис. 2.17. Экспериментальные дифракционные картины (А) Ag@FcRA и (Б) Ag₃₀@FcRA без вычитания фона. Красные вертикальные линии показывают положение интерференционных пиков, соответствующих кристаллическому серебру.

Полученные коллоидные структуры стабильны в воде в течение длительного времени. Наличие большого локализованного отрицательного заряда на поверхности агрегатов является причиной их устойчивости. Дзета-потенциал Ag@FcRA составляет -57 мВ, что значительно ниже, чем у агрегатов FcRA (-47 мВ) (Рис. 2.18).

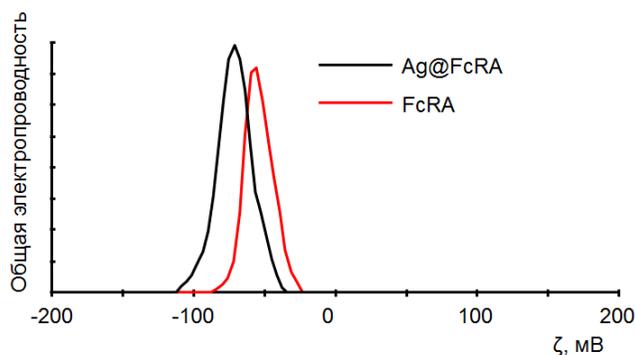


Рис. 2.18. Распределение дзета-потенциала для Ag@FcRA и FcRA.

Процесс восстановления ионов серебра ферроценовым резорцинареном происходит поэтапно (Рис. 2.19). Первоначально происходит окисление ферроценовых групп с восстановлением ионов серебра. Окисленные ферроцениловые группы распадаются в воде с образованием активных ионов Fe (II) и пентадиеновых радикалов, которые так же способны восстанавливать ионы серебра. Разрушение ферроценовых групп фиксируется по уменьшению интенсивности полосы колебания металлоценовой группы при 482 см^{-1} (Рис. S8 см. в приложении).

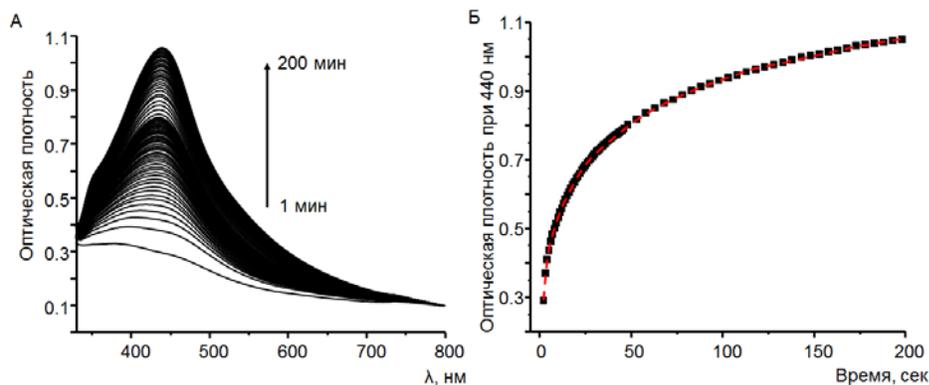


Рис. 2.19. (А) Изменение УФ спектра раствора, содержащего FcRA (0,025 мМ) и AgNO₃ (0,25 мМ) со временем; (Б) зависимость оптической плотности при 440 нм от времени.

Сохранение полосы колебания ферроценовой группы на ИК-спектре Ag@FcRA свидетельствует о наличии в составе гибридной системы непрореагировавших FcRA (Рис. S8 см. в приложении). Для определения соотношения AgNO₃ и FcRA, при котором прореагируют все ферроценовые группы, было проварьировано соотношение реагентов. Для этого был проведен синтез серебряных наночастиц с использованием $0,25 \div 2,5\text{ мМ}$ AgNO₃ и $0,025\text{ мМ}$ FcRA. Наличие максимума адсорбции при 440 нм свидетельствует об получении наночастиц серебра одинакового размера (Рис. 2.20). При соотношении нитрата серебра и ферроцен резорцинарена 20 : 1 и 30 : 1 оптическая плотность при 440 нм в два - три раза больше, чем при соотношении 10 : 1. При

использовании большего количества нитрата серебра оптическая плотность не меняется, т.е. не образуется большее количество наночастиц. Действительно, из ИК спектра $\text{Ag}_{30}\text{@FcRA}$ видно, что при данном соотношении отсутствует полоса колебания ферроценовой группы при 482 см^{-1} (Рис. S8 см. в приложении). Таким образом, при использовании соотношения AgNO_3 к FcRA 30 : 1, реагируют все ферроценовые группы, присутствующие в структуре резорцинарена. Анализ порошковых дифрактограмм показывает, что в данном случае образуются наночастицы серебра, аналогичные Ag@FcRA с размером кристаллитов около 19-33 нм.

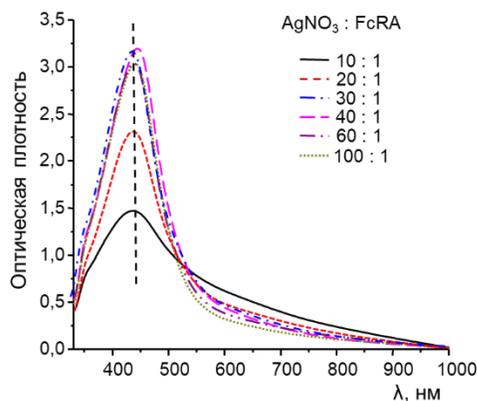


Рис. 2.20. УФ спектры наночастиц серебра, полученных при различном соотношении AgNO_3 ($C = 0,25 \div 2,5$ мМ) и FcSA ($C = 0,025$ мМ), H_2O .

Гибридный нанокompозит Ag@FcRA , подобно супрамолекулярным $\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$ и $\text{Ag@C}_{10}\text{H}_{21}\text{RA}$, показал высокую каталитическую активность в реакции восстановления п-нитрофенола. Процесс восстановления п-нитрофенола начинается сразу же, без индукционного периода, что видно на кинетической кривой реакции восстановления (Рис. 2.21). Кинетические параметры реакции, вычисленные как для реакции псевдопервого порядка по п-нитрофенолу, составили: константа скорости реакции – $0,0061\text{ сек}^{-1}$, а удельная мольная каталитическая активность – $290\,476\text{ моль} \cdot \text{сек}^{-1}$.

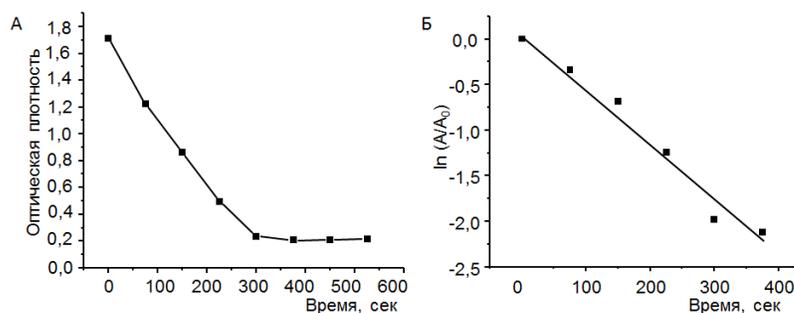


Рис. 2.21. (А) Кинетическая и (Б) логарифмическая кривые восстановления п-нитрофенола в присутствии Ag@FcRA , $C(\text{п-нитрофенол}) = 0,1$ мМ, $C(\text{NaBH}_4) = 5$ мМ, $C(\text{Ag}^0) = 14$ мкМ.

Таким образом, ферроценовый резорциарен с восьмью карбоксилатными группами по верхнему ободу использовали в качестве темплата и восстановителя в синтезе наночастиц серебра. Наночастицы серебра с окисленным резорциареном образуют нанокомпозиты с кинетической стабильностью. Полученные композиты показывают высокую каталитическую активность в реакции восстановления п-нитрофенола.

2.3. pH- и глюкоза-управляемые полимерные наноконтейнеры на основе сульфатного резорциарена SRA

Результаты предыдущей подглавы показали, что полимерные наноконтейнеры на основе производных резорциарена и фенилбороновой кислоты оказались малоэффективными для иммобилизации и стабилизации металлических наночастиц для катализа, но эффективными в связывании гидрофильных и гидрофобных органических субстратов. Боронатная связь между резорциаренами является динамической. Она обратимо диссоциирует при уменьшении pH, а также вступает в реакции конкурентного замещения с 1,2- и 1,3-диолами. Поэтому полимерные наноконтейнеры на основе боронатов перспективны для связывания и управляемой доставки лекарственных веществ.

Для создания pH- и глюкоза-управляемых полимерных наноконтейнеров был использован амфифильный резорциарен с сульфатными группами на верхнем ободу и гидроксильными группами на нижнем ободу (SRA). SRA синтезировали в две стадии. На первой стадии конденсацией резорцина и 2,3-дигидрофурана получили пропиол резорциарен (Рис. 2.22) [187]. На второй стадии верхний обод резорциарена функционализировали метилсульфонатными группами [193].

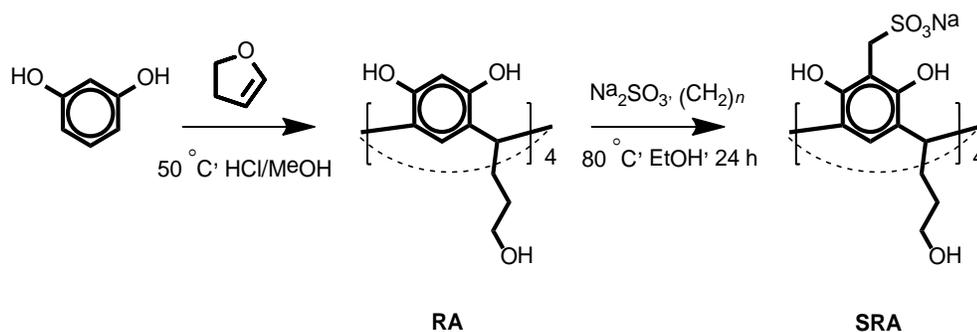


Рис. 2.22. Схема синтеза резорциарена SRA.

SRA хорошо растворяется в воде. В его структуре имеются гидрофильные и гидрофобные области, что позволяет использовать его в качестве эмульгатора в микроэмульсиях.

2.3.1. pH-чувствительный полимерный наноконтейнер p(SRA-B) [194]

Синтез pH-управляемого наноконтейнера проводили аналогично синтезу полимерных нанокапсул, описанных в подглаве 2.1 (Рис. 2.23).

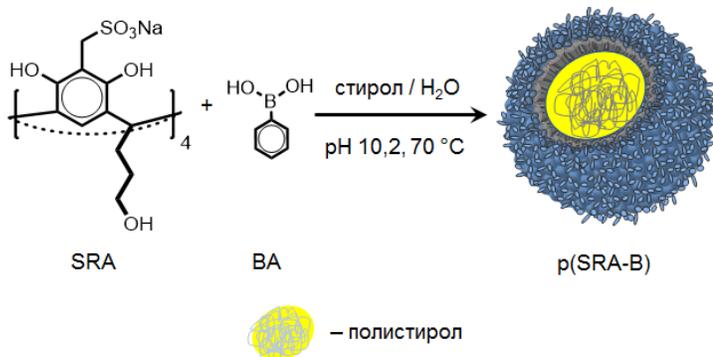


Рис. 2.23. Схема получения p(SRA-B).

В качестве дисперсной фазы использовали стирол (St), а водный раствор карбоната калия (pH 10.2) – в качестве дисперсионной среды. SRA и BA располагаются на границе раздела фаз. Сульфонатные группы резорцинарена направлены в водную среду, а хвосты и BA – в гидрофобную фазу. При выдерживании микроэмульсии при 70 °C между SRA и BA образуются боронатные связи, что приводит к формированию полимерных наночастиц (Рис. 2.2). Концентрации используемых SRA и BA были 2.5 мМ и 5 мМ, соответственно, а объем стирола варьировали от 0,5 до 3 об.%.

Данные ДСП показали, что размер и дисперсность наночастиц зависят от объема используемого стирола. Согласно данным при использовании 2,5 об.% St образуются наиболее монодисперсные наноконтейнеры с гидродинамическим радиусом около 200 нм и индексом полидисперсности 0,23 (Таблица 2.6, Рис. 2.24). Во всех дальнейших экспериментах использовали такое соотношение фаз для получения наноконтейнера (p(SRA-B)). Наночастицы очищали диализом, а после удаления растворителя промывали ацетоном. Выход составил 66 % от суммы исходных SRA, BA и St.

Таблица 2.6. Средний гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности полимерных наночастиц, полученных взаимодействием SRA и BA в микроэмульсионной среде с различным содержанием дисперсной фазы (стирола), $C(\text{SRA}) = 1 \text{ мМ}$, $C(\text{BA}) = 2 \text{ мМ}$, H_2O , $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Стирол, об.%	Гидродинамический диаметр, нм	Индекс полидисперсности
0,5	162 ± 3	0,34
1,0	171 ± 16	0,26
1,5	168 ± 6	0,38
2,0	158 ± 14	0,30
2,5	195 ± 5	0,23
3,0	205 ± 43	0,39

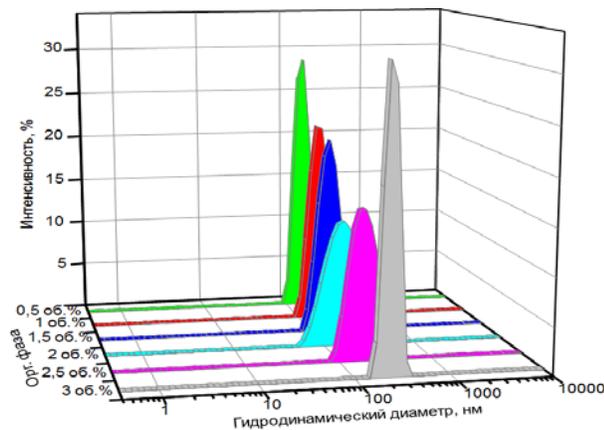


Рис. 2.24. График распределения гидродинамического диаметра для систем SRA-BA-St с различным содержанием стирола.

Диаметр $r(\text{SRA-B})$, по данным атомно-силовой микроскопии (АСМ), составляет $130 \pm 20 \text{ нм}$ (Рис. 2.25(А)). Его гидродинамический диаметр чуть выше, и равен $195 \pm 5 \text{ нм}$ (ДСР, Рис. 2.25(Б)). Молекулярная масса, вычислена из графика Дебая, полученного из ССР данных, составляет около $1600 \pm 90 \text{ кДа}$ (Рис. 2.25(В)).

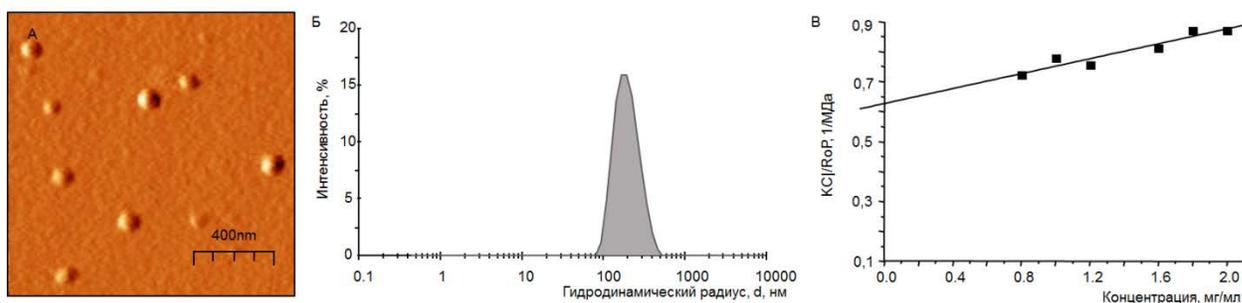


Рис. 2.25. Для p(SRA-B): (А) АСМ изображение; (Б) график распределения гидродинамического диаметра, $C(p(SRA-B)) = 0,14$ мг/мл; (В) график Дебая, полученные методом ССР, $C(p(SRA-B)) = 0,8 \div 2,0$ мг/мл, H_2O .

На ИК-спектре p(SRA-B) наблюдается полоса колебания связи В—О при 1365 см^{-1} , что подтверждает образование боронатной эфирной связи (Рис. S9 см. в приложении). На спектрах также регистрируются полосы валентных колебаний связи О—Н в области $3300\text{--}3500\text{ см}^{-1}$, связи С—Н при $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ и валентных колебаний ароматического кольца при $1525\text{--}1475\text{ см}^{-1}$ и полосы деформационных колебаний С—С и С—Н связей при $1191, 1048$ и 533 см^{-1} . В области 1040 см^{-1} проявляется полоса колебаний сульфонатной группы. На спектрах 1H и ^{13}C ЯМР полимерных наноконтейнеров p(SRA-B) присутствуют сигналы SRA, BA и полистирола (Рис. S10 и Рис. S11 см. в приложении). Интегралы протонных сигналов на спектре 1H ЯМР при 1,0–4,5 м.д. указывают, что в p(SRA-B) на один фрагмент SRA содержится один мономерный фрагмент полистирола, то есть содержание фракции полистирола составляет 11 мас. %.

p(SRA-B) устойчив в водной среде благодаря наличию отрицательно заряженной поверхности, образованной сульфонатными группами. Дзета-потенциал наночастиц p(SRA-B) составляет -50 мВ.

Боронатная эфирная связь является обратимой и распадается в кислой среде. Кислотно-основные характеристики полимерных наноконтейнеров p(SRA-B) изучены методом УФ-видимой спектроскопии (Рис. 2.26). На спектре резорцинарена SRA не наблюдаются значительные изменения при изменении pH от 2 до 6 (Рис. 2.26(A,B)). При дальнейшем увеличении pH от 6,5 до 12 на УФ-видимом спектре SRA начинаются изменения, связанные с депротонированием гидроксильных групп верхнего обода резорцинарена. С увеличением pH исчезает полоса поглощения при 286 нм, соответствующая резорциновым фрагментам SRA, и появляются новые полосы поглощения при 305 и 352 нм, характерные для депротонированных фенолятных ионов [195]. Константы депротонирования pK_a SRA, сосчитанные по изменению в адсорбции в УФ спектре при увеличении pH от 2 до 12 с помощью программы по анализу и моделированию кривых титрования [196], намного

меньше аналогичных значений для свободного резорцина, что связано с образованием внутримолекулярных водородных связей между гидроксильными группами (Таблица 2.7) [197,198]. В отличие от SRA, в УФ-видимых спектрах р(SRA-B) изменения начинаются при рН 3 и первая точка перегиба на кривой рН-метрического титрования соответствует рН 4,9 (Рис. 2.26(Б,Г)). Этот переход соответствует диссоциации сложноэфирной боронатной связи (pK_{diss}). При этом значения констант депротонирования гидроксильных групп pK_a р(SRA-B) выше значений для SRA. Повышенная концентрация отрицательного заряда на поверхности наноконтейнеров препятствует диссоциации гидроксильных групп. Таким образом, данные кислотно-основного титрования показывают, что р(SRA-B) стабильны в основной и нейтральной среде ($pH = 6-12$), при котором происходит только депротонизация гидроксильных групп верхнего обода. При дальнейшем понижении рН с 6 до 3 происходит диссоциация боронатных связей и разрушение р(SRA-B).

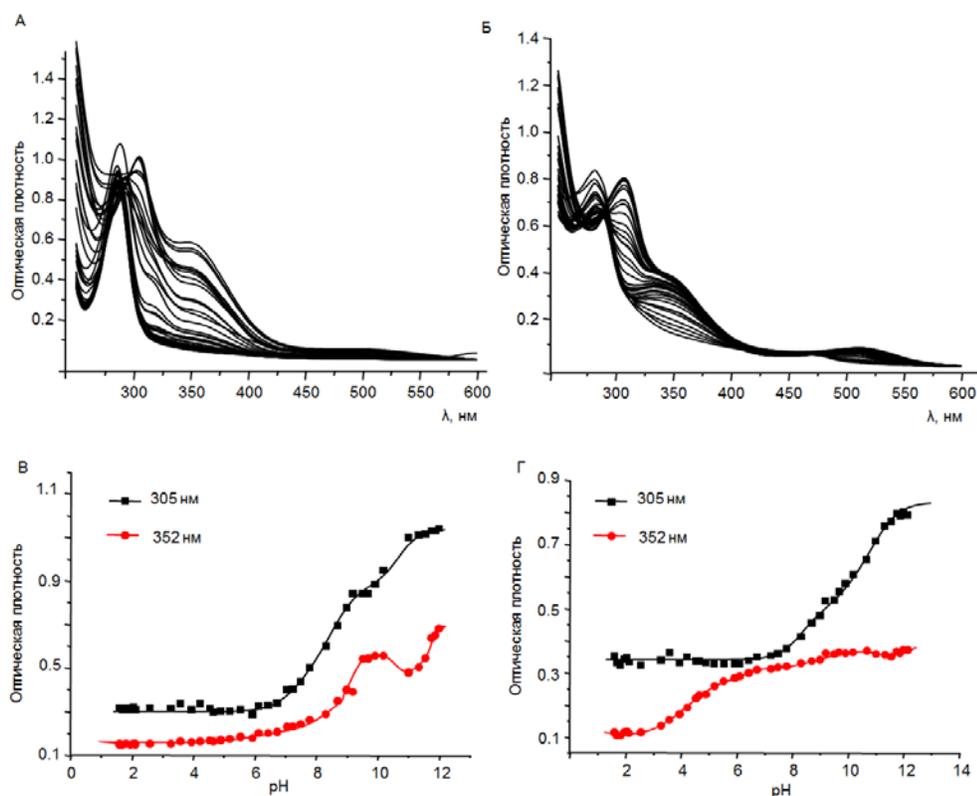


Рис. 2.26. Изменение УФ-видимых спектров (А,В) SRA (0,1 мМ) и (Б,Г) р(SRA-B) (0,14 мг/мл) при изменении рН. Внутри графиков: зависимость оптической плотности от рН при 305 и 352 нм для SRA и р(SRA-B).

Таблица 2.7. Значения pK_a ступенчатого депротонирования SRA (0,1 мМ) и $p(SRA-B)$ (0,14 мг/мл) и $pK_{дисс. p(SRA-B)}$, определенные из данных pH титрования (универсальный буферный раствор, 25 °C).

	$pK_{дисс.}$	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}
резорцин [195]	-	9,2	10,9	-	-
SRA	-	7,2	8,7	11	11,4
$p(SRA-B)$	4,9	8,2	10,0	11,1	12,2

Боронатные эфирные связи динамичные и обратимые [199]. При взаимодействии с 1,2-цис и 1,3-диолами боронатные связи переэтерифицируются с образованием стабильных пяти- и шестичленных колец [200]. К таким диолам относится глюкоза (Glu), которая может вытеснять спиртовые фрагменты с образованием эфира глюкозы и бороновой кислоты. Действительно, согласно данным ДСР, при в присутствии 0,4 мМ Glu, что соответствует двукратному мольному избытку Glu по отношению к SRA, индекс полидисперсности возрастает с 0,23 до 0,47, а на графике распределения гидродинамического радиуса появляются пики в диапазоне от 40 до 1000 нм, что свидетельствует о распаде полимерных контейнеров вследствие диссоциации боронатных связей (Рис. 2.27).

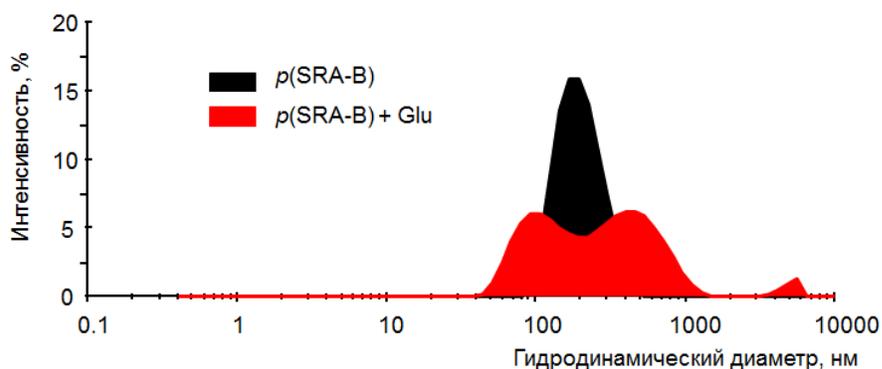


Рис. 2.27. График распределения гидродинамического диаметра $p(SRA-B)$ до и после добавления глюкозы (Glu), $C(p(SRA-B)) = 0,28$ мг/мл, $C(Glu) = 0,4$ мМ, H_2O .

$p(SRA-B)$ был использован в качестве наноконтейнера для хранения и pH и глюкоза контролируемого высвобождения субстрата. В качестве субстрата использованы три красителя (Dye): пирен (Py), флуоресцеин (Fl) и пирен-1,3,6,8-тетрасульффоната натрия (PTS). Эти красители отличаются между собой полярностью и применяются в качестве зондов для определения

полярности среды [201]. Расположение красителей в наноконтейнере, а также контроль выхода из полости наноконтейнера осуществляли методом флуоресцентной спектроскопии.

Синтез наноконтейнеров с флуоресцентными красителями ($\text{Dye}@p(\text{SRA-B})$) проводился аналогично вышеописанному с использованием 5 мМ водных растворов красителей в качестве дисперсионной среды. После синтеза реакционной смесь диализировали в течение трех дней для удаления неинкапсулированного Dye и непрореагировавших мономеров (Рис. 2.28). Эффективность связывания ($EE\%$), определенная из данных УФ-спектроскопии, для PTS и FI достигает 10 %. Для Ru точное определение количества инкапсулированного красителя невозможно из-за склонности Ru к агрегации и плохой растворимости в воде.

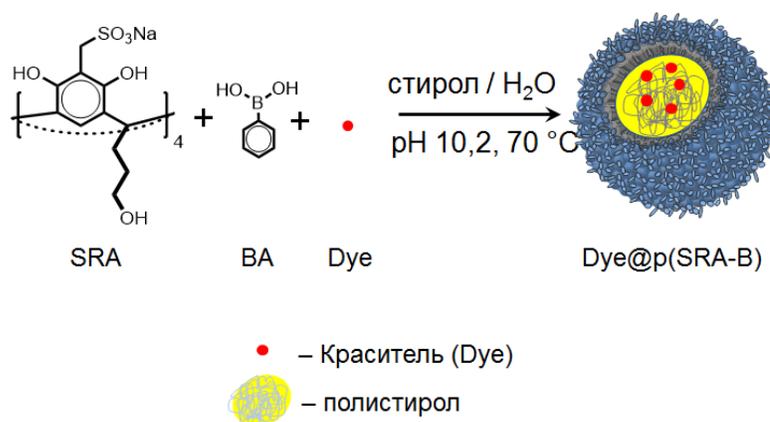


Рис. 2.28. Схема получение $\text{Dye}@p(\text{SRA-B})$.

Для $\text{FI}@p(\text{SRA-B})$ наблюдается батохромный сдвиг полос поглощения и флуоресценции, что подтверждает расположение FI в органической фазе (Рис. 2.29(A)) [202, 203]. $\text{Ru}@p(\text{SRA-B})$ демонстрирует батохромный сдвиг полосы поглощения относительно свободного Ru (Рис. 2.29(Б)). В спектре флуоресценции $\text{Ru}@p(\text{SRA-B})$ уменьшение интенсивности первой полосы при 375 нм по сравнению с второй и третьей полосами испускания при 395 и 420 нм также демонстрирует гидрофобное окружение красителя [204,205]. Аналогичная картина наблюдается для $\text{PTS}@p(\text{SRA-B})$ (Рис. 2.29(В)). Соотношение интенсивностей первого и третьего полос испускания при 387 и 425 нм, соответственно, для $\text{PTS}@p(\text{SRA-B})$ значительно ниже по сравнению со свободным PTS [206]. Присутствие свободного SRA не оказывает значительного влияния на оптические характеристики красителей. Спектры красителей практически не изменяются в присутствии 10-кратного избытка SRA (Рис. 2.30). Таким образом, анализ УФ- и флуоресцентных спектров $\text{Dye}@p(\text{SRA-B})$ показал, что все изменения спектральных характеристик флуоресцентных красителей, инкапсулированных в

структуру полимерных наноконтейнеров, связаны с их расположением в органической полистирольной среде (Рис. 2.29).

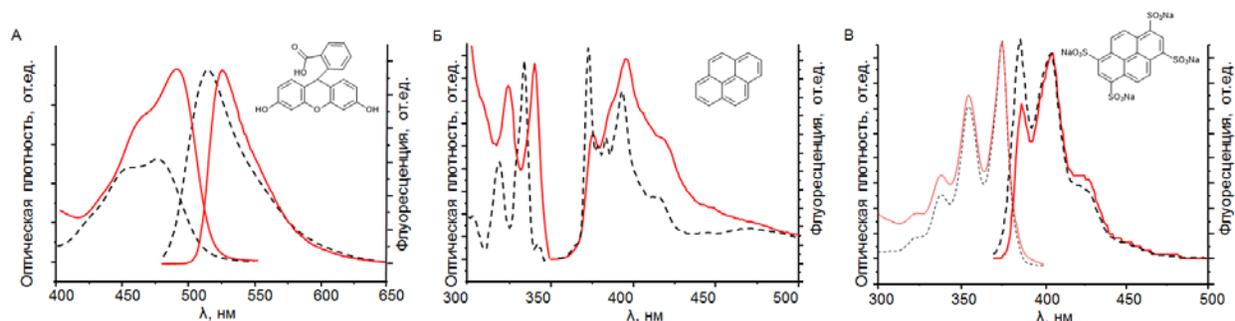


Рис. 2.29. Спектры поглощения и флуоресценции Dye@p(SRA-B) (красные сплошные линии) и свободного Dye (черные пунктирные линии), где Dye - (A) FI, (Б) Py и (B) PTS, $C(p(SRA-B)) = 0,27$ мг/мл, $C(Dye_{своб.}) = 0,01$ мМ, H_2O .

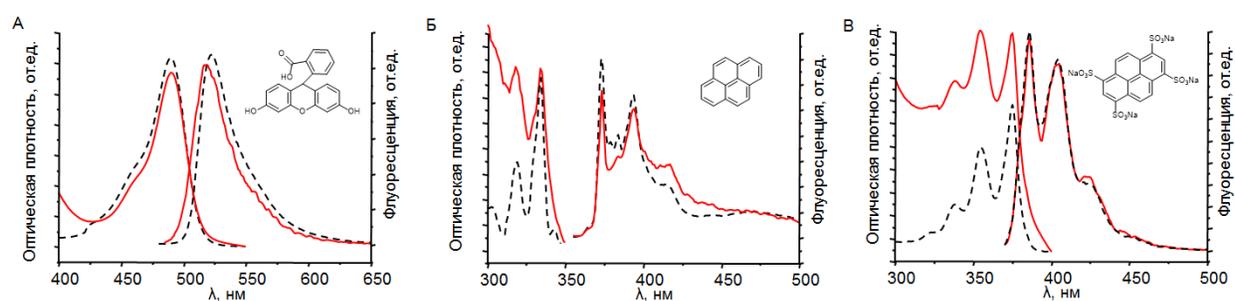


Рис. 2.30. Спектры поглощения и флуоресценции (A) FI, (Б) Py и (B) PTS в отсутствии (черные пунктирные линии) и в присутствии (красные сплошные линии) SRA, $C(Dye) = 0,01$ мМ, $C(SRA) = 0,1$ мМ, H_2O .

Растворы Dye@p(SRA-B) стабильны в воде в течение длительного времени. Однако при подкислении до pH 3,0 происходит распад боронатных связей и p(SRA-B) диссоциирует с высвобождением субстрата в водную среду (Рис. 2.31). Спектры флуоресценции PTS@p(SRA-B) значительно не меняются при уменьшении pH с 9 до 5. При дальнейшем уменьшении pH до 3 интенсивность флуоресценции PTS@p(SRA-B) увеличивается. Кроме того, увеличение интенсивности первого пика флуоресценции PTS при 375 нм подтверждает выход красителя из органической среды в воду (Рис. 2.32(A)). Для Py@p(SRA-B) наблюдается увеличение интенсивности излучения, что подтверждает разрушение носителя. При этом форма спектра испускания для Py практически не меняется, что связано с природой красителя (Рис. 2.32(Б)). Гидрофобный Py после разрушения наноконтейнера остается в органической части образующихся ассоциатов. Растворы FI@p(SRA-B) также чувствительны к изменению pH (Рис. 2.32(В)). FI является

pH-чувствительным флуоресцентным красителем. При переходе от щелочной среды к кислой меняется и интенсивность флуоресценции, и форма флуоресцентного спектра. То же самое наблюдается и в случае FI@p(SRA-B). При pH 5 уменьшается интенсивность флуоресценции FI@p(SRA-B). При дальнейшем уменьшении pH до 3 наблюдается увеличение пика флуоресценции и гипсохромный сдвиг, связанный с переходом красителя из органической фазы в водную.

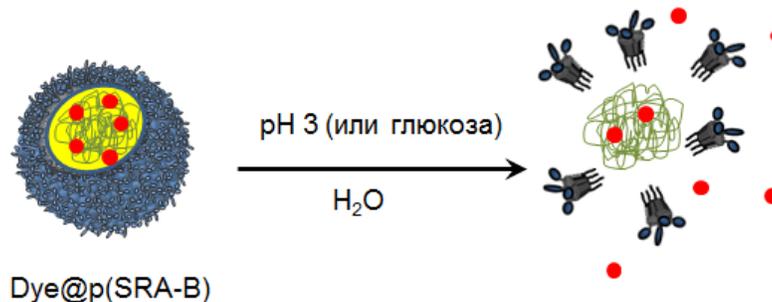


Рис. 2.31. Разрушение Dye@p(SRA-B) с последующим высвобождением субстрата при pH 3 и в присутствии глюкозы.

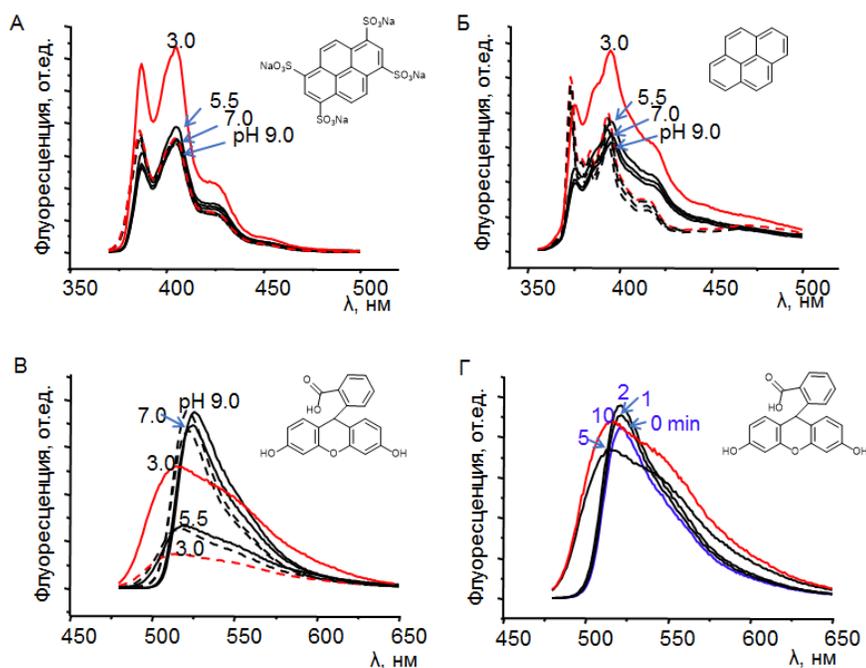


Рис. 2.32. Изменение спектров флуоресценции (А) PTS@p(SRA-B), (Б) Py@p(SRA-B), (В) FI@p(SRA-B) при уменьшении pH от 9,0 до 3,0, $C(\text{Dye@p(SRA-B)}) = 0,27$ мг/мл, универсальный буферный раствор с pH 9,0, 7,0, 5,5 и 3,0; (Г) Изменение спектра флуоресценции FI@p(SRA-B) после добавления 10 мМ Glu с течением времени, $C(\text{Dye@p(SRA-B)}) = 0,27$ мг/мл, $C(\text{Glu}) = 0,4$ мМ, H_2O .

Для количественного определения выхода Dye (Dye – Fl, PTS), в течение трех часов проводили диализ растворов Dye@p(SRA-B) с pH 3,0. Количество вышедшего в диализат красителя определяли по данным УФ-спектроскопии. При pH 3 Dye@p(SRA-B) распадается с выделением 45 ± 2 % инкапсулированного Dye.

Добавление двукратного избытка глюкозы также вызывает диссоциацию наноконтейнера. При добавлении глюкозы в раствор Fl@p(SRA-B) наблюдается небольшое увеличение интенсивности флуоресценции в первые две минуты. Через 5-10 минут происходит гипсохромный сдвиг полосы испускания и уменьшение интенсивности флуоресценции (Рис. 2.32(Г)). Для определения количественного выхода был проведен диализ Dye@p(SRA-B) (Dye – F1) после добавления 0,4 мМ глюкозы. В течение трех часов диализа высвобождается до 100 % инкапсулированного красителя.

Таким образом, получены pH-чувствительные полимерные наноконтейнеры на основе сульфонатного резорцинарена SRA и фенилбороновой кислоты BA. Данные наноконтейнеры могут быть использованы для хранения и pH- и глюкоза контролируемого высвобождения гидрофильных и гидрофобных субстратов.

2.3.2. Глюкоза чувствительные полимерные наноконтейнеры на основе сульфонатного резорцинарена и фенилбороновой кислоты [207,208]

Чувствительность полученного полимерного наноконтейнера к цис-диолам позволяет использовать их для глюкоза управляемого высвобождения лекарственного субстрата. Резорцинарен SRA использовали для создания глюкоза-чувствительного полимерного наноконтейнера для управляемого высвобождения инсулина. Стирол относится к ядам общетоксического действия и обладает раздражающим, мутагенным и канцерогенным действием [209]. Хроническая интоксикация стиролом поражает центральную и периферическую нервную системы, системы кроветворения и пищеварительный тракт. Токсичность полистирола вызвана наличием в его составе остаточного количества неполимеризованных мономеров стирола. Использование токсичного ядра ограничивает применение вышеописанных полимерных наноконтейнеров в качестве носителей лекарственных веществ.

Для создания нетоксичных полимерных наночастиц на основе SRA использовали биосовместимый триолеат глицерина (триолеин). Синтез осуществляли в микроэмульсионной среде, подобно p(SRA-B).

Для определения оптимального соотношения SRA и ВА в наноконтейнере для хранения и высвобождения инсулина провели их синтез в присутствии инсулина при различном соотношении реагентов ((Рис. 2.33, Таблица 2.8). Применяли следующую процедуру: 0,5 мл раствора инсулина (3,47 мг/мл) гомогенизировали с 50 μ л триолеина до получения однородной системы. После этого растворитель удаляли при пониженном давлении при температуре 37 °С. К нему добавляли раствор SRA и ВА в 2 мл ФБ с рН 8,5. Раствор перемешивали в течение 10 сек на вортексе при скорости 3500 оборотов в минуту для создания микроэмульсии, затем обрабатывали ультразвуком и продували аргоном в течение 90 минут для гомогенизации и стабилизации микроэмульсии. Микроэмульсию нагревали при перемешивании при 37 °С в течение 3 дней. Для определения количества неинкапсулированного инсулина после прохождения реакции реакцию смесь диализировали в течение 3 часов. Растворитель диализата отгоняли при пониженном давлении. Количество неинкапсулированного инсулина определяли по интенсивности сигналов инсулина в ^1H ЯМР спектре диализата. К диализируемым растворам, разбавленным в десять раз, добавляли глюкозу Glu различной концентрации (5, 7,5 и 10 мМ). Полученные смеси термостатировали при 37 °С в течение 40 минут. После смеси вновь диализировали в течение 3 часов. После отгонки растворителя и анализа ^1H ЯМР спектров определяли количество вышедшего инсулина.

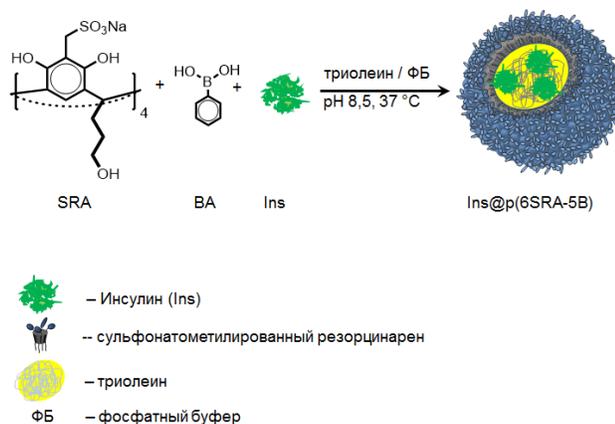


Рис. 2.33. Схема получения наноконтейнеров с инкапсулированным инсулином.

При использовании 2,5 мМ ВА в зависимости от концентрации SRA инкапсулируется до 52 % исходного инсулина. Однако при добавлении уже 5 мМ глюкозы к растворам наночастиц высвобождается практически весь инкапсулированный инсулин (Таблица 2.8). Таким образом, при использовании такого количества ВА, образуются наноконтейнеры, с высокой чувствительностью к глюкозе. При данных условиях распад наноконтейнеров происходит уже в присутствии 5 мМ глюкозы, что является физиологической нормальной концентрацией.

Для создания менее чувствительных к концентрации глюкозы структур концентрация ВА была увеличена до 5 мМ. Низкие концентрации SRA (1,25 и 2,5 мМ) недостаточны для стабилизации микроэмульсий и удерживания субстрата внутри наноконтейнеров. В данном случае эффективность связывания субстрата составляет лишь 18 и 25 %, соответственно. При увеличении концентрации SRA до 4 и 5 мМ эффективность связывания достигает до 63 %, но при добавлении 5 мМ глюкозы высвобождается до 20 % связанного субстрата. Увеличение концентрации SRA до 30 мМ приводит к уменьшению эффективности связывания инсулина (Таблица 2.8).

Наиболее оптимальными концентрациями SRA и ВА для создания глюкоза чувствительных наноконтейнеров для доставки инсулина являются 6 мМ и 5 мМ, соответственно (р(6SRA-5B)). В данном случае удерживается до 72 % инсулина, а при добавлении 5 мМ глюкозы выходит лишь 7 % инкапсулированного инсулина (Таблица 2.8). В дальнейшем это соотношение использовалось в качестве рабочей концентрации (Рис. 2.33).

Таблица 2.8. Получение наноконтейнеров с инкапсулированным инсулином и его выход в присутствии глюкозы, $C(\text{инсулин}) = 1.75 \text{ мг/мл}$, $V(\text{триолеин}) = 50 \text{ }\mu\text{л}$, $V(\text{ФБ}) = 2 \text{ мл}$, $\text{pH} = 8.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.*

C(SRA) (мМ)	C(ВА) (мМ)	Эффективность связывания, EE%	Емкость связывания, LC%	Выход инсулина в присутствии глюкозы		
				5 мМ	7,5 мМ	10 мМ
5	2,5	25	3,5	92	не определялся	
10	2,5	47	3,4	> 95	не определялся	
12,5	2,5	50	2,9	> 95	не определялся	
30	2,5	52	1,3	> 95	не определялся	
1,25	5	18	7,5	не определялся		
2,5	5	42	10,2	82	100	100
4	5	60	9,7	14	28	100
5	5	63	8,4	20	42	100
6	5	76	8,5	7	21	100
30	5	34	0,8	89	91	100

* Ошибка определения, связанная с точностью используемого метода, составляет 5 %.

Для характеристики наноконтейнера р(6SRA-5B) получили без инкапсулированного инсулина. Раствор SRA (6 мМ) и ВА (5 мМ) в фосфатном буферном растворе (рН 8,4) гомогенизировали с триолеином, и затем перемешивали в течение 3 дней при 37 °С. После диализа и частичного удаления органической фазы многократной отмывкой ацетоном выделили р(6SRA-5B) с выходом 20,7 г, что составляет 34 % от суммы реагентов. По данным элементного анализа в составе р(6SRA-5B) доля серы составляет 7,25 %, что соответствует содержанию SRA в р(6SRA-5B) около 73%.

Размер р(6SRA-5B), согласно данным ПЭМ, составляет 120 ± 10 нм (Рис. 2.34(А)). Гидродинамический диаметр, определенный методом ДСР равен 140 ± 8 нм (Рис. 2.34(Б)). Молекулярная масса, определенная из данных ССР, составляет 1450 ± 200 кДа (Рис. 2.34(В)). Отрицательное значение дзета-потенциала -91 мВ подтверждает расположение сульфонатных групп на поверхности наноконтейнера и коллоидную стабильность р(6SRA-5B) в воде.

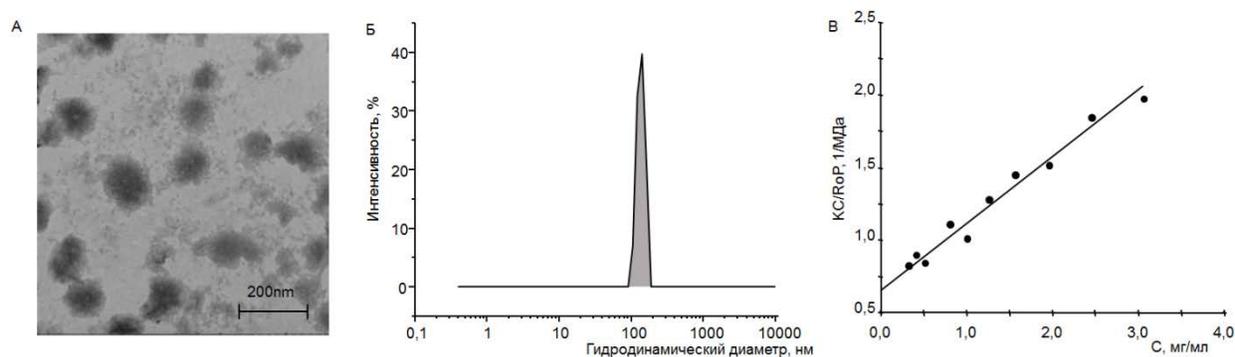


Рис. 2.34. Для р(6SRA-5B): (А) Изображение ПЭМ; (Б) график распределения гидродинамического диаметра, $C(\text{p}(6\text{SRA-5B})) = 2$ мг/мл, H_2O ; (В) график Дебая, полученный методом SLS, $C(\text{p}(6\text{SRA-5B})) = 0,4 \div 3,0$ мг/мл.

На ИК спектре р(6SRA-5B) наблюдаются полосы валентных колебаний связей С—Н при $3000\text{--}2800$ cm^{-1} , связей С—О при 1610 cm^{-1} , валентных колебаний ароматического кольца при 1540 cm^{-1} , а также полосы деформационных колебаний связей С—С и С—Н при 1190 , 1040 и 530 cm^{-1} (Рис. S12 см. в приложении). Слабоинтенсивная полоса колебания связи В—О при 1365 cm^{-1} подтверждает образование эфирной боронатной связи между SRA и ВА и соответственно, успешный синтез р(6SRA-5B). Исчезновение полосы деформационного колебания связи О—Н, связанной с алифатическим радикалом при 900 cm^{-1} , также подтверждает образование боронатной связи. На ^1H ЯМР спектре р(6SRA-5B) наблюдаются уширенные сигналы ароматических и алифатических сигналов SRA, ВА и небольшого количества триолеина (Рис. S13 см. в приложении). Как показано

на примере $p(\text{SRA-B})$, $pK_{\text{дисс}}$ сложноэфирной боронатной связи, 4,9, поэтому $p(6\text{SRA-5B})$ стабилен в нейтральной среде и разрушается только при понижении pH до 5.

$p(6\text{SRA-5B})$ практически нетоксичен по отношению к клеткам крови (Таблица 2.9). Гемолитическая активность, определённая как степень разрушения эритроцитов крови человека, не превышает 14 % в диапазоне концентраций 0,3-0,6 мг/мл. Цитотоксичность определялась по степени ингибирования роста клеток на линии клеток эмбриона человека. Концентрация $p(6\text{SRA-5B})$, при которой ингибируется рост 50 % клеток, то есть IC_{50} , составила 0,4 мг/мл.

Таблица 2.9. Гемолитическая активность $p(6\text{SRA-5B})$.

$C(p(6\text{SRA-5B}))$, мг/мл	Гемолиз, %
0,62	13,9
0,31	4,4
0,13	0,6

$p(6\text{SRA-5B})$ стабильны в плазме крови и не агрегируют с его компонентами. На графике распределения гидродинамического диаметра методом ДСР наблюдаются частицы плазмы и частицы $p(6\text{SRA-5B})$ (Рис. 2.35). При увеличении содержания плазмы крови происходит незначительное увеличение размеров $p(6\text{SRA-5B})$ от 140 до 200 нм. Стабильность наночастиц в плазме крови способствует свободной циркуляции $p(6\text{SRA-5B})$ в кровеносной системе.

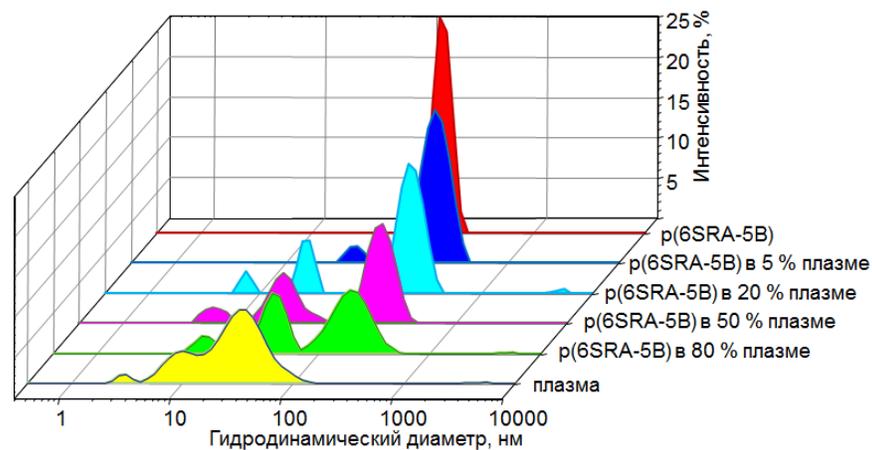


Рис. 2.35. Графики распределения гидродинамического диаметра для $p(6\text{SRA-5B})$, плазмы крови и $p(6\text{SRA-5B})$ при различном содержании плазмы крови в системе, $C(p(6\text{SRA-5B})) = 0,76$ мг/мл, плазма = 5÷80 об.%. .

p(6SRA-5B) распадается при увеличении концентрации глюкозы в среде. При добавлении глюкозы в систему в результате процессов конкурентной переэтерификации, фенолбороновая кислота связывается с глюкозой с образованием термодинамически более стабильных пяти- и шестичленных циклов (Рис. 2.36) [200]. В результате глюкоза замещает резорцинарен с образованием более стабильных эфиров с фенолбороновой кислотой. Для демонстрации распада наноконтейнера, в раствор p(6SRA-5B) (0,76 мг/мл) добавили глюкозу (5÷10 мМ). Раствор термостатировался при 37 °С в течение 40 минут. Распределение размеров частиц в системе определялся методом ДСР. В присутствии глюкозы в концентрации 5 и 7,5 мМ гидродинамический диаметр наночастиц практически не меняется (Рис. 2.37). Но при увеличении концентрации глюкозы до 10 мМ происходит распад наночастиц и на диаграмме распределения гидродинамического диаметра появляются пики в интервале 100-2000 нм.

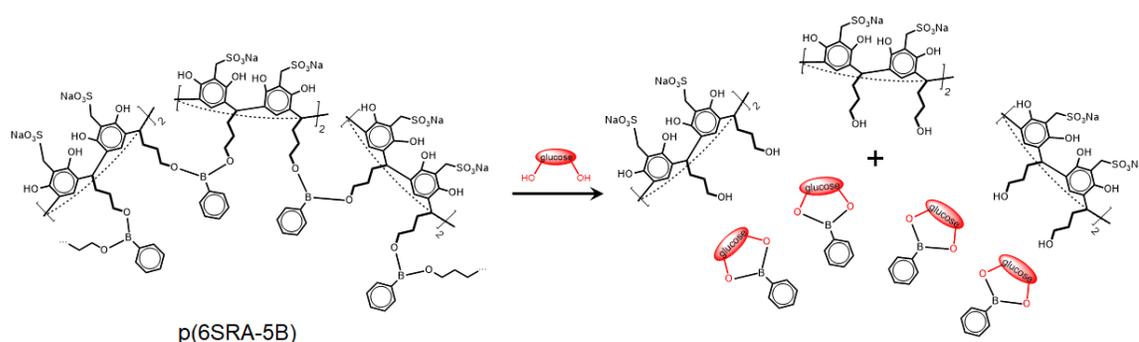


Рис. 2.36. Схема распада p(6SRA-5B) под воздействием глюкозы.

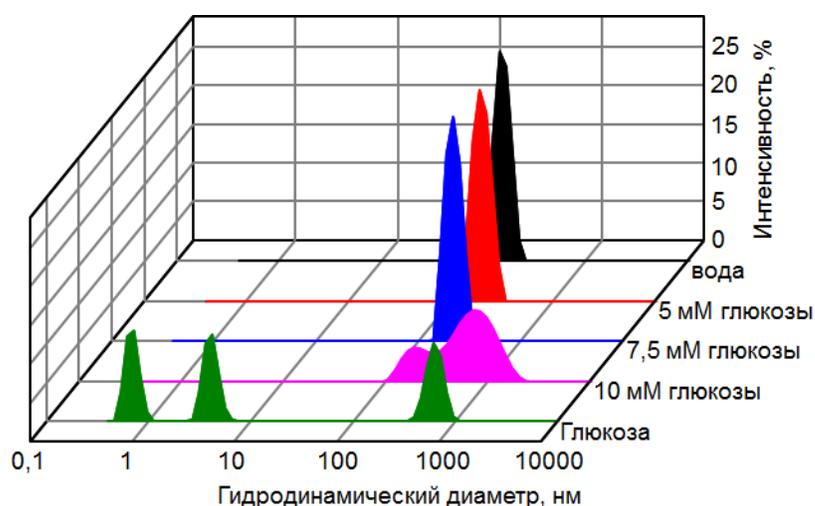


Рис. 2.37. График распределения гидродинамического диаметра глюкозы и p(6SRA-5B) в присутствии глюкозы, $C(p(6SRA-5B)) = 0,76$ мг/мл, $C(Glu) = 0 \div 10$ мМ, H_2O .

Емкость связывания ($LC\%$) наноконтейнера по отношению к инсулину может быть увеличена при увеличении количества инсулина, взятого в реакцию. При использовании 5,2 мг/мл инсулина $LC\%$ возрастает до 47 %, а эффективность при этом падает незначительно до 69 % ($EE\%$).

Нахождение инсулина в полости $p(6SRA-5B)$ подтверждается спектральными методами. Отсутствие сигналов инсулина на 1H ЯМР спектре $Ins@p(6SRA-5B)$ (где Ins – инсулин), слабая интенсивность сигналов инсулина на флуоресцентном спектре и спектре кругового дихроизма (КД) подтверждают нахождение инсулина внутри наноконтейнеров (Рис. S13 см. в приложении, Рис. 2.38). При добавлении глюкозы к $Ins@p(6SRA-5B)$ происходит распад наноконтейнера и высвобождение инкапсулированного инсулина, что вызывает изменения в спектральных характеристиках (Рис. 2.38, Рис. 2.39). На флуоресцентном спектре диализата после добавления глюкозы увеличивается интенсивность сигнала флуоресценции инсулина (Рис. 2.38(A)). На КД спектре $Ins@p(6SRA-5B)$ после добавления 10 мМ глюкозы появляются сигналы инсулина (Рис. 2.38(B)). Совпадение данного спектра со спектром исходного инсулина показывает сохранение конформации инсулина в процессе синтеза и дальнейших с ним манипуляций. КД спектр два минимума при 209 и 222 нм, что характерно для α -спиральной вторичной структуры инсулина.

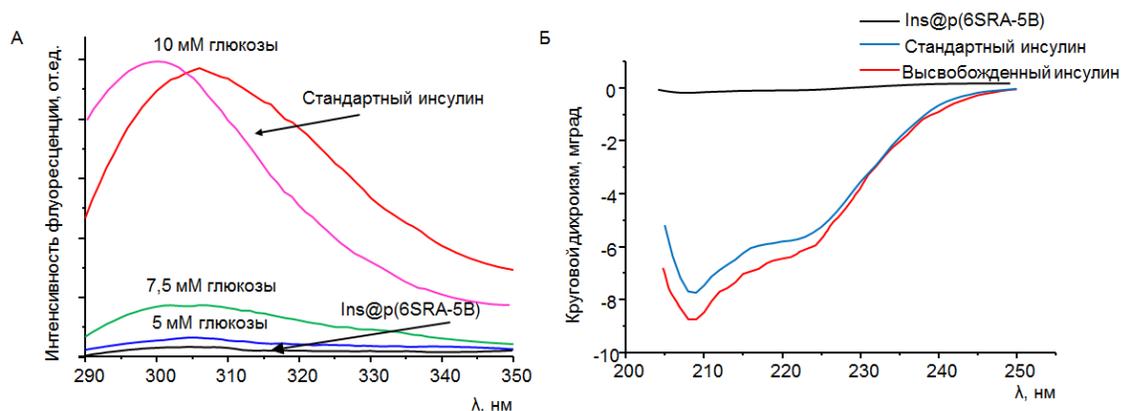


Рис. 2.38. (А) Флуоресцентные спектры стандартного инсулина, $Ins@p(6SRA-5B)$ и диализатов после добавления глюкозы, $C(Ins) = 11,6$ мкг/мл, H_2O ; (Б) КД спектры $Ins@p(6SRA-5B)$ до и после добавления 10 мМ Glu , и стандартного инсулина, $C(Ins) = 8$ мкг/мл, H_2O .

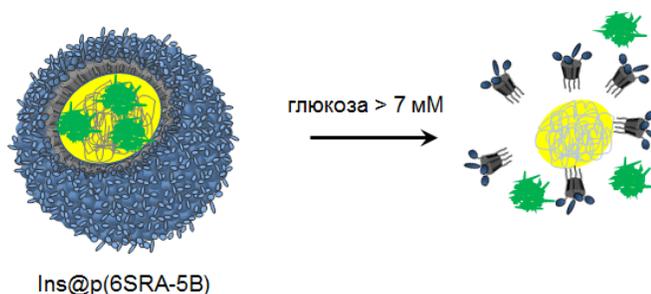


Рис. 2.39. Разрушение Ins@p(SRA-B) и высвобождение инсулина при повышенном уровне глюкозы в системе.

Кинетика высвобождения инсулина при добавлении глюкозы изучена данными УФ-спектроскопии. Добавление 10 мМ глюкозы к полимерным наноконтейнерам с инкапсулированным инсулином вызывает быстрое высвобождение инсулина в течение 15-30 минут (Рис. 2.40). При добавлении 7,5 мМ глюкозы высвобождается 50 % связанного инсулина. В присутствии физиологически нормальной концентрации глюкозы (5 мМ) происходит выход всего 8 % инкапсулированного инсулина.

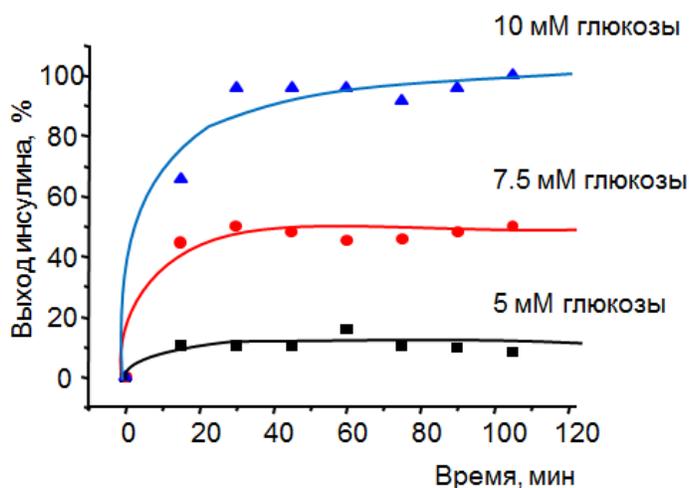


Рис. 2.40. Кинетика выхода инсулина из Ins@p(6SRA-5B) в присутствии глюкозы, $C(\text{Ins}) = 0,25$ мг/мл, $C(\text{Glu}) = 5\div 10$ мМ, ФБ pH 7,5, 37 °С.

Таким образом, на основе SRA и BA получен глюкоза-чувствительный наноконтейнер p(6SRA-5B). При физиологически нормальном уровне глюкозы (5 мМ) из p(6SRA-5B) высвобождает менее 10 % инсулина, а при концентрации глюкозы 10 мМ происходит разрушение наноконтейнера и выход до 100 % инсулина. Кроме того, полученный контейнер безвреден по отношению к клеткам крови и может свободно циркулировать в кровеносной системе. Полученный контейнер может быть применен для высвобождения инсулина при повышенном уровне глюкозы в крови.

2.4. pH-управляемый полимерный наноконтейнер на основе N-метилглюкаминового резорцинарена р(MEGRA-B)

Создание наноконтейнеров для направленной и стимул-управляемой доставки лекарственных веществ актуально для различных областей медицины, но особенно, для противоопухолевой терапии. Одной из задач, которое решается при внедрении лекарственного вещества в структуру наноконтейнеров, является увеличение доступности субстрата в раковых клетках и уменьшение их токсичности для здоровых тканей. Одним из особенностей физиологии раковых клеток является поглощение большого количества глюкозы в процессах метаболизма [210,211]. Это обстоятельство позволяет создавать контейнеры для направленной доставки противораковых лекарственных веществ декорированием их глюкозосодержащими фрагментами.

Для получения наноконтейнера для хранения и высвобождения противоракового препарата в работе использовали N-метилглюкаминовое производное резорцинарена (MEGRA). Меглюмин (MEG или N-метил-глюкамин) представляет собой аминопроизводное глюкозы и используется в фармацевтике для улучшения адсорбции лекарственных средств [212,213]. MEG стабилен в широком диапазоне pH и ионной силы. И хотя он сам не проявляет биологической активности, он защищает организм от метаболического синдрома и увеличивает выносливость мышц [214].

Для получения MEGRA применили реакцию Манниха – взаимодействие RA с MEG и параформом (Рис. 2.41). Реакцию проводили в этиловом спирте при 80 °С. Выход составил 75 %. MEGRA хорошо растворим в воде. Наличие в структуре резорцинарена гидрофильного N-метилглюкаминового фрагмента на верхнем ободе резорцинарена и гидрофобной области, состоящей из ароматического тела и хвостов резорцинарена, позволяет использовать MEGRA в качестве эмульгатора и стабилизатора микроэмульсий.

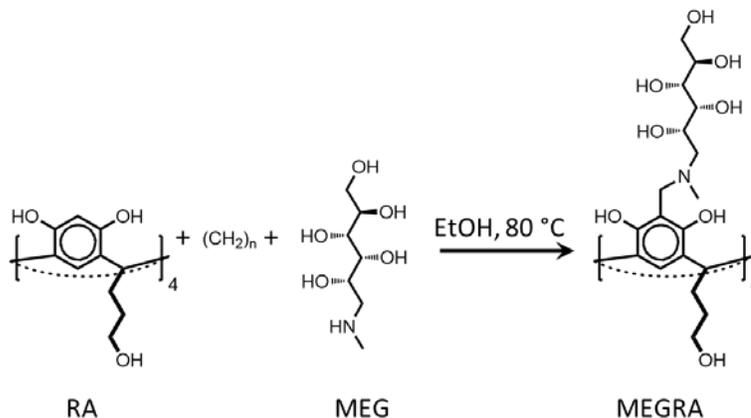


Рис. 2.41. Схема синтеза MEGRA.

Синтез полимерного наноконтейнера (p(MEGRA-B)) проводили методом микроэмульсионной полимеризации по типу «масло в воде», с использованием ВА в качестве сшивателя. В качестве дисперсионной среды был использован фосфатный буфер с pH 8,5, а триолеин применяли в качестве дисперсной фазы. (Рис. 2.42). Микроэмульсию выдерживали в течение трех дней при 37 °С для образования боронатных связей между MEGRA и ВА.

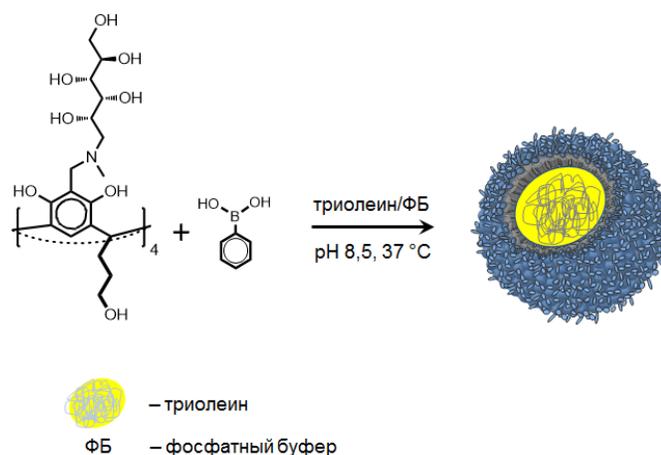


Рис. 2.42. Схема синтеза p(MEGRA-B).

По окончании реакции дисперсию очищали диализом. Затем удаляли растворитель при пониженном давлении, а остаток промывали несколько раз ацетоном для очистки от избыточного количества триолеина. Выход составил 35,3 % по отношению к сумме исходных реагентов MEGRA, ВА и триолеина.

Согласно данным ПЭМ, размер p(MEGRA-B) равен 65 ± 10 нм (Рис. 2.43(А, Б)). Гидродинамический диаметр наноконтейнера значительно выше и равен 160 ± 20 нм (Рис. 2.43(В)). Причиной такой большой разницы является образование гидратной оболочки большого радиуса вокруг p(MEGRA-B) из-за склонности глюкоаминовых групп к образованию водородных связей с молекулами воды. Молекулярная масса, определенная по графику Дебая из данных ССР, составила 3570 ± 250 кДа (Рис. 2.43(Г)). Большое значение молекулярной массы показывает присутствие в p(MEGRA-B) большого количества остаточного триолеина, что подтверждается данными ^1H ЯМР спектроскопии (Рис. S14 см. в приложении). В ЯМР спектре p(MEGRA-B) помимо уширенных сигналов MEGRA и ВА наблюдаются интенсивные сигналы триолеина при 5,25, 3, 1,25 и 0,9 м.д.

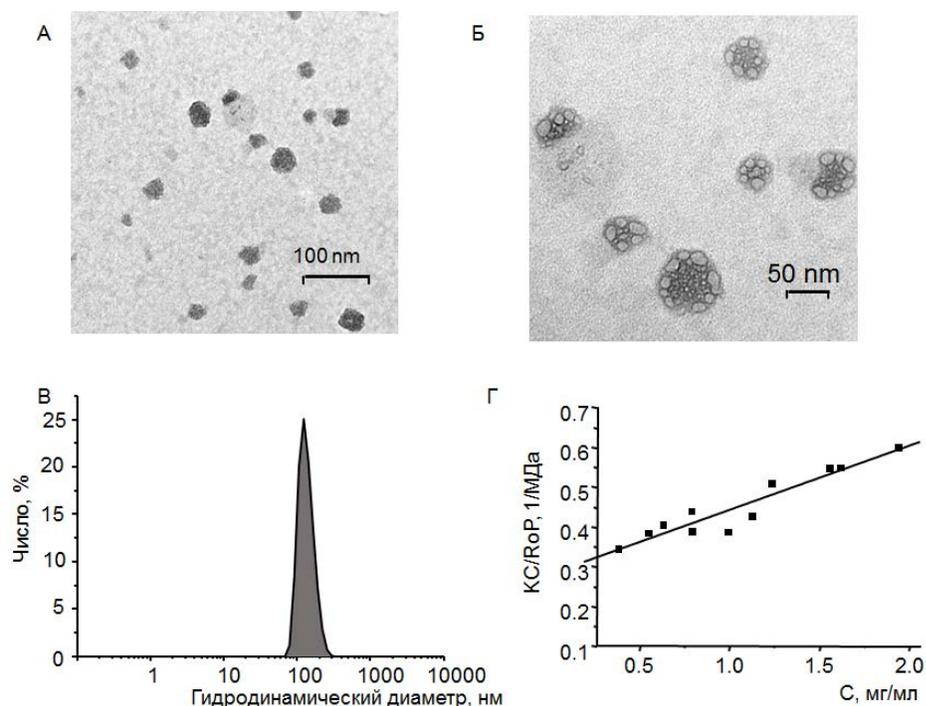


Рис. 2.43. Для р(МЕГРА-В): (А, Б) Изображения ПЭМ; (В) график распределения гидродинамического диаметра, $C(p(\text{MEGRA-B})) = 1,64 \text{ мг/мл}$, H_2O ; (Г) график Дебая, полученный по данным SLS, $C(p(\text{MEGRA-B})) = 0,3 \div 2 \text{ мг/мл}$, H_2O .

Отсутствие сигнала протонов метиленовой группы при хвостовой гидроксильной группе в области 3,2 м.д. на ^1H ЯМР спектре подтверждает успешный синтез полимерных наночастиц (Рис. S14 см. в приложении). На спектре ^{13}C ЯМР р(МЕГРА-В) проявляются в основном сигналы N-метилглюкаминового фрагмента (Рис. S15 см. в приложении). На ИК-спектрах МEGRA и р(МЕГРА-В) наблюдаются полосы валентных колебаний связей O—H в области $3300\text{--}3500 \text{ см}^{-1}$, C—H в области $2800\text{--}2950 \text{ см}^{-1}$. В области 1610 и 1460 см^{-1} проявляются полосы валентных колебаний ароматического кольца. При 1082 см^{-1} наблюдается полоса колебания связи C—N. На ИК-спектре р(МЕГРА-В) наблюдается полоса колебания боронатной связи при 534 см^{-1} (Рис. S16 см. в приложении).

MEGRA является основанием Манниха и постадийно протонируется по аминогруппам, и депротонируется по гидроксильным группам [197]. Из данных рН метрического титрования видно, что в диапазоне рН 10-2,5 проявляются две ступени протонизации. Первая ступень соответствует присоединению двух протонов с pK_a 8,9, а вторая – присоединению третьего протона с pK_a 6,7. В случае р(МЕГРА-В), наряду с двумя ступенями протонизации с pK_a 9,6 и 7,9, проявляется четко выраженная ступень с pK 6,0, которая отсутствует в случае МEGRA. Эта ступень относится к диссоциации сложноэфирных боронатных связей. Таким образом, полимерные наночастицы

p(MEGRA-B) стабильны при щелочной и нейтральной pH, и диссоциируют в слабокислой среде (Рис. 2.44, Таблица 2.10).

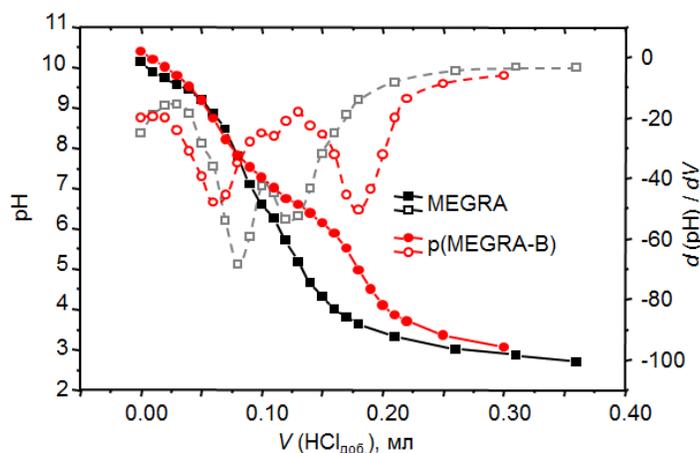


Рис. 2.44. Кривые pH-метрического титрования и первого производного dpH/dV для MEGRA и p(MEGRA-B), $C(\text{MEGRA}) = 0,1 \text{ мМ}$, $C(\text{p(MEGRA-B)}) = 0,16 \text{ мг/мл}$, H_2O .

Таблица 2.10. Значения pK_a ступенчатого протонирования MEGRA и p(MEGRA-B) и $pK_{\text{дисс.}}$ p(MEGRA-B), определенные из данных pH титрования, $C(\text{MEGRA}) = 0,1 \text{ мМ}$, $C(\text{p(MEGRA-B)}) = 0,16 \text{ мг/мл}$, H_2O .

	pK_{a1}, pK_{a2}	pK_{a3}	$pK_{\text{дисс.}}$
MEGRA	8,9	6,7	-
p(MEGRA-B)	9,6	7,9	6,0

Данные ДСР подтверждают распад полимерных наноконтейнеров в кислой среде. При pH 7 на диаграмме распределения гидродинамического диаметра наблюдается узкий пик при 160 нм. При подкислении раствора до pH до 4 происходит протон-иницируемая диссоциация сложноэфирной боронатной связи и распад наноконтейнеров. При этом на диаграмме распределения гидродинамического диаметра наблюдается широкий интервал разброса размеров в интервале от 30 до 10000 нм (Рис. 2.45).

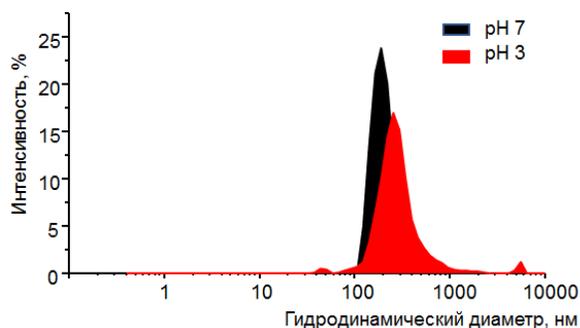


Рис. 2.45. График распределения гидродинамического диаметра р(МЕГРА-В) при pH 7 и pH 4, $C(p(\text{MEGRA-B})) = 0,32 \text{ мг/мл}$, $\text{HCl/H}_2\text{O}$.

р(МЕГРА-В) использовали в качестве вектора для доставки доксорубицина (DOX) в раковые клетки линии M-Hela. DOX оказывает антимитотическое и антипролиферативное действие и широко используется в противоопухолевой терапии. Основным недостатком DOX является его неизбирательное действие на все делящиеся клетки, что приводит к появлению различных патологий, наиболее опасными из которых являются кардиотоксичность и миелосупрессия [215]. По причине высокой токсичности концентрация используемого в терапии DOX очень мала. Создание векторного наноносителя для доставки DOX в раковые клетки позволяет уменьшить побочные эффекты, эффективно использовать низкую концентрацию DOX за счет избирательного концентрирования лекарства в раковых клетках.

Наноконтейнер с инкапсулированным доксорубицином ($\text{DOX}@p(\text{MEGRA-B})$) получали аналогично р(МЕГРА-В), используя в качестве дисперсной фазы доксорубицин в триолеине. Для этого раствор DOX в этиловом спирте гомогенизировали с 25 мкл триолеина, после чего растворитель удаляли при пониженном давлении. К полученной смеси добавляли раствор МЕГРА (6 мМ) и ВА (5 мМ) в 1 мл ФБ pH 8,5. Раствор гомогенизировали действием ультразвука и продуванием аргоном в течение 90 минут до образования стабильной микроэмульсии. Микроэмульсию нагревали при перемешивании при 37 °С в течение 3 дней. После диализа в течение 18 часов (2 мл диализуемого раствора против 250 мл дистиллированной воды, с размерами пор 2 кДа) для удаления неинкапсулированного доксорубицина получили раствор $\text{DOX}@p(\text{MEGRA-B})$. Эффективность связывания $EE\%$ составила 38 %, а емкость связывания $LC\%$ - 5 %, при использовании 9,3 мг МЕГРА, 0,61 мг ВА и 1,32 мг DOX.

Доксорубицин в р(МЕГРА-В) находится в органической триолеиновой фазе, что видно из изменений флуоресцентных спектров доксорубицина после инкапсуляции в структуру наноконтейнеров (Рис. 2.46(А)) [216]. На спектре испускания $\text{DOX}@p(\text{MEGRA-B})$ наблюдаются два пика при 560 и 595 нм. При этом для несвязанного DOX соотношение интенсивностей пиков при

595 и 560 нм намного выше, чем для DOX@p(MEGRA-B). Зеркальная картина наблюдается и для спектров возбуждения. Если на спектре возбуждения свободного DOX присутствует широкая полоса испускания от 400 до 580 нм, то на спектре возбуждения DOX@p(MEGRA-B) проявляются два выраженных пика при 500 и 540 нм.

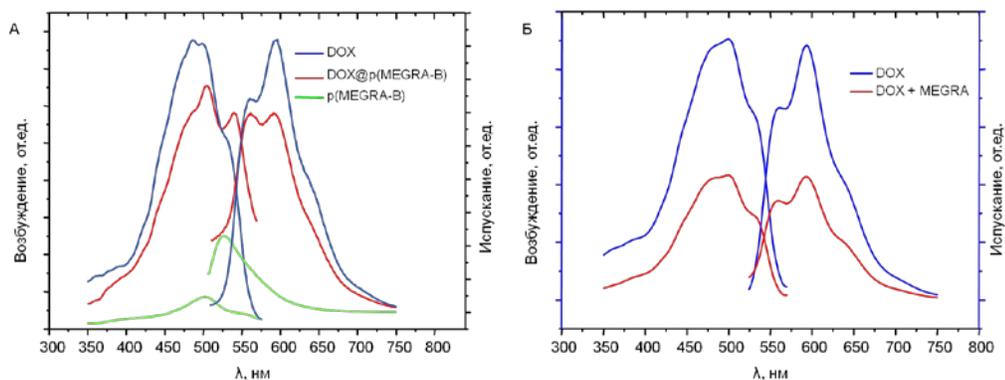


Рис. 2.46. Спектры возбуждения и испускания для: (А) DOX, DOX@p(MEGRA-B) и p(MEGRA-B), $C(\text{DOX}) = 0,02 \text{ мМ}$, $C(\text{p(MEGRA-B)}) = 0,28 \text{ мг/мл}$, H_2O ; (Б) DOX и DOX + MEGRA, $C(\text{DOX}) = 0,02 \text{ мМ}$, $C(\text{MEGRA}) = 0,2 \text{ мМ}$, H_2O .

Следует отметить, что сам MEGRA не оказывает влияние на положение полос возбуждения и испускания в спектрах (Рис. 2.46(Б)). В присутствии 10 кратного мольного избытка MEGRA интенсивность полос DOX почти в два раза ниже, из-за вероятного взаимодействия DOX с верхним ободом резорцинарена.

При уменьшении pH от 7 до 4 происходит диссоциация боронатной эфирной связи с последующим распадом наноконтейнера и высвобождением DOX. При понижении pH до 4 со временем возрастает интенсивность испускания при 525, 560 и 595 нм (Рис. 2.47(А)). Возрастание отношения интенсивностей полос при 595 и 560 нм показывают переход DOX из органической фазы в водную при разрушении наноконтейнера (Рис. 2.47(Б)). Повышение интенсивности испускания при 525 связано с испусканием образующихся свободных MEGRA, интенсивность испускания в кислой среде которых в 1,5 раза выше, чем у p(MEGRA-B) (Рис. 2.47(В)).

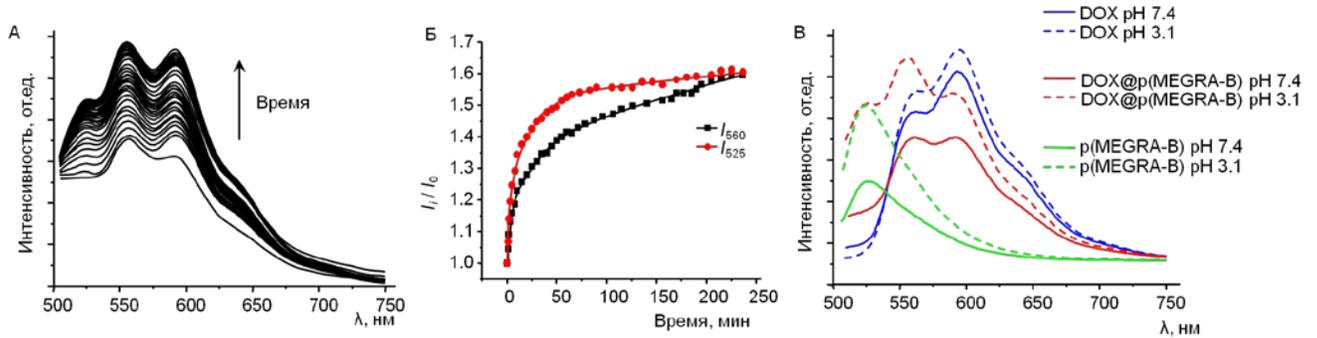


Рис. 2.47. (А) Изменение спектра флуоресценции DOX@p(MEGRA-B) с течением времени при уменьшении pH раствора от 7 до 3; (Б) Зависимость I/I_0 при 525 и 560 нм в зависимости от времени; (В) изменение интенсивности в спектрах флуоресценции DOX, DOX@p(MEGRA-B) и p(MEGRA-B) при покислении с pH 7,4 до pH 3,1, $C(\text{DOX}) = 0,02$ мМ, $C(\text{p(MEGRA-B)}) = 0,28$ мг/мл, H_2O , 25 °С.

В Таблица 2.11 представлены результаты по гемолитической активности полученных полимерных частиц. Как видно из результатов p(MEGRA-B) демонстрируют хорошую гемосовместимость. Гемолиз не превышает 0,2 % даже в присутствии p(MEGRA-B) при высокой концентрации 0,81 мг/мл.

Таблица 2.11. Гемолитическая активность p(MEGRA-B).

$C(\text{p(MEGRA-B)})$, мг/мл	Гемолиз, %
0,81	0,2
0,41	0
0,20	0,2
0,10	0
0,05	0

Одним из путей доставки лекарства в клетку является эндоцитоз (Рис. 2.48). pH внеклеточной жидкости в раковой опухоли составляет 6,0-6,8. Уменьшение pH внеклеточной жидкости связано с выделением из внутриклеточной среды раковой клетки избытка молочной кислоты, образующейся из глюкозы в результате внутриклеточных анаэробных процессов [217]. Наличие глюкаминных фрагментов на поверхности p(MEGRA-B) должно способствовать повышению эндоцитоза наноконтейнера как за счет связывания молочной кислоты посредством протонирования аминогрупп, так и за счет поглощения глюкозных фрагментов как источников энергии для раковых

клеток. При эндоцитозе наноконтейнер должен попадать внутрь клетки в липосоме, которая затем переходит в лизосому с pH 4,5-5,0 [218]. Это значение pH должно вызывать распад наноконтейнера и высвобождение DOX (Рис. 2.48).

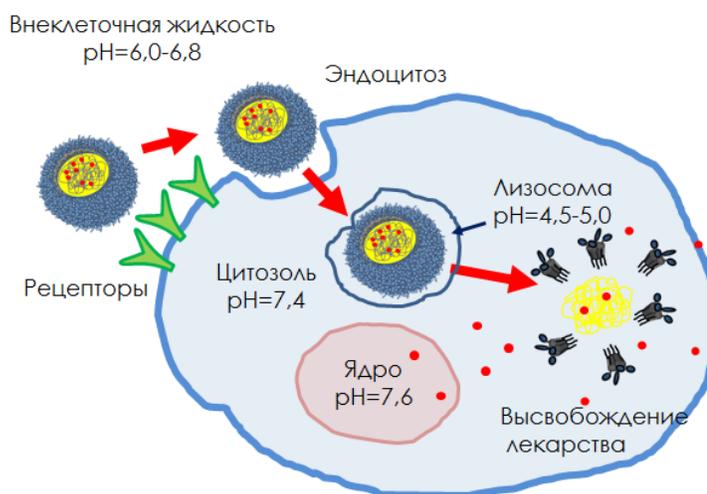


Рис. 2.48. Схематическое изображение процесса эндоцитоза DOX@p(MEGRA-B) в раковые клетки с последующим распадом и высвобождением субстрата.

Для оценки клеточного проникновения p(MEGRA-B), инкапсулированного и неинкапсулированного DOX использовали метод проточной цитометрии, в которой определяли интенсивность флуоресценции раковых клеток M-Hela после инкубации с растворами p(MEGRA-B), DOX и DOX@p(MEGRA-B). После 24 часов инкубации клетки промывались для удаления адсорбированных частиц с поверхности клеток. Результаты показали, что p(MEGRA-B) действительно проникает в раковые клетки. Флуоресценция клеток после инкубации значительно возрастает, несмотря на низкую флуоресценцию самих частиц p(MEGRA-B) (Рис. 2.49(А,Б)). Загруженный в наноконтейнер доксорубин DOX@p(MEGRA-B) показывает более сильную флуоресценцию, по сравнению с свободным DOX, что указывает на лучшее проникновение связанного доксорубина в клетку, по сравнению со свободным.

Свободный DOX проникает внутрь клеток за счет диффузии [219], поэтому использование двукратного избытка DOX незначительно влияет на его проникновение, и флуоресценция клеток при обработке DOX 0,0025 мМ и 0,005 мМ отличаются незначительно (Рис. 2.49(В)). Напротив, интенсивность флуоресценции клеток более чувствительна к концентрации DOX@p(MEGRA-B). При увеличении концентрации в два раза флуоресценция возрастает почти в 4 раза (Рис. 2.49(Г)). Причиной более высокого клеточного поглощения является механизм эндоцитоза. Эндоцитоз является наиболее вероятным механизмом клеточного поглощения наноконтейнеров раковыми

клетками. Эндоцитоз – это процесс проникновения в клетку больших структур, которые не способны проникать через клеточную мембрану в процессах диффузии, осмоса и через ионные насосы.

Включение DOX в состав полимерных наночастиц увеличивает его токсичность для здоровых клеток печени (Таблица 2.12). Кроме того, полученный наноконтейнер DOX@p(MEGRA-B) не обладает селективностью и показывает одинаковую цитотоксичность по отношению к здоровым и раковым клеткам. В обоих случаях IC_{50} DOX, инкапсулированного в полимерный наноконтейнер, составляет 0,003 мМ. Сам p(MEGRA-B) не обладает цитотоксичностью. IC_{50} для p(MEGRA-B) выше 0,19 мг/мл.

Несмотря на токсичность DOX@p(MEGRA-B) для здоровых клеток, полученные результаты показали, что p(MEGRA-B) способствует повышенному клеточному проникновению доксорубина в раковые клетки, что позволяет концентрировать лекарственное вещество в целевых тканях. Это препятствует свободной циркуляции доксорубина по всему организму и позволяет уменьшать концентрацию вводимого лекарства.

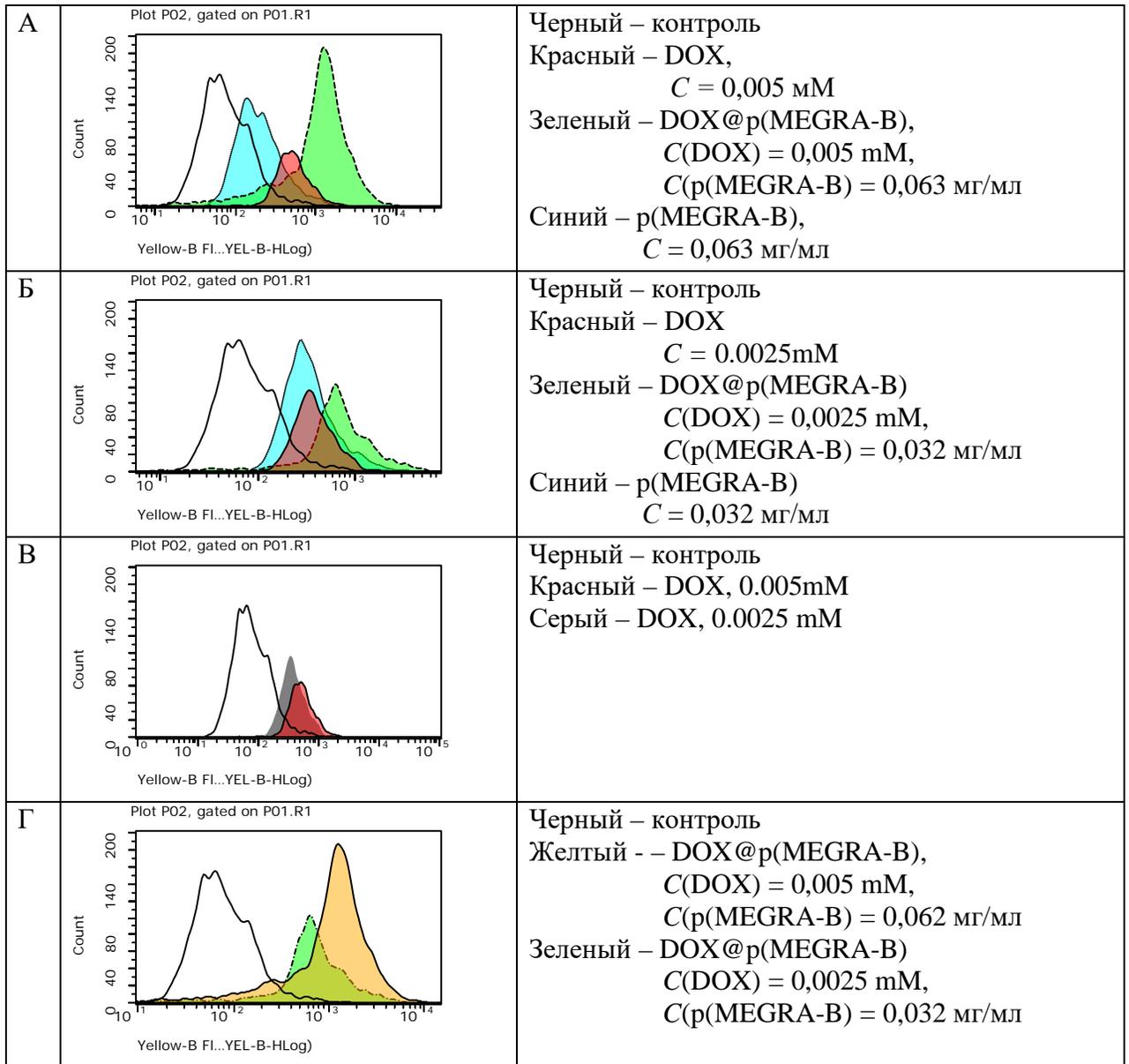


Рис. 2.49. Данные проточной цитометрии для p(MEGRA-B), DOX и DOX@p(MEGRA-B) при различных концентрациях, после 24 часа инкубации.

Таблица 2.12. Цитотоксичность DOX, DOX@p(MEGRA-B) и p(MEGRA-B).

	IC ₅₀	
	раковые клетки M-Hela	клетки печени
DOX	0,004 mM	0,006 mM
DOX@p(MEGRA-B)	0,003 mM (по DOX)	0,003 mM (по DOX)
p(MEGRA-B)	> 0,19 мг/мл	> 0,19 мг/мл

Таким образом, получен полимерный наноконтейнер р(MEGRA-B) для доставки лекарственного средства доксорубицина в раковые клетки. Результаты показали, что р(MEGRA-B) стабилен при нормальном рН, а выход лекарства осуществляется при пониженных рН 4-5. Наноконтейнер способствует улучшенному проникновению лекарства внутрь клетки.

2.5. Редокс-чувствительная полимерная наносфера на основе сульфонатного виологен кавитанда (р(SVCA-SS)) [220]

Наноконтейнер, представленный в данной подглаве, разработали также для адресной доставки доксорубицина DOX. В отличие от предыдущего его принцип действия основан на чувствительности к действию глутатиона (GSH). Глутатион является трипептидом – γ -глутамилцистеинилглицином. Он обладает антиоксидантными свойствами, регулирует окислительно-восстановительные процессы в клетке и уменьшает концентрацию свободных радикалов, таким образом, предотвращая мутацию ДНК [221]. GSH играет важную роль в работе иммунной системы, способствуя росту Т-лимфоцитов. Концентрация GSH различается в внеклеточных и внутриклеточных пространствах, а также в опухолевых (~ 2-10 мМ) и здоровых тканях (~ 2-10 мкМ). В раковых клетках повышенное содержание глутатиона увеличивает их сопротивляемость к химиотерапии. Напротив, пониженное содержание глутатиона делает раковые клетки уязвимыми к действию иммунной системы.

Для создания глутатион-чувствительного наноконтейнера использовали виологен-кавитанд (SVCA, Рис. 2.50). Виологен-кавитанд представляет собой резорцинарен с сшитыми гидроксильными группами, образующими жесткий циклический каркас, предорганизующий активные виологеновые группы на верхнем ободе. Нижний обод кавитанда может быть легко функционализирован различными фрагментами, что дает возможность его дальнейшей модификации для формирования наноконтейнера. Использование виологен кавитанда позволяет получать многозарядные носители, что важно для эффективного взаимодействия с поверхностью клеток. Виологен является известным акцептором. Он взаимодействует с протеинами и рецепторами клеток [222]. Мультивиологены демонстрируют антимикробную и противовирусную активность [223]. Они ингибируют активность HIV-1, а также используются в качестве переносчиков генов и нуклеиновых кислот [224]. Введение сульфонатной группы в структуру виологена уменьшает токсичность виологена и улучшает его диффузию.

SVCA синтезировали из бромметил кавитанда [225] реакцией нуклеофильного замещения с N-сульфонатопрпил виологеном (Рис. 2.50). После замены противоионов на хлорид ионы, снятия

защитной ацетатной группы и введения акрилатной группы получили SVCA с суммарным выходом около 57 %. Структура полученного кавитанда доказана методами ^1H ЯМР спектроскопии, ИК спектроскопии, и элементным анализом (Рис. S17 и Рис. S18 см. в приложении и в экспериментальной части). Данные элементного анализа показали, что в полученном кавитанде отсутствуют противоионы натрия, при этом соотношение количества ионов хлора к кавитанду составляет 4/1. Это показывает, что в полученной структуре один положительный заряд виологеновой группы компенсируется отрицательно заряженной сульфонатной группой, а для второго положительно заряженного атома азота противоионом является ион хлора.

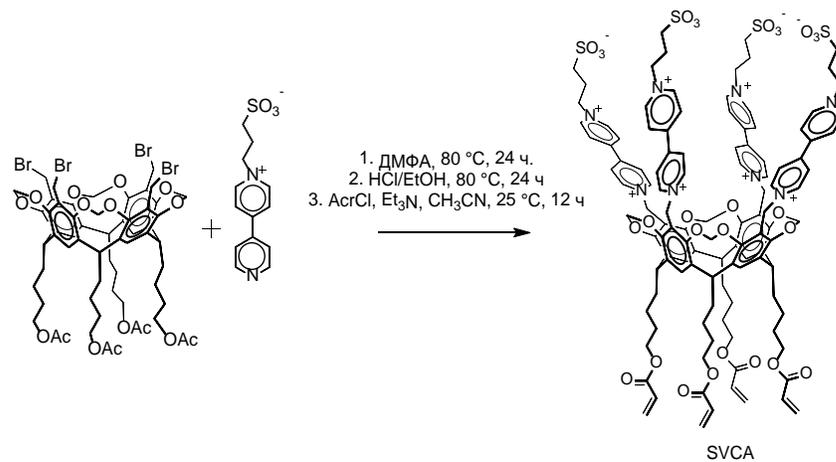


Рис. 2.50. Получение кавитанда SVCA.

Синтез полимерного наноконтейнера (p(SVCA-SS)) проводили методом микроэмульсионной полимеризации по типу «масло в воде» (Рис. 2.51). В качестве органической дисперсной фазы использовали диаллилдисульфид (SS). Он содержит две двойные связи и дисульфидную связь, чувствительную к восстановителям, особенно к тиолам. SVCA как эмульгатор располагается на границе раздела фаз. Заряженные группы направлены в воду, а кавитанд с акрилатными группами в органическую часть. В ходе полимеризации SS образует разветвленные полимеры, формирующие гидрофобное ядро, сополимеризованное на границе с SVCA.

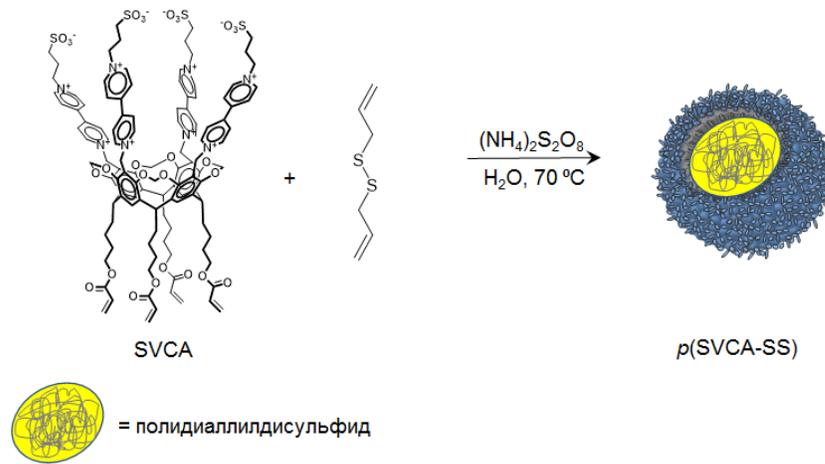


Рис. 2.51. Получение p(SVCA-SS).

Для синтеза p(SVCA-SS) смесь SVCA (2,5 мМ), SS (7 – 30 мкл) и воды (1 мл) обрабатывали ультразвуком и продували аргоном в течение 90 минут для получения микроэмульсии. Затем добавили $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ в качестве катализатора полимеризации, и смесь грели при 70 °С в течение 24 часов (Рис. 2.51). При использовании 7, 10 и 12 мкл SS образуются частицы с гидродинамическим диаметром выше 150 нм и с индексом полидисперсности от 0,31 до 0,35 (Таблица 2.13, Рис. 2.52). При использовании 30 мкл образуется нестабильная система, которая разделяется на масляную и водную фазу при стоянии. При использовании 15 мкл SS образуются наночастицы с гидродинамическим диаметром около 110 нм при индексе полидисперсности 0,19. Таким образом, 15 мкл SS на 1 мл воды является оптимальным для получения однородных частиц, и в дальнейшем использовали это соотношение, а именно 1,5 об.% дисперсной фазы. Полученные наночастицы p(SVCA-SS) очищали диализом и промывали ацетоном. Выход составил 72 %.

Таблица 2.13. Размер и индекс полидисперсности частиц, полученных после полимеризации SVCA с диаллилдисульфидом в водной среде.

Орг.фаза, об.%	Гидродинамический диаметр, нм	Индекс полидисперсности
3,0	Не стабилен	
1,5	112±5	0,19
1,2	162±37	0,35
1,0	158±18	0,31
0,7	209±14	0,31

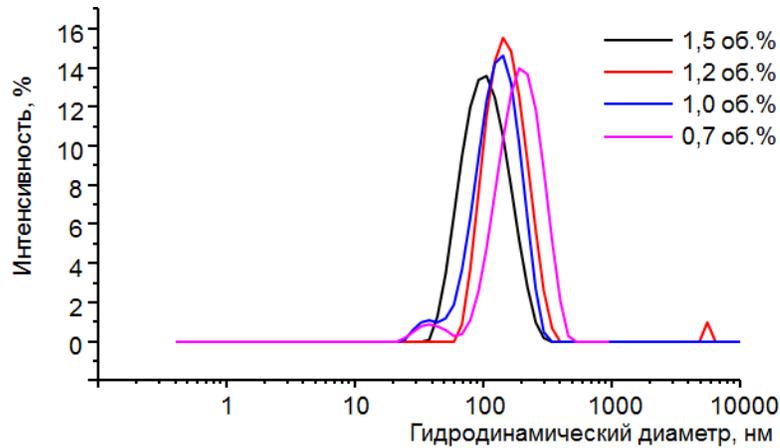


Рис. 2.52. Графики распределения гидродинамического диаметра частиц, полученных после полимеризации SVCA с диаллилдисульфидом в водной среде.

На ^1H ЯМР спектре $p(\text{SVCA-SS})$ отсутствуют сигналы акрилатной группы в области 6,3 – 5,7 м.д. и проявляются сигналы метиленовых протонов полимерного ядра в области 2,5 – 1,0 м.д. (Рис. S17 см. в приложении). Об получении полимерных наноконтейнеров также свидетельствует уширение сигналов ароматического протона 9, аксиальных протонов метиленового моста 10а и сигналов метиленовых групп бутилакрилатного хвоста 12-15, которые направлены в сторону гидрофобного ядра наносфер.

На ИК спектрах SVCA и $p(\text{SVCA-SS})$ наблюдаются полосы валентных колебаний связей O—H в области 3400-3500 см^{-1} , C—H связей в области 3130-2930 см^{-1} , связи C=O при 1717 см^{-1} . При 1638 и 1205 см^{-1} регистрируются полосы валентных колебаний C—N и S=O связи, соответственно. В области от 1400-1560 см^{-1} регистрируются полосы валентных колебаний ароматического кольца. При сравнении ИК-спектров SVCA и $p(\text{SVCA-SS})$ наблюдается относительное уменьшение интенсивности колебания при 1717 см^{-1} , что свидетельствует об заторможенности колебания связи C=O акрилатной группы вследствие расположения в гидрофобном ядре наноконтейнеров (Рис. S18 см. в приложении).

На Рис. 2.53 (А, Б) приведены изображения $p(\text{SVCA-SS})$, полученные методами АСМ и ПЭМ. Размер наночастиц составляет 90 ± 10 нм. Гидродинамический диаметр, согласно данным ДСР равен 112 ± 5 нм (Рис. 2.53(В)). Молекулярная масса, определенная из данных ССР из графика Дебая, составляет 1180 ± 30 кДа (Рис. 2.53(Г)). Значение дзета-потенциала, определенная методом электрофоретического светорассеяния, равен +40 мВ, что говорит о стабильности полученных наночастиц в воде (Рис. 2.53(Д)).

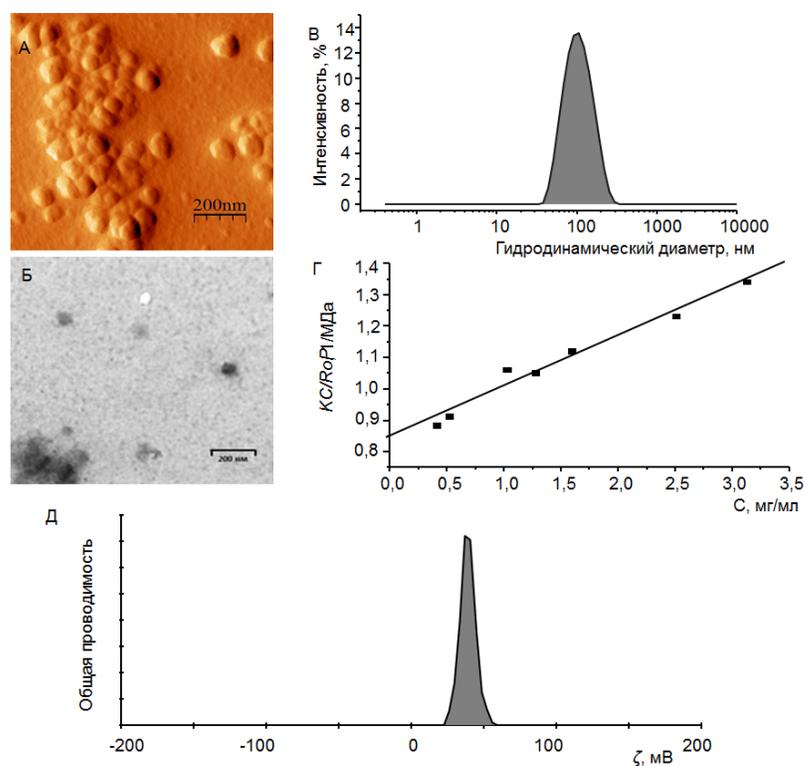


Рис. 2.53. Данные для p(SVCA-SS): (А) АСМ и (Б) ПЭМ изображения; (В) распределение гидродинамического диаметра p(SVCA-SS), $C = 0,6$ мг/мл; (Г) график Дебая, полученный методом SLS, $C = 0,4 - 3,2$ мг/мл; (Д) Распределение дзета-потенциала для p(SVCA-SS).

p(SVCA-SS) нетоксичны в диапазоне используемых концентраций (0,2-1,9 мг/мл). Гемолиз в их присутствии не превышает 4 % (Таблица 2.14). Жизнеспособность клеток эмбриона человека WI-38 VA 13 subline 2R больше 60 % даже при высокой концентрации 2,08 мг/мл (Таблица 2.15).

Таблица 2.14. Гемолитическая активность p(SVCA-SS).

$C(p(SVCA-SS))$, мг/мл	Гемолиз, %
1,87	3,3
0,94	2,1
0,45	1,4
0,23	1,0

Таблица 2.15. Определение цитотоксичности p(SVCA-SS).

$C(p(SVCA-SS))$, мг/мл	Жизнеспособность клеток WI-38, % от контроля
2,08	69
1,04	75
0,50	82
0,25	88

Концентрация глутатиона в раковых клетках в 100-1000 раз больше, чем в нормальных клетках, и равен около 8 мМ [226]. Для проверки редокс-чувствительности наноконтейнера к раствору p(SVCA-SS) концентрацией 0,6 мг/мл добавили раствор GSH 8 мМ. Согласно данным ДСР, после добавления GSH на графике распределения гидродинамического диаметра наблюдаются частицы различного размера в диапазоне от 100 до 500 нм, а индекс полидисперсности возрастает от 0,19 до 0,78, что подтверждает распад p(SVCA-SS) в присутствии GSH (Рис. 2.54).

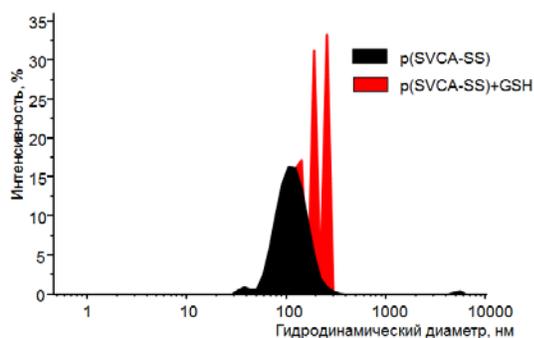


Рис. 2.54. Распределение частиц p(SVCA-SS) по гидродинамическому диаметру до и после добавления GSH, $C(p(SVCA-SS)) = 0,6$ мг/мл, $C(GSH) = 8$ мМ.

p(SVCA-SS) использовали в качестве наноконтейнера для инкапсуляции DOX. Для этого провели синтез p(SVCA-SS) в присутствии DOX. Водный раствор DOX (1,88 мг в 3 мл) смешали с 15 мкл диаллилдисульфида. После двадцатиминутной гомогенизации растворитель удалили при пониженном давлении. К полученной смеси добавили раствор SVCA (2,5 мМ, 1 мл). Смесь обрабатывали ультразвуком и продували аргоном в течение 90 минут для создания стабильной микроэмульсии. После тридцатиминутного нагревания при 70 °С к микроэмульсии добавили инициатор $(NH_4)_2S_2O_8$. Через 24 часов нагревания раствор диализировали для удаления неинкапсулированного DOX. В результате получены полимерные наносферы с инкапсулированным

доксорубицином – DOX@p(SVCA-SS) (Рис. 2.55). Эффективность связывания $EE\%$ составила 26 %, а емкость связывания $LC\%$ - 3.25 %.

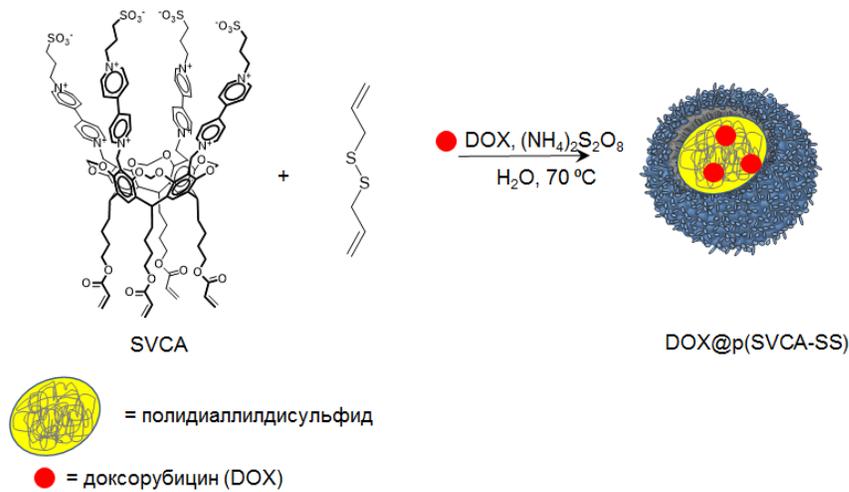


Рис. 2.55. Схема получения DOX@p(SVCA-SS).

Спектр возбуждения DOX@p(SVCA-SS) по форме совпадает со спектром свободного доксорубицина (Рис. 2.56(A)). При этом интенсивность испускания связанного доксорубицина в восемь раз ниже по сравнению со свободным. Низкая интенсивность может быть вызвана несколькими причинами: самотушением из-за высокой концентрации DOX, находящегося внутри ядра, или тушением виологеновыми фрагментами, при расположении DOX на поверхности наносфер. Где бы не располагался DOX при добавлении GSH (8 мМ) наблюдается увеличение флуоресценции DOX, что указывает на его выход из ограниченного пространства в раствор после восстановления наносфер (Рис. 2.56(Б, В)).

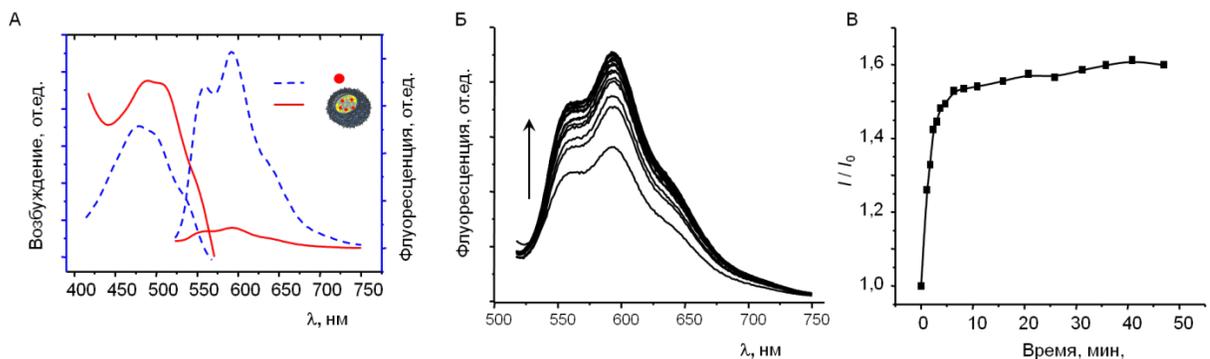


Рис. 2.56. (А) Спектры возбуждения и флуоресценции DOX@p(SVCA-SS) (красные сплошные линии) и DOX (синие пунктирные линии); (Б) временные спектры флуоресценции DOX@p(SVCA-SS) после добавления GSH; (В) Изменение интенсивности флуоресценции при 590 нм после добавления GSH, $C(\text{DOX}) = 0,2 \text{ мМ}$, $C(\text{GSH}) = 8 \text{ мМ}$, H_2O .

Инкапсуляция DOX в структуру полимерного наноконтейнера не влияет на его цитотоксичность (Таблица 2.16). IC₅₀ DOX по отношению к здоровым клеткам печени и раковым клеткам M-Hela составляет 0,003 и 0,002 мМ, соответственно. Для DOX, инкапсулированного в структуру полимерной наносферы, IC₅₀ по отношению к обоим типам клеток составляет 0,003 мМ.

Таблица 2.16. Цитотоксичность DOX, DOX@p(SVCA-SS) и p(SVCA-SS).

	IC ₅₀	
	раковые клетки M-Hela	клетки печени
DOX	0,002 мМ	0,003 мМ
DOX@ p(SVCA-SS)	0,003 мМ (по DOX)	0,003 мМ (по DOX)
p(SVCA-SS)	> 0,75 мг/мл	> 0,75 мг/мл

Инкапсуляция DOX в наноконтейнер улучшает проникновение DOX в раковые клетки M-Hela, как видно из данных проточной цитометрии (Рис. 2.57). Внутриклеточная концентрация DOX увеличилась в практически в 4-5 раз после воздействия на клетки DOX@p(SVCA-SS), по сравнению с обработкой клеток свободным DOX.



Рис. 2.57. Данные цитометрии для образцов DOX и DOX@p(SVCA-SS) после 24 часов инкубации.

Для наблюдения морфологических изменений в клетках M-Hela использовали флуоресцентную микроскопию с использованием клеток, ядро которых окрашено бисбензимином (Hoechst 33342). Как показано на Рис. 2.58 свободный DOX локализуется, как и ожидаемо, в ядре раковых клеток. Хотя границы ядра клеток размыты, что говорит о их частичном повреждении, существенных морфологических изменений в клетках после 24 обработки DOX не обнаружено.

Напротив, после обработки клеток инкапсулированным доксорубицином DOX@p(SVCA-SS) морфологические изменения значительны. Как видно из микроскопических данных ядро клеток полностью разрушено, а бисбензимида и DOX распределены по всей цитоплазме клеток. Полученные результаты ясно демонстрируют, что p(SCVA-SS) не только улучшает проникновение доксорубицина в клетки, но и индуцирует апоптоз клеток M-Hela.

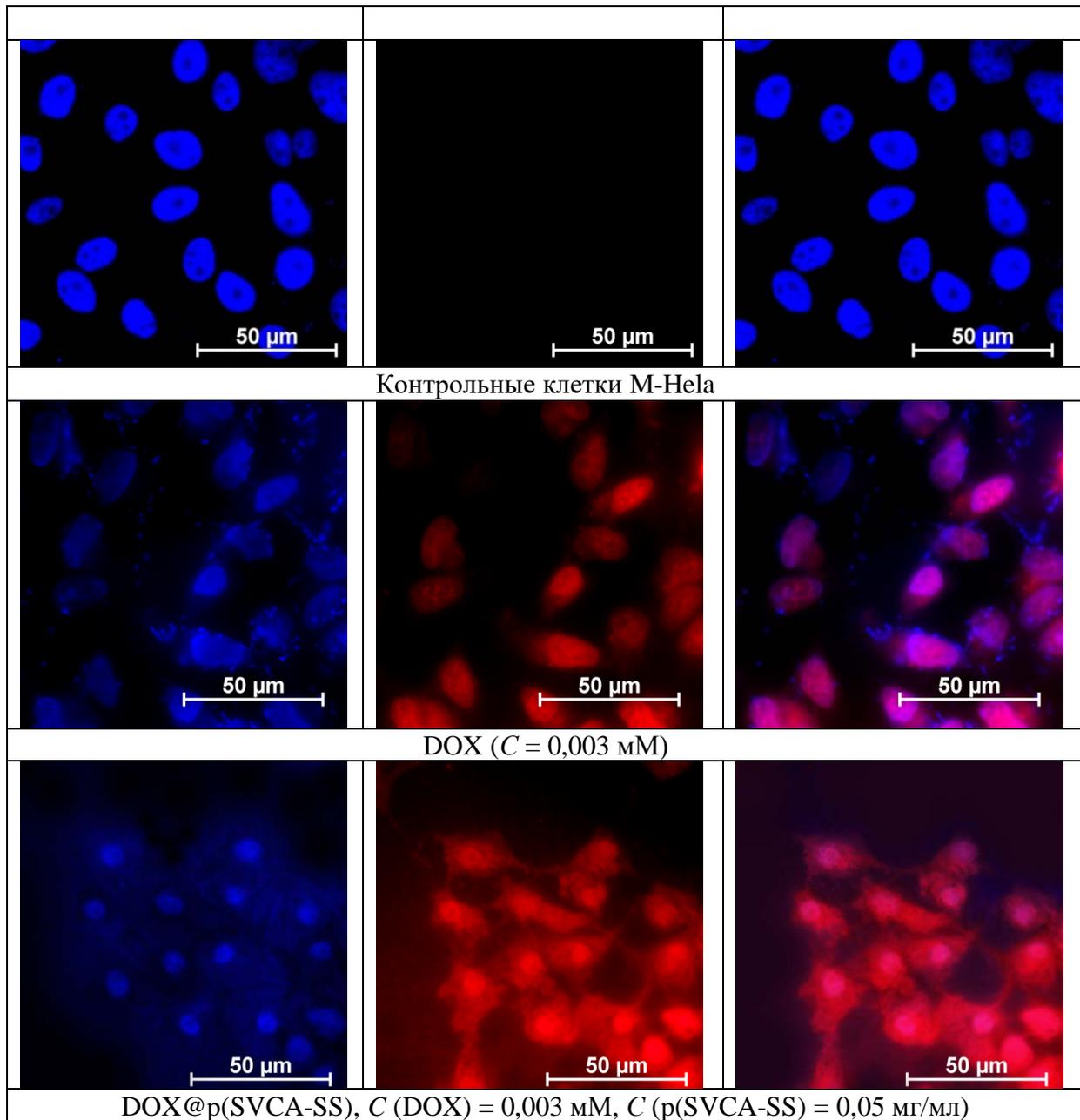


Рис. 2.58. Изображения флуоресцентной микроскопии клеток линии M-Hela, окрашенных бисбензимидазом (Hoechst 33342): контрольного образца, после инкубации в растворе DOX ($C = 0,003 \text{ mM}$) и после инкубации в растворе DOX@p(SVCA-SS) ($C(\text{DOX}) = 0,003 \text{ mM}$, $C(\text{p(SVCA-SS)}) = 0,05 \text{ мг/мл}$)

Таким образом, получен редокс-управляемый наноконтейнер для доставки доксорубицина. Наноконтейнер показывает хорошую биосовместимость. Он не токсичен, и гемолитически неактивен. Он содержит гидрофобное ядро, чувствительное на действие восстановителя глутатиона. Наноконтейнер был успешно применен для связывания доксорубицина, и показано, что в присутствии глутатиона контейнер разрушается и лекарство выходит из полости контейнера. При этом включение доксорубицина в структуру улучшает его противоопухолевую активность и способствует разрушению ядра раковых клеток.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Приборы и методы

^1H , ^{13}C ЯМР спектры, ИК-спектры, масс-спектры, порошковые дифрактограммы и данные элементного анализа регистрировались в коллективном спектро-аналитическом Центре изучения строения, состава и свойств веществ и материалов ФГБУН Институт органической и физической химии имени А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН.

^1H и ^{13}C ЯМР спектры регистрировались на ЯМР-Фурье спектрометре Avance-600, Bruker, Германия.

ИК спектры записывались на спектрометре Tensor 27 (Bruker, Германия) в таблетках KBr в диапазоне длин волн от 4000 до 400 cm^{-1} .

Масс-спектры МАЛДИ были получены на масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия). В качестве матрицы при регистрации масс-спектров МАЛДИ использовалась 2,5-дигидроксибензойная кислота (ДНВ).

Элементный анализ осуществлялся на CHNS анализаторе EuroEA3028-NT-OM производства «Eurovector SpA», Италия.

Размеры, молекулярные массы и дзета-потенциалы исследуемых систем определяли на фотонном корреляционном спектрометре динамического рассеяния света ZetaSizer Nano, Malvern, Великобритания. Для анализа размеров, молекулярной массы и дзета-потенциала использовано программное обеспечение Malvern dispersion technology, версия 5.10.

Кондуктометрические измерения проводили на кондуктометре FiveEasy FE30, METTLER Toledo, США.

pH метрические измерения проводились на pH-метре Orion 2-Star, Thermo electron corporation, США.

УФ-видимые спектры регистрировали на спектрометре Lambda 25, Perkin–Elmer, США.

Для регистрации флуоресцентных спектров использовался спектрофлуориметр CaryEclipse, Agilent, США. Во всех экспериментах использовалась кварцевая кювета с оптическим ходом 1 см. Все измерения проводились при температуре 25 °С. Для регистрации спектров испускания: раствор родамина Б облучали при 556 нм, спектр регистрировали от 560 до 800 нм; раствор флуоресцеина облучали при 475 нм, спектр регистрировали от 480 до 800 нм; раствор пирена облучали при 317 нм,

спектр регистрировали от 340 до 500 нм; раствор ПТС облучали при 360 нм, спектр регистрировали от 370 до 550 нм; раствор инсулина облучали при 275 нм, спектр регистрировали от 290 до 350 нм; раствор доксорубина облучали при 490 нм, спектр регистрировали от 524 до 800 нм. Для регистрации спектров возбуждения: раствор родамина Б облучали от 520 до 650 нм, испускание регистрировали при 720 нм; раствор флуоресцеина облучали от 365 до 550 нм, испускание регистрировали при 680 нм; раствор пирена облучали от 220 до 390 нм, спектр регистрировали при 420 нм; раствор доксорубина облучали от 350 до 590 нм, испускание регистрировали при 595 нм.

Спектры кругового дихроизма регистрировались на спектрометре кругового дихроизма J-1500 в диапазоне от 205 до 250 нм. В качестве базового раствора использовалась дистиллированная вода. Для регистрации спектров кругового дихроизма использовалась кювета с длиной оптического пути 1 см.

Порошковые дифрактограммы получены на автоматическом рентгеновском дифрактометре Bruker D8 Advance, оборудованной приставкой Vario и линейным координатным детектором Vantec. Обработка полученных данных выполнена с использованием пакета программ EVA [227]. Полнопрофильный анализ дифракционных данных по методу Ритвельда и оценка размерных характеристик кристаллитов наночастиц выполнены с использованием программного пакета TOPAS [228].

Изображения АСМ и ПЭМ, спектры энергодисперсионного анализа получены к.х.н., н.с. лаборатории электрохимического синтеза Низамеевым И.Р. и д.х.н., с.н.с. лаборатории электрохимического синтеза Кадиловым М.К. Изображения ПЭМ получены на просвечивающем электронном микроскопе Libra 120, Carl Zeiss, Германия. Регистрация спектров энергодисперсионного анализа проводилась на энергодисперсионном флуоресцентном рентгеновском спектрометре EDX-800HS2, Shimadzu, Япония.

Определение содержания металлических наночастиц в композитах проводилась методом атомно-эмиссионной спектроскопии к.х.н., н.с. лаборатории электрохимического синтеза Холиным К.В. Элементный анализ проводился на атомно-эмиссионном спектрометре iCAP 6300 DUO.

Биологические исследования образцов проводились в лаборатории микробиологии ИОФХ им. А.Е. Арбузова к.б.н., с.н.с., Волошиной А.Д. и м.н.с. Сапуновой А.С. Образцы исследованы на биологическую активность против эритроцитов крови человека (hRBC). Клеточное поглощение анализировали с помощью проточной цитометрии (Guava easyCyte 8HT, США). Проточная

цитометрия была использована для создания статистики по поглощению препарата раковыми клетками M-Hela. Необработанные клетки использовали в качестве отрицательного контроля.

Цитотоксичность образцов изучена на клетках печени человека и на культуре клеток WI-38 VA 13 subline 2RA (легкое эмбриона человека) из Коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Определение цитотоксического действия р(SVCA-SS) проводили при помощи многофункциональной системы Cytell Cell Imaging (GE Healthcare Life Science, Швеция), используя приложение Cell Viability BioApp, на основании интенсивности флуоресценции. Степень подавления роста клеток высчитывали по формуле:

$$N\% = \left(1 - \frac{\text{Опыт}}{\text{Контроль}}\right) \cdot 100\%$$

По кривой зависимости роста культуры клеток от концентрации соединения определяли IC₅₀, то есть концентрацию соединений, вызывающие торможение роста клеток на 50%.

3.2. Получение исходных реагентов

RA, C₁₀H₂₁, C₁₀H₁₉, FcRA, Bг-кавитанд получали по известным методикам [181, 185-187, 192]. Фосфатный буферный раствор (ФБ) и универсальный буфер изготавливали по методике [229].

3.2.1. Получение C₁₀H₂₁RA

К смеси 5 г (4,8 ммоль) децилрезорцинарена, 0,8 г (4,8 ммоль) йодида калия и 6,6 г (48 ммоль) карбоната калия в 100 мл ацетона медленно добавляли 8 г (48 ммоль) этилового эфира бромуксусной кислоты, растворенного в 100 мл ацетона. Реакционную смесь нагревали при температуре 60 °С в течение 24 часов. После удаления растворителя остаток растворили в этилацетате, три раза промыли водой, высушили над сульфатом магния и удалили растворитель при пониженном давлении. Образовавшееся масло растворили в 50 мл этилового спирта и добавили 2 мл 10 н NaOH. Реакционную смесь нагревали при температуре 80 °С в течение двух дней. Осадок отфильтровали, промыли этанолом и высушили при пониженном давлении. Выход: 4,5 г (57 %). Т.пл. > 350 °С. Спектр ¹H ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 6,72 (4H, ArH); 6,20 (4H, ArH); 4,63 (4H, ArCH₂Ar); 4,20 (16H, CH₂); 1,75 (8H, CH₂); 1,13 (64H, (CH₂)₈); 0,77 (12H, CH₃). Спектр ¹³C ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 177; 154; 127; 125; 100; 69; 35; 32; 29; 22; 14. ИК-спектр (KBr, ν, см⁻¹): 2923, 2853 (C-H); 1605, 1421 (C=O), 1499 (C=C), 719 (C-H). Элементный анализ для C₈₄H₁₁₂Na₈O₂₄: вычислено, %; C 59,71; H 6,68; Na 10,88; найдено, %: C 59,41; H 6,24; Na 11,30.

3.2.2. Получение $C_{10}H_{19}RA$

К смеси 5 г (4,8 ммоль) деценилрезорцинарена, 0,8 г (4,8 ммоль) йодида калия и 6,6 г (48 ммоль) карбоната калия в 100 мл ацетона добавили раствор 8 г (48 моль) этилового эфира бромуксусной кислоты, растворенного в 100 мл ацетона. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов при 60 °С. Отделили осадок и отогнали растворитель с фильтрата при пониженном давлении. Остаток пропустили через хроматографическую колонку с использованием в качестве элюента этилацетат/гексан в соотношении 1/1. Выделенное масло растворили в 50 мл этилового спирта и добавили 2 мл 10 н NaOH. Реакционную смесь нагревали при температуре 80 °С в течение двух дней. Осадок отфильтровали, промыли этанолом и высушили при пониженном давлении. Выход: 4,0 г (49.5 %). Т.пл. > 350 °С. Спектр 1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 6,66 (4H, ArH); 6,26 (4H, ArH); 5,67 (4H, $CH=CH_2$); 4,82 (8H, $CH=CH_2$); 4,54 (4H, Ar CH_2 Ar); 4,12 (16H, OCH_2COO); 1,77 (8H, CH_2); 1,24 (56H, $(CH_2)\times 7$). Спектр ^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 174; 152; 136; 125; 123; 111; 98; 66; 32; 31; 27; 26. ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 2927, 2855 (C-H); 1608, 1332 (C=O); 1501, 1424 (C=C); 994, 882 (C-H). Масс-спектр MALDI-TOF для $C_{84}H_{104}O_{24}^{8-}$: вычислено, m/z : 1498; найдено, m/z : 1527 ($C_{84}H_{104}O_{24}^{8-} + Na^+ + 6H^+$); 1572 ($C_{84}H_{104}O_{24}^{8-} + 3Na^+ + 6H^+$); 1593 ($C_{84}H_{104}O_{24}^{8-} + 4Na^+ + 4H^+$); 1615 ($C_{84}H_{104}O_{24}^{8-} + 3K^+$). Элементный анализ для $C_{84}H_{104}Na_8O_{24}$: вычислено, %: C 60,00; H 6,23; Na 10,94; найдено, %: C 60,05; H 6,27; Na 10,54.

3.2.3. Получение C_3H_6OH-RA

К смеси 7 г (9,7 ммоль) пропиолрезорцинарена, 10,74 г (77,6 ммоль) карбоната калия и 1,6 г (9,7 ммоль) йодида калия в 100 мл ацетона при перемешивании прикапали 13 г (77,6 ммоль) этилового эфира бромуксусной кислоты в 100 мл ацетонитрила. Смесь перемешивали в течение 24 часов при 80 °С. Растворитель удалили при пониженном давлении. Маслянистый остаток растворили в 50 мл этилового спирта и добавили 2 мл 10 н NaOH. Смесь нагревали при 80 °С в течение 24 часов. Осадок отфильтровали, промыли этиловым спиртом и высушили. Выход: 8,3 г (63 %). т.пл. > 350 °С. Спектр 1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 6,74 (с, 4H, ArH) 6,30 (с, 4H, ArH); 4,59 (т, 4 H, ArHAr); 4,15 (с, 16 H, OCH_2COO); 3,91 (с, 4H, OH); 3,58 (т, 8H, $CHCH_2CH_2CH_2OH$); 1,89 (т, 8H, $CHCH_2CH_2CH_2OH$); 1,55 (т, 8H, $CHCH_2CH_2CH_2OH$). Спектр ^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 174; 152; 124; 123; 98; 66; 59; 32; 27; 14. ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 2938, 2866 (C-H); 1608, 1334 (C=O); 1501, 1423

(C-C); 834 (C-H). Масс-спектр MALDI-TOF для $C_{56}H_{62}O_{28}^{8-}$: вычислено, m/z : 1183; найдено, m/z : 1206 ($C_{56}H_{62}O_{28}^{8-} + Na^+ + 2H^+$); 1231 ($C_{56}H_{62}O_{28}^{8-} + 2Na^+ + 2H^+$). Элементный состав для $C_{56}H_{56}Na_8O_{28}$: вычислено, %: C 49,42; H 4,15; Na 13,51; найдено, %: C 49,00; H 3,98; Na 13,91.

3.2.4. Получение SRA

К 3,45 г (27 ммоль) Na_2SO_3 в 5 мл воды добавили 0,823 г (27 ммоль) параформа и смесь нагревали при 80 °С до полного растворения параформа. К раствору добавили суспензию пропиол резорцинарена (2 г, 2,7 ммоль) в 30 мл этилового спирта. Суспензию перемешивали при 80 °С в течение 6 часов. Осадок отфильтровали и растворили в воде. pH водного раствора довели до 5-6 добавлением соляной кислоты. Раствор очищали диализом три раза по 30 минут, используя диализный мешок с порами 1000 Да. Растворитель удалили при пониженном давлении, а остаток высушили. Выход: 2,4 г (73 %). Т.разл. > 250 °С. Спектр 1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7,21 (с, 4H, ArH); 4,50 (т, 4H, ArCH₂Ar); 4,29 (с, 8H, ArCH₂SO₃); 3,65 (т, 8H, CHCH₂CH₂CH₂OH); 2,21 (д, 8H, CHCH₂CH₂CH₂OH); 1,57 (м, 8H, CHCH₂CH₂CH₂OH). Спектр ^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 152; 125; 122; 108; 62; 48; 34; 30; 29. ИК спектр (KBr, ν , см⁻¹): 3500-3250 (O-H); 2939, 2871 (C-H); 1473, 1414 (C-C); 1213, 1150 (C-O); 1041 (S=O). Масс-спектр MALDI-TOF для $C_{44}H_{52}O_{24}S_4^{4-}$: вычислено, m/z : 1093; найдено, m/z : 1095 ($C_{44}H_{52}O_{24}S_4^{4-} + 2H^+$); 1116 ($C_{44}H_{52}O_{24}S_4^{4-} + Na^+$); 1139 ($C_{44}H_{52}O_{24}S_4^{4-} + 2Na^+$). Элементный анализ для $C_{44}H_{52}Na_4O_{24}S_4$: вычислено, %: C, 44.59; H, 4.42; Na, 7.76; S, 10.82; найдено, %: C, 44.26; H, 4.68; Na, 7.89; S, 10.89.

3.2.5. Получение MEGRA

Смесь 2,2 г (11,3 ммоль) MEG и 0,34 г (11,3 ммоль) параформа в этиловом спирте нагревали при 70 °С до полного растворения реагентов. К полученному раствору медленно добавили 2 г пропиол резорцинарена (2,8 ммоль) в 30 мл этилового спирта. Полученную суспензию нагревали при 70 °С в течение 24 часов. После удаления растворителя остаток растерли в ацетоне, отфильтровали и высушили. Выход: 3,2 г (74 %). Т.разл. = 196 °С. Спектр 1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7,2 (4H, ArH); 4,5-4,1 (20H, ArCH₂Ar, ArCH₂NCH₂); 3,9-3,5 (24H, NCH₂(CH(OH))₄CH₂OH); 3,20 (8H, CHCH₂CH₂CH₂OH); 2,55 (12H, CH₃N); 2,27 (8H, CHCH₂CH₂CH₂OH); 1,55 (8H, CHCH₂CH₂CH₂OH). Спектр ^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 156; 125; 122; 106; 71; 70; 68; 67; 62; 57; 53; 51; 34; 33; 30. ИК спектр

(KBr, ν , cm^{-1}): 3500-3000 (O-H); 2935, 2870 (C-H); 1608 (C-C); 1459 (C-C); 1047 (C-O). Элементный анализ для $\text{C}_{72}\text{H}_{116}\text{N}_4\text{O}_{32}$: вычислено, %: C 55,80; H 7,54; N 3,62; найдено, %: C 55,35; H 7,58; N 3,14.

3.2.6. Получение натрий сульфатопропил виологена (SV)

К суспензии 3-бормсульфоната натрия (2,88 г, 12,8 ммоль) в 20 мл этилового спирта добавили раствор 4,4'-бипиридина (2 г, 12,8 ммоль) в 40 мл этилового спирта. Реакционную смесь перемешивали в инертной атмосфере при 80 °C в течение 8 часов. Осадок отфильтровали и промыли этиловым спиртом. Выход: 2,45 г (50 %). Т.пл. > 300 °C. Спектр ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 9,00-7,90 (32H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{N}$); 4,81 (8H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{N}$); 3,00 (8H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{S}$); 2,49 (8H, $\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2$). Спектр ^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 154; 150; 145; 142; 126; 122; 59; 47; 26. ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 3500, 2880 (C-H); 1645-1500 (C-C); 1051 (S=O); 1250-1150 (SO_3). Элементный анализ для $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{NaO}_3\text{S}^{8+}$: вычислено, %: C 40,96; H 3,70; Br 20,96; N 7,35; Na 6,03; S 8,41; найдено, %: C 40,10; H 4,01; Br 20,45; N 6,47; Na 6,98; S 7,53.

3.2.7. Получение SVCA-ОН

К раствору бромметил кавитанда (2 г, 1,46 моль) в 30 мл ДМФА добавили 2,24 г SV (5,86 моль), растворенного в 20 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали в инертной атмосфере при 80 °C в течение 8 часов. Растворитель отогнали при пониженном давлении. Остаток растворили в 100 мл этилового спирта и добавили 15 мл 37 % соляной кислоты. Реакционную смесь перемешивали при 70 °C в течение 4 часов. Осадок отфильтровали и промыли этиловым спиртом. Выход: 2,05 г (69,3 %). Т.пл. > 350 °C. Спектр ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 9,20-8,55 (32H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{N}$); 7,69 (4H, $\text{H}_{\text{аром}}$); 6,32 (4H, $\text{OCH}_2\text{O}_{\text{арк}}$); 5,77 (8H, C- $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{-N}$); 4,88 (8H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{N}$); 3,54 (8H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{OH}$); 3,01 (8H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{-S}$); 2,53 (8H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{-S}$); 2,41 ($\text{CH}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$); 1,61 (8H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{O}$); 1,32 (8H, $\text{CH}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2$). Спектр ^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 153; 150; 145; 142; 139; 127; 126; 122; 119; 100; 61; 60; 55; 47; 34; 31; 26; 23. ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 3450, 2950 (C-H), 1640, 1560, 1505 (C-C), 1205 (SO_3), 1045 (S=O). Элементный анализ для $\text{C}_{104}\text{H}_{116}\text{N}_8\text{O}_{24}\text{S}_4^{4+}\cdot 4\text{Cl}^-$: вычислено, %: C 58,58; H 5,48; N 5,26; S 6,02; Cl 6,65; найдено, %: C 58,28; H 5,50; N 5,35; S 5,78; Cl 6,38.

3.2.8. Получение SVCA

К 0,37 г (0,17 ммоль) SVCA-ОН добавили 7 мл ацетонитрила. Суспензию продували аргоном при перемешивании в течение 20 минут. Добавили 172 мг (0,24 мл, 1,7 ммоль) триэтиламина и 154 мг (0,14 мл, 1,7 ммоль) акрил хлорида. Реакционную смесь перемешивали при 25 °С в течение 24 часов. Осадок отфильтровали и промыли ацетонитрилом. Выход 0,33 г (83 %). Т.пл. > 350 °С. ¹H ЯМР спектр (D₂O, δ, м.д.): 9,25-8,53 (32H, СНN); 7,69 (4H, H_{аром}); 6,39 (4H, OСН₂O_{акс.}); 6,30-5,70 (СН=СН₂, CСН₂N); 4,88 (8H, СН₂N); 4,06 (8H, СН₂OAc); 3,00 (8H, СН₂-S); 2,52 (8H, СН₂СН₂-S); 2,38 (СНСН₂); 1,70 (8H, СН₂СН₂O); 1,37 (8H, СHСН₂СН₂). ИК спектр (KBr, ν, см⁻¹): 3430, 2870 (С-Н), 1715 (С=O), 1640, 1560 (С-С), 1205 (SO₃), 1040 (S=O). Элементный анализ для C₁₁₆H₁₂₄N₈O₂₈S₄⁴⁺·4Cl⁻: вычислено, % С 58,33; Н 5,32; N 4,77; S 5,46; Cl 6,04; найдено, %: С 58,00; Н 5,62; N 4,95; S 5,24; Cl 6,04.

3.3. Получение и исследование супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров

3.3.1. Супрамолекулярные и полимерные наноконтейнеры на основе карбоксилатных производных резорцинаренов

Определение ККА RRA кондуктометрическим методом

Растворы для определения ККА готовили методом последовательного разбавления 5 мМ раствора резорцинарена в 1,5 раза. Для этого приготовили 6 мл 5 мМ раствора растворением 0,03 ммоль сухого резорцинарена в 6 мл деионизированной воды Millipore. Для последующего разбавления из раствора отливали 2 мл раствора и добавляли такое же количество деионизированной воды. Электропроводность растворов измеряли три раза и за истинное значение принимали среднее арифметическое. Диапазон используемых концентраций 3,4 мкМ ÷ 5 мМ.

Определение ККА RRA с использованием красителя Оранж ОТ

Приготовили серию растворов RRA с концентрациями 0,01÷2 мМ (V = 2 мл) методом последовательного разбавления 2 мМ раствора RRA. В каждый раствор добавили Оранж ОТ на кончике шпателя. Растворы выдержали в течение 12 часов. Снимали УФ спектр отфильтрованных

растворов в диапазоне от 300 до 650 нм. ККА определяли из графика зависимости оптической плотности при 491 нм от концентрации.

Получение р(C₃H₆ОН-В-ОI)

13,61 мг (10 мкмоль) C₃H₆ОН-РА и 0,61 мг (5 мкмоль) ВА растворили в 2 мл ФБ (рН 8,5). К полученному раствору добавили 50 мкл триолеина. Смесь перемешивали на вортексе при 3500 обр./мин в течение 40 с, затем продували аргоном и обрабатывали ультразвуком в течение 90 минут. Дисперсионный раствор перемешивали при 37 °С в течение 3 дней. Полученную дисперсию очищали диализом три раза по 30 минут с использованием диализного мешка 2000 Да. После удаления растворителя при пониженном давлении остаток несколько раз промывали ацетоном для удаления избытка триолеина. Выход: 42 мг (67 %). Т.пл. > 300 °С. Спектр ¹Н ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 7,5 – 6,3 (уш.с. АгН); 5,3 (уш.с. Н_{триолеин}); 4,6 (т, АгСН₂Аг); 4,14 (с, СН₂); 2,3 (уш.с. Н_{триолеин}); 2,1 (уш.с. Н_{триолеин}); 1,87 (м, СН₂); 1,54 (м, СН₂); 1,3, 0,85 (уш.с. Н_{триолеин}). Спектр ¹³С ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 178; 177; 173; 158; 130; 127; 126; 101; 100; 70; 69; 35; 31; 30; 29; 23; 14. ИК-спектр (КВг, ν, см⁻¹): 3403 (О-Н); 2938, 2872 (С-Н); 1610, 1338 (С-О); 1502, 1424 (С-С); 859 (С-Н). Элементный анализ для (5C₅₆H₅₆Na₈O₂₈ × 2C₆H₇VO₂ × 20C₅₇H₁₀₄O₆ × 5Na₂HPO₄ × 2KH₂PO₄ × 9H₂O)_n: вычислено, %: С 49,44; Н 5,65; В 0,26; К 0,94; Na 11,00; Р 2,22; найдено, %: С 49,58; Н 5,74; В 0,28; К 1,08; Na 11,28; Р 2,37.

Остаток растворили в 2 мл воды и использовали в качестве рабочего раствора р(C₃H₆ОН-В-ОI).

Получение р(C₃H₆ОН-В-St)

13,61 мг (10 мкмоль) C₃H₆ОН-РА и 0,61 мг (5 мкмоль) ВА растворили в 2 мл ФБ с рН 8,5. К раствору добавили 50 мкл стирола. Смесь перемешивали на вортексе при 3500 обр./мин в течение 40 с, затем продували аргоном и обрабатывали ультразвуком в течение 90 минут. Дисперсионный раствор перемешивали при 70 °С в течение 24 часов. Полученную дисперсию очистили диализом три раза по 30 минут с использованием диализного мешка 2000 Да. После удаления растворителя при пониженном давлении остаток несколько раз промывали ацетоном для удаления избытка стирола. Выход: 14 мг (22 %). Т.пл. > 300 °С. Спектр ¹Н ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 7,7 – 6,2 (уш.с. АгН.); 4,58 (т, АгСН₂Аг); 4,14 (с, ОСН₂СОО); 3,9 – 3,5 (уш.с., Н_{полистирол}); 1,89 (м, СН₂); 1,54 (м, СН₂). Спектр ¹³С ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 178; 177; 154; 133; 130-126; 101; 69; 68; 62; 36; 31; 30. ИК-спектр (КВг, ν, см⁻¹): 2938, 2872 (С-Н); 1610, 1338 (С-О); 1502, 1424 (С-С); 859 (С-Н). Элементный анализ для

$(5C_{56}H_{56}Na_8O_{28} \times 2,5C_6H_7BO_2 \times C_8H_8 \times 4Na_2HPO_4 \times KH_2PO_4 \times 7,5H_2O)_n$: вычислено, %: С 45,19; Н 4,09; Р 1,92; найдено, %: С 44,82; Н 3,99; Р 2,04.

Остаток растворили в 2 мл воды и использовали в качестве рабочего раствора р(C₃H₆ОН-В-St).

Связывание родамина Б и флуоресцеина амфифильными резорцинаренами

В 5 мл 10 мМ раствора RhB (23,95 мг, 50 мкмоль) (или Fl (16,61 мг, 50 мкмоль)) растворили C₁₀H₁₉RA (8,41 мг, 5 мкмоль) (или C₁₀H₂₁RA (8,45 мг, 5 мкмоль)). Смесь перемешивали при 70 °С в течение 24 часов. После этого 1 мл раствора разбавили в 10 раз. 4 мл разбавленного раствора и 4 мл исходного раствора очищали от несвязанного красителя в течение трех дней с использованием диализного мешка 2000 Да.

Связывание красителя полимерными наноконтейнерами

К 1 мл рабочих растворов р(C₃H₆ОН-В-St) (или р(C₃H₆ОН-В-Оl)) добавили 4 мл 12,5 мМ раствора RhB (или Fl). Смесь перемешивали при 70 °С в течение 24 часов. После этого 1 мл полученных разбавляли в 10 раз. 4 мл разбавленного раствора и 4 мл концентрированного раствора очищали диализом от несвязанного красителя в течение трех дней с использованием диализного мешка 2000 Да.

Определение емкости связывания

Концентрацию связанного красителя супрамолекулярными и полимерными наноконтейнерами определяли по оптической плотности в УФ-спектре при 470 и 490 нм для флуоресцеина ($\epsilon = 33800$ и $87000 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, соответственно) и при 545 нм для родамина Б ($\epsilon = 106\,000 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Концентрацию связанного красителя определяли по формуле:

$$C_{\text{св}} = \frac{A_{\text{Dye}}}{\epsilon_{\text{Dye}}} \cdot 1000,$$

где $C_{\text{св}}$ – концентрация связанного красителя, мМ, A_{Dye} – оптическая плотность раствора при максимуме поглощения красителя, ϵ_{Dye} – коэффициент мольной экстинкции при максимуме поглощения красителя, $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Емкость связывания супрамолекулярными контейнерами определяли по формуле:

$$LC\% = \frac{C_{\text{св}} \times M}{1000 \times m_{\text{конт}}} \cdot 100\%,$$

где $C_{\text{св}}$ – концентрация связанного красителя, мМ, M – молекулярная масса красителя, г/моль, $m_{\text{конт}}$ – масса контейнеров в 1 мл раствора, что составляет 0,17 мг и 1,7 мг до ККА и после ККА, соответственно.

Емкость связывания полимерными контейнерами определяли по формуле:

$$LC\% = \frac{C_{\text{св}} \times M}{1000 \times (m_{\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}} + m_{\text{BA}})} \cdot 100\%,$$

где $C_{\text{св}}$ – концентрация связанного красителя, мМ, M – молекулярная масса красителя, г/моль, $m_{\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}} + m_{\text{BA}}$ – масса $\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}$ и BA в 1 мл раствора, что составляет 0,14 мг и 1,4 мг до ККА и после ККА, соответственно.

3.4. Получение и исследование нанокомпозитов с наночастицами серебра

3.4.1. Получение наночастиц серебра, стабилизированных амфифильными резорцинаренами

В ультразвуковой бане к 10 мл водного раствора, содержащего 0,42 мг (0,25 мкмоль) $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$ или 0,42 гамм (0,25 мкмоль) $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{RA}$ и 0,00042 гамм (2,5 мкмоль) AgNO_3 , добавили NaBH_4 (1,89 мг, 50 мкмоль). Смесь выдерживалась при комнатной температуре в течение суток. Растворы очистили диализом три раза по 30 минут с использованием диализного мешка 2000 Да. Выход 72-73 %.

Полученные растворы использовались в качестве рабочего раствора $\text{Ag}@C_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$ (или $\text{Ag}@C_{10}\text{H}_{21}\text{RA}$).

Для выделения частиц в твердом виде раствор концентрировался в десять раз и центрифугировался.

3.4.2. Получение наночастиц серебра, стабилизированных полимерными наноконтейнерами $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ и $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$

К 0,2 мл рабочего раствора полимерного наноконтейнера $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ (или $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$) добавили 1 мл 10 М раствора нитрата серебра, 5,8 мл воды и 3 мл 16,7 мМ аскорбиновой кислоты. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение суток. Растворы

очищали диализом три раза по 30 минут с использованием диализного мешка 2000 Да. Выход 64-65 %.

Полученные растворы были использованы в качестве рабочего раствора Ag@p(C₃H₆OH-B-OI) (или Ag@ p(C₃H₆OH-B-St)).

Для получения наночастиц серебра в твердом виде раствор центрифугировался.

3.4.3. Катализ восстановления *n*-нитрофенола в присутствии Ag@C₁₀H₂₁RA и Ag@C₁₀H₁₉RA

В кварцевую кювету с оптическим ходом 0,5 см добавили 75 мкл 2 мМ *p*-нитрофенола, 1,155 мл H₂O, 150 мкл 50 мМ NaBH₄ и 120 мкл Ag@C₁₀H₂₁RA (или Ag@C₁₀H₁₉RA). Ход реакции восстановления наблюдали по изменению УФ-спектров.

3.4.4. Катализ восстановления *n*-нитрофенола в присутствии Ag@p(C₃H₆OH-B-OI) и Ag@p(C₃H₆OH-B-St)

В кварцевую кювету с оптическим ходом 0,5 см добавили 75 мкл 2 мМ *p*-нитрофенола, 1,245 мл H₂O, 150 мкл 50 мМ NaBH₄ и 30 мкл Ag@p(C₃H₆OH-B-OI) (или Ag@p(C₃H₆OH-B-St)). Ход реакции восстановления наблюдали по изменению УФ-спектров.

3.4.5. Определение константы скорости реакции и каталитической активности

Для определения кинетических параметров реакции реакция восстановления *p*-нитрофенола избытком боргидрида натрия рассматривалась как реакция псевдопервого порядка по нитрофенолу. Кинетическая кривая реакции строилась по изменению оптической плотности при 400 нм, которая пропорциональна концентрации невосстановленного *p*-нитрофенола в растворе. Для определения индукционного периода и константы скорости реакции были построены кривые зависимости $\ln(A/A^0)$ от времени, где A – значение оптической плотности реакционной смеси в момент времени t , A^0 – значение оптической плотности сразу после смешивания реагентов. Константа скорости реакции определялась по тангенсу угла наклона прямой к оси времени после индукционного периода. Мольная каталитическая активность определялась по формуле:

$$K = \frac{k}{n},$$

где K – мольная каталитическая активность, k – константа скорости реакции, n – количество молей Ag^0 ($n = 30$ нмоль).

3.5. Исследование полимерных наноконтейнеров с инкапсулированными субстратами

3.5.1. Получение и исследование $p(\text{SRA-B})$

К водному раствору, содержащему 5,93 г (5 мкмоль) SRA, 1,22 г (10 мкмоль) BA и 0,08 г (0,6 мкмоль) K_2CO_3 , добавили 50 мкл стирола. Смесь продували аргоном в течение 30 минут, обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут и в конце снова продували аргоном 30 минут. Реакционную смесь перемешивали при 100 °С в течение 12 часов. Полученную дисперсию очищали диализом три раза по 30 минут с использованием диализного мешка 2000 Да. В первый раз в качестве диализата использовался раствор K_2CO_3 (7 мМ), в последующие два раза – дистиллированная вода. Растворитель удалили при пониженном давлении. Остаток промыли ацетоном для удаления избытка стирола. Выход: 4,7 мг (66 %). Спектр ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7,7–7,0 (уш.с., ArH, BA, полистирол); 4,6–3,8 (уш.с., ArCH_2Ar , ArCH_2SO_3); 3,8–3,2 (уш.с., $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 2,4–1,0 (уш.с., $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, полистирол). Спектр ^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 162; 131; 127; 72; 68; 62; 61; 52; 47; 30; 29. ИК спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 3500-3300 (O-H); 2932 (C-H); 1600 (C-C); 1191 (C-O); 1048 (S=O). Элементный анализ для $\text{C}_{56}\text{H}_{59}\text{B}_2\text{Na}_4\text{O}_{24}\text{S}_4 \cdot 10\text{K}_2\text{CO}_3$: вычислено, %: C 28,93; H 2,17; B 0,79; K 28,54; Na 3,36; S, 4,68; найдено, %: C 28,54; H 2,29; B 0,87; K 28,44; Na 3,58; S 4,74. Аналогично проводились реакции с 10, 20, 30, 40 и 60 мкл стирола.

Определение значений $pK_{\text{дисс.}}$ и pK_a для SRA и $p(\text{SRA-B})$

К 0,3 мл раствора SRA (1 мМ) или $p(\text{SRA-B})$ (1,4 мг/мл) добавили 2,7 мл универсального буферного раствора с различными значениями pH. Для каждого раствора снимали УФ спектр в интервале от 250 до 600 нм. С использованием программного обеспечения CurTiPot (версия 4.2.3) по значениям оптической плотности при 305 и 352 нм вычислили значения pK .

Получение $\text{Dye}@p(\text{SRA-B})$

В 2 мл воды растворили 5,93 г (5 мкмоль) SRA, 1,22 г (10 мкмоль) BA и 0,08 г (0,6 мкмоль) K_2CO_3 и краситель (5 мМ). К полученному раствору добавили 50 мкл стирола. Смесь продували

аргоном в течение 30 минут, обрабатывали ультразвуком в течение 60 минут, и потом опять продували аргоном в течение 30 минут. Реакционную смесь перемешивали при 100 °С в течение 12 часов. Полученную дисперсию очищали диализом в течение трех дней диализным мешком 2000 Да для удаления инкапсулированного красителя.

УФ-спектр диализата снимался в интервале от 200 до 600 нм. Концентрацию инкапсулированного красителя определяли по формуле:

$$C_{\text{инк}} = C_{\text{общ}} - \frac{A(V_{\text{диализат}} + V_{\text{раствор}})}{\varepsilon \cdot V_{\text{раствор}} \cdot 1000},$$

где $C_{\text{общ}}$ – концентрация красителя, использованное в процессе синтеза, A – оптическая плотность диализата при максимуме поглощения красителя, $V_{\text{диализат}}$ – объем диализата, $V_{\text{раствор}}$ – объем диализуемого раствора, равное объему реакционной смеси, ε – мольный коэффициент экстинкции красителя при максимуме поглощения.

Эффективность инкапсуляции определялась как соотношение концентрации инкапсулированного красителя к концентрации красителя, использованного для синтеза.

pH контролируемое высвобождение Dye из Dye@p(SRA-B)

К 0,3 мл водного раствора Dye@p(SRA-B) (2,7 мг/мл) добавили 2,7 мл универсального буферного раствора с pH 9,0, 7,1, 5,2 и 3,3. Высвобождение красителя наблюдали по изменению флуоресцентных спектров.

Для изучения кинетики выхода красителя проводился диализ 3 мл раствора Dye@p(SRA-B) (0,27 мг/мл) в универсальном буферном растворе с pH 9,0, 7,1, 5,2 и 3,3 с использованием диализного мешка 2000 Да. УФ спектры диализата снимались каждые 30 минут в течение 3 часов в диапазоне от 200 до 600 нм.

Глюкоза контролируемое высвобождение Dye из Dye@p(SRA-B)

К 0,3 мл водного раствора Dye@p(SRA-B) (2,7 мг/мл) добавили 0,3 мл 4 мМ раствора глюкозы и 2,4 мл воды. Флуоресцентный спектр раствора снимали через 0, 1, 2, 5 и 10 минут после смешивания растворов.

Для изучения кинетики выхода красителя проводился диализ 3 мл раствора Dye@p(SRA-B) (0,27 мг/мл) против 4 мМ раствора глюкозы с использованием диализного мешка 2000 Да. Каждые 30 минут в течение 3 часов снимался УФ спектр диализата в интервале от 200 до 600 нм.

Количество вышедшего красителя определялась по формуле:

$$R\% = 10 \cdot \frac{A(V_{\text{диализат}} + V_{\text{раствор}})}{\varepsilon \cdot C_{\text{инк}} \cdot V_{\text{раствор}} \cdot 1000} \cdot 100\%,$$

где A – оптическая плотность диализата при максимуме поглощения красителя, $V_{\text{диализат}}$ – объем раствора глюкозы, $V_{\text{раствор}}$ – объем диализуемого раствора, ε – мольный коэффициент экстинкции красителя при максимуме поглощения, $C_{\text{инк}}$ – концентрация красителя в Dye@p(SRA-B).

3.5.2. Получение и исследование p(6SRA-5B)

Подбор условий синтеза для получения полимерных наноконтейнеров для управляемой доставки инсулина

0,5 мл раствора инсулина (3,47 мг/мл) добавили к 50 мкл триолеина. Смесь гомогенизировали в течение 20 минут в ультразвуковой бане и после этого удалили растворитель при пониженном давлении при температуре 37 °С. К полученной смеси добавили раствор, содержащий SRA (1,25÷30 мМ) и ВА (2,5÷5 мМ) в фосфатном буфере с рН 8,5. Смесь гомогенизировали на вортексе при 3500 обр./мин в течение 10 секунд, затем продували аргоном и обрабатывали ультразвуком в течение 90 минут. Полученную дисперсию перемешивали при 37 °С в течение 3 дней. Проводили диализ раствора один раз 3 часа с использованием диализного мешка 12000 Да для удаления неинкапсулированного инсулина. С диализата отогнали растворитель, снимали спектр ^1H ЯМР остатка в 0,04 об.% растворе ДМФА в D_2O . Интенсивность протонных сигналов инсулина в интервале 3,47-3,55 м.д. остатка относительно внутреннего стандарта ДМФА сравнивали с аналогичным значением для стандартного инсулина. Для получения интенсивности протонных сигналов стандартного инсулина отогнали 0,1 мл раствора стандартного инсулина (3,47 мг/мл) и снимали спектр ^1H ЯМР в 0,6 мл 0,04 об.% растворе ДМФА в D_2O .

Количество инсулина в диализате определяли по формуле:

$$m_{\text{Ins}} = I_{\text{Ins}} \times \frac{m(\text{стандартный Ins})}{I_{\text{Ins}}(\text{стандартный Ins})},$$

где m_{Ins} – масса инсулина в определяемом растворе, мг, I_{Ins} – интенсивность сигналов инсулина в протонном спектре в интервале 3,47-3,55 мдп относительно внутреннего стандарта ДМФА в определяемом растворе, $m(\text{стандартный Ins})$ – масса стандартного инсулина, 0,347 мг, $I_{\text{Ins}}(\text{стандартный Ins})$ – интенсивность сигналов инсулина в протонном спектре в интервале 3,47-3,55 мдп относительно внутреннего стандарта ДМФА в стандартном растворе.

Эффективность инкапсуляции определяли по формуле:

$$EE\% = \frac{m_{Ins}^0 - m_{Ins}}{m_{Ins}^0} \cdot 100\%,$$

где $EE\%$ – эффективность инкапсуляции, %, m_{Ins}^0 – масса инсулина, взятого для проведения реакции, мг, m_{Ins} – масса неинкапсулированного инсулина, определенная из данных ^1H ЯМР спектроскопии, мг.

Емкость наноконтейнеров по отношению к инсулину определяли по формуле:

$$LC\% = \frac{m_{Ins}^0 - m_{Ins}}{m_{SRA} + m_{BA}} \cdot 100\%,$$

где $LC\%$ – емкость связывания, %, m_{Ins}^0 – масса инсулина, взятого для проведения реакции, мг, m_{Ins} – масса неинкапсулированного инсулина, определенная из данных ^1H ЯМР спектроскопии, мг, m_{SRA} и m_{BA} – масса SRA и BA, использованные в реакции получения полимерных наноконтейнеров с инкапсулированным инсулином, мг, соответственно.

Выход инсулина из полимерных наночастиц

К 0,2 мл раствора добавили 1,8 мл раствора глюкозы (5,55, 8,34 и 11,1 мМ). Раствор термостатировали при 37 °С в течение 40 минут, затем провели диализ раствора для разделения свободного инсулина в течение 3 часов с использованием диализного мешка 12000 Да. Растворитель диализата отогнали при пониженном давлении, температура бани не превышала 37 °С. ^1H ЯМР остатка регистрировали в 0,04 об.% растворе ДМФА в D_2O . Интенсивность протонных сигналов инсулина в интервале 3,47-3,55 м.д. в диализате относительно внутреннего стандарта ДМФА сравнивали с аналогичным значением для стандартного инсулина.

Количество вышедшего инсулина определялось по формуле:

$$m_{Ins} = 10 \times In_{Ins} \times \frac{m(\text{стандартный Ins})}{In(\text{стандартный Ins})},$$

где m_{Ins} – масса инсулина в определяемом растворе, мг, In_{Ins} – интенсивность сигналов инсулина в протонном спектре в интервале 3,47-3,55 м.д. относительно внутреннего стандарта ДМФА в определяемом растворе, $m(\text{стандартный Ins})$ – масса стандартного инсулина 0,347 мг, $In(\text{стандартный Ins})$ – интенсивность сигналов инсулина в протонном спектре в интервале 3,47-3,55 м.д. относительно внутреннего стандарта ДМФА в стандартном растворе.

Получение p(6SRA-5B)

В 2 мл ФБ (рН 8,5) растворили 14,22 мг (12 мкмоль) SRA и 1,22 мг (10 мкмоль) ВА. К полученному раствору добавили 50 мкл триолеина. Смесь гомогенизировали на вортексе при 3500 обр./мин в течение 10 с, потом продували аргоном и обрабатывали ультразвуком в течение 90 минут. Дисперсию перемешивали три дня при температуре 37 °С. Коллоидный раствор очищали диализом один раз в течение 3 часов с использованием диализного мешка 12000 Да. Удалили растворитель при пониженном давлении, остаток несколько раз промыли ацетоном для удаления избытка триолеина. Выход: 20,7 мг (34 %). Т.пл. > 350 °С. Спектр ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7,5–6,9 (уш.с., ArH); 4,5–4,2 (уш.с., ArCH_2Ar , триолеин); 4,2–3,7 (уш.с., ArCH_2SO_3); 3,7–3,3 (уш.с., $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,8–1,6 (уш.с., $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, триолеин), 1,6–1,2 (уш.с., $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, триолеин). ИК спектр (KBr , ν , cm^{-1}): 3000–2800 (O-H); 1610 (C-O); 1540 (C-C); 1190 (C-C); 1040 (C-C); 530 (C-H). Элементный анализ для $6\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{Na}_4\text{O}_{24}\text{S}_4 \times 5\text{C}_6\text{H}_7\text{BO}_2 \times 2\text{C}_{57}\text{H}_{104}\text{O}_6 \times 10\text{H}_2\text{O}$: найдено, %: С 50,19; Н 5,25; S 7,25; вычислено, %: С 50,67; Н 5,99; S 7,96.

Полученный осадок р(6SRA-5B) растворили в 2 мл воды и использовали в качестве рабочего раствора.

Распределение р(6SRA-5B) в плазме

Из цельной крови человека выделили плазму крови осаждением клеток крови центрифугированием в течение 30 минут при обороте 13000 rpm.

0,2 мл рабочего раствора р(6SRA-5B) разбавили до 1 мл добавлением 0,05 ÷ 0,80 мл плазмы и 0,75 ÷ 0 мл 0,9% NaCl. Распределение частиц по размерам определяли по методу ДСР.

Глюкоза-инициируемый распад р(6SRA-5B)

К 0,2 мл рабочего раствора р(6SRA-5B) добавили 1,8 мл глюкозы (5,55, 8,34 и 11,1 mM). Смесь термостатировали при 37 °С в течение 40 минут. Распределение частиц по размерам определяли по методу ДСР.

Получение р(6SRA-5B) с инкапсулированным инсулином Ins@р(6SRA-5B)

К 3 мл раствора инсулина (3,47 мг/мл) добавили 50 мкл триолеина. После двадцатиминутной обработки ультразвуком удаляли растворитель при пониженном давлении при 37 °С. К полученной смеси добавили раствор SRA (14,12 г, 12 мкмоль) и ВА (1,22 г, 10 мкмоль) в 2 мл ФБ (рН 8,5). Смесь

гомогенизировали на вортексе при 3500 обр./мин в течение 10 секунд и продували аргоном и обрабатывали ультразвуком в течение 90 минут. Дисперсию перемешивали при 37 °С в течение 3 дней. Провели диализ коллоидного раствора в течение 3 часов с использованием диализного мешка 12000 Да для удаления неинкапсулированного инсулина.

Очищенный раствор разбавили до 4 мл и использовали в качестве рабочего раствора Ins@p(6SRA-5B).

Глюкоза инициируемое высвобождение инсулина из Ins@p(6SRA-5B)

К 0,4 мл рабочего раствора Ins@p(6SRA-5B) добавили 2,6 мл раствора глюкозы (6,25, 9,38 или 12,5 мМ). Полученную смесь диализировали в течение 3 часов при 37 °С (2 мл диализируемой смеси против 60 мл диализата, диализный мешок 12000 Да). Снимали УФ спектр диализата в интервале от 200 до 350 нм. Для сравнения использовался УФ спектр диализата p(6SRA-5B) после добавления глюкозы. Количество вышедшего инсулина определялась по разнице оптической плотности при 270 нм между диализатом Ins@p(6SRA-5B) и диализатом p(6SRA-5B).

Спектры флуоресценции Ins@p(6SRA-5B) и Ins@p(6SRA-5B) после добавления глюкозы

Для регистрации флуоресцентного спектра Ins@p(6SRA-5B), 19,4 мкл рабочего раствора Ins@p(6SRA-5B) довели до 3 мл водой.

Для регистрации флуоресцентного спектра инсулина после выхода из Ins@p(6SRA-5B), к 0,4 мл рабочего раствора Ins@p(6SRA-5B) добавили 2,6 мл раствора глюкозы (6,25, 9,38 или 12,5 мМ). Полученную смесь диализировали в течение 1,5 часов при 37 °С с использованием диализного мешка 12000 Да. Регистрировали флуоресцентный спектр диализата.

Спектры кругового дихроизма Ins@p(6SRA-5B) и Ins@p(6SRA-5B) после добавления глюкозы

Для регистрации спектра кругового дихроизма Ins после высвобождения из Ins@p(6SRA-5B), к 0,1 мл рабочего раствора Ins@p(6SRA-5B) добавили 0,4 мл раствора глюкозы (12,5 мМ). Раствор термостатировали при 37 °С в течение 30 минут. К полученному раствору добавили 14,8 мл воды. В качестве стандартного образца использовали раствор исходного инсулина ($C \approx 8$ мг/мл).

3.5.3. Получение и исследование *p*(MEGRA-B)

В 3 мл раствора MEGRA (2,99 мг, 18 мкмоль) в ФБ pH 8,5 растворили 1,83 мг (15 мкмоль) ВА. К раствору добавили 75 мкл триолеина. Смесь гомогенизировали на вортексе при 3500 обр./мин в течение 60 секунд, продували аргоном и обрабатывали ультразвуком в течение 90 минут. Микроэмульсию перемешивали при 37 °С в течение 3 дней. Коллоидный раствор очищали диализом три раза по часу с использованием диализного мешка 2000 Да. Растворитель удалили при пониженном давлении, остаток несколько раз промыли ацетоном для удаления избытка триолеина. Выход: 34,3 мг (47,5 %). Т.пл. > 225 °С. Спектр ¹H ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 7,9 (ArH); 7,75–6,7 (уш.с., ArH); 5,32 (уш.с., CH=CH триолеин); 4,5–3,95 (уш.с., CH, CH₂N); 3,9–3,45 (уш.с., СНОН, СН₂ОН); 2,96 (уш.с., триолеин); 2,81 (уш.с., триолеин); 2,26 (уш.с., CH₃N); 2,01 (уш.с., СНСН₂); 1,57 (уш.с., СН₂СН₂СН₂); 1,29 (уш.с., CH₂, триолеин); 0,88 (br, CH₃, триолеин). Спектр ¹³C ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 129; 125; 72; 71; 70; 68; 63; 62; 60; 51; 33. ИК спектр (KBr, ν, см⁻¹): 3600–3000 (O-H); 2925, 2850 (C-H); 1608, 1465 (C-C); 1080 (C-C); 1080 (C-O). Элементный анализ для (6C₇₂H₁₁₆N₄O₃₂ × 5C₆H₅BO₂ × C₅₇H₁₀₄O₆ × 30H₂O)_n: вычислено, %: C 55,89; H 7,91; N 3,01; найдено, %: C 55,40; H 8,26; N 2,54. Осадок растворили в 18 мл воды и использовали как рабочий раствор *p*(MEGRA-B).

pH титрование MEGRA и *p*(MEGRA-B)

К 2,95 мл водного раствора MEGRA (0,1 мМ) добавили 50 мкл 30 мМ NaOH. К полученному раствору добавляли по 0,01 мл 10 мМ HCl. После каждого добавления измеряли pH раствора. Для pH титрования *p*(MEGRA-B), к 0,3 мл рабочего раствора *p*(MEGRA-B) добавили 2,65 мл воды и 0,05 мл 30 мМ раствора NaOH. pH титрование *p*(MEGRA-B) проводили аналогично MEGRA.

Получение *p*(MEGRA-B) с инкапсулированным DOX (DOX@*p*(MEGRA-B))

К раствору 1,32 мг DOX (2,42 мкмоль) в 9 мл этилового спирта добавили 25 мкл триолеина. Смесь гомогенизировали на вортексе при 3500 обр./мин в течение 20 с и обрабатывали ультразвуком в течение 20 минут. Растворитель удалили при пониженном давлении. К смеси добавили раствор MEGRA (9,3 мг, 6 мкмоль) и ВА (0,61 мг, 5 мкмоль) в 1 мл ФБ pH 8,5. Смесь гомогенизировали на вортексе при 3500 обр./мин в течение 60 с, а затем продували аргоном и обрабатывали ультразвуком в течение 90 минут. Микроэмульсию перемешивали при 37 °С в течение 3 дней. Полученный

коллоидный раствор очищали диализом в течение 18 часов с использованием диализного мешка 2000 Да.

Для определения свободного неинкапсулированного DOX рН диализата (3 мл) довели до значения 3 и сняли УФ спектр полученного раствора. Масса неинкапсулированного DOX определяли по формуле:

$$m_{\text{своб.}} = \frac{A_{481} \cdot (V_{\text{диализат}} + V_{\text{раствор}}) \cdot Mm}{\epsilon_{481} \cdot 1000}$$

где $m_{\text{своб.}}$ – масса неинкапсулированного DOX, мг, A_{481} – оптическая плотность диализата при 481 нм, ϵ_{481} – молярный коэффициент поглощения DOX при 481 нм, $10410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $V_{\text{диализат}}$ – объем диализата, мл, $V_{\text{раствор}}$ – объем диализуемого раствора, мл, Mm – молекулярная масса доксорубицина, г/моль.

Массу связанного DOX определяли, как разницу между общим количеством DOX и свободным неинкапсулированным DOX:

$$m_{\text{DOX}} = m_{\text{DOX}}^0 - m_{\text{своб.}}$$

где m_{DOX} – масса связанного DOX, мг, m_{DOX}^0 – масса DOX, взятого для реакции и $m_{\text{своб.}}$ – масса неинкапсулированного DOX, мг.

Емкость наноконтейнеров по отношению к DOX определялась по формуле:

$$LC\% = \frac{m_{\text{DOX}}}{m_{\text{MEGRA}} + m_{\text{BA}}} \cdot 100\%$$

где m_{DOX} – масса связанного DOX, мг, m_{MEGRA} и m_{BA} – масса MEGRA и BA, использованные в реакции получения полимерных наноконтейнеров с инкапсулированным DOX, мг, соответственно.

Эффективность инкапсуляции определяли по формуле:

$$EE\% = \frac{m_{\text{DOX}}}{m_{\text{DOX}}^0} \cdot 100\%$$

где m_{DOX} – масса связанного DOX, мг, m_{DOX}^0 – масса DOX, взятого для реакции, мг.

Для полной очистки DOX@p(MEGRA-B) от свободного неинкапсулированного доксорубицина, раствор DOX@p(MEGRA-B) очищался диализом в течение 1,5 часов (3 мл диализуемого раствора против 3×60 мл диализата). Очищенный раствор разбавили до 44,5 мл так, чтобы $C(\text{DOX})$ в конечном растворе была 0,02 мМ ($C(\text{p(MEGRA-B)}) = 0,21 \text{ мг/мл}$).

3.5.4. Получение и исследование p(SVCA-SS)

К раствору 5,86 мг (2,5 мкмоль) SVCA в 0,95 мл воды добавили 15 мкл диаллилдисульфида. Смесь продували аргоном в течение 30 минут, затем обрабатывали ультразвуком в течение 60 часов. После тридцатиминутного перемешивания при 70 °С в реакционную смесь добавили 0,0005 г $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (3 массовых % от SS) в 50 мкл воды. Микроэмульсию перемешивали при 70 °С в течение 24 часов. Коллоидный раствор очистили диализом три раза по одному часу с использованием диализного мешка 2000 Да. Растворитель удалили при пониженном давлении, остаток промыли несколько раз ацетоном для удаления избытка SS. Выход: 15 мг (72 %). Т.пл. >350 °С. Спектр ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 9,36 (уш.с., $\text{ArH}_{\text{виологен}}$); 8,76 (уш.с., $\text{ArH}_{\text{виологен}}$); 8,30-8,00 (уш.с., ArH), 6,58 (уш.с., OCH_2O), 6,05 (уш.с., ArCH_2N), 5,10 (уш.с., $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$), 3,90 (уш.с., $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$), 3,27 (уш.с., $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$), 2,74 (уш.с., $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$), 2,50-1,25 (уш.с., $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$, полидиаллилдисульфид). Спектр ^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 153; 150; 146; 127; 63; 60; 47; 26. ИК спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 3500-3300 (O-H); 3123-2945 (C-H); 1717 (C=O); 1638 (C-N); 1560-1400 (C-Саром); 1204 (S=O).

GSH-инициируемый распад p(SVCA-SS)

К 3 мл раствора p(SVCA-SS) (0,6 мг/мл) добавили 7,34 мг (24 мкмоль) GSH. Распределение частиц по размеру определяли методом ДСР.

Инкапсуляции DOX в полимерные наноконтейнеры p(SVCA-SS)

Отогнали растворитель из 3,06 мл водного раствора DOX (1,13 мМ, 1,88 мг). К полученному раствору добавили 0,95 мл водного раствора SVCA (0,00586 г, 2,5 мкмоль) и 15 мкл диаллилдисульфида. Смесь продували аргоном в течение 30 минут, затем обрабатывали ультразвуком в течение 60 минут для создания стабильных микроэмульсий. После тридцатиминутного нагревания при 70 °С в смесь добавили 0,00045 г $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (3 массовых % от SS) в 50 мкл воды. Реакционную смесь перемешивали при 70 °С в течение 24 часов. Неинкапсулированный DOX удаляли диализом в течение трех дней с использованием диализного мешка 2000 Да.

Полученный раствор разбавили до 6 мл и использовали в качестве рабочего раствора DOX@(p(SVCA-SS)).

Количество инкапсулированного DOX определяли по данным УФ-спектроскопии. Для этого снимали УФ-спектр рабочего раствора DOX@(p(SVCA-SS)).

$$m_{DOX} = \frac{(A_{481} - A_{481,base}) \cdot V_{p.p.} \cdot M \cdot 1000}{\epsilon_{481} \cdot V_{исх.р.}},$$

где m_{DOX} – масса инкапсулированного доксорубина, мг, A_{481} – оптическая плотность рабочего раствора DOX@p(SVCA-SS) при 481 нм, $A_{481,base}$ – оптическая плотность раствора p(SVCA-SS) при 481 нм, $V_{p.p.}$ – объем рабочего раствора DOX@p(SVCA-SS), мл, ϵ_{481} – коэффициент молярной экстинкции доксорубина при 481 нм, $10410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $V_{исх.р.}$ – объем реакционной смеси, мл.

Эффективность связывания определяли как отношение массы инкапсулированного доксорубина к изначально взятому количеству:

$$EE\% = \frac{m_{DOX}}{m_{DOX}^0} \cdot 100\%,$$

где $EE\%$ – эффективность связывания, %, m_{DOX} – масса инкапсулированного доксорубина, мг, m_{DOX}^0 – масса доксорубина, взятого для проведения реакции, мг.

Емкость p(SVCA-SS) по отношению к DOX определялась по формуле:

$$LC\% = \frac{m_{DOX}}{m_{SVCA} + m_{SS}} \cdot 100\%,$$

где $LC\%$ – емкость наноконтейнера p(SVCA-SS) по отношению к DOX, %, m_{DOX} – масса инкапсулированного доксорубина, m_{SVCA} и m_{SS} – масса SVCA и диаллилдисульфида, использованные в реакции получения полимерных наноконтейнеров с инкапсулированным доксорубином, соответственно.

Для снятия флуоресцентных спектров к 0,4 мл рабочего раствора DOX@(p(SVCA-SS)) добавили 2,6 мл воды так, чтобы концентрация DOX в полученном растворе была 0,02 мМ ($C(\text{SVCA-SS}) = 0,46 \text{ мг/мл}$). Снимался флуоресцентный спектр DOX@(p(SVCA-SS)) до и после добавления 0,0074 г GSH.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Установлены преимущества полимерных наноконтейнеров на основе карбоксилатных производных резорцинарена в связывании органических субстратов, по сравнению с их супрамолекулярными аналогами. Показано, что при высоких концентрациях как полимерные, так и супрамолекулярные наноконтейнеры являются эффективными системами для инкапсуляции гидрофобных субстратов. При низких концентрациях полимерные наносферы эффективны в инкапсуляции гидрофобных субстратов, в то время как полимерные нанокapsулы действенны в связывании гидрофильных субстратов.
2. Созданы композиционные наноматериалы на основе наночастиц серебра и наноконтейнеров, состоящих из карбоксилатных производных резорцинаренов. Композиты на основе супрамолекулярных контейнеров демонстрируют высокую стабильность и каталитическую активность, по сравнению с полимерными аналогами. Реакция восстановления п-нитрофенола в присутствии супрамолекулярных контейнеров протекает без индукционного периода, а наблюдаемая константа реакции больше, чем у композитов на основе полимерных наноконтейнеров.
3. Получены рН- и глюкоза-управляемые полимерные наноконтейнеры на основе сульфатометилрезорцинарена и фенилбороновой кислоты. Показана их высокая эффективность в управляемом высвобождении органических гидрофобных и гидрофильных субстратов, в том числе инсулина при повышенной концентрации глюкозы в среде. При физиологической концентрации глюкозы 5 мМ высвобождается менее 10% инсулина, а при концентрации глюкозы 10 мМ происходит разрушение наноконтейнера и выход до 100% инсулина.
4. Для доставки лекарственного средства доксорубина в раковые клетки линии M-Hela созданы нетоксичные гемолитически неактивные полимерные наноконтейнеры: редокс-управляемая наносфера р(SVCA-SS) на основе сульфатного виологен кавитанда и рН-чувствительный полимерный наноконтейнер р(MEGRA-B) на основе N-метилглюкаминного производного резорцинарена и фенилбороновой кислоты. Установлено, что р(SVCA-SS) разрушается в присутствии глутатиона, что приводит к выходу доксорубина из его полости. Наноконтейнер р(MEGRA-B) стабилен при физиологических значениях рН, а выход лекарства осуществляется при пониженных значениях рН.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BA		
фенилбороновая кислота		26, 45, 65, 74, 82
C ₁₀ H ₁₉ RA		
натрий карбоксилат деценил резорцинарен		44
C ₁₀ H ₂₁ RA		
натрий карбоксилат децил резорцинарен		44
C ₃ H ₆ OH-RA		
натрий карбоксилат пропиол резорцинарен		44
DOX		
доксорубицин		12, 14, 17, 20, 85, 91, 96
Dye		
краситель		69
EE%		
эффективность связывания		70, 75, 79, 85, 97
<i>ex-situ</i>		
метод получения вне какой-либо системы		35
FcRA		
ферроцен резорцинарен		59
Fl		
флуоресцеин		48, 69
Glu		
глюкоза		69, 74
GOx		
глюкозооксидаза		26
GSH		
глутатион		91
Ins		
инсулин		79
<i>in-situ</i>		
метод получения внутри какой-либо системы		32
LbL		
метод послойного осаждения "слой-за-слоем"		16, 18, 34, 36, 37
LC%		
емкость связывания		49, 75, 79, 85, 97
MEG		
N-метил-глюкамин		81
MEGRA		
N-метилглюкаминометил резорцинарен		81
OI		
триолеин		45
Orange OT		

1-(о-толилазо)-2-нафтол	45
p(6SRA-5B)	
наноконтейнер на основе 6 мМ SRA и 5 мМ BA	75
p(C ₃ H ₆ OH-B-OI)	
наносфера на основе C ₃ H ₆ OH-RA и BA	45
p(C ₃ H ₆ OH-B-St)	
нанокапсула на основе C ₃ H ₆ OH-RA и BA	45
p(MEGRA-B)	
наноконтейнер на основе MEGRA и BA	81
p(SRA-B)	
наноконтейнер на основе SRA и BA	65
p(SVCA-SS)	
наноконтейнер на основе SVCA и SS	91
PEG	
полиэтиленгликоль	13, 17
PTS	
пирен-1,3,6,8-тетрасульфат натрия	69
Pu	
пирен	69
RhB	
родамин Б	48
SRA	
сульфонатометил резорцинарен	64, 73
SS	
диаллилдисульфид	92
St	
стирол	46, 65
SVCA	
N-сульфонатопрпил виологен кавитанд	91
АСМ	
атомно-силовая микроскопия	60, 66, 94
АФК	
активные формы кислорода	17
ГЭБ	
гематоэнцефалический барьер	24
ДНК	
дезоксирибонуклеиновая кислота	20, 91
ДСР	
динамическое светорассеяние	46, 47, 65, 66, 69, 76, 78, 84, 94, 96
ИК	
инфракрасное облучение	20, 21, 35, 54, 62, 67, 76, 83, 92, 94
КД	
круговой дихроизм	79
ККА	
критическая концентрация ассоциации	44, 48
НКТР	
нижняя критическая температура растворения	15
ПАВ	

поверхностно-активное вещество	31, 35, 40, 43
ПЭМ	
просвечивающая электронная микроскопия	33, 36, 46, 47, 55, 60, 76, 82, 94
ССР	
статическое светорассеяние	47, 66, 76, 82, 94
УФ	
ультрафиолетовое облучение	19, 20, 48, 52, 55, 60, 67, 70, 80
ФБ	
фосфатный буфер	45, 74, 80, 85, 103
ЯМР	
ядерный магнитный резонанс	67, 74, 76, 79, 82, 92, 94

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

-
1. Bangham A. D. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids / A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins // *J. Mol. Biol.* – 1965. – 13. – 238-252.
 2. Bangham A. D. Biophysical properties of phospholipid. I. Interaction of phosphatidylserine monolayer with metal ions / A.D. Bangham, D. Papahadjopoulos // *Biochem. Biophys. Acta* – 1966. – 126. – 181-184.
 3. Carmona-Ribeiro A. M. Synthetic amphiphile vesicles / A. M. Carmona-Ribeiro // *Chem. Soc. Rev.* – 1992. – 21. – 209-214.
 4. Idrissi M. E. Nanosensors based on polymer vesicles and planar membranes: a short review / M. E. Idrissi, C. E. Meyer, L. Zartner, W. Meier // *J. Nanobiotechnol.* – 2018. – 16. – 63.
 5. Matos C. Liposomes as a model for the biological membrane: studies on daunorubicin bilayer interaction / C. Matos, C. Moutinho, P. Lobão // *J. Membr. Biol.* – 2012. – 245. – 69-75.
 6. de Lima M. C. Cationic Liposomes for Gene Delivery: From Biophysics to Biological Applications / M. C. de Lima, S. Neves, A. Filipe, N. Duzgunes, S. Simoes // *Curr. Med. Chem.* – 2003. – 10. – 1221-1231.
 7. Madden N. D. The modulations of membrane fluidity by hydrogenation processes. IV. Homogeneous catalysis of liposomes using a water-soluble catalyst / T. D. Madden, W. E. Peel, P. J. Quinn, D. Chapman // *J. Biochem. Biophys. Meth.* – 1980. – 2. – 19-27.
 8. Wöhrle D. Liposome-delivered Zn(II)-2,3-naphthalocyanines as potential sensitizers for PDT: synthesis, photochemical, pharmacokinetic and phototherapeutic studies / D. Wöhrle, M. Shopova, S. Müller, A. D. Milev, V. N. Mantareva, K. K. Krastev // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1993. – 21. – 155-165.
 9. Heurtault H. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles / B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J-E. Proust, J-P. Benoit // *Biomaterials.* – 2003. – 24. – 4283-4300.
 10. Ma Z. Influence of the Spacer Length of Glycolipid Receptors in Polydiacetylene Vesicles on the Colorimetric Detection of *Escherichia coli* / Z. Ma, J. Li, L. Jiang // *Langmuir.* – 2000. – 16. – 7801-7804.
 11. Oberholzer T. Polymerase chain reaction in liposomes / T. Oberholzer, M. Albrizio, P. L. Luisi // *Chem. Biol.* – 1995. – 2. – 677-682.

-
12. Chang H-I. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy / H-I. Chang, M-K. Yeh // *Int. J. Nanomedicine*. – 2012. -7. – 49–60.
 13. Soni V. Role of liposomal drug-delivery system in cosmetics / V. Soni, S. Chandel, P. Jain, S. Asati // *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics Applications of Nanobiomaterials*. – 2016. – 10. – 93-120.
 14. Bulbake U. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review / U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan // *Pharmaceutics*. – 2017. – 9. – 12.
 15. Lasic D. D. Lasic Novel applications of liposomes / D. D. Lasic // *Trends Biotechnol.* 1998. – 16. – 307-321.
 16. Samad, A. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review / A. Samad, Y. Sultana, M. Aqil // *Curr. Drug Deliv.* – 2007. – 4. – 297-305.
 17. Agrawal M. A review on liposome / M. A. M. Agrawal, S. Jawade, S. Khan, M. I. // *IJPBS*. – 2012. – 2. – 453.
 18. Winterhalter M. Liposome stability and formation: Experimental parameters and theories on the size distribution / M. Winterhalter, D.D. Lasic // *Chem. Phys. Lipids*. – 1993. – 64. – 35-43.
 19. Anderson M. The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations / M. Anderson, A. Omri // *Drug Deliv.* 2004. – 11. – 33-39
 20. Nardin C. Polymerizable Amphiphilic Block Copolymers: From Nanostructured Hydrogels to Nanoreactors and Ultrathin Films CHIMIA / C. Nardin, W. Meier // *Int. J. Chem.* 2001. – 55. – 142-146.
 21. Caruso F. Hollow Titania Spheres from Layered Precursor Deposition on Sacrificial Colloidal Core Particles / F. Caruso, X. Shi, R. A. Caruso, A. Susa // *Adv. Mater.* – 2001. – 13. – 740-744.
 22. Kabanov A. V. Pluronic Block Copolymers in Drug Delivery: from Micellar Nanocontainers to Biological Response Modifiers / A. V. Kabanov, V. Yu. Alakhov // *Crit. Rev. Ther. Drug.* – 2002. – 19. – 1.
 23. Masood F. Masood Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy / F. Masood // *Mater. Sci. Eng. C*. -2016. – 60. - 569-578.
 24. Kabanov A.V. Polymer Nanomaterials for Drug Delivery Across the Blood Brain Barrier / A. V. Kabanov, E. V. Batrakova // *Neuroimmune Pharmacology*. – 2017.
 25. Fleige E. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications / E. Fleige, M. A. Quadir, R. Haag // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – 64. – 866-884.

-
26. Ramasamy T. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: A comprehensive review / T. Ramasamy, H. B. Ruttala, B. Gupta, B. K. Poudel, H-G. Choi, C. S. Yong, J. O. Kim // *J. Control. Release.* – 2017. – 258. – 226-253.
 27. Lim E-K. Recent Advances in pH-Sensitive Polymeric Nanoparticles for Smart Drug Delivery in Cancer Therapy / E-K. Lim, B. H. Chung, S. Chung // *J. Curr. Drug Targets.* – 2018. – 19. – 300-317.
 28. Pardridge W. M. Combined Use of Carboxyl-Directed Protein Pegylation and Vector-Mediated Blood-Brain Barrier Drug Delivery System Optimizes Brain Uptake of Brain-Derived Neurotrophic Factor Following Intravenous Administration / W. M. Pardridge, D. Wu, T. Sakane // *Pharm. Res.* – 1998. – 15. – 576–582.
 29. Sudhakar Y. Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs / Y. Sudhakar, K. Kuotsu, A. K. Bandyopadhyay // *J. Control. Release.* – 2006. – 114. – 15-40.
 30. Mitragotri S. Materials for Drug Delivery: Innovative Solutions to Address Complex Biological Hurdles / S. Mitragotri, J. Lahann // *Adv. Mater.* – 2012. – 24. – 3717-3723.
 31. Pardridge W. M. Vector-mediated drug delivery to the brain / W. M. Pardridge // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1999. – 36. – 299-321.
 32. Kataoka K. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance / K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – 64. – 37-48.
 33. Hoffman A. S. The origins and evolution of «controlled» drug delivery systems / A. S. Hoffman // *J. Contr. Release.* - 2008. – 132. – 153—163.
 34. Ganta S. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery / S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji // *J. Control. Release.* – 2008. – 126. – 187-204.
 35. Ibarz G. Smart Micro- and Nanocontainers for Storage, Transport, and Release / G. Ibarz, L. Dähne, E. Donath, H. Möhwald // *Adv. Mater.* – 2001. – 13. – 1324-1327.
 36. Mura S. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery / S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur // *Nature Mater.* – 2013. – 12. – 991–1003.
 37. Schmaljohann D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery / D. Schmaljohann // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006. – 58. – 1655-1670.
 38. Vaupel P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review / P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff // *Cancer Res.* – 1989. – 49. – 6449-6465.
 39. Rofstad E. K. Acidic Extracellular pH Promotes Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells in Athymic Nude Mice / E. K. Rofstad, B. Mathiesen, K. Kindem, K. Galappathi // *Cancer Res.* – 2006. – 66. – 6699-6707.

-
40. Watson P. Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells / P. Watson, A. T. Jones, D. J. Stephens // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2005. – 57. – 43-61.
 41. Bae Y. In Vivo Antitumor Activity of the Folate-Conjugated pH-Sensitive Polymeric Micelle Selectively Releasing Adriamycin in the Intracellular Acidic Compartments / Y. Bae, N. Nishiyama, K. Kataoka // *Bioconjugate Chem.* – 2007. – 18. – 1131-1139.
 42. Lee S-M. Polymer-Caged Liposomes: A pH-Responsive Delivery System with High Stability S-M. Lee, H. Chen, C. M. Dettmer, T. V. O'Halloran, S. B. T. Nguyen // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – 129. – 15096-15097.
 43. Sukhorukov G. B. Multifunctionalized Polymer Microcapsules: Novel Tools for Biological and Pharmacological Applications / G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, M. Garstka, S. Springer, W. J. Parak, A. Muñoz-Javier, O. Kreft, A. G. Skirtach, A. S. Susa, Y. Ramaye, R. Palankar, M. Winterhalter, *Complex Mater.* – 2007. – 3. – 944-955.
 44. Zhang K. Synthesis and Characterization of a pH- and Ionic Strength-Responsive Hydrogel / K. Zhang, Y. Luo, Z. Li // *Soft Mater.* – 2007. – 5. – 183-195.
 45. Na K. Self-Organized Nanogels Responding to Tumor Extracellular pH: pH-Dependent Drug Release and in Vitro Cytotoxicity against MCF-7 Cells / K. Ha, E. S. Lee, Y. H. Bae // *Bioconjugate Chem.* – 2007. – 18. – 1568-1574.
 46. Devalapally H. Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 3. Therapeutic efficacy and safety studies in ovarian cancer xenograft model / H. Devalapally, D. Shenoy, S. Little, R. Langer, M. Amiji // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2007. – 59. – 477-484.
 47. Li Z. pH-sensitive nanoparticles of poly(l-histidine)-poly(lactide-co-glycolide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate for anti-tumor drug delivery / Z. Li, L. Qiu, Q. Chen, T. Hao, M. Qiao, H. Zhao, J. Zhang, H. Hu, X. Zhao, D. Chen, L. Mei // *Acta Biomater.* – 2015. – 11. – 137-150.
 48. Niedermayer S. Multifunctional polymer-capped mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive targeted drug delivery / S. Niedermayer, V. Weiss, A. Herrmann, A. Schmidt, S. Datz, K. Müller, E. Wagner, T. Bein, C. Bräuchle // *Nanoscale.* – 2015. -7. – 7953-7964.
 49. Li M. Cisplatin crosslinked pH-sensitive nanoparticles for efficient delivery of doxorubicin / M. Li, Z. Tang, S. Lv, W. Song, H. Hong, X. Jing, Y. Zhang, X. Chen // *Biomater.* – 2014. – 35. – 3851-3864.
 50. Heyda J. Thermodynamic Description of Hofmeister Effects on the LCST of Thermosensitive Polymers / J. Heyda, J. Dzubiella // *J. Phys. Chem. B.* – 2014. – 118. – 10979-10988.

-
51. Chung J. E. Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core-shell micellar drug carriers / J. E. Chung, M. Yokoyama, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano // *J. Controll. Release* – 1998. – 53. – 119-130.
 52. Jonas A. M. Thermo-Responsive Polymer Brushes with Tunable Collapse Temperatures in the Physiological Range / A. M. Jonas, K. Glinel, R. Oren, B. Nysten, W. T. S. Huck // *Macromolecules*. – 2007. – 40. – 4403-4405.
 53. Bae Y. H. Thermo-sensitive polymers as on-off switches for drug release / Y. H. Bae, T. Okano, R. Hsu, S. W. Kim // *Makromol. Chem., Rapid. Commun.* – 1987. – 8. – 481-485.
 54. Cavallaro G. Biocompatible Poly(N-isopropylacrylamide)-halloysite Nanotubes for Thermoresponsive Curcumin Release / G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Massaro, S. Milioto, R. Noto, F. Parisi, S. Riela // *J. Phys. Chem. C*. – 2015. – 119. – 8944-8951.
 55. Zhou J. Thermoresponsive Layer-by-Layer Assemblies for Nanoparticle-Based Drug Delivery / J. Zhou, M. V. Pishko, J. L. Lutkenhaus // *Langmuir* 2014. – 30. – 5903-5910.
 56. Liu J. Redox-Responsive Polyphosphate Nanosized Assemblies: A Smart Drug Delivery Platform for Cancer Therapy / J. Liu, Y. Pang, W. Huang, Z. Zhu, X. Zhu, Y. Zhou, D. Yan // *Biomacromolecules*. – 2011. – 12. – 2407-2415.
 57. Aleksanian S. Rapidly thiol-responsive degradable block copolymer nanocarriers with facile bioconjugation / S. Aleksanian, B. Khorsand, R. Schmidt, J. K. Oh // *Polym. Chem.* – 2012. – 3. – 2138-2147.
 58. Yan Y. Cellular Association and Cargo Release of Redox-Responsive Polymer Capsules Mediated by Exofacial Thiols / Y. Yan, Y. Wang, J. K. Heath, E. C. Nice, F. Caruso // *Adv. Mater.* – 2011. – 23. – 3916-3921.
 59. Yu Z-Q. Bioreducible nanogels/microgels easily prepared via temperature induced self-assembly and self-crosslinking / Z-Q. Yu, J-T. Sun, C-Y. Pan, C-Y. Hong // *Chem. Commun.* – 2012. – 48. – 5623-5625.
 60. Han D. Block Copolymer Micelles with a Dual-Stimuli-Responsive Core for Fast or Slow Degradation / D. Han, X. Tong, Y. Zhao // *Langmuir*. – 2012. – 28. – 2327-2331.
 61. McCarley R. L. Redox-Responsive Delivery Systems / R. L. McCarley // *Annu. Rev. Anal. Chem.* – 2012. – 5. – 391-411.
 62. Thambi T. Bioreducible polymersomes for intracellular dual-drug delivery / T. Thambi, V. G. Deepagan, H. Ko, D. S Lee, J. H. Park // *J. Mater. Chem.* – 2012. – 22. – 22028-22036.

-
63. Yuan W. Supramolecular micelles with dual temperature and redox responses for multi-controlled drug release / W. Yuan, H. Zou, W. Guo, T. Shen, J. Ren // *Polym. Chem.* – 2013. – 4. – 2658-2661.
 64. Zhang J. Controlled Formation of Microgels/Nanogels from a Disulfide-Linked Core/Shell Hyperbranched Polymer / J. Zhang, F. Yang, H. Shen, D. Wu // *ACS Macro Lett.* – 2012. – 1. – 1295-1299.
 65. Zhao J. Redox-Sensitive Nanoscale Coordination Polymers for Drug Delivery and Cancer Theranostics / J. Zhao, Y. Yang, X. Han, C. Liang, J. Liu, X. Song, Z. Ge, Z. Liu // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2017. – 9. – 23555-23563.
 66. Velluto D. PEG-b-PPS Diblock Copolymer Aggregates for Hydrophobic Drug Solubilization and Release: Cyclosporin A as an Example / D. Velluto, D. Demurtas, J. A. Hubbell // *Mol. Pharm.* – 2008. – 5. – 632-642.
 67. Hu P. Scavenging ROS: Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics by the Use of an Oxidation-Sensitive Nanocarrier/Enzyme Conjugate / P. Hu, N. Tirelli // *Bioconjugate Chem.* – 2012. – 23. – 438-449.
 68. Mahmoud E. A. Inflammation Responsive Logic Gate Nanoparticles for the Delivery of Proteins / E. A. Mahmoud, J. Sankaranarayanan, J. M. Morachis, G. Kim, A. Almutairi // *Bioconjugate Chem.* – 2011. – 22. – 1416-1421.
 69. Napoli A. Oxidation-responsive polymeric vesicles / A. Napoli, M. Valentini, N. Tirelli, M. Müller, J. A. Hubbell // *Nature Mater.* – 2004. – 3. – 183–189.
 70. Nakahata M. Redox-responsive self-healing materials formed from host–guest polymers / M. Nakahata, Y. Takashima, H. Yamaguchi, A. Harada // *Nature Commun.* – 2011. – 2. – 511.
 71. Kulbaba K. Polyferrocenylsilanes: Metal-Containing Polymers for Materials Science, Self-Assembly and Nanostructure Applications / K. Kulbaba, I. Manners. – 2001. – 22. – 711-724.
 72. Kulbaba K. Polyferrocenylsilane Microspheres: Synthesis, Mechanism of Formation, Size and Charge Tunability, Electrostatic Self-Assembly, and Pyrolysis to Spherical Magnetic Ceramic Particles / K. Kulbaba, A. Cheng, A. Bartole, S. Greenberg, R. Resendes, N. Coombs, A. Safa-Sefat, J. E. Greedan, H. D. H. Stöver, G. A. Ozin, I. Manners, *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – 124. – 12522-12534.
 73. Wang H. Redox-Mediated Synthesis and Encapsulation of Inorganic Nanoparticles in Shell-Cross-Linked Cylindrical Polyferrocenylsilane Block Copolymer Micelles / H. Wang, X. Wang, M. A. Winnik, I. Manners // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – 130. – 12921-12930.

-
74. Gracia R. Polymers with redox properties: materials for batteries, biosensors and more / R. Gracia, D. Mecerreyes // *Polym. Chem.* – 2013. – 4. – 2206-2214.
 75. Staff R. H. Patchy Nanocapsules of Poly(vinylferrocene)-Based Block Copolymers for Redox-Responsive Release / R. H. Staff, M. Gallei, M. Mazurowski, M. Rehahn, R. Berger, K. Landfester, D. Crespy // *ACS Nano.* – 2012. – 6. – 9042-9049.
 76. Ma Y. Redox-controlled molecular permeability of composite-wall microcapsules / Y. Ma, W-F. Dong, M. A. Hempenius, H. Möhwald, G. J. Vancso // *Nature Mater.* – 2006. – 5. – 724–729.
 77. Fomina N. Photochemical mechanisms of light-triggered release from nanocarriers / N. Fomina, J. Sankaranarayanan, A. Almutairi, *Adv. Drug Deliv.* – 2012. – 64. – 1005-1020.
 78. Ackermann G. Correlations Between Light Penetration into Skin and the Therapeutic Outcome Following Laser Therapy of Port-wine Stains / G. Ackermann, M. Hartmann, K. Scherer, E. W. Lang, U. Hohenleutner, M. Landthaler, W. Bäumlner // *Lasers Med. Sci.* – 2002. – 17. – 70-78.
 79. Kolárová H. Penetration of the laser light into the skin in vitro / H. Kolárová, D. Ditrichová, J. Wagner // *Lasers Surg Med.* 1999. – 24. – 231-235.
 80. Yuan Q. Photon-Manipulated Drug Release from a Mesoporous Nanocontainer Controlled by Azobenzene-Modified Nucleic Acid / Q. Yuan, Y. Zhang, T. Chen, D. Lu, Z. Zhao, X. Zhang, Z. Li, C-H. Yan, W. Tan // *ACS Nano.* – 2012. – 6. – 6337-6344.
 81. Hang C. NIR and UV-responsive degradable hyaluronic acid nanogels for CD44-targeted and remotely triggered intracellular doxorubicin delivery / C. Hang, Y. Zou, Y. Zhong, Z. Zhong, F. Meng // *Colloid. Surface B.* – 2017. – 158. – 547-555.
 82. Angelatos A. S. Light-Responsive Polyelectrolyte/Gold Nanoparticle Microcapsules / A. S. Angelatos, B. Radt, F. Caruso // *J. Phys. Chem. B.* – 2005. – 109. – 3071-3076.
 83. Shapiro G. Multiparameter evaluation of in vivo gene delivery using ultrasound-guided, microbubble-enhanced sonoporation / G. Shapiro, A. W. Wong, M. Bez, F. Yang, S. Tam, L. Even, D. Sheyn, S. Ben-David, W. Tawackoli, G. Pelled, K. W. Ferrara, D. Gazit // *J. Control. Release.* – 2016. – 223. – 157-164.
 84. Helfield B. Biophysical insight into mechanisms of sonoporation / B. Helfield, X. Chen, S. C. Watkins, F. S. Villanueva // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – 113. – 9983-9988.
 85. Bouakaz A. Sonoporation: concept and mechanisms. / A. Bouakaz, A. Zeghimi, A. A. Doinikov // *Sonoporation Therapeutic ultrasound.* - 2016. – 175–189.

-
86. Tzu-Yin W. Ultrasound and microbubble guided drug delivery: mechanistic understanding and clinical implications / W. Tzu-Yin, K. E. Wilson, S. Machtaler, J. K. Willmann // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2013. – 14. – 743-52.
 87. Mullick C. S Ultrasound-guided therapeutic modulation of hepatocellular carcinoma using complementary microRNAs / C. S. Mullick, T. Y. Wang, S. Bachawal, R. Devulapally, J. W. Choe, E. L. Abou, B. K. Yakub, D. S. Wang, L. Tian, R. Paulmurugan, J. K. Willmann // *J. Control. Release.* – 2016. – 238. – 272-280.
 88. Delalande A. Sonoporation: mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer / A. Delalande, S. Kotopoulis, M. Postema, P. Midoux, C. Pichon // *Gene.* – 2013. – 525. – 191-199.
 89. Chen H. Ultrasound-targeted microbubble destruction for chemotherapeutic drug delivery to solid tumors / H. Chen, J. H. Hwang // *J. Ther. Ultrasound.* – 2013. – 1. – 10.
 90. Dimcevski G. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer / G. Dimcevski, S. Kotopoulis, T. Bjånes, D. Hoem, J. Schjøtt, B. T. Gjertsen, M. Biermann, A. Molven, H. Sorbye, E. McCormack, M. Postema, O. H. Gilja // *J. Control. Release.* – 2016. – 243. – 172-181.
 91. Kotopoulis S. Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: a clinical case study / S. Kotopoulis, G. Dimcevski, O. H. Gilja, D. Hoem, M. Postema. – *Med. Phys.* – 2013. – 40. – 072902.
 92. Mina H. S. Chemical gas-generating nanoparticles for tumor-targeted ultrasound imaging and ultrasound-triggered drug delivery / H. S. Mina, S. Sona, D. G. You, T. W. Lee, J. Lee, S. Lee, J. Y. Yhee, J. Lee, M. H. Han, J. H. Park, S. H. Kim, K. Choi, K. Park, K. Kim, I. C. Kwon // *Biomaterials.* – 2016. – 108. – 57-70.
 93. Pankhurst Q. A. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine / Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2003. – 36. – R167.
 94. Pankhurst Q. A. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine / Q. A. Pankhurst, N. T. K. Thanh, S. K. Jones, J. Dobson // *J. Physics D: Appl. Phys.* - 2009. – 42. – 224001.
 95. Sun C. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery / C. Sun, J. S.H. Lee, M. Zhang // *Adva. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – 60. – 1252-1265.
 96. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery / J. Dobson // *Drug. Dev. Res.* – 2006. – 67. – 55-60.
 97. McBain S. C. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery / S. C. McBain, H. H. Yiu, J. Dobson // *Int. J. Nanomedicine.* – 2008. – 3. – 169-180.

-
98. Widder K. J. Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery in vivo / K. J. Widder, A. E. Senyei, D. G. Scarpelli // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1978. – 58. -141–146.
 99. Widder K. J. Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin - total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats / K. J. Widder, R. M. Morris, G. A. Poore, D. P. Howard, A. E. Senyei // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* – 1983. – 19. – 135–139.
 100. Zhang J. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core-shell nanoparticle carrier and drug release response / J. Zhang, R. D. K. Misra // *Acta Biomater.* – 2007. - 3. – 838-850.
 101. Do T. D. Guidance of Magnetic Nanocontainers for Treating Alzheimer's Disease Using an Electromagnetic, Targeted Drug-Delivery Actuator / T. D. Do, F. Ullmann, Y. Noh, M. O. Kim, J. Yoon // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2016. – 12. – 569-574.
 102. Azagarsamy M. A. Enzyme-Triggered Disassembly of Dendrimer-Based Amphiphilic Nanocontainers / M. A. Azagarsamy, P. Sockalingam, S. Thayumanavan // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – 131. – 14184-14185.
 103. Wu Q. Organization of Glucose-Responsive Systems and Their Properties / Q. Wu, L. Wang, H. Yu, J. Wang, Z. Chen // *Chem. Rev.* – 2011. – 111. – 7855-7875.
 104. Luo R. Parameter Study of Glucose-Sensitive Hydrogel: Effect of Immobilized Glucose Oxidase on Diffusion and Deformation / R. Luo, H. Li // *Soft Mater.* – 2013. – 11. – 69-74.
 105. Luo J. Super long-term glycemic control in diabetic rats by glucose-sensitive LbL films constructed of supramolecular insulin assembly / J. Luo, S. Cao, X. Chen, S. Liu, H. Tan, W. Wu, J. Li // *Biomaterials.* – 2012. – 33. – 8733-8742.
 106. Díez P. Toward the Design of Smart Delivery Systems Controlled by Integrated Enzyme-Based Biocomputing Ensembles / P. Díez, A. Sánchez, M. Gamella, P. Martínez-Ruiz, E. Aznar, C. de la Torre, J. R. Murguía, R. Martínez-Mañez, R. Villalonga, J. M. Pingarrón // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – 136. – 9116-9123.
 107. Zhao W. A glucose-responsive controlled release of insulin system based on enzyme multilayers-coated mesoporous silica particles / W. Zhao, H. Zhang, Q. He, Y. Li, J. Gu, L. Li, H. Lia, J. Shi // *Chem. Commun.* – 2011. – 47. – 9459-9461.
 108. Taylor M. J. Rheological characterisation of dextran-concanavalin A mixtures as a basis for a self-regulated drug delivery device / M. J. Taylor, S. Tanna, T. S. Sahota, B. Voermans // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2006. – 62. – 94-100.

-
109. Tanna S. The effect of degree of acrylic derivatisation on dextran and concanavalin A glucose-responsive materials for closed-loop insulin delivery / S. Tanna, T. S. Sahota, K. Sawicka, M. J. Taylor // *Biomaterials*. – 2006. – 27. – 4498-4507.
 110. Yoshida K. Layer-by-layer deposited nano- and micro-assemblies for insulin delivery: A review / K. Yoshida, Y. Hasebe, S. Takahashi, K. Sato, J. Anzai // *Mater. Sci. Eng. C*. – 2014. – 34. – 384-392.
 111. Siegel R. A. Hard and soft micro- and nanofabrication: An integrated approach to hydrogel-based biosensing and drug delivery / R. A. Siegel, Y. Gu, M. Lei, A. Baldi, E. E. Nuxoll, B. Ziaie // *J. Control. Release*. – 2010. – 141. – 303-313.
 112. Ma R. Phenylboronic acid-based glucose-responsive polymeric nanoparticles: synthesis and applications in drug delivery / R. Ma, L. Shi // *Polym. Chem*. – 2014. – 5. – 1503-1518.
 113. Qi W. Glucose-Sensitive Microcapsules from Glutaraldehyde Cross-Linked Hemoglobin and Glucose Oxidase / W. Qi, X. Yan, L. Duan, Y. Cui, Y. Yang, J. Li // *Biomacromolecules*. – 2009. – 10. – 1212-1216.
 114. Qi W. Triggered release of insulin from glucose-sensitive enzyme multilayer shells / W. Qi, X. Yan, J. Fei, A. Wang, Y. Cui, J. Li // *Biomaterials*. – 2009. – 30. – 2799-2806.
 115. Díez P. Biomedical nanomotors: efficient glucose-mediated insulin release / P. Díez, B. Esteban-Fernández de Ávila, D. E. Ramírez-Herrera, R. Villalonga, J. Wang // *Nanoscale*. – 2017. – 9. – 14307-14311.
 116. Yin R. Design of genipin-crosslinked microgels from concanavalin A and glucosyloxyethyl acrylated chitosan for glucose-responsive insulin delivery / R. Yin, K. Wang, S. Du, L. Chen, J. Nie, W. Zhang // *Carbohydr. Polym.* – 2014. – 103. – 369-376.
 117. Yin R. Glucose-responsive microhydrogels based on methacrylate modified dextran/concanavalin A for insulin delivery / R. Yin, Z. Tong, D. Yang, J. Nie // *J. Control. Release*. – 2011. – 152. – e163-e165.
 118. Yin R. Photo-crosslinked glucose-sensitive hydrogels based on methacrylate modified dextran–concanavalin A and PEG dimethacrylate / R. Yin, K. Wang, J. Han, J. Nie // *Carbohydr. Polym.* – 2010. – 82. – 412-418.
 119. Ye T. Synthesis and volume phase transition of concanavalin A-based glucose-responsive nanogels / T. Ye, S. Yan, Y. Hu, L. Ding, W. Wu // *Polym. Chem*. – 2014. – 5. – 186-194.

-
120. Wu S. Glucose- and pH-Responsive Controlled Release of Cargo from Protein-Gated Carbohydrate-Functionalized Mesoporous Silica Nanocontainers / S. Wu, X. Huang, X. Du // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2013. – 52. – 5580-5584.
 121. Ding Z. Synthesis of glucose-sensitive self-assembled films and their application in controlled drug delivery / Z. Ding, Y. Guan, Y. Zhang, X. X. Zhu // *Polymer.* – 2009. – 50. – 4205-4211.
 122. Xingju M. X. Amphiphilic Random Glycopolymer Based on Phenylboronic Acid: Synthesis, Characterization, and Potential as Glucose-Sensitive / M. X. Jin, X. Zhang, Z. Wu, D. Teng, X. Zhang, Y. Wang, Z. Wang, C. Li // *Biomacromolecules.* – 2009. – 10. – 1337-1345.
 123. Yang H. Glucose-Responsive Polymer Vesicles Templated by α -CD/PEG Inclusion Complex / H. Yang, C. Zhang, C. Li, Y. Liu, Y. An, R. Ma, L. Shi // *Biomacromolecules.* – 2015. – 16. – 1372-1381.
 124. Khot L. R. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review / L. R. Khot, S. Sankaran, J. M. Maja, R. Ehsani, E. W. Schuster // *J. Crop Prot.* – 2012. – 35. – 64-70.
 125. Stankiewicz A. Self-healing coatings in anti-corrosion applications / A. Stankiewicz, I. Szczygie, B. Szczygie // *J. Mater. Sci.* – 2013. – 48. – 8041-8051.
 126. Grillo R. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water / R. Grillo, A. do Espirito, S. Pereira, N. F. Silva de Melo, R. M. Porto, L. O. Feitosa, P. Sergio, T. Newton, L. D. Filho, A. H. Rosa, R. Lima, L. F. Fraceto // *J. Hazard. Mater.* – 2011. – 186. – 1645-1651.
 127. Shchukin D. G. Layer-by-Layer Assembled Nanocontainers for Self-Healing Corrosion Protection / D. G. Shchukin, M. Zheludkevich, K. Yasakau, S. Lamaka, M. G. S. Ferreira, H. Möhwald // *Adv. Mater.* – 2006. – 18. – 1672-1678.
 128. Liqun Z. Electrodeposition of composite copper/liquid-containing microcapsule coatings / Z. Liqun, Z. Wei, L. Feng, Y. He // *J. Mater. Sci.* – 2004. – 39. – 495-499.
 129. Lu A-H. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application / A-H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth // *Angew. Chem.* – 2007. – 46. – 1222-1244.
 130. Cuenya B. R. Metal Nanoparticle Catalysts Beginning to Shape-up / B. R. Cuenya // *Acc. Chem. Res.* – 2013. – 46. – 1682-1691.
 131. Zhang Y. Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water / Y. Zhang, Y. Chen, P. Westerhoff, K. Hristovski, J. C Crittenden // *Water Res.* – 2008. – 42. – 2204-2212.

-
132. Volokitin Y. Quantum-size effects in the thermodynamic properties of metallic nanoparticles / Y. Volokitin, J. Sinzig, L. J. de Jongh, G. Schmid, M. N. Vargaftik, I. I. Moiseevi // *Nature*. – 1996. – 384. – 621–623.
 133. Pachón L. D. Transition-metal nanoparticles: synthesis, stability and the leaching issue / L. D. Pachón, G. Rothenberg // *Appl. Organomet. Chem.* – 2008. – 22. – 288-299.
 134. Sanchez C. Designed Hybrid Organic–Inorganic Nanocomposites from Functional Nanobuilding Blocks / C. Sanchez, G. J. de A. A. Soler-Illia, F. Ribot, T. Lalot, C. R. Mayer, V. Cabuil // *Chem. Mater.* – 2001. – 13. – 3061-3083.
 135. Sanchez C. Applications of hybrid organic–inorganic nanocomposites / C. Sanchez, B. Julián, P. Belleville, M. Popall // *J. Mater. Chem.* – 2005. – 15. – 3559-3592.
 136. Hagrman P. J. Organic–Inorganic Hybrid Materials: From “Simple” Coordination Polymers to Organodiamine-Templated Molybdenum Oxides / P. J. Hagrman, D. Hagrman, J. Zubieta // *Angew. Chem.* – 1999. – 38. – 2638-2684.
 137. Shchukin D. G. Nanoparticle Synthesis in Engineered Organic Nanoscale Reactors / D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov // *Adv. Mater.* – 2004. – 16. – 671-682.
 138. Schwuger M-J. Microemulsions in Technical Processes Milan-Johann / M-J. Schwuger, K. Stickdorn, R. Schomaecker // *Chem. Rev.* – 1995. – 95. – 849-864.
 139. Landfester K. Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions / K. Landfester, M. Willert, M. Antonietti // *Macromolecules*. – 2000. – 33. – 2370-2376.
 140. Beitz T. Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) and 1-Octyl-2-pyrrolidinone Modified Ionic Microemulsions / T. Beitz, J. Kötz, G. Wolf, E. Kleinpeter, S.E. Friberg // *J. Colloid Interface Sci.* – 2001. – 240. – 581-589.
 141. Hirai T. Biomimetic Synthesis of Calcium Carbonate Particles in a Pseudovesicular Double Emulsion / T. Hirai, S. Hariguchi, I. Komasa, R. J. Davey // *Langmuir*. – 1997. – 13. – 6650-6653.
 142. Chengzhong Y. Synthesis of Siliceous Hollow Spheres with Ultra Large Mesopore Wall Structures by Reverse Emulsion Templating / Y. Chengzhong, T. Bozhi, F. Jie, S. Galen D., Z. Dongyuan // *Chem. Lett.* – 2002. – 31. – 62-63.
 143. Pileni M. P. Fabrication and Properties of Nanosized Material Made by Using Colloidal Assemblies as Templates / M. P. Pileni *Cryst. Res. Technol.* – 1998. – 33. – 1155-1186.
 144. Li W. Synthesis of stable hollow silica microspheres with mesoporous shell in nonionic W/O emulsion / W. Li, X. Sha, W. Dong, Z. Wang // *Chem. Commun.* – 2002. – 2434-2435.

-
145. Li M. Emergent Nanostructures: Water-Induced Mesoscale Transformation of Surfactant-Stabilized Amorphous Calcium Carbonate Nanoparticles in Reverse Microemulsions / M. Li, S. Mann // *Adv. Funct. Mater.* – 2002. – 12. – 773-779.
 146. Quinlan F. T. Reverse Micelle Synthesis and Characterization of ZnSe Nanoparticles / F. T. Quinlan, J. Kuther, W. Tremel, W. Knoll, S. Risbud, P. Stroeve // *Langmuir.* – 2000. – 16. – 4049-4051.
 147. Calandra P. Synthesis of Ultra-small ZnS Nanoparticles by Solid–Solid Reaction in the Confined Space of AOT Reversed Micelles / P. Calandra, A. Longo, V. T. Liveri // *J. Phys. Chem. B.* – 2003. – 107. – 25-30.
 148. McLeod M. C. Synthesis and stabilization of silver metallic nanoparticles and premetallic intermediates in perfluoropolyether/CO₂ reverse micelle systems / M. C. McLeod, R. S. McHenry, E. J. Beckman, C. B. Roberts // *J. Phys. Chem. B.* – 2003. – 107. – 2693-2700.
 149. Seregina M. V. Preparation of Noble-Metal Colloids in Block Copolymer Micelles and Their Catalytic Properties in Hydrogenation / M. V. Seregina, L. M. Bronstein, O. A. Platonova, D. M. Chernyshov, P. M. Valetsky, J. Hartmann, E. Wenz, M. Antonietti // *Chem. Mater.* 1997. – 9. – 923-931.
 150. Hopwood J. D. Synthesis of Barium Sulfate Nanoparticles and Nanofilaments in Reverse Micelles and Microemulsions / J. D. Hopwood, S. Mann // *Chem. Mater.* 1997. – 9. – 1819-1828.
 151. Zhao H. Preparation of CdS Nanoparticles in Salt-Induced Block Copolymer Micelles / H. Zhao, E. P. Douglas, B. S. Harrison, K. S. Schanze // *Langmuir.* – 2001. – 17. – 8428-8433.
 152. Wang T. C. Polyelectrolyte Multilayer Nanoreactors for Preparing Silver Nanoparticle Composites: Controlling Metal Concentration and Nanoparticle Size / T. C. Wang, M. F. Rubner, R. E. Cohen // *Langmuir.* - 2002 – 18. – 3370-3375.
 153. Dante S. Nucleation of Iron Oxy-Hydroxide Nanoparticles by Layer-by-Layer Polyionic Assemblies / S. Dante, Z. Hou, S. Risbud, P. Stroeve // *Langmuir.* – 1999. – 15. – 2176-2182.
 154. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites / G. Decher // *Science.* – 1997. – 277. – 1232-1237.
 155. DeLongchamp D. M. High-Contrast Electrochromism from Layer-By-Layer Polymer Films / D. M. DeLongchamp, M. Kastantin, P. T. Hammond // *Chem. Mater.* – 2003. – 15. – 1575-1586.
 156. DeLongchamp D. M. Fast Ion Conduction in Layer-By-Layer Polymer Films / D. M. DeLongchamp, P. T. Hammond // *Chem. Mater.* – 2003. – 15. – 1165-1173.
 157. Shchukin D. G. Photoinduced Reduction of Silver inside Microscale Polyelectrolyte Capsules / D. G. Shchukin, I. L. Radtchenko, G. B. Sukhorukov // *ChemPhysChem.* – 2003. – 4. – 1101-1103.

-
158. Shchukin D. G. Selective YF₃ Nanoparticle Formation in Polyelectrolyte Capsules as Microcontainers for Yttrium Recovery from Aqueous Solutions / D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov // *Langmuir*. – 2003. – 19. – 4427-4431.
 159. Skirtach A. G. Remote Activation of Capsules Containing Ag Nanoparticles and IR Dye by Laser Light / A. G. Skirtach, A. A. Antipov, D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov // *Langmuir*. – 2004. – 20. – 6988-6992.
 160. Kang Y. Core/Shell Gold Nanoparticles by Self-Assembly and Crosslinking of Micellar, Block-Copolymer Shells / Y. Kang, T. A. Taton // *Angew. Chem.* – 2005. – 117. – 413-416.
 161. Lecommandoux S. Magnetic Nanocomposite Micelles and Vesicles / S. Lecommandoux, O. Sandre, F. Chécot, J. Rodriguez-Hernandez, R. Perzynski // *Adv. Mater.* – 2005. – 17. – 712-718.
 162. Ding X. Silica nanoparticles encapsulated by polystyrene via surface grafting and in situ emulsion polymerization / X. Ding, J. Zhao, Y. Liu, H. Zhang, Z. Wang // *Mater. Lett.* – 2004. – 58. – 3126-3130.
 163. Mahdavian A. R. Preparation of poly(styrene–methyl methacrylate)/SiO₂ composite nanoparticles via emulsion polymerization. An investigation into the compatibilization / A. R. Mahdavian, M. Ashjari, A. B. Makoo // *Europ. Polym. J.* – 2007. – 43. – 336-344.
 164. Tang E. Synthesis of nano-ZnO/poly(methyl methacrylate) composite microsphere through emulsion polymerization and its UV-shielding property / E. Tang, G. Cheng, X. Pang, X. Ma, F. Xing // *Colloid Polym. Sci.* – 2006. – 284. – 422-428.
 165. Lu Z. Magnetic Switch of Permeability for Polyelectrolyte Microcapsules Embedded with Co@Au Nanoparticles / Z. Lu, M. D. Prouty, Z. Guo, V. O. Golub, C. S. S. R. Kumar, Y. M. Lvov // *Langmuir*. – 2005. – 21. – 2042-2050.
 166. Wu H. Preparation of hollow capsule-stabilized gold nanoparticles through the encapsulation of the dendrimer / H. Wu, Z. Liu, X. Wang, B. Zhao, J. Zhang, C. Li // *J. Colloid Interface Sci.* – 2006. – 302. – 142-148.
 167. Pillalamarri S. K. One-Pot Synthesis of Polyaniline–Metal Nanocomposites / S. K. Pillalamarri, F. D. Blum, A. T. Tokuhira, M. F. Bertino // *Chem. Mater.* – 2005. – 17. – 5941-5944.
 168. Mallick K. In situ synthesis of copper nanoparticles and poly(o-toluidine): A metal–polymer composite material / K. Mallick, M. J. Witcomb, M. S. Scurrrell // *Europ. Polym. J.* – 2006. – 42. – 670-675.
 169. Sliwa, W. Calixarenes and Resorcinarenes. Synthesis, properties and application / W. Sliwa, C. Kozłowski // Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

-
170. Timmerman P. Resorcinarenes / P. Timmerman, W. Verboom, D. N. Reinhoudt // *Tetrahedron*. – 1996. – 52. – 2663-2704.
171. Shimizu Sh. Mannich-type reactions in water using anionic water-soluble calixarenes as recoverable and reusable catalysts / Sh. Shimizu, N. Shimada, Y. Sasaki // *Green Chem.* – 2006. – 8. – 608-614.
172. Zhang Q. Terpene cyclization catalysed inside a self-assembled cavity / Q. Zhang, K. Tiefenbacher // *Nature Chemistry*. – 2015. – 7. – 197-202.
173. Pappalardo A. Catalysis inside Supramolecular Capsules: Recent Developments / A. Pappalardo, R. Puglisi, G. T. Sfrassetto // *Catalysts*. – 2019. – 9. – 630.
174. Lamb J. D. Application of Resorcinarene Derivatives in Chemical Separations / N. Li, R. G. Harrison, J. D. Lamb // *J Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 2014 – 78. – 39-60.
175. Kobayashi K. Self-assembled capsules based on tetrafunctionalized calix[4]resorcinarene cavitands / K. Kobayashi, M. Yamanaka // *Chem. Soc. Rev.* – 2015. – 44. – 449-466.
176. Gibb B. C. Binding properties and supramolecular polymerization of a water-soluble resorcin[4]arene / J. H. Jordan, A. Wishard, J. T. Mague, B. C. Gibb // *Org. Chem. Front.* – 2019. – 6. – 1236-1243.
177. Atwood J. L. A chiral spherical molecular assembly held together by 60 hydrogen bonds L. R. MacGillivray / J. L. Atwood // *Nature*. – 1997. – 389. – 469-472.
178. Español E. S. Calixarenes: Generalities and Their Role in Improving the Solubility, Biocompatibility, Stability, Bioavailability, Detection, and Transport of Biomolecules / E. S. Español, M. M. Villamil // *Biomolecules*. – 2019. – 9. – 90.
179. Liu Y. Multicomponent Dynamic Covalent Assembly of a Rhombicuboctahedral Nanocapsule / Y. Liu, X. Liu, R. Warmuth // *Chem. – Eur. J.* – 2007. – 13. – 8953–8959.
180. Liu X. Solvent Effects in Thermodynamically Controlled Multicomponent Nanocage Syntheses / X. Liu, R. Warmuth // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – 128. – 14120-14127.
181. Sultanova E. D. Thermoresponsive polymer nanoparticles based on viologen cavitands / E. D. Sultanova, E. G. Krasnova, S. V. Kharlamov, G. R. Nasybullina, V. V. Yanilkin, I. R. Nizameev, M. K. Kadirov, R. K. Mukhitova, L. Y. Zakharova, A. Y. Ziganshina, A. I. Konovalov // *ChemPlusChem*. – 2015. – 80. – P. 217 – 222.
182. Sultanova E. D. Reduction-controlled substrate release from a polymer nanosphere based on a viologen-cavitand / E. D. Sultanova, A. A. Atlanderova, R. D. Mukhitova, V. V. Salnikov, Yu. N. Osin, A. Y. Ziganshina, A. I. Konovalov // *RSC Adv.* – 2016. – 6. – 70072–70076.
183. Sultanova E. D. Highly active Pd–Ni nanocatalysts supported on multicharged polymer matrix / E. D. Sultanova, A. I. Samigullina, N. V. Nastapova, I. R. Nizameev, K. V. Kholin, V. I. Morozov, A. T.

-
- Gubaidullin, V. V. Yanilkin, M. K. Kadirov, A. Y. Ziganshina, A. I. Konovalov // *Catal. Sci. Technol.* – 2017. – 7. – 5914–5919.
184. Sulatnova E. D. High catalytic activity of palladium nanoparticle clusters supported on a spherical polymer network / E. D. Sultanova, V. V. Salnikov, R. K. Mukhitova, Yu. F. Zuev, Yu. N. Osin, L. Ya. Zakharova, A. Y. Ziganshina, A. I. Konovalov // *Chem. Commun.* – 2015. – 51. – 13317-13320.
185. Tunstad L. M. Host guest complexation. 48. Octol building-blocks for cavitands and carcerands / L.M. Tunstad, J. A. Tucker, E. Dalcanale, J. Weiser, J. A. Bryant, J. C. Sherman, R. C. Helgeson, C. B. Knobler, D. J. Cram // *J. Org. Chem.* – 1989. – 54. – 1305–1312.
186. Abis L. Structurally new macrocycles from the resorcinol aldehyde condensation – Configurational and conformational-analyses by means of dynamic NMR, NOE, and T1 experiments // L. Abis, E. Dalcanale, A. Duvosel, S. Spera // *J. Org. Chem.* – 1988. – 53. – 5475–5479.
187. Gibb B. C. Synthesis of hydroxyl-footed cavitands / B. C. Gibb, R. G. Chapman, J. C. Sherman // *J. Org. Chem.* – 1996. – 61(4). – P. 1505-1509.
188. Ji X. One-pot preparation of poly(styrene-co-divinylbenzene)/silver nanoparticles composite microspheres with tunable porosity and their catalytic degradation of methylene blue in aqueous solution / X. Ji, F. Griesing, R. Yan, B. Sun, W. Pauer, M. Zhu, Y. Sun, H-U. Moritz // *RSC Adv.* – 2017. – 7. – 50176-50187.
189. Holmberg K. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution / K. Holmberg, B. Jonsson, B. Kronberg, B. Lindman // Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2003, 545 P.
190. Sergeeva T. Yu. Application of ferrocene-resorcinarene in silver nanoparticle synthesis / T. Yu. Sergeeva, A. I. Samigullina, A. T. Gubaidullin, I. R. Nizameev, M. K. Kadirov, R. K. Mukhitova, A. Y. Ziganshina, A. I. Konovalov // *RSC Adv.* – 2016. – 6. – 87128–87133.
191. Сергеева Т. Ю. Применение октакарбоксилата тетраферроценкаликс[4]резорцина в синтезе серебряных наночастиц / Т. Ю. Сергеева, Э. Д. Султанова, Р. К. Мухитова, И. Р. Низамеев, М. К. Кадилов, А. Ю. Зиганшина, А. И. Коновалов // *Изв. УфНИЦ. РАН.* – 2014. -- №3. – С. 94-97.
192. Korshin D. E. Electroswitchable self-assembly of ferrocene-resorcinarene / D. E. Korshin, N. V. Nastapova, S. V. Kharlamov, G. R. Nasybullina, T. Y. Sergeeva, E. G. Krasnona, E. D. Sultanova, R. K. Mukhitova, Sh. K. Latypov, V. V. Yanilkin, A. Yu. Ziganshina, A. I. Konovalov // *Mendeleev Commun.* – 2013. – 23. – 71-73.
193. Kazakova, E. Kh. Novel water-soluble tetrasulfonatomethylcalix[4]resorcinarenes / E. Kh. Kazakova, N. A. Makarova, A. U. Ziganshina, L. A. Muslinkina, A. A. Muslinkin, W. D. Habicher // *Tetrahedron Lett.* – 2000. – 41(51). – P. 10111-10115.

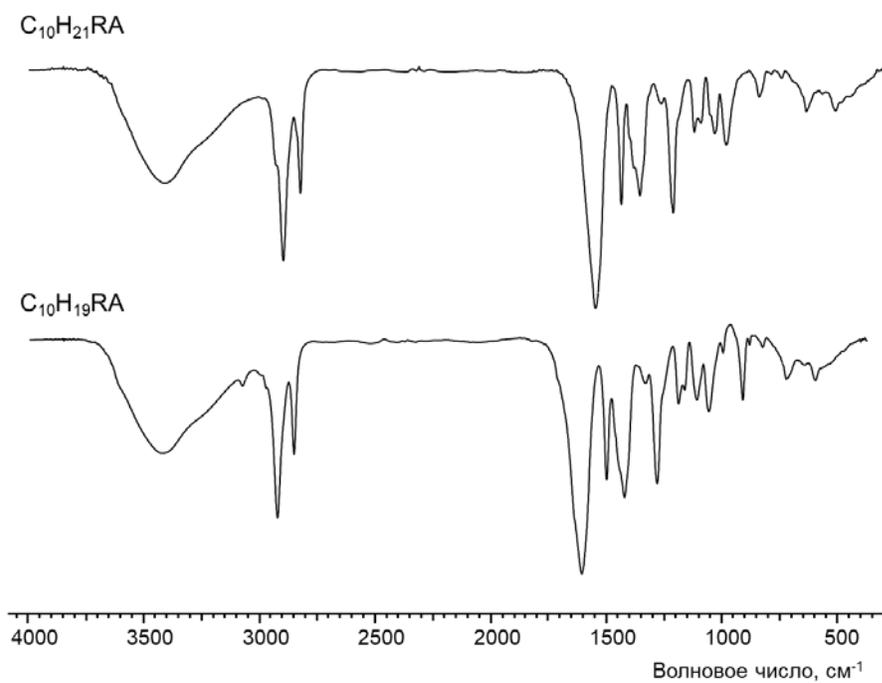
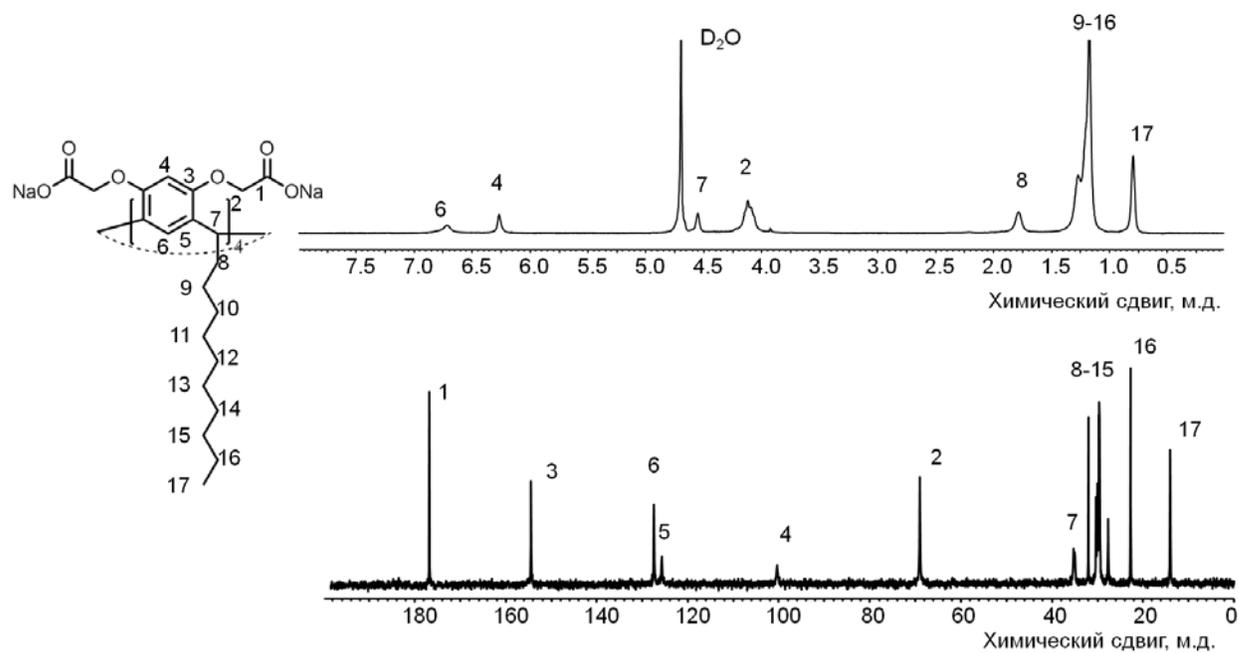
-
194. Sergeeva T. Yu. Closed polymer containers based on phenylboronic esters of resorcinarenes / T. Yu. Sergeeva, R. K. Mukhitova, I. R. Nizameev, M. K. Kadirov, P. D. Klypina, A. Y. Ziganshina and A. I. Konovalov // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2018. – 9. – 1594–1601.
 195. Blanco, S. E. Determination of the overlapping pKa values of resorcinol using UV-visible spectroscopy and DFT methods / S. E. Blanco, M. C. Almandoz, F. H. Ferretti // *Spectrochim. Acta A.* – 2005. – 61(1). – P. 93-102.
 196. pH Calculation and Acid-Base Titration Curves - Freeware for Data Analysis and Simulation. Available from: <http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot.html>.
 197. Morozova, Y. E. Aminoalkylated calix[4]resorcinarenes as pH sensitive “hosts” for charged metallocomplexes / Y. E. Morozova, L. S. Kuznetzova, A. R. Mustafina, E. Kh Kazakova, V. I. Morozov, A. Yu Ziganshina, A. I. Konovalov // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 1999. – 35. – 397–407.
 198. Zhang, Q. Hexameric resorcinarene capsule is a Brønsted acid: investigation and application to synthesis and catalysis / Q. Zhang, K. Tiefenbacher // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – 135. – P. 16213-16219.
 199. Wilson, A. Matile Functional systems with orthogonal dynamic covalent bonds / A. Wilson, G. Gasparinia, S. Matile // *Chem. Soc. Rev.* – 2014. – 43. – P. 1948-1962.
 200. Wu, X. Selective sensing of saccharides using simple boronic acids and their aggregates / X. Wu, Zh. Li, X.-X. Chen, J. S. Fossey, T. D. Jamesc, Y.-B. Jiang // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – 42. – P. 8032-8048.
 201. Sabnis R W. *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes.* Wiley. – 2015.
 202. Klonis, N. Spectral properties of fluorescein in solvent-water mixtures: applications as a probe of hydrogen bonding environments in biological systems / N. Klonis, A. H. A. Clayton, E. W. Voss, W. H. Sawyer // *Photochem Photobiol.* – 1998. – 67. – P. 500–510.
 203. Song, A. Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles / A. Song, J. Zhang, M. Zhang, T. Shen, J. Tang // *Colloids Surf., A.* – 2000. – 167(3). – P. 253-262.
 204. Anthony, O. Fluorescence investigation of the binding of pyrene to hydrophobic microdomains in aqueous solutions of polysoaps / O. Anthony, R. Zana // *Macromolecules.* – 1994. – 27. – 3885-3891.
 205. Itoh, H. Estimation of the hydrophobicity in microenvironments by pyrene fluorescence measurements: n- β -octylglucoside micelles / H Itoh, S. Ishido, M. Nomura, T. Hayakawa, Sh. Mitaku // *J. Phys. Chem.* – 1996. – 100. – 9047-9053.

-
206. Tokgoz, N. S. Evaluation of two fluorescent probes for the characterization of W/O/W emulsions / N. S. Tokgoz, J. L. Grossiord, A. Fructus, M. Seiller, P. Prognon // *Int. J. Pharm.* – 1996. – 141. – P. 27-37.
207. Antipin I. Glucose responsive polymeric nanocontainers for insulin delivery / I. Antipin, A. Ziganshina, T. Sergeeva, R. Mukhitova, I. Nizameev, M. Kadirov, A. Voloshina, V. Zobov, // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2018. – 48 (Suppl. 1). - 159.
208. Sergeeva T. Yu. A Glucose-Responsive Polymer Nanocarrier Based on Sulfonated Resorcinarene for Controlled Insulin Delivery / T. Yu. Sergeeva, A. Y. Ziganshina, R. K. Mukhitova, I. R. Nizameev, M. K. Kadirov, A. S. Sapunova, A. D. Voloshina, T. A. Mukhametzyanov, I. S. Antipin // *ChemPlusChem.* – 2019. – 84. – 1560-1566. DOI: 10.1002/cplu.201900428.
209. Гигиенические нормативы ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 27 апреля 2003 г.).
210. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells / O. Warburg // *Science.* – 1956. – 123. – 309-314
211. Peeters K. Effect of nitrogen atom positioning on the trade-off between emissive and photocatalytic properties of carbon dots / K. Peeters, S. Bhattacharyya, F. Ehrat, P. Urban, R. Teves, R. Wyrwich, M. Döblinger, J. Feldmann, A. S. Urban, J. K. Stolarczyk // *Nat Commun.* - 2017. – 8 – 922.
212. Borborema S. E. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania (Leishmania) major*-infected macrophages / S. E. Borborema, R. A. Schwendener, J. A. Osso Jr., H. F. de Andrade Jr., N. do Nascimento // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2011. – 38. – 341-347.
213. Rossetti R. C. Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows / R. C. Rossetti, A. Perdigão, F. S. Mesquita, M. Sá Filho, G. P. Nogueira, R. Machado, C. M. B. Membrive, M. Binelli // *Theriogenology.* – 2011. – 76. – 751-758.
214. Bravo-Nuevo A. Meglumine Exerts Protective Effects against Features of Metabolic Syndrome and Type II Diabetes / A. Bravo-Nuevo, A. Marcy, M. Huang, F. Kappler, J. Mulgrew, L. Laury-Kleintop, M. Reichman, A. Tobia, G. C. Prendergast // *PLoS ONE.* – 2014. – 9. – e90031.
215. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy / S. Rivankar // *J. Can. Res. Ther.* – 2014. – 10. – 853-858.

-
216. Mohan, P. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking / P. Mohan, N. Rapoport // *Mol. Pharm.* – 2010. – 7. – P. 1959–1973.
217. Engelberg S. Cancer cell-selective, clathrin-mediated endocytosis of aptamer decorated nanoparticles / S. Engelberg, J. Modrejewski, J. G. Walter, Y. D. Livney, Y. G. Assaraf // *Oncotarget.* – 2018. – 9. – 20993–21006.
218. Saftig P. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function / P. Saftig, J. Klumperman // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2009. — 10. — 623-635.
219. Zhang S. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis / S. Zhang, H. Gao, G. Bao // *ACS Nano.* – 2015. – 9. – 8655–8671.
220. Antipin I. Design of molecular carriers based on sulfonated viologen cavitand for redox-induced substrate delivery / I. Antipin, P. Klypina, T. Sergeeva, A. Ziganshina, A. Sapunova, A. Voloshina // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2019. - 49 (S1). – 160.
221. Strużńka L. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity / L. Strużńka, M. Chalimoniuk, G. Sulkowski // *Toxicology.* – 2005. – 212. – 185-194.
222. Fukushima T. Mechanism of cytotoxicity of paraquat / T. Fukushima, K. Tanaka, H. Lim, M. Moriyama // *Environ. Health Prev. Med.* – 2002 – 7. – 89–94.
223. Murugavel K. Benzylic viologen dendrimers: a review of their synthesis, properties and applications / K. Murugavel // *Polym. Chem.* – 2014. – 5. – 5873-5884.
224. Asaftei S. HIV-1 X4 Activities of Polycationic “Viologen” Based Dendrimers by Interaction with the Chemokine Receptor CXCR4: Study of Structure–Activity Relationship / S. Asaftei, D. Huskens, D. Schols // *J. Med. Chem.* – 2012. – 55. – 10405–10413.
225. Mezo A. R. Water-Soluble Cavitands: Synthesis of Methylene-Bridged Resorcin[4]arenes Containing Hydroxyls and Phosphates at Their Feet and Bromomethyls and Thiomethyls at Their Rims / A. R. Mezo, J. C. Sherman // *J. Org. Chem.* – 1998. – 63. – 6824-6829.
226. Estrela J. M. Glutathione in cancer biology and therapy / J. M. Estrela, A. Ortega, E. Obrador // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2006. – 43. – 143-181.
227. EVA v.11.0.0.3. User Manual. SOCABIM 2005
228. TOPAS V3: General profile and structure analysis software for powder diffraction data. (2005). Technical Reference. Bruker AXS. Karlsruhe. Germany. – 117 p.
229. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия, 1971. – 456 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Рис. S 1.	ИК спектры $C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$	146
Рис. S 2.	1H и ^{13}C ЯМР спектры $C_{10}H_{21}RA$ в D_2O	146
Рис. S 3.	1H и ^{13}C ЯМР спектры $C_{10}H_{19}RA$ в D_2O	147
Рис. S 4.	ИК спектры C_3H_6OH-RA , $p(C_3H_6OH-B-OL)$ и $p(C_3H_6OH-B-St)$	147
Рис. S 5.	1H ЯМР спектры C_3H_6OH-RA , $p(C_3H_6OH-B-OL)$ и $p(C_3H_6OH-B-St)$	148
Рис. S 6.	^{13}C ЯМР спектры C_3H_6OH-RA , $p(C_3H_6OH-B-OL)$ и $p(C_3H_6OH-B-St)$	148
Рис. S 7.	(А) ИК спектры $Ag@C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{21}RA$; (Б) ИК спектры $Ag@C_{10}H_{19}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$	149
Рис. S 8.	ИК спектры (А) $FcRA$, (Б) $Ag@FcRA$ и (В) $Ag_{30}@FcRA$	149
Рис. S 9.	ИК-спектры SRA и $p(SRA-B)$	150
Рис. S 10.	1H ЯМР спектры SRA и $p(SRA-B)$	150
Рис. S 11.	^{13}C ЯМР спектры SRA и $p(SRA-B)$	151
Рис. S 12.	ИК-спектры SRA и $p(6SRA-5B)$	151
Рис. S 13.	1H ЯМР спектры SRA , $p(6SRA-5B)$ и $Ins@p(6SRA-5B)$	152
Рис. S 14.	1H ЯМР спектры $MEGRA$ и $p(MEGRA-B)$	152
Рис. S 15.	^{13}C ЯМР спектры $MEGRA$ и $p(MEGRA-B)$	153
Рис. S 16.	ИК спектры $MEGRA$ и $p(MEGRA-B)$	153
Рис. S 17.	1H ЯМР спектры $SVCA$ и $p(SVCA-SS)$	154
Рис. S 18.	ИК спектры $SVCA$ и $p(SVCA-SS)$	154

Рис. S 1. ИК спектры $C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$.Рис. S 2. 1H и ^{13}C ЯМР спектры $C_{10}H_{21}RA$ в D_2O .

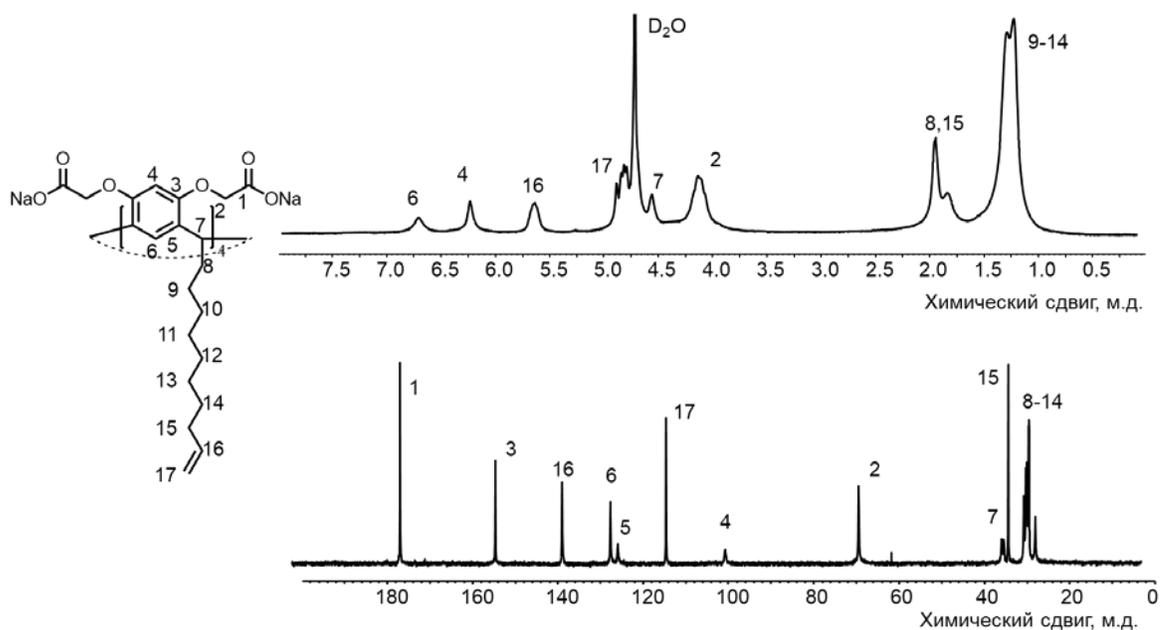


Рис. S 3. ^1H и ^{13}C ЯМР спектры $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{RA}$ в D_2O .

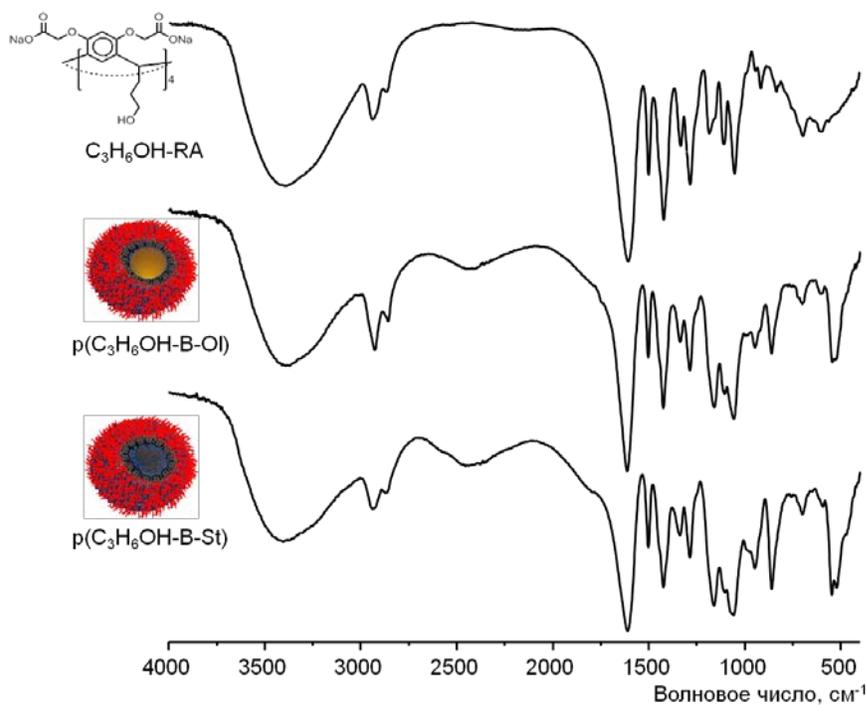


Рис. S 4. ИК спектры $\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}$, $\text{p}(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ и $\text{p}(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$.

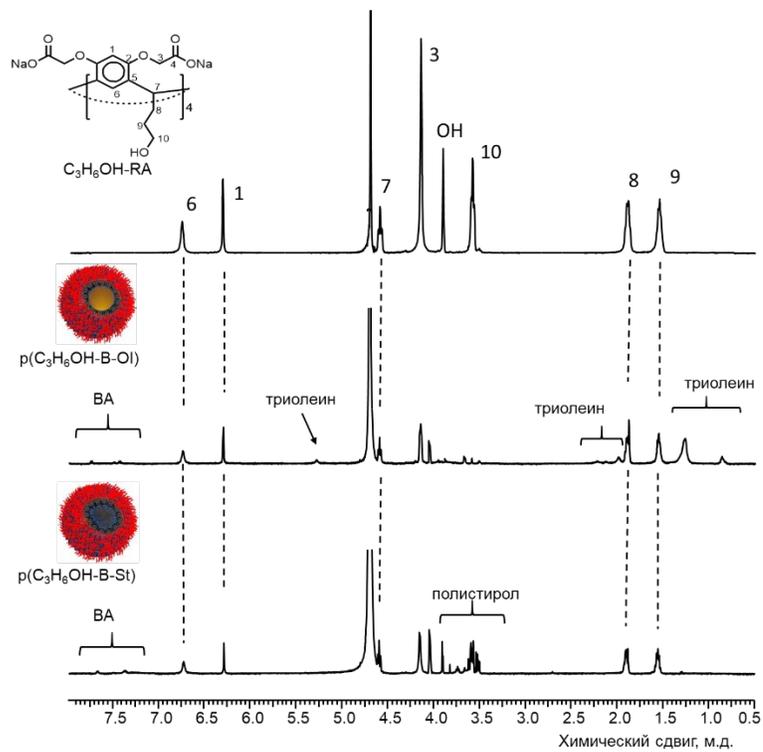


Рис. S 5. ^1H ЯМР спектры $\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}$, $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ и $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$.

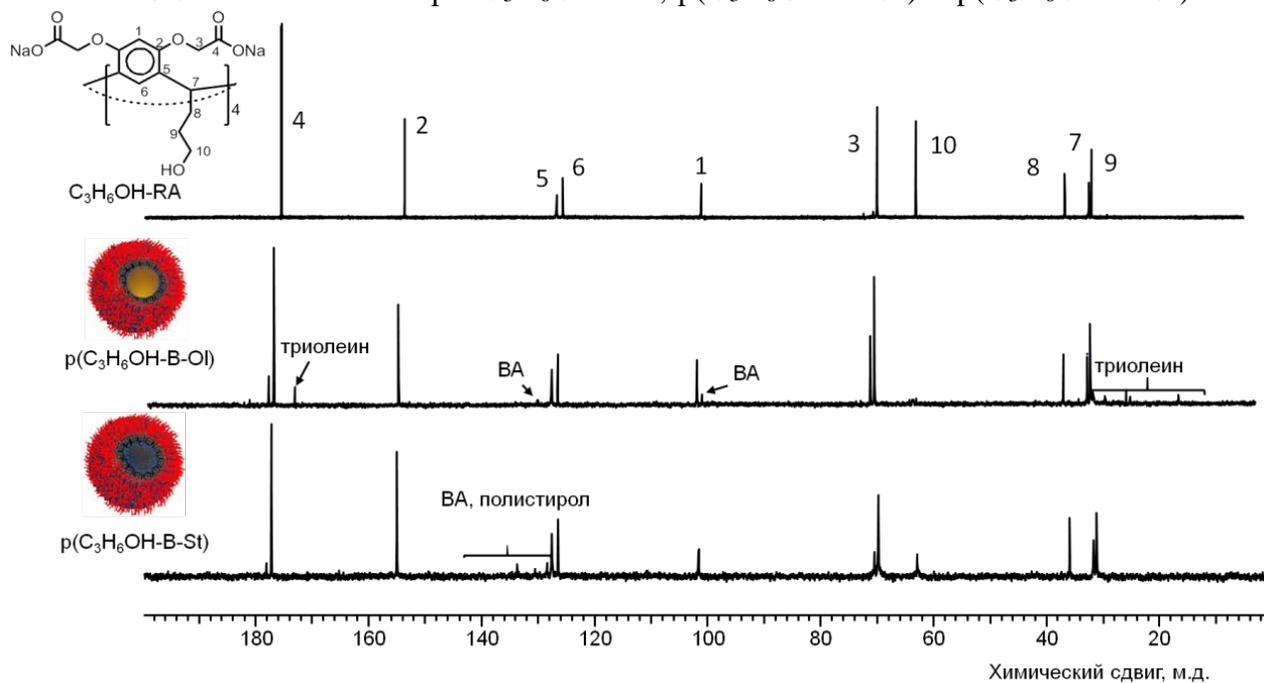


Рис. S 6. ^{13}C ЯМР спектры $\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-RA}$, $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-OI})$ и $p(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH-B-St})$.

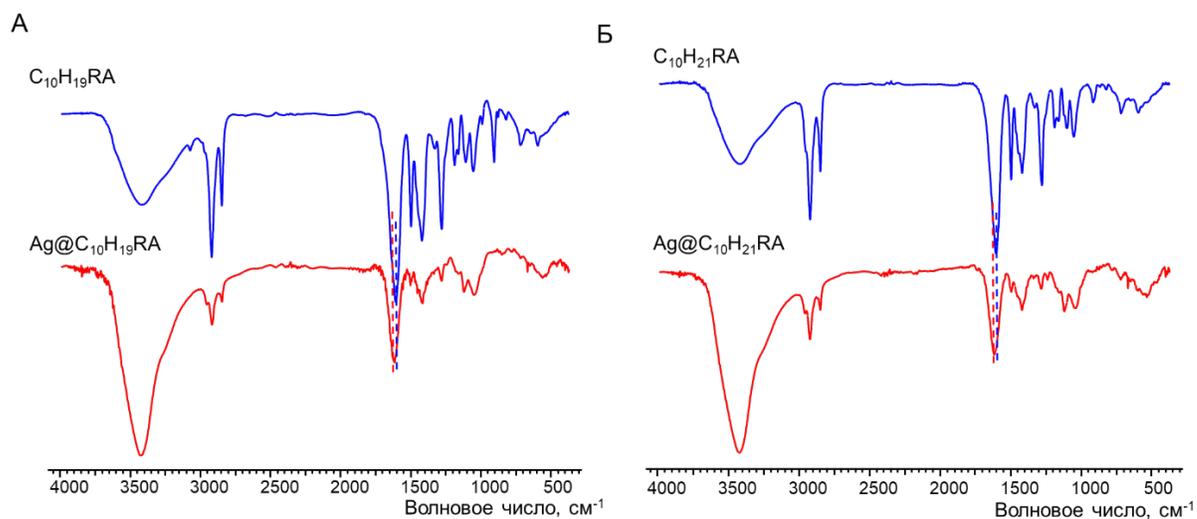


Рис. S 7. (А) ИК спектры $Ag@C_{10}H_{21}RA$ и $C_{10}H_{21}RA$; (Б) ИК спектры $Ag@C_{10}H_{19}RA$ и $C_{10}H_{19}RA$.

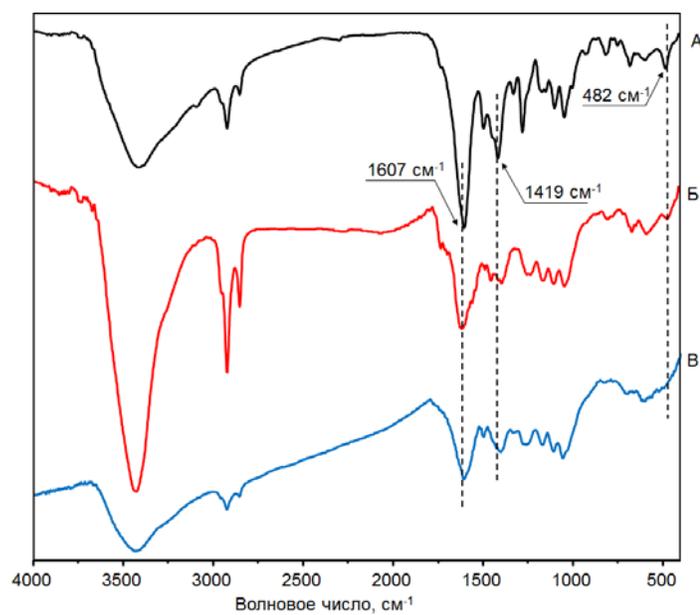


Рис. S 8. ИК спектры (А) FcRA, (Б) $Ag@FcRA$ и (В) $Ag_{30}@FcRA$.

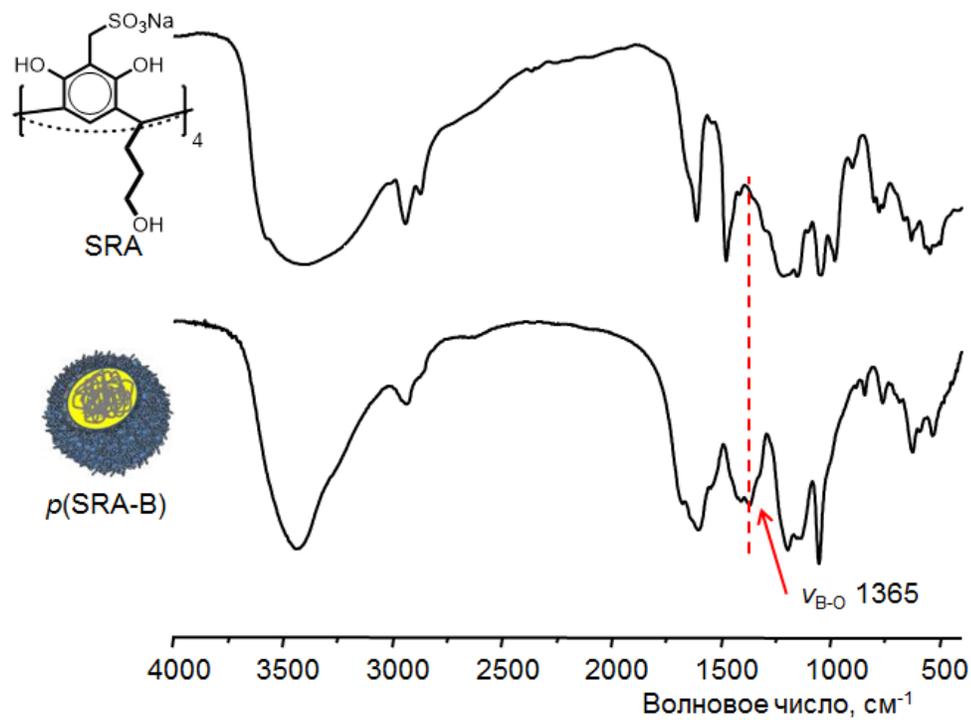
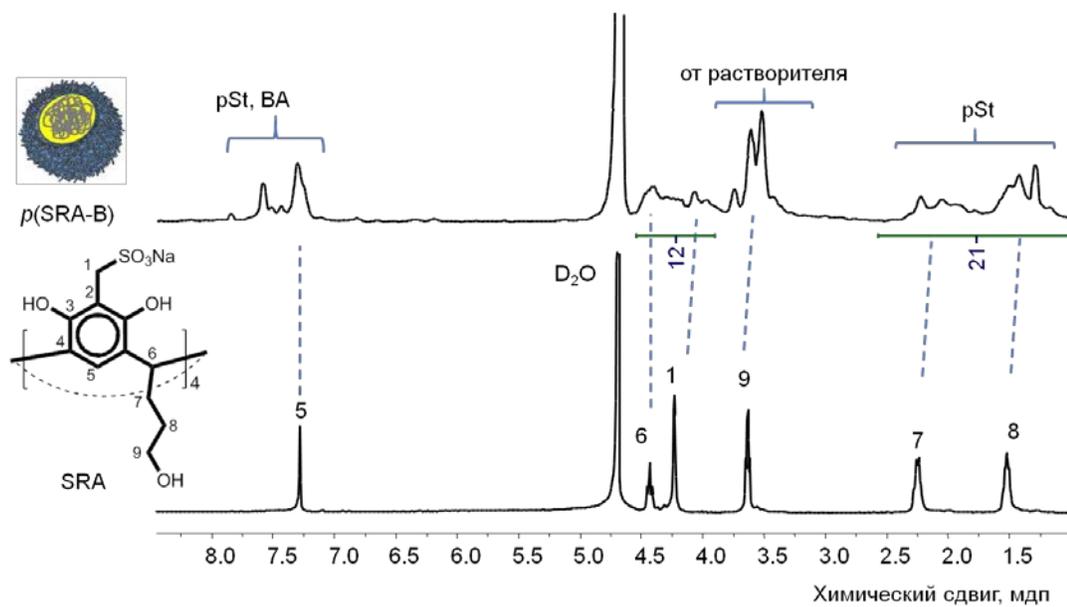


Рис. S 9. ИК-спектры SRA и p(SRA-B).

Рис. S 10. ¹H ЯМР спектры SRA и p(SRA-B).

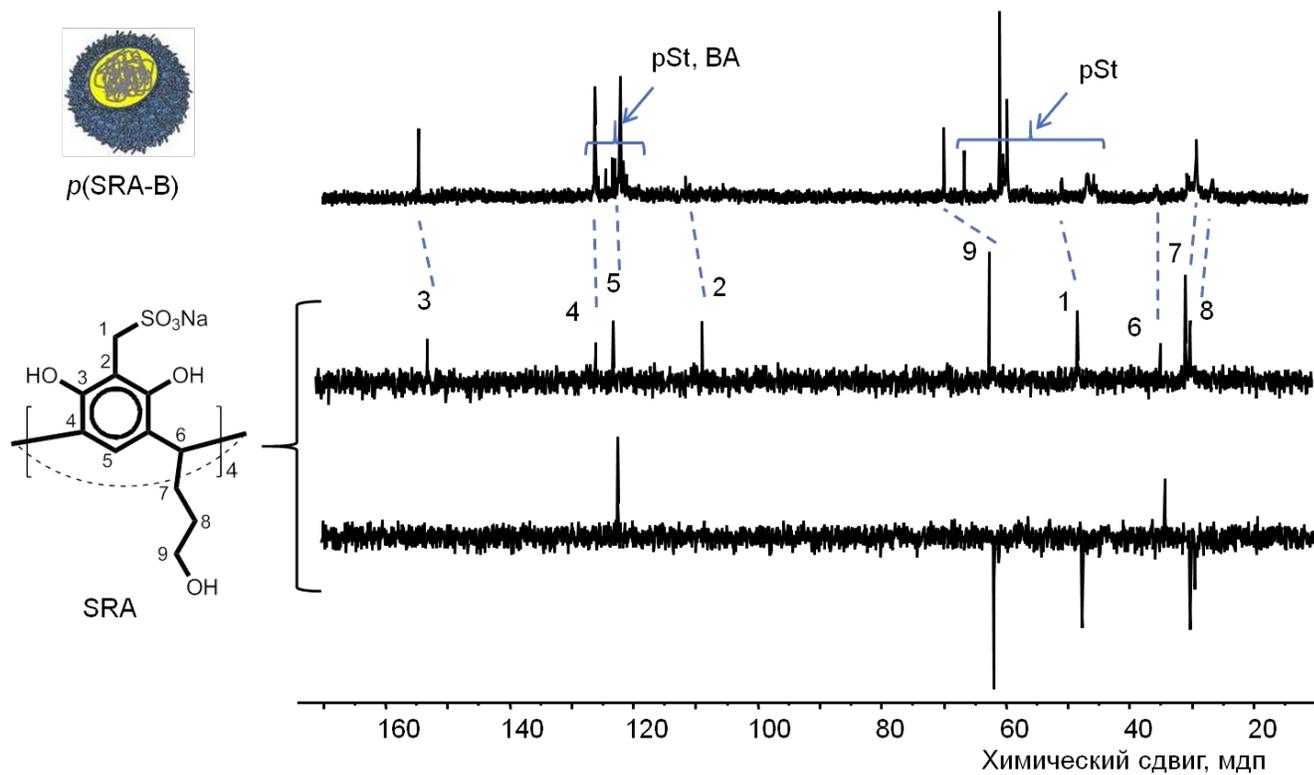
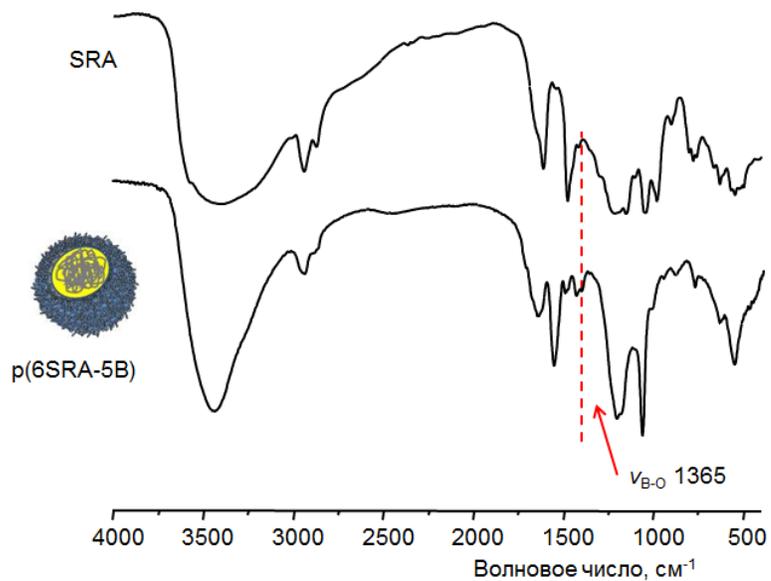
Рис. S 11. ¹³C ЯМР спектры SRA и p(SRA-B).

Рис. S 12. ИК-спектры SRA и p(6SRA-5B).

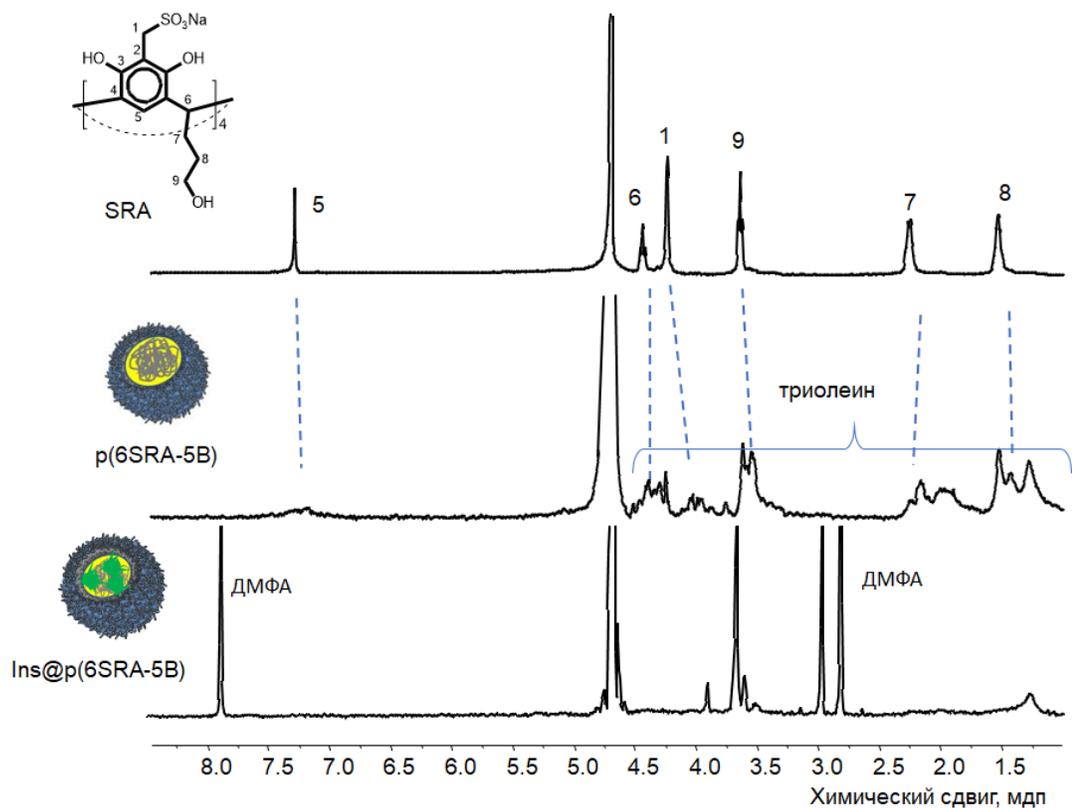


Рис. S 13. ^1H ЯМР спектры SRA, p(6SRA-5B) и Ins@p(6SRA-5B).

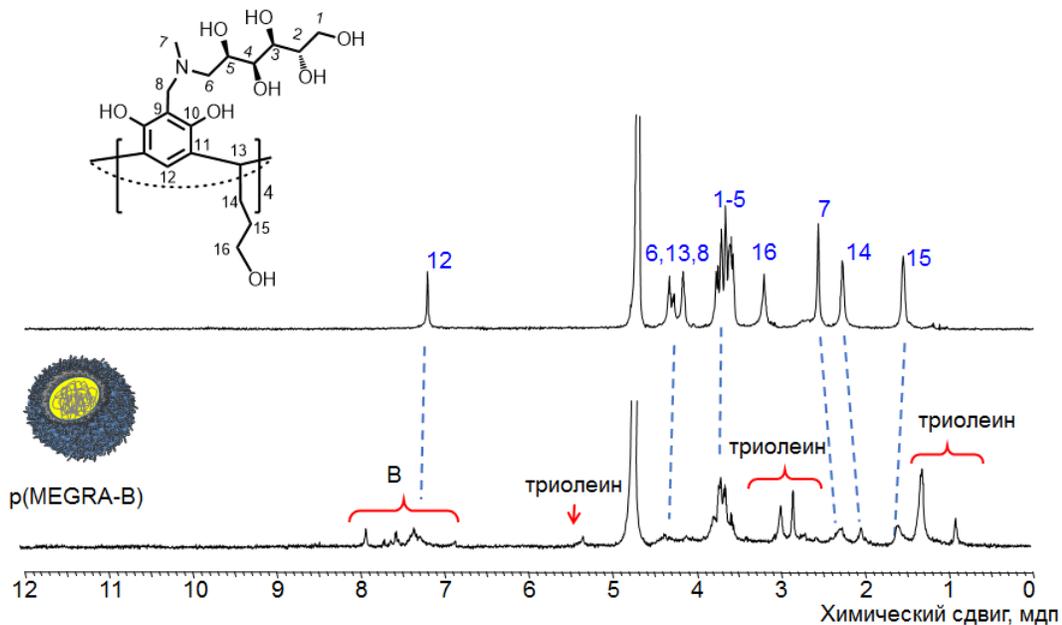


Рис. S 14. ^1H ЯМР спектры MEGRA и p(MEGRA-B).

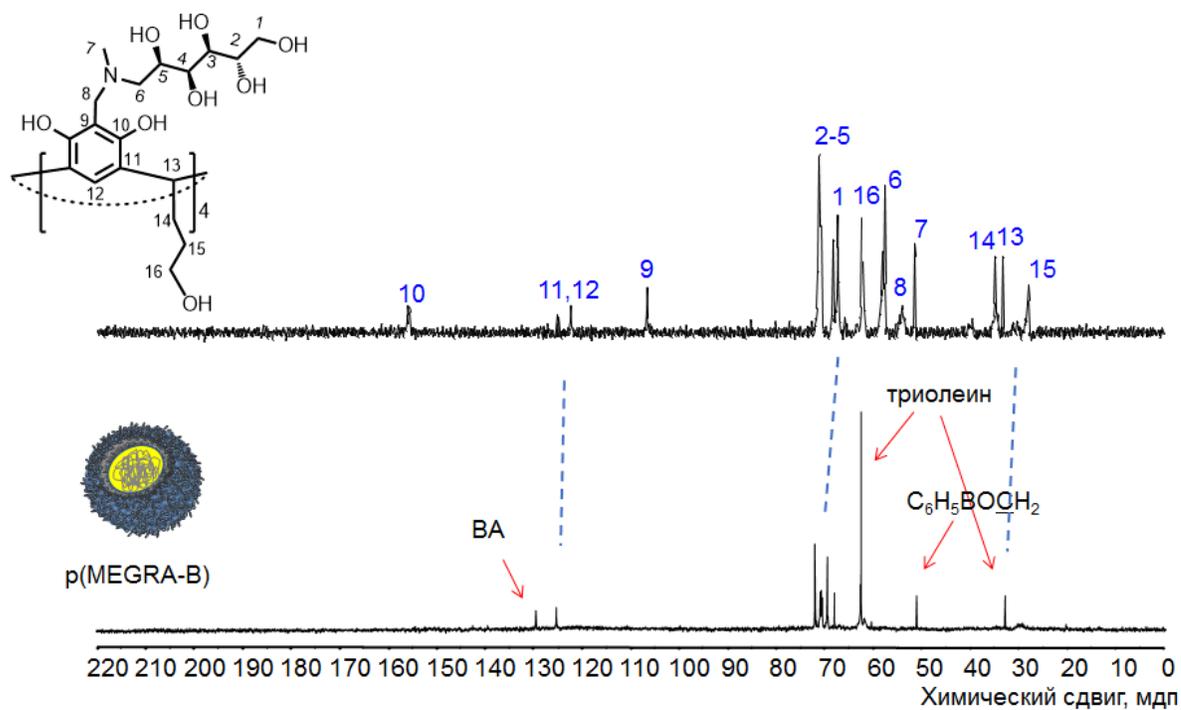
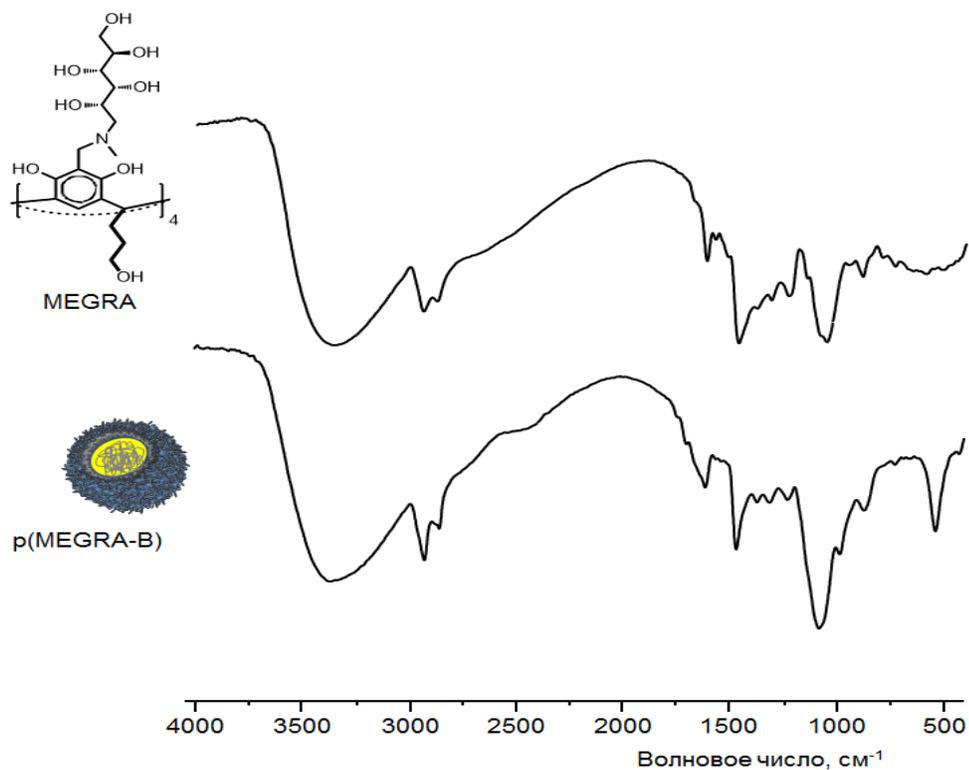
Рис. S 15. ^{13}C ЯМР спектры MEGRA и p(MEGRA-B).

Рис. S 16. ИК спектры MEGRA и p(MEGRA-B).

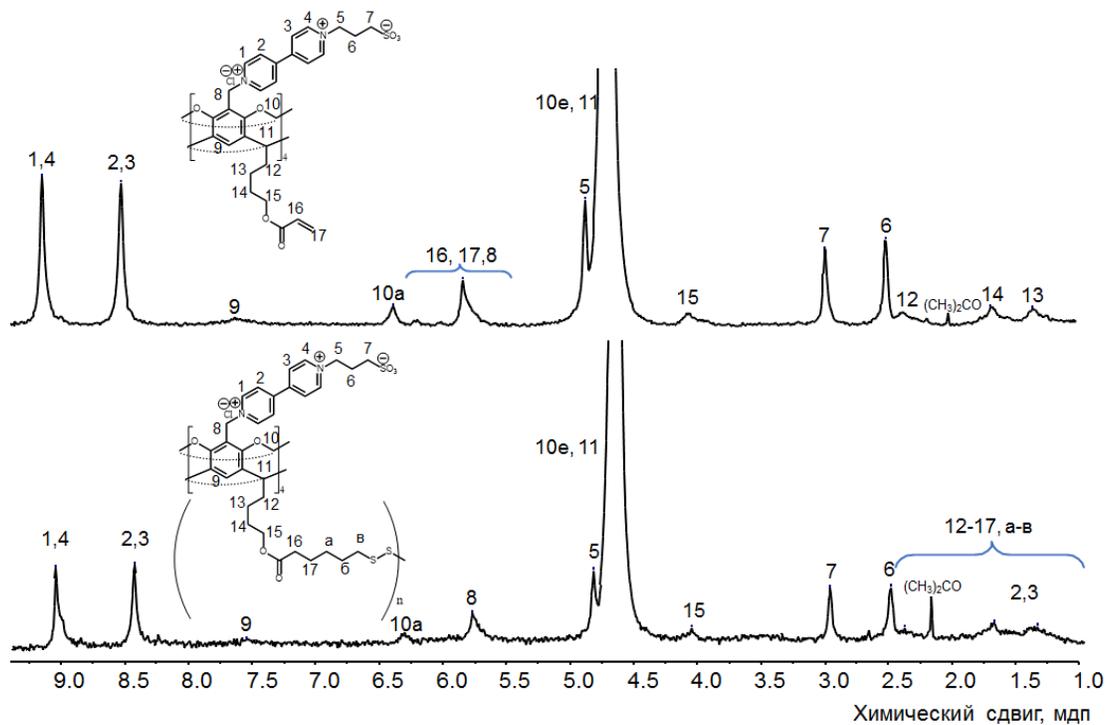


Рис. S 17. ^1H ЯМР спектры SVCA и p(SVCA-SS).

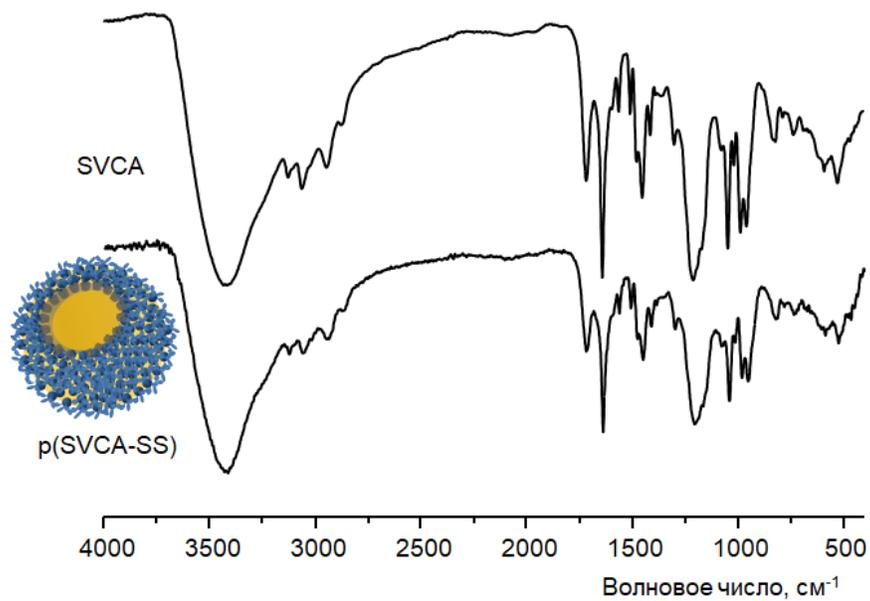


Рис. S 18. ИК спектры SVCA и p(SVCA-SS).