ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ИМ. Н.С. ЕНИКОЛОПОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Хаптаханова Полина Анатольевна

ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ И НАНОЧАСТИЦ БОРА ДЛЯ НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

> Научный руководитель: к.х.н. Успенский Сергей Алексеевич

Москва 2024 г.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	.6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	14
1.1. Актуальность проблемы и основные принципы бор-нейтронозахватной терапии	.14
1.2. Препараты для бор-нейтронозахватной терапии	16
1.3. Основные способы синтеза и свойства наночастиц элементного бора	18
1.4. Применение полисахаридов в медицине	21
1.4.1. Применение полисахаридов в медицине: гиалуроновая кислота	.22
1.4.2. Применение полисахаридов в медицине: производные целлюлозы	26
1.5. Полимолочная кислота: синтез, свойства, медицинское применение	31
1.5.1. Применение ПМК в медицине: микро- и наночастицы	.38
1.6. Полиаминокслоты: синтез, свойства, медицинское применение	.41
1.7. Механохимия: импульсная механоактивация	46
ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ	51
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	.52
2.1. Характеристики исходных веществ	.52
2.2. Методики синтеза	.53
2.2.1. Наночастиц элементного бора	53
2.2.1.1. Лабораторный синтез	.53
2.2.1.2. Синтез наночастиц бора с применением экспериментального ультразвуково	ого
реактора	54
2.2.2. Синтез поли-L-молочной кислоты	55
2.2.3. Синтез сополимера є-полилизина-поли-L-молочной кислоты	55
2.2.4. Стабилизация наночастиц бора в полимерных матрицах	.56
2.2.5. Определение времени окисления частиц бора	57
2.3. Методики анализа	57
2.3.1. Динамическое светорассеяние	.57
2.3.2. Рентгенофазовый анализ	58
2.3.3. Трансмиссионная электронная микроскопия	.58
2.3.4. Сканирующая электронная микроскопия	59
2.3.5. Инфракрасная спектроскопия	.59
2.3.6. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	.61
2.3.7. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия	.63

2.3.8. Дифференциальная сканирующая калориметрия
2.3.9. Эмиссионная спектрометрия с дугой постоянного тока
2.3.10. Гель-проникающая хроматография64
2.3.11. Малоугловое рентгеновское рассеяние
2.3.12. Измерение динамической вязкости растворов полимеров
2.3.13. In vitro исследования
2.3.14. In vivo исследования
2.3.15. Радиобиологические исследования полимерных композиций на основе наночастиц
бора69
2.3.16. Ветеринарная практика применения полимерных композиций, содержащих
наночастицы бора в нейтронной захватной терапии70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ71
3.1. Наночастицы элементного бора71
3.1.1. Исследование параметров синтеза наночастиц элементного бора методом
ультразвукового диспергирования71
3.1.2. Исследование морфологии частиц и определение структурно-фазовых характеристик
наночастиц бора76
3.1.3. Стабилизация наночастиц бора в полимерных матрицах
3.2. Синтез сополимера є-полилизина-поли-L-молочной кислоты
3.2.1. Синтез поли-L-молочной кислоты методом твердотельной дополиконденсации89
3.2.2. Синтез ПЛ-ПМК методом импульсной механохимии
3.3. Радиобиологические испытания полимерных композиций на основе наночастиц бора в
условиях БНЗТ111
3.3.1. In vitro исследования полимерных композиций на основе наночастиц бора111
3.3.2. Радиобиологические исследования полимерных композиций на основе наночастиц
бора118
3.3.3. In vivo исследования полимерных композиций на основе наночастиц бора120
3.3.4. Ветеринарная практика применения полимерных композиций, содержащих
наночастицы бора в нейтронной захватной терапии126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ129
ВЫВОДЫ131
БЛАГОДАРНОСТИ132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ
ПРИЛОЖЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БНЗТ	_	бор-нейтронозахватная терапия
B/B	_	внутривенное введение
в/бр	_	внутрибрюшинное введение
BM	_	внеклеточный матрикс
ГК	_	гиалуроновая кислота
оГК	_	олигоГК
нГК	_	низкомолекулярная ГК
вГК	_	высокомолекулярная ГК
ГПХ	_	гель-проникающая хроматография
ГЭЦ	_	гидроксиэтилцеллюлоза
ДЗХК	_	дезоксихолевая кислота
ДМСО	_	диметилсульфоксид
ДНК	_	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСК	_	дифференциальная сканирующая калориметрия
ДСР	_	динамическое светорассеяние
ИК	_	инфракрасная спектроскопия
КМЦ	_	карбоксиметилцеллюлоза
МК	_	молочная кислота
MPT	_	магнитно-резонансная томография
МУРР	_	малоугловое рентгеновское рассеяние
НПВО	_	нарушенное полное внутреннее отражение
НЧ	_	наночастица
ПКЛ	_	поликапролактон
ПАВ	_	поверхностно-активное вещество
ПАК	_	полиаминокислота
Перр.	_	пероральное введение
ПЛ	_	є-полилизин
ПЛГА	_	полилактид-со-гликолид
ПМК	_	поли-L-молочная кислота
ПЭГ	_	полиэтиленгликоль
РФЭС	_	рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
СДЛ	_	система доставки лекарств

—	степень замещения		
_	сканирующая электронная микроскопия		
_	трансмиссионная электронная микроскопия		
_	ультразвуковой		
—	ультразвуковое диспергирование		
—	эмиссионная спектрометрия с дугой постоянного тока		
—	спектроскопия ядерно-магнитного резонанса		
—	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид		
—	4-Borono- L-phenylalanine, борфенилаланин		
_	sodium borocaptate, боркаптат натрия		
—	гликопротеин клеточной мембраны		
—	European Medicines Agency, Европейское агентство лекарственных		
	средств		
_	Food and Drug Administration, Управлением по санитарному надзору за		
	качеством пищевых продуктов и медикаментов США		
—	Good Manufacturing Practice, надлежащая производственная практика		
—	рецептор ГК-опосредованной подвижности		
—	solid state polycondensation, твердотельная дополиконденсация		

введение

Современные достижения в области синтеза и модификации биосовместимых полимерных материалов оказали существенное влияние на развитие пролонгируемых систем доставки лекарств и практическое совершенствование терапевтических функций лекарственных препаратов, таких как: селективная локализация, контролируемый профиль высвобождения и снижение системной токсичности. Актуальной задачей является разработка полимерных систем доставки борсодержащих препаратов для одного из передовых направлений лучевой терапии онкологических заболеваний – борнейтронозахватной терапии (БНЗТ).

БНЗТ бинарная лучевая терапия, которая демонстрирует положительную тенденцию к повышению эффективности лечения сложных форм раковых образований, включая злокачественные опухоли мозга. Метод БНЗТ заключается в использовании соединений на основе стабильного изотопа ¹⁰В в качестве основы терапевтических препаратов и стабильного пучка тепловых (<0.1 эВ) нейтронов. Одним из ключевых факторов, ограничивающим развитие и применение методики БНЗТ в широкой практике является клинические препараты, которые не накапливаются в достаточной дозировке в пораженной области (30 мкг ¹⁰В на 1 г опухоли – 10 млрд. атомов) и тем самым не обеспечивают необходимый регресс опухоли после нейтронного облучения [1]. Для успешной реализации БНЗТ предъявляются основные требования к разрабатываемым препаратам, такие как: отсутствие системной токсичности, биосовместимость, высокая концентрация ¹⁰В, доступные и масштабируемые методы синтеза.

Создание системы доставки терапевтического препарата на основе наночастиц элементного бора и полимерных матриц является одним из перспективных подходов в получении мишенного агента для реализации БНЗТ. Актуальность применения наночастиц элементного бора в качестве терапевтического препарата БНЗТ заключается в высоком содержании атомов ¹⁰В в одной частице: при диаметре в 50 нм число атомов составит ~500 тыс., что обеспечит терапевтическую концентрацию ¹⁰В для БНЗТ в раковых клетках в случае селективной локализации.

Гидрофобный характер наночастиц элементного бора является лимитирующим фактором, который может ограничить их применение в области медицины. Из-за высокой гидрофобности наноструктуры бора можно использовать в биологических приложениях только после предварительной ковалентной или нековалентной функционализации, что позволяет снизить процесс агрегации в жидких средах, способствует повышению солюбилизации и одновременно приводит к изменению их биодоступности. Появление концепции инкапсуляции гидрофобных лекарственных средств в матрицы биополимеров способствовало качественному и количественному росту разработок, в фармацевтической сфере. Биополимерные материалы в системах доставки лекарств значительно улучшают фармакологические и терапевтические свойства лекарственных/терапевтических веществ (связанных с полимерами), в результате контроля их фармакокинетики, фармакодинамики, биораспределения, токсичности. Управление фармакологическими и токсическими свойствами инкапсулированных лекарственных средств стало возможным, так как большинство биополимеров биосовместимы, не иммуногенные, обладают предсказуемыми механизмами деградации, а разнообразие их химической структуры и наличие реакционноспособных функциональных групп определяют потенциал для присоединения специфических таргетных молекул [2].

Из множества биополимеров, современные носители для доставки лекарств зачастую производят из тоннажных полисахаридов, в частности гиалуроновая кислота, целлюлоза и ее водорастворимые производные [3]. Использование полисахаридов и их производных может повысить растворимость, снизить токсичность инкапсулированных лекарственных веществ, что приводит к появлению различных механизмов контроля профилей высвобождения препаратов, исключению взаимодействия с нецелевыми биообъектами в организме. Полисахариды образуют верхней гелевый слой на поверхности инкапсулированной дисперсии, при этом, где толщина слоя определена химической структурой, концентрацией и вязкостью раствора полимера.

Альтернативными матрицами для инкапсуляции наночастиц бора являются сложные полиэфиры и полиаминокислоты. Полимолочная кислота (ПМК) – алифатический сложный полиэфир, который одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) для изготовления регулируемых медицинских изделий класса III [4].

Однако, ПМК является гидрофобным и инертным полимером, что значительно ограничивает его применение в инвазивной медицине. Идея создания амфифильных макромолекул с ПМК способствует расширению свойств полимерных носителей на его основе. В настоящее время разработаны, промышленно производятся и применяются системы доставки на основе ПМК в составе блок-сополимера с полиэтиленгликолем (ПЭГ) в виде нано- и микрочастиц, для контролируемой доставки соединений различных классов, включая ДНК, антигены, вакцины, пептиды [5]. Известны торговые марки [6]: Risperdal Consta, Lupron Depot, Vivitrol и т.д., всего 19 наименований, одобренных FDA.

Модификация цепи полимолочной кислоты гидрофильными фрагментами близкими по своей природе к составу структурных элементов клеток организма будет способствовать

созданию нового поколения «умных» полимерных носителей для систем доставки лекарств. Одним из таких соединений, является полиаминокислота – є-полилизин (є-ПЛ-NH₂), Поликатионная природа є-ПЛ при физиологическом pH делает его одним из кандидатов в области доставки лекарств, при этом ПЛ обладает реакционноспособными функциональными группами для связывания с целевыми лигандами и биомаркерами для обеспечения специфического клеточного поглощения (активная доставка) [7]. є-ПЛ также как и ПМК, имеет одобрение FDA. Материалы на основе как є-ПЛ, так и ПМК характеризуются комплексом необходимых свойств для медицинского применения, таких как: биосовместимость, низкий иммунный ответ, регулируемые физико-химические и механические свойства. В зависимости от задач, решаемых в медицине, перечисленные свойства полимеров можно изменить, варьируя молекулярно-массовые характеристики полимеров в процессе их синтеза, сополимеризации, модификации или функционализации [8].

Новым и исключительно перспективными подходом в синтезе сополимеров ПЛ-ПМК являются применение методов импульсной механохимии. Метод реализуется в процессе механохимической активации в вибрационной мельнице, который обеспечивает деформационное перемешивание, приложение давления со сдвигом, сопровождаемое непрерывным образованием в твердом теле дефектов, которые способствуют протеканию химических реакций при комнатной температуре без использования больших количеств органических растворителей и катализаторов [9, 10]. Твердофазные процессы, инициируемые механическим воздействием, стали предметом интенсивных исследований.

Реализация выбранных подходов в разработке предложенных полимерных композиций с наночастицами бора для БНЗТ обеспечит высокую эффективность метода и возможность варьирования молекулярно-массовых характеристик, надмолекулярных структур, контролируемых сроков биодеградации в различных средах, дополнительной функционализации таргетными молекулами.

Актуальность темы исследований. Разработка биосовместимых полимерных композиций на основе наночастиц элементного бора позволит повысить эффективность БНЗТ за счет увеличения дозы ¹⁰В.

Цель диссертационной работы: разработать научно-технологические подходы к получению перспективных композиций для БНЗТ на основе биосовместимых полимеров и наночастиц элементного бора, соответствующих требованиям: отсутствие токсичности; высокое содержание ¹⁰В в одной единице препарата (мкг/мг полимера); биодоступность композиции; высокий ингибирующий эффект в условиях БНЗТ для исследуемых биологических систем; стабилизация наночастиц бора в полимерных матрицах. Получение

композиций с наночастицами бора, диспергированных в полимерных матрицах, должно быть реализовано с применением доступных, масштабируемых, а также эффективных методов синтеза.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Разработать композиции на основе биосовместимых полимеров и наночастиц элементного бора, обеспечивающие стабильность частиц во времени, биодоступность. Предложить доступные способы получения таких полимерных композиций.

2. Разработать методику получения ультрадисперсных фракций наночастиц бора менее 100 нм. Провести количественный и качественный анализы нанодисперсий бора, исследовать морфологию и состав.

3. Исследовать коллоидную устойчивость наночастиц бора в водных растворах полисахаридов: гиалуроновая кислота, гидроксиэтилцеллюлоза. Провести комплекс биологических и радиобиологических экспериментов для определения эффективности разработанных композиций на основе полисахаридов с наночастицами бора в условиях БНЗТ.

4. Изучить процессы и особенности инкапсулирования наночастиц бора в матрицу ПМК.

5. Провести синтез сополимеров полимолочной кислоты и є-полилизина для использования в качестве инкапсулирующей матрицы наночастиц бора. Исследовать структуру полученных сополимеров. Оценить эффективность инкапсуляции наночастиц бора в матрицу ПЛ-ПМК.

6. Сравнить эффективность распределения полимерных композиций (ГК, ГЭЦ, ПЛ-ПМК) с наночастицами бора для модели in vivo.

Научная новизна полученных результатов.

1. Впервые предложены рецептуры полимерных композиций на основе полисахаридов, сополимеров сложных полиэфиров и полиаминокислот, в матрицу которых инкапсулированы наночастицы бора для применения в качестве БНЗТ.

2. Впервые предложено использовать эффективный безрастворный механохимический подход для синтеза привитых сополимеров полимолочной кислоты-є-полилизина, обеспечивающий более простую и экологически безопасную технологию, позволяющую получать продукт, не требующий дополнительной очистки.

3. Впервые показано, что полимерные матрицы полисахаридов, сополимера полимолочной кислоты-полилизина могут быть использованы в качестве эффективных стабилизирующих систем для нанодисперсных частиц бора, обеспечивающих сохранение размерных характеристик в течение длительного времени. Такие матрицы повышают биодоступность частиц бора, обеспечивают низкую токсичность и высокий терапевтический эффект после

нейтронного облучения.

Практическая значимость работы. Разработанные в ходе выполнения исследовательской работы композиции на основе наночастиц бора и биосовместимых полимеров позволят увеличить эффективность БНЗТ за счет повышения дозы мишенного агента в пораженных областях. Изучение параметров и условий синтеза полимерных композиций на основе наночастиц бора и биополимеров важны для предполагаемого медицинского применения. Разработаны составы композиций на основе наночастиц бора в составе полимерных матриц, ингибирующие рост злокачественного образования в экспериментах in vitro/in vivo после нейтронного облучения.

На защиту выносятся следующие положения.

1. Впервые получены полимерные композиции с наночастицами элементного бора для БНЗТ. Показа эффективность стабилизации частиц бора в водных растворах полисахаридов: гиалуроновой кислоте, гидроксиэтилцеллюлозе;

2. Впервые показана возможность получения наночастиц элементного бора менее 100 нм с применением тонкого механохимического диспергирования в условиях акустической кавитации.

3. Представлена зависимость параметров диспергирования на морфологию, дисперсность частиц бора; определены этапы фракционирования частиц с узким гранулометрическим распределением. Методами ДСР, ИК-спектроскопией, ТЭМ, СЭМ, РФЭС охарактеризованы свойства наночастиц бора.

4. Впервые синтезированы композиции ПМК-наночастицы бора методом бескаталитической твердотельной дополиконденсации, охарактеризованы свойства продуктов с каждого этапа синтеза методами ДСК, рентгенофазового анализа, ГПХ. Показано влияние наполнителя (наночастиц бора) на свойства ПМК.

5. Впервые методом импульсной механохимии получены сополимеры є-полилизина и Lполимолочной кислоты. Методами ИК-, ЯМР-спектроскопией охарактеризована структура полученных сополимеров. Оценена морфология ассоциатов ПЛ-ПМК в водном буферном растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния, ДСР.

6. Проведен комплекс радиобиологических испытаний для композиций на основе наночастиц бора в составе полимерных матриц. Показа эффективность наночастиц бора в условиях БНЗТ.

Личный вклад соискателя. Автор работы внес существенный вклад в разработку концепции диссертации, активно принимал участие в постановке целей, задач, экспериментального комплекса исследований и анализа/ интерпретации полученных результатов исследований.

Автором проведен анализ литературы, разработаны методики синтеза наночастиц бора в условиях лабораторного синтеза и опытно-промышленного. Оценил свойства наночастиц бора аналитическими методами, включая ДСР, ТЭМ, СЭМ, РФЭС, рентгенофазовый анализ, ЭС ДПТ, ИК-спектроскопию, ГПХ, МУРР. Автор провел синтез композиций на основе наночастиц бора, включая готовые и синтетические полимерные матрицы, которые были охарактеризованы методами ДСК, ИК-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии, ЭС ДПТ. Автор принимал непосредственное участие в радиобиологических испытаниях разработанных композиций.

Автором проведено обобщение научных результатов, которые отражены в статьях, патентах, а также представлены на профильных научных конференциях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Результаты диссертации соответствуют паспорту специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 2, 4, 9 паспорта специальности.

Степень достоверности результатов работы. Достоверность результатов данной работы подтверждается комплексом статистических исследований, реализованных с применением современных методов и подходов, а также характеризуется непротиворечивостью согласно проведенным литературным исследованиям. Результаты исследований были представлены в виде научных статей и прошли рецензирование в российских и зарубежных изданиях.

Апробация работы. Результаты научных исследований по теме диссертации опубликованы в 5-ти научных статьях в российских и зарубежный журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в базах данных «Scopus» и «Web of Science». 1 статья принята в печать. Получены 2 патента: РФ, Китай. Одобрена 1 заявка на изобретение, РФ.

Статьи:

1. Получение наночастиц элементного бора методом ультразвуковой обработки в водной среде и их применение в бор-нейтронозахватной терапии / С. А. Успенский, П. А. Хаптаханова, А. А. Заборонок и др. // ДАН – 2020. – Т.491. – С.20-24. (WoS, IF = 0.8).

Получение полимолочной кислоты методом твердотельной поликонденсации олигомеров. Влияние борного нанонаполнителя на конечные свойства полимера / П. А. Хаптаханова, Н. Б. Свищёва, Т. С. Куркин, С. А. Успенский // Известия АН. Серия химическая – 2021. – №9. – С. 1729-1735. (WoS, IF = 1.7).

3. Наночастицы элементного бора, их получение и применение в бор-нейтронозахватной терапии рака / Успенский С.А., Хаптаханова П.А., Таскаев С.Ю., Заборонок А.А. // Медицинская физика – 2021. – №1. – 89. С. 56-57. (Перечень ВАК).

4. Polymer-Stabilized Elemental Boron Nanoparticles for Boron Neutron Capture Therapy: Initial Irradiation Experiments / Alexander Zaboronok, Polina Khaptakhanova, Sergey Uspenskii [et al.] // Pharmaceutics – 2022. – Nº14. – 761.- P.1-18. (WoS, IF = 6.525).

5. Наночастицы бора в химио- и радиотерапии: синтез, современное состояние и перспективы / С. А. Успенский, П. А. Хаптаханова // Известия АН. Серия химическая – 2022. – №12. – С. 2533-2560. (WoS, IF = 1.7).

6. Chemical transformations during mechanoactivation of ε-Polylysine-Poly-L-lactic acid mixture
/ P. Khaptakhanova, S. Uspenskii, A. Aleksandrov, Yu. Ryzhykau, I. Okhrimenko // Journal of
Applied Polymer Science – 2024. Принята к публикации. (WoS, IF = 3.0).

Патенты:

 Способ получения композиции для бор-нейтронозахватной терапии злокачественных опухолей (варианты) / Успенский С.А., Хаптаханова П.А., Заборонок А.А., Куркин Т.С., Зеленецкий А.Н., Селянин М.А., Таскаев С.Ю. // Патент РФ № 2720458. Опубликован 10.12.
 2020 г.

2. Method of producing a composition for boron neutron capture therapy of malignant tumors (embodiments) / Uspenskij S.A., Haptahanova P.A., Zaboronok A.A., Kurkin T.S., Zeleneckij A.N., Selyanin M.A., Taskaev S.Yu. // China application patent no. CN114072656A filed on 2022 February 18.

3. Способ получения нанопорошка элементного бора / Успенский С.А., Хаптаханова П.А. // Заявка на изобретение РФ №2023127730. Решение о выдачи патента от 20.03.2024 г.

Результаты диссертационной работы представлены на 11 российских и международных конференциях:

1. P.A. Khaptakhanova (oral presentation). Boron nanoparticles for glioma boron neutron capture therapy / P.A. Khaptakhanova, S.A. Uspenskii, A. Zaboronok, T.S. Kurkin [et al.] // 8th European Conference on Boron Chemistry «EuroBoron 8th». Book of abstracts: p. O53. – Montpelier, France, 24-27 June 2019.

2. P.A. Khaptakhanova (oral presentation). Multifunctional boron nanoparticles: an ecological method of production, properties / P.A. Khaptakhanova, S.A. Uspenskii [et al] // International Symposium on Self-Propagating High-Temperature Synthesis. Book of abstracts: 162-164 pp. – Moscow, Russia, 16-20 September 2019.

3. P.A. Khaptakhanova (oral presentation). Boron nanoparticles: production, properties, various applications, Advanced Nanomaterials and Methods / P.A. Khaptakhanova, S.A. Uspenskii, T. S. Kurkin // ANAM 2019. Book of abstracts: 102-103 pp. – Yerevan, Armenia, 30 September-2 October 2019.

4. P.A. Khaptakhanova (oral presentation). Boron nanoparticles as a potential target drug for boron

neutron capture therapy / P.A. Khaptakhanova, S.A. Uspenskii, S.U. Taskaev // 1-я Всероссийская конференция по Бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ-2019). Книга абстрактов: 13 с. – Новосибирск, Россия, 22-25 октября 2019 г.

5. P.A. Khaptakhanova (oral presentation). Boron nanoparticles for boron neutron capture therapy / P.A. Khaptakhanova, S.A. Uspenskii, T. S. Kurkin, A.N. Zelenetskii // 8-я Международная конференция «Деформация и разрушение материалов и наноматериалов». Книга абстрактов: 841-842 с. – Москва, Россия, 19-22 ноября 2019 г.

6. Хаптаханова П.А. (стендовый доклад). Оценка влияния наноразмерного наполнителя на свойства полимолочной кислоты при его добавлении на этапе синтеза / Хаптаханова П.А., Успенский С.А., Куркин Т.С. // Восьмая Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры-2020». Книга абстрактов: 531 с. – Москва, Россия, 9-13 ноября 2020 г.

7. P.A. Khaptakhanova (oral presentation). Boron nanostructures in boron neutron capture therapy: synthesis, properties / P. Khaptakhanova, S. Uspenskii // 4-я Всероссийская конференция по бор-нейтронозахватной терапии (4th RU BNCT). Книга абстрактов: 22 с. – Новосибирск, Россия, 11-13 июля 2022 г.

8. P.A. Khaptakhanova (oral presentation). Features of changes in the properties of microparticles of elemental boron in the process of fine grinding / P. Khaptakhanova, S. Uspenskii, A. Zaboronok, T. Kurkin // 19th International congress on Neutron Capture Therapy, accelerating a new hope in the fight of cancer. Book of abstracts: p. 14. – Granada, Spain, 27 September-1 October 2022.

9. Хаптаханова П.А. (устный доклад). Синтез сополимера полимолочной кислоты-єполилизина с применением импульсных механохимических воздействий / Хаптаханова П.А., Успенский С.А. // 16-ая Санкт-Петербургская конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах». Книга абстрактов: 204 с. – Санкт-Петербург, Россия, 24-27 октября 2022 г.

10. P.A. Khaptakhanova (oral presentation). Synthesis of polylactic acid-ε-polylysine copolymer by pulsed mechanochemical actions / P. Khaptakhanova, S. Uspenskii, A. Aleksandrov // VI International Conference "Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies" (FBMT-2022). Book of abstracts: p. 90. – Novosibirsk, Russia, 21-24 November, 2022.

11. Хаптаханова П.А. (пленарный доклад). Наночастицы бора в БНЗТ: синтез, свойства, апробация / Хаптаханова П.А. // VII Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорадиология, лучевая диагностика и терапия». – Москва, Россия, 15-16 февраля 2024 г.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Актуальность проблемы и основные принципы бор-нейтронозахватной терапии

Рак является одной из основных причин смертности во всем мире ввиду сложности и гетерогенности этого заболевания. Согласно статистическим данным Международного агентства по исследованию рака, в 2023 году было зарегистрировано почти 20 миллионов новых случаев заболевания и 10 миллионов смертей [11].

Раковые клетки идентифицируют как генетически мутантные, физиологически отличающиеся от нормальных клеток человека. Синергизм патологических процессов разнообразного (измененной клеточной физиологии, микроокружения опухоли, разнообразной цитоархитектоники опухоли и модифицированных молекулярных механизмов) против химиотерапевтических препаратов отодвигает традиционную онкотерапию далеко от оптимальной [12]. Несмотря на достижения и интенсивные исследования в области онкологии, такие проблемы, как множественная лекарственная устойчивость, низкие показатели выздоровления, высокая токсичность лекарств и длительные режимы лечения, привели к снижению эффективности многих клинических методов лечения. Поэтому, дальнейшее совершенствование и улучшение методов терапии рака было преимущественно направлено на развитие персонализированной медицины и комбинированной терапии [13]. Применение комбинированной терапии способствовало снижению случаев резистентности опухоли, рецидивов заболевания, неэффективности лечения и других проблем, с которыми сталкивается монотерапия.

Бор-нейтронозахватная терапия – малоинвазивная, комбинированная терапия, применяемая при злокачественных опухолях, устойчивых к другим методам лечения, а именно химиотерапии и лучевой терапии. Метод заключается в использовании соединений на основе стабильного изотопа бора-10 (¹⁰B) в качестве терапевтических препаратов (1 компонент БНЗТ) и стабильного пучка тепловых нейтронов (2 компонент БНЗТ). Ни один из двух компонентов БНЗТ, взятых по отдельности, не оказывает губительного действия на опухоль, но их комбинация вызывает летальный эффект для опухолевых клеток с минимальным повреждением здоровой ткани. Такой эффект связан со свойством ¹⁰В переходить в возбужденный изотоп бора-11 (¹¹В) при протекании ядерной реакции с эпитепловыми нейтронами (рисунок 1).

Рисунок 1 – Основная ядерная реакция БНЗТ.

В результате ядерной реакции образуются две частицы (He⁴ и Li⁷) с высокой энергией и радиусом действия в ткани, ограниченным диаметром одной раковой клетки (~10 мкм) [14]. Это дает возможность воздействовать на отдельные опухолевые клетки и уничтожать их с высокой эффективностью, не затрагивая при этом другие ткани, содержащие меньше препарата с ¹⁰В. За счет использования соответствующих соединений бора, которые предпочтительно находятся в опухолевых клетках, а не в здоровых тканях, БНЗТ обеспечивает более высокий лечебный потенциал с минимальной токсичностью на уровне нормальных тканей.

Клинический интерес к БНЗТ был сосредоточен в первую очередь на глиомах высокой степени злокачественности [15-18], пациентах с рецидивирующими опухолями области головы и шеи [19-26], у которых традиционная терапия оказалась неэффективной, и гораздо меньшем числе пациентов с кожными [27-30] или внекожных [31] меланом. Поскольку БНЗТ в первую очередь представляет собой биологически, а не физически направленный тип лучевой терапии, должна быть возможность избирательно разрушать опухолевые клетки, инфильтрирующие нормальные ткани. Однако требование состоит в том, чтобы к месту опухоли было доставлено достаточное количество ¹⁰В и тепловых нейтронов. До 2014 года источником этих нейтронов были специально разработанные ядерные реакторы, но недавно ряд компаний в Японии [32] и США, Китае [33], России разработали источники нейтронов на основе ускорителей, которые применяются в клинической практике. С 2024 года функционируют 22 клиники, которые проводят БНЗТ на пациентах с опухолями головы, шеи, а также глиобластомы. В 2025 планируется запуск БНЗТ в России на базе «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» [34].

В 2020 году Агентство по фармацевтическому и медицинскому оборудованию впервые в мире одобрило БНЗТ на основе ускорителя с единственным клиническим препаратом борфенилаланином (ВРА, борофалан) в качестве комплекса D-сорбита (Стеборонин®) для лечения рака головы и шеи [35]. Поскольку в разных странах разрабатывают методы генерации нейтронов на основе ускорителей, а методику БНЗТ активно внедряют в повседневную практику терапии онкозаболеваний, то разработка новых борных агентов и подходов к получению перспективных композиций для БНЗТ становится все более важной и востребованной задачей.

В следующей главе обобщены тенденции в разработке препаратов для БНЗТ, а также выделены рекомендуемые требования к потенциальным препаратам.

1.2. Препараты для бор-нейтронозахватной терапии

Селективная локализация бора в опухолевых клетках необходима для получения терапевтических соотношений опухоль-кровь и опухоль-мозг во время БНЗТ. Однако, как и во всех других формах радио- и химиотерапии, ограничением, которое необходимо преодолеть в БНЗТ, является относительно неспецифическое распределение большинства борсодержащих соединений in vivo. Когда соединения БНЗТ вводятся внутривенно, они обычно распределяются как в опухолевых, так и в здоровых клетках, и необходимо разработать методы для максимального увеличения соотношения опухоль/здоровая ткань. Требуемая концентрация бора, как правило, оценивается в 10⁹ атомов ¹⁰В на клетку, что соответствует примерно 35 мкг ¹⁰В на грамм ткани [1]. Для предотвращения повреждения здоровых тканей на пути нейтронного пучка окружающая ткань должна содержать не более 5 мкг ¹⁰В/г ткани [36]. Следовательно, усовершенствование средств доставки бора значительно повысит эффективность БНЗТ.

Основными особенностями, влияющими на химическое поведение бора, являются небольшие размеры атома, высокая энергия ионизации и электроотрицательность, близкая к С и Н (и Si), что приводит к необычной способности образовывать ковалентные связи. Подобно С и Si, бор проявляет заметную склонность к образованию ковалентных связей, но резко отличается от них наличием на один валентный электрон меньше по отношению к числу валентных орбиталей, следовательно, электронно-дефицитный. Наличие трех внешних электронов объясняет его склонность образовывать трехвалентные соединения, большая часть его химии происходит от тенденции действовать как акцептор электронной пары и давать многоцентровые связи [37]. На основании таких свойств бора были синтезированы различные соединения, которое были предложены в качестве препаратов для БНЗТ.

Разработка препаратов доставки бора для БНЗТ началась около 60 лет назад, и по сей день остается сложной и высокоприоритетной задачей. Схема развития основных

направлений в разработке препаратов для БНЗТ представлена в таблице П.1 (см. Приложение). В наиболее перспективные разработки для потенциального использования в БНЗТ можно включить борсодержащие соединения/комплексы, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Примеры новых низко- и высокомолекулярных агентов доставки бора.

Борсодержащие иммунолипосомы и липосомы [38]	Кластеры карборана [45]
Борсодержащий липиодол [39]	Борсодержащие трансферрин-ПЭГ липосомы [46]
Борсодержащие нуклеозиды [40]	Производные декаборана с липидами и
	холестерином [47]
Борсодержащие сополимеры [41]	Борсодержащие полианионные полимеры [48]
Борсодержащие циклические пептиды [42]	Борсодержащие полиамины [49]
Борсодержащие дезоксирибонуклеиновую кислоту	Борсодержащие порфирины [50]
(ДНК) [43]	
Борсодержащие сахара [44]	Борсодержащие аминокислоты [51]

На основании многочисленных экспериментальных данных разработаны оптимальные параметры препаратов для БНЗТ. Вещества, используемые для введения бора БНЗТ, должны соответствовать следующим основным критериям: [52-54]:

• повышенное содержание бора в единице препарата (молекула/комплекс);

- отсутствие системной токсичности;
- соотношение концентраций бора для опухоли:кровь должно быть не более 4:1;
- содержание бора в опухоли должно составлять ~20-30 мкг ¹⁰В/г на опухоль;

• однородное микрораспределение ¹⁰В по всему объему опухоли.

Несмотря на многообразие синтезированных агентов таргетной доставки бора для БНЗТ, к настоящему моменту ни один из них в полной мере не отвечает вышеизложенным требованиям. Вероятно, это связано с сложным синтезом и небольшим выходом таких соединений, что затрудняет провести полноценные in vivo исследования для выявления всех характеристик.

Создание терапевтических препаратов нового поколения на основе наночастиц бора является одним из перспективных подходов в эффективной реализации БНЗТ. Междисциплинарные исследования в области наномедицины привели к разработке ряда агентов доставки бора в виде частиц элементного, нитрида, карбида бора, различных морфологий, подходящих в качестве терапевтических агентов БНЗТ [55]. Несомненным преимуществом терапевтического препарата на основе наночастиц бора является высокое содержание атомов ¹⁰B, ¹¹B в одной частице. При диаметре наночастиц элементного бора в 3 нм, число атомов будет составлять примерно 29 тыс., а при диаметре в 50 нм – примерно 480 тыс. атомов [55]. Наибольший исследовательский интерес, с точки зрения мишенного агента для БНЗТ, сосредоточен на наночастицах элементного бора. Учитывая предполагаемое

медицинское применение, необходимо знать особенности синтеза наночастиц бора, а именно, оценить количество загрязнений, качество прекурсоров, общие технологические стадии. В следующей главе представлены способы синтеза наночастиц элементного бора.

1.3. Основные способы синтеза и свойства наночастиц элементного бора

В практике применяются различные методы синтеза наночастиц элементного бора. При этом, могут быть получены как «аморфные» частицы, так и кристаллические, в связи с чем меняется реакционная способность частиц. Кристаллический бор гораздо менее реакционноспособен, чем «аморфный», и может окисляться очень медленно даже при более высокой температуре [56]. Полиморфные модификации кристаллического бора включают α-ромбоэдрический, β-ромбоэдрический, α-тетрагональный, β-тетрагональный и недавно открытый γ-B28 [37]. Морфология бора в значительной степени зависит от метода полученияю.

Способы получения частиц элементного бора представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные методы синтеза наночастиц бора: особенности.

№	Метод	Принцип метода	Условия синтеза	Примечание
1	Синтез из газовой фазы			вазы
A	В системе терм. плазмы [57]	Диссоциация прекурсора (BCl ₃) путем инъекции в тепловую плазму, с последующей нуклеацией НЧ бора на сетке из нержавеющей стали 2BCl ₃ + 3H ₂ = 2B + 6HCl	Среда: H ₂ /Ar T=1200-3800 ⁰ С НЧ бора раз- мером 30-70, 250 нм	<i>плюсы метода:</i> контроль морфологии наноструктур легко реализуется путем регулировки потока или соотношения предшественников и период реакции относительно короче. Степень чистоты до 99.99% <i>минус метода</i> : газообразные прекурсоры (BCl ₃) обычно токсичны, легковоспламеняемы, взрывоопасны, как следствие – сложное аппаратурное оформление
Б	Газовый пиролиз [58]	Декаборан В ₁₀ Н ₁₄ разлагают в печи	Среда: H ₂ /Ar T = 630-800 ⁰ C P = 1 атм НЧ бора раз- мером 10-150 НМ	<i>плюсы метода:</i> элементный бор высокой степени чистоты до 99.99% <i>минус метода</i> : использование токсичных органических растворителей для выделения НЧ бора; окисление поверхности НЧ до оксида
2	Синтез из твердой фазы			
Α	Получение сфе- рических наночастиц бора в ре- зультате	Высокоэнер- гетический метод измельчения в вибрационных или планетарных шаровых мельницах порошков	Условия: Шары 5-18 мм. Среда воздух; Ar. 1) стадия - пассивное	<i>плюсы метода:</i> метод применим для коммерческих целей в крупномасштабном производстве элементарного бора в относительно короткие сроки. Простота аппаратурного оформления в сравнение с

N⁰	Метод	Принцип метода	Условия синтеза	Примечание
	механи- ческого реакци- онного смешения прекурсора бора и восста- новителя [58-62]	(чистота 99%): В ₂ О ₃ и Mg: B ₂ O ₃ + 3Mg = 2B + 3MgO В ряде случаев применяют вос- пламенитель: KClO ₃ , а также проводят выщелачивание, де- кантирование и центрифугирование	перемешивание 3 часа; 2) активное перемешивание 20-30 мин. 300 об/мин; 10 часов 50 мин. Сферические НЧ бора до 80 нм, 210 нм. Средний диаметр 32; 50 нм, зависит от соотношения реагентов, среды, скорости и времени измельчения, объема загрузки контейнера материалом для измельчения	аппаратурой ХОГФ. Однако, для снижения окисления поверхности бора необходим контроль атмосферы смешения. <i>минус метода</i> : трудно контролировать температуру, необходим контроль атмосферы системы смешения. Загрязнение бора материалами, из которого состоит рабочее тело и сам реакционный контейнер. Использование дополнительных реагентов (HCl:3H ₂ O) для выщелачивания второстепенных продуктов реакции и истирания (MgO, Mg ₃ B ₂ O ₆ Fe, Co, W, Ni и т.п.). Степень чистоты до 92.8%
3	Комбинированный синтез из твердой фазы с последующей конденсацией бора в газовой фазе			
A	Обжиг порошков оксида бо- ра и маг- ния в присут- ствии хлорида натрия [59, 63-65]	Перемешивание и спекание порошков B_2O_3 и Mg в присутствии NaCl в печи. $B_2O_3 + 3Mg + nNaCl = 2B + 3MgO + nNaCl$	Среда в си- стеме: H ₂ /Ar T = 1100 ⁰ С наночастицы бора размером 30-300 нм.	<i>плюсы методы</i> метод используется в коммерческих целях для крупномасштабного производства элементарного бора в относительно короткие сроки. Степень чистоты 97-99.8% <i>минус метода</i> : окисление поверхности наночастиц элементного бора до оксида; широкий разброс по размерам; использование дополнительных реагентов (HCI:3H ₂ O) для выщелачивания второстепенных продуктов реакции (MgO, NaCl)
Б	Обжиг порошков оксида бо- ра и эле- ментного бора и графита [63-66]	 перемешивание и спекание порошков (чистота 99,99%): В₂О₃, В и графита в заданном со- отношении. инъекции в тепловую плазму 1000-1100С, с по- следующей нуклеацией наночастиц бора в виде нанопроволки. Катализатор – НЧ Fe₃O₄ 	Среда в си- стеме: 1 стадия H ₂ , 400 ⁰ C в течение 20-30 минут. 2 стадия Ar, T = 1000- 1100 ⁰ C нанотрубки бора в длину 5 мкм, диаметр 20-40 нм.	Метод применяют для получения элементного бора заданной морфологии. Степень чистоты 99.999%.

Основной недостаток указанных методов заключается в получении дисперсия бора в широком гранулометрическом распределении, что затрудняет медицинское применение.

При введении частиц с таким распределением сложности с достоверным контролем дозировки, биораспределения, возможно проявление побочных процессов, связанных с закупоркой сосудов частицами более крупных размеров.

Для получения наночастиц элементного бора с минимальным процентов примесей, загрязнений и узким гранулометрическим распределением применяют ультразвуковое диспергирование в жидких средах [67]. Ультразвук в жидкости вызывает химические процессы, которые достигаются в процессе акустической кавитации. Причиной появления кавитации могут быть достаточно большие растягивающие напряжения, возникающие в жидкости при обтекании ее различных препятствий, к примеру, при распространении в ней звуковой волны, создающей отрицательные давления. В результате тепловых флуктуациях в жидкости возникают маленькие пузырьки пара, которые и являются зародышами кавитационных полостей. Если упругость пара жидкости больше внешнего давления, пузырек будет расти, если же упругость пара меньше внешнего давления – сокращаться. При коллапсе акустической кавитации происходит интенсивный нагрев пузырьков. Рост пузырьков за счет циклов расширения-сжатия приводит к образованию локализованных «горячих точек» [68]. Эти локализованные горячие точки имеют температуру около 5000°С, давление около 2000 атм и время жизни в несколько микросекунд [69]. Кроме того, акустическая кавитация в жидкости часто вызывает многочисленные физические и/или механические эффекты (разогрев, ударные волны, микроструи), которые могут сопровождающиеся высокоскоростными межчастичными столкновениями [70-76]. Кавитацию можно создать разными способами: например, с помощью форсунок высокого давления, роторно-статорных смесителей или ультразвуковых процессоров [77].

Известно, что силы, возникающие при схлопывании микропузырьков, вызывают различные физические и химические эффекты [78-85]. Обработка жидких сред ультразвуковым воздействием генерирует высокоактивные радикалы [70]. Эти радикалы могут служить сильными окислителями или восстановителями, инициируя различные химические реакции в водном или неводном растворе, включая восстановление, окисление или гидроксилирование растворенных веществ. Ультразвук используется как источник для инициирования или усиления каталитических реакций как в гомогенных, так и в гетерогенных системах. Исследования показали, что образование перекиси водорода в условиях акустической кавитации в водной дисперсионной среде – сложный процесс, включающий множество взаимосвязанных реакций. Упрощенное описание начинается с разложения воды на водород и свободные гидроксильные радикалы: H₂O = H⁺ + OH⁻. Радикалы могут рекомбинировать с образованием воды или образовывать молекулярный водород и перекись водорода. В кислородсодержащих средах дополнительная перекись водорода может образовываться с участием пергидроксильного радикала (•HO₂) [71].

Основные преимущества использования ультразвукового диспергирования для получения наночастиц: низкий процент примесей, узкое гранулометрическое распределение, однородная форма, потенциально низкие эксплуатационные затраты. Способ ультразвукового диспергирования нашел широкое применение для получения различных наночастиц материалов различной природы (таблица П. 2, см. приложение).

Большинство наночастицы, получаемых при ультразвуковом диспергировании, неорганические, обладают гидрофобными свойствами, что ограничивает их применение в медицине, в частности, в качестве индивидуальных лекарственных или терапевтических препаратов [67]. Из-за наличия развитой поверхности, наночастицы агрегируют с последующей седиментацией, следовательно, свойства частиц меняются. Использование стабилизирующих систем на основе низкомолекулярных поверхностно-активных веществ (ПАВ) может быть проблематичным, поскольку стабилизаторы меньшего размера часто не обеспечивают желаемую растворимость и часто не могут эффективно предотвратить коалесценцию или агрегацию наночастиц перед использованием.

Согласно современным исследованиям и тенденциям, для гидрофобных частиц, которые применяются в лекарственных/терапевтических целях, активно разрабатываются инкапсулирующие системы доставки высокомолекулярной природы: липосомы, полимерные материалы, белки и тд. Стратегии контролируемой доставки лекарств продолжают оставаться наиболее удобными и совместимыми средствами лечения пациентов, поскольку решают проблем, связанных c: контролируемым ряд высвобождением, деградации препарата, снижение улучшение растворимости, дозированным высвобождением терапевтических концентраций для обеспечения высокой биодоступности препаратов в системе in vivo, а также с внедрением подходов таргетинга для минимизации системной токсичности [86-93]. Быстрое развитие новых методов синтеза крупномасштабному переработки биосовместимых полимеров способствовало И производству систем доставки лекарств. Биосовместимые полимеры имеют значительные преимущества перед неразлагаемыми полимерами, для удаления которых требуется вторичная процедура. В следующей главе рассмотрены основные принципы и особенности применения полимерных материалов в разработке систем доставки лекарственных средств.

1.4. Применение полисахаридов в медицине

Разрабатываемые препараты для БНЗТ чаще всего применяют в виде инъекционных форм, вводимых в виде водных растворов. Однако, многие разрабатываемые

молекулы/частицы в качестве мишенного агента для БНЗТ ограниченно или полностью не растворимы в воде. Конъюгация низкорастворимых борных соединений с водорастворимыми молекулами сахаров является перспективной стратегией изменения растворимости [94].

С одной стороны, гидрофильный характер сахаров гарантирует повышение растворимости борных соединений. С другой стороны, их можно использовать для нацеливания борного агента на опухоли, которые сверхэкспрессируют белки GLUT1. В литературе описано множество конъюгатов борное соединение-моносахар, соединенные через гликозидные или амидные связи. Доказано, что для обеспечения растворимости гидрофобных борных соединения (количество атомов ¹⁰В в соединении > 10) в воде необходимы как минимум две моносахаридные единицы [95]. При увеличении количество сахаридных единиц, закономерно возрастает растворимость борного агента. Поэтому использование высокомолекулярных полисахаридов может эффективно повысить растворимость гидрофобных наночастиц бора.

1.4.1. Полисахариды в медицинском применении: гиалуроновая кислота

Гиалуроновая кислота – это полисахарид с чередующимися звеньями Dглюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных β -(1 \rightarrow 4) и β -(1 \rightarrow 3) гликозидными связями (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Формула гиалуроновой кислоты.

Карбоксильная группа каждой единицы D-глюкуроновой кислоты обычно диссоциирует, что приводит к образованию отрицательно заряженной биомакромолекулы при физиологических значениях pH [96, 97]. ГК является водорастворимым полимером, обладает хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью, а также является продуктом крупнотоннажного биотехнологического производства качества Pharm.

ГК принадлежит к группе небелковых несульфатированных гликозаминогликанов и синтезируется в плазматических мембранах фибробластов, хондроцитов и синовиоцитов. [98-100]. ГК естественным образом встречается во внеклеточном матриксе (ВМ) организма

человека в форме натриевой соли (гиалуроната натрия). В наибольшей концентрации ГК присутствует в коже и синовиальной жидкости, а также входит в состав эпителиальной, нервной и соединительной тканей. Кроме того, ГК является структурным компонентов стенок кровеносных сосудов [101]. Многие исследования подтвердили участие ГК в процессах заживления ран, формировании структуры тканей, передаче сигналов клеткам и гидратации тканей [102]. Более того, специфические и неспецифические взаимодействия ГК способствуют эмбриональному развитию, дифференцировке, организации ВМ, клеточной адгезии, воспалению, регенерации тканей и структурной стабильности органов [103].

Молекулярная масса ГК имеет решающее значение во взаимодействии с клетками и тканями организма, влияет на физиологические функции и процессы. Биологическая функция ГК варьируется в зависимости от ее молекулярной массы, что приводит к ее разделению на три категории: олигосахариды ГК (оГК, <25 дисахаридных единиц), низкомолекулярная ГК (нГК, 10-100 кДа) и высокомолекулярная ГК. ГК (вГК, >100 кДа). Роль ГК в биохимии опухолей довольно сложна; например, было обнаружено, что оГК и вГК ингибируют развитие опухоли и метастазирование, тогда как нГК ускоряет эти процессы [104]. Высокомолекулярная ГК связана с гомеостазом и защитным действием в организме, оказывает противовоспалительное, антипролиферативное и антиангиогенное действие, а также способствует заживлению ран [105]. Низкомолекулярная ГК указывает на патологическое состояние ткани [106, 107], включая воспаление или канцерогенез.

Взаимодействие ГК со специфическими рецепторами на поверхности клетки определяет ее свойства в организме. На основании многочисленных исследований известно, что ГК специфична к рецепторам на поверхности мембраны клеток. Существуют два основных рецептора ГК: гликопротеин клеточной мембраны (CD44) и рецептор ГКопосредованной подвижности (RHAMM) [108]. Рецепторы CD44 появляются на фибробластах, эндотелиальных клетках, лейкоцитах, кератиноцитах, эпителиальных клетках, кроветворных клетках и различных неопластических клетках. CD44 играет значительную роль в клеточной адгезии, миграции и формировании тканей. Однако отмечено, что в опухолях человека уровень экспрессии CD44 повышен [109] и связан с прогрессированием опухоли. Рецептор RHAMM индуцирует пролиферацию и миграцию клеток, характеризуется низким уровнем экспрессии в нормальных тканях [110]. RHAMM демонстрирует повышенную экспрессию в раковых клетках, что также может приводить к метастазам [111]. Он взаимодействует с ГК через положительно заряженные аминокислотные кластеры на карбоксильном конце [112].

Учитывая возможность специфического связывания с рецепторами на поверхности

раковых клеток, биоразлагаемость и биосовместимость, применение гиалуроновой кислоты для адресной доставки противораковых препаратов достигло большого прогресса. ГК используется при разработке современных клинических средств лечения рака в различных составах/формуляциях. Наличие по длине макромолекулы ГК функциональных групп, таких как гидроксильная, карбоксильная, N-ацетил, позволяет образовывать конъюгаты ГК с лекарственными препаратами различной природы. В многочисленных исследованиях использование конъюгатов на основе ГК, показало контролируемое высвобождение и целенаправленное действие лекарства, замедление роста опухоли, улучшение качества И минимизацию токсичности [113]. жизни пациентов лекарств Соединение цитотоксического препарата с макромолекулярным веществом улучшает фармакокинетический профиль лекарства, продлевает распределение лекарства и сокращает время выведения [114-117].

Гиалуроновая кислота и ее производные широко используются в различных системах доставки лекарств в форме: наночастиц, геля, наноэмульсий, полиэлектролитных микрокапсул, микросфер, пленок (таблица 3).

Таблица 3 – Конъюгаты ГК и лекарственных средств для терапии онкологических заболеваний.

Конъюгат	С чем борьба	Свойства
Амфипатический	Защита ДНК от	•не токсичен;
вектор	деградации под	•высокая скорость трансфекции в клетках
ГК/полиэтиленамин	действием нуклеазами	HepG2;
М _N ГК: 1500 кДа [118]		•In vivo исследования
ГК/полилизин/ДНК	Для накопления	•не токсичен;
М _N ГК: 600 кДа [119]	конюъгата в	•взаимодействие с рецептором HERE клеток
	синусоидальном	эпителия печени, для последующей экспрессия
	эндотелии печени	генов;
		•In vivo исследования
ГК/ полиэтиленимин	Применялся для	•не токсичен;
/дексаметазон/ДНК	уплотнения ДНК в	•высокое клеточное поглощение;
М _N ГК:10 кДа [120]	наноразмерную	•высокая эффективность трансфекции
	структуру и облегчения	опухолевых клеток В16-F10;
	ядернои транслокации	•высокая противовоспалительная активность;
	ДНК после эндоцитоза в	•ингиоирование роста опухоли;
	опухолевые клетки, а	•In vivo исследования
	полианион 1 К в качестве	
	внешней короны	
	использовался для	
	улучшения адресной	
	доставки к опухоли и	
	интотоксинности	
НА-шисплатин	Снижение почечной	•не токсичен.
Мы ГК: 1000 кЛа [121]	токсичности от	•эффективное накопление писплатина в
	использования	опухоли.
	токсического писплатина	•снижение системной токсичности:
	······	•In vivo исследования
НА/доксорубицин	Колоректальный рак	•не токсичен;
М _N ГК: 50 кДа [122]	1 1	•эффективное накопление доксорубицина в

Конъюгат	С чем борьба	Свойства
	•	кишечнике в течение 24 часов при внутривенном
		введении;
		•снижение экспрессии кишечных маркеров
		апоптоза и воспаления;
		•Клинические исследованиях II фазы
НА-паклитаксел	Повышение	•использование ГК позволило повысить
М _N ГК: 35 кДа [123]	противоопухолевой	растворимость паклитаксела в воде;
	эффективность и	•не токсичен;
	снижение токсичность	•высокая противоопухолевая активность –
	паклитаксела	накопление, опосредованное CD44;
		•высокое ингибирующее действие для
		плоскоклеточного рака головы и шеи OSC-19 и
		HNS;
4 1 1		•In vivo исследования
Амфифильные произвое	оные I К	
I К/церамид/	Повышение	•не токсичен;
M ГV: 6 r По [124]	эффективности загрузки	•увеличенное клегочное поглощение в
M _N I К. 0 КДа [124]	и стабильности	(MCE 7)
	профиля высвобожления	
	профиля высвоеождения	•In vivo исспелования
ГК/фторурациц	Исспелование	•не токсичен:
М _N ГК: 120 кЛа [125]	накопления конъюгата в	•высокая загрузка фторурацила (25 мол. %):
MM 110 120 MAG [120]	опухолях.	•снижена системная токсичность:
	сверхэкспрессирующих	• высокое накопление в опухоли:
	CD44	•In vivo исследования
ГК/камптотецин	Исследование	•не токсичен;
М _w ГК: 7.5 кДа [126]	накопления конъюгата в	•снижена системная токсичность;
	опухолях,	• высокое накопление в опухоли;
	сверхэкспрессирующих	•In vivo исследования
	CD44	
ГК-фуллерен С60-	Увеличение	•растворимость в воде;
трансферин/	стабильности С60 в in	•не токсичен;
Артесунат	vivo	•высокое внутриклеточное накопление;
М _N ГК: 12-14 кДа		•повышенная противоопухолевая активность;
[127]		•регресс опухоли;
11		•In vivo исследования
Наночастицы, покрыт	ые I К	
I К/ЛИПИД/	гак молочнои железы	•растворимость в воде;
Наночастицы железа/		•не токсичен;
$M_{12} \Gamma K \cdot 1000 \ \kappa \Pi_0 [128]$		•эффективный регресс опухоли молочной
WIN I К. 1000 КДа [120]		
Мегопористые	Колоректальный рак	
углеролные	Колоректальный рак	•не токсичен.
наночастицы/ГК		•повышенное накопление к онкоклетках:
М _м ГК: 100 кЛа [129]		•эффективный регресс колоректального рака:
[,		•In vivo исследования
ПЭГ-	Рак молочной железы	•не токсичен;
наночастицы/ГК/Ддо		•повышенное накопление к онкоклетках;
ксорубици		•высокая противоопухолевая активность в
М _N ГК: 1100 кДа [130]		отношении раковых клеток;
,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		•In vivo исследования

На основании свойств конъюгатов, которые описаны в таблице 3, можно сделать вывод о том, что действительно, ГК имеет множество преимуществ: улучшение растворимости лекарственного средства; обеспечение целенаправленной и безопасной

доставки химиотерапевтических препаратов и других противораковых средств in vivo; увеличение периода полураспада противораковых лекарств и целевую доставку к клеткам, сверхэкспрессирующим рецепторы к ГК. Таким образом, многие противоопухолевые методы лечения могут быть более эффективными при более низких дозах, что приводит к меньшему количеству побочных эффектов, связанных с системной токсичностью. ГК привлекает большое внимание в системе доставки не только противоопухолевых препаратов, но и нанопрепаратов, обеспечивая хорошую платформу для их стабилизации. Система доставки нанопрепаратов с модифицированной поверхностью гиалуроновой кислотой может не только улучшить нацеливание нанопрепарата, но и относительно продлить время циркуляции in vivo. Гидрофильная оболочка предотвращает ненужную адсорбцию белков плазмы крови, тем самым избегая неспецифического поглощения эндотелиальной ретикулярной системой.

Исследования гиалуроновой кислоты как носителя противоопухолевого препарата достигли большого прогресса, но некоторые проблемы все еще требуют дальнейшего изучения. Использование конъюгатов гиалуроновой кислоты с лекарственным средством ограничено из-за отсутствия гибких методов синтеза. Модификации ГК гидрофобными препаратами приводит к изменению растворимости полимера. Поэтому, важно контролировать степень замещения макромолекул ГК. Кроме того, благодаря наличию рецепторов гиалуроновой кислоты в эндотелиальных клетках печени, в in vivo экспериментах наблюдается высокое накопление ГК и конъюгированных препаратов в печени. Считается, что перспективы использования гиалуроновой кислоты в качестве носителей лекарств станут еще шире с открытием новых материалов и развитием новых технологий.

1.4.2. Полисахариды в медицинском применении: производные целлюлозы

Альтернативными полимерами из группы полисахаридов, которые активно применяется в медицинских целях, является тоннажные целлюлоза и ее производные (рисунок 3). Такие полимеры особенно перспективны в качестве экономически эффективных перспективных материалов для биомедицинских применений из-за их биосовместимости, биоразлагаемости и низкой токсичности [131]. Более того, благодаря своей химической функциональности целлюлозные материалы можно легко модифицировать для получения полезных продуктов с заданными свойствами.



Рисунок 3 – Химическая структура целлюлозы с двумя β-1,4-связанными ангидроглюкозными единицами.

Целлюлоза и ее производны используются в тканевой инженерии, входят в число вспомогательных веществ, часто используемых в фармацевтических и промышленных продуктах различного назначения [132]. Производные целлюлозы активно используются в качестве суспендирующих агентов в жидких препаратах для перорального применения, а также в составе твердых лекарственных форм, обеспечивающих немедленное или контролируемое/пролонгированное высвобождение лекарственного препарата. Основные направлении в применении целлюлозы представлены в таблице 4.

Тип	Применение	Особенности
Микро-/нанокристаллическая целлюлоза [133]	Тканевая инженерия	Пленки для культуры клеток in vitro и регенерация тканей in vivo
		Гидрофобные и липофильные каркасы
		Нанокомпозитная пленка с антибактериальной активностью
Целлюлозные микро- /нанофибриллы [134]	Тканевая инженерия	Модификация поверхности каркаса из нановолокон
		Модифицированные пленки с адаптированными свойствами каркаса для регулирования клеточного роста
	Перевязочный материал для ран	Сшитый каркасный материал с ранозаживляющими свойствами
		Материал с свойствами повышенной эпителизации поиорского участка
Бактериальная целлюлоза [135]	Тканевая инженерия	Мембрана для усиления роста фибробластов и безбелкового прикрепления клеток
		Гидрогель для регенерации костной ткани
		Мембраны для инженерных кровеносных сосудов
	Перевязочный материал для ран	Материал для эпителизации и регенерации кожи
		Микрочастицы гидрогеля в качестве перевязочного материала
	Доставка лекарств	Трансдермальная система доставки лекарств
		Наполнитель для таблеток

Габлица 4 – Основное применение целлюлозь

Основным ограничением использования целлюлозы в биомедицинских целях является ее нерастворимость в воде и других распространенных растворителях. Это связано со стабилизацией молекул целлюлозы внутри- и межмолекулярными водородными связями, а также электростатическими и гидрофобными взаимодействиями внутри интегрированных фибрилл, образующими прочные пучки с многочисленными гидроксильными группами, которые распределены по основной макроцепи. В результате возникновения прочных связей между запутанными цепями целлюлозы целлюлоза становится нерастворимой в воде и большинстве распространенных растворителей. Поэтому для изменения растворимости и свойств целлюлозы разработали ряд ее производных.

Для изменения растворимости и расширения применения целлюлозы, путем химической модификации были разработаны различные производные целлюлозы, которые широко применяются в биомедицинской промышленности. Свойства производных целлюлозы определяются не только типом и степенью замещения, но и характером функционализации вдоль полимерной цепи. Региоселективный синтез производных целлюлозы ограничен плохой растворимостью целлюлозы в органических растворителях и высокими стерическими затруднениями из-за жесткой и объемистой цепи целлюлозы. Гидроксильные группы целлюлозы являются относительно плохими нуклеофилами, что приводит к необходимости проведения довольно жестких реакций, поэтому использование относительно небольших различий в реакционной способности между 2-, 3- и 6-ОНгруппами затруднено [136]. Производные целлюлозы, такие как метил, этил, гидроксиэтил, гидроксиэтилметил, гидроксипропил, гидроксипропилметил и карбоксиметиловые эфиры целлюлозы (рисунок 4), образуются путем гидроксилэтерификации соответствующим алкилгалогенидом предварительно подщелачиваемой целлюлозы, обычно получаемой из древесной массы. Степень замещения (СЗ) в этих эфирных производных указывает на среднее количество R-групп, присутствующих в каждой единице глюкана вдоль цепи. Максимальное значение СЗ равно трем, поскольку это количество гидроксильных групп, которые могут быть заменены на каждую единицу глюкана. СЗ влияет на физические свойства производных целлюлозы, такие как растворимость [137].



Эфир целлюлозы	R – группа:
Метилцеллюлоза	H, -CH ₃
Этилцеллюлоза	H, -CH ₂ CH ₃
Гидроксиэтилцеллюлоза	H, -CH ₂ CH ₂ OH
Гидроксипропилцеллюлоза	H, [CH ₂ CH(CH ₃)O] _n H
Карбоксиметилцеллюлоза	H, -CH ₂ COONa

Рисунок 4 – Химическая структура производных эфиров целлюлозы.

Эфир целлюлозы может быть водорастворимым в зависимости от химической структуры заместителя, а также степени и характера замещения. Большинство водорастворимых эфиров целлюлозы имеют степень замещения 0.4-2.0. Хотя многие эфиры целлюлозы были синтезированы с начала 1900-х годов, лишь некоторые из них приобрели коммерческое значение. Среди всех производных карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), метилцеллюлоза и ГЭЦ широко используются в рецептурах промышленных биомедицинских продуктов для перорального, местного или парентерального применения, благодаря их нетоксичному профилю и соответствующим реологическим и механическим свойствам [138, 139]. Наиболее актуальное применение водорастворимых эфиров целлюлозы в фармацевтических промышленных продуктах, заключается в создании матричных систем для твердых пероральных лекарственных форм. Благодаря водному набуханию материала высвобождение лекарственного средства контролируется за счет его диффузии через образующиеся слои гидрогеля. Основные свойства и области применения производных целлюлозы представлены в таблице 5.

Тип	Функциональная	Синтез	Свойства	Применение
производного	группа			
Метилцеллюлоза [140]	-ОН или -ОСН3	Обработка целлюлозы в щелочной среде с помощью метилирующего агента, таких как метилхлорид или диметилсульфат	 Растворитель: H₂O (<50°C) при C3 1.4-2.0, CH₃COOH при C3 2.4-2.8; не токсичен; обладает термогелирующей способностью; эмульгирующие свойства. 	Пищевая промышленность, тканевая инженерия
КМЦ [138]	-OH или -OCH ₂ COOH	Обработка целлюлозы монохлоруксусной кислотой (СЗ 0.6 до 1.25)	 Растворитель: H₂O; не токсичен; эмульгирующие свойства. 	Тканевая инженерия (стимулированная адгезия, инкубация фибробластов, инкубация фибробластов, инженерия костной ткани), перевязочные материалы (растворимая пенная повязка, повязки на ожоговую рану), доставка лекарств (матрица для

Таблица 5 – Свойства и применения производных целлюлозы.

Тип	Функциональная	Синтез	Свойства	Применение
производного	группа			
				высвобождения лекарств, гидрогелевый комплекс для инъекционных препаратов), пищевая промышленность, адсорбционные технологии, текстильная
	011		D	промышленность
Этилцеллюлоза [141]	-OH или -OCH2CH3	Обработка целлюлозы этилхлоридом, при 60°С в течение нескольких часов	 Растворитель: глицерин, пропан- 1,2-диол при СЗ 2.2-2.6; не токсичен; высокая пленкообразующая способность. 	Бумажная промышленность, тканевая инженерия (каркасные материалы с микропористой структурой для наращивания костной ткани), перевязочные материал для ран, материалы для без инфекционного заживления ран; доставка лекарств: матрица для контролируемого и пролонгированного высвобождения гилрофобных лекарств
ГЭЦ [139]	-ОН или -OCH2CH2OH	Обработка целлюлозы этиленоксидом	 Растворитель: H₂O; легкость в модифицировании; 	Косметические средства, доставка лекарств
Гидроксипропил- целлюлоза [142]	-ОН или -OCH ₂ CH(OH)- CH ₃	Обработка целлюлозы 1,2- пропиленоксидом	 не токсичен. Растворитель: H₂O; легкость в модифицировании; не токсичен. 	Тканевая инженерия, доставка лекарств (композитный материал для фермент- контролируемой системы доставки лекарств в толстую кишку, композиции для гастроретенционной доставки лекарств), заживление ран (биоразлагаемые гидрогелевые композиты для лечения ран), сенсорные технологии

Целлюлоза имеет долгую историю применения в фармацевтической промышленности, где ее использовали в качестве покрытия для таблеток при смешивании с различными наполнителями для перорального применения [131]. Несмотря на обширную историю использования производных целлюлозы в таблетировании, все еще продолжаются исследования потенциального использования целлюлозы и ее производных в

усовершенствованных системах доставки лекарственных средств. Такие системы смогут обеспечивать высокую скорость растворения таблеток, контролируемые диффузионные свойства и растворимость. Например, было замечено, что производные целлюлозы демонстрируют определенные схемы доставки лекарств путем мгновенного, контролируемого или отсроченного высвобождения в пероральных лекарственных формах [143]. Кроме того, естественная устойчивость целлюлозных материалов к кислой среде желудка делает их практичными для использования в качестве энтеросолюбильных покрытий капсул или таблеток [144]. Также производные целлюлозы использовались в качестве стабилизаторов для кристаллических наночастиц лекарств, в качестве матриксообразователя для обеспечения длительного устойчивого высвобождения лекарства в течение нескольких недель, а также в качестве пленкообразователя со свойствами немедленного высвобождения для плохо растворимых лекарств [145].

Последние достижения в исследовании свойств, показали, что целлюлозные материалы обладают характеристиками, которые можно адаптировать для широкого спектра биомедицинских применений, тканевой инженерии, а также для разработки систем доставки лекарств и перевязочных материалов.

1.5. Полимолочная кислота: синтез, свойства, медицинское применение

Полимолочная кислота, классифицируемая как алифатический сложный полиэфир, является одним из наиболее широко используемых биоразлагаемых, биосовместимых, не иммуногенных полимеров, применяемых в медицинских целях. ПМК – тоннажный полимер, объемы производства которого непрерывно увеличивается. ПМК объединяет несколько интересных свойств, которые делают такой полимер идеальным кандидатом для биомедицинских применений. Основные преимущества и недостатки ПМК представлены в таблице 6.

Преимущества	Недостатки		
Экологичность:	Плохая прочность:		
• ПМК производится из возобновляемого	• Очень хрупкий материал, удлинение которого при		
природного сырья;	разрыве составляет <10%.		
• Биоразлагаемый, пригоден для вторичной			
переработки и компостирования;			
 При производстве ПМК потребляется СО₂. 			
Биосовместимость:	Низкая скорость деградации:		
• продукт деградации молочная кислота, которая	• В условиях in vivo ПМК разлагается в результате		
нетоксична и метаболизируется in vivo.	гидролиза, скорость которого зависит от ряда		
	факторов: степень кристалличности, молекулярно-		
	массовые характеристики, объем изделия.		
	Медленная деградация ПМК приводит к		
	длительному сроку службы изделия in vivo,		

Таблица 6 – Преимущества и недостатки ПМК [146-148].

Преимущества	Недостатки	
	поэтому, при необходимом повторном извлечении	
	изделия из организма могут возникнуть сложности.	
Технологичность:	Гидрофобность:	
• ПМК облает хорошей способностью к	• ПМК является гидрофобным полимеров (краевой	
термопереработке, по сравнению с другими	угол смачивания воды 80°). В условиях in vivo	
биополимерами (ПМК может быть переработана	наблюдается низкое сродство (адгезия) к клеткам	
различными технологичными методами, в отличие	организма, а также наблюдаются воспалительные	
от других биополимеров): литье под давлением,	реакции в местах контакта ПМК с биологическими	
экструзия, выдувное формование,	жидкостями.	
термоформование волокон.		

Мономером для синтеза ПМК является водорастворимая молочная кислота (МК), которая представлена в виде двух энантиомерных форм: L-MK и D-MK (рисунок 5).



Рисунок 5 – Энантиомеры молочной кислоты.

В практике реализуют различные методы получения МК: ферментация углеводов или химический синтеза из таких ресурсов, как уголь, нефтепродукты и природный газ [149].

Хотя оба энантиомера используются в промышленной практике, L-MK представляет интерес для биомедицинских применений. МК – метаболит организма, которая выполняет регуляторную роль в различных клеточных физиологических процессах, индуцируя изменения пространственной конформации белков. К примеру известно, что лактилирование лизина в составе белков ядра клетки, приводит к эпигенетической модификации, что подтверждает роль лактата в патофизиологических процессах, включая инфекционные и злокачественные [150]. ПМК также может быть переработана обратно в мономер путем гидролиза или термической деполимеризации. В условиях in vivo L-MK может включаться в цикл Кребса или превращаться в гликоген в печени, но в конечном итоге МК выводится из легких в виде H₂O и CO₂ [151].

ПМК можно производить как из чистых изомеров L-MK (L-ПМК) и D-MK (D-ПМК), так и из рацемической смеси L- и D-мономеров (L, D-ПМК). Стереохимия оказывает существенное влияние на свойства материала: L-ПМК представляет собой полукристаллический полимер, а L, D-ПМК представляет собой аморфный полимер без точки плавления [152]. Кроме того, скорость разложения L-ПМК значительно медленнее, чем L, D-ПМК, из-за присутствия кристаллических областей.

Физико-химические и механические свойства ПМК могут быть адаптированы к

необходимым требованиям применения за счет варьирования молекулярно-массовых характеристик, стереорегулярности, степени кристалличности. ПМК демонстрируют высокую механическую прочность и модуль упругости. В таблице 7 перечислены основные свойства ПМК: значения параметров выражаются в виде диапазонов, так как они сильно зависят от характеристик тестируемого материала (молекулярная масса, кристалличность, обработка и т. д.) [153].

Свойства	ПМК	L-ПМК	L, D-ПМК
р, г/см ³	1.21-1.25	1.24-1.30	1.25-1.27
σ, МПа	21-60	15.5-150	27.6-50
Е, ГПа	0.35-0.5	2.7-4.14	1.0-3.45
ε, %	2.5-6	3.0-10.0	2.0-10.0
Т стеклования, ⁰ С	45-60	55-65	50-60
Т плавления, ⁰ С	150-162	170-200	аморфный

Таблица 7 – Физические свойства ПМК [153].

Вариабельность свойств позволяет создавать изделия с необходимыми фармакокинетическими и биоразлагаемыми характеристиками. ПМК была одобрена FDA для изготовления материалов для медицинских изделий классов 3, 4, а также инъекционных форм (в составе сополимера с ПЭГ) для систем пролонгированной доставки гидрофобных/гидрофильных фармацевтических субстанций (Таблица 8) [154].

Таблица 8 – Медицинское применение ПМК.

Область	Применение	
Ортопедия [155]	Изделия для:	
	• регенерации после травм периферических нервов и	
	спинного мозга;	
	• восстановления мениска;	
	 направленной костной регенерации. 	
	Биоадсорбируемые винты.	
Кардиология [156]	Изделия для:	
	• реконструкции грудной клетки;	
	• сосудистого стента.	
Стоматология [157]	Изделия для:	
	• направленной регенерации костной/эпителиальной	
	ткани;	
	• реставрации.	
Пластическая хирургия [158]	Изделия для:	
	• шовных материалов;	
	• реконструкции костного каркаса;	
	• дермальных наполнителей;	
	• реконструкции кожных покровов.	
Хирургия [159]	Сетки для грыжи.	
Гинекология [160]	Сетка для лечения стрессового недержания.	
Радиология [161]	Микрочастицы для тераностических агентов.	
Онкология [162]	Микро- и наночастицы для доставки	
	гидрофобных/гидрофильных лекарств.	

Для получения ПМК используют два основных синтетических метода: прямая поликонденсация (включая поликонденсацию в растворе и поликонденсацию в расплаве) и

полимеризация с раскрытием цикла (рисунок 6). В таблице 9 представлены основные параметры методов синтеза ПМК. На рисунках представлены основные механизмы синтеза ПМК.

Метод	Условия	М _N ПМК, кДа	Особенности
синтеза	C	. 100 П-	. V
ия с	• получение лактида из МК;	• 100 кда (катализатор:	• удаление примесси из всех исходных реагентов;
раскрытием	• +катализаторы (0.1-1.0 мол.%):	Sn(Oct) ₂)	• Удаление остатков
лактида [163]	соли/оксиды Sn, Zn, Al, Sb, втор-,		катализаторов, растворителей из
	трет-бутиллитий, метанол, октанол,		ПМК;
	1-додеканол;		• Дезактивация каталитической
	• +растворители: дифениловыи эфир,		системы.
	• полимеризация пактила (Т~140-		
	170°C);		
Поликонденс	Стадии:	• 130 кДа	• Синтез проводят в аппаратах,
ация в	• удаление растворной воды (Т~100-	(катализатор:	обеспечивающих интенсивное
расплаве	140°С, 8-15 мбар);	бутоксид	перемешивание для обеспечения
[164]	• поликонденсация MK $(1 \sim 140 - 160\% C 5.7 \text{ убор})$;	титана (IV) ;	хороших массо- и теплопереноса
	• поликонленсация одигомеров ПМК	100°С), • 100 кЛа	реактор с мешацкой которые
	в расплаве (T~160-180 ^o C, 0.1-1.5	(катализатор:	обеспечивает хорошее
	мбар).	SnCl ₂ , 180 ⁰ C);	радиальное и аксиальное
	• Катализаторами поликонденсации	• 79 кДа	перемешивание).
	(добавляют в раствор мономера, 0.1-	(катализатор:	• Важно: удаление растворной, а
	1.0 мол.%): сильные кислоты, а также	La_2O_3).	также реакционнои воды (общее
	основе Ge Sb Zn Fe Al Ti Sn		не более 1 ррт) Лля этого
			применяют вакуумирование,
			барботирование инертным газом
			(Ar). При неэффективном
			удалении воды возможны
			побочные реакции
			переэтерификации, приводящая к
			разного размера Образование
			кольцевых структур, таких как
			лактид, снижает общую
			молекулярную массу.
			• Удаление остатков
			катализаторов из полученной ПМК.
Азеотропная	Стадии:	• 100 кДа	• Удаление реакционной воды из
дегидратация	• удаление растворной воды (T~100-	(катализатор:	реакционной среды становится
[165]	140°C, 8-15 Moap);	$SnCl_2$;	оолее легким при дооавлении
	• поликонденсация МК $(1 \sim 140 - 160^{\circ}$ C 5-7 мбар).	• 50 кда (катализатор:	растворителя, улучшается теплоперенос
	• добавление растворителя:	порошок Sn.	• Растворитель необходимо
	• поликонденсация олигомеров ПМК	растворитель:	регенерировать.
	в растворе (T~160-180°C, 0.1-1.5	0.16 мол.%	• Полученный полимер
	мбар).	CH ₃ OH,	необходимо выделять из
	• Растворители: анизол,	дифениловый	органического растворителя.
	дифениловыи эфир, п-	эфир, 130°С);	• Удаление остатков
	• Обрыватели непи: метаноп этаноп	- 520 кда (катализатор)	ПМК.
	уксусная кислота, пировиноградная	порошок Sn.	
	кислота, не более 0,3 мол% [39].	растворитель:	
	• Катализаторами поликонденсации	0.02 мол.%	

Таблица 9 – Основные методы синтеза ПМК.

Метод	Условия	М _N ПМК, кДа	Особенности
синтеза			
Chillesa	(добавляют в раствор мономера, 0.1- 1.0 мол.%): соединения Sn (порошок Sn, SnO, SnCl ₂ , Sn(Oct) ₂), Ni(OAc) ₂ , CH ₃ -Ph- HSO ₃ .	СН ₃ ОН, дифениловый эфир, 130 ⁰ С); • 500 кДа (катализатор: Sn(Oct) ₂ , растворитель: п- толуолсульфо новая	
		кислота)	



Рисунок 6 – Схемы синтеза ПМК: А. полимеризация с раскрытием цикла, В. этерификация

Для синтеза сополимеров ПМК-ПЭГ, которые применяются в клинической практике для доставки химиопрепаратов, используют совместную полимеризацию лактида и гликолида в присутствии Sn(Oct)₂ или солей тяжелых металлов в качестве катализаторов процесса. Разрешенная FDA концентрация Sn(Oct)₂ в таких композициях составляет 10 ppm, а концентрация тяжелых металлов не более 20 ppm, которые определяют методами, согласно протоколам фармакопеи США <231>/метод II и европейской фармакопеи 2.4.8 по методу С [166, 167]. Для получения продуктов с таким остаточным содержанием катализаторов проводят многочисленные стадии очистки, что является сложным и затратным технологическим процессом. Стоит отметить, что FDA требует протоколов сGMP (current Good Manufacturing Practice/текущая надлежащая производственная практика) для обеспечения эффективности, безопасности и стабильности изделий, применяемых в различных формах и вариациях.

В последние десятилетия прогресс в увеличении молекулярной массы ПМК был достигнут за счет поликонденсации в расплаве и последующей конденсации в твердом теле (твердотельная дополиконденсация/solid state polycondensation, SSP) [168, 169]. При таком способе реализуются три первые стадии, описанные для прямой поликонденсации

(удаление свободной воды, поликонденсация олигомеров и поликонденсация в расплаве), а также дополнительная четвертая стадия. Частично закристаллизовавшийся продукт измельчают до частиц однородного размера и нагревают выше температуры стеклования аморфной фазы, но ниже температуры плавления кристаллической фазы. Реакционноспособные концевые группы, а также катализатор (соли тяжелых металлов) концентрируются в аморфной фазе между кристаллами, что приводит к очевидному увеличению скорости поликонденсации, при этом, все реакции протекают в пределах одной частицы полимера [170]. Определяющей стадией твердофазной поликонденсации является массоперенос реакционной воды за счет молекулярной диффузии. Удаление воды можно дополнительно улучшить, проводя реакцию в условиях вакуума в инертной атмосфере. Технология SSP позволяет получать полимеры с высокой молекулярной массой, что не может быть достигнуто в типичном расплавном методе. Средневесовая молекулярная масса линейной ПМК, полученной таким способом, превышала 100 кДа [171]. Технология SSP стала популярным методом синтеза полукристаллических полимеров, таких как сложные полиэфиры, поликарбонаты, а также полиамиды. Дополнительные преимущества твердотельного метода по сравнению с расплавным методом, следующие: • трудности, связанные с перемешиванием вязкого расплава и теплопередачей, уменьшаются или устраняются; • термическая деградация и побочные реакции ограничены из-за более низких температур реакции.

На процесс SSP влияют следующие параметры [172]:

• скорость обратимой химической реакции: когда скорость диффузии побочных продуктов намного быстрее чем скорость химической реакции между макромолекулами, то концентрация побочных продуктов очень мала по всей полимерной частице, поэтому скоростью обратной реакции можно пренебречь; процесс характеризуется линейным увеличением молекулярная масса продукта во времени, а также зависит от начальной молекулярной массы и константы скорости реакции;

• скорость диффузии побочных продуктов реакции через полимерную матрицу к поверхности частиц: если скорость диффузии побочного продукта через аморфную фазу значительно медленнее, чем скорость химической реакции между макромолекулами, то реакцию можно считать равновесной во всей полимерной частице. Скорость процесса зависит от размера частиц, скорости диффузии побочного продукта, исходной молекулярной массы полимера и константы равновесия реакции;

• скорость диффузии побочных продуктов реакции из поверхности частицы к газуносителю: когда скорость потока инертного газа высока, концентрация побочных продуктов на поверхности частиц поддерживается на равновесном значении, определяемом
концентрацией побочных продуктов в газе. В этих условиях массоперенос с поверхности уравновешивается диффузией внутри частицы к поверхности. Однако если поток газа уменьшается, коэффициент массопереноса на стороне газа также будет уменьшаться до тех пор, пока в конечном итоге массоперенос с поверхности не станет медленнее, чем диффузия к поверхности. В этот момент концентрация побочных продуктов на поверхности увеличивается, а общая скорость диффузии побочных продуктов снижается. Это приводит к снижению скорости реакции и процесс контролируется скоростью поверхностной диффузии.

Каждый из представленных выше параметров зависит от условий реакции. Среди этих условий есть как физические, так и химические факторы, такие как температура реакции, молекулярная масса форполимера, размер и геометрия полимерных частиц, вакуум, расход газа, содержание кристаллической фазы и тип каталитической системы. Основные факторы и их влиянием на процесс SSP представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Влияние параметров на процесс SSP.

Фактор	Влияние							
Температура	• Реакция проводится выше Т стеклования и ниже Т плавления кристаллической фазы							
реакции [173]	полимера;							
	• Диапазон температур, в котором может происходить SSP, довольно узок, поскольку,							
	с одной стороны, температура должна быть как можно выше, чтобы максимизировать							
	скорость реакции, но с другой стороны, она должна быть достаточно ниже Т							
	плавления, чтобы предотвратить слипание частиц полимера;							
	• Оптимальная температура SSP должна быть на 10-40°С ниже Т плавления							
	форполимера, чтобы исключить агломерацию частиц.							
Время реакции	• Как правило, увеличение молекулярной массы пропорционально корню							
[174]	квадратному из времени. Такое поведение характерно для процесса, обусловленного							
	как химической реакцией, так и диффузией внутри материала.							
Начальная	• При SSP форполимера с более высокой молекулярной массой образуется полимеры							
молекулярная	с более высокой молекулярной массой, по сравнению с полимером, синтезированного							
масса	с использованием более низкой молекулярной массы форполимер;							
форполимера	• Конечный продукт характеризуется более высокой молекулярной массой, когда							
[175]	концентрация концевых групп в исходном форполимере ниже. Это соответствует							
	высокому значению начальной молекулярной массы. Согласно двухфазной модели,							
	высокое значение начальной молекулярной массы гарантирует более эффективное							
	удержание аморфной фазы и, следовательно, высокую концентрацию концов							
	реакционной цепи в зоне реакции;							
	• В случае более низкой молекулярной массы форполимера полимерным цепям легче							
	вписаться в кристаллические решетки и в результате большее количество концевых							
	групп будет захвачено и станет неактивным.							
Размер частицы	• Размер частиц и гранулометрическое распределение играют решающую роль во							
полимера [176]	время процесса SSP относительно его эффективности. Исходные материалы для SSP							
	могут быть различной морфологии (например, гранулы, хлопья, порошок или даже							
	волокна и тонкие пленки), размер не более 4 мм;							
	• Распределение частиц по размерам определяет молекулярно-массовое							
	распределение, которое само определяет однородность качества;							
	• Небольшой размер частиц форполимера (менее 1 мкм) могут привести к увеличению							
	скорости SSP и, как следствие, сокращению времени пребывания частиц в реакторе							
	из-за более короткого диффузионного расстояния и большей площади поверхности							
	частиц на единицу объема. Как правило, чем выше скорость поликонденсации, тем							
	меньше размер частиц из-за более короткого пути диффузии.							
Катализаторы	Добавки, которые могут улучшить процесс SSP, могут быть делится на три типа:							
[177]	• катализаторы, такие как металлы или производные металлов, кислоты, основания;							

Фактор	Влияние					
	• реактивные добавки, которые могут удлинять или разветвлять макромолекулярные					
	цепи;					
	• инертные добавки, которые влияют на процесс, но не участвовуют в химической					
	реакции.					
	Добавку или катализатор можно добавлять к мономерам, преполимерам или					
	полимерам на разных стадиях производственного процесса. Использование					
	катализаторов при синтезе полиэфиров и полиамидов ускоряет реакции как в твердой,					
	так и в расплавленной фазе. В твердофазном процессе также эффективен любой тип					
	известных катализаторов, вызывающих поликонденсацию в расплавленном					
	состоянии. Зачастую в SSP катализаторы используются для преодоления низкой					
	скорости реакции и агломерации частиц.					
	Наиболее эффективные катализаторы при SSP:					
	$H_{3}BO_{3}(1\%)$, MgO (0.2%)> (COONH ₄) ₂ (0.5%)> (CH ₃ COO) ₂ Zn (0.5%)> Na ₂ CO ₃ (0.2%)>					
	$CH_3COOH (0.6\%) > (NH_4)_2SO_4 (0.5\%) > SnCl_2 (1\%).$					
Кристалличность	• Кристалличность влияет на скорость лиффузии и полвижность концевых групп.					
[178]	которые сосредоточены в аморфных областях. Следует отметить, что размер, форма					
[]	и упаковка кристаллов являются важными параметрами. влияющими на полвижность					
	концевых групп макроцепи:					
	• Согласно лвухфазной молели, реакционноспособные концевые группы					
	расположены в аморфных областях. В результате повышения кристалличности					
	увеличивается как концентрация концевых групп в аморфной фазе, так и скорость					
	реакции:					
	• Оптимальная степень кристалличности лолжна составлять около 40 %, при этом.					
	агломерация частиц полимера минимальна.					
Вакуум и газ	• Инертный газ или вакуум в системе SSP используются лля: улаления побочных					
транспорт [179]	пролуктов синтеза, ингибирование окисления полимера путем исключения кислорола					
-F	из атмосферы реактора: нагрев реакционной массы (только потока газа):					
	• В случае вакуумного метода на быстрое удаление побочных пролуктов влияет					
	приложенное лавление, тогла как в метоле потока газа оно зависит от скорости потока					
	используемого инертного газа.					
	• В процессах SSP в качестве инертных газов преимущественно используются: азот					
	(N ₂), углекислый газ (CO ₂), гелий (He). Во многих случаях необходимо учитывать					
	характеристики используемого инертного газа, поскольку они могут влиять на					
	процесс SSP. Например, наблюдаются различия в активности используемых газов (Не					
	$> CO_2 > N_2$). Гелий имеет относительно более высокий коэффициент лиффузии, чем					
	N ₂ или CO ₂ , из-за меньшего размера молекул. Следовательно, применение Не					
	приволит к увеличению скорости роста своболного объема и глубине					
	поликонленсации. Межлу тем. СО ₂ характеризуется лучшей растворимостью в					
	полимере, чем N ₂ , что может вызвать эффект пластификации и улучшить покальную					
	полвижность					
	подряжноств.					

Из данных, представленных в таблице 10, следует, что SSP является сложным подходом в синтезе полимеров, при этом, необходимо тщательно выверять и следить за параметрами синтеза. Однако, несмотря на такие сложности, можно реализовать синтез без использования каталитических систем и органических растворителей. В результате получится продукт, который не будет иметь посторонних примесей в своем составе, что вполне приемлемо для медицинских применения.

1.5.1. Применение ПМК в медицине: микро- и наночастицы

Многие лекарства имеют ограничения в отношении пути введения из-за проблем, связанных с растворимостью, проницаемостью и биодоступностью, что приводит к плохой

фармакокинетике. Актуальной задачей является разработка лекарственных форм с надлежащей фармакокинетикой. Формы доставки на основе микро-/наночастиц могут либо сами быть лекарственными/терапевтическими агентами, либо выступать в качестве носителя для транспортировки различных препаратов к определенным пораженным областям в организме, а также обеспечивать желаемые специфические свойства. За последние 20 лет FDA и EMA (European Medicines Agency/Европейское агентство лекарственных средств) одобрило для клинического использования около 80 продуктов микро-/наномедицины [180].

С развитием фармацевтической промышленности, были разработаны различные микро- и наночастицы на основе ПМК в составе сополимеров для создания различных систем доставки низкомолекулярных препаратов, пептидных и белковых препаратов, гидрофобных препаратов [181-186], при этом, морфология частиц вариативна: сферы, капсулы, кубы и другие формы [186, 187]. Преимущество таких форм доставки на основе ПМК следующие: гомогенность распределения И высокая скорость загрузки фармацевтической субстанции [188, 189], кинетика высвобождения [190], способность нацеливания/таргетинг [191, 192] и взаимодействие с биологическими барьерами [193, 194], что позволяет сохранить свойства инкапсулированного препарата.

Микро- и наночастицы можно классифицировать как микро- наносферы и микронанокапсулы в зависимости от их внутренней структуры. Микро- наносферы обычно представляют собой гомогенную матрицу полимера, в которой невозможно выделить отдельно ядро и мембрану, а активный фармацевтический ингредиент диспергирован в полимерной матрице либо в виде небольших кластеров, либо на молекулярном уровне. Микро- нанокапсулы представляют собой частицы, состоящие из центрального жидкого, твердого или полутвердого ядра, содержащего лекарственное вещество отдельно или в сочетании с наполнителями, окруженного мембраной или сплошным полимерным покрытием [195].

Для систем доставки лекарственных веществ на основе микро- или наночастиц выдвигаются следующие требования:

• сохранение стабильности инкапсулированного лекарственного вещества;

• оптимальная загрузка лекарственного вещества;

• высокая эффективность и высокий процент инкапсуляции;

• контролируемый профиль высвобождения лекарственного вещества;

• обеспечение масштабируемого и воспроизводимого метода синтеза микро- наночастиц с инкапсулирванным лекарственным веществом.

В настоящее время для клинического применения производятся в соответствии с

правилами cGMP системы доставки на основе ПМК в виде микро- и наночастиц. На основании положительных клинических испытаний, активно ведутся разработки в синтезе новых микро-/наночастиц на основе ПМК в составе сополимеров для инкапсуляции препаратов различной химической природы и принципа действия в организме (таблица 11).

Система	Диаметр,	Инкапсулированный	Особенности		
ПМК-ПЭГ Мп ПМК = ~16 кЛа [196]	100	Винкристин	Возможность определения фармакокинетики и		
			биораспределение препарата на модели in vivo		
ПМК	200	Лиганды рецептора	Оценен системный		
Мп ПМК = ~47 кДа [197]		NOD1	иммунный ответ для		
			повышения эффективности		
			применения вакцин		
ПМК- гидроксиэтилкрахмал-	155	Доксорубицин	Комбинированная доставка,		
ингибитор TGF-β LY2157299			направленная на подавление		
Мп ПМК = ~5 кДа [198]			как роста опухоли, а также		
INK ID	100 150	L'ANDREAD GUILL	на метастазирование		
$Mn \Pi MK = \sim 9 \kappa \Pi a [199]$	100-150	Куркумин	куркумина а также		
			обеспечение его		
			стабильности при		
			физиологических рН		
ПМК- поливинилацетат-	220	Люмоген Красный F300	Частицы демонстрировали		
аполипопротеин Е		1	более высокое клеточное		
Мп ПМК = ~18 кДа [200]			поглощение		
Полилактид-со-гликолид (ПЛГА)	1500	Рифампицин	In vitro исследования		
$\frac{1}{11}$ Mn IIMK = ~20 к Па [202]	2000	Перофлоксанин	In vitro исследования		
Попистый ППГА	8000	Локсорубицин	In vitro		
$Mn \Pi MK = ~25 к \Pi a [203]$	0000	Доксорубнции	исспелования/апоптоз		
			клеток		
ПЭГ-ПЛГА	3000	Будесонид	Усиление системного		
Мп ПМК = ~20 кДа [204]			воздействия лекарственного		
			средства		
ПМК-ПЭГ	С-ПЭГ 120 Ибупрофен		Эффективная инкапсуляция		
Мп ПМК = ~20 кДа [205]			препарата, контролируемое		
			высвобождение		
ПМК-ПЭГ-Фолиевая кислота	2400	Паклитаксел/	Высокое клеточное		
Mn IIMK = ~ 20 кДа [206]		Доксорубицин	поглощение в условиях іп		
			vitro/in vivo (для опухоли SKOV3)		
ПМК-ПЭГ-ПМК	3000	Паклитаксел	Эффективная инкапсуляция		
Мп ПМК = ~158 кДа [207]			препарата в микрочастицы		
ПМК-со-є-поликапролактон (ПКЛ)	1400	5-Фторурацил	Одноразовое дозирование		
75:25			препарата		
Мп ПМК = ~40 кДа [208]					
ПМК- ε-ПКЛ 48.1:51.9 [209]	3100	Циклоспорин А	Целенаправленный		
	200	π	транспорт препарата		
пімік-со-υ-α-токоферол ПЭГ	200	доцетаксел	усиленное клеточное		
сукцинат- полидофамин-			поглощение в печени		
люкозамин Mn ПМК = $\sim 40 \ \kappa \Pi_2$ [210]			посредством лиганд-		
μια μινικ το κχια [210]			энлонитоза		
ПМК-ПЭГ-белок EGFP-EGF1	100-120	Паклитаксел	В условиях іп уіуо такие		
Мп ПМК = ~30 кДа [211]			частицы способны		
71 L J			воздействовать на несколько		

Таблица 11 – Разработки микро- наночастиц на основе ПМК для систем доставки.

Система	Диаметр,	Инкапсулированный	Особенности
	HM	компонент	
			типов опухолей
ПЛГА-ПЭГ-ферритин Mn ПМК = ~30 кДа [212]	150	Паклитаксел	В условиях in vivo показано активное специфическое
			связывание с клетками рака молочной железы
ПМК-ПЭГ	30-50	Ацикловир	Активное нацеливание
Mn IIMK = ~10 кДа [213]			
ПМК-полиэтилен имин-	140-220	Доксорубицин	Функционализация
герцептин-моноклональные		гидрохлорид	улучшила клеточное
антитела [214]			поглощение, а наночастицы
			усилили терапевтический
			эффект препарата, уменьшая
			побочные эффекты
ПМК-ПЭГ-линкер СРР (мицеллы)	25	Паклитаксел	Более эффективное
Мп ПМК = ~2.7 кДа [115]			нацеливание
ПМК-ПЭГ-трансферрин	90	-	Исследования
Мп ПМК = ~6.5 кДа [216]			фармакокинетики и
			биораспределения in vivo
			показали, что наночастицы
			пенетратин-ПМК-ПЭГ
			демонстрируют
			повышенное поглощение
			мозгом и снижение
			накопления в органах, не
			являющихся мишенями

Стоить отметить, что микро- и наночастицы, а также изделия из ПМК, которые будут применяться в клинических испытаниях должны быть изготовлены согласно стандартам ISO 9001-2015, ISO 13485.

В настоящее время широкое применение микро-/наночастиц по-прежнему ограничено из-за потенциальных токсических эффектов, что не позволяет наночастицам полностью раскрыть свой потенциал. Однако, FDA активно публикует информацию о том, что для нанообъектов, которые проявляют в условиях in vivo высокую эффективность к направленному органу/объекту исследования, нужно определять подходы к четкому регулированию стадий синтеза для получения воспроизводимых, безопасных и эффективных продуктов. Также отмечено, что важно подбирать подход к регулированию индивидуальных характеристик и воздействия нанопродукта в конкретном биологическом контексте. FDA рекомендует разработчикам консультироваться с агентством на ранних этапах процесса разработки продуктов для решения любых вопросов, связанных с безопасностью, эффективностью или другими характеристиками продуктов.

1.6. Полиаминокслоты: синтез, свойства, медицинское применение

Полиаминокислоты (ПАК) – это класс полимеров, в которых несколько аминокислот одного типа соединены пептидными связями. ПАК проявляют превосходную

биосовместимость и другие свойства, важные для использования биоматериала в различных отраслях промышленности, особенно в биомедицинской и биофармацевтической областях [217]. ПАК широко используются в качестве мицеллообразующих материалов для инкапсуляции гидрофобных лекарств, в частности полилизин, полиглутаминовая кислота и полиаспарагиновая кислота.

Полилизин является поликатионной, биоразлагаемой и биосовместимой полиаминокислотой [218]. ПЛ существует в двух формах: а-ПЛ и є-ПЛ. а-ПЛ состоит из 50 остатков лизина, которые связаны между α-карбоксильной и α-аминогруппами, синтезируется методом химического синтеза и имеет ограниченное применение из-за высокой токсичности [219]. є-ПЛ состоит 25-35 остатков лизина с пептидными связями между α-карбоксильной и ε-аминогруппами, производится микробным синтезом как класс природных полимеров и является широко используется в различных пищевых, медицинских продуктах, поскольку является безопасным полимером, токсичность ЛД50 не более 5.0 г/кг массы тела, что эквивалентно токсичности NaCl [220]. ε-ПЛ метаболизируется до лизина, который является незаменимой аминокислотой для функционирования организма человека. Для є-ПЛ характерна хорошая растворимость в воде, до 9 г/л [221]. є-ПЛ устойчив при физиологических условиях, при это деградации не наблюдается даже при кипячении раствора є-ПЛ при 100°С в течение 30 мин или автоклавировании при 120°C в течение 20 мин [222]. є-ПЛ имеет различные вторичные структуры, такие как случайная конформация клубка, α-спираль или β-листы в водном растворе. Образование таких структур обусловлено водородными связями И электростатическими взаимодействиями между основными и боковыми цепями. Однако, изменения конформаций можно легко добиться при добавлении в водный раствор солей, спиртов, или изменении рН, температуры. Конформации є-ПЛ обладают различной гидрофобностью, поскольку внутримолекулярные водородные связи влияют на их взаимодействие с молекулами воды. Как правило, гидрофобность трех конформаций постепенно уменьшается в порядке β -листы > α -спираль > случайный клубок [223].

Перечисленные свойства делают є-ПЛ одним из самых потенциальновостребованных кандидатов для разработки систем доставки лекарств, генных носителей, диагностической визуализации, диагностики, биосенсоров и специальных методов лечения рака. FDA одобрило конъюгат на основе є-ПЛ для лечения и диагностики онкологических и инфекционных заболеваний: полиинозин-полицитидиловая кислота, стабилизированная є-ПЛ и карбоксиметилцеллюлозой (Hiltonol, Oncovir) [224].

є-аминогруппа лизина положительно заряжена при физиологическом pH. Таким образом, поликатионный є-ПЛ может ионно взаимодействовать с полианионом в

42

организме, например ДНК или абсорбироваться на поверхность раковых клеток. Кроме того, ε-аминогруппа является хорошим нуклеофилом при pH выше 8.0 и, следовательно, легко реагирует с различными реагентами с образованием стабильной связи и ковалентного присоединения лигандов к молекуле. К примеру, известны [225]:

 модификация є-аминогрупп полилизина бифункциональными линкерами, содержащими сложноэфирную группу, после чего ее модифицируют тиоловой группой, что приводит к образованию дисульфидной или тиоэфирной связи. Такой прием используется для последующего соединения ПЛ с белками;

 соединения, содержащие карбоксильную группу для образования амидной связи с єаминогруппой полилизина;

 альдегиды (к примеру, окисленный гликопротеин), образуют гидролизуемые основания Шиффа с аминогруппами є-ПЛ, которые можно селективно восстановить цианоборгидридом натрия с образованием стабильного вторичного амина;

• изотиоцианат реагирует с є-аминогруппами, образуя производное тиомочевины;

• связывание антитела также может быть осуществлено специфично к N-концевой аминогруппе полилизина.

С помощью этих методов к полилизину были присоединены различные молекулы, такие как белки, молекулы сахара, лекарственные препараты, а также различные полимеры, с образованием гидрофильных или амфифильных конъюгатов для доставки лекарственный веществ [226]. Полимерные мицеллы, образованные из амфифильных блок-сополимеров, привлекли значительное внимание в качестве наноносителей лекарственных средств из-за их простоты изготовления, структурного разнообразия, варьируемых способов загрузки лекарственного средства и улучшенной стабильности по сравнению с традиционными мицеллами, образованными из молекул поверхностно-активных веществ. Многие системы на основе ε-ПЛ использовались для создания полимерных мицелл для доставки лекарств. В таблице 12 представлены основные разработки конъюгатов, мицелл, а также наночастиц на основе ε-ПЛ, оценен их биологический эффект, а также кратко представлены условия синтеза.

Конъюгат	Условия синтеза	Применение
ε-ПЛ-	• Смешение є-ПЛ/метотрексата/	лейкозы, саркомы и другие
метотрексат;	карбодиимид в течение 2 ч при 25°С;	формы неопластических
препарат:	• отделение непрореагировавшего метотрексата гель-	заболеваний
метотрексат;	фильтрацией	Преобразование MTX в PL
М _N ПЛ: 70 кДа	Выход: 70%.	заметно увеличило его
[227]		усвоение клетками
		и предлагает новый способ
		преодоления лекарственной
		устойчивости

Таблица 12 – Конъюгаты на основе є-ПЛ для биомедицинского применения.

L'auguanam	Varapug ayumana	Паниканали
Конъюгат	Условия синтеза	Применение
1191 -e-11 <i>J</i> 1;	МетоксиПЭІ-карооксиметил (mПЭІ-OCH ₂ COOH в	увеличение трансфекции
препарат:	тионилхлориде кипятили с обратным холодильником в	ДНК с 5 до 30 раз;
плазмида	течение 40 минут с последующим выпариванием	Низкая токсичность;
невирусной	тионилхлорида под вакуумом. Полученный продукт	Повышенное проникновение
днк;	растворяли в ДМСО и добавляли к раствору ПЛ в	в клетки карцинома человека
М _N ПЛ: 25 кДа	триэтиламине, при перемешивании и 20°С. После	путем эндоцитоза.
[228]	перемешивания в течение 30 минут добавляли	
	деионизированной воды и доводили рН реакционной	
	смеси до 1,0 с помощью 6Н HCl. Продукты очищали	
	путем диализа против воды. Выход: 12-20 мг.	
	Смешение конъюгата с плазмидой ДНК и бромистого	
	этидия в буфере (0.15M NaCl).	
ε-ПЛ-ПЭГ-	• ДЗХК и 4-(4,6-Диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-	• Увеличение времени
дезоксихолевая	метилморфолиний хлористый растворяли в ДМСО при	циркулирования конъюгата
кислота (ДЗХК)-	перемешивании (20°С, 1 ч);	при кровообращении, что, в
цианин 5,5	• Смесь добавляли к водному раствору є-ПЛ:НВг и	свою очередь, увеличивало
карбоновая	проволили реакцию при 20°С в течение 2 лней:	эффект ЭПР.
кислота:	• Полученный раствор лиализовали против	• оболочка НЧ из є-ПЛ.
препарат:	сорастворителя, состоящего из этанола и волы (50/50	селективно реагировала на
куркумин.	об %) при комнатной температуре в течение 3 лней	низкий рН увеличивая
M_N ПЛ· 5 кЛа	ПЭГ-СООН и цианин 55 карбоновую киспоту	электростатически
[229]	конъюгировали с ПЛ-ЛЗХК в ЛМСО	абсорбинонный эндоцитоз в
[22)]	• НЧ с-ПП-ПЭГ-ЛЗХК-цианин 5 5 карбоновой кислоты	области раковой опухоли
	были приготовлены метолом лиализа	oonaem pakobon onyxonn.
	Раствор куркумина в СН-ОН побавляли по канлям в	
	раствор куркумина в СПЗОП добавляли по канлям в	
	• Гаствор диализовали против воды при комнатной	
		· Data array of a farmer of a
8-11,1-11,91 -	• с-пл и пот сшили диглицидиловым эфиром при	• Эффективная и безопасная
ооркаптат натрия	перемешивании в ДМСО, при 20°С в течение 1 ч.	доставка кластеров оора в
(BSH);	• ВSH оыл введен через оифункциональные	опухоль-карциному (п vivo);
препарат: ВSH;	аминогруппы линкер N-е-	• повышен эттр-эффект.
M _N IIЛ: 5 кда	малемидокапроилоксисукцинимидныи эфир.	
		10 0
Дендример є-пл	Синтез дендримера: метод ступенчатого твердофазного	конъюгат ооладает
о генерации;	пептидного синтеза на смоле 4-метилоензгидриламина	спосооностью
M _N IIЛ: 8 кДа	с использованием третоутоксикароонила (Вос).	накапливаться и
[231]	• Вос-Gly-OH, Гексафторфосфат 2-(Поензотриазол-1-	персистировать в участках
	ил)-1,1,3,3-тетраметилурония, N-гидроксибензотриазол	солиднои опухоли (саркомы)
	смешивали в диметилформамиде и	после системного введения и
	диизопропилэтиламине.	проявлять антиангиогенную
	• Снятие защиты с N-конца осуществляли с помощью	активность
	100% трифторуксусной кислоты.	
	• После третьего лизинового связывания использовали	
	смесь диметилформамида/1-метил-2-пиролидинона	
	(1:1) для достижения лучшего набухания смолы и более	
	эффективного связывания. Смолу дважды промывали	
	дихлорметаном и сушили в вакууме. Конъюгат	
	выделяли из смолы с помощью HF -5°С.	
є-ПЛ(холат)-	• Конъюгация доксорубицина с ПЭГ-СОН	Чувствительность
ПЭГ;	осуществлялась посредством реакции Шиффа между	разработанных нанокапсул к
препарат:	аминогруппой доксорубицина и концевой	рН привела к усиленному
доксорубицин;	бензальдегидной группой ПЭГ-СНО: оба компонента	поглощению раковыми
М _N ПЛ: 15-30	растворяли в CH ₃ OH при перемешивании, 20 ⁰ C, 24 ч;	клетками MCF-7 в условиях
кДа [232]	• є-ПЛ с привитым холатом синтезировали с помощью	in vivo.
	двух стадий: холевую кислоту активировали с	
	помощью с N-гидроксисукцинимида в присутствии	
	дициклогексилкарбодиимида. Сукцинимидный эфир	
	холевой кислоты перемешивали с ПЛ:НВг в ДМСО и	
	тетраэтиламине в течение 24 ч, 20°С.	
	Выделение целевого продукта диализом против 75%	

Конъюгат	Условия синтеза	Применение
	раствора C ₂ H ₅ OH в течение 3-х суток.	
	• Смесь є-ПЛ-холат и ПЭГ-доксорубицин смешивали в	
	СН ₃ ОН. Раствор медленно упаривали на роторном	
	испарителе под вакуумом до образования тонкой	
	пленки и дополнительно сушили в течение 3-6 ч для	
	полного удаления остаточного органического	
	растворителя. Затем в колбу добавляли фосфатный	
	буфер (рН 7.4), дисперсию обрабатывали ультразвуком	
	в ультразвуковой ванне в течение 1 часа при 30°С, затем	
	пропускали через нейлоновый фильтр с размером пор	
	0.8 мкм и дополнительно перемешивали в течение 12	
	часов при комнатной температуре.	
Полиаспарагино	Сополимеры синтезировали в две стадии. Производное	Сополимер
вая кислота-	полиаспаргиновой кислоты было впервые	самоорганизуется в мицеллы
лизин-є-ПЛ;	синтезирован методом полимеризации с раскрытием	в водном растворе с цвиттер-
препарат:	цикла в демитилформамиде (ДМФА) с использованием	ионной оболочкой,
доксорубицин;	бутиламина в качестве инициатора.	демонстрируя превосходные
М _N ПЛ: 5 кДа	• N-карбоксиангидрид β-бензил-L-аспартата	противосорбционные
[233]	растворяли в ДМФА и перемешивали в атмосфере N ₂ с	свойства (белков плазмы
	последующим добавлением бутиламина, 20°С, 48 ч.	крови) и биосовместимость.
	Затем раствор осаждали диэтиловым эфиром 3 раза.	Нагруженный DOX показал
	Осадок (β-бензиловый эфир полиаспарагиновой	низкое поглощение
	кислоты) фильтровали и сушили в вакууме в течение 12	клетками из-за цвиттер-
	Ч.	ионной полипептидной
	• β-бензиловый эфир полиаспарагиновой кислоты	оболочки, что продлило
	смешивали с є-ПЛ при 20°С, 48 часов, а затем 3 раза	время циркуляции.
	осаждали диэтиловым эфиром для выделения целевого	
	продукта (блок-сополимеры).	
	• Получение амфифильных мицелл: сополимеры	
	растворяли в ДМФА, после добавляли H ₂ O по каплям	
	при перемешивании. После перемешивания в течение 4	
	часов раствор диализовали в течение 24 ч против	
	фосфатного буфера (рН = 7.4), полученный осадок	
	лиофильно высушивали.	
	• Загрузка доксорубицина: мицеллы на основе є-ПЛ	
	перемешивали в H ₂ O, далее по каплям добавляи раствор	
	доксорубицина в соляной кислоте при перемешивании.	
	После перемешивания в течение 4 часов раствор	
	диализовали против фосфатного буфера в течение 24 ч.	
Фолат-е-ПЛ-	•Синтез производного ПЛА: трет-бутил-N-(3-	Противораковые
ПМК;	гидроксипропил) карбамат смешивали с L-лактидом и	исследования in vitro и in
препарат:	SnCl ₂ в дихлорметане под вакуумом в течение 4 часов.	vivo показали, что
доксорубицин;	При 140°С проводили полимеризацию с раскрытием	нагруженные
М _N ПЛ: 5 кДа	цикла в течение 6 часов. После продукты растворяли в	доксорубицином,
[234]	дихлорметане, осаждали в избытке холодного C ₂ H ₅ OH	конъюгированные с фолатом
	и затем сушили в вакууме в течение 24 часов. Таким	и рН-чувствительные
	образом, был получен белый порошок Вос-NH-ПЛА,	полимерные мицеллы є-ПЛ-
	который после перемешивали в дихлорметане и	ПЛА обладают
	трифторуксусной кислоте в течение 1 ч при 0°С. После	эффективным
	выпаривания всех растворителей продукт промывали	нацеливанием, повышенной
	5% водным раствором NaHCO3 и водой и далее	клеточной интернализацией
	окончательно сушили над MgSO4. После фильтрации и	и противоопухолевой
	осаждения в охлажденном СН ₃ ОН получают ПЛА с	эффективностью.
	концевыми аминогруппами (NH ₂ -ПЛА), выход: 80%.	
	• Синтез ε-ПЛ-ПЛА: ω-бензилоксикарбонил-L-лизин-	
	N-карбоксиангидрид растворяли в ТГФ и смешивали с	
	трифосгеном при 40°С в течение 4 ч. Далее в ДМФА	
	добавляли NH ₂ -ПЛА, реакция проводили при	
	перемешивании, 35°С, в течение 72 ч. Полученные	
	сополимеры выделяли с помощью С ₂ H ₅ OH.	
	• Синтез фолат-є-ПЛ-ПЛА: є-ПЛ-ПЛА растворяли в	

Конъюгат	Условия синтеза	Применение	
	ДМСО с дициклогексилкарбодиимидом и N-		
	гидроксисукцинимидом при перемешивании, 40°С, в		
	течение 12 ч. Выделяли с помощью C ₂ H ₅ OH.		
ПЭГ-ε-ПЛ-	Синтез мицелл:	Дегидроаскорбиновую	
дегидроаскорбин	• 6-карбобензилокси-L-лизина добавляли раствор ПЭГ-	кислоту использовали для	
овая кислота;	NH_2 в безводном ДМФА при $35^{0}C$ в атмосфере N_2 .	функционализации	
препарат:	Через 24 часа к смеси добавляли L-фенилаланин N-	полимерных мицелл, для	
паклитаксел;	карбоксиангидрид и ДМФА (15 мл) и поддерживали	активного воздействия на	
М _N ПЛ: 5 кДа	реакцию при 35°C еще в течение 48 часов. Смесь	опухоль, поскольку она	
[235]	сополимеров выделяли повторным осаждением из	обладает высоким сродством	
	ДМФА в диэтиловый эфир и сушили при комнатной	к белку-переносчику	
	температуре (выход: 90%). • Затем проводили гидролиз	глюкозы 1, который	
	путем обработки блок-сополимера трифторуксусной	сверхэкспрессируется на	
	кислотой и HBr/CH ₃ COOH для удаления бензильных	поверхности клеток рака	
	групп, далее диализовали при 20°С, в течение 24 часов.	печени и рака толстой	
	В атмосфере N ₂ смешивали раствор Cul и N,N-	кишки. Полимерные	
диизопропилэтиламина, сополимер ПЭГ-ПЛ и		мицеллы, нагруженные	
	азидированную дегидроаскорбиновую кислоту.	пактитакселом, значительно	
	Реакцию проводили при 30°С в течение 12 часов, далее	подавляли	
	продукт диализовали против динатриевой соли	жизнеспособность,	
	эдетовой кислоты (pH 7.0) в течение 24 часов.	пролиферацию и миграцию	
	• Полимерные мицеллы, нагруженные паклитакселом,	опухолевых клеток in vitro, a	
	получали методом диализа.	также значительно	
		ингибировали рост опухоли	
		и продлевали выживаемость	
		у мышей с опухолями.	

Благодаря непрерывным усилиям многих исследователей из различных областей, за последнее лесятилетие произошли значительные изменения в отношении многообешаюших биомедицинских применений полимеров основе ε-ПЛ. на Биоразлагаемость, катионные зарядные свойства и легкая функционализация делают є-ПЛ идеальным кандидатом для использования в качестве биомедицинского полимера, в частности в разработке систем доставки лекарственных средств. Как показано в научных исследованиях, катионный заряд є-ПЛ эффективен при селективном связывании с опухолевыми клетками из-за более высокого отрицательного заряда гликокаликса на [236]. поверхности опухолевых клеток Однако, стоит заметить, что синтез вышеизложенных конъюгатов, мицелл на основе є-ПЛ основан на использовании токсичных органических растворителей, катализаторов. Разработка и апробация альтернативных методов синтеза «зеленой химии» является приоритетной научной задачей.

1.7. Механохимия: импульсная механоактивация

Среди многочисленных методов «зеленого» синтеза безрастворный механохимический подход активно применяется для получения новых функциональных материалов в различных отраслях промышленности, как относительно безопасный, экономичный по времени и энергии подход к синтезу. Сокращение масштабного

использования летучих органических растворителей привело к увеличению использования механохимии как экологически чистого метода синтеза по сравнению с растворными методами.

По определению Международного союза теоретической и прикладной химии, термин «механохимия» относится к любой химической реакции, вызываемой прямым поглощением механической энергии [237]. Такой метод основан на химических и физикохимических превращениях, инициированные механическим воздействием.

В отличие от термически индуцированных процессов, передача механической энергии в системе происходит через мелющие тела в локальном масштабе, что зачастую приводит к образованию метастабильных фаз в материале. Измельчение в импульсном, испульсно-истирающем или истирающем режимах приводит к накоплению структурных дефектов в обрабатываемом материале, увеличению кривизны поверхности, увеличение площади поверхности, удаление пассивирующих слоев, фазовым превращениям и даже аморфизации кристаллов, что влияет на их химическую активность [238]. На молекулярном уровне механическая сила может вызывать химические реакции в твердом состоянии за счет напряжения сдвига, вызывая нарушение симметрии в молекулах, которое дестабилизирует связь и делает их склонными к разрушению [239].

Исследования в области механохимии позволили установить механизмы протекания механохимических реакций и выявить ключевые этапы, которые ограничивают скорость реакции. Одним из важных направлений исследований является определение процессов активации однофазных и многофазных систем. В случае однофазных систем, процесс активации может быть связан с механическим перемешиванием реагентов и уменьшением размера частиц, что способствует увеличению поверхности контакта и ускорению химических реакций. Кроме того, механическое воздействие может привести к изменению кристаллической структуры материалов, что также влияет на скорость реакции. Для многофазных систем процесс активации сложнее и может включать в себя перемешивание различных фаз, диспергирование одной фазы в другой, а также разрушение и образование новых связей между частицами [240]. Исследования активации в гетерогенных системах позволяют оптимизировать условия для синтеза новых материалов с заданными свойствами.

Для осуществления реакций в твердых телах необходимо соблюдение двух основных условий. С одной стороны, механохимическая активация должна способствовать накоплению максимального количества нарушений и дефектов в твердом теле за счет энергии, подводимой при обработке. С другой стороны, механохимическая активация должна способствовать гомогенизации, при которой все компоненты смеси будут

47

находиться в максимальном контакте друг с другом, поскольку количество и площадь контакта компонентов смеси определяют скорость твердофазной реакции [241]. При обработке реакционной массы в аппаратах, продуцируемых механическую энергию, происходят несколько последовательных процессов: измельчение, активация твердой фазы и механохимическая реакция.

<u>Измельчение</u>: в процессе измельчения материала в мельнице происходит разрушение частиц под воздействием механических сил. Это приводит к уменьшению размера частиц и увеличению поверхности контакта, что способствует ускорению последующих химических реакций [242].

<u>Активация твердой фазы:</u> после измельчения и увеличения поверхности контакта материала происходит процесс активации твердой фазы. В этот момент происходит изменение структуры материала, нарушение связей и образование активных центров, что создает условия для последующих химических реакций [243].

<u>Механохимическая реакция:</u> после измельчения и активации твердой фазы начинается сам процесс механохимической реакции, когда реагенты вступают во взаимодействие под действием механической энергии. Это может привести к образованию новых соединений или изменению структуры материала [244].

Упругость, неупругость, пластичность и разрушение материалов тесно связаны с реакционной способностью обрабатываемых материалов. При механическом воздействии на твердые тела происходит создание метастабильных состояний с избыточной энергией, что может привести к различным изменениям в структуре материала и активации химических процессов. Наличие дислокаций, межзеренных границ и межфазных поверхностей является ключевым фактором в механической активации твердых тел [244]. Таким образом, понимание и управление взаимосвязью между механическими свойствами твердых тел и их реакционной способностью является ключевым аспектом в исследовании механохимических процессов и синтезе новых материалов с уникальными свойствами.

В ходе механохимических процессов ввод механической энергии используется для инициирования и/или ускорения химических реакций и/или индукции аморфизации и/или структурных превращений, деструкции, реакций окисления и восстановления, гидрирования или нитридирования, легирования, интеркаляции и каталитических реакций, комплексообразования [245].

В настоящее время используются различные типы мельниц или экструдеров для генерации механической энергии, необходимой для проведения химических реакций. Мелющая гарнитура может быть изготовлена из материалов различного состава: нержавеющая сталь, хромистая сталь, хромоникелевая сталь, агат, карбид вольфрама, нитрид кремния, корунд, цирконий или полимерные материалы [246].

Параметры измельчения (тип воздействия: истирание, импульс, давление и сдвиг), материал, размер мелющих элементов, время воздействия, температура и атмосфера, скорость вращения, частота. массовое соотношение мелюших элементов И обрабатываемого материала, коэффициент наполнения) напрямую влияют на кинетическую энергию и на ход механохимических реакций, что в свою очередь, влияет на качество и свойства получаемого продукта [247]. На примере мельницы, с помощью которой реализуется импульсное воздействие, рассмотрим параметры, влияющие на процесс механохимического синтеза материала.

Размер мелющих элементов напрямую меняет поверхностные свойства синтезируемых материалов. К примеру, большие шарики в мельнице (или высокой плотности) могут обеспечивать высокую энергию при столкновении и увеличить поверхностную активность материала, что приводит к образованию термодинамически стабильного продукта. Маленькие шарики усиливают трение, что способствует образованию аморфных и метастабильных фаз, и их обычно выбирают, когда требуется более эффективное перемешивание [248].

Коэффициент наполнения мельницы является важным параметром, обусловленным необходимостью достаточного пространства для свободного перемещения. При наполнении мельницы мелющими элементами и обрабатываемым материалов менее, чем 30%, производительность имела невысокие показатели эффективности (выход целевого продукта был минимальным). Если процент наполнения мельницы более 60%, то перемешивание было неэффективным. не хватает промежутков для перемещения и энергия влияет меньше. Оптимальный процент наполнения составляет 45%, что обеспечивает достаточное место для перемешивания и плотный контакт мелющих элементов с материалом [249].

В основном, при длительном механическом воздействии на материал, увеличивается выход целевых продуктов, поскольку число столкновений и общее количество переданной энергии также увеличивается. Однако, в некоторых случаях продукт может деструктировать, а также возможно увеличение количества загрязнений и образования нежелательных фаз при длительном измельчении. Поэтому, время помола для каждой системы необходимо подбирать экспериментальным путем, контролируя свойства продукта [250].

Температура помола также является важным параметром механохимического синтеза. Для снижения температуры измельчения зачастую используют жидкий азот, а для повышения температуры при измельчении можно использовать электрический нагрев.

Изменения температуры напрямую влияют диффузию твердых веществ при помоле многофазных систем, а также на фазовые переходы обрабатываемого материала [251].

Однако, стоит отметить, что для каждой обрабатываемой реакционной массы необходимо оптимизировать индивидуальные параметры измельчения в мельнице, основываясь на физико-химических свойствах материала [252].

Механохимический метод синтеза активно применяется для синтеза полимеров, сополимеров, модификации поверхности полимеров. Изначально механохимия применялась для деструкции полимерных цепей или для синтеза полимеров с короткими цепями с низкой молекулярной массой. Позже исследования сосредоточились на синтезе полимеров с уникальными свойствами. Известен способ синтеза поли(фенилен) винилена на вибрационной мельнице (частота 30 Гц, время синтеза 30 мин), без использования органических растворителей. Было исследовано влияние времени и частоты измельчения, размера мелющих элементов, и было обнаружено, что полимеризация посредством шарового измельчения представляет собой быстрый и эффективный процесс, позволяющий получать поли(фенилен)винилен со средней молекулярной массой до 40 кДа и выходом 70%, при этом полимер обладал отличными электролюминесцентными свойствами [253].

Для механохимической полимеризации стирола применяли мокрое измельчение кварца в стироле с использованием вибрационной шаровой мельницы лабораторного типа, а полимеризацию связывали с общей площадью поверхности измельченного кварца [254]. Механохимия также эффективна для модификации поверхности полимеров. К примеру, при использовании Р4О₁₀ для фосфорилирования синтетических полимеров и целлюлозы в условиях механохимического синтеза, способствовало созданию новых антипиренов [255]. Механохимия показала свою эффективность при деацетилирования хитина, с выходом 98%, при этом, получался хитозан с высокой молекулярной массой [256].

Современные исследования показали, что механохимическое воздействия является эффективным методом синтеза, который может использоваться как альтернатива уже существующим растворным методам, или как новый способ синтеза функциональных материалов.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

В приведенном литературном обзоре освещена актуальность разработки новых полимерных композиций, которые смогут обеспечить эффективное применение БНЗТ. Вопервых, выбранные наночастицы бора в качестве мишени для нейтронного пучка, смогут обеспечить требуемую терапевтическую концентрацию ¹⁰В. Во-вторых, такой критерий будет выполним только в случае селективной локализации бора в заданной пораженной области. Такой эффект может быть достигнут при инкапсуляции борных частиц в биосовместимые полимерные матрицы, выбор которых обусловлен их клиническим внедрением. Были рассмотрены как синтетические (ПМК, ПЛ, ГЭЦ), так и природные полимерные матрицы (ГК), которые уже доказали свою эффективность в инкапсуляции гидрофобных лекарств.

Анализ литературных данных позволил сформулировать основные задачи данной диссертационной работы:

1. Разработать композиции на основе биосовместимых полимеров и наночастиц элементного бора, обеспечивающие стабильность частиц во времени, биодоступность. Предложить доступные способы получения таких полимерных композиций.

2. Разработать методику получения ультрадисперсных фракций наночастиц бора менее 100 нм. Провести количественный и качественный анализы нанодисперсий бора, исследовать морфологию и состав.

3. Исследовать коллоидную устойчивость наночастиц бора в водных растворах полисахаридов: гиалуроновая кислота, гидроксиэтилцеллюлоза. Провести комплекс биологических и радиобиологических экспериментов для определения эффективности разработанных композиций на основе полисахаридов с наночастицами бора в условиях БНЗТ.

4. Изучить процессы и особенности инкапсулирования наночастиц бора в матрицу ПМК.

5. Провести синтез сополимеров полимолочной кислоты и є-полилизина для использования в качестве инкапсулирующей матрицы наночастиц бора. Исследовать структуру полученных сополимеров. Оценить эффективность инкапсуляции наночастиц бора в матрицу ПЛ-ПМК.

6. Сравнить эффективность распределения полимерных композиций (ГК, ГЭЦ, ПЛ-ПМК) с наночастицами бора для модели in vivo.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Характеристики исходных веществ

Вещества:

1. Бор (порошок), марка В. Производитель: Sigma Aldrich, США. Состав (массовая доля, %): бор (В), элементный – 99.6%; магний (Mg) – 0.003%; кремний (Si) – 0.191%; медь (Cu) – 0.211%, титан (Ti) – 0.010%. Изотопный состав: 19% ¹⁰В, 81% ¹¹В. Размер дисперсии: 1.0-1.1.

2. Бор (порошок). Производитель: National High Technology Centre, Tbilisi, Georgia. Состав (массовая доля, %): бор (В), элементный – 99.9%; магний (Mg) – 0.001%. Изотопный состав: 80% ¹⁰B, 20% ¹¹B. Размер дисперсии: 0.9-1.1.

 Гидроксиэтилцеллюлоза, марка Natrosol 250 HX Pharma grade. Производитель: Ashland, США. Состав (массовая доля, %): гидроксиэтилцеллюлоза – 100.0%. Степень замещения:
 2.5. Молекулярная масса: 1000 кДа; влажность: 6.1%.

4. Гиалуронат натрия, Pharma grade. Производитель: Тауда, Китай. Состав (массовая доля, %): гиалуронат натрия – 46.0%; гиалуроновая кислота – 44.0%; тяжелые металлы – не более 0.001%. Молекулярная масса: 1000-1500 кДа; влажность: 7%.

5. L-Молочная кислота, Pharma grade. Производитель: PanReac AppliChem, США. Состав (массовая доля, %): L-молочная кислота – 88.0-92.0%; вода: 7-12%; примеси металлов: не более 0.01%.

6. ε-Полилизин, Pharma grade. Производитель: Ensince Industry, Китай. Состав (массовая доля, %): ε-полилизин – 98.0%; свинец (Pb): 0.001%; мышьяк (As): 0.0005%. Молекулярная масса: 5-6 кДа.

7. Ацетат натрия (3-водный). Производитель: Русхимсеть, Россия. ЧДА. Состав (массовая доля, %): ацетат натрия – 99.9%; примеси – 0.1%.

Растворители:

1. Хлороформ. Производитель: ХимРеактив, Россия. ОСЧ, использовался без дополнительной очистки.

2. Тетрагидрофуран. Производитель: РусХим, Россия. ОСЧ, использовался без дополнительной очистки.

3. Вода дистиллированная. Получена при деионизации на приборе Direct-Q3 (Millipore, США). Сопротивление: 18.2 МОм/см.

 Кислота соляная (фиксанал). Производитель: Химикон, Россия. ОСЧ. Концентрация: 36-37.0% (на 1.0 л H₂O – 0.1 H, pH = 2.0). 5. Уксусная кислота (ледяная). Производитель: ХимРеактив, Россия. ОСЧ. Состав (массовая доля, %): уксусная кислота – не менее 99.8%; нелетучий остаток – не более 0.2%.
6. Ацетатный буфер. Состав: 4.0% ледяная уксусная кислота (Ленреактив, Россия, ХЧ):0.4 М ацетат натрия 3-х водный (Ленреактив, Россия, ЧДА) = 1:1, pH = 4.4.

Вещества для аналитических исследований:

1. Хлороформ дейтерированный. Производитель: Roth, Германия. Степень дейтерирования: 99.8%.

2. Диметилсульфоксид дейтерированный. Производитель: Roth, Германия. Степень дейтерирования: 99.8%.

3. Соляная кислота. Производитель: Сигма Тек, Россия. ОСЧ 20-4. Состав: 35.0-38.0% HCl.

4. Перекись водорода. Производитель: Химпром, Россия. ОСЧ 8-4. Состав: 30.0-35.0% H₂O₂.

5. Азотная кислота. Производитель: База №1 ХимРекативов, Россия. ОСЧ. Состав: 70.0% HNO₃.

6. Порошок графитовый. Производитель: МеталлЭнергоХолдинг, Россия. ОСЧ 8-4. Состав: 99.9999% графит.

7. Стандартные растворы бора. Производитель: Merck, Германия. H₃BO₃ в H₂O, 1000.0 мг/мл. MSDS 170307.

2.2. Методики синтеза

2.2.1. Наночастиц элементного бора

2.2.1.1. Лабораторный синтез

Наночастицы бора получали из порошка элементного бора микронных размеров (размер частиц: 1.0-1.1 мкм) методом диспергирования в условиях ультразвуковой кавитации в водной дисперсионной среде. Диспергирование выполняли на ультразвуковом оборудовании И-10-0.63 (Инлаб, Россия) с магнитострикционным преобразователем и погружным волноводом: выходная мощность 0.63 кВт; рабочая частота 22.0-25.0 кГц. Оптимизацию процесса получения тонкодисперсных наночастиц бора осуществляли при варьировании параметров: концентрация исходных частиц бора, время воздействия, время седиментации.

Последовательность диспергирования микрочастиц элементного бора, следующая: 1. В химический стакан из боросиликатного стекла (Roth, Германия) помещали 0.3-1.5 г порошка исходного бора и 30.0 мл дистиллированной воды – раствор КР_1. Время ультразвуковой обработки КР_1 варьировали от 5 до 90 минут. Полученный коллоидный раствор оставляли для седиментации частиц бора разной массы/размера в течение 1-10 минут, далее стеклянной пипеткой собирали 15.0 мл верхней фракции Ф_НЧ.

2. В 15.0 мл верхней Ф_НЧ добавляли дистиллированную воду и затем воздействовали на него ультразвуком. Время ультразвуковой обработки варьировали. После седиментации (в течение 5 минут) стеклянной пипеткой собирали 15.0 мл верхней фракции Ф НЧ 2.

3. В 15.0 мл верхней Ф_НЧ_2 добавляли дистиллированную воду и затем воздействовали на него ультразвуком. Время ультразвуковой обработки варьировали. После седиментации (в течение 5 минут) стеклянной пипеткой собирали 15.0 мл верхней фракции Ф_НЧ_3.

4. В 15.0 мл верхней Φ_НЧ добавляли дистиллированную воду и затем воздействовали на него ультразвуком. Время ультразвуковой обработки варьировали. После седиментации (в течение 5 минут) стеклянной пипеткой собирали 15.0 мл верхней фракции Φ_НЧ_4.

2.2.1.2. Синтез наночастиц бора с применением экспериментального ультразвукового реактора

Критически важным моментом в развитие синтеза наночастиц элементного бора является его получение в весовых количествах. На основании соглашения № 075-15-2020-694 от 22.06.2020 г. (заказчик Минобрнауки РФ) о предоставлении из федерального бюджета грантов в виде субсидии на реализацию мероприятий, направленных на обновление приборной базы ведущих организаций, выполняющих научные исследования и разработки, в рамках федерального проекта "Развитие передовой инфраструктуры для проведения исследований и разработок в Российской Федерации" национального проекта "Наука" и в соответствии с утвержденной программой обновления приборной базы МФТИ был разработан экспериментальный проточный ультразвуковой реактор непрерывного действия. Такой обладает практически однородным распределением реактор ультразвуковой энергии по всему объему реактора (объемом 8.0 литра), так что интенсивность ультразвукового воздействия в рабочем объеме не ограничена. Наличие датчиков (температуры, давления, рН, мутности, растворенного кислорода адаптированы для работы в условиях ультразвука) по всей конструкции реактора в сочетании с программируемыми контроллерами формируют работу высокопроизводительной системы управления технологического процесса, что позволяет реализовать автоматизированную сепарацию фракций частиц разных масс и размеров в момент их получения. Оптимизация и валидация параметров УЗ реактора в течение проекта Старт-1 обеспечила масштабирование процесса механохимического тонкого измельчении элементного

микронного бора в условиях кавитации при ультразвуковом воздействии высокой интенсивности в водной среде и последующего каскадного фракционирования в количестве 1.0 г/час.

Основные составные части ультразвукового комплекса: 1) погружной монолитный волновод (состав: сплав титана); 2) стеклянный реактор – колонна (состав – боросиликатное стекло, термостойкое); 3) насос; 4) охлаждающий контур. Опции: мощность – 2.0 кВт; рабочая частота – 22.0-25.0 кГц; объем реактора – 8.0 л; датчики – Т, мутность, О₂.

2.2.2. Синтез поли-L-молочной кислоты

ПМК получали твердотельной поликонденсации молочной кислоты без каталитической системы. Первый этап синтеза сложного полиэфира проводили в круглодонной колбе ротационного испарителя (HeiDolph, Германия) и заключался в концентрировании водного раствора мономера: загрузка 60.0 г, $T = 60-90^{\circ}$ С, $\tau_{концентрирования}$ варьировали: 30-150 мин. На втором этапе синтеза получали олигомеры молочной кислоты: P = 5 мбар, $T = 110-220^{\circ}$ С, $\tau = 30-480$ мин. Выход олигомеров составил 76% (~46.0 г). Следующий этап синтеза заключался к кристаллизации олигомеров молочной кислоты при $T = 120-130^{\circ}$ С, $\tau = 1-5$ ч, P =атмосферное. Предварительно олигомеры измельчали в вибромельнице до размера частиц 50-100 мкм. Заключительная стадия синтеза: олигомеры после кристаллизации нагревали в диапазоне температур $T_1 = 140^{\circ}$ С, $T_2 = 150^{\circ}$ С, $T_3 = 160^{\circ}$ С, при P = 1-2 мбар. Время экспозиции в условиях T_1 , T_2 , $T_3 - 8$ ч. Выход продукта составил: 75% (45.0 г).

2.2.3. Синтез сополимера є-полилизина-поли-L-молочной кислоты



Схема синтеза сополимеров ПЛ-ПМК представлена на рисунке 7.

Рисунок 7 – Схема синтеза сополимеров є-ПЛ-L-ПМК с применением импульсного механохимического метода.

Исходные компоненты смешивали в трех массовых соотношениях ε-ПЛ:L-ПМК = 1:9; 1:1; 9:1; исходные значения М_W: ПЛ – 6 кДа (Đ 1.1), ПМК – 10 кДа (Đ 2.1). Смешение

производили следующим образом: предварительно полимеры растворяли в соответствующих растворителях (ε-ПЛ – 0.1 Н HCl; L-ПМК – CHCl₃), после при 60⁰С и интенсивном перемешивании смешивали растворы полимеров в течение 60 минут до полного испарения растворителей.

После испарения растворителей, порошки помещали в вибрационную мельницу (Fritsch, Germany), диспергировали в течение 20 минут при амплитуде вибрации 60%. Диспергирующий элемент: мелющий шар, диаметром 5 см (материал: агат).

Продукты реакции, полученные в результате импульсного механохимического воздействия, выделяли согласно схеме, представленной на рисунке 8.



Рисунок 8 – Общая схема выделения сополимеров є-ПЛ-L-ПМК после синтеза с применением импульсного механохимического подхода.

2.2.4. Стабилизация наночастиц бора в полимерных матрицах

Наночастицы элементного бора характеризуются низкой седиментационной и агрегационной устойчивостью. Для снижения таких процессов применили как коммерчески доступные высокомолекулярные полимеры, такие как: гидроксиэтилцеллюлоза, гиалуроновая кислота, так и синтетические полимерные матрицы на основе биополимеров, полученных автором в данной работе: ПМК, ПЛ-ПМК.

Дисперсию наночастиц бора (размер вариативен) вводили в готовые растворы полисахаридов (стабилизаторов) при интенсивном перемешивании. Перед введением, дисперсию наночастиц бора редиспергировали на ультразвуковом оборудовании в 10.0 мл дистиллированной воды в течение 15 минут.

Были разработаны следующие рецептуры:

1) -Объем раствора ГЭЦ: 30.0 мл;

-концентрация ГЭЦ: 0.3% масс.;

-концентрация частиц бора (размер вариативен): от 10 до 1000 ррт;

2) -Объем раствора ГК: 30.0 мл;

-концентрация ГК: 0.3% масс.;

-концентрация частиц бора (размер вариативен): от 10 до 1000 ррт;

В качестве биосовместимой синтетической полимерной матрицы выбрали сополимер ПЛ-ПМК. Инкапсуляцию частиц бора осуществляли на стадии синтеза ПМК: в колбу ротационного испарителя загружали 60.0 г раствора МК. Для полного распределения НЧ в мономере МК при перемешивании магнитной мешалкой добавляли дисперсию наноразмерных частиц элементного бора в воде (25.0 мл) до содержания НЧ 0.03-10.0 масс.% Получение олигомеров МК в присутствии НЧ бора в разном диапазоне концентраций проводили аналогично схеме твердотельной поликонденсации, описанной в п. 2.2.2. Далее с борсодержащей ПМК проводили синтез сополимера ПЛ-ПМК аналогично методике в п. 2.2.4.

2.2.5. Определение времени окисления частиц бора

0.3 г частиц бора, в диапазоне размеров: 1.0-1.1 мкм, 50-70 нм, 20-50 нм, 5-15 нм, помещали в 30.0 мл кислот: перекись водорода (35%); азотная кислота (70%); «царская водка»: азотная кислота (70%):соляная кислота (35%) = 1:3. Растворение проводили при интенсивном перемешивании и нагревании (70°С), время – варьировали. Время полного окисления бора оценивали по количеству образовавшейся борной кислоты, которую детектировали с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Методика измерения соответствовала стандартным протоколам для борсодержащих соединений, применяемых в БНЗТ.

2.3. Методики анализа

2.3.1. Динамическое светорассеяние (ДСР)

Объекты исследования: дисперсия частиц элементного бора в водной дисперсионной среде; сополимеры ПЛ-ПМК.

Цели: исследование процесса измельчение частиц бора, оценка ζ-потенциала, изучение агрегативной устойчивости; оценка размера и ζ-потенциала макромолекулярных ассоциатов ПЛ-ПМК.

Концентрация образца в пробе: 0.01 мг/мл.

Прибор для измерения: Litesizer DLS 500 (Anton Paar, Австрия), одноразовая аналитическая

кювета выполнена из кварца.

Объем анализируемой пробы: не менее 3.0 мл.

Примечание: сухие навески образцов сополимеров перемешивали в хлороформе, а также в воде, в течение 60 минут, при комнатной температуре. Затем полученные суспензии центрифугировали в течение 5 минут, при 600 об/мин, методом ДСР исследовали супернатант.

2.3.2. Рентгенофазовый анализ

Объект исследования: дисперсия частиц элементного бора; ПМК и ПМК, содержащая НЧ элементного бора.

Цели: оценка изменения кристаллической фазы частиц бора в зависимости от размера частиц; оценка кристалличности ПМК в зависимости от условий синтеза.

Навеска образца: не менее 100 мг. Перед измерением исследуемые порошки помещались между двумя слоями пленки из аморфного полиэтилентерефталата.

Прибор для измерения: Bruker D8 Advance (Bruker, Германия), оснащен фокусирующим Geмонохроматором (λ (CuK α) = 1.5418Å) и многоканальным детектором LinxEye в режиме съемки «на просвет», диапазон рассеяния углов на приборе от 10 до 80⁰. Первичную обработку рентгенограмм (учет фонового рассеяния) проводили в программных комплексах Diffrac EVA 3.0 и OriginPro 8.

2.3.3. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Объект исследования: дисперсия частиц элементного бора.

Цели: исследование изменений размера и формы частиц бора в зависимости от условий получения.

Навеска частиц: не менее 200 мг.

Прибор для измерения: микроскоп HT7800 (Hitachi, Япония), с рабочим ускоряющим напряжением 20-120 кВ (100 В/ступенчатая переменная), увеличение: X250-600 к.

Примечание: предварительно образцы редиспергировали на ультразвуковой установке с погружным зондом в течение 15 минут в водной дисперсионной среде. Далее на медную сетку наносили 1.0-2.0 мкл дисперсии частиц в воде (d = 3.05 мм), которую затем сушили на воздухе в течение 5-10 мин. Далее сетки помещали в пробор и систему вакуумировали.

2.3.4. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Объект исследования: дисперсия частиц элементного бора.

Цели: исследование изменений размера и формы частиц бора.

Навеска частиц: не менее 200 мг.

Прибор для измерения: микроскоп PhenomPure (PhenomWorld, Нидерланды), увеличение: X4500, X7700. Исследования проводили на углеродном скотче в качестве подложки.

2.3.5. Инфракрасная (ИК) спектроскопия

Объект исследования: дисперсия частиц элементного бора; гомополимеры ПЛ и ПМК; сополимеры ПЛ-ПМК.

Цели: исследование свойств частиц бора в зависимости от размера; анализ структуры гомополимеров, сополимеров в зависимости от стадий синтеза.

Навеска образца: 10.0 мг.

Прибор для измерения: <u>частицы бора</u> – ИК-Фурье-спектрометр (Shimadzu IRPrestige 21, Япония) в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), при разрешении 4 см⁻¹, количество сканирований 32, область сканирования от 2700 до 1100 см⁻¹; <u>полимеры</u> – ИК-спектрометр с Фурье-преобразователем (Bruker Equinox 55/S, Германия) в режиме НПВО, при разрешении 4 см⁻¹, количество сканирований 32, область сканирований 32, область сканирования от 3800 до 600 см⁻¹.

Спектры всех исследованных продуктов, содержащих L-ПМК, нормированы с использованием внутреннего стандарта составной полосы валентных колебаний карбоксильной группы сложных эфиров в области 1757 см⁻¹.

*Примечание:



Рисунок 10 – ИК-спектр ϵ -ПЛ (НПВО).

60

Диапазон частот, см ⁻¹	Отнесение			
Поли-L-молочная кислота				
2995	Валентные ассиметричные колебания -CH ₃			
2923	Валентные симметричные колебания -СН3			
2851	Валентные колебания -СН			
1757	Валентные колебания -С=О			
1455	Деформационные ассиметричные колебания -CH ₃			
1386	Деформационные симметричные колебания -CH ₃			
1250	Деформационные плоскостные колебания -CH +			
1559	Деформационные симметричные колебания CH ₃			
1284	Деформационные колебания -CH + валентные колебания			
1284	COC			
1182	Валентные ассиметричные колебания -СОС + плоскостные			
1102	маятниковые ассиметричные колебания CH ₃			
1130	Плоскостные маятниковые ассиметричные колебания -CH ₃			
1087	Валентные симметричные колебания -СОС			
1044	Валентные колебания -С – СН3			
871	Валентные колебания -С – СОО-			
755	Деформационные колебания -С=О			
	ε-Полилизин			
3600-3100	-NH валентные (3285 см ⁻¹), несвязанные группировки -NH ₂			
5000-5100	(3400-3600 см ⁻¹)			
2972-2805	-CH ₂ , -CH			
1656	Амид-І			
1537	Амид-II			
1292	-CN валентные			
1230	-CN валентные			
1122	-CN валентные			
940	-NН деформационные			
794	-NH деформационные			

Таблица 13 – Соотнесение полос поглощения с характерными группами [257].

2.3.6. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Объект исследования: гомополимеры ПЛ и ПМК; сополимеры ПЛ-ПМК.

Цели: анализ структуры гомополимеров, сополимеров в зависимости от условий синтеза.

Навеска образца: 15.0 мг.

Прибор для измерения: 300 UltraShield (Bruker, Германия) при частоте 300 МГц, температура опыта 297 К.

Тип спектра: ¹Н.

Приготовление образца: навеску образца растворяли в 500.0 мкл дейтерированного растворителя (CDCl₃ или диметилсульфоксиде (ДМСО)-d₆) в течение 2-х часов, далее раствор пропускали через шприц-фильтр с гидрофобной мембраной и размером пор 0.45 мкм. Химические сдвиги измеряли относительно сигналов остаточных протонов

дейтерированного растворителя (7.24 м.д. для CHCl₃, 2.2 м.д. для ДМСО-d₆).

*Примечание:

0.80

4.2

4.1

4.0

3.9

3.8



Рисунок $12 - {}^{1}$ Н спектр ПЛ (растворитель D₂O).

1.4 f1 (мд) 2.84

1.3

1.2

1.43

1.1

1.0

56-

0.9

0.8

0.7

1.00

3.7

1.5

3.6

2.3.7. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС)

Объект исследования: дисперсия частиц элементного бора (порошок). Цель: исследование поверхности частиц бора в зависимости от размера.

Навеска частиц: не менее 50 мг.

Прибор для измерения: Kratos AXIS Ultra DLD (Kratos Analytical Limited, Англия): рентгеновский источник с двойным анодом (Al, Mg) с энергиями: дублет Mg Kα12=1253.6 эВ, дублет Al Kα12 =1486.6 эВ, и откачкой магниторазрядным насосом, Al монохроматор Кα излучение, 15 кВ, 30мА (450Вт).

2.3.8. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Объект исследования: ПМК.

Цель: определение Тпл.

Навеска частиц: 100 мг.

Прибор для измерения: STA 449F3 Jupiter (Netzsch, Германия): Аl тигель, скорость нагрева: 10⁰С/мин, поток: Ar (30 мл/мин).

2.3.9. Эмиссионная спектрометрия с дугой постоянного тока (ЭС ДПТ)

Объекты исследования: дисперсия частиц элементного бора (порошок); стабилизированные наночастицы бора в ГЭЦ, ГК, ПМК, ПЛ-ПМК; биологический материал (in vitro) с накопленными наночастицами бора (стабилизатор вариативен).

Цель: определение концентрации бора в стабилизирующих системах; определение поглощенной дозы частиц бора биологическими объектами (in vitro).

Навеска образца: 10-1000 ррт.

Прибор для измерения: модернизированный спектрограф PGS-2 (Carl Zeiss Jena, Германия) и электродуговой генератор Fireball FB-25 (ВМК-Оптоэлектроника, Россия). Спектрограф оснащен 8-кристальной фотодиодной матрицей для регистрации аналитических сигналов. Спектры регистрировали при токе дуги 13 А в течение 22 с. Использовали графитовые электроды для спектрального анализа (d = 6 мм, Grafi, Россия). В качестве анодов использовались усеченные конусы, а в качестве катодов – электроды с кратерами (глубина и диаметр 4 мм). Определение концентрации бора проводили по аналитическим линиям без спектральных помех: 249.678 и 249.773 нм.

Пробоподготовка: Исследуемые объекты смешивали с порошком графита. Далее образцы

наносили на аликвоты графитового порошка и сушили в ИК-лампе при температуре ~80°С. Затем добавляли хлорид натрия (4 масс. %) для стабилизации дугового разряда и снова сушили. Смесь графитового порошка с 4 масс. % хлорида натрия называется спектральным буфером. Полученные смеси перемешивали и помещали в кратеры графитовых электродов. Концентрацию бора в образце рассчитывали путем усреднения результатов регистрации трех электродов. Дополнительное разбавление спектральным буфером проводили при высокой концентрации бора.

• Схема пикового эксперимента для оценки точности метода: к раствору стабилизирующих систем (3.0 г/л) добавляли бор стандартного раствора. Затем 0.04 мл стабилизатора вносили в 100.0 мг спектрального буфера и перемешивали после сушки под ИК-лампой. Полученную смесь помещали в кратеры графитовых электродов. Концентрация бора, введенного в спектральный буфер, составляла 125.0 мг/л.

2.3.10. Гель-проникающая хроматография (ГПХ)

Объект исследования: поли-L-молочная кислота, полилизин, сополимеры ПЛ-ПМК.

Цель: исследование молекулярно-массовых характеристик полимолочной кислоты на различных этапах синтеза, готового раствора полилизина.

Навеска: 30.0-50.0 мг/мл.

Приборы для измерения:

Поли-L-молочная кислота

Хроматографическая система «Кпаuer» с использованием рефрактометрического детектора и колонки Phenogel размером 300х7,8 мм и размером пор частиц 104 Å. Колонку калибровали по полистирольным стандартам (максимальное значение молекулярной массы до 75 кДа). Исследование проводили при 40⁰C и скорости потока 1 мл/мин. Перед введением в хроматограф раствор пропускали через шприцевой фильтр с гидрофобной мембраной (политетрафторэтилен) с размером пор 0.45 мкм.

є-<u>Полилизин, сополимеры ПЛ-ПМК</u>

Хроматографическая система АКТА Purifier 10 с использованием УФ-детектора с оптическим путем 10 мм (детектирование ПЛ-ПМК при 240 нм) и эксклюзионной колонки Superdex 75 Enhance 5/150 GL. Элюент: ацетатный буфер (pH = 4.4). Колонку калибровали по полипептидам известной молекулярной массы (№1511901, Bio-Rad, США). Исследование проводили при температуре 25⁰С и скорости потока 0.5 мл/мин. Для исследования готовили растворы образцов полимера в воде с концентрацией 30.0 мг/мл. Перед нанесением на колонку раствор пропускали через шприцевой фильтр с

гидрофильной поливинилиденфторидной мембраной с размером пор 0.45 мкм.

2.3.11. Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР)

Объект исследования: дисперсия ПЛ-ПМК в ацетатном буфере.

Цель: исследование ассоциатов ПЛ-ПМК в растворе.

Концентрация: 0.01 мг/мл.

Прибор для измерения: MicroMax-007HF (Rigaku, Япония), оснащен камерой-обскурой, прикрепленной к генератору рентгеновского излучения с вращающимся анодом (MicroMax 007-HF), работающему при напряжении 40 кВ и токе 30 мА.

Пробоподготовка: образцы сополимеров готовили перемешиванием сухой навески в ацетатном буфере (pH 4.4) в течение 60 минут при комнатной температуре. Для каждого образца были собраны два набора данных на разных расстояниях от образца до детектора, а затем объединены. Расстояния от образца до многопроводного газонаполненного детектора Rigaku ASM DTR Triton 200 составили 200 см и 30.5 см, что соответствует диапазонам q 0.014-0.203 Å⁻¹ и 0.088-1.3 Å⁻¹ соответственно, где $q = 4\pi*\sin\theta/\lambda$, $2\theta -$ угол рассеяния, длина волны СиКа $\lambda = 1.5406$ Å). Для ε -ПЛ и ε -ПЛ-ПМК = 9:1 и ε -ПЛ-ПМК = 1:1 время экспозиции составило 4 часа, 3 часа и 4 часа соответственно при расстоянии от образца до детектора 200 см и 12 часов, 3 часа. и 12ч соответственно при расстоянии образец-детектор 30.5 см. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Обработка данных МУРР.

Азимутальное интегрирование полученных 2D-изображений проводили с использованием программного обеспечения Saxsgui (Rigaku Innovative Technologies, Inc. и JJ X-ray System Aps). Программы Primus и GNOM из пакета программ ATSAS использовались для первичной обработки 1D профилей I(q) и расчета парных функций распределения по расстояниям P(r) соответственно. Аппроксимация кривых МУРР с моделями трехосного эллипсоида и катушки Гаусса была выполнена с использованием программы SasView 4.2.2. В соответствии с химической формулой є-ПЛ, (C₆H₁₂N₂O)n, плотность электронов ho_e и парциальный удельный объем \bar{v} были определены как 0.5078 e/Å³ и 0.6476 см³/г (1,075 Å³/Да). Для L-ПМК (C₃H₄O₂)n $\rho_e = 0.5223 \text{ e/Å}^3$ и $\bar{\nu} = 0.6080 \text{ см}^3/\Gamma = 1.010$ Å³/Да. Объем единицы полимера рассчитывали в соответствии с [258], атомные объемы рассчитывали на основе ван-дер-ваальсовых радиусов элементов в соответствии с базой данных https:// periodictable.com. Для сополимеров ПЛ:ПМК = 9:1 (по массе) и сополимера ПЛ:ПМК = 1:1 (по массе) частичный удельный объем можно оценить как 0.1 $\bar{v}_{\Pi M K}$ + 0.9 $\bar{v}_{\Pi \Pi}$ = 1.0688 Å³/Да и 0.5 $\bar{v}_{\Pi M K}$ + 0.5 $\bar{v}_{\Pi M}$ = 1.0425 Å³/Да соответственно. Из-за схожей плотности электронов (и, следовательно, плотности длины рассеяния) є-ПЛ и L-ПМК, мы использовали модель однородного эллипсоида вместо модели эллипсоида ядро-оболочка, использованной в работе [259], для аппроксимации данных МУРР из сополимерных мицелл.

2.3.12. Измерение динамической вязкости растворов полимеров

Объект исследования: растворы полимеров ГК и ГЭЦ.

Цель: определение динамической вязкости растворов полимера.

Объем для исследования: 25.0 мл.

Прибор для измерения: вибрационный вискозиметр SV-10A (AnD, Япония). Температура измерения 25⁰C. Калибровка по дистиллированной воде: 0.89 мПа*с при 25⁰C.

2.3.13. In vitro исследования

Объекты исследования: наночастицы элементного бора; композиция наночастицы борагидроксиэтилцеллюлоза; композиция наночастицы бора-гиалуроновая кислота.

Концентрация бора в образцах: 50-1000 ррт.

Цель: предварительная оценка цитотоксичности наночастиц бора [260], стабилизированных в разных полимерных матрицах. Испытания проведены в соответствии с методикой испытаний МТТ-тестом, активно применяемым и рекомендованным для оценки токсичности борсодержащих препаратов и их ингибирующего эффекта в условиях БНЗТ [261].

Исследования: Для оценки цитотоксичности и клеточного поглощения наночастиц бора в составе различных композиций проведен комплекс исследований на клеточных линиях, активно использующихся в исследованиях по оценке токсичности борсодержащих препаратов и их ингибирующего эффекта в условиях БНЗТ: U251 MG – клетки глиомы человека, U87 – клетки глиомы человека, G361 – клетки меланомы человека, T98G – клетки глиобластомы человека, BJ-5ta – фибробласты человека. Клетки, находящиеся на хранении в жидком азоте, размораживали по стандартной методике [Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство, 2018]. В исследуемых клеточных линиях отсутствую патогены на момент тестирования (микоплазма). После разморозки клеточные линии культивировались в среде Iscove's DMEM (IMDM, SIGMA 17633 с L-глютамином и 25 mH HEPES буфером) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Scientific HyClone SV30160.03 HyClone UK Ltd.) при температуре 37⁰C в атмосфере с 5%

 CO_2 .

Цитотоксичность объектов исследования определялась помощью с колориметрического теста Cell Titer 96 AQueous One Solution (Корпорация Promega, Мэдисон). 4×10⁴ клеток каждой раковой линии помещали в каждую лунку 96-луночного планшета в 100.0 мкл среды и инкубировали в течение 24 ч. Культуральную среду заменяли средой с водным коллоидным раствором композитов на основе наночастиц бора в концентрациях 50-1000.0 ррт и инкубировали в течение 24 ч. Затем среду удаляли и клетки промывали буферным раствором, добавляли бессывороточную среду, содержащую реактив 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид (МТТ) в концентрации 0.5 мг/мл. Планшеты инкубировали с МТТ 4 часа, затем удаляли среду и растворяли образовавшиеся кристаллы формазана ДМСО. Планшеты с клетками помещали в оптический анализатор Multiscan FC (Thermofisher Scientific, USA) и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм. Данные представлены как доля выживших клеток, инкубированных с нативными наночастицами бора и борсодержащими композициями, относительно клеток, инкубированных без композиций в зависимости от времени инкубации.

После оценки жизнеспособности клеточных линий, инкубированных с исследуемыми объектами, определяли поглощенную дозу бора методом ЭС ДПТ. Клетки, содержащие исследуемые образцы, переносили в спектральный буфер и высушивали под ИК-лампой. Объем питательной среды 0.04 мл. При необходимости проводили разбавление спектральным буфером.

2.3.14. In vivo исследования

Объекты исследования: наночастицы элементного бора; композиция наночастицы борагидроксиэтилцеллюлоза; композиция наночастицы бора-гиалуроновая кислота; композиция ПЛ-ПМК-наночастицы бора.

Концентрация бора в образцах: 1000 ррт.

Цель: определение дозы, не вызывающей токсических реакций у животных.

Исследования: Животные (мыши CD-1, 12 недель) содержались в контролируемых условиях (животные происходят из блока разведения ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН). Условия содержания соответствовали стандартам, указанным в Директиве 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях. Содержание и манипуляции с животными регламентируются стандартными операционными процедурами, разработанными в строгом соответствии с требованиями [262-265]. При проведении испытаний использованы здоровые животные с подтвержденным статусом здоровья.

Объекты исследования вводили в виде коллоидных растворов, в дозах: ГК-НЧ – 1000 ррт: 1000 мкг НЧ бора на 1 мл 0.3% раствора ГК (масса ГК в 1.0 мл – 3.2258 мг (с учетом влажности)); ГЭЦ-НЧ – 1000 ррт: 1000 мкг НЧ бора на 1 мл 0.3% раствора ГЭЦ (масса ГЭЦ в 1.0 мл – 3.1948 мг (с учетом влажности)). Композицию ПЛ-ПМК-НЧ в форме порошка вводили перорально – дозировка будет рассчитана далее; 3 мыши. Композиции ГЭЦ-НЧ и ГК-НЧ вводили тремя различными способами: однократно 80 мкл/г массы тела мыши внутрибрюшинно (в/бр, 3 мыши); двукратно по 20.0 мкл/г массы тела мыши каждые 2 часа, внутривенно (в/в) через ретроорбитальный синус правого глаза – 3 мыши; перорально (внутрижелудочно) однократно – 50.0 мкл/г массы тела (3 мыши). Композицию ПЛ-ПМК-НЧ вводили однократно перорально (внутрижелудочно) через зонд – 50 мкл/г массы тела.

Для сравнения трех полимерных матриц, содержащих наночастицы бора, использовали внутрижелудочный способ (перорально) введения композиции через зонд исключает попадание композиций на слизистую ротовой полости. Средний вес мышей составлял 20 г.

В качестве контрольной группы использовали интактных мышей той же линии и того же возраста.

Состояние животных непрерывно фиксировали в течение первого часа после инъекции. Через 10, 24 и 48 часов после инъекции проводили клинический осмотр, затем ежедневно в течение 30 дней. Осмотр состоит из трех этапов:

• внешний осмотр животного, находящегося в клетке. Осматривается подстил на наличие признаков диареи, поза, движения и поведение животного. Регистрируется наличие атаксии, тонических судорог, клонических судорог, аномального поведения, гиперкинезии, гипокинезии, тремора, диареи, аномальной походки, пилоэрекции, парезов конечностей и аномального положения хвоста;

• внешний осмотр животного при взятии в руки. Проводили осмотр внешнего вида животного, состояние покровов и слизистых. Регистрируется наличие птоза, слезоточения, повышенного слюноотделения, цианоза слизистых оболочек, гиперемии слизистых оболочек, кровоизлияния слизистых оболочек, покраснения век и одышки;

• проверка наличия базовых рефлексов. Проверяли реакцию зрачков на свет, рефлекторное мочеиспускание и дефекацию при манипуляциях, ослабление захвата.

Взвешивание мышей проводили непосредственно перед инъекцией и далее 1 раз в неделю.

На 30 день после введения композиций с НЧ бора все животные были подвержены СО₂ эвтаназии с последующей некропсией. Визуально оценивали состояние головного

мозга, сердца, лёгких, селезёнки, печени и почек.

Для определения распределения бора в органах животных (мыши CD-1, 12 недель) инъекции использовали метод ЭС ДПТ. По истечению 1 и 2-х часов после инъекции композиций бора (см. дозировку выше) все животные были подвержены CO₂ эвтаназии с последующей некропсией.

2.3.15. Радиобиологические исследования полимерных композиций на основе наночастиц бора

Объекты исследования: композиция наночастицы бора-гидроксиэтилцеллюлоза; композиция наночастицы бора-гиалуроновая кислота.

Концентрация бора в образцах: 50-1000 ррт.

Цель: оценка эффективности наночастиц бора по ингибированию роста клеточных культур после нейтронного облучения.

Исследования: In vitro

Нейтронное облучение раковых клеточных линий, инкубированных в среде, содержащей исследуемые объекты с наночастицами бора (см. п. 2.3.9.), а также контрольных интактных клеток, проводили на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов (ИЯФ СО РАН, г. Новосибирск, Россия). Параметры облучения: ток протонного пучка – 1,8 мА, энергия – 2,0 МэВ, время облучения – 60 минут, флюенс нейтронов – 6,2×10¹¹ см⁻². После облучения через 14 дней оценивали колониеобразующую способность раковых клеточных линий с помощью клоногенного анализа. Для каждой концентрации наночастиц готовили по 6 лунок (6 повторов). За отрицательный контроль принимали лунки с клетками, инкубированными в ростовой среде без борсодержащих композиций. В качестве положительного контроля использовали коммерческий борфенилаланин (StellaPharma, Китай), с которым инкубировали клеточные линии в течение 24 ч (50-1000 проводили нейтронное облучение планшетов с ppm). Далее клетками. Колониеобразующую способность оценивали по истечению 14 дней после нейтронного облучения: выросшие колонии отмывали 3 раза холодным раствором фосфатного буфера, далее окрашивали колонии клеток с помощью раствора кристаллического фиолетового и оценивали их количество с помощью оптического микроскопа.

2.3.16. Ветеринарная практика применения полимерных композиций, содержащих наночастицы бора в нейтронной захватной терапии

Объекты исследования: композиция наночастицы бора-гиалуроновая кислота; ветеринарное животное: кошка со спонтанной опухолью носоглотки с локализацией в области фронтального синуса, клиновидной пазухи.

Концентрация бора в образцах: 500 ррт.

Цель: определение эффективности наночастиц бора в условиях БНЗТ на ветеринарном животном со злокачественным образованием носоглотки.

Препарат вводили в/в, с дозировкой 2 мг/кг веса животного, в течение 2-х часов. Проведение БНЗТ проводили под седацией, параметры облучения: ток протонного пучка – 1,8 мА, энергия – 2,0 МэВ, время облучения – 120 минут, флюенс нейтронов – 6,2×10¹¹ см⁻ ². Оценку динамики роста опухоли проводили с помощью магнитно-резонансной томографии (MPT).

ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Наночастицы элементного бора

Раздел 3.1. диссертации посвящен описанию методик получения наночастиц элементного бора размером менее 100 нм. Установлены закономерности и описаны свойства наночастиц при их получении методом тонкого измельчения микрочастиц бора в условиях акустической кавитации в зависимости от способа реализации методики синтеза. Установлены оптимальные параметры получения наночастиц бора менее 100 нм. Описаны способы стабилизации наночастиц бора в высокомолекулярных системах.

3.1.1. Исследование параметров синтеза наночастиц элементного бора методом ультразвукового диспергирования

Для получения наночастиц элементного бора менее 100 нм для целей БНЗТ, выбран метод измельчения в условиях ультразвукового диспергирования. Для оптимизации параметров диспергирования использовали микрочастицы бора, изотопный состав: 19% ¹⁰B, 81% ¹¹B. Возможности ультразвуковых колебаний для интенсификации технологических процессов в жидких средах реализуются при контактном ведении источника ультразвуковых волн непосредственно в жидкие среды, содержащие микрочастицы элементного бора и в создании условий для развития и поддержания режима кавитации.

Оценено влияние концентрации микронных частиц (прекурсор, размер: 1.0-1.1 мкм) и длительности диспергирования на процесс получения наноразмерного бора. Значения концентраций исходных борных микрочастиц варьировали: 0.01 г/мл, 0.025 г/мл, 0.05 г/мл. Отмечено, что при длительном УЗ воздействии (90 мин) на микрочастицы бора процесс диспергирования значительно затруднен (не выражен), наблюдалась широкое гранулометрическое распределение в конечной системе (таблица 14). Размер частиц бора оценивали с помощью метода ДСР.

N⁰	Время УЗ воздействия, мин	Средний размер дисперсии, d, нм				
	Исходная концентрация микрочастиц бора: 0.01 г/мл (размер: 1.0-1.1. мкм)					
1	5	1000-1080				
2	10	750-980-1020				
3	20	490-565, 680-960				
4	30	356, 430-536, 656-930				
5	60	398-467, 711-967				
6	90	304-321, 432-756				

Таблица 14 – Оценка параметров диспергирования микрочастиц бора.

N⁰	Время УЗ воздействия, мин Средний размер дисперсии, d, нм					
	Исходная концентрация микрочастиц бора: 0.025 г/мл (размер: 1.0-1.1. мкм)					
7	7 5 996-1067, 1102-1178					
8	10	786-894, 724-1047				
9	20	537-597, 720-945				
10	30	326-379, 557, 632-843				
11	60	318-343, 489-733				
12	90	310-357, 378, 401-647				
	Исходная концентрация микрочастиц б	ора: 0.05 г/мл (размер: 1.0-1.1. мкм)				
13	5	1090-1120				
14	10	1060-1085				
15	20	867-948				
16	30	814-946				
17	60	567-785-904				
18	90	423-746-934				

Определено оптимальное время воздействия на микрочастицы бора, при котором зафиксировали минимальный размер частиц 300-350 нм: 30 минут. Для системы, где концентрация частиц составила 0.05 г/мл, УЗ диспергирование является не целесообразным, так как размер микрочастиц бора изменяется не значительно. Для интенсификации измельчения частиц бора предложено введение стадии седиментации системы и последующего фракционирования частиц (таблица 15). Размер частиц бора из верхней фракции Ф_НЧ оценивали с помощью метода ДСР.

Исходная концентрация		Исходная концентрация			Исходная концентрация			
микрочастиц бора: 0.01 г/мл (размер: 1.0-1.1, мкм)		М	микрочастиц бора: 0.025 г/мл (размер: 1.0-1.1, мкм)		микрочастиц бора: 0.05 г/мл (размер: 1.0-1.1. мкм)			
№	Время УЗ воздействия, мин	Средний размер дисперсии, d, нм	№	Время УЗ воздействия, мин	Средний размер дисперсии, d, нм	№	Время УЗ воздействия, мин	Средний размер дисперсии, d, нм
1	5	1000-1080	7	5	996-1067, 1102-1178	13	5	1090-1120
2	10	750-980- 1020	8	10	786-894, 724-1047	14	10	1060-1085
3	20	490-565, 680-960	9	20	537-597, 720-945	15	20	867-948
4	30	356, 430- 536, 656-930	10	30	326-379, 557, 632-843	16	30	814-946
5	60	398-467, 711-967	11	60	318-343, 489-733	17	60	567-785-904
6	90	304-321, 432-756	12	90	310-357, 378, 401-647	18	90	423-746-934

Таблица 15 – Оценка параметров диспергирования микрочастиц бора.

По данным таблицы 15 оптимальным временем для седиментации является 5 минут. Воздействие ультразвуковых колебаний в жидких средах приводит к формированию кавитационных парогазовых пузырьков. При расширении эти пузырьки накапливают энергию, а при захлопывании порождают различные деструктирующие эффекты, локально могут образовываться зоны с высокими значениями температуры и давления. Это позволяет
изменять структуру и свойства веществ и материалов. Под действием таких эффектов происходит диспергирование/разрушение крупных кристаллитов бора (исходного порошка бора) и образование частиц с меньшим гранулометрическим распределением. Исследуемые параметры по получению наночастиц бора закономерно оказывают взаимное влияние друг на друга. Показано, что извлечение из системы частиц с меньшим средним размеров, процесс диспергирования повышается. Такой эффект связан с нерегулярным характером дефектности исходных микрочастиц бора. После первого акта ультразвукового воздействия разрушение частиц происходило в местах максимальной дефектности, что привело к возрастанию дисперсности материала. При максимальном времени ультразвукового воздействия на микрочастицы бора, но без отбора измельченной фракции из системы, процесс диспергирования затруднен. Возможно, что такой эффект связан с сопутствующим процессом агрегирования частиц меньшего размера.

Для получения частиц бора, размером менее 100 нм, на фракцию Ф_НЧ повторно воздействовали ультразвуковыми колебаниями согласно схеме, описанной в п. 2.2.1.1. В таблице 16 представлены данные суммарного времени воздействия на отдельные фракции бора для получения наночастиц с узким гранулометрическим распределением. Размер наночастиц бора оценивали с помощью метода ДСР.

Таблица 16 – Зависимость размера дисперсии частиц бора от интенсивности ультразвукового воздействия.

N⁰	Средний размер исходной	Концентрация исходной	∑ время	Средний размер частиц
	фракции, нм	фракции, мг/мл	воздействия, мин	после получения, d, нм
1	302-315 (Ф_НЧ)	4.7/12.3	250	52-70
2	52-70 (Φ_HЧ_II)	2.2/6.1	300	20-46
3	20-46 (Φ_HЧ_III)	0.9/2.9	300	5-15, 20 (Ф_НЧ_IV)

На основании полученных результатов, при использовании метода ультразвукового диспергирования с дополнительными стадиями (седиментация, фракционирование), определены оптимальные параметры получения наночастиц бора менее 100 нм: узкодисперсные фракции наночастиц бора в интервале размеров 5-20 нм, 20-50 нм, 50-70 нм. Выход каждой фракции частиц составил 85-90% масс. от той фракции, из которой они были получены. Оставшиеся 10-15% масс. направляются в бак-накопитель для повторного диспергирования. Общая схема получения фракция наночастиц бора представлена на рисунке 13.



Рисунок 13 – Схематическое представление алгоритма синтеза наночастиц элементного бора.

Для получения весовых количеств наночастиц бора разработан экспериментальный ультразвуковой комплекс (рисунок 14), который позволил реализовать ранее разработанный лабораторный синтез [67, 266], а также масштабировать и автоматизировать процесс механохимического тонкого измельчения элементного бора. Использование такого комплекса исключает загрязнения продукта в виду уникальных технологических решений: контакт продукта с рабочими частями прибора минимизирован, автоматизированный отбор фракций наночастиц.



Рисунок 14 – Экспериментальный ультразвуковой комплекс К_УЗ_Нано: 1. колонна для диспергирования; 2. ультразвуковой проточный реактор; 3. насос; 4. камера подогрева/охлаждения (опционально); 5. краны с автоматическим приводом.

Конструкция комплекса К_УЗ_Нано представлена в таком исполнении, которое позволяет осуществлять интенсивный процесс ультразвукового диспергирования: 1) рабочая камера прибора имеет замкнутый контур, в узле которого расположен источник ультразвука (погружной волновод), который передает системе равномерную частоту ультразвуковых колебаний. В контуре создается движение потока в турбулентном режиме – за счет этого удается задать эффективное перемешивание дисперсионной среды, и следовательно, воздействовать ультразвуковыми колебаниями высокой интенсивности на каждую единицу объема обрабатываемой среды; 2) составная часть рабочей камеры – колонна для седиментации частиц в заданный промежуток времени (в программном обеспечении задается объем коллоида для отбора) и автоматической сепарации целевого продукта (отбор проб для анализа). Получение наночастиц бора на основе 10 B (изотопный состав: 80% 10 B, 20% 11 B) проводили согласна разработанной методике.

3.1.2. Исследование морфологии частиц и определение структурно-фазовых характеристик наночастиц бора

На основании алгоритма получения (см. п. 2.2.1) проведены исследования морфологии частиц бора в зависимости от времени обработки на ультразвуковом оборудовании с выходной мощностью 0.63 кВт. Исследования формы и размера проводили с помощью таких методов, как СЭМ, ТЭМ (таблица 17). Контроль размера частиц и измерения ζ-потенциала проводили методом динамического светорассеяния в жидкой среде.



Таблица 17 – Морфологические характеристики наночастиц бора.



Показано, что с уменьшением размера частиц выражена их овализация.

Для оценки влияния ультразвукового воздействия на поликристаллическую структуру элементного бора применили рентгенофазовый анализ. Сняли рентгеновские спектры исходного порошка микрочастиц бора, а также спектр порошка наночастиц бора в интервале размеров 5-15 нм.

Нейтральная конфигурация атома бора $1s^22s^22p^1$. Данная конфигурация неустойчива и при формировании конденсированного состояния стремится перейти в более стабильную s^1p^3 , например, в результате одноэлектронных переходов $2s^2p^1 \leftrightarrow 2s^1p^2 \leftrightarrow s^1p^3 + s^1p^1$. Для реальных твердофазных модификаций бора возникает, как правило, набор гибридных конфигураций s^xp^y за счет электронного обмена между атомами бора; при этом достижение относительной энергетической стабильности конфигураций может осуществляться различными способами, что находит отражение в широком многообразии структур и специфике свойств конденсированного бора. Стремление к образованию s^1p^3 конфигураций определяет выраженные акцепторных свойства бора, его способность к захвату внешних электронов разнообразных примесей.

Для кристаллического беспримесного бора достижение оптимальной электронной конфигурации реализуется за счет образования сложных структурных мотивов атомного упорядочения, включающих различную комбинацию полиэдрических группировок (в основном, икосаэдрических структур В₁₂). При этом формирование конкретной стабильной конфигурации может проходить через ряд промежуточных (менее устойчивых) конфигураций, что определяет лабильность бора к полиморфным превращениям и структурное многообразие его кристаллических модификаций. Образование той или иной аллотропии определяется технологическим методом получения элементного бора.

Сравнивая спектры исходных микронных частиц бора и наночастиц бора (5-15 нм) выявили ряд особенностей: под действием УЗ происходит деградация монолитных

кристаллических структур по кристаллографическим плоскостям их соприкосновения в нанометровый порошок, то есть повышается дисперсность исходных микронных частиц бора, степень кристалличности наночастиц бора по данным рентгеноструктурного анализа составила 98% (рисунок 15).



Рисунок 15 – Дифрактограммы исходного порошка бора (А) и нанодисперсии бора, средний размер: 5-15 нм (В).

Предположительно, исходные микрочастицы бора состоят из смеси аллотропных модификаций, что, вероятно, связано с методом получения таких микрочастиц. При воздействии акустической кавитации наблюдается фрагментация отдельных кристаллитов по кристаллографическим плоскостям соприкосновения, при этом, доля однородности аллотропии повышается (α-ромбоэдрическая структура). В процессе исследования дифрактограмм бора была отмечена следующая закономерность. У исследуемых исходных порошков бора на дифракционной картине присутствует пик, соответствующий кристаллическому оксиду бора (28⁰), который находится на поверхности дисперсии. Отмечена тенденция, что после длительной обработки микронных образцов бора ультразвуком в жидкой среде, на дифрактограммах нанообразцов рефлекс оксида бора не выявлен. Следовательно, порошок наночастиц по составу представляет собой чистый элементный бор без окисленной поверхности.

Таким образом, под действием высокого давления и температуры, возникающих при коллапсе кавитационных пузырьков в ультразвуковом поле на границе раздела фаз, происходит фрагментация микрочастиц элементного бора.

В таблице 18 представлены данные об оценке кристаллической модификации в зависимости от размера частиц бора, а также положение рефлексов на дифрактограмме,

характеризующих различные фазовые аллотропии.

Таблица 18 – Данные рентгенофазового анализа дисперсий частиц бора в зависимости от размеров.

N⁰	Аллотропная модификация	Положение рефлексов, 2 θ	Симметричность	
	Мик	оочастицы бора: 1.0-1.1 мкм		
1	Бета-аллотропия	$2\theta = 15^{\circ}, 2\theta = 19^{\circ}, 2\theta = 28^{\circ}, 2\theta = 32^{\circ}, 2\theta = 40^{\circ}$	Ромбоэдрическая	
	Нан	ючастицы бора: ~50-70 нм		
2	Бета-аллотропия	$2\theta = 15^{0}, 2\theta = 19^{0}, 2\theta = 28^{0}, 2\theta = 32^{0}, 2\theta = 40^{0}$	Ромбоэдрическая	
	Нан	ючастицы бора: ~20-50 нм		
3	Альфа-аллотропия	$2\theta = 35^{\circ}, 2\theta = 38^{\circ}, 2\theta = 42^{\circ}, 2\theta = 54^{\circ}, 64^{\circ}, 2\theta = 71^{\circ}$	Ромбоэдрическая	
Наночастицы бора: ~5-15 нм				
4	Альфа-аллотропия	$2\theta = 35^{0}, 2\theta = 38^{0}, 2\theta = 42^{0}, 2\theta = 54^{0}, 64^{0}, 2\theta = 71^{0}$	Ромбоэдрическая	

По данным таблицы 18, изменение аллотропной модификации наблюдается для частиц при уменьшении размера до 50 нм.

Изменение аллотропной модификации напрямую влияет на время окисление частиц (альфа-модификация крайне устойчива к окислению [56]). В работе установлена зависимость размера частиц на время полного их окисления в концентрированных сильных окислителях: азотная кислота (70%), «царская водка» – смесь соляной кислоты (36%) и азотной (70%) (таблица 19). Также проведено исследование по окислению частиц бора в присутствии пероксида водорода (34%). Выбор данного окислителя обусловлен фактом: В организме человека некоторые ферментные следующим системы (ксантиноксидаза, циклооксигеназа и др.) продуцируют супероксид, который спонтанно или под действием супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода [70]. Скорость окисления бора зависит от размера частиц. Окисляется бор с образованием оксидов. Оксид бора реагирует с водой с образованием борной кислоты, которая относительно безопасна для организма (ПДК 10 мг/м³) [267]. Таким образом, наночастицы, бора можно использовать в медицине, в частности, в терапии рака, не опасаясь побочных эффектов, традиционно ассоциирующихся с подобными терапиями.

Таблица 19 – Данные по изменению степени окисления частиц бора в зависимости от их размера и окислителя.

Donnen Hacture Cons. Hug	Время полного	Время полного	Время полного			
тазмер частиц обра для	окисления в перекиси	окисления в азотной	окисления в «царской			
окисления, нм	водорода, мин	кислоте, мин	водке», мин			
Исходные микронные частицы бора*						
1000.0-1100.0	35	50	24			
Нанометровые частицы бора*						
300.0-350.0	15	29	10			
50.0-70.0	145	180	80			
20.0-50.0	168	195	94			

Pooven useruu fons ung	Время полного	Время полного	Время полного
тазмер частиц обра для	окисления в перекиси	окисления в азотной	окисления в «царской
окисления, нм	водорода, мин	кислоте, мин	водке», мин
5.0-15.0	181	198	98

*Концентрация анализируемых частиц для всех образцов и температура окисления постоянны, C = 0.01 г/мл, T = 70⁰C.

Увеличение времени окисления для образцов наночастиц в интервале размеров от 50 до 5 нм обусловлено изменением их аллотропной структуры после ультразвуковой обработки – наблюдается образование более устойчивой к окислению аллотропии – альфафаза.

В продолжение исследования свойств наночастиц бора, необходимо понимать, что происходит с поверхностью частиц после ультразвуковой обработки, что является немаловажным аспектом в дальнейших экспериментах по оценке стабильности частиц в различных дисперсионных средах, а также и в биологических исследованиях. Частицы с разным средним размером, были изучены с помощью инфракрасной спектроскопии в режиме НПВО (см. п. 2.2.1). Полученные ИК-спектры представлены на рисунке 16.



Рисунок 16 – ИК-спектры НПВО образцов наночастиц бора в различном гранулометрическом распределении.

Для сравнения характеристик поверхности наночастиц бора, были взяты 5 различных фракций наночастиц, включая целевые: ~5-10 нм, ~20-50 нм, ~50-70 нм. Образец частиц бора со средним диаметром частиц ~300-500 нм имеет полосу поглощения,

характеризующую валентным колебаниям терминальных связей В-Н (область 2500см⁻¹) и несколько перекрывающихся полос валентных колебаний мостиковых связей В-Н-В (область 2230-2500 см⁻¹). Полосы в области 1200 см⁻¹ относятся к деформационным колебаниям связей Н-В-Н в частицах бора, со средним диаметром частиц более 100 нм. При последовательном уменьшении размера частиц все полосы поглощения для колебаний связи В-Н постепенно уменьшаются по интенсивности до полного исчезновения. Полосы В-Н не наблюдаются для образцов, характеризующих размеры частиц 70 нм и менее. Таким образом, можно сделать вывод, что частицы бора, со средним диаметром более 100 нм, содержат довольно большое количество гидрогенизированных центров. Однако, при уменьшении размера до 50 нм, образцы частиц теряют свои группы -BH и не превращаются в материал, содержащий много ВО/ВОН.

Также для анализа поверхности дисперсии наночастиц бора применили метод РФЭС. Исследовали образцы исходных микронных частиц бора и наночастиц трех целевых фракций: ~5-15 нм, ~20-50 нм, ~50-70 нм (рисунок 17).





B.

Рисунок 17 – Спектры 1 s РФЭС для дисперсий частиц: А. Микронные частицы бора (1.0-1.1 мкм); В. Общий вид спектра для наночастицы бора трех фракций: ~50-70 нм; ~20-50 нм; ~5-15 нм. *E(C1s) = 285.0 эВ

Для образца микрочастиц бора наблюдаются следующие энергии связи для пика В 1s, которые можно отнести к следующим соединениям бора: 1. 186.4 эВ – B₁₀H₁₂ (28%); 189.0 эВ – B₁₂H₁₄ (6.5%); 187.5 (Δ 1/2 = 2.6) эВ – бор (элементный) В-В (48.2%); 188.66 эВ (Δ 1/2 = 2.8) – бор (элементный) В-В (16.9%) [268]. Дисперсия микрочастиц бора в основном состоит из смеси элементного бора и его оксидных форм, которые после ультразвуковой обработки не идентифицируется в системе наночастиц (рисунок 18): 187.3 эВ (Δ 1/2 = 2.6) – бор (элементный) В-В (56%); 188.3 эВ (Δ 1/2 = 2.8) – бор (элементный) В-В (44%).

Было отмечено, что данные РФЭС коррелируются с данными ИК-спектроскопии, а именно в отсутствии поверхностных слоев. Действительно, для образца микрочастиц бора наблюдаются значения энергий связи для В 1s-электронов, которые можно отнести к соединениям элементного бора и его оксидных форм. Для образцов наночастиц бора до 70 нм, на спектре идентифицируются только значения энергий для связей, соответствующие элементному бору. То есть поверхность микрочастиц бора в основном состоит из смеси элементного бора и его оксидных слоев, которые после ультразвуковой обработки не идентифицируется в образцах наночастиц менее 70 нм (таблица 20).

Тип	Содержание, % - микрочастицы бора: 1.0-1.1 мкм	Содержание, % - наночастицы бора: ~50-70 нм	Содержание, % - наночастицы бора: ~20-50 нм	Содержание, % - наночастицы бора: ~5- 15 нм
B-B	48.2	53.3	55.7	56.0
B-B ₂	16.9	22.0	28.4	44.0
$B_{10}H_{12}$	28.0	10.1	14.3	0.0
$B_{12}H_{14}$	6.5	4.6	1.6	0.0

Таблица 20 – Данные по количеству соединения в поверхности микро- и наночастиц бора.

На спектрах для микрочастиц бора идентифицировались сигналы для O 1s (530.75 эВ), C 1s (285.00 эВ), N 1s (283.25 эВ), при этом, в образцах наночастиц бора (5-15 нм), такие сигналы можно отнести к примесям, отсорбированных на молекулярном уровне из воздуха. Их количество не превышает 10%. В таблице 21 приведены соотношения В/O, N/O, C/O на поверхности образцов частиц.

Таблица 21 – Содержание (масс.%) элементов в образцах микро- и наночастиц.

Образец	Элементы, содержание %		
	B/O	C/O	N/O
Микронные частицы бора, от 5 мкм	96.1/4/7	41.21	2.83
Наночастицы бора, ~50-70 нм	99.5/0.5	4.5/9.0	1.8/3.6
Наночастицы бора, ~20-50 нм	99.1/0.9	5.3/10.6	2.2/4.4
Наночастицы бора, ~5-15 нм	99.4/0.6	1.3/2.6	4.2/8.4

Для определения примесей в общей массе образцов частиц бора применили метод ЭС ДПТ Приготовление образцов проводили согласно методике, согласно п. 2.3.8. При проведении исследования микро- и наночастиц бора были выявлены следующие примеси: оксид бора, магний алюминий, кремний. В таблице 22 представлены данные по оценке примесей других элементов в составе образов частиц бора.

Таблица 22 – Данные по определению содержания (% масс.) посторонних включений в образцах частиц бора.

N⁰	Содержание Si, %	Содержание Al, %	Содержание Мg, %	Содержание В ₂ О ₃ , %	
		Микрочастицы бора	а: 1.0-1.1 мкм		
1	0.3	0.5	0.9	1.2	
		Наночастицы бора	:: ~50-70 нм		
2	0.0	0.0	0.5	0.9	
Наночастицы бора: ~20-50 нм					
3	0.0	0.0	0.5	0.6	
Наночастицы бора: ~5-15 нм					
4	0.0	0.0	0.0	0.4	

На основании полученных данных, наночастицы бора менее 70 нм не имеют в своем составе примесей посторонних включений, а также проанализировано изменение аллотропных кристаллических модификаций бора в зависимости от размера частиц. Вышеизложенный комплекс исследований позволил в полной мере оценить морфологию частиц, а также их состав. Отсутствие примесей является несомненным преимуществом с

точки зрения применения таких наночастиц в БНЗТ.

3.1.3. Стабилизация наночастиц бора в полимерных матрицах

Дисперсия наночастиц бора в воде характеризуется низкой агрегативной устойчивостью из-за наличия избытка поверхностной энергии. Вероятно, это связано с разрывом связей между кристаллитами бора, что приводит к образованию активной поверхности (положительный заряд на поверхности частиц), взаимодействующей с дисперсионной средой. Процесс образование агломератов частиц является термодинамически выгодным.

Оценку агрегативной стабильности дисперсии наночастиц бора изучали по изменению размера и ζ-потенциала системы наночастицы бора-жидкая дисперсионная среда в зависимости от времени экспозиции (таблица 23), при постоянной концентрации дисперсии в воде: 500 ppm. С увеличением времени экспозиции частиц, возрастает значение ζ-потенциала до -45 мВ, и как следствие, возрастает размер агломератов частиц бора (900 нм) и их устойчивость во времени. В водной среде наночастицы склонны к обратимой агломерации за счет слияния частиц друг с другом и уменьшения их поверхностной энергии. Следовательно, при повторной ультразвуковой обработке агломераты распадаются.

Таблица 23 – Оценка агрегативной устойчивости наночастиц бора частиц в водной дисперсионной среде.

Время, мин	ζ-потенциал, мВ	Размер ассоциатов частиц бора, нм
0 – получение итоговой	-4.5	5-15
нанодисперсии		
30	-15.2	110-125
40	-21.34	154-160
50	-26.51	190-195
60	-38.0	380-460
65	-45.87	850-900

Стабилизация наночастиц – проблема, без решения которой наночастицы даже с идеальными индивидуальными свойствами теряют наноразмерные эффекты. После получения наночастиц необходимо создать условия, исключающие агрегацию и последующую седиментацию. Для компенсации заряда на поверхности НЧ применяют стабилизирующие агенты, которые снижают агломерацию на продолжительное время и сохраняют размерные свойства частиц. Например, в практике применяют различного рода стабилизаторы: это могут быть ионы (электростатическая стабилизация), ПАВ (электростатическая и стерическая стабилизация). Также высокомолекулярные соединения довольно часто служат матрицей, фиксирующей НЧ, при этом сохраняя их размерные

свойства (стабилизация за счет высокой вязкости, стерического фактора). Наличие заряда позволяет частицам адсорбировать на своей поверхности ионы из раствора, вследствие чего образуются лиофильный адсорбционный слой.

Развивающимся методом стабилизации, является применение высокомолекулярных соединений. В результате такой стабилизации, получившей название стерической, наночастицы будут окружены защитным барьером, представляющим собой сплошной слой сольватированных полимерных цепей достаточных размеров, в результате чего коллоидная система становится неограниченно устойчивой, до тех пор, пока защитный слой останется неповрежденным. Агрегативная устойчивость дисперсных систем увеличивается с возрастанием вязкости дисперсионной среды, понижением температуры и концентрации дисперсной фазы. Применение полимера в роли стабилизатора приводит к повышению кинетической устойчивости за счет увеличения вязкости коллоида наночастиц.

В качестве стабилизирующих систем выбрали следующие полимерные матрицы: гидроксиэтилцеллюлозу и гиалуроновую кислоту, выбор которых обусловлен их высоким значением молекулярных масс, биосовместимостью, биологической активностью в среде организма, что определяет их как потенциальных инкапсуляторов наночастиц бора. Применение таких стабилизирующих систем позволит повысить функциональность наночастиц бора, в частности для связывания с таргетными молекулами различной химической природы или радиоизотопными метками.

Полисахариды могут выступать для наночастиц бора как гидрофильные полидентатные лиганды, так как имеют несколько донорных центров для взаимодействия с поверхностными атомами частицы бора. В работах [269-272] было показано, что гиалуроновая кислота и полибораты могут образовывать сеть циклических полихелатных комплексов, где ГК играет роль полидентатного лиганда. Карбоксильные и карбонильные группы гиалуроновой кислоты являются донорами протонов в связях с О-атомами связей В-О-В и борат-анионах В-О(-): О-Н····О, О-Н····(-)О и одновременно выступают в качестве электронодонора за счет свободных пар электронов в гетероатомах: -O(:)···B, -·N(:)··B. В то же время полисахарид и полиборат образуют типичные для этих соединений автоассоциации: внутри- и межмолекулярные экваториальные водородные связи в гиалуроновой кислоте в сочетании с дисперсионными взаимодействиями циклических пиранозных колец в аксиальном направлении. Такие системы устойчивы в воде [273]. Предварительная функционализация НЧ элементного бора также будет способствовать предотвращению связывания с белками сыворотки и продлевать время циркуляции НЧ бора в крови. Функциональные группы на макромолекулах эфиров целлюлозы и гиалуроновой кислоты обеспечат хорошую платформу для объединения их с наночастицами бора при рН

85

В работе исследованы 3 метода введения стабилизирующей системы в нанодисперсию бора:

1) введение стабилизатора во время процесса ультразвуковой обработки;

2) введение стабилизатора сразу после ультразвуковой обработки;

7-8.

3) введение частиц бора в готовый раствор стабилизирующей системы.

Для стабилизации наночастиц бора оптимальным является способ введения готовой дисперсии бора в воде в готовый раствор стабилизатора. Введение порошка полимера в коллоидный раствор наночастиц бора не эффективен, так как необходимо дополнительное время для растворения полимера в среде, в результате чего частицы бора успевают агрегировать. Введение полимера в момент ультразвуковой обработки имеет отрицательные последствия. В условиях ультразвуковых колебаний макроцепи цепи полимера способны к деградации с образованием токсичных остатков/осколков от макроцепи, что исключает дальнейшее применение композиции в биологических исследованиях. На рисунке 18 показано влияние ультразвукового воздействия на динамическую вязкость растворов ГЭЦ и ГК, с концентрацией 0.3% масс. Параметры диспергирования: 0.63 кВт, 22.0-25.0 кГц.





Показано, что ультразвуковая обработка приводит к разрушению макромолекул ГЭЦ и ГК, поэтому вязкость полимерных растворов снижается.

Исследования показали, что образование перекиси водорода в условиях акустической кавитации в водной дисперсионной среде – сложный процесс, включающий множество взаимосвязанных реакций. В упрощенном виде процесс образования радикалов

86

в условиях кавитации начинается с разложения воды на водород и свободные гидроксильные радикалы: $H_2O = H^+ + OH^-$. Радикалы могут рекомбинировать с образованием воды или образовывать молекулярный водород и перекиси водорода. В кислородсодержащих средах дополнительная перекись водорода может образовываться с участием пергидроксильного радикала (•HO₂). Наличие таких окислительных радикалов пагубно сказывается на свойствах полимеров, а именно наблюдается сонохимическое разрушение макромолекул [71].

Для определения оптимальной концентрации полимера, которая бы обеспечила стабильность размера частиц (5-15 нм, 500 мкг/мл) во времени, дисперсию бора добавляли в растворы с 0.1 и 0.3 масс.%, что приемлемо для введения в биологические системы (рисунок 19).



Рисунок 19 – Зависимость размера частиц и ζ-потенциала от времени экспозиции: А. ГК-НЧ; В. ГЭЦ-НЧ.

При концентрации полимера 0.1% масс. средний гидродинамический диаметр наночастиц увеличивается в зависимости от времени, при этом, размер дисперсии с 5-15 нм

за первые 2 дня увеличился до ~50 нм. Оптимальная концентрация полимеров для стабилизации наночастиц бора – 0.3% масс.

В таблице 24 представлены данные по оценке стабильности частиц бора, в интервале размеров: 5-15 нм, 20-50 нм, 50-70 нм, при варьировании концентрации частиц, в растворах гиалуроновой кислоты и гидроксиэтилцеллюлозе.

Таблица 24 – Оценка агрегативной устойчивости наночастиц бора (размер вариативен) в полимерных матрицах.

N⁰	Концентрация частиц, ррт	Стабильность, сут	Средний размер, нм			
	Стабилизатор: гиалуроновая кислота/0.3%/4.8 мПа*с					
	Средний размер дисперсии бора: 50-70 нм					
1	10	20				
2	50	20				
3	100	20	55-70(+3)			
4	200	18	55-70 (±5)			
5	500	16				
6	1000	15				
	Стабилизатор: гиалуронс	овая кислота/0.3%/4.8 мПа*с				
	Средний размер дис	сперсии бора: 20-50 нм				
7	10	27				
8	50	27				
9	100	27	23-52 (±2)			
10	200	23				
11	500	21				
12		21				
	Стаоилизатор. тиалуронс	сперсии бора: 5-20 им				
13	10	32				
13	50	32				
15	100	32				
16	200	32	4-21 (±1)			
17	500	27				
17	1000	27				
10	Стабилизатор: гидроксиэт	ищеплюпоза/0 3%/4 3 мПа*с				
	Средний размер лис	сперсии бора: 50-70 нм				
19	10	22				
20	50	22				
21	100	21				
22	200	21	52-75 (±4)			
23	500	18				
24	1000	18				
	Стабилизатор: гидроксиэт	илцеллюлоза/0.3%/4.3 мПа*с				
	Средний размер дис	сперсии бора: 20-50 нм				
25	10	31				
26	50	31				
27	100	31	19-48 (+5)			
28	200	29	19-48 (±3)			
29	500	28				
30	1000	28				
	Стабилизатор: гидроксиэт	илцеллюлоза/0.3%/4.3 мПа*с				
	Средний размер ди	сперсии бора: 5-20 нм				
31	10	33				
32	50	33				
33	100	33	4-18 (±3)			
34	200	31				
35	500	30				

N₂	Концентрация частиц, ppm	Стабильность, сут	Средний размер, нм
36	1000	30	

Применение полимерных матриц для функционализации наночастиц элементного бора способствует повышению стабильности частиц бора в течение продолжительного времени, что важно для хранения частиц и проведения БНЗТ. Выбор значения концентраций водных растворов полимеров (0.3% масс.) обусловлен следующими факторами:

• методическая сложность: при более высоких концентрациях значительно возрастает вязкость раствора, из-за чего диффузия наночастиц бора в матрицу полимера затруднена, и как следствие, наблюдалась агломерация частиц;

• значения динамической вязкости для 0.3% раствора полимера соответствует значению вязкости крови млекопитающих (4.2-4.8 мПа*с), при этом, сложность введения внутривенных инъекций исключена или определяется скоростью введения коллоидного раствора. Известно, что высоковязкие системы не предусмотрены для внутривенно, поскольку высок риск закупорки мелких кровеносных сосудов [274].

3.2. Синтез сополимера є-полилизина-поли-L-молочной кислоты

Данный раздел диссертации посвящен синтезу полимерной матрицы для инкапсуляции наночастиц элементного бора. Описан синтез ПМК методом бескаталитической твердотельной дополиконденсации, изучены свойства полимера. Оценено влияние наночастиц бора на свойства ПМК при их добавлении на этапе синтеза. Описан синтез сополимера ПЛ-ПМК с применением импульсного механохимического подхода.

3.2.1. Синтез поли-L-молочной кислоты методом твердотельной дополиконденсации

Стадии синтез полимолочной кислоты методом бескаталитической твердотельной дополиконденсации описаны в п. 2.2.2. Схема синтеза представлена на рисунке 20.



Рисунок 20 – Схема процесса поликонденсации (**A**), образование второстепенного продукта (**B**).

Начальное этап синтеза полимолочной кислоты заключается в испарении воды из водного раствора молочной кислоты. Для оптимизации времени испарения воды варьировали температуру и время проведения процесса. Процесс проводили при постоянно остаточном давлении 10 мбар. Количество воды измеряли как массу воды в конденсате (рисунок 21).



Рисунок 21 – Оценка конденсата воды в условиях концентрирования раствора молочной кислоты.

На графике показано увеличение количества воды в конденсате в зависимости от времени и температуры процесса, МК не была обнаружена в конденсате. При измерении молекулярно-массовых характеристик продукта после 1 этапа синтеза при времени концентрирования раствора $\tau = 150$ мин, обнаружено, что происходит частичная олигомеризация МК: $M_W = 900$ Да, D 2.3. На основании полученных данных, оптимальными условиями 1 этапа синтеза ПМК являются: $\tau = 150$ мин, $T = 90^0$ C, P = const = 10.0 мбар.

90

С целью увеличения выхода олигомеров и снижения количества второстепенных соединений, таких как лактид и реакционная вода, для сконцентрированного и частично олигомеризовавшегося раствора МК проводили процесс при варьировании температуры (110-220⁰C) и времени олигомеризации (90 мин, 300 мин, 480 мин), P = const = 5 мбар (рисунок 22).





Реакция поликонденсации зависит от времени, температуры, давления и диффузии второстепенных продуктов из расплава реакционной массы. При температуре синтеза более 180-200⁰С происходит термодеструкция [185], наблюдается образование лактида. Для подавления образования циклического димера реакцию поликонденсации следует проводить при температуре ниже 200° С. Проведение поликонденсации при низких температурах также отрицательно влияет на удаление воды из-за относительно высокой вязкости реакционной смеси, а также снижает скорость реакции. Удаление воды становится более трудным и может определять скорость при получении ПМК с более высокой молекулярной массой из-за повышенной вязкости реакционной смеси. Поскольку основной реакцией должна быть поликонденсация, удаление воды должно быть как можно более эффективным, не допуская в реакционной смеси реакции переэтерификации. Удаление воды можно интенсифицировать за счет применения вакуума. Остаточное давление 5.0 мбар обеспечивает отгон реакционной воды, а также низкомолекулярных примесей в мономере (уксусная, винная, лимонная кислоты). Оптимальные условия, для получения олигомеров ПМК с М_w более 10 кДа ($\oplus 2.1$): P = 5.0 мбар, $T = 178^{\circ}$ С, $\tau = 480$ мин.

Некаталитический процесс поликонденсации не позволяет получать ПМК с высоким значением М_w. Поскольку поликонденсация ПМК осуществляется за счет реакций этерификации, увеличение конденсации снижается по мере того, как общее количество

карбоксильной группы уменьшается в результате реакции поликонденсации [185-187]. При более длительном времени поликонденсации в расплаве (более 480 мин) отмечено образование циклического димера-лактида, который конденсировался на колбе.

Для определения структурных характеристик продукта после этапа олигомеризации и концентрации остаточного мономера применили метод ¹Н ЯМР. На рисунке 23 показаны сигналы, которые относятся как к протонам в ПМК, так и протоном МК и лактида.



Рисунок $23 - {}^{1}$ Н спектр ПМК/МК/лактида (растворитель CDCl₃).

Положения сигналов групп (химический сдвиг относительно сигнала CDCl₃) исследуемых образцов и интегральные интенсивности соответствующих групп олигомера, лактида, МК (в зависимости от времени синтеза) представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Положение, интегральная интенсивность, вид основных сигналов на ¹Н ЯМР – спектрах исследуемых продуктов

Группа/соединение	Положение сигналов, ppm	Интегральная интенсивность, <i>I, от.ед</i> .	Вид сигнала	
	Время ситеза:30мину	Т		
СН (ПМК)	5,12-5,23	0,13	квартет	
-CH3 (ПМК)	1,51-1,60	0,38	дуплет	
-СН (МК)	4,30-4,41	0,07	квартет	
–СН (лактид)	4,98-5,06	0,04	квартет	
-СНз (лактид)	1,62-1,68	0,11	дуплет	
300 минут				
-СН (ПМК)	5,10-5,21	0,18	квартет	

Группа/соединение	Положение сигналов, ppm	Интегральная интенсивность, <i>I, от.ед</i> .	Вид сигнала			
CH3 (ПМК)	1,52-1,61	0,51	дуплет			
-СН (МК)	4,30-4,40	0,03	квартет			
–СН (лактид)	4,98-5,07	0,02	квартет			
-СНз (лактид)	1,64-1,66	0,05	дуплет			
480 минут						
-СН (ПМК)	5,05-5,17	0,21	квартет			
CH3 (ПМК)	1,49-1,57	0,61	дуплет			
-СН (МК)	4,27-4,36	0,01	квартет			
–СН (лактид)	4,99-5,07	0,02	квартет			
-СНз (лактид)	1,59-1,63	0,01	дуплет			

Концентрацию остаточного мономера и лактида в системе рассчитывали из интегральных интенсивностей *I*_{CH} по формуле (1).

$$\frac{0.5 \times I_{CH}^{\text{MOHOMEP}}}{I_{CH}^{\text{IDOJUMEP}} + 0.5 \times I_{CH}^{\text{MOHOMEP}}} = C_{\text{MOHOMEP}} (1)$$

На ¹Н ЯМР – спектрах полимеров присутствует МК, но с увеличением времени концентрирования, остаточное количество мономера значительно уменьшается (таблица 26).

Таблица 26 – Концентрации остаточного мономера и побочного продукта.

Образцы полимера прямой поликонденсации, ПМК	Концентрация остаточного мономера, С _{МК} %	Концентрация лактида, С _{лактид} %
ПМК – 30 минут	21.2	13.3
ПМК – 180 минут	8.0	5.5
ПМК – 300 минут	7.7	5.2
ПМК – 480 минут	2.3	4.5

Непрореагировавший мономер может негативно влиять на свойства полимера, поэтому его концентрация должна быть контролируема и не превышать 3%. Если концентрация мономера превышает допустимое значение, можно использовать метод переосаждения полимера из раствора в охлажденный этиловый спирт или воду для его очистки.

Твердотельная дополиконденсация после поликонденсации в расплаве позволяет увеличить численное значение молекулярной массы олигомеров. В зависимости от стереорегулярности исходного мономера, полимер может быть получен в различных фазовых состояниях, которые отличаются физическими свойствами. Например, полимер на основе L-MK может быть аморфно-кристаллическим. Если полимер имеет низкую степень кристалличности, то происходит слипание измельченного материала, и реакция образования макромолекул протекает в фазе расплава. Это приводит к более высокой степени дисперсности, но не увеличивает численное значение молекулярной массы полимера. Для повышения степени кристалличности полимера, кристаллизацию проводят при температуре ниже температуры плавления, но выше температуры стеклования полимера. Варьировали температуру и время кристаллизации (рисунок 24).



Рисунок 24 – Зависимость кристалличности ПМК от времени и температуры кристаллизации.

Показано, что оптимальные условия кристаллизации составили: 4 часа, T = 120^oC. Вероятно, что при более высоких значениях температуры наблюдается частичное плавление олигомерной фазы, что приводит к слипанию частиц и ингибированию процесса кристаллизации.

Образование полимера с более высоким значением молекулярных масс происходит в результате физических процессов: кристаллизованную дисперсию олигомеров ПМК нагревают выше температуры стеклования, но ниже точки плавления, при этом аморфная составляющая вытесняется на поверхность кристаллической фазы [173]. Увеличение локальной концентрации функциональных групп в аморфной части ПМК приводит к смещению константы скорости в сторону продукта реакции, позволяя синтезировать полимер с М_w до 25 кДа.

Для ПМК твердотельная поликонденсация протекает в аморфной части, поэтому максимальная плотность полимерных клубков в конденсированной фазе способна обеспечить высокую вероятность реагирования свободных функциональных групп на концах различных полимерных цепей. Этот процесс приводит к увеличению M_w полимера.

Температура для твердотельной поликонденсации является важным фактором, так как она влияет на протекание химической реакции, на фазовые состояния цепей макромолекул, на мобильность функциональных групп и диффузию остаточной воды, влаги, второстепенных продуктов. При твердотельной дополиконденсации олигомеров, которые имеют невысокую степень кристалличности или высокий выход побочных продуктов, может иметь место слипание частиц полимера. В таком случае реакция протекает не в твердой, а в расплавленной фазе, вклад реакций между концевыми функциональными группами и реакционноспособными группами средней части полимера цепи намного выше, что приводит к более высокой степени дисперсности, но не к увеличению молекулярной массы полимера. Наличие большего количества побочных продуктов в реакционной массе может привести к деградации полимера. Наличие в системе кислорода способно вызывать интенсивное образование гидроперекисей при 120⁰C, поэтому в системе необходимо создавать инертную атмосферу посредством вакуума, кроме того, быстрое удаление летучих продуктов реакции играет наиболее важную роль в смещении равновесия в сторону образования высокомолекулярного полимера.

Для ПМК значение температуры в интервале от 140⁰ до 160⁰С обеспечивает достаточную мобильность функциональных групп в аморфной частиц для их дальнейшего взаимодействия друг с другом. Заключительный этап твердотельной поликонденсации проводили с точностью температуры в 1⁰С. Для анализа молекулярно-массовых характеристик конечных продуктов использовали метод ГПХ: M_N – 9575 Да; M_W – 22800 Да; Đ 2.3.

Синтез ПМК, с молекулярной массой ~23 кДа, реализован при отсутствии катализатор, инициаторов процесса, органических растворителей. Поэтому такой материал можно использовать в медицинских целях, в частности, инкапсулирующей полимерной матрицей для наночастиц элементного бора. На основании оптимизированных параметров твердотельной дополиконденсации, синтезировали борсодержащую ПМК.

В матрицу ПМК инкапсулировали наночастицы бора, в интервале размеров 5-20 нм. Оптимальным способом введения НЧ бора в полимерную матрицу является добавление частиц на этапе концентрирования исходного мономера. При добавлении дисперсии частиц в расплав олигомеров МК не целесообразно, так как из-за вязкости расплава добиться равномерного распределения частиц является сложной задачей. Вводили 0.03-10.0% масс. наночастиц бора. Изменение свойств ПМК при добавлении частиц бора на начальном этапе синтеза проводили с помощью метода ДСК (фазовые переходы). После проведения 2 этапа синтеза (T = 178^{0} C, P = 5 мбар), в продукте отсутствует эндотермический пик, соответствующий наличию остаточного мономера (рисунок 25).



Рисунок 25 – Кривые ДСК олигомеров с 2 стадии синтеза: 1. ПМК, 2. ПМК-НЧ (С_{БОРА}=0.03% масс.).

На кривой ДСК олигомеров без содержания частиц бора отсутствует эндотермический пик в интервале температур 130-150^оС. На кривой ДСК для олигомеров с наночастицами бора идентифицируется эндотермический пик, в области 130-150^оС. Наличие в системе НЧ бора в матрице олигомеров приводит к изменению фазового состояния ПМК, а именно, образуется кристаллическая фаза, так как наночастицы бора выступают в качестве зародышей кристаллической фазы.

На кривых ДСК полимерных продуктов после стадии кристаллизации и конечных продуктов твердотельной поликонденсации присутствуют эндо-пик, соответствующий энергии, затраченной на плавление кристаллической фазы (рисунок 26).



Рисунок 26 – Кривые ДСК полимера: после стадии кристаллизации: 1. ПМК, 2. ПМК-НЧ (С_{БОРА}=0.03 % масс.).

На кривых ДСК имеют эндотермические пики, соответствующий энергии, затраченной на плавление кристаллической фазы. В полимерном образце без НЧ бора, глубина пика невысока, следовательно степень кристалличности имеет низкое значение. Наличие бора в системе приводит к увеличению степени кристалличности.

В зависимости от условий процесса и содержания наполнителя, получают материалы с разной надмолекулярной организацией. Для оценки степени кристалличности ПМК в зависимости от состава применили рентгенофазовый анализ (рисунок 27).



Рисунок 27 – Дифрактограммы ПМК: А. Полимер без добавок: степень кристалличности 56% (линия 1 – кристаллическая фаза; линия 2 – аморфная фаза); В. Полимер в присутствии наночастиц бора, с концентрацией 0.03 % масс: степень кристалличности

74% (линия 1 – кристаллическая фаза; линия 2 – аморфная фаза).

Степень кристалличности полимера W_C рассчитывается как отношение суммарной интенсивности рассеяния кристаллической фазы к интенсивности общего рассеяния от

аморфной и кристаллической областей:

$$W_{C} = I_{K}/(I_{K}+I_{A}),$$

где I_K – суммарная интенсивность всех кристаллических пиков; I_A – интенсивность аморфного гало.

Наличие наночастиц бора в системе повышает значение степени кристалличности на 20%, а также уменьшает долю аморфной составляющей, так как выступают в роли нуклеирующей добавки (вторичное зародышеобразование) – гибкоцепным полимерным макромолекулам энергетически выгодней строить кристаллы на инородной поверхности, чем самим образовывать зародыши новой фазы. При наличии в матрице НЧ бора увеличивается скорость кристаллизации, так как частица бора имеет развитую кристаллографическую поверхность, на которой и происходит начало кристаллизации макромолекул полимолочной кислоты.

Для оценки молекулярно-массовых характеристик ПМК в присутствии НЧ бора применили ГПХ (таблица 27).

Таблица 27 – Свойства ПМК в зависимости концентрации (С) наночастиц элементного бора.

Концентрация наночастиц бора,	а ПМК, %	М _W ПМК,	Đ	Терапевтическая концентрация
% масс. в 1 г ПМК		кДа		бора, мкг/г (в 1 мг ПМК)
0	47	23	2.3	0
0.03	74	62	2.4	0.3
1.0	64	53	2.1	10
5.0	41	19	2.3	50
10.0	32	15	2.0	100

НЧ бора, в интервале размеров 5-20 нм, структурируют матрицу ПМК, при этом уменьшаются межмолекулярные расстояния в аморфной фазе и увеличивается вероятность взаимодействия макромолекул аморфной фазы друг с другом, в следствие чего наблюдается повышение степени кристалличности и молекулярной массы ПМК, по сравнению с полимером без добавки.

Для дальнейших работ по получению амфифильных сополимеров с полилизином, механохимическим методом, выбрали композит ПМК, с содержанием бора 5 %масс., и средним размером частиц 5-15 нм. Используя такую концентрацию борных частиц в терапевтической композиции, возможно добиться значительного увеличения необходимой концентрации мишенного агента для бор-нейтронозахватной терапии 500 мкг в 0,01 г композиции ПМК-НЧ. Полученные композиты на основе ПМК и НЧ бора ($C_{6opa} = 5$ % масс.) предварительно микронизировали для оценки содержания наночастиц бора в матрице полимера методом ЭС ДПТ, при этом оценивали содержание для 5 проб одного образца:

масса пробы 0.01 г, растворяли в 70% HNO₃ – содержание бора, относительно загрузки, составит ppm (таблица 28).

Таблица 28 – Оценка содержания наночастиц бора в 1.0 г ПМК: введенное количество бора: 5.0% масс.

N⁰	Экспериментальное значение, мг
1	49.2
2	49.8
3	49.7
4	49.8
5	49.3

Измерения показали, что расхождение концентрации бора в ПМК между рассчитанной концентрацией бора на основании загруженной массы частиц, не превышает 2%. Наночастицы бора равномерно распределены в матрице ПМК, потерь частиц не наблюдается.

3.2.2. Синтез є-ПЛ-L-ПМК методом импульсной механохимии

В литературе описаны способы получения сополимеров на основе полилизинаполимолочной кислоты. В работе [275] представлен двухэтапный синтез сополимеров ПМК-ПЭГ-ПЛ, в котором сначала получали сополимер NH₂-ПЭГ-ПМК по реакции ацидолиза D, L-молочной кислоты с ранее синтезированным ПЭГ. Второй этап синтеза заключался в полимеризации лизина с защитной группой N-карбоксиангидрид, в среде диметилформамида, в течение 30 часов, в присутствии NH₂-ПЭГ-ПМК. После проводилась деблокировка первичной аминогруппы ПЛ. Такой процесс является крайне трудоемким с точки зрения отмывки продуктов реакции и последующей регенерации растворителей, таких как: трифторуксусная кислота, бромистоводородная кислота, метанол, уксусная кислота.

Аналогично получали сополимер ПМК-ПЭГ-ПЛ в работе [276], но в качестве реакционной среды для полимеризации использовали метанол, и защиту первичной NH₂-ПЛ осуществляли трет-бутоксикарбонильной (Вос) группировкой, которая после получения конечного продукта быта снята с применением дихллорметана, трифторуксусной кислоты, метанола, диметилформамида. Выход полученного сополимера ПМК-ПЭГ0ПЛ составил 71% (57 мг).

Для получения статистического сополимера ПМК-ПЛ применяли совместную полимеризацию ангидросульфита молочной кислоты и e-N-cbz-L-лизин-N-карбокси ангидрида [277]. Процесс проводили в среде тетрагидрофурана, инициаторов различного

типа, при T = 50^oC, в течение 72 часов. Полученный сополимер промывали хлороформом и водой, а после высаживали в петролейном эфире (выход составил 67% масс.). Процесс депротекции проводили аналогично работе авторов [276].

Другие схемы синтеза сополимеров ПЛ-ПМК показаны на рисунке 28.



Β.

Рисунок 28 – Схема синтеза сополимера ПЛ-ПМК: А. [278]; В. [277].

При использовании перечисленных методов синтеза сополимеров ПЛ-ПМК необходимо проводить последующие стадии очистки от токсичных катализаторов и растворителей.

В данной работе предложен оригинальный механохимический подход для синтеза сополимеров ПЛ-ПМК. В последнее время фармацевтическая промышленность уделяет особое внимание «синтезу в твердом теле», когда реакция проводится без растворителей или количество используемых растворителей значительно снижено [237]. Такой подход позволяет: получать особо чистые вещества; нередко проводить реакции более селективно, с высоким выходом продукта; решать экологические проблемы [238]. Способы реализации синтеза в твердом теле и реакции между твердыми веществами взаимосвязаны. Для осуществления реакций в твердом теле должны быть выполнены два главных условия. С одной стороны, механохимическая активация должна способствовать накоплению в

твёрдом теле максимального числа нарушений и дефектов за счёт подведённой в ходе обработки энергии. С другой стороны, механохимическая активация должна способствовать гомогенизации, при которой все компоненты смеси будут максимально контактировать друг с другом, так как число и площадь контактов компонентов смеси определяют скорость твердофазной реакции [279]. Предположительно в нашем случае, выбранный метод механохимического импульсного воздействия в разной степени обеспечивают выполнение перечисленных условий.

Для механической активации и последующего синтеза сополимеров на основе L-ПМК и є-ПЛ в работе использовали вибрационную шаровую мельницу, предназначенную для измельчения материалов и получения как можно большей удельной поверхности при значительно меньших затратах энергии в условиях многоосного сжатия и сдвига. В основе метода: импульсный характер процесса во времени и локальный характер механического воздействия на вещество [243, 244], обеспечивающие для каждого метода различия в чередование процессов возникновения давления, сдвига, релаксации полимера [255]. Проведение механической активации в мельницах является наиболее распространенной операцией в механохимии. Однако, следует отметить, что подобный метод синтеза не применялся для смесей ПЛ-ПМК, и в данной работе это было апробировано впервые. Исходные гомополимеры были предварительно смешаны в виде растворов с последующим совместным испарением растворителей и измельчением в ступке. Это обеспечило гомогенизацию компонентов смеси в равных вариантах (см. материалы и методы).

При выбранных условиях механохимического синтеза продукт будет содержать смеси компонентов, в том числе привитые сополимеры с разной степенью прививки и непрореагировавшие гомополимеры (рисунок 29).

$$\begin{bmatrix} 0 \\ -H \\ -H_{3} \end{bmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -H \\ -H_{2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -H \\ -H_{2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -H_{2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} H_{2} \\ -$$

Рисунок 29 – Схема синтеза ПЛ-ПМК с применением импульсной механохимии.

Разработка алгоритмов разделения таких смесей является чрезвычайно сложной задачей из-за сходной растворимости амфифильных сополимеров и гомополимеров ПЛ-ПМК в селективных растворителях.

Всего было получено три соотношения є-ПЛ:L-ПМК = 1:9, 1:1, 9:1 (по 10.0 г). Разделение реакционной массы проводили согласно схеме, указанной в п.2.2.3. Для качественной оценки структуры целевых продуктов использовали ИК (НПВО) и ¹Н ЯМР. Выход сополимеров составил: 58% (ПЛ:ПМК = 1:9); 75% (ПЛ:ПМК = 1:1); 73% (ПЛ:ПМК

= 9:1).

Исследование структуры методом ИК (НПВО) показало, что в продуктах реакций в твердом состоянии хорошо разрешены характерные полосы поглощения как для полилизина, так и для полимолочной кислоты для всех соотношений гомолимеров є-ПЛ:L-ПМК = 1:9, 1:1, 9:1. Для смеси компонентов, которые не подвергались механохимическому воздействию, интенсивней наблюдаются полосы поглощения того гомополимера, который преобладает в смеси, в зависимости от массового соотношения. Для смеси продуктов реакции, которая была получена в результате механохимического воздействия аналогично выражены полосы поглощения, которые характеризуют гомополимер.

На рисунке 30 приведены спектры продуктов, полученных после первого смешения в ступке, смеси после импульсной механохимии и смеси после этапа очистки.

После стадии очистки для продуктов идентифицируются валентные колебания карбоксильной группы сложных полиэфиров в области 1756 см⁻¹; полосы поглощения, в совокупности характеризующие амидную группировку: деформационные колебания -C=O в полиаминокислотах в твердом состоянии (Амид I) в области 1660 см⁻¹, частота такой полосы сильно подвержена влиянию водородной связи, вследствие чего возможны значительные смещения при переходе от твердого состояния к раствору; деформационные колебания -NH- в амидах (Амид II) в области 1521 см⁻¹. Также наблюдаются полосы поглощения, характеризующие деформационные ассиметричные колебания -CH₃ сложных полиэфирах в области 1481 см⁻¹ [257].





Рисунок 30 – ИК-спектры НПВО для продуктов, полученных после разных этапов синтеза: А. ε-ПЛ:L-ПМК = 1:9 (синий – смесь после смешения в ступке, бордовый – смесь после механоактивации, красный – смесь после очистки); В. ε-ПЛ:L-ПМК = 9:1 (синий – смесь после смешения в ступке, зеленый – смесь после механоактивации, красный – смесь после очистки); С. ε-ПЛ:L-ПМК = 1:1 (синий – смесь после смешения в ступке, бордовый

- смесь после механоактивации, красный - смесь после очистки).

Согласно полученным данным, для всех трех соотношений гомополимеров, после механоактивации и стадии очистки, на спектрах наблюдаются полосы поглощения для

сополимера, характеризующие группы ПЛ и ПМК, что свидетельствует об интенсивном процессе прививки ПЛ и ПМК в результате реакции аминолиза.

Для продукта реакции при соотношении ПЛ к ПМК = 1:1, наблюдается исчезновение полосы поглощения валентных колебаний первичной аминогруппы по длине макроцепи у ПЛ в области 3400-3500 см⁻¹ [257]. Одновременно при таком соотношении компонентов интенсивность полос Амида-I и Амида-II заметно возрастает, что свидетельствует об интенсивном процессе прививки полилизина и полимолочной кислоты в результате реакции аминолиза.

Анализ структуры привитых сополимеров ПЛ/ПМК, полученных после механоактивации и очистки, исследовали методом ¹Н ЯМР-спектроскопии, в растворителе CDCl₃. На рисунке 32 приведен общий вид протонного спектра продуктов реакции.



Рисунок 32 – Общий вид ¹Н спектра для продуктов после маханоактивации и очистки. Растворитель CDCl₃.

На ¹Н-спектре наблюдаются пики, характеризующие ПМК: $\delta = 5.12-5.23$ м.д. – протоны СН группы в макроцепи ПМК (a'), $\delta = 1.51-1.16$ м.д. – протоны -СН₃ группы в макроцепи ПМК (b'), $\delta = 4.3-4.4$ м.д. – протоны в -СН группе на концах макроцепи ПМК (a), протоны в -СН группе ПЛ (g), $\delta = 1.45-1.5$ м.д. – протоны в -СН₃ группе на концах макроцепи ПМК (b); а также ПЛ: $\delta = 2.19$ м.д. – протоны в -СН₂ группе ϵ -ПЛ (c), $\delta = 1.46$ м.д. – протоны в -СН₂ группе ϵ -ПЛ (d). В

таблице 29 приведены значения интегральных интенсивностей для сигналов протонов групп в полилизине и полимолочной кислоте, при варьировании соотношения исходных гомополимеров.

Таблица 29 – Интегральные интенсивности сигналов для протонов в группах, характерных для ПЛ и ПМК (растворитель CDCl₃), в продуктах.

Соотношение	δ м.д. (группа), <u>I</u>	<u>(Існ(ПЛ)/Існ(ПМК))*100%</u>
ПЛ:ПМК		
1:9	3.1 м.д. (d, -С Н 2- в ПЛ), <u>0.63</u> ; 4.3-	(0.09)/1 = 9.0%
	4.4 м.д. (g, -СН в ПЛ), <u>0.09</u> ; 5.12-	
	5.23 м.д. (а', -С Н - в ПМК), <u>1.0</u>	
1:1	3.1 м.д. (d, -С Н 2- в ПЛ), <u>0.85</u> ; 4.3-	(0.2)/1 = 20%
	4.4 м.д. (g, -СН в ПЛ), <u>0.2;</u> 5.12-	
	5.23 м.д. (а', -С Н - в ПМК), <u>1.0</u>	
9:1	3.1 м.д. (d, -С Н 2- в ПЛ), <u>0.4</u> ; 4.3-	(0.19)/1 = 18.0 %
	4.4 м.д. (g, -СН в ПЛ), <u>0.18; 5</u> .12-	
	5.23 м.д. (а', -С Н - в ПМК), <u>1.0</u>	

Образование сополимера в условиях импульсного механохимического воздействия обусловлено наличием групп полилизина в нехарактерной для него органической среде (хлороформе). Для массового соотношения гомополимеров ПЛ:ПМК = 1:1 наблюдали наибольшее значение интенсивности сигналов протонов групп (таблица 29), характерных полилизину. Мольная доля ПЛ, рассчитанная по соотношению интегральных интенсивностей -СН в ПЛ и -СН в ПМК, составила 20%.

Продукты реакции, полученные после механоактивации и очистки, исследовали методом ¹Н ЯМР в растворителе DMSO-d₆ (рисунок 33).



Рисунок 33 – Общий вид ¹Н спектра для продуктов после маханоактивации и очистки. Растворитель ДМСО-d₆.

На ¹Н-спектре наблюдаются пики, характеризующие ПМК: $\delta = 4.18-4.25$ м.д. – протоны в -СН группе на концах макроцепи ПМК (а), $\delta = 1.47-1.5$ м.д. – протоны в -СН₃ группе на концах макроцепи ПМК (b), $\delta = 5.10-5.24$ м.д. – протоны СН группы в макроцепи ПМК (a'), $\delta = 1.55-1.21$ м.д. – протоны -СН₃ группы в макроцепи ПМК (b'), а также ПЛ: $\delta = 4.18-4.25$ м.д. – протоны в -СН (g), $\delta = 3.58$ м.д. – протоны в -СН₂ группе ε -ПЛ (c), $\delta = 1.47$ м.д., 1.18-1.25 м.д. – протоны в -СН₂ группе ε -ПЛ (d, e, f). В таблице 30 приведены численные значение интенсивности сигналов для протонов групп в полилизине, при варьировании соотношения исходных гомополимеров.

Таблица 30 – Сравнение интенсивности сигналов для протонов в группах, характерных для полилизина (растворитель DMSO-d₆).

Соотношение	δ м.д. (группа), <u>I</u>	<u>(Існ(ПЛ)/Існ(ПМК))*100%</u>
ПЛ:ПМК		
1:9	1.46 м.д. (d, -С H ₂ - в ПЛ), <u>0.22;</u>	(0.04*0.5)/1 = 2.0%
	4.18-4.25 м.д. (g, СН в ПЛ), 0.04;	
	5.10-5.24 м.д. (а', -С Н- в ПМК),	
	<u>1.0</u>	
1:1	1.46 м.д. (d, -С H ₂ - в ПЛ), <u>0.32</u> ;	(0.2*0.5)/1 = 10.0%
	4.18-4.25 м.д. (g, C H в ПЛ), 0.2;	
	5.10-5.24 м.д. (а', -С Н- в ПМК),	
	<u>1.0</u>	

106

9:1	1.46 м.д. (d, -С H ₂ - в ПЛ), <u>0.49</u> ;	(0.24*0.5)/1 = 12.0%
	4.18-4.25 м.д. (g, С Н в ПЛ), 0.24;	
	5.10-5.24 м.д. (а', -С Н- в ПМК),	
	<u>1.0</u>	

По данным ИК и ЯМР показано, что в результате импульсного механохимического воздействия образуются целевые продукты – сополимеры ПЛ-ПМК. Следует отметить, что выход соответствует выбранным параметрам и условиям синтеза. Изменение амплитуды колебаний вибромельницы, а также время воздействия на материал будут способствовать увеличению количественного выхода целевых продуктов. Оптимизация параметров и условий синтеза является предметом дальнейших исследований.

Кажущуюся молекулярную массу сополимера определяли методом ГПХ. Изучались продукты реакции после очистки, полученные при массовом соотношении ПЛ:ПМК = 1:1, 9:1. В качестве элюента использовали ацетатный буфер. На рисунке 34 представлены хроматограммы образцов в зависимости от массового соотношения гомополимеров.



Образец	Удержание,	Мw, кДа	М _N , кДа	Ð
	мин			
ПЛ (розовый)	11.35	5.4	5.3	1.02
ПЛ:ПМК= 9:1 (красный)	11.8	8.8	7.4	1.2
ПЛ:ПМК= 1:1 (синий)	12.5	12.72	10.6	1.2

Рисунок 34 – Хроматограммы и расчетные молекулярные массы продуктов, полученных в

результате механохимического воздействия.

Для сравнения был взят ПЛ с известной молекулярной массой. Показано, что наибольшая молекулярная масса характерна для образца, полученного в результате синтеза

в вибрационной мельнице, с массовым соотношением ПЛ:ПМК = 1:1.

Сополимеры є-ПЛ-ПМК имеют различную растворимость в зависимости от преобладающего фрагмента в сополимере, гидрофильный (ПЛ) или гидрофобный (ПМК) амфифильный характер. Изучена потенциальная возможность использования полученных амфифильных сополимеров (в качестве инкапсулирующей полимерной матрицы гидрофобных наночастиц бора) в отношении процесса образования макромолекулярных ассоциатов в характерных для ПЛ-ПМК дисперсионных средах – вода. В таблице 31 показано распределение по размерам ассоциатов, полученных методом ДСР.

Таблица 31 – Распределение ассоциатов по размерам и их относительное содержание.

N⁰	Соотношение ПЛ:ПМК, масс.	Средний R _{hyd} , нм	ζ-потенциал, мВ
1	9:1	10±2	29.5
2	1:1	12±3	28.5

Исследуемые сополимеры самоорганизовались в коллоидные структуры в жидких средах. В воде размер макромолекулярных ассоциатов увеличивается с увеличением содержания ПМК в продукте.

Для амфифильного сополимера ассоциаты в водном растворе состоят из гидрофобного ядра, представленного схлопнувшейся гидрофобной полимолочной кислотой, и гидрофильной оболочки, представленной полилизином. Были исследованы образцы с массовым соотношением ПЛ:ПМК = 1:1 и 9:1. Экспериментально методом МУРР показано, что у сополимеров наблюдаются самоорганизующиеся структуры в водной среде.

Согласно [280], были использованы две модели для аппроксимации данных МУРР для ассоциатов (рисунок 35): эллипсоид и катушку Гаусса. Эллипсоидальная модель лучше соответствует экспериментальным данным (значения χ^2 1.080, 1.078 и 0.902 вместо 1.217, 1.235 и 0.977), что указывает на более вероятную глобулярную структуру для ε -ПЛ и ε -ПЛ-L-ПМК по сравнению со спиралью. Из-за схожих значений плотности длины рассеяния ПЛ:ПМК мы использовали модель однородного эллипсоида вместо модели эллипсоида ядро-оболочка, использованной в [259].


Рисунок 35 – Данные МУРР сополимеров. А. Экспериментальные профили I(q) для є-ПЛ (оранжевый) и сополимеров є-ПЛ:L-ПМК с соотношением 9:1 (фиолетовый) и 1:1 (синий). В. Нормализованная функция распределения парных расстояний P(r)/P_{MAX} для є-ПЛ и сополимеров є-ПЛ-ПМК. Вертикальные пунктирные линии соответствуют максимумам функций P(r) и показывают, что характерные размеры сополимера увеличиваются с увеличением доли ПМК.

Форма ассоциатов преимущественно вытянутая и уплощенная, с соотношением осей примерно 1:2:5, что хорошо согласуется с тем, что ПЛ имеет положительный заряд (все кислотно-основные центры протонированы) в растворе с pH<7 (ацетатный буфер) и имеет тенденцию принимать вытянутую конформацию, при этом может находиться в электростатически расширенной конформации из-за отталкивания протонированных аминогрупп.. Отношение положения максимума к максимальному размеру R_{Pmax}/D_{max}~1/5 также указывает на удлиненную/сплющенную форму ассоциата.

Функция парной корреляции, описывает форму ассоциатов в виде трехосевого эллипсоида, размеры которого меняются в зависимости от соотношения гидрофильной и гидрофобной частей. Показано, что размеры трехосного эллипсоида варьируются в зависимости от соотношения гидрофильной и гидрофобной частей и увеличиваются с увеличением доли ПМК (таблица 32). Радиус инерции R_g, а также положение максимума R_{Pmax} функции распределения парных расстояний также увеличиваются с увеличением доли ПМК (рисунок 35 В, таблица 32), показывают, что характерные размеры сополимера увеличиваются.

109

ΠΠ.ΠΜΓ	<i>P</i> (<i>r</i>) параметры		Эллипсоидные полуоси			Объем,	 λ³/Π ο	Mw,	
11J1:11IVIK	D_{\max} , Å	$R_{\rm g}$, Å	$R_{\rm Pmax}$, Å	<i>a</i> , Å	b, Å	<i>c</i> , Å	10^{3}\AA^{3}	<i>v</i> , А ^з /Да	kДa
ПЛ	55	12 ± 0.2	9.1	-	-	-	4.5 ± 0.4	-	3.8 ± 0.4
9:1	51	12.8 ± 0.8	11.6	7.1 ± 1.3	$9.8\!\pm\!1.6$	22.9 ± 1.3	6.7 ± 0.4	1.0688	6.2 ± 0.4
1:1	54	14.9 ± 1.3	11.4	6.4 ± 1.0	10.2 ± 1.3	32.3 ± 2.1	$8.9\!\pm\!0.8$	1.0425	8.3 ± 0.7

Таблица 32 – Параметры є-ПЛ и є-ПЛ-L-ПМК, полученные методом МУРР.

Размеры ассоциатов, полученные методом МУРР, сравнили с гидродинамическим радиусом R_{hyd} , полученным в экспериментах по ДСР. Показано, что гидродинамические радиусы хорошо согласуются с эквивалентным сферическим радиусом из МУРР, хотя они немного больше, что ожидаемо для полимерных мицеллярных структур из-за гидродинамического сопротивления боковых цепей мицеллы.

Полученные сополимеры были рассмотрены как синтетическая полимерная матрица для инкапсуляции гидрофобных наночастиц элементного бора. Синтез и изучение комплекса свойств ПЛ-ПМК (1:1) в присутствии наночастиц бора проводили аналогично исследованиям, описанных в п.2.2.3. При изучении структуры полученных сополимеров с наночастицами бора не было выявлено никаких отличий с продуктами, которые получали без добавления частиц бора.

амфифильные были Полученные ассоциаты исследованы в качестве инкапсулирующей полимерной матрицы для наночастиц бора. Предполагается, что частицы будут распределены в гидрофобном ядре, в то время как внешняя оболочка будет поддерживает гидратационный барьер, который защищает целостность каждого ассоциата. Для оценки эффективности инкапсуляции фракции бора 5-10 нм в матрицу ПЛ-ПМК оценили распределение наночастиц. Добавляли 5% масс. частиц бора в матрицу ПМК. Исследования проводили для порошковых систем, полученных после стадии очистки (см. п. 2.2.3.). Концентрация сополимеров ПЛ-ПМК (1:1): 1.0, 5.0, 10.0 мг, при этом теоретические концентрации бора составили: 24.5 мкг, 122.5 мкг, 245 мкг, соответственно. На рисунке 36 указаны загруженные концентрации наночастиц бора 5-15 нм в матрице, а также концентрации бора, определенные практическим путем, методом ЭС ДПТ.





Показано, что наночастицы бора эффективно инкапсулируются в матрицу сополимера ПЛ-ПМК, средний процент инкапсуляции составил: 63%.

3.3. Радиобиологические испытания полимерных композиций на основе наночастиц бора в условиях БНЗТ

Данный раздел диссертации посвящен описанию биологических и радиобиологических испытаний нативных наночастиц бора (¹⁰В), а также в составе полимерных матриц-стабилизаторов. Оценены токсичность частиц и исследуемых полимерных композиций, накопление in vitro, проведены эксперименты нейтронного облучения клеток с наночастицами бора, оценены эффекты БНЗТ. Определены токсичность и биораспределение in vivo.

3.3.1. In vitro исследования полимерных композиций на основе наночастиц бора

Препараты, которые разрабатываются для БНЗТ, должны избирательно доставлять бор в опухоли, не вызывая токсичности для нормальных клеток. Для оценки предварительной эффективности борсодержащего препарата для БНЗТ проводят тесты на цитотоксичность и тесты клеточного поглощения опухолевыми клетками. Чтобы подтвердить точность этих экспериментов, необходимо проводить сравнение с клиническим ВРА, терапевтическое поведение которого описано в многочисленных исследованиях. При самостоятельном исследовании ВРА важно оценивать сходимость полученных данных (в рамках одного эксперимента) с данными из предыдущих исследований. Для определения размера наночастиц бора, который не будет оказывать токсического действия, а также максимально накапливаться в клеточных линиях человека (не менее 90% от исходной загруженной концентрации наночастиц бора) вне зависимости от стабилизирующей системы, проведен эксперимент с нативными наночастицы бора. Размер частиц варьировали в диапазоне: 5-15 нм, 20-50 нм, 50-70 нм, концентрация: 50, 100, 250, 500, 1000 ppm.

Для определения токсичности наночастиц бора выбраны линии клеток: U251 MG – клетки глиомы человека, U87 – клетки глиомы человека, G361 – клетки меланомы человека, T98G – клетки глиобластомы человека, BJ-5ta – фибробласты человека. Предварительно клеточные линии культивировались в среде Iscove's DMEM (IMDM, SIGMA 17633 с L-глютамином и 25 mH HEPES буфером) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Scientific HyClone SV30160.03 HyClone UK Ltd.) при температуре 37⁰C в атмосфере с 5% CO₂. После 24 ч инкубации клеток с наночастицами бора, материал трехкратно промывался культуральной средой для отмывки от не поглощенного материала.

На рисунке 37 показаны данные токсичности наночастиц бора в зависимости от концентрации, в которой инкубировали клеточный материал. Интервал коэффициента пролиферации клеток при токсическом эффекте составляет: 0-0.5.



A.







C.

Рисунок 37 – Оценка цитотоксичности наночастиц бора: А. 5-15 нм; В. 20-50 нм; С. 50-70 нм.

Показано, что наночастицы бора в интервале размеров 5-15 нм, 20-50 нм, 50-70 нм не оказывают токсического действия: снижение жизнеспособности раковых клеточных линий не наблюдалось, для отдельных линий пролиферация возросла на 5-10%.

Эффективная БНЗТ и снижение радиотоксичности могут быть достигнуты за счет оптимизации методов введения препаратов бора. Значения концентрации бора в опухолях и здоровых тканях зависят от конкретного соединения бора (препарата). Исследования распределения бора являются ключом к созданию успешного протокола лечения БНЗТ для каждого потенциального агента доставки бора [36]. Важным компонентом исследования распределения является количественная оценка бора в препаратах, клетках, опухолях, тканях и органах.

Для определения накопленных концентраций наночастиц бора в зависимости от размера, применили метод ЭС ДПТ, который исключает проведение дополнительных стадий по растворению образцов в концентрированных кислотах. В таблице П.3 и 33 приведены данные по накоплению борных частиц раковыми клеточными линиями после 24 ч инкубации. Аналитические линии определения бора, нм: 249.678 и 249.773.

Таблица 33 – Процент накопления частиц бора в раковых клетках в зависимости от размера.

Тип линии	5-20 нм	20-50 нм	50-70 нм
U251 MG	91%	97%	81.22%
G361	95.2%	95.1%	75.2%
U87	89.3%	83.7%	73.3%
T98G	96.5%	85.7%	71.62

По данным таблицы 33, частицы с гидродинамическим диаметром менее 20 нм демонстрируют более высокую способность проникновения сквозь мембраны раковых клеток, по сравнению с частицами, размером более 50 нм. Средний процент накопления наночастиц бора в клетках составил 92%. Для дальнейших биологических экспериментов будет использована фракция частиц 5-15 нм.

Для оценки эффективности инкапсуляции фракции бора 5-15 нм в полимерные матрицы (гиалуроновая кислота, гидроксиэтилцеллюлоза) оценили распределение наночастиц в матрицах полимеров. На рисунках 38, 39 указаны загруженные концентрации наночастиц бора 5-10 нм (50, 100, 250, 500, 1000 ppm) в композиции, а также концентрации бора, определенные практическим путем, методом ЭС ДПТ, брали независимые пробы со всего объема исследуемого образца. Концентрации: 50, 100, 250, 500, 1000 ppm в растворе полимера (ГК, ГЭЦ). Такой эксперимент был проведен для подтверждения того, что частицы бора равномерно распределены в матрице полимера.



Рисунок 38 – Теоретическая и определенная концентрации наночастиц бора в композиции гиалуроновая кислота-наночастицы бора: серый – теоретическая, зеленый – определенная



Рисунок 39 – Теоретическая и определенная концентрации наночастиц бора в композиции гидроксиэтилцеллюлоза-наночастицы бора: голубой – теоретическая, синий –

определенная экспериментально.

На основании полученных данных сделан вывод о том, что наночастицы бора эффективно инкапсулируются в полимерные матрицы, а также сохраняют стабильность размерных характеристик не менее 20 дней. Средний процент инкапсуляции составил не менее 95% для композиций ГК-НЧ, ГЭЦ-НЧ.

В in vitro исследованиям полимерных композиций с наночастицами бора (5-15 нм) выбраны клеточные линии, аналогичные экспериментам с нативными наночастицами, которые активно используют в исследованиях по оценке токсичности борсодержащих препаратов и их ингибирующего эффекта в условиях БНЗТ: U251 MG, U87, G361, T98G, SJ-5ta [36].

Цитотоксичность коллоидных растворов полимерных композиций: ГК-НЧ, ГЭЦ-НЧ

определяли с помощью колориметрического теста Cell Titer 96 AQueous One Solution (Корпорация Promega, Мэдисон).

Данные представлены как доля выживших клеток, инкубированных с композициями, относительно клеток, инкубированных без препарата в зависимости от времени инкубации (рисунке 40 А-С). Интервал коэффициента пролиферации клеток при токсическом эффекте составляет: 0-0.5. В качестве образца сравнения использовали ВРА в таких же концентрациях. В качестве контроля использовали клетки, которые инкубировались в аналогичных условиях, но без содержания борных композиций.







B.



С.

Рисунок 40 – Оценка цитотоксичности композиций на основе бора: А. гиалуроновая кислота-наночастицы бора; В. гидроксиэтилцеллюлоза-наночастицы бора; С. ВРА.

По данным графиков, для каждой раковой клеточной линии человека композиции на основе наночастиц бора (5-15 нм, ¹⁰В – 80%) не проявляют токсичности в интервале концентраций от 50 до 1000 ppm, то есть не влияют на эффективность образования колоний и, соответственно, не приводят к снижению жизнеспособности клеток глиом, меланомы и глиобластомы человека. Определенные концентрации в несколько раз превышают требуемый терапевтический интервал концентрации изотопа бора-10 (30-40 ррт) для успешной реализации методики БНЗТ. Фактическая концентрация частиц бора/концентрация в пересчете на изотоп ¹⁰В для композиций с ГК и ГЭЦ: 50 ppm/40 ppm; 100 ppm/80 ppm; 250 ppm/200 ppm; 500 ppm/400 ppm; 1000 ppm/800 ppm. Жизнеспособность клеточных линий с клиническим препаратом ВРА, в диапазоне концентраций 50-1000 ррт, снижена до 40%.

Для определения накопления композиций частицы бора 5-15 нм/полимерная матрица, оценивали содержание бора в клеточном материале после 24 часов инкубации. В таблице 34 представлены данные по определению накопления бора в раковых клетках методом ЭС ДПТ, инкубированных с указанными композициями.

Таблица 34 – Оценка накопления наночастиц бора в составе стабилизирующей системы в раковых клеточных линиях человека.

Концентрация наночастиц бора в стабилизирующей		100	250	500	1000
системе, ppm					
Наночастицы бора-гиалуроновая кислота					
Клеточная линия: U251 MG					
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	46.5	87.04	240.89	485.65	979.4
Клеточная линия: Т98G					
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	44.03	81.56	245.0	490.74	986.4

Концентрация наночастиц бора в стабилизирующей	50	100	250	500	1000		
системе, ррт							
Клеточная линия	: U87						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	45.66	94.33	239.7	492.4	993.0		
Клеточная линия:	Клеточная линия: G361						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	49.5	98.7	248.98	496.01	997.3		
Клеточная линия:	SJ-5ta						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	49.7	97.3	249.1	492.0	998.1		
Наночастицы бора-гидрокс	иэтилце.	плюлоза					
Клеточная линия: T98G							
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	48.04	95.78	228.6	467.89	956.2		
Клеточная линия: U251 MG							
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	48.96	98.22	245.43	493.67	948.9		
Клеточная линия: U87							
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	41.06	86.4	241.78	493.2	960.1		
Клеточная линия: G361							
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	48.09	94.23	245.8	486.46	942.4		
Клеточная линия: SJ-5ta							
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ррт	43.5	82.7	215.6	403.0	863.1		

На основании полученных результатов, было составлено заключение о том, что композиции на основе наночастиц бора и гиалуроновой кислоты, наночастиц бора и гидроксиэтилцеллюлозы, не оказывают токсического действия на раковые клеточные линии T98G, G361, U87, U251 MG, а также фибробласты BJ-5ta, в диапазоне концентраций от 50 до 1000 ppm, а также накапливаются в клетках в достаточных количествах за 24 ч инкубации (85-90%). Поэтому для экспериментов по нейтронному облучению клеточных линий и дальнейших экспериментов in vivo использовали безопасные концентрации композиций с наночастицами бора (ГК-НЧ, ГЭЦ-НЧ): 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm. Для фибробластов BJ-5ta и клеток меланомы кожи G361 выражено высокое накопление частиц бора в составе композиции с ГК. Вероятно, такой эффект основан на том, что ГК является составным компонентом внеклеточного матрикса кожи. Поэтому такие композиции могут быть эффективны для доставки частиц бора в опухоли с подкожной локализацией, меланомы различного типа.

3.3.2. Радиобиологические исследования полимерных композиций на основе наночастиц бора

Нейтронное облучение клеточных линий, инкубированных в среде, содержащей композиций с НЧ бора (5-15 нм, ¹⁰В – 80%) при варьировании концентрации, а также контрольных клеток, проводили на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов (г. Новосибирск). Параметры облучения: ток протонного пучка – 1,8 мА, энергия – 2,0 МэВ, время облучения – 60 минут, флюенс нейтронов – 6,5×10¹¹ см⁻². После облучения через 14 дней оценивали колониеобразующую способность раковых клеточных линий с помощью



клоногенного анализа (рисунок 41). В качестве сравнение использовали комплекс ВРА с фруктозой (¹⁰В – 99%). В качестве контроля облучали интактные раковые клеточные линии.





B.



Рисунок 41 – Оценка выживаемости клеточных линий после нейтронного облучения по данным клоногенного анализа: А. ГК-НЧ; В. ГЭЦ-НЧ; С. ВРА.

По данным клоногенного теста установлено, что облучение нейтронами опухолевых клеточных линий, которые предварительно были инкубированы в среде с композициями, в составе которых наночастицы бора (5-15 нм), ведет к значительному подавлению их жизнеспособности, по сравнению с контрольными клетками, которые не содержали борсодержащий препарат [281]. Выживаемость клеток, которые облучали с ВРА составила более 20% после эксперимента при максимальных дозировках.

Оптимальные составы для экспериментов in vivo:

• ГК-НЧ бора: концентрация ГК: 0.3% масс., концентрация частиц бора: 1000 ppm (¹⁰B – 800 ppm);

• ГЭЦ-НЧ бора: концентрация ГЭЦ: 0.3% масс., концентрация частиц бора: 1000 ppm (¹⁰В – 800 ppm).

3.3.3. In vivo исследования полимерных композиций на основе бора

Для определения токсичности композиций на основе наночастиц бора и полимерных матриц in vivo (мыши CD-1) использовали следующие составы: ГК-НЧ – 1000 ppm: 1000 мкг НЧ бора на 1 мл 0.3% раствора ГК (масса ГК в 1.0 мл – 3.2258 мг (с учетом влажности)); ГЭЦ-НЧ – 1000 ppm: 1000 мкг НЧ бора на 1 мл 0.3% раствора ГЭЦ (масса ГЭЦ в 1.0 мл – 3.1948 мг (с учетом влажности)); ПЛ-ПМК-НЧ – 187 мкг бора в навеске 10.0 мг сополимера (к 10.0 мг навески сополимера добавили 1.0 мл воды, после перемешивания отобрали 50 мкл для перорального введения). Объекты исследования вводили в виде коллоидных

растворов, в дозах, которые представлены в таблице 35.

Композиция	Разрешенная дозировка,	Расчетная	На 20.0 г			
	мкл/г [282]	концентрация бора,	мыши, мкг			
		ΜΚΓ/Γ				
Тип введения: в/в						
ГК-НЧ бора	20	20	400			
ГЭЦ-НЧ бора						
Тип введения: в/бр						
ГК-НЧ бора	80	80	1600			
ГЭЦ-НЧ бора						
Тип введения: перорально						
ГК-НЧ бора	50	50	1000			
ГЭЦ-НЧ бора						
ПЛ-ПМК-НЧ		9.35	187			
бора*						

Таблица 35 – Расчетные дозы наночастиц бора.

* Согласно п. 3.2.2. инкапсуляция НЧ бора в матрицу ПЛ-ПМК, при концентрации сополимера 10 мг/мл составила: 187 ppm.

Изменение массы тела животных проводили согласно методике, описанной в п. 3.3.3 (рисунок 42).



A.



С.

Рисунок 42 – Динамика массы тела мышей CD-1 после введения композиций на основе наночастиц бора: А. композиция ГЭЦ-НЧ; В. ГК-НЧ; С. ПЛ-ПМК-НЧ.

В ходе эксперимента не было отмечено каких-либо признаков токсического действия исследуемых НЧ ни в день инъекции, ни в дальнейших наблюдениях. Масса тела животных не снижалась и не отличалась от контрольной группы. Некоторое увеличение массы тела во всех группах можно объяснить возрастными особенностями животных. Через неделю после введения инкапсулированных наночастиц бора в различных разведениях значительных отклонений в массе тела не обнаружено. У двух, которым вводили инкапсулированные наночастицы в ПЛ-ПМК, разведенные в концентрации 10.0 мг/мл, отмечена снижением массы тела на 5%. При вскрытии (некропсии) не наблюдалось морфологических изменений внутренних органов.

При внутривенном, внутрибрюшинном и пероральном введении ЛД50, 100 не установлены. Все животные остались живы в течение всего срока наблюдения. Наночастицы бора в составе стабилизирующих систем не приводят к гибели животных, что может указывать на их низкую токсичность в исследуемом диапазоне концентраций.

Комплекс экспериментов по определению накопления бора в тканях животных проводили на моделях животных с ксенотрансплантатом опухоли глиомы человека U87. Глиома человека – самая распространенная из всех глиальных опухолей, самая злокачественная и одна из самых радиорезистентных. Стандартным лечением глиом является сочетание хирургической резекции и адъювантной лучевой и химиотерапии. Однако, несмотря на достижения в современной терапии и комплексное многопрофильное лечение, медиана общей выживаемости составляет всего около 15 месяцев после постановки диагноза. Причинами резистентности глиомы к различным методам лечения являются неконтролируемая пролиферация клеток, нарушение регуляции апоптоза, выраженная опухолевая инвазия и ангиогенез. БНЗТ является многообещающим средством борьбы с этой резистентностью.

Для экспериментов in vivo (оценка биораспределения частиц) были установлены следующие параметры: тип введения – в/в, в/бр, перорально; композиции: НЧ бора в воде – 1000 ppm; ГК-НЧ – 1000 ppm (1000 мкг НЧ бора на 1 мл 0.3% раствора ГК (масса ГК в 1.0 мл – 3.0 мг)); ГЭЦ-НЧ – 1000 ppm (1000 мкг НЧ бора на 1 мл 0.3% раствора ГЭЦ (масса ГЭЦ в 1.0 мл – 3.0 мг)); ПЛ-ПМК-НЧ – 187 мкг в 10.0 мг сополимера (к 10.0 мг навески сополимера добавили 1.0 мл воды, после перемешивания отобрали 50 мкл для перорального введения); лабораторные животные: мыши CD-1, возраст 12 недель, с моделью ксенотрансплантата U87 (инокулировали в область бедра 100 мкл суспензии клеток опухоли U87), для каждой системы (варьировали способ введения, полимер, концентрацию частиц) использовали 3 особи (n=3), количество введенного бора описано в таблице 35. Эвтаназию с применением CO₂ осуществляли через 1 (n=3) и 2 (n=3) часа после введения мастицы композиций с наночастицами бора. У каждой мыши собрали образцы материала из печени, крови, головного мозга, опухоли, почек, селезенки. Содержание бора в тканях анализировали методом ЭС ДПТ (рисунок 43).



















D.

Рисунок 43 – Содержание бора в органах мышей через 1 и 2 ч после введения: А. композиция ГЭЦ-НЧ бора; В. композиция ГК-НЧ; С. композиция ПЛ-ПМК-НЧ; D. наночастицы бора (1 – опухоль (средний вес 0.8 г), 2 – кровь, 3 – головной мозг, 4 – селезенка, 5 – печень, 6 – почки).

При исследовании биораспределения наночастиц бора без полимерной оболочки показано, что наибольшее накопление выражено в печени и почках. По литературным данным, частицы неорганической природы, сферической формы и менее 20 нм, активно накапливаются в печени, почках, селезенке [283]. При использовании стабилизирующих полимерных матриц распределение бора меняется. На основании данных о накоплении частиц бора (5-15 нм) в модели in vivo, показано, что частицы достоверно накапливаются в пораженной области. При в/в, в/бр введении композиций ГЭЦ-НЧ в анализируемых дозах содержание бора во всех исследуемых органах было достоверно выше через 1 ч по сравнению с 2 ч, причем самые высокие значения наблюдались в тканях опухоли и крови. Для композиции ГК-НЧ содержание бора в органах возрастало к 2 часам циркуляции, высокое накопление наблюдалось в опухоли, печени. При сравнении перорального способа введения для трех композиций показано, что для всех трех композиций НЧ бора накапливаются в опухоли, однако, для ГК-НЧ и ПЛ-ПМК-НЧ накопление выше, чем для ГЭЦ-НЧ. Если оценивать в/в введение, то относительные соотношения опухоль/кровь в эксперименте с инкапсулированными частицами в ГК и ГЭЦ для временной точки 2 ч составляли довольно приемлемые значения, которые пригодны для методики БНЗТ: ГК-НЧ – 47.6/21.7 = 2.19; ГЭЦ-НЧ – 31/18 = 1.72. Стоит отметить, что при варьировании полимерной матрицы для инкапсуляции наночастиц бора, меняется и профиль накопления бора, что может быть связно с природой полимера. К примеру, композицию ГК-НЧ можно рассматривать как эффективный препарат для опухолей кожи или подкожной локализации; композицию ГЭЦ-НЧ, ПЛ-ПМК-НЧ – для опухолей, локализованных в органах пищеварительной системы. Более точные представления о механизмах накопления бора в зависимости от типа стабилизирующей полимерной матрицы будут изучены в дальнейших исследованиях, что может послужить расширению спектра злокачественных образований, к котором возможно будет применить БНЗТ. При этом, необходимо варьировать типы опухолей, типы лабораторных животных.

3.3.4. Ветеринарная практика применения полимерных композиций, содержащих наночастицы бора в нейтронной захватной терапии

Проведены клинические исследования БНЗТ с композицией ГК-НЧ (500 ppm) на ветеринарном животном (кошка, 10 лет, 4 кг) с злокачественным образованием в полости носа, с тяжелым соматическим статусом: на фоне новообразования было затруднено дыхание. Ранее животное не подвергалось химиотерапии.

Дозировка композиции: 2 мл/кг массы тела, что в пропорционально количеству бора: 1000 ppm/кг. Параметры облучения и условия дозирования указаны в п.

Контроль регресса опухоли проводили с помощью МРТ исследований. На рисунке 44 показаны снимки, снятые с периодичность в 3 месяца.







Рисунок 44 – Данные МРТ исследований носовой полости кошки: А. май 2023 г. (до облучения); В. август 2023 г. (после облучения).

По данным МРТ исследований, параметры опухоли в мае 2023 г. составили: 4.0x1.3x3.8 см; в августе: 3.0x1.4x3.6. Выражена значимая отрицательная динамика в росте опухоли, подтверждая ответ на лечение, проведенного в условиях БНЗТ. Было отмечено улучшения общей клинической картины животного, что прогнозируемо повлияет на качество и срок жизни. Не исключены и побочные реакции, которые выражены дерматитом, выпадение шерстяного покрова в местах облучения.

Предварительно полученная положительная динамика уменьшения роста опухоли является предпосылкой к дальнейшим исследованиям на животных с вариативными типами злокачественных образований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых и эффективных композиций для БНЗТ является актуальной задачей. В данной работе впервые были предложены, получены и апробированы биосовместимые полимерные композиции, наполненные наночастицами элементного бора, которые выполняют роль терапевтического препарата в БНЗТ. Для этого был разработан оптимальный алгоритм получения ультрадисперсных фракций сферических наночастиц элементного бора в диапазоне размеров: 5-15 нм; 20-50 нм; 50-70 нм с высокой производительностью (не менее 1.0 г/час), наличие примесей минимизировано. Так как наночастицы бора гидрофобные, их применение в инвазивной медицине затруднительно, поскольку нет закономерности в их биораспределении. В качестве биосовместимых стабилизирующих систем для наночастиц бора использовали водные растворы полисахаридов. Показано, что оптимальным способом стабилизации частиц является: предварительно редиспергированные в результате ультразвукового воздействия частицы в водной дисперсионной среде ввести в готовый водный раствор полимера, с концентрацией 0.3 % масс.

Также была предложена оригинальная синтетическая матрица для инкапсуляции наночастиц бора на основе биосовместимых и биодеградируемых полимеров: ПМК, ПЛ. Начальный этап синтеза такой полимерной терапевтической композиции заключался в инкапсуляции НЧ бора в матрицу ПМК в момент синтеза. Для синтеза ПМК был выбран метод твердотельной дополиконденсации, который зарекомендовал себя как промышленный, экологичный, высокэффективный. Изучены свойства ПМК на разных этапах синтеза, а также оценено влияние наполнителя на конечные свойства ПМК. С помощью метода ЭС ДПТ был определен процент инкапсуляции наночастиц бора: более 80%, что приемлемо для последующих стадий синтеза сополимера ПЛ.

Впервые показано, что при импульсном механохимическом взаимодействии на смеси є-ПЛ и ПМК аминогруппы є-ПЛ реагируют с карбоксильными группами ПМК по реакции аминолиза. На ИК-спектрах продуктов, полученных после импульсной механохимической обработки и стадии очистки наблюдаются характерные полосы поглощения как для L-ПМК, так и для є-ПЛ. Аналогичным образом при анализе спектра ЯМР продуктов идентифицируются пики, характерные как для L-ПМК, так и для є-ПЛ, тогда как образование привитого сополимера обусловлено наличием групп є-ПЛ в органической среде, что для него не характерно. Отмечено, что при массовом соотношении гомополимеров ПЛ:ПМК = 1:1 наблюдается наибольшее значение интенсивности сигналов протонов групп, характерных для є-ПЛ. Оценили кажущуюся молекулярную массу

сополимера. Полученные сополимеры обладают амфифильными свойствами и способны образовывать макромолекулярные ассоциаты в водных растворителях. Сополимеры самоорганизуются в коллоидные структуры в ацетатном буфере со средним гидродинамическим радиусом менее 15 нм.

Свойство полученных сополимеров ПЛ-ПМК самоорганизовываться в мицеллярные структуры типа «ядро-оболочка» открывает ряд интересных применений, а именно инкапсулирование гидрофобных лекарственных средств. В будущем эти материалы могут быть использованы в системах инкапсулирования и доставки гидрофобных фармацевтических субстанций. Твердофазная модификация полимеров, проводимая в отсутствие растворителей и разбавителей, улучшает экологические и экономические показатели процессов за счет снижения расхода реагентов и продолжительности от часов до минут.

Проведен комплекс экспериментов in vitro/in vivo для разработанных полимерных композиций с наночастицами бора. Показано, что такие композиции в широком диапазоне тестируемых концентраций не оказывают токсическое действие на исследуемые биологические системы. Определен процент накопления наночастиц бора, в зависимости от размера, концентрации, типа стабилизатора, типа клеточной линии: наночастицы проникают в клеточный материал не менее 85% от исходной загруженной концентрации.

Разработанные полимерные композиции на основе биосовместимых полимеров и наночастиц бора имеет ряд преимуществ, по сравнению с клиническим аналогом в БНЗТ: не вызывают токсического эффекта в тестировании in vitro/ in vivo, оказывают больший ингибирующий эффект после нейтронного облучения, технологическое решение для синтеза разработанных композиций превалирует над методиками синтеза борфенилаланина. Дальнейшие исследования разработанных прототипов позволят значительно повысить эффективность БНЗТ, как следствие, процент выживаемости и излечения онкобольных.

Стоит отметить, что для всех выбранных объектов исследования были выбраны доступные, воспроизводимые методы синтеза, такие как УЗ диспергирование, SSP, механоактивация. Данные методы экологичны и их можно реализовать в промышленных масштабах.

выводы

1. Разработаны новые полимерные композиции на основе полисахаридов (гиалуроновая кислота, гидроксиэтилцеллюлоза) и наночастиц элементного бора. Показана возможность получения ультрадисперсных фракций частиц бора менее 100 нм в условиях акустической кавитации в водной дисперсионной среде. С применением такого метода получения наночастиц бора количество примесей и посторонних включений минимизировано.

 Предложенный состав композиций обеспечивает ключевые характеристики такие как: коллоидную стабильность дисперсии частиц бора, отсутствие токсичности, биосовместимость, биодоступность, высокая эффективностью в условиях радиобиологических испытаний.

3. Продемонстрирована возможность инкапсуляции наночастиц бора в синтетическую полимерную матрицу на основе высокомолекулярной ПМК, которая была синтезирована бескаталитической твердотельной дополиконденсацией. Показано изменение свойств ПМК при добавлении наночастиц бора на начальных этапах синтеза.

4. Впервые показана возможность получения привитых сополимеров поли-L-молочной кислоты и ε-полилизина с применением без растворного импульсного механохимического подхода.

5. Проведено сравнение полимерных матриц относительно биораспределения, в которые были инкапсулированы наночастицы элементного бора. Показана высокая усваиваемость разработанных полимерных композиций на моделях in vitro/in vivo, что потенциально исключает использование больших терапевтических дозировок ¹⁰В, при этом повышается возможность снизить токсическую нагрузку на организм, в сравнении с существующими клиническим препаратом – ВРА. Применение разработанных композиций в условиях нейтронного облучения обеспечило снижение жизнеспособности тестируемых биологических систем на 70%.

6. Разработанные композиции имеют потенциал дальнейшего развития – возможность произвести модифицирование специфическими таргетными молекулами и повысить селективность к определенным типам опухолей. В свою очередь, предложенные в работе научно-технологические подходы будут способствовать расширению областей их применения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность коллективам лабораторий:

- Института ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН, лаборатория БНЗТ;
- Новосибирского государственного университета, лаборатория БНЗТ;
- Институт неорганической химии им. А. В. Николаева СО РАН, аналитическая лаборатория;
- Институт цитологии и генетики СО РАН, ЦКП SPF-виварий;
- Институт физики твердого тела РАН, лаборатория РФЭС;
- «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» лаборатория радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии
- Московский физико-технический институт, центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R.Barth. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer / R.Barth, P. Mi, W. Yang // Cancer Communications. – 2018. – T. 38. – C. 1-15.

2. Application of polymer in biomedical implication / M. Datta, K. Maraz, N. Rahman, R. Khan [et al.] // GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. – 2021. – T. 14. – №2. – C. 98-114.

3. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release / N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O. Farokhzad // Chemical Reviews. – 2016. – T. 116. – №4. – C. 2-63.

4. ASTM F1925-22 (FDA approved). Standard Specification for Semi-Crystalline Poly(lactide) Polymer and Copolymer Resins for Surgical Implants. – 2022. – T. 13.01. – №F04.11. – C. 9.

5. DNA vaccine incorporated poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) microspheres offer enhanced protection against Aeromonas hydrophila infection / E. Thirumalaikumar, S. Vimal, R. Sathishkumar [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. 2016. – T. 116. – N_{24} . – C. 2-63.

6. Key Factor Study for Generic Long-Acting PLGA Microspheres Based on a Reverse Engineering of Vivitrol / Ya. Hua, Z. Wang, D. Wang [et al] // Molecules. – 2021. – T. 26. – C. 1-18.

7. Polylysine and cysteine functionalized chitosan nanoparticle as an efficient platform for oral delivery of paclitaxel / X. Dua, S. Yina, L. Xua [et al.] // Carbohydrate Polymers. -2020. - T. 229. $- N_{2}2. - C. 54-84$.

8. Sonochemical preparation of folic acid-decorated reductive-responsive ϵ -poly-L-lysine-based microcapsules for targeted drug delivery and reductive-triggered release / C. Shi, S. Zhong, Y. Sun [et al.] // Materials Science & Engineering C. – 2020. – T. 106. – C. 1-7.

Mechanochemistry: A Green Approach in the Preparation of Pharmaceutical Cocrystals / M. Solares-Briones, G. Coyote-Dotor, J. Paez-Franco [et al.] // Pharmaceutics. – 2021. – T. 13. – №6. – C. 1-49.

 Mechanochemical Preparation of Active Pharmaceutical Ingredients Monitored by In Situ Raman Spectroscopy / I. Sovic, S. Lukin, E. Mestrovic [et al.] // ACS Omega. – 2020. – T. 5. №44.
 – C. 28663-28672.

11. Cancer statistics, 2023 / R. Siegel, K. Miller, N. Wagle, A. Jemal // A Cancer Journal for Clinicians. – 2023. – T. 73. №1. – C. 17-48.

12. A. Upadhyay. Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead / A. Upadhyay // Genes and Diseases. – 2021. – T. 8. №5. – C. 655-661.

13. G. Mitola. New Insight to Overcome Tumor Resistance: An Overview from Cellular to Clinical

Therapies / G. Mitola, P. Falvo, F. Bertolini // Life (Basel). – 2021. – T. 11. №11. – C. 1-10.

14. R. Barth. Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects / R. Barth, J. Coderre, G. Vicente, T. Blue // Clinical Cancer Research. – 2005. – T. 11. №11. – C. 1-17.

15. H Hatanaka. A revised boron-neutron capture therapy for malignant brain tumors. II. Interim clinical result with the patients excluding previous treatments / H Hatanaka // Journal of Neurology. – 1975. – T. 209. №2. – C. 81-94.

16. Clinical review of the Japanese experience with boron neutron capture therapy and a proposed strategy using epithermal neutron beams / Y. Nakagawa, K. Pooh, T. Kobayashi [et al.] // Journal of Neuro-Oncology. – 2003. – T. 62. – C. 87-99.

17. Modified boron neutron capture therapy for malignant gliomas performed using epithermal neutron and two boron compounds with different accumulation mechanisms: an efficacy study based on findings on neuroimages / S. Miyatake, S. Kawabata, Y. Kajimoto [et al.] // Journal of Neurosurgery. – 2005. – T. 103. – C. 1000-1009.

Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas / S.
 Miyatake, S. Kawabata, K. Yokoyama [et al.] // Journal of Neuro-Oncology. – 2009. – T. 91. – C.
 199-206.

19. Boron neutron capture therapy (BNCT) followed by intensity modulated chemoradiotherapy as primary treatment of large head and neck cancer with intracranial involvement / L. Kankaanranta, K. Saarilahti, A. Makitie [et al.] // Radiotherapy and Oncology. – 2011. – T. 99. – C. 98-99.

20. Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head-and-neck cancer: final analysis of a phase I/II trial / L. Kankaanranta, T. Seppala, H. Koivunoro [et al.] // International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. – 2012. – T. 82. – C. 67-75.

21. Boron neuron capture therapy using epithermal neutrons for recurrent cancer in the oral cavity and cervical lymph node metastasis / Y. Ariyoshi, S. Miyatake, Y. Kimura [et al.] // Oncology Reports. – 2007. – T. 18. – C. 861-866.

22. Boron neutron capture therapy for papillary cystadenocarcinoma in the upper lip: a case report / Y. Kimura, Y. Ariyoshi, S. Miyatake [et al.] // International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. – 2009. – T. 38. – C. 293-295.

23. Boron neutron capture therapy for recurrent oral cancer and metastasis of cervical lymph node
/ Y. Kimura, Y. Ariyoshi, M. Shimahara [et al.] Applied Radiation and Isotopes. – 2009. – T. 67.
- C. 47-49.

24. First clinical case of boron neutron capture therapy for head and neck malignancies using 18F-BPA PET / T. Aihara, J. Hiratsuka, N. Morita [et al.] // Head Neck. – 2006. – T. 28. – C. 850-855.

25. Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies / I. Kato, K. Ono, Y. Sakurai [et al.] // Applied Radiation and Isotopes. – 2004. – T. 61. – C. 1069-1073.

26. Effectiveness of boron neutron capture therapy for recurrent head and neck malignancies / I. Kato, Y. Fujita, A. Maruhashi [et al.] Applied Radiation and Isotopes. – 2009. – T. 67. – C. 37-42.
27. Treatment of malignant melanoma by single thermal neutron capture therapy with melanomaseeking 10B-compound / Y. Mishima, C. Honda, M. Ichihashi [et al] // Lancet. – 1989. – T. 2. – C. 388-389.

28. Y. Mishima. Selective thermal neutron capture therapy of cancer cells using their specific metabolic activities—melanoma as prototype / Y. Mishima // Cancer neutron capture therapy. New York: Plenum Press. – 1996. – C. 400.

29. Boron neutron capture therapy for malignant melanoma: first clinical case report in China / Z. Yong, Z. Song, Y. Zhou [et al.] // Chinese Journal of Cancer Research. – 2016. – T. 28. – C. 634-640.

30. J. Hiratsuka. Neutron capture therapy. Malignant melanoma. In: Sauerwein WAGEA / J. Hiratsuka. // Berlin: Springer-Verlag. – 2012. – C. 433.

31. Boron neutron capture therapy for vulvar melanoma and extramammary Paget's disease of the genital regions with curative clinical responses / J. Hiratsuka, N. Kamitani, R. Tanaka [et al.] // Chinese Journal of Cancer. -2018. - T. 38. - N 238. - C. 1-10.

32. Initiatives Toward Clinical Boron Neutron Capture Therapy in Japan / A. Matsumura, T. Asano, K. Hirose [et al.] // Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. – 2023. – T. 38. – №3. – C. 201-207.

33. A Review of Planned, Ongoing Clinical Studies and Recent Development of BNCT in Mainland of China / Z. Zhang, Y. Chong, Y. Liu [et al.] // Cancers. – 2023. – T. 15. – №16. – C. 40-60.

34. Интерфакс Россия. 23.09.2022 г. URL: https://www.interfaxrussia.ru/siberia/news/ustanovka-dlya-bor-neytronozahvatnoy-terapii-raka-v-centre-im-blohinazarabotaet-v-2025-godu-iyaf. (дата обращения: 10.09.2023 г.)

35. N. Kondo. Evaluation of 3-Borono-l-Phenylalanine as a Water-Soluble Boron Neutron Capture Therapy Agent / N. Kondo, F. Hirano, T. Temma // Pharmaceutics. – 2022. – T. 4. – №5. – C. 1-10.

36. W. Sauerwein. Neutron Capture Therapy. Principles and Applications. W. Sauerwein, A. Moss, Y. Nakagawa / Berlin: Springer-Verlag. – 2012. – C. 545.

37. К. В. Ткачев. Технология неорганических соединений бора / К. В. Ткачев, Ю. С. Плышевский // Л.: Химия. – 1983. – С. 208.

38. Therapeutic Efficacy of Boron Neutron Capture Therapy Mediated by Boron-Rich Liposomes

for Oral Cancer in the Hamster Cheek Pouch Model / E. Heber, M. Hawthorne, P. Kueffer [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-2014. - T. 111. - N_{2}45. - C. 77-81.$

39. Boron-lipiodol: a potential new drug for the treatment of liver tumors / W. Lin, C. Chi, Y. Ho [et al.] // Anticancer Research. – 2002. – T. 22. – №6С. – С. 89-92.

40. Boron-containing nucleosides as tools for boron-neutron capture therapy / D. O. Zharkov, A.
V. Yudkina, T. Riesebeck [et. al] // American Journal of Cancer Research. – 2021. – T. 11. – №10.
– C. 68-82.

41. Boron-rich, cytocompatible block copolymer nanoparticles by polymerization-induced self-assembly / L. Huang, D. Le, L. Hsiao [et al.] // Polymer Chemistry. – 2021. – T. 12. – C. 50-56.

42. 64Cu-Labeled Boron-Containing Cyclic RGD Peptides for BNCT and PET Imaging / S. Kim, S. Mushtaq, K. Chul [et al.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2024. – T. 15. – №3. – C. 344-348.

43. C. Perry. DNA condensation with a boron-containing cationic peptide for modeling boron neutron capture therapy / C. Perry, J. Ramos-Mendez, J. Milligan // Radiation Physics and Chemistry. -2020. - T. 166. - C. 1-9.

44. D. Imperio. Sweet Boron: Boron-Containing Sugar Derivatives as Potential Agents for Boron Neutron Capture Therapy / D. Imperio, L. Panza // Symmetry. – 2022. – T. 14. – №4. – C. 1-15.

45. In vitro and in vivo BNCT investigations using a carborane containing sulfonamide targeting CAIX epitopes on malignant pleural mesothelioma and breast cancer cells / D. Alberti, A. Michelotti, A. Lanfranco [et al] // Scientific Reports. -2020. - T. 10. - C. 1-13.

46. Transferrin-loaded nido-carborane liposomes: tumor-targeting boron delivery system for neutron capture therapy / Y. Miyajima, H. Nakamura, Y. Kuwata [et al.] // Bioconjugate Chemistry. $-2006. - T. 17. - N_{2}7. - C. 14-20.$

47. D. Tribovane. Non-natural lipids: Synthesis and characterization of esters from meta-carborane-1-carboxylic acid / D. Tribovane, M. Scholz // Chemistry and Physics of Lipids. – 2018.
– T. 210. – C. 149-154.

48. N. Chauhan. Boron-based polymers: opportunities and challenges / N. Chauhan, N. Hosmane,
M. Mozafari // Materials Today Chemistry. – 2019. – T. 14. – C. 1-20.

49. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Boron-Containing Macrocyclic Polyamines and Their Zinc(II) Complexes for Boron Neutron Capture Therapy / H. Ueda, M. Suzuki, R. Kuroda [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – T. 64. – №12. – C. 8523-8544.

50. A. Sinha. Synthesis and properties of boron porphyrinoids / A. Sinha, T. Chatterjee, M. Ravikanth // Coordination Chemistry Reviews. – 2022. – T. 465. – C. 1-11.

51. Structural and Biological Overview of Boron-containing Amino Acids in the Medicinal Chemistry Field / A. Garcia, A. Rayevsky, E. Jorge, J. Trujillo-Ferrara // Current Medicinal

Chemistry. – 2019. – T. 26. – №26. – C. 5077-5089.

52. N S. Hosmane. Boron Science. New Technologies and Applications / N S. Hosmane // USA: CRC Press. – 2012. – C. 856.

53. A. Hughes. Optimizing Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) to Treat Cancer: An Updated Review on the Latest Developments on Boron Compounds and Strategies / A. Hughes, N. Hu // Cancers. – 2023. – T. 15. – №15. – C. 1-30.

54. X. Cheng. Boron Neutron Capture Therapy: Clinical Application and Research Progress / X. Cheng, F. Li, L. Liang // Current Oncology. – 2022. – T. 20. – №10. – C. 7868-7886.

55. Успенский С.А. Наночастицы бора в химио- и радиотерапии: синтез, современное состояние и перспективы / Успенский С.А., Хаптаханова П.А. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2022. – №10. – С. 2533-2560.

56. Юматов В.Д. Рентгеновские спектры и электронное строение соединений бора / Юматов В.Д., Волков В.В. // Успехи химии. – 2003. – Т. 72. – №12. – С. 1141-1162.

57. Synthesis of Pure Boron Single-Wall Nanotubes / D. Ciuparu, R. Klie, Y. Zhu, L. Pfefferle // Physical Chemistry B. – 2004. – T. 108. – C. 3967-3969.

58. Crystalline Boron Nanoribbons: Synthesis and Characterization / T. Xu, J. Zheng, N. Wu [et al.] // Nano Letters. – 2004. – T. 4. – №5. – C. 963-968.

59. Preparation and characterization of amorphous boron powder with high activity / Z. Dou, T. Zhang, G. Shi [et al.] // Nonferrous Metals. – 2014. – T. 24. – C. 1446-1451.

60. Preparation of amorphous nano-boron powder with high activity by combustion synthesis / Z. Dou, T. Zhang, J. He, Y. Huang // Journal of Central South University. -2014. -T. 21. -C. 900-903.

61. A. Seifolazadeh. Synthesis and characterization of nanoboron powders prepared with mechanochemical reaction between B_2O_3 and Mg powders / A. Seifolazadeh, S. Mohammad // Bulletin of Materials Science. – 2016. – T. 39. – C. 479-486.

62. M. Semnan. Combustion synthesis of amorphous boron in a very-short-term magnesiothermic reduction / M. Semnan, M. Jalaly // Materials Research Express. – 2016. – T. 3. – C. 1-7.

63. Boron nanowires for flexible electronics / J. Tian, J. Cai, C. Hui [et al.] //Applied Physics Letters. – 2008. – T. 93. – C. 1-4.

64. Fabrication of Vertically Aligned Single-Crystalline Boron Nanowire Arrays and Investigation of Their Field-Emission Behavior / F. Liu, J. F. Tian, L. H. Bao [et al.] // Advanced Materials. – 2008. – T. 20. – C. 2609-2615.

65. Metal-like single crystalline boron nanotubes: synthesis and in situ study on electric transport and field emission properties / F. Liu, C. M. Shen, Z. J. Su [et al.] // Materials Chemistry. – 2010. – T. 20. – C. 2197-2205.

66. T. Niemyski. The preparation of pure boron for semiconductor investigations / T. Niemyski,
Z. Olempska // Less-Common Metals. – 1962. – T. 4. – №4. – C. 235-243.

67. Получение наночастиц элементного бора методом ультразвуковой обработки в водной среде и их применение в бор-нейтронозахватной терапии / С. А. Успенский, П. А. Хаптаханова, А. А. Заборонок // Доклады академии наук. – 2020. – Т. 491. – С. 20-24.

68. М. Г. Сиротюк. Ультразвуковая кавитация / М. Г. Сиротюк // Акустический журнал. –
1962. – Т. 8. – №3. – С. 255-272.

69. J. Taurozzi. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment--issues and recommendations / J. Taurozzi, V. Hackley, M. Wiesner // Nanotoxicology. $-2011. - T. 5. - N_{2}4. - C. 711-729.$

70. Yu. T. Didenko. The energy efficiency of formation of photons, radicals and ions during singlebubble cavitation / Yu. T. Didenko, K. S. Suslick // Letters to Nature. – 2002. – T. 418. – C. 394-397.

71. S. Ziembowic. Sonochemical Formation of Hydrogen Peroxide / S. Ziembowic, M. Kida, P. Koszelnik // Proceedings. – 2018. – T. 5. – №2. – C. 1-10.

72. Sonochemical fabrication of inorganic nanoparticles for applications in catalysis / Z. Li, T. Zhuang, J. Dong [et al.] // Ultrasonics Sonochemistry. – 2021. – T. 71. – C. 1-24.

73. Effect of ultrasonic frequency and power on the disruption of algal cells / K. Yamamoto, P. King, X. Wu [et al.] // Ultrasonics Sonochemistry. – 2015. – T. 24. – C. 165-171.

74. J. J. Hinman. Nanostructured materials synthesis using ultrasound / J. J. Hinman, K. S. Suslick // Topics in Current Chemistry. – 2017. – T. 375. – C. 1-12.

75. D.G. Shchukin. Ultrasonic fabrication of metallic nanomaterials and nanoalloys / D. G. Shchukin, D. Radziuk, H. Moehwald // - 2010. - T. 40. - C. 345-362.

76. J. H. Bang. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials / J. H. Bang,
K. S. Suslick // Advanced Materials. – 2010. – T. 22. – C. 1039-1059.

77. Experimental Investigation of Sludge Treatment Using a Rotor-Stator Type Hydrodynamic Cavitation Reactor and an Ultrasonic Bath / H. Kim, X. Sun, B. Koo, J. Yoon // Processes. – 2019.
- T. 7. – №11. – C. 1-14.

78. B. Zeiger. Sonofragmentation of Molecular Crystals / B. Zeiger, S. Suslick // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – T. 133. – №37. – C. 114530-14533.

79. Determination of the effect of the ultrasonic frequency on the cooling crystallization of paracetamol / J. Jordens, B. Gielen, L. Braeken, T. Van Gerven // Chemical Engineering and Processing. – 2014. – T. 84. – C. 38-44.

80. Particle breakage kinetics and mechanisms in attrition-enhanced deracemization / Ch. Xiouras, A. Fytopoulos, H. Ter [et al.] // Crystal Growth and Design. – 2018. – T. 18. – №5. – C. 3051-

3061.

81. E. Kelly. The breakage function; what is it really? / E. Kelly, D. Spottiswood // Minerals Engineering. $-1990. - T. 3. - N_{2}5. - C. 405-414.$

82. R. Vinay. Particle grinding by high-intensity ultrasound: Kinetic modeling and identification of breakage mechanisms / R. Vinay, A. Ali, Z. Wenting // AIChE Journal. – 2011. – T. 57. – №8. – C. 2025-2035.

83. V. Tiwari. Particle Breakage Using Wet Mill, Ultrasonic, and Hydrodynamic Cavitation / V. Tiwari, G. Walker, V. Ranade // Crystal Growth & Design. – 2023. – T. 23. – №12. – C. 8620-8636.

84. A. Muthupandian. The characterization of acoustic cavitation bubbles – An overview / A. Muthupandian // $-2011. - T. 18. - N_{2}4. - C. 864-872.$

85. Sonofragmentation: Effect of ultrasound frequency and power on particle breakage / J. Jordens,

T. Appermont, B. Gielen // Crystal Growth & Design. – 2016. – T. 16. – №11. – C. 6167-6177.

86. K. Paunovska. Drug delivery systems for RNA therapeutics / K. Paunovska, D. Loughrey, J. Dahlman // Nature Reviews Genetics. – 2022. – T. 23. – C. 265-280.

87. Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics / M. Cheng, G. Cuda,M. Gaspari [et al] // Current Opinion in Chemical Biology. – 2006.

88. Recent Trends in Nanotechnology-Based Drugs and Formulations for Targeted Therapeutic Delivery / H. Iqbala, A. Rodrigueza, R. Khandia [et al.] // Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery. – 2016. – T. 110. – C. 86-93.

89. A. Halwani. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market /
A. Halwani // Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. – №106. – C. 1-25.

90. S. Adepu. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions / S. Adepu,
S. Ramakrishna // Molecules. – 2021. – T. 26. – №19. – C. 1-45.

91. S. Sharma. Biomolecules for development of biosensors and their applications // S. Sharma,
N. Sehgal, A. Kumar // Current Applied Physics. – 2003. – T. 3. – C. 307-316.

92. Targeted drug delivery strategies for precision medicines / M. Manzari, Y. Shamay, H. Kiguchi [et al.] // Nature Reviews Materials. – 2021. – T. 6. – №4. – C. 351-370.

93. Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery / Z. Zhao, A. Ukidve, J. Kim, S. Mitragotri // Cell Journal. – 2020. – T. 181. – №1. – C. 151-167.

94. Organotrifluoroborate Sugar Conjugates for a Guided Boron Neutron Capture Therapy: From Synthesis to Positron Emission Tomography / L. Confalonieri, D. Imperio, A. Erhard [et al.] // ACS Omega. – 2022. – T. 7. – C. 40-48.

95. Novel Carboranyl C-Glycosides for the Treatment of Cancer by Boron Neutron Capture Therapy / L. Tietze, U. Griesbach, I. Schuberth [et al.] // Chemistry: A European Journal. – 2003.

- T. 9. - №6. - C. 1296-1302.

96. N. Hadler. Structure of Hyaluronic Acid in Synovial Fluid and Its Influence on the Movement of Solutes / N. Hadler, M. Napier // Seminars in Arthritis and Rheumatism. – 1997. – T. 7. – №2.
– C. 141-152.

97. J. Lee. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule / J. Lee, A. Spicer // Current Opinion in Cell Biology. – 2000. – T. 12. – C. 581-586.

98. J. Burdick. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications / J. Burdick, G. Prestwich
// Advanced Materials. – 2011. – T. 23. – C. 41-56.

99. Hyaluronic Acid in the Third Millennium / A. Fallacara, E. Baldini, S. Manfredini, S. Vertuani
// Polymers. – 2018. – T. 10. – №701. – C. 1-36.

100. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory / R. Gupta, R. Lall, A. Srivastava, A. Sinha // Frontiers in Veterinary Science. – 2019. – T. 6. – №193. – C. 1-24.

101. Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan / N. Volpi, J. Schiller,
R. Stern, R. Soltes // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – T. 16. – C. 1718-1745.

102. M. Dovedytis. Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review / M. Dovedytis, Z. Liu, S. Bartlett // Engineered Regeneration. – 2020. – T. 1. – C. 102-113.

103. Hyaluronic Acid: A Review of the Drug Delivery Capabilities of This Naturally Occurring Polysaccharide / C. Buckley, E. Murphy, T. Montgomery, I. Major // Polymers. -2022. - T. 14. - N17. - C. 1-25.

104. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues / M. Cowman, H. Lee, K. Schwertfeger [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2015. – T. 6. – №261. – C. 1-8.

105. Hyaluronic Acid as a Modern Approach in Anticancer Therapy-Review / M. Michalczyk, E. Humeniuk, G. Adamczuk, A. Korga-Plewko // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – T. 24. – №103. – C. 1-29.

106. A Trickster in Disguise: Hyaluronan's Ambivalent Roles in the Matrix / L. Bohaumilitzky, A. Huber, E. Maria Stork [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2017. – T. 7. – №242. – C. 1-19.

107. Dual-Stimuli Responsive Hyaluronic Acid-Conjugated Mesoporous Silica for Targeted Delivery to CD44-Overexpressing Cancer Cells / Q. Zhao, J. Liu, W. Zhu W. [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2015. – T. 23. – C. 147-156.

108. Expression of the Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility (RHAMM) in Endometrial Cancer Is Associated with Adverse Histologic Parameters and Tumor Progression / N. Schatz-Siemers, Y. Chen, Z. Chen [et al.] // Applied Immunohistochemistry Molecular Morphology. – 2020. – T. 28. – C. 453-458.

109. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications / C. Chen, S. Zhao, A. Karnad, J. Freeman // Journal of Hematology & Oncology. $-2018. - T. 11. - N_{2}64. - C.$

1-23.

110. W. Cheung. Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM), a Hyaladherin That Regulates Cell Responses to Growth Factors / W. Cheung, T. Cruz, E. Turley // Biochemical Society Transactions. – 1999. – T. 27. – №135. – C. 135-142.

111. The role of RHAMM in cancer: Exposing novel therapeutic vulnerabilities / J. Hinneh, J. Gillis, N. Moore [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2022. – T. 22. – C. 1-14.

112. Computational Study of Complex Formation between Hyaluronan Polymers and Polyarginine
Peptides at Various Ratios / N. Kulik, B. Minofar, A. Jug, M. Pekar // Langmuir. – 2023. – T. 39.
– №40. – C. 14212-14222.

113. Hyaluronic acid-based drug nanocarriers as a novel drug delivery system for cancer chemotherapy: A systematic review / N. Salari, K. Mansouri, E. Valipour [et al.] // Daru Journal of Pharmaceutical Sciences. -2021. - T. 29. - No2. - C. 439-447.

114. Multifunctional nanoparticle-mediated combining therapy for human diseases / X. Li, X.
Peng, M. Zoulikha [et al.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2024. – T. 9. – №1. – C. 1-33.

115. Receptor-Meditated Endocytosis by Hyaluronic Acid@Superparamagnetic Nanovetor for Targeting of CD44-Overexpressing Tumor Cells / K. Yu, M. Lin, H. Lee [et al.] // Nanomaterials $.-2016. - T. 6. - N_{2}149. - C. 1-15.$

116. Applications and delivery mechanisms of hyaluronic acid used for topical/transdermal delivery – A review / J. Zhu, X. Tang, Y. Jia [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2020. – T. 578. – C. 1-10.

117. Effects of the Molecular Weight of Hyaluronic Acid in a Carbon Nanotube Drug Delivery Conjugate / S. Arpicco, M, Bartkowski, A. Barge [et al.] // – 2020. – T. 8. – C. 1-12.

118. Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications / J. Casper,
S. Schenk, E. Parhizkar [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2023. – T. 362. – C. 667-691.

119. Poly-L-lysine/hyaluronan nanocarriers as a novel nanosystem for gene delivery / M. Souri,
M. Bagherzadeh, M. Mofazzal Jahrom [et al.] // Journal of Microscopy. – 2022. – T. 287. – №1.
– C. 32-44.

120. Ternary complexes with core-shell bilayer for double level targeted gene delivery: in vitro and in vivo evaluation / Y. Fan, J. Yao, R. Du [et al.] // Pharmaceutical Research. $-2013. - T. 30. - N_{2}5. - C. 1215-1227.$

121. Cisplatin-Cross-Linked and Oxygen-Resupply Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers for Chemo-photodynamic Therapy / X. Cheng, S. Shi, Y. Wu [et al.] // ACS Applied Nano Materials. $-2021. - T. 4. - N \ge 10. - C. 10194-10208.$

122. Hyaluronic acid-doxorubicin nanoparticles for targeted treatment of colorectal cancer / D.

Pan, V. Krishnan, A. Salinas [et al.] // Bioengineering & Translational Medicine. – 2021. – T. 6. – №1. – C. 1-14.

123. Hyaluronic acid anchored paclitaxel nanoparticles to solubilize for drug delivery / H. Zhou,
C. Liu, S. Yu [et al.] // European Polymer Journal. – 2023. – T. 201. – C. 1-10.

124. Hyaluronic Acid–Ceramide-based Liposomes for Targeted Gene Delivery to CD44-Positive Cancer Cells / S. Mallick, J. Park, H. Cho [et al.] // Bulletin of the Korean Chemical Society. – 2015. – T. 36. – №3. – C. 874-881.

125. 5-Fluorouracil-Loaded Hyaluronic Acid-Coated Niosomal Vesicles: Fabrication and Ex Vivo Evaluation for Skin Drug Delivery / W. Khalid, K. Shah, M. Saeed [et al.] // ACS Omega. – 2023.
- T. 8. – №48. – C. 405-413.

126. Hyaluronic Acid-Coated Camptothecin Nanocrystals for Targeted Drug Delivery to Enhance Anticancer Efficacy / J. Wang, N. Muhammad, T. Li [et al.] // Molecular Pharmaceutics. – 2020.
– T. 17. – №7. – C. 2411-2425.

127. Transferrin-mediated fullerenes nanoparticles as Fe²⁺ dependent drug vehicles for synergistic anti-tumor efficacy / H. Zhang, L. Hou, X. Jiao [et al.] // Biomaterials. – 2014. – C. 1-14.

128. Hyaluronic acid-based nanoplatforms for Doxorubicin: A review of stimuli-responsive carriers, co-delivery and resistance suppression / M. Ashrafizadeh, S. Mirzaei, M. Hossein [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2021. – T. 272. C. 1-21.

129. Hyaluronic acid modified mesoporous carbon nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells / L. Wan, J. Jiao, Y. Cui [et al.] // Nanotechnology. – 2016. – T. 27. – N13. – C. 1-12.

130. Hyaluronic acid/PEGylated amphiphilic nanoparticles for pursuit of selective intracellular doxorubicin release / X. Yan, Q. Chen, J. An [et al.] // Journal of Materials Chemistry B. – 2019. – T. 7. – N<u>1</u>. – C. 95-102.

131. N. Jabeen. Polysaccharides based biopolymers for biomedical applications: A review / N.
Jabeen, M. Atif // Polymers for Advanced Technologies. – 2023. – T. 35. – №1. – C. 1-23.

132. D. Ciolacu. Cellulose-Based Hydrogels as Sustained Drug-Delivery Systems / D. Ciolacu, R.
Nicu, F. Ciolacu // Materials. – 2020. – T. 13. – №22. – C. 1-37.

133. P. Mali. Cellulose nanocrystals: Fundamentals and biomedical applications / P. Mali, A. Sherje // Carbohydrate Polymers. – 2022. – T. 275. – C. 1-10.

134. G. Surendran. Cellulose nanofibers and composites: An insight into basics and biomedical applications / G. Surendran, A. Sherje // Journal of Drug Delivery Science and Technology. - 2022. - T. 75. - C. 1-8.

135. Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine / S. Swingle, A. Gupta, H. Gibson [et al.] // Polymers. – 2021. – T. 13. – №3. – C. 1-29.

136. X. Zheng. Remarkably regioselective deacylation of cellulose esters using tetraalkylammonium salts of the strongly basic hydroxide ion / X. Zheng, R. Gandour, K. Edgar // Carbohydrate Polymers. – 2014. – T. 111. – C. 25-32.

137. F. Marques-Marinho. Cellulose and Its Derivatives Use in the Pharmaceutical Compounding Practice / F. Marques-Marinho, C. Vianna-Soares // Intech Open. – 2013. – C. 316.

138. Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose / S. Rahman, S. Hasan, A. Sutradhar Nitai
[et al.] // Polymers. – 2021. – T. 13. – №18. – C. 1-48.

139. Hydroxyethylcellulose as a methotrexate carrier in anticancer therapy / J. Ciekot, M. Psurski,
K. Jurec, J. Boratyński // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – T. 1. – №194. – C. 1010-1018.

140. Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications / P. Nasatto, F. Pignon, J. Silveira [et al.] // Polymers. – 2015. – T. 7. – №5. – C. 777-803.

141. K. Wasilewska. Ethylcellulose-A Pharmaceutical Excipient with Multidirectional Application in Drug Dosage Forms Development / K. Wasilewska, K. Winnicka // Materials. – 2019. – T. 12. – №20. – C. 1-21.

142. M. Pastor. New insights into the use of hydroxypropyl cellulose for drug solubility enhancement: An analytical study of sub-molecular interactions with fenofibrate in solid state and aqueous solutions / M. Pastor, E. Stoyanov // Journal of Polymer Science. -2021. - C. 1-11.

143. Tunable drug release from blend poly(vinyl pyrrolidone)-ethyl cellulose nanofibers / V.
Godakanda, H. Li, L. Alquezar [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2019. – T. 562.
– C. 172-179.

144. H. Guo. Amylopectin as a subcoating material improves the acidic resistance of entericcoated pellets containing a freely soluble drug / H. Guo, J. Heinämäki, J. Yliruusi // International Journal of Pharmaceutics. – 2002. – T. 235. – №1-2. – C. 79-86.

145. K. Löbmann. Cellulose nanofibers as excipient for the delivery of poorly soluble drugs / K.
Löbmann, A. Svagan // International Journal of Pharmaceutics. – 2017. – T. 533. – №1. – C. 285-297.

146. R. James. Poly(lactic acid) for delivery of bioactive macromolecules / R. James, O. Manoukiana, S. Kumbar // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – T. 107. – C. 277-278.

147. A review on recent researches on polylactic acid/carbon nanotube composites / M. Kaseem,
K. Hamad, F. Deri, Y. Ko // Polymer Bulletin. – 2016. – C. 1-17.

148. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid / G. Li, M. Zhao, F. Xu // Molecules. – 2020. – T. 25. – C. 1-18.

149. A. Oluranti Ojo. Lactic Acid: A Comprehensive Review of Production to Purification / A.

Oluranti Ojo, O. Smidt // Processes. – 2023. – T. 11. – №3. – C. 1-20.

150. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation / D. Zhang, Z. Tang, H. Huang [et al.] // Nature. – 2019. – T. 574. – C. 575-580.

151. Lactate metabolism in human health and disease / X. Li, Y. Yang, B. Zhang [et al.] Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2022. – T. 574. – №305. – C. 575-580.

152. S. Faraha. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications – A comprehensive review / S. Faraha, D. Anderson, R. Langer // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – T. 107. – C. 367-392.

153. L. Lu. Poly(lactic acid), in Polymer Data Handbook / L. Lu, A. Mikos // New York: Oxford University Press. – 1999. – C. 633.

154. Poly(Lactic Acid)-Based Microparticles for Drug Delivery Applications: An Overview of Recent Advances / A. Vlachopoulos, G. Karlioti, E. Balla [et al] // Pharmaceutics. -2022. - T. 14. - N2. - C. 1-25.

155. Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering / G.
Narayanan, V. Vernekar, E. Kuyinu, C. Laurencin // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. –
T. 107. – C. 247-276.

156. W. Hadasha. Poly(lactic acid) as Biomaterial for Cardiovascular Devices and Tissue Engineering Applications / W. Hadasha, D. Bezuidenhout // Advances in Polymer Science. – 2017. – C. 1-27.

157. Current Uses of Poly(lactic-co-glycolic acid) in the Dental Field: A Comprehensive Review / M. Virlan, D. Miricescu, A. Totan [et al.] // Journal of Chemistry. – 2015. – T. 2015. – C. 1-12.

158. V. DeStefano. Applications of PLA in modern medicine / V. DeStefano, S. Khan, A. Tabada // Engineered Regeneration. – 2020. – T. 1. – C. 76-87.

159. M. Singhvi. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications / M. Singhvi, S. Zinjarde,
D. Gokhale // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – T. 127. – C.1612-1626.

160. B. Sheizaf. Unabsorbed Intraabdominal Polylactide Adhesion Barrier / B. Sheizaf, T. Tulandi // Journal of Minimally Invasive Gynecology. – 2011. – T. 11. – №1. – C. 10-11.

161. Use of light-weight foaming polylactic acid as a lung-equivalent material in 3D printed phantoms / S. Crowe, S. Maxwell, H. Brar [et al.] // Physical and Engineering Sciences in Medicine. – 2023. – T.46. – C. 1811-1817.

162. R. Mundel. Emerging uses of PLA–PEG copolymer in cancer drug delivery / R. Mundel, T. Thakur, M. Chatterjee // 3 Biotech. – 2022. – T. 12. – №2. – C. 1-41.

163. Ring opening polymerization of lactide: kinetics and modeling / S. Metkar, V. Sathe, I. Rahman [et al.] // Chemical Engineering Communications. – 2019. – T. 206. – №9. – C. 1159-1167.
164. J. Pretula. Polylactides-Methods of synthesis and characterization / J. Pretula, S. Slomkowski,
S. Penczek // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – T. 107. – C. 3-16.

165. Synthesis and Modeling of Poly(L-lactic acid) via Polycondensation of L-Lactic Acid / A.
Theodorou, V. Raptis, I. Baltzaki [et al.] // Polymers. – 2023. – T. 15. – № 23. – C. 1-15.

166. USP <232> / USP <233> and ICH Q3D. – 2016.

167. Heavy metals. Revision Bulletin 231. Official April 1, 2015.

168. I. Steinborn-Gogulska. Solid-state polycondensation (SSP) as a method to obtain high molecular weight polymers / I. Steinborn-Gogulska, G. Rokicki // Polimery. $-2013. - T. 58. - N_{\rm P}1. - C. 1-11.$

169. Solid-state modification of poly(butylene terephthalate): Design of process from calorimetric methods for catalyst investigation to reactive extrusion / C. Gerbehaye, K. Bernaerts, R. Mincheva, J. Raquez // European Polymer Journal. – 2022. – T. 166. – C. 1-11.

170. S. Vouyiouka. Solid state polymerization / S. Vouyiouka, E. Karakatsani, C. Papaspyrides // Progress in Polymer Science. – 2005. – T. 30. – C. 10-37.

171. Synthesis of High Molecular Weight Poly(L-lactic acid) via Melt/Solid State Polycondensation. II. Effect of Precrystallization on Solid State Polycondensation / B. Peng, H. Hou, F. Song, L. Wu // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2012. – T. 51. – №14. – C. 5190-5196.

172. Recent Advances in Solid-State Modification for Thermoplastic Polymers: A Comprehensive Review / J. Bravo, C. Gerbehaye, J. Raquez, R. Minchev // Molecules. – 2024. – T. 29. – № 3. – C. 1-26.

173. An equilibrium model for diffusion-limited solid-state polycondensation / M. Goodner, J. DeSimone, D. Kiserow, G. Roberts // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2000. – T. 39. – C. 2797-2806.

174. S. Jabarin. Solid state polymerization of poly(ethylene terephthalate): Kinetic and property parameters / S. Jabarin, E. Lofgren // Journal of Applied Polymer Science. – 1986. – T. 32. – C. 5315-5335.

175. R. Schiavone. Solid state polymerization (SSP) of low molecular weight poly(ethylene terephthalate) (PET) copolyesters compared to conventional SSP of PET / R. Schiavone // Journal of Applied Polymer Science. $-2002. - T. 86. - N_{\rm P}1. - C. 230-238.$

176. B. Duh. Effects of crystallinity on solid-state polymerization of poly(ethylene terephthalate)
/ B. Duh // Journal of Applied Polymer Science. - 2006. - T. 102. - C. 623-632.

177. C. Papaspyrides. Solid state polymerization / C. Papaspyrides, S. Vouyiouka // Wiley. – 2009.
– C. 315.

178. Crystallization and Melting Behavior of Poly (l-lactic Acid) / T. Kawai, N. Rahman, G.

Matsuba [et al.] // Macromolecules. – 2007. – T. 40. – №26. – C. 9463-9469.

179. B. Gantillon. The Solid State Postcondensation of PET / B. Gantillon, R. Spitz, T. McKenna
// Macromolecular Materials and Engineering. – 2024. – T. 289. – №1. – C. 106-112.

180. A. Halwani. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market
/ A. Halwani // Pharmaceutics. – 2022. – T.14. – № 1. – C. 1-21.

181. B. Lee. PLA Micro- and Nano-Particles / B. Lee, Y. Yun, K. Park // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – T.107. – C. 176-191.

182. Recent Advances in Nanoparticle Development for Drug Delivery: A Comprehensive Review of Polycaprolactone-Based Multi-Arm Architectures / R. Yousfi, M. Brahmi, M. Dalli [et al.] // Polymers. – 2023. – T. 15. – № 8. – C. 1-14.

183. V. Lassalle. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation / V. Lassalle, M. Ferreira // Macromolecular Bioscience. – 2007. – T. 7. – № 6. – C. 767-783.

184. Polypeptide-Based Systems: From Synthesis to Application in Drug Delivery / M. Stepanova,
A. Nikiforov, T. Tennikova, E. Korzhikova-Vlakh // Pharmaceutics. – 2023. – T. 15. – №11. – C.
26-41.

185. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking / E. Rideau, R. Dimova, P. Schwille [et al.] // Chemical Society Reviews. – 2018. – T. 47. – C. 8572-8610.

186. Recent Advances in Micro- and Nano-Drug Delivery Systems Based on Natural and Synthetic Biomaterials / H. Rashid, N. Aktar, S. Hossain [et al.] // Polymers. – 2023. – T. 15. – №23. – C. 1-40.

187. The Future of Drug Delivery / J. Gao, J. Karp, R. Langer, N. Joshi // Chemistry of Materials. – 2023. – T. 35. – №2. – C. 359-363.

188. K. Jain. An Overview of Drug Delivery Systems / K. Jain // Drug Delivery Systems. – 2019.
- T. 2059. - C. 1-54.

189. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions / T. Ezike, U. Okpala,
U. Onoja [et al.] // Heliyon. – 2023. – T. 9. – C. 1-17.

190. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects / J. Kumar Patra, G. Das, L. Fernandes Fraceto [et al.] // Journal of Nanobiotechnology. $-2018. - T. 16. - N_{2}71. - C. 1-33.$

191. C. Alvarez-Lorenzo. Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic / C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiroa // Chemical Communications. – 2014. – T. 50. – C. 743-7765.

192. Y. Sung. Recent advances in polymeric drug delivery systems / Y. Sung, S. Kim // Biomaterials Research. – 2020. – T. 24. – №12. – C. 1-12.

193. Polymers in Drug Delivery / A. Srivastava, T. Yadav, S. Sharma [et al.] //. - 2016. - T. 4. -

№1. – C. 1-16.

194. Polymeric Drug Delivery Systems Bearing Cholesterol Moieties: A Review / P. Misiak, K. Markiewicz, D. Szymczuk, A. Wilczewska // Polymers. – 2020. – T. 12. – №11. – C. 1-36.

195. Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing / [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2021. – T. 173. – C. 349-373.

196. Comprehensive study of the drug delivery properties of poly(llactide)-poly(ethylene glycol) nanoparticles in rats and tumorbearing mice / V. Shalgunov, D. Zaytseva-Zotova, A. Zinchenko [et al.] // Journal of Controlled Release. $-2017. - T. 261. - N_{\odot}9. - C. 31-42.$

197. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties / V. Pavot , N. Rochereau, Ch. Primard [et al.] // Journal of Controlled Release. -2013. - T. 167. - No1. - C. 60-67.

198. Co-delivery nanoparticle to overcome metastasis promoted by insufficient chemotherapy / Q.
Zhou, Y. Li, Y. Zhu [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2018. – T. 275. – №4. – C. 67-77.
199. Curcumin-bortezomib loaded polymeric nanoparticles for synergistic cancer therapy / S.
Medel, Z. Syrova, L. Kovacik [et al.] // European Polymer Journal. – 2017. – T. 93. – №8. – C.
116-131.

200. B. Raudszus. A new preparation strategy for surface modified PLA nanoparticles to enhance uptake by endothelial cells/ B. Raudszus, D. Mulac, K. Langer // International Journal of Pharmaceutics. $-2018. - T. 536. - N_{\rm P}1. - C. 211-221.$

201. A novel and simple preparative method for uniform-sized PLGA microspheres: Preliminary application in antitubercular drug delivery / Z. Liu, X. Li, B. Xiu [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. $-2016. - T. 145. - N_{\odot}9. - C. 679-687.$

202. Development of levofloxacin-loaded PLGA microspheres of suitable properties for sustained pulmonary release / M. Gaspar, A. Pais, J. Sousa [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2019. – T. 556. – №2. – C. 117-124.

203. Improving the Intracellular Drug Concentration in Lung Cancer Treatment through the Codelivery of Doxorubicin and miR-519c Mediated by Porous PLGA Microparticle / D. Wu, Ch. Wang, J. Yang [et al.] // Molecular Pharmaceutics. $-2016. - T. 13. - N \ge 11. - C. 3925-3933.$

204. Inhalable PLGA microspheres: Tunable lung retention and systemic exposure via polyethylene glycol modification / J. Li, H. Zheng, E. Xu [et al.] // Acta Biomaterialia. $-2021. - T. 123. - N_{2}3. - C. 325-334.$

205. Ibuprofen-loaded micelles based on star-shaped erythritol-core PLLA-PEG copolymer: effect of molecular weights of PEG / A. Ding, Y. Zhou, P. Chen, W. Nie [et al.] // Colloid and Polymer Science. – 2017. – T. 295. – C. 1609-1639.

206. Tumor-targeted paclitaxel-loaded folate conjugated poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide)

microparticles produced by supercritical fluid technology / X. Huang, Y. Zhang, G. Yin [et al.] // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2015. – T. 26. – №95. – C. 1-14.

207. Fabrication of hydrophilic paclitaxel-loaded PLA-PEG-PLA microparticles via SEDS process / P. Ouyang, Y. Kang, G. Yin [et al] // Frontiers of Materials Science in China. – 2009. – T. 3. – C. 15-24.

208. Development of a Respirable, Sustained Release Microcarrier for 5-Fluorouracil I: In Vitro Assessment of Liposomes, Microspheres, and Lipid Coated Nanoparticles / C. Hitzman, W. Elmquist, W. Wattenberg, T. Wiedmann // Journal of Pharmaceutical Sciences. $-2006. - T. 95. - N_{2}5. - C. 1114-1126.$

209. In vitro and in vivo studies of cyclosporin A-loaded microspheres based on copolymers of lactide and ε -caprolactone: Comparison with conventional PLGA microspheres / Y. Li, K. Zhu, J. Zhang [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2005. – T. 295. – No. – C. 67-76.

210. Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer / D. Zhu, W. Tao, H. Zhang [et al.] // Acta Biomaterialia. $-2016. - T. 30. - N_{\rm P}1. - C. 144-154.$

211. Enhanced Antitumor Activity of EGFP-EGF1-Conjugated Nanoparticles by a Multitargeting Strategy / B. Zhang, T. Jiang, L. Ling [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2016. – T. $8. - N_{2}14. - C. 8918-8927.$

212. Ferritin Decorated PLGA/Paclitaxel Loaded Nanoparticles Endowed with an Enhanced Toxicity Toward MCF-7 Breast Tumor Cells / L. Turino, M. Ruggiero, R. Stefania [et al.] // Bioconjugate Chemistry. – 2017. – T. 28. – №4. – C. 1283-1290.

213. Functionalized PLA-PEG nanoparticles targeting intestinal transporter PepT1 for oral delivery of acyclovir / B. Gourdon, C. Chemin, A. Moreau [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2017. – T. 529. – №2. – C. 357-370.

214. N. Cuia / Monoclonal antibody-tagged polyethylenimine (PEI)/poly(lactide) (PLA) nanoparticles for the enhanced delivery of doxorubicin in HER-positive breast cancers / Cuia, S. Zhu // RSC Advances. – 2016. – T. 6. – C. 79822-79829.

215. Acid-sensitive hybrid polymeric micelles containing a reversibly activatable cell-penetrating peptide for tumor-specific cytoplasm targeting / B. Tang, J. Zaro, Y. Shen [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2018. – T. 279. – C. 147-156.

216. Development of transferrin functionalized poly(ethylene glycol)/poly(lactic acid) amphiphilic block copolymeric micelles as a potential delivery system targeting brain glioma / W. Ren, J. Chang, Ch. Yan [et al.] // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2010. – T. 21. – C. 2673-2681.

217. A pH- and thermo-responsive poly(amino acid)-based drug delivery system / N. Liu, B. Li,

C. Gong [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2015. – T. 136. – C. 562-569.

218. ϵ -Polylysine and next-generation dendrigraft poly-L-lysine: Chemistry, activity, and applications in biopharmaceuticals / C. Shi, Y. He, X. Feng, D. Fu // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2015. – C. 1-32.

219. Poly(α -l-lysine)-based nanomaterials for versatile biomedical applications: Current advances and perspectives / M. Zheng, M. Pan, W. Zhang [et al.] // Bioactive Materials. – 2021. – T. 6. – $N_{2}7. - C. 1878-1909.$

220. A. Pandey. Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-L-lysine / A. Pandey, A. Kumar // Process Biochemistry. – 2013. – T. 49. – N_{23} . – C. 496-505.

221. T. Yoshida. ε-Poly-l-lysine: microbial production, biodegradation and application potential / T. Yoshida, T. Nagasawa // Applied Microbiology and Biotechnology – 2003. – T. 62. – C. 21-26.
222. Review on production and medical applications of ε-polylysine / S. Shukla, A. Singh, A. Kumar Pandey, A. Mishra // Biochemical Engineering Journal. – 2012. – T. 65. – C. 70-81.

223. Understanding the Effect of Secondary Structure on Molecular Interactions of Poly-L-Lysine with Different Substrates by SFA / M. Binazadeh, A. Faghihnejad, L. Unsworth, H. Zeng // Biomacromolecules. -2013. - T. 14. - N 10. - C 1-11.

224. Therapeutic in situ autovaccination against solid cancers with intratumoral poly-ICLC: case report, hypothesis, and clinical trial / A. Salazar, R. Erlich, A. Mark [et al.] // Cancer Immunology Research. $-2014. - T. 2. - N_{2}8. - C. 720-724.$

225. Polylysine complexes and their biomedical applications / H. Zhu, R. Liu, Y. Shang, L. Sun // Engineered Regeneration. $-2023. - T. 4. - N \ge 1. - C. 20-27.$

226. Epsilon-poly-L-lysine: Recent Advances in Biomanufacturing and Applications / L. Wang,
C. Zhang, J. Zhang [et al.] // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – T. 9. – C.
1-17.

227. H. Ryser. Conjugation of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells / H. Ryser, W. Shen // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-1978. - T. 75. - N_{2}8. - C. 3867-3870.$

228. Polyethylene glycol-grafted poly-l-lysine as polymeric gene carrier / Y. Choi, F. Liu, J. Kim [et al.] // Journal of Controlled Release. $-1998. - T. 54. - N_{2}1. - C. 39-48.$

229. Preparation of poly-1-lysine-based nanoparticles with pH-sensitive release of curcumin for targeted imaging and therapy of liver cancer in vitro and in vivo / D. Yang, H. Kim, K. Park [et al.] // Drug Delivery. $-2018. - T. 25. - N_{2}1. - C. 950-960.$

230. Tumor accumulation of ε -poly-lysines-based polyamines conjugated with boron clusters / M. Umano, K. Uechi, T. Uriuda [et al.] // Applied Radiation and Isotopes. – 2011. – T. 69. – №12. –

C. 1765-1767.

231. Systemic antiangiogenic activity of cationic poly-L-lysine dendrimer delays tumor growth / K. Al-Jamal, W. Al-Jamal, S. Akerman [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-2010. - T. 107. - N_{2}9. - C. 3966-3971.$

232. pH-Sensitive Polymeric Vesicles from Coassembly of Amphiphilic Cholate Grafted Poly(1lysine) and Acid-Cleavable Polymer–Drug Conjugate / L. Zhu, L. Zhao, X. Qu, Z. Yang // Langmuir. – 2012. – T. 28. – №33. – C. 88-96.

233. Development of polypeptide-based zwitterionic amphiphilic micelles for nanodrug delivery / G. Ma, W. Lin, Z. Wang [et al.] // Journal of Materials Chemistry B. – 2016. – T. 4. – C. 56-64. 234. Folate-conjugated and pH-responsive polymeric micelles for target-cell-specific anticancer drug delivery / J Guan, Z. Zhou, M. Chen [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2017. – T. 15. – C. 244-255.

235. Dehydroascorbic Acids-modified Polymer Micelles Target Cancer Cells to Enhance Antitumor Efficacy of Paclitaxel / X. Pei, F. Luo, J. Zhang [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – T. 7. – №975. – C. 1-11.

236. N. Avinash Patil. Functionalized Polylysine Biomaterials for Advanced Medical Applications: A Review / N. Avinash Patil, B. Kandasubramanian // European Polymer Journal. – 2021. – T. 146. – C. 1-24.

237. C. Weidenthaler. In Situ Analytical Methods for the Characterization of Mechanochemical Reactions / C. Weidenthaler // Crystals. -2022. - T. 12. - NO3. - C. 1-16.

238. P. Julien. The effect of milling frequency on a mechanochemical organic reaction monitored by in situ Raman spectroscopy / P. Julien, I. Malvestiti, T. Friscic // Beilstein Journal of Organic Chemistry. – 2017. – T. 13. – C. 2160-2168.

239. Hallmarks of Mechanochemistry: From Nanoparticles to Technology / P. Balaz, M. Achimovicova, M. Balaz [et al.] // Chemical Society Reviews. – 2013. – T. 42. – C. 7571-7637.

240. Tribochemistry, Mechanical Alloying, Mechanochemistry: What is in a Name? / A. Michalchuk, E. Boldyreva, A. Belenguer [et al.] // Frontiers in Chemistry. – 2021. – T. 9. – C. 1-29.

241. Ю.Г. Широков. Механохимия. Теоретические основы / Ю.Г. Широков // Иваново. – 2015. – С. 1-214.

242. В.В. Болдырев. Механохимические явления при сверхтонком измельчении / В.В. Болдырев, В.И. Молчанов, Е. Г. Аввакумов // Новосибирск. – 1971. – С. 1-176.

243. Mechanical Milling: A Superior Nanotechnological Tool for Fabrication of Nanocrystalline and Nanocomposite Materials / M. El-Eskandarany, A. Al-Hazza, L. Al-Hajji [et al.] // Nanomaterials. – 2021. – T. 11. – №2484. – C. 1-35.

244. D. Ozer. Advances in Green Synthesis. Mechanochemistry: A Power Tool for Green Synthesis / D. Ozer // New-York: Springer. – 2021. – C. 23-39.

245. Mechanochemistry: A force in disguise and condition effects / S. Mateti, M. Mathesh, Z. Liu [et al.] // Chemical Communications journal. – 2021. – T. 57. – C. 1080-1092.

246. Mechanochemical treatment of vermiculite in vibration milling and its effect on lead (II) adsorption ability / T. Hongo, S. Yoshino, A. Yamazaki [et al.] // Applied Clay Science. – 2021. – T. 70. – C. 74-78.

247. H. Ashrafizadeh. Influence of processing parameters on grinding mechanism in planetary mill by employing discrete element method / H. Ashrafizadeh, M. Ashrafizadeh // Advanced Powder Technology. $-2011. - T. 23. - N_{\odot}6. - C. 708-716.$

248. Effects of rotational direction and rotation-to-revolution speed ratio in planetary ball milling / H. Mio, J. Kano, F. Saito, K. Kaneko // Materials Science and Engineering A. – 2002. – T. 332. – N2. – C. 75-80.

249. C. Tangsathitkulchai. Effects of slurry concentration and powder filling on the net mill power of a laboratory ball mill / C. Tangsathitkulchai // Powder Technology. -2003. - T. 137. - N 3. - C.131-138.

250. P. Balaz. Mechanochemistry in Nanoscience and Minerals Engineering / P. Balaz // New-York: Springer. – 2008. – C. 421.

251. R. O'Neill. The many flavours of mechanochemistry and its plausible conceptual underpinnings / R. O'Neill, R. Boulatov // Nature Reviews Chemistry. – 2021. – T. 5. – C. 148-167.

252. P. Balaz. Fine milling in applied mechanochemistry / P. Balaz, E. Dutkova // Minerals Engineering. – 2009. – T. 22. – C. 681-694.

253. J. Ravnsbaek. Mechanochemical Synthesis of Poly(phenylene vinylenes) / J. Ravnsbaek, T. Swager // ACS Macro Letters. – 2014. – T. 3. – №4. – C. 305-309.

254. L. Anderson. Polymer Mechanochemistry: A New Frontier for Physical Organic Chemistry /
L. Anderson, R. Boulatov // Advances in Physical Organic Chemistry. – 2018. – C. 1-57.

255. The mechanochemical synthesis of polymers / A. Krusenbaum, S. Gratz, G. Tamiru Tigineh [et al.] // Chemical Society Reviews. – 2022. – T. 51. – №7. – C. 2873-2905.

256. Synthesis of high molecular weight chitosan from chitin by mechanochemistry and aging / T. Nardo, C. Hadad, A. Nguyen Van Nhien, A. Moores // Green Chemistry. $-2019. - T. 21. - N_{2}12. - C. 1-11.$

257. Л. Беллами. Инфракрасные спектры молекул / Л. Беллами // Москва: Издательство иностранной литературы. – 1957. – С. 445.

258. Y. Zhao. Fast Calculation of van der Waals Volume as a Sum of Atomic and Bond

Contributions and Its Application to Drug Compounds / Y. Zhao, M. Abraham, A. Zissimos // JThe Journal of Organic Chemistry. – 2003. – T. 68. – №19. – C. 7368-7373.

259. Effect of stereochemistry on nanoscale assembly of ABA triblock copolymers with crystallizable blocks / X. Yin, D. Hewitt, B. Zheng [et al.] // Polymer. – 2021. – Т. 223. – С. 1-8. 260. ГОСТ ISO 10993.5-99, ч. 5. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование на цитотоксичность: методы in vitro: дата введения 01.01.2002.

261. W. Sauerwein. Neutron Capture Therapy. Principles and Applications/ W. Sauerwein, A. Raymond Moss, Y. Nakagawa // Springer. – 2012. – C. 545.

262. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики: дата введения 01.08.2015.

263. ГОСТ 32296-2013. Методы испытании по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы: дата введения 01.08.2014.

264. Приказ министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрава России) от 1 апреля 2016 г. № 199н г. Москва «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». – С. 9.

265. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. ФГБУ «НЦЭСМП». – 2012.

266. Патент 2720458. Российская Федерация. Способ получения композиции для борнейтронозахватной терапии злокачественных опухолей (варианты). Опубликован 10.12. 2020 г. Успенский С.А., Хаптаханова П.А., Заборонок А.А. и др. – С. 10.

267. Boron contamination and its risk management in terrestrial and aquatic environmental settings / S. Bolan, H. Wijesekara, D. Amarasiri [et al.] // Science of The Total Environment. – 2023. – T. 894. – C. 1-21.

268. E. A. Il'inchik. X-ray photoelectron spectroscopy of boron compounds / E. A. Il'inchik, V.
V. Volkov, L. N. Mazalov // Journal of Structural Chemistry. – 2005. – T. 46. – №3. – C. 523-534.

269. The study of hyaluronic acid compounds for neutron capture and photon activation therapies / S. N. Koryakin, V. A. Yadrovskaya, E. E. Beketov [et al.] // Central European Journal of Biology. – 2014. – T. 9. – C. 922-930.

270. Synthesis and use of hyaluronic acid-10B polymeric chelates for neutron capture therapy / S.N. Koryakin, P.L. Ivanov [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2013. – T. 47. – №6. – C. 299-302.

271. Effect of borax additives on the rheological properties of sodium hyaluronate aqueous

solutions / SA Dubrovskii, AN Zelenetskii, SA Uspenskii, VN Khabarov // Polymer Science Series A. – 2014. – T. 56. – C. 205-210.

272. Optimizing Colloidal Stability and Transport of Polysaccharide-Coated Magnetic Nanoparticles for Reservoir Management: Effects of Ion Specificity / R. Shi, H. Ow, J. R. Cox [et al.] // Frontiers in Nanotechnology. – 2022. – C. 1-11.

273. Effects of the Combined Utilization of Ultrasonic/Hydrogen Peroxide on Excess Sludge Destruction / D. Yuan, X. Zhou, W. Jin [et al.] // Water. – 2021. – T. 13. – №3. – C. 1-13.

274. D. Soares. Bridging a Century-Old Problem: The Pathophysiology and Molecular Mechanisms of HA Filler-Induced Vascular Occlusion (FIVO) – Implications for Therapeutic Interventions / D. Soares // Molecules. – 2022. – T. 27. – N17. – C. 1-38.

275. Biodegradable Tri-Block Copolymer Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine)(PLA-PEG-PLL) as a Non-Viral Vector to Enhance Gene Transfection / Ch. Fu, X. Sun, D. Liu, [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2011. – T. 12. – C. 1371-1388.

276. F. Marquet. Comparison of triblock copolymeric micelles based on α - and ϵ -poly(L-lysine): a Cornelian choice / F. Marquet, V. Patrulea, G. Borchard // Polymer. – 2022. – T. 54. – C. 199-209.

277. Copolymerization and Degradation of Poly(1actic acid-co-lysine) / D. Barrer, E. Zylstra, P. Lansbury, R. Langer // Macromolecules. – 1998. – T. 28. – C. 425-432.

278. Synthesis and characterization of biodegradable polylactides and polylactide-block-poly(Z-lysine) copolymers / Y. Peng, Y. Huang, H. Chuang [et al.] // Polymer. – 2010. – T. 51. – C. 4329-4335.

279. Mechanochemistry: A Green Approach in the Preparation of Pharmaceutical Cocrystals / M. Solares-Briones, G. Coyote-Dotor [et al.] // Pharmaceutics. $-2021. - T. 13, -N_{2}6. - C. 1-49.$

280. Polymerisation-Induced Self-Assembly of Graft Copolymers / S. Häkkinen, J. Tanaka, R. Maset [et al.] // Angewandte Chemie International Edition. – 2022. – T. 61. – C. 1-8.

281. Polymer-Stabilized Elemental Boron Nanoparticles for Boron Neutron Capture Therapy:
Initial Irradiation Experiments / A. Zaboronok, P. Khaptakhanova, S. Uspenskii // Pharmaceutics.
2022. – T. 14, – №761. – C. 1-18.

282. Существующие требования и подходы к дозированию лекарственных средств лабораторным животным / А. В. Рыбакова, М. Н. Макарова, А. Е. Кухаренко [и др.] // Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2018. – Т. 8. – №4. – С. 207-217.

283. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats / S. Balasubramanian, J. Jittiwat, J. Manikandan [et al.] // Biomaterials. -2010. - T. 31. - N = 8. - C. 2034-2042.

приложение

Таблица П.1. Разработки препаратов для БНЗТ [30-33].

Название	Свойства	Современное состояние/текущий			
Препараты I поколения					
Борная кислота.	• Низкая токсичность (указать):	Завершены in vivo исследования			
обогащенная ¹⁰ В	• нет специфического биораспределения.				
,	Препараты II поколения				
Боркаптат натрия	• Токсичен: указать;	Апробация в I/II фазах клинических			
(BSH)	 нет специфического биораспределения; 	исследований на опухолях: глиома,			
	• низкий градиент накопления в опухоли;	опухоли головы и шеи. Одобрен			
	• водорастворимый.	FDA, не используется в клинической			
P 1		практике.			
Борфенилаланин	• Частично растворим в воде: мг/мл;	Апробация іп vivo на опухолях:			
(BPA)	• назкии градиент накопления в опухоли;	меланома, Плиосаркома 9L.			
	опухоли: отток из нитозоля из-за его				
	антипортового механизма:				
	• низкая токсичность.				
Комплекс:	• Растворим в воде;	Апробация в IV фазе клинических			
борфенилаланин/	• низкий градиент накопления в опухоли;	исследований на глиомах. Одобрен			
фруктоза	• не равномерное распределение в объеме	FDA, используется в клинической			
	опухоли.	практике.			
	Класс: борсодержащие природные амин	юкислоты			
1-амино-3-бор-	• низкая токсичность;	In vivo исследования прекращены:			
циклогептан	• не равномерное распределение в объеме	необходимо многократно проводить			
карооновои	опухоли.	БИЗТ — ДЛИТЕЛЬНАЯ ДОЗИРОВКА пренарата миогократное общинение			
кислоты		препарата, многократное облучение			
		в комплексе			
	Препараты III поколения				
Класс: конъюгат	ы ВРА с пептидными лигандами к экспрессиров	анным рецепторам на поверхности			
	раковых клеток				
BSH+лиганд к	• Избирательное накопление в опухоли за	In vivo исследования прекращены:			
рецептору фактора	счет наличия таргетивных лигандов.	необходимо многократно проводить			
роста эндотелия		БНЗТ – длительная дозировка			
сосудов (VEGFR)		препарата, многократное облучение			
		по причине низкого содержание оора			
Борсолержащий 3-	• Избирательное накопление в опухоли (N5-	In vivo исследования на опуходях			
карбонильный	20H):	головного мозга (RG2) у крыс.			
тимидиновый	• высокая скорость фосфорилирования;				
аналог	• низкая токсичность;				
	• высокое соотношение опухоль:кровь – для				
	одного типа опухоли (RG2), не специфична				
	для других типов опухолей.				
Борсодержащие про	изводные порфирина (порфирины, хлорины, бак	териохлорины, тетрабензопорфирины,			
фталоцианины)	11	TT · ·			
H_2DCP	• Низкая токсичность;	Исследования іп vivo			
ди[3,3-	• специфичны к макрофагам,				
(нидокарооран-	чнизкое содержание в раковой опухоли.				
нил]порфирин					
p \p	Борсодержащие сахара				
дендритный	• Низкая токсичность;	In vitro исследования			
гликоборан:	• низкое поглощение опухолью из-за				
-	гидрофильности и выведения из тканей				
	организма;				
	• диндримерная структура обеспечивает				

	рецептор мультивалентного лиганда; • использование галактозы в качестве нацеливающего средства фрагмент увеличивает растворимость карборанового каркаса в воде.			
Высокомолекулярные агенты доставки бора				
Моноклональные	• Высокая специфичность к молекулярным	In vivo исследования не		
антитела MoAbs	мишеням на поверхности раковых клеток –	возобновляются		
C225-G5-B1000	EGFR EGFRvIII EGF VEGF;			
	• Высокое соотношение опухоль:кровь – для			
	одного типа опухоли (F98EGFR глиома), не			
	специфична для других типов опухолей			
BSH-ПЭГ-	• Высокое содержание В10 в опухоли	In vivo исследования в процессе.		
полиглутаминовая	(карцинома С26): 70-90 мкг В10 на грамм			
кислота	опухоли после однократного внутривенное			
	введение в дозе 50 мг/кг;			
	• Соотношение опухоль:кровь = 20:1;			
	• Высокое накопление в не целевых органах.			
Поливиниловый	• Интернализируется в раковые клетки	In vivo исследования		
спирт-ВРА	посредством LAT1-опосредованного			
-	эндоцитоза;			
	• замедленный отток из опухоли;			
	• быстрое выведение из кровотока и не			
	целевых органов.			
NanoPBA	• эффективное нацеливания на	In vivo исследования, расширения		
фенилбороновая	гиперсиалированные раковые клетки;	спектра опухолей – тестирование		
кислота,	• сильный таргетный эффект,			
полимолочная	предположительно за счет мультивалентного			
кислота и	связывания с мембраной раковых клеток;			
поли(этиленглико	• мощный противоопухолевый эффект.			
ль)				

Таблица П.2. Наноматериалы, синтезируемые с помощью ультразвукового

0
воздеиствия.

Тип наночастиц	Наноматериал	Размер, нм
Металлические	AuNCs	1.8
наночастицы	Au-AgNCs	2.4
	Pd	Менее 100
	Си и СиО	50-70
	Pd в атмосфере Ar	3.6±0.7
	Рd в атмосфере N ₂	2.0±0.3
	Pd	Менее 10
	Ru	10-20
	Fe	3
	Au	40
	Se	40.0±7
Сульфиды металлов	CdS	10-20
	Гексагональный CdS	40
Биметаллические	Композит Au и Pd	8
наночастицы/сплавы	Со ₂₀ Ni ₈₀ и Со ₅₀ Ni ₅₀	10
металлов/композиты	Fe и Co	Менее 100
металлов	Сплав Fe/Co	40
	Pt-Ru	5-10
Оксиды металлов	Fe_3O_4 -SiO ₂	4-8
	SnO_2	3-5
	Fe ₂ O ₃	100-200
	TiO ₂	Менее 10
	MnO ₂	10
	ZnO	39

Полимерные	ПЛГА	30-300
наночастицы	Поливинилкарбазол	5-7
	Хитозан	200-300
	Полистирол	300
	Сополимер	100-300
	метилметакрилата и 2-	
	гидроксиэтилметакрилата	
Неметаллические	Углеродные нанотрубки	200
наночастицы	SiO ₂	100
	Se	150

Таблица П. 3. Оценка накопления нативных наночастиц бора в раковых клеточных линиях человека.

Концентрация наночастиц бора для инкубации с		100	250	500	1000	
клетками, ppm						
Клеточная линия: U251 MG						
Размер частиц 5-15 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	45.5	96.78	185.45	487.24	945.3	
Размер частиц 20-50 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	42.24	91.7	188.22	481.0	923.2	
Размер частиц 50-	70 нм					
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	38.2	85.56	160.1	482.78	915.3	
Клеточная линия	: G361					
Размер частиц 5-15 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	45.29	94.34	192.2	499.7	987.5	
Размер частиц 20-50 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	46.9	99.85	185.08	482.3	927	
Размер частиц 50-70 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	35.2	73.05	158.2	436.64	891.3	
Клеточная линия: U87						
Размер частиц 5-1	5 нм					
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	45.22	96.65	189.23	475.87	929.9	
Размер частиц 20-50 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	41.4	88.5	182.12	465.57	915.8	
Размер частиц 50-70 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	36.2	72.89	150.1	442.05	894.6	
Клеточная линия:	T98G					
Размер частиш 5-15 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	49.5	97.08	194.35	486.76	987.3	
Размер частиц 20-50 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	46.89	83.5	175.8	462.81	980.5	
Размер частиц 50-70 нм						
Определенная концентрация бора в ЭС ДПТ, ppm	40.07	76.28	122.2	439.45	901.3	