

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ



На правах рукописи

Иванова Татьяна Александровна

**Закономерности высвобождения низкомолекулярных веществ
из матриц на основе полилактида,
установленные методом спинового зонда**

1.4.4. Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:
д.х.н., доцент Е.Н. Голубева
к.х.н. Е.М. Зубанова

Москва – 2025

Оглавление

Введение	4
1. Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Полимеры медицинского назначения и области их применения.....	11
1.1.1. Алифатические полиэфиры	12
1.1.2. Термочувствительные полимеры. Поли-N-изопропилакриламид и его сополимеры	13
1.2. Модификация полимеров биологически активными соединениями (БАС)	15
1.3. Сверхкритические флюидные технологии для формирования полимерных конструкций, импрегнированных БАС	18
1.4. Методы характеристики полимерных систем, в том числе допированных БАС	21
1.4.1. Оптические методы: турбидиметрия и динамическое рассеяние света	21
1.4.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).....	23
1.4.3. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)	25
1.4.4. Другие методы	31
1.5. Деградация полимерных матриц и высвобождение из них БАС	31
1.5.1. Деградация полимерных матриц	31
1.5.2. Высвобождение БАС из полимерных конструкций	34
2.2. Химические превращения нитроксильных радикалов	47
2.3. Заключение	51
3. Глава 2. Экспериментальная часть	53
3.1. Вещества и материалы	53
3.2. Приготовление образцов	56
3.2.1. Импрегнация PDLA парамагнитными молекулами в сверхкритическом диоксиде углерода.....	56
3.2.2. Приготовление растворов термочувствительных графт-сополимеров на основе N-изопропилакриламида и олиголактида (P(NIPAM- <i>g</i> -PLA))	58
3.3. Спектроскопия ЭПР	59
3.3.1. Регистрация спектров.....	59
3.3.2. Математическая обработка и моделирование спектров ЭПР	60
3.4. Установление стабильности графт-сополимера P(NIPAM- <i>g</i> -PLA) в водных растворах	66

3.5. Кинетика высвобождения парамагнитных молекул из полимерных структур в жидкую среду.....	67
3.5.1. Кинетика процессов с участием парамагнитных молекул при выдерживании матриц из PDLA в водных растворах.....	67
3.5.2. Кинетика высвобождения TEMPO из глобул PNIPAM и P(NIPAM- <i>g</i> -PLA) в PBS	69
4. Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	70
4.1. Полимерные матрицы из PDLA, допированные нитроксильными зондами: методы формирования и кинетические закономерности высвобождения допантов	70
4.1.1. Пористые скаффолды на основе PDLA	71
4.1.2. Пленки PDLA	79
4.2. Термочувствительные графт-сополимеры P(NIPAM- <i>g</i> -PLA) как материалы для создания систем доставки лекарств.....	98
4.2.1. Стабильность графт-сополимера P(NIPAM- <i>g</i> -PLA) в водных растворах	98
4.2.2. Импрегнация графт-сополимера P(NIPAM- <i>g</i> -PLA) нитроксильным зондом в среде scCO_2	99
4.2.3. Спектроскопия ЭПР спиновое зонда TEMPO в водных растворах графт-сополимеров P(NIPAM- <i>g</i> -PLA) разного состава	101
4.2.4. Кинетические закономерности высвобождения TEMPO из глобул PNIPAM и P(NIPAM- <i>g</i> -PLA) в водный раствор.....	113
5. Заключение	118
6. Список сокращений и обозначений	120
7. Список литературы	122
8. Приложение	143
Приложение 1.....	143
Приложение 2.....	143

Введение

Актуальность работы. Одним из активно развивающихся направлений биомедицины является создание систем доставки лекарств (СДЛ), представляющих собой полимерную матрицу или оболочку, внутрь которой введено биологически активное соединение (БАС), скоростью высвобождения которого можно управлять. В случае широко используемых в качестве матриц для СДЛ полилактидов (PLA) и полилактогликолидов, процессы набухания и гидролиза в совокупности с диффузией БАС по образующимся в полимерной матрице порам определяют профиль высвобождения допантов из матрицы. Предложено немало моделей высвобождения БАС из алифатических полиэфиров, однако они применимы только к узкому кругу систем и обладают низкой предсказательной способностью.

Кроме того, в качестве матриц для СДЛ используют стимул-чувствительные, в том числе термочувствительные полимеры, что открывает дополнительные возможности регулирования кинетики высвобождения БАС. Высвобождение БАС из подобных матриц может происходить не только путем фиковской диффузии из полимерной матрицы или геля, но и за счет выброса допанта в окружающую среду при коллапсе полимерных цепей при температурах выше нижней критической температуры растворения (НКТР). В этом случае процессами высвобождения БАС можно управлять, изменяя НКТР путем варьирования состава полимера, в том числе введения гидрофобных фрагментов, например, олиголактидов. На наш взгляд, возможности применения и исследования стимул-чувствительных полимеров далеко не исчерпаны как в области новых подходов к получению СДЛ на их основе, так и для установления закономерностей, связывающих структуру полимерных матриц и физико-химические свойства БАС с особенностями кинетических профилей их высвобождения.

Применение сверхкритического диоксида углерода (scCO_2) для формирования пористых полимерных матриц с одновременной импрегнацией БАС является экологичным и перспективным подходом, который позволяет изменять характеристики получаемых полимерных матриц за счет варьирования параметров сверхкритического флюидного (СКФ) процесса. Использование в качестве моделей БАС нитроксильных спиновых зондов позволяет характеризовать получаемые матрицы и происходящие с ними изменения при помощи спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Цель работы: установление кинетических закономерностей и механизма высвобождения нитроксильных радикалов как моделей низкомолекулярных биологически активных соединений из биodeградируемых и термочувствительных матриц на основе полилактида.

В соответствии с данной целью сформулированы следующие **задачи**:

1. Определение оптимальных параметров вспенивания и импрегнации нитроксильными спиновыми зондами поли-D,L-лактида (PDLLA) в среде scCO_2 с целью создания матриц для СДЛ, характеризующихся системой взаимосвязанных пор и равномерным распределением частиц допанта по матрице.
2. Установление взаимосвязи структуры матриц на основе PDLLA и природы нитроксильных спиновых зондов с кинетикой и механизмом высвобождения из них низкомолекулярных веществ.
3. Установление закономерностей коллапса полимерных цепей в водных растворах графт-сополимеров на основе N-изопропилакриламида и олиголактида P(NIPAM-*g*-PLA) с разным содержанием олиголактидных фрагментов.
4. Установление кинетических закономерностей высвобождения зонда ТЕМПО из глобул поли-N-изопропилакриламида (PNIPAM) и P(NIPAM-*g*-PLA).

Объекты исследования – пористые матриксы и пленки из PDLLA (PDL02 ($M_n = 11.8$ кДа) и PDL04 ($M_n = 14.8$ кДа), содержащие нитроксильные радикалы (4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксид (TEMPO), 4-оксо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксид (TEMPONE), 5,5-диметил-4-(диметиламино)-2-этил-2-пиридин-4-ил-2,5-дигидро-1H-имидазол-1-оксил (DPI), 2,2,5,5-тетраметил-4-фенил-3-имидазолин-1-оксил-3-оксид (R5)), спин-меченый дигидрокверцетин (sl-DHQ) и спин-меченый диклофенак (sl-DCF)), а также растворы и глобулы термочувствительных полимеров PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA), содержащие (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (TEMPO).

Предмет исследования – строение пористых матриксов на основе PDLLA, кинетические профили набухания пленок PDLLA, кинетические закономерности высвобождения зондов и спин-меченых лекарств из пористых матриксов и пленок из PDLLA *in vitro*, температурные зависимости процессов глобулообразования в растворах термочувствительных сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA), кинетические закономерности высвобождения ТЕМПО из глобул PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA).

Методология и методы исследования. Пористые матриксы из PDLLA были получены путем вспенивания с одновременной импрегнацией нитроксильными радикалами и спин-мечеными лекарствами в среде scCO_2 . Определение параметров микроструктуры и микродинамики полимерных матриц на основе PDLLA была выполнено при помощи спектроскопии ЭПР в рамках методики спинового зонда. Для моделирования спектров ЭПР применяли пакет MATLAB с надстройкой инструментов Easyspin (v. 5.2.28). На основании анализа спектров ЭПР оценивали равномерность распределения нитроксильных спиновых

зондов в матрице PDLLA. Спектроскопия ЭПР в рамках методики спинового зонда была использована и для количественных оценок содержания парамагнитных форм в различных фазах систем «вода-полимер»; с этой целью была проведена оценка ошибок при количественном измерении содержания нитроксильных радикалов в полимерных матрицах. Метод ЭПР был также применен для установления закономерностей глобулообразования в растворах термочувствительных сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA), кинетических закономерностей высвобождения ТЕМПО из глобул PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA). Для характеристики полимерных матриц были также использованы сканирующая электронная микроскопия и оптическая микроскопия.

Научная новизна работы. Усовершенствована методика получения пористых матриц из PDLLA с одновременной импрегнацией их спиновыми зондами в среде скCO₂ путем определения параметров СКФ процесса (температура, давление, время выдерживания в скCO₂ и время сброса давления), позволяющих получать матрицы, удовлетворяющие заданным критериям однородности, пористости, взаимосвязанности пор, равномерности распределения допанта по матрице. Впервые показано, что высвобождение из пористого матрикса PDL04 контролируется фиковской диффузией зонда в заполненных жидкостью порах.

С использованием pH-чувствительного зонда DPI было подтверждено образование пор в пленках PDL02, заполненных водным раствором, pH в которых был менее двух на всех этапах набухания и деградации полимера. Установлены количественные закономерности высвобождения зондов TEMPONE и DPI из пленок PDL02 и PDL04. Подтвержден и дополнен предложенный ранее механизм высвобождения из пленок PDLLA низкомолекулярных веществ [1], позволяющий описывать профили высвобождения разного вида. Полученные данные можно использовать для предсказания закономерностей высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ в зависимости от толщины пленок, размера молекул и их заряда.

Обнаружено, что в полуразбавленных водных растворах термочувствительных сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) коллапс полимерных цепей происходит в широком температурном диапазоне (около 20-35 °C), а кроме того, образовавшиеся статические неоднородности выше 40 °C переходят в динамические. В работе предложен метод получения СДЛ из термочувствительных полимеров, основанный на захвате БАС полимерными глобулами при температурах выше НКТР. Установлено, что высвобождение спинового зонда ТЕМПО из глобул PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) протекает по механизму фиковской диффузии.

Теоретическая и практическая значимость. Разработана методика формирования в среде скCO₂ пористых матриц из PDLLA, содержащих низкомолекулярные БАС (нитроксильные радикалы) и применимых в качестве временных протезов. Установленные в работе кинетические профили и механизм высвобождения нитроксильных спиновых зондов и

спин-меченых лекарственных соединений могут быть применены с целью прогнозирования кинетических профилей высвобождения БАС различной природы из пористых скаффолдов и пленок PDLA разной толщины.

Показано, что коллапс полимерных цепей в растворах термочувствительных полимеров P(NIPAM-*g*-PLA) происходит в широком температурном интервале (около 20-35 °C), что может быть использовано для расширения области применения полимеров в качестве материалов для формирования СДЛ. Установлено, что при температурах выше 40 °C статические неоднородности переходят в динамические, а основным механизмом высвобождения зонда ТЕМПО из глобул является механизм фиковской диффузии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Основным процессом, определяющим кинетику и механизм высвобождения спинного зонда ТЕМПОНЕ из пористого матрикса PDL04, полученного в среде scCO_2 , в водный раствор, является фиковская диффузия зонда в порах, сформированных в ходе СКФ процесса.
2. Профили высвобождения низкомолекулярных веществ из пленок PDLA в водную среду могут быть описаны в рамках одной модели и определяются соотношением скоростей диффузии и гидролиза полимерных цепей, зависящим от толщины пленок, молекулярной массы полимера, строения молекулы допанта.
3. Процесс коллапса полимерных цепей в водных растворах сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) происходит в широком диапазоне температур (около 20-35 °C), при этом выше 40 °C образовавшиеся статические неоднородности переходят в динамические.
4. Высвобождение ТЕМПО из глобул термочувствительных полимеров PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA), сформированных в результате коллапса полимерных цепей, при температурах выше НКТР протекает по механизму фиковской диффузии.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов и выводов обеспечивается использованием современных высокочувствительных приборов и физико-химических методов (спектроскопия ЭПР, оптическая микроскопия, СЭМ), современных методов моделирования спектров, критическим анализом полученных результатов и сравнением их с литературными данными, широкой апробацией материалов диссертации на научных конференциях, совещаниях и семинарах и наличием ряда публикаций в высокорейтинговых журналах.

Апробация результатов. Основные материалы работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на конференциях: Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017», «Ломоносов-2018» (Москва, 2017 – 2018 гг., устные доклады); XXXIV-XXXVI Всероссийских симпозиумах молодых ученых по

химической кинетике (пос. Поведники, Московская область, 2016, 2018, 2019 г., устные доклады); IX, XI, XIII Всероссийских школах-конференциях молодых учёных «Сверхкритические флюидные технологии в решении экологических проблем» (Барнаул, 2018 г.; Архангельск (онлайн формат), 2020 г.; Архангельск, 2022 г.; устные доклады) IX-XII Научно-практических конференциях с международным участием «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» (Сочи, 2017 г.; Ростов-на-Дону, 2019 г.; Новосибирск, 2021 г.; Тверь, 2023 г., устные доклады); XXXIII Симпозиуме «Современная химическая физика» (Туапсе, 2021 г., стендовый доклад); Зезинской школе-конференции для молодых ученых «Химия и физика полимеров» (Москва, 2021 г., стендовый доклад); VIII Международной конференции «Атмосфера, ионосфера, безопасность» (Калининград, 2021 г., устный доклад); Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2023 г., устный доклад); Девятой всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2024» (Москва, 2024 г., стендовый доклад).

Публикации

Основное содержание работы в полной мере изложено в 10 публикациях, в том числе в 10 статьях (объемом 9.17 п.л.) в рецензируемых научных изданиях Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4 Физическая химия:

1. Chumakova N.A., **Ivanova T.A.**, Golubeva E.N., Kokorin A.I. To the precision of measuring concentrations of nitroxide radicals in polymers by EPR technique // Applied Magnetic Resonance. – 2018. – Vol. 49 – P. 511–522. 0.63 п.л. DOI: 10.1007/s00723-018-0992-3 Вклад автора 20%. (JIF WoS 1.1)
2. Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., **Иванова Т.А.**, Воробьева Н.Н., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н. ЭПР диагностика пористых матриц на основе D,L-полилактида, сформированных в среде сверхкритического CO₂ // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2018. – Т. 13, №1. – С. 86-93. 0.67 п.л. Вклад автора 30%. (ИФ РИНЦ 0.340). Chumakova N.A., Golubeva E.N., **Ivanova T.A.**, Vorobieva N.N., Timashev P.S., Bagratashvili V.N. EPR diagnostics of D,L-polylactide porous matrices formed in supercritical CO₂ // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2018. – Vol. 12, № 8. – P. 1255–1260. 0.59 п.л. DOI: 10.1134/S1990793118080031 Вклад автора 30%. (JIF WoS 1.4).
3. **Иванова Т.А.**, Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., Лунин В.В. Кинетика высвобождения нитроксильного радикала TEMPONE из D,L-полилактида, вспененного в среде сверхкритического диоксида углерода // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2019. – Т. 14, №1. – С. 67–70. 0.27 п.л. Вклад автора 50%. (ИФ РИНЦ 0.340)

- Ivanova T.A.**, Chumakova N.A., Golubeva E.N., Lunin V.V. Kinetics of release of the TEMPONE nitroxyl radical from poly-D,L-lactide foamed in the supercritical carbon dioxide medium // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2019. – Vol. 13, №7. – P. 1211–1213. 0.23 п.л. DOI: 10.1134/S199079311907025X Вклад автора 50%. (JIF WoS 1.4).
4. Chumakova N.A., Golubeva E.N., Kuzin S.V., **Ivanova T.A.**, Grigoriev I.A., Kostjuk S.V., Melnikov M.Y. New insight into the mechanism of drug release from poly(D,L-lactide) film by electron paramagnetic resonance // Polymers. – 2020. – Vol. 12, № 12. – P. 3046–3067. 1.53 п.л. DOI: 10.3390/polym12123046 Вклад автора 30%. (JIF WoS 4.7).
 5. **Иванова Т.А.**, Зубанова Е.М., Попова А.А., Громов О.И., Голубева Е.Н., Ксендзов Е.А., Костюк С.В., Тимашев П.С. Диффузия радикала TEMPONE в графт-сополимере N-изопропилакриламида с олиголактидом в присутствии сверхкритического диоксида углерода методом ЭПР in situ // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2021. – Т. 16, №3. – С. 33–41. 0.60 п.л. Вклад автора 30%. (ИФ РИНЦ 0.340)
- Ivanova T.A.**, Zubanova E.M., Popova A.A., Gromov O.I., Golubeva E.N., Ksendzov E.A., Kostyuk S.V., Timashev P.S. The diffusion of TEMPONE radical in the graft copolymer of N-isopropylacrylamide with oligolactide in the presence of supercritical carbon dioxide by in situ EPR method // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2022. – Vol. 16, № 7. – P. 1208–1212. 0.58 п.л. DOI: 10.1134/S1990793122070089 Вклад автора 30%. (JIF WoS 1.4).
6. Zubanova E.M., **Ivanova T.A.**, Ksendzov E.A., Kostyuk S.V., Timashev P.S., Melnikov M.Y., Golubeva E.N. Structure and dynamics of inhomogeneities in aqueous solutions of graft copolymers of N-isopropylacrylamide with lactide (P(NIPAM-graft-PLA)) by spin probe EPR spectroscopy // Polymers. – 2022. – Vol. 14, № 21. – P. 4746–4763. 1.15 п.л. DOI: 10.3390/polym14214746 Вклад автора 60%. (JIF WoS 4.7).
 7. **Иванова Т.А.**, Голубева Е.Н. Алифатические полиэфиры для биомедицинских целей: дизайн и кинетические закономерности деградации in vitro // Химическая физика. 2022. – Т. 41, №6. – С. 34–54. 2.02 п.л. Вклад автора 70%. (ИФ РИНЦ 0.316)
- Ivanova T.A.**, Golubeva E.N. Aliphatic polyesters for biomedical purposes: Design and kinetic regularities of degradation in vitro // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2022. – Vol. 16, № 3. – P. 426–444. 2.02 п.л. DOI: 10.1134/S1990793122030162 Вклад автора 70%. (JIF WoS 1.4).
8. **Ivanova T.A.**, Melnikov M.Y., Timashev P.S., Golubeva E.N. pH-sensitive paramagnetic probe 4-(methyamino)-2-ethyl-5,5-dimethyl-4-pyridine-2-yl-2,5-dihydro-1h-imidazol-1-oxyl for controlling microacidity inside poly-D,L-lactide films during degradation in vitro // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2023. – Vol. 17, № 2. – P. 471–477. 0.52 п.л. DOI: 10.1134/S1990793123020276 Вклад автора 60%. (JIF WoS 1.4).

9. **Ivanova T.A.**, Zubanova E.M., Timashev P.S., Golubeva E.N. EPR study of controlled drug release from PNIPAM and P(NIPAM-g-PLA) globules // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2024. – Vol. 18, № 3. – P. 780–787. 0.65 п.л. DOI: 10.1134/S1990793124700180 Вклад автора 60%. (JIF WoS 1.4)
10. Kuzin S.V., **Ivanova T.A.**, Timashev P.S., Golubeva E.N. Mechanism based on formation, closure and overgrowth of pores describing zero-order release from polylactide films // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2024. – Vol. 79, № 6. – P. 442–451. 1.13 п.л. DOI: 10.3103/S0027131424700469 Вклад автора 50%. (JIF WoS 0.7)

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке текстов публикаций, представлении результатов на российских и международных конференциях в форме устных и стендовых докладов. Все экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии. Моделирование профилей высвобождения парамагнитных молекул из пленок PDLLA проведено совместно с С.В. Кузиным. В большинстве работ, опубликованных в соавторстве, вклад Т.А. Ивановой является основополагающим и составляет от 20 до 70%.

Структура и объем диссертации. Материал диссертации изложен на 146 страницах машинописного текста и состоит из 7 разделов, включающих введение, литературный обзор, экспериментальную часть, обсуждение результатов, заключение, приложения и список цитируемой литературы. Диссертационная работа содержит 58 рисунков и 12 таблиц. Список литературы включает 269 наименований.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность д.х.н. Н.А. Чумаковой и С.В. Кузину, а также другим соавторам за помощь в проведении исследований и обсуждении результатов, проф. И.А. Григорьеву за предоставление спинового зонда 5,5-диметил-4-(диметиламино)-2-этил-2-пиридин-4-ил-2,5-дигидро-1H-имидазол-1-оксила (DPI) и спин-меченых лекарственных соединений дигидрокверцетина (sl-DHQ) и диклофенака (sl-DCF).

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Полимеры медицинского назначения и области их применения

В настоящее время полимерные материалы медицинского назначения широко применяются для формирования систем контролируемой доставки лекарств, изготовления подложек для выращивания клеточных культур, создания временных протезов различных органов и тканей, в том числе связок, костных пластинок, сердечных клапанов, сосудистых трансплантатов, зубных имплантатов, интраокулярных линз и медицинских устройств, например, биосенсоров, кардиостимуляторов и т. д. [2,3]. Предотвращение воспалительных процессов и стимуляция роста тканей во время применения имплантатов достигается за счет введения в них биологически активных соединений. В этом случае матрица выполняет функции и временного протеза, и системы доставки лекарств. Кроме того, имплантаты должны быть пористыми и обладать взаимосвязанной системой пор, чтобы обеспечить прорастание клеток и диффузию БАС [4]. В качестве материалов для формирования матриц могут быть использованы как природные, так и синтетические полимеры. Природные полимеры обладают высокоорганизованной молекулярной структурой и слабым воспалительным откликом, а также продуктивно взаимодействуют с клетками, что приводит к лучшему росту тканей в месте нахождения имплантата, однако их состав может существенно зависеть от партии, так как содержание химических компонентов в материалах, полученных от разных видов и собранных в разное время и в разных климатических условиях, может варьироваться [5]. Также следует иметь в виду, что в случае использования материалов природного происхождения нельзя исключать возможность передачи человеку различных заболеваний [6]. Еще одним серьезным препятствием для применения природных полимеров является их недоступность в больших количествах и сложность в обработке [7], нативная структура может быть разрушена при высоких температурах [8].

Широкое использование синтетических полимеров в качестве биоматериалов обусловлено возможностью придания им разных форм за счет изменения их свойств для конкретных задач (время разложения, механические характеристики, пористость) [8]. Они могут быть получены полимеризацией и поликонденсацией мономеров, произведены в больших количествах и обладают длительным сроком хранения. Физико-химические и механические свойства многих коммерчески доступных синтетических полимеров сопоставимы со свойствами биологических тканей [9,10]. Подбор материала для создания полимерной конструкции зависит от поставленной биомедицинской задачи и свойств полимера - химического состава, структуры, молекулярной массы, гидрофильности/гидрофобности, растворимости, водопоглощения, смазывающей способности, поверхностной энергии и

механизма эрозии. Кроме того, важным фактором является биосовместимость полимера, скорость деградации полимерной конструкции (биорезорбции), механическая прочность и низкая токсичность продуктов его разложения. Так, например, если деградация полимера будет протекать быстрее, чем образование новых тканей, то он не сможет выполнять функцию временного протеза. Перспективными материалами, удовлетворяющими большинству описанных выше критериев, являются алифатические полиэфиры и термочувствительные полимеры на основе N-изопропилакриламида.

1.1.1. Алифатические полиэфиры

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [11]¹.

Основными представителями класса алифатических полиэфиров являются полилактиды (PLA), полигликолиды (PGA), их сополимеры полилактогликолиды (PLGA) и поликапролактоны (PCL). Основное различие между ними заключается в скорости деградации: так PCL не демонстрирует значительной деградации в течение шести месяцев, а для полной деградации материала требуется два года, поэтому он больше подходит для формирования временных протезов костных тканей. PLA и PLGA деградируют значительно быстрее и их чаще используют для формирования систем доставки лекарств [12]. В результате их гидролиза образуются нетоксичные продукты разложения - молочная и гликолевая кислоты, которые в конечном итоге превращаются в воду и углекислый газ под действием ферментов в цикле трикарбоновых кислот и автокаталитически и выводятся через дыхательную систему [13]. Автокаталитический характер гидролиза полиэфиров обусловлен образованием кислотного фрагмента, ускоряющего разложение полимера (рис. 1) [14–17].

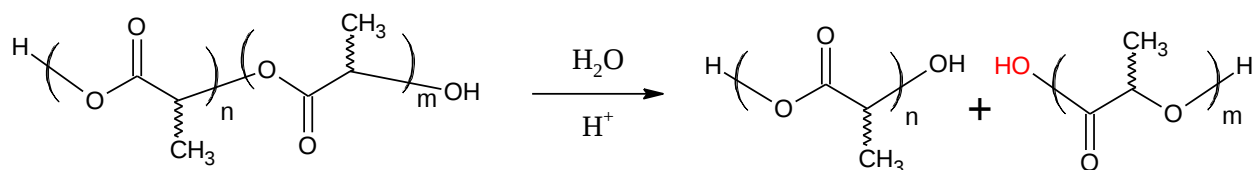


Рисунок 1. Гидролиз поли-D,L-лактида с образованием молочной кислоты.

Преимуществом полиэфиров является возможность варьирования их свойств (кристалличность, механическая прочность, скорость разложения) за счет изменения молекулярной массы полимера, соотношения лактидных и гликолидных звеньев в сополимере или добавления заместителей к основной цепи полимера [18]. Например, соотношение лактида и гликолида в сополимере определяет скорость деградации материала: чем больше содержание

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Иванова Т.А., Голубева Е.Н. Алифатические полиэфиры для биомедицинских целей: дизайн и кинетические закономерности деградации *in vitro*// Химическая физика. — 2022. — Vol. 41, №. 6. — Р. 34–54 [11]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 70%.

гликолида в сополимере, тем быстрее он разлагается [19]. Различные полиэфиры [20–22] используют для изготовления систем доставки лекарств [7,23–25] и временных протезов (штифтов, винтов, сеток, стержней и пористых матриксов). В таблице 1 представлены основные области применения таких полимеров.

Таблица 1. Свойства и области применения алифатических полиэфиров.

Полимер	Кристалличность (%)	Время деградации (недели)	Области применения	Ссылка
Поли(L-лактид)	37	12-18	Фиксация перелома, интерференционные винты, шовный материал якоря, ремонт мениска	[26–28]
Полигликолид/ Полиглактин	45-55	6-12	Шовные якоря, ремонт мениска, медицинские приборы, доставка лекарств	[28–30]
Поли(D,L-лактид- ко-гликолид) 50/50	аморфный	1-2	Ортопедические импланты, доставка лекарств	[31,32]
Поли(D,L-лактид- ко-гликолид) 75/25	аморфный	4-5	Пластины, сетка, шурупы, доставка лекарств	[28,30, 31]
Поли(D,L-лактид- ко-гликолид) 85/15	аморфный	5-6	Интерференционные винты, шовные якоря	[26,28, 32,33]
Поли(D,L- лактид)	аморфный	11-15	Ортопедические импланты, доставка лекарств	[28,30, 31]

1.1.2. Термочувствительные полимеры. Поли-N-изопропилакриламид и его сополимеры

«Умные» полимеры (от англ. smart polymers) – соединения, претерпевающие обратимые физические или химические изменения свойств в ответ на небольшие изменения в окружающей среде [34,35]. Они могут реагировать на один или несколько внешних стимулов, которые вызывают обратимый коллапс полимерных цепей, приводящий к таким макроскопическим процессам, как сжатие гелей или потеря растворимости. Самыми распространенными

стимулами являются pH, температура, электрические или магнитные поля, свет. Термочувствительные полимеры – это частный случай «умных» полимеров, для которых в качестве стимула выступает температура. Характеристикой растворов термочувствительных полимеров является наличие верхней (ВКТР) или нижней (НКТР) критической температуры растворения. Если при повышении температуры наблюдается переход из двухфазного состояния в монофазное, то полимер характеризуется ВКТР. Если нагревание системы приводит к ее переходу из однофазного состояния в двухфазное, то характеристикой полимера является НКТР. Такое явление и обратный ему фазовый переход позволяют использовать термочувствительные полимеры в приложениях молекулярного транспорта и создания СДЛ [36,37]. Состав термочувствительного полимера может оказывать существенное влияние на его поведение при фазовом переходе. Например, высокая доля гидрофильного мономера в сополимере приводит к повышению, а гидрофобного, напротив, к понижению НКТР [36].

Термочувствительные полимеры в тканевой инженерии обычно используются в двух видах: в виде гелей для инъекций с целью создания каркаса *in situ* и в качестве субстратов, обеспечивающих рост клеток [38,39]. Первый случай предполагает инкапсуляцию клеток или биологически активных соединений (БАС) в трехмерные структуры в организме. Термочувствительный полимер смешивается при комнатной температуре с клетками или БАС, а затем вводится в организм. При введении за счет повышения температуры (до 37 °С), превышающей НКТР полимера, полимер переходит в трехмерную структуру геля, в который инкапсулированы клетки или БАС. Один из примеров подобных *in situ* систем - сополимерные гели хитозан- N-изопропилакриламид [40]. Во втором случае термочувствительная способность полимеров используется для регуляции прикрепления и отрыва клеток от поверхности.

Наиболее известным и изученным термочувствительным полимером является поли-N-изопропилакриламид (PNIPAM) [37,41–44]. Он и его сополимеры ниже НКТР растворимы в воде за счет образования водородных связей между молекулами воды и гидрофильными амидными группами в цепях полимера. В результате нагревания системы выше НКТР (32 °С для раствора гомополимера) происходит разрушение водородных связей и преобладание гидрофобных взаимодействий, что ведет к схлопыванию полимерного клубка в плотную глобулу [45]. Гидрофобность коллапсированных областей в гидрогелях PNIPAM близка к гидрофобности хлороформа [37]. Термочувствительные свойства растворов и гелей PNIPAM позволяют использовать его в различных биомедицинских целях, например, для доставки лекарств [46,47], биомолекул [48,49] и разделения белков [50], а также в тканевой инженерии в качестве умных гидрогелей [51] и для покрытия чашек с целью выращивания клеточных культур [52,53]. В последнем случае покрытия PNIPAM позволяют создавать 2D- и 3D-клеточные структуры с развитым внеклеточным матриксом с возможностью их

самопроизвольного отрыва от термочувствительных покрытий за счет набухания или растворения полимера при температурах ниже НКТП [54,55].

Для варьирования значений НКТП и увеличения адгезии клеток были синтезированы и испытаны сополимеры N-изопропилакриламида, в частности серии привитых сополимеров PNIPAM с N-трет-бутилакриламидом (NTBA) [56] и с олиголактидом [57]. Добавление гидрофобных фрагментов NTBA к цепи PNIPAM снижает НКТП сополимера и способствует росту и пролиферации клеток. При этом открепление клеток замедляется при увеличении соотношения NTBA/NIPAM в сополимере [57].

Введение в цепь полимера алифатических полиэфирных групп повышает его биосовместимость и способствует биодegradации [58]. Дegradация P(NIPAM-*g*-PLA) в результате гидролиза молекул олиголактида может повышать НКТП в процессе роста клеток, приводя к растворению каркаса P(NIPAM-*g*-PLA) при физиологических температурах [59]. Таким образом можно расширить возможности применения P(NIPAM-*g*-PLA) в биомедицине в качестве гидрогелей для инъекций с целью формирования трехмерных клеточных структур [60–62].

1.2. Модификация полимеров биологически активными соединениями (БАС)

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [11]¹.

Используемые в медицинских целях полимерные матрицы, как правило, допируют различными БАС, которые могут представлять собой кислотные, основные и нейтральные соединения. Примерно две трети всех существующих БАС являются слабыми электролитами, и соответственно могут существовать в виде заряженных частиц при растворении в различных биологических матрицах. Важной характеристикой БАС считается степень его ионизации, так как она влияет на несколько ключевых молекулярных свойств: проницаемость, липофильность (коэффициент распределения) и растворимость [63]. Основными функциями БАС являются предотвращение воспалительных процессов в месте имплантации и стимуляция роста тканей [64,65]. Используемые классы БАС – гормоны, витамины, факторы роста, стероидные и нестероидные противовоспалительные препараты и др. [66]. Одними из основных критериев применимости в медицине полимерных материалов, допированных лекарственными средствами, являются дозируемые и контролируемые доставка и высвобождение БАС. В

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Иванова Т.А., Голубева Е.Н. Алифатические полиэфиры для биомедицинских целей: дизайн и кинетические закономерности деградации *in vitro*// Химическая физика. — 2022. — Vol. 41, №. 6. — P. 34–54 [11]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 70%.

таблице 2 представлены примеры БАС, которые используют на практике для введения в полимерные материалы медицинского назначения.

Таблица 2. Примеры используемых на практике БАС для введения в полимерные материалы медицинского назначения.

Материал каркаса	БАС	Конечный вид конструкции	Высвобождение из матрицы	Ссылка
Поли(L-лактид)	Прогестерон	Пленка	<i>In vitro</i>	[67]
PLGA	Лидокаин	Пленка	<i>In vitro</i>	[68]
Сополимер PNIPAM и поли(N-бутилакриламида)	Колхицин	Пленка	<i>In vitro</i>	[69,70]
PLA, PLGA	Индометацин	Пористый матрикс	-	[71]
Полиметилметакрилат – полилактид (PMMA–PLA)	Ибупрофен	Пористый матрикс	<i>In vitro</i>	[72]
PLA, PLGA	5-флуорацил	Пористый матрикс	<i>In vitro</i>	[73]
PLGA	Гидрохлорид ципрофлоксацина	Матрикс, прессованные из микрокапсул	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i>	[74]
Поли(N-изопропилакриламид)-b-поли(3-капролактон)	Клоназепам	Наночастицы	<i>In vitro</i>	[75]
Холестерил привитой P(NIPAM-co-HMAAm)	Индометацин	Наночастицы	<i>In vitro</i>	[76]
PLA-PNIPAM	Комбретастин А4	Волокна	<i>In vitro</i>	[77]
PNIPAM-b-PMMA	Преднизона ацетат	Мицеллы	<i>In vitro</i>	[78]

«Умные» полимеры, считающиеся перспективными материалами для разработки систем доставки лекарств, в частности малоинвазивных инъекционных систем в тканевой инженерии [34,40,41,79], достаточно легко допируются БАС. Основным способом внедрения БАС в такие полимеры является их соразстворение в одном растворителе [70,75,76,78] с последующими

разными способами формирования матриц из полученного раствора. Так, например, допированные клоназепамом наночастицы из поли(N-изопропилакриламид)-b-поли(3-капролактона), получали путем сорастворения полимера и БАС в тетрагидрофуране (ТГФ) и дальнейшим испарением растворителя при пониженном давлении [75]. В работе [78] допированные ацетатом преднизона мицеллы из PNIPAM-b-PMMA получали путем сорастворения в диметилформамиде (ДМФА) и дальнейшего диализа. Дурти и др. в работе [69] получали пленки из сополимера NIPAM и NTBA, допированные колхицином, путем введения лекарственного средства в спиртовые растворы сополимера при комнатной температуре и дальнейшем высыхании аликвот этих растворов на лунках планшетов для тканевых культур. В работе [77] термочувствительные волокна типа «ядро-оболочка» формировали путем электроспиннинга сердцевины из раствора полилактида, комбретастатина А4 и фотоинициатора в растворе дихлорметана и УФ-фотополимеризации оболочки из раствора NIPAM. В случае термочувствительных гидрогелей медицинского назначения БАС вносят в жидкий гидрогель, который при введении в организм или нанесении на кожу затвердевает [80].

Ким, Баудис и др. [81,82] разработали другой метод загрузки БАС в полимерные частицы, основанный на захвате БАС при коллапсе полимерных цепей выше НКТР. Водный раствор при 4 °С, содержащий глициновый буфер, хлорид натрия, чувствительный к температуре и рН сополимер поли(N-изопропилакриламид-ко-бутилметакрилат-ко-акриловая кислота) и БАС (пептидные гормоны инсулин или кальцитонин) добавляли по каплям в минеральное масло, нагретое выше НКТР. Сформированные частицы промывали в гексане, фильтровали и сушили с помощью роторного испарителя при комнатной температуре. Степень загрузки БАС в полимерные частицы зависела от рН, температуры, ионной силы и концентрации раствора, а также содержания акриловой кислоты в сополимере [82].

Получение медицинских изделий на основе алифатических полиэфиров, допированных БАС, осуществляется значительно сложнее. При этом, как правило, изменяют и морфологию полимерного материала, например, осуществляют его вспенивание [67,68,71–74]. Существует несколько широко применимых на практике методов формирования полимерных конструкций, в том числе мембранное ламинирование [83] спекание микросфер [84], формование из расплава [84], лазерная микростереолитография [85], метод отливания полимерных объектов из растворителя и выщелачивание добавок [4,83], электроспиннинг [12,86], 3D-печать [12], сверхкритические флюидные технологии, например, сверхкритическая жидкостная инверсия фазы [87] и сверхкритическое вспенивание и импрегнация скаффолдов [84,87,96–99,88–95].

В настоящее время многообещающим подходом к формированию полимерных конструкций для медицинского и фармацевтического применения считаются сверхкритические флюидные технологии на основе сверхкритического диоксида углерода. Их основным

преимуществом является получение материалов в отсутствии токсичных органических растворителей [87]. Существует несколько методов изготовления полимерных форм в виде микрочастиц (для доставки лекарств), мембран (пленок) и пористых 3D-структур (применения в качестве временных протезов и для доставки лекарств). В их число входят жидкостная инверсия фазы, метод сверхкритического антирастворителя (SAS), быстрое расширение сверхкритических растворов (RESS), получение частиц из газонасыщенного раствора (PGSS) и сверхкритическое вспенивание с одновременной импрегнацией.

1.3. Сверхкритические флюидные технологии для формирования полимерных конструкций, импрегнированных БАС

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [11]¹.

Сверхкритические флюидные технологии основаны на использовании веществ в агрегатном состоянии, свойства которого являются промежуточными между свойствами газа и жидкости. Сверхкритический флюид (СКФ) по вязкости и сжимаемости похож на газ, а по плотности и растворяющей способности близок к жидкости. Коэффициент диффузии веществ в СКФ состоянии значительно выше, чем в жидком состоянии. В случае превышения критических значений давления и температуры (если вещества не разлагаются в этих условиях) осуществим переход веществ в СКФ состояние, [100].

Сверхкритический диоксид углерода (scCO_2) является наиболее широко используемым флюидом (более 80% случаев). Он обладает рядом преимуществ по сравнению с другими соединениями: нетоксичен, относительно легко переходит в сверхкритическое состояние ($T_{\text{кр}}=31.3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{кр}}=7.36\text{ МПа}$), является хорошим растворителем для многих органических соединений, относительно инертен, недорог, взрыво- и пожаробезопасен [101]. Кроме того, может быть многократно использован за счет рециркуляции.

Получение пористых 3D-конструкций в scCO_2 основано на процессах поглощения сверхкритического флюида полимерной матрицей и вспенивания полимера на этапе сброса давления в стационарном реакторе. Характеристики формируемых полимерных конструкций можно варьировать за счет изменения параметров СКФ процесса таких, как давление, температура, время выдерживания полимера в СКФ условиях и время сброса давления. Опубликовано большое количество работ, посвященных установлению взаимосвязи между параметрами СКФ процесса и свойствами получаемых пористых полимерных конструкций.

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Иванова Т.А., Голубева Е.Н. Алифатические полиэфиры для биомедицинских целей: дизайн и кинетические закономерности деградации *in vitro*// Химическая физика. — 2022. — Vol. 41, №. 6. — Р. 34–54 [11]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 70%.

Далее будет более детально рассмотрено влияние каждого из параметров СКФ процесса на характеристики получаемых полиэфирных матриц (в частности, PLA, PLGA и PCL).

Обнаружено, что в случае полиэфиров увеличение температуры в диапазоне 35-60 °C приводит к формированию более крупных по размеру пор [84,87–90]. Так, в работе [88] показано, что при увеличении температуры наблюдается увеличение пористости в случае полилактогликолида (38-50 °C) и поликапролактона (>45 °C). В случае полилактидной матрицы увеличение температуры с 35 °C до 55 °C вызывает образование более открытых пор

В работах [87–90] обнаружено, что для структур из полилактида и полилактогликолида (рис. 2а) повышение давления в системе в диапазоне 6-23 МПа приводит к уменьшению среднего размера пор. Однако в литературе представлены работы, результаты которых не согласуются с этой тенденцией. Так, например, авторами [89] показано, что размер пор в матрицах из PLGA уменьшается при увеличении давления в диапазоне 15-20 МПа, однако, если давление в системе увеличить до 30 МПа, то размер пор увеличивается. Наряду с этим в [87] показано, что в случае полилактида средний размер пор уменьшается при увеличении давления в диапазоне 10-23 МПа. Влияние давления на пористость полимерных конструкций также неоднозначно [89,91]. В работе [89] было продемонстрировано, что пористость немного уменьшается при увеличении давления в диапазоне 15-25 МПа, однако последующее увеличение давления до 30 МПа не приводит к изменениям в пористости матриц. В то же время авторами [91] обнаружена противоположная тенденция - увеличение давления в диапазоне 12-16 МПа приводит к небольшому увеличению пористости. Таким образом, на основании представленных выше данных нельзя однозначно сказать, каким образом связаны изменение давления в системе с изменением среднего размера пор и пористости.

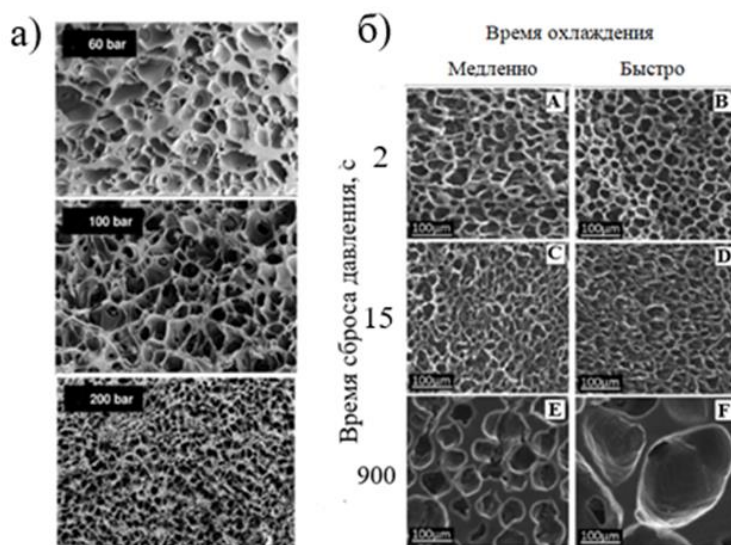


Рисунок 2. Структура пор в полимерном матриксе: а - при изменении давления scCO_2 (поли-D,L-лактид, $T=40^\circ\text{C}$, время выдерживания – 30 мин, время сброса давления – 12 мин) [90]; б -

при изменении времени сброса давления (поликапролактон, $p=20$ МПа, $T=37$ °С, время выдерживания – 1.5 часа) [87].

В литературе прослеживается однозначная тенденция, демонстрирующая, что увеличение времени выдерживания PCL и PLGA в СКФ условиях (0.5-5 часов) приводит к уменьшению среднего размера пор, более узкому распределению пор по размерам [84,88,92] и образованию более однородных структур [87]. Так, при выдерживании в СКФ условиях в течение 1 часа ($p=12$ МПа) получают неоднородно вспененные матрицы, но если увеличить время выдерживания до 4 часов уже при меньшем давлении (10 МПа), то можно получить однородно вспененные конструкции (в обоих экспериментах температура выдерживания в СКФ условиях и время сброса давления одинаковые – 35 °С и 120 мин) [88]. Более того, авторами [92] были сформированы матрицы, характеризующиеся узким распределением пор по размерам (1-500 мкм), в результате выдерживания полимера в СКФ условиях в течение 5 часов. Параметры СКФ процесса были следующими: $T=39$ °С, $p=14$ МПа, скорость сброса давления = 1.8 г/мин. Полученные конструкции удовлетворяют критериям применимости материалов для инженерии костной ткани.

Структура получаемого материала существенно зависит от скорости спуска давления [102], так как именно в процессе выхода CO_2 из реактора происходит вспенивание полимерного материала. Согласно данным из работ [88,90,93,94] более пористые матриксы с большей степенью взаимной связанности пор получают при уменьшении скорости спуска давления [89,94]. Известно, что однородность образца при увеличении времени спуска давления увеличивается [71,87], а анизотропия размеров и формы пор уменьшается [90]. Небольшие времена сброса давления (2 и 5 мин) приводят к образованию неоднородных структур [88]. Во многих источниках говорится, что для полимерных конструкций из полилактогликолида и поликапролактона увеличение времени сброса давления (0-120 минут) приводит к увеличению среднего размера пор [87–90,93,94] (рис. 2б). Однако авторами [71] обнаружена противоположная тенденция - уменьшение размера пор при увеличении времени спуска давления. Таким образом, можно подытожить, что данные о влиянии параметров СКФ процесса на свойства формируемых пористых полимерных матриц недостаточны и противоречивы.

Применение полимерных материалов в качестве временных протезов в живом организме может приводить к возникновению воспалительных процессов. С целью их предотвращения и стимуляции роста тканей в полимерные конструкции вводят лекарственные соединения. Процесс создания пористой структуры и процесс импрегнации могут быть осуществлены одновременно [73,95–98] - молекулы БАС проникают в полимер из раствора в сверхкритическом флюиде и остаются внутри сформированной полимерной матрицы после

возвращения системы к нормальным условиям и испарения флюида [103]. Кабесаз и его коллеги в среде scCO_2 получали вспененные скаффолды из PLA и PLGA, импрегнированные индометацином [71] и 5-флуорацилом [73] при следующих параметрах СКФ процесса: $p=18$ МПа, $T=40$ °С, время выдерживания – 60 мин, время сброса давления – 3 и 90 мин. В работе [72] пористые скаффолды из PMMA-PLA импрегнировали ибупрофеном при следующих условиях: $p=16\text{--}26$ МПа, $T=60$ °С, время выдерживания - 2–41 часов, время сброса давления – 10-12 секунд. В работе [104] при постоянном времени импрегнации 2 часа варьировали параметры СКФ процесса для импрегнации PLGA рутином: $p=8\text{--}20$ МПа, $T=33\text{--}55$ °С, скорость сброса давления – 0.5-10 МПа/мин.

Обработка в scCO_2 применима и к системам, содержащим термочувствительные полимеры. Так, одна из идей тканевой инженерии состоит в том, чтобы материалы, которые будут имплантированы в место дефекта для регенерации ткани, содержали клетки пациента. С этой целью путем вспенивания в СКФ были созданы структуры PDLLA, пропитанные PNIPAM, который сам по себе может быть получен в сверхкритических условиях [105,106]. Гидрофобная природа полученных материалов при 37 °С позволяет клеткам прикрепляться и расти, а при понижении температуры ниже 32 °С (НКТП) поверхности становятся гидрофильными и клетки могут отделяться от поверхности, поэтому подобные конструкции могут быть использованы для выращивания клеточных культур. Исследования, проведенные с клеточной линией фибробластов (L929), демонстрируют, что отслоившиеся клетки сохраняют свою жизнеспособность и могут быть в дальнейшем использованы в приложениях регенеративной медицины [105].

Полимерные матриксы из полиэфигов и закономерности их деградации с выделением БАС, фазовых превращений, происходящих с термочувствительными полимерами при изменении температуры можно охарактеризовать с использованием широкого круга физико-химических методов.

1.4. Методы характеристики полимерных систем, в том числе допированных БАС

1.4.1. Оптические методы: турбидиметрия и динамическое рассеяние света

Одной из важнейших характеристик термочувствительных полимеров является температура фазового перехода раствора полимера определенной концентрации из растворимого в агрегированное состояние, сопровождающегося помутнением раствора. Для полимеров, характеризующихся НКТП, этот переход можно наблюдать при нагревании системы. Наиболее широко используемыми методами для установления температуры перехода клубок-глобула являются турбидиметрия и динамическое рассеяние света [107].

Турбидиметрия – количественный метод, основанный на измерении интенсивности света определённой длины волны, прошедшего через кювету, содержащую коллоидный раствор, например, суспензию, образованную частицами анализируемого вещества. Диапазон используемых длин волн находится в начале видимого диапазона, обычно около 400-550 нм. Измеряемое пропускание уменьшается, когда размер образующейся новой фазы сравним с длиной волны падающего света. С увеличением размера образующихся частиц мутность раствора увеличивается. Обнаружение точки помутнения является распространённым методом определения появления границ фаз в полимерных растворах [108]. В случае растворов термочувствительных полимеров, характеризующихся НКТР, систему постепенно нагревают и температуру, при которой пропускание света, уменьшается на 10%, определяют как температуру перехода клубок-глобула [109]. На рисунке 3 представлен пример зависимости пропускания света от температуры в случае нагревания 1 масс.% водного раствора PNIPAM-co-PLA [57].

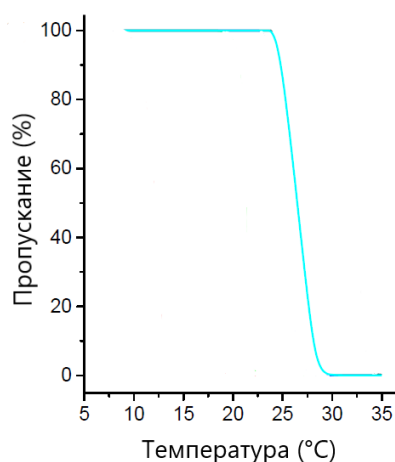


Рисунок 3. Зависимость пропускания света через 1 масс.% водный раствор PNIPAM-co-PLA от температуры [57].

Метод динамического рассеяния света (DLS от англ. dynamic light scattering) основан на регистрации света, рассеянного движущимися частицами в суспензии. На суспензию, содержащую частицы, воздействуют лазером. Попадая на частицы, свет рассеивается во всех направлениях (рэлеевское рассеяние), интенсивность рассеяния со временем колеблется, так как частицы во взвешенном состоянии совершают броуновское движение, и расстояние между рассеивателями в растворе меняется со временем. В этих флуктуациях интенсивности содержится информация о временных параметрах движения рассеивателей, в том числе о коэффициенте диффузии. На основе кривой интенсивности рассеяния света строятся кривые автокорреляции, из которых рассчитывается скорость распада (Γ), которая связана с коэффициентом поступательной диффузии (D_t) через коэффициент пропорциональности – волновой вектор (q):

$$g^1(q;\tau)=\exp(-\Gamma\tau) \quad (1)$$

$$\Gamma=q^2D_t \quad (2)$$

где $q=(4*\pi*n_0/\lambda)*\sin(\theta/2)$, λ - длина волны падающего лазера, n_0 - показатель преломления растворителя, а θ - угол, под которым расположен детектор по отношению к ячейке с образцом. Благодаря измеренному коэффициенту диффузии по уравнению Стокса-Эйнштейна можно определить размер полимерных частиц в исследуемом растворе:

$$d(H)=k*T/(3*\pi*\eta*D) \quad (3)$$

где $d(H)$ – средний гидродинамический диаметр, k — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, η — вязкость диспергирующей среды, D — коэффициент диффузии [107].

Метод динамического рассеяния света по сравнению с другими методами дает информацию о размере частиц полимеров, позволяя определить начало фазового разделения по появлению полимерных агломератов, даже если они еще не вызывают помутнения раствора. Например, в работе [57] было показано, что в растворах термочувствительных полимеров PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) при температурах ниже НКТР могут формироваться наноразмерные неоднородности. Примеры зависимостей размера частиц от температуры для водных растворов 0.25 масс.% PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA-A500) представлены на рисунке 4.

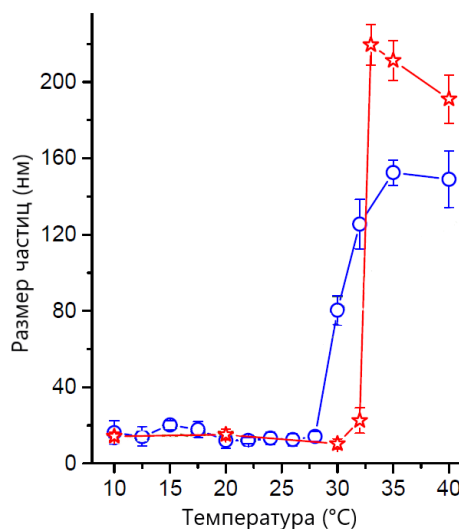


Рисунок 4. Зависимости размера частиц от температуры водных растворов 0.25 масс.% PNIPAM (звезды) и P(NIPAM-*g*-PLA-A500) (круги) [57].

1.4.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) - метод, основанный на измерении разницы в количестве тепла, необходимого для повышения температуры образца и эталона как функции от температуры. Метод ДСК позволяет определять следующие термические свойства полимеров: теплоемкость, температуры стеклования (T_g), кристаллизации, плавления и других фазовых переходов [110]. Температура стеклования

определяется химическим составом и строением полимерной цепи, зависит от способа изготовления полимерной конструкции [111,112]. В случае биоразлагаемых полимеров, подвергающихся гидролизу, в частности алифатических полиэфиров, T_g также зависит от времени выдерживания полимера в водном растворе [68,113]. Температура стеклования не является жестко определенной величиной, так как переход в стеклообразное состояние происходит в определенном диапазоне температур. Пример зависимости потока тепла от температуры для диска из PLA, по которой может быть определена T_g , представлен на рисунке 5 [111].

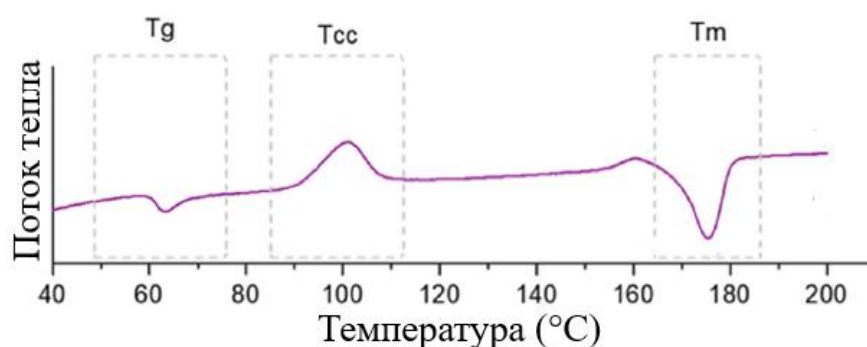


Рисунок 5. Зависимость потока тепла от температуры для диска из PLA. Серым пунктиром выделены области стеклования (T_g), кристаллизации (T_{cc}) и плавления (T_m) [111].

Метод ДСК позволяет характеризовать переход клубок-глобула в растворах термочувствительных полимеров – определять температуру, при которой происходит фазовое разделение, а также энтальпию фазового перехода. Фазовый переход представляет собой эндотермический процесс, так как при нагревании полимера, характеризующегося НКТР, происходит разрушение специфических водородных связей между полимером и молекулами воды. Температура экстремума на термограмме соответствует НКТР. Термограммы растворов гомополимера и сополимеров на его основе будут различаться, например, для сополимера P(NIPAM-*g*-PLA) наблюдается значительное уширение и смещение эндотермического пика на термограмме по сравнению с гомополимером PNIPAM, при этом вид диаграммы зависит от химического состава сополимера. На рисунке 6 приведен пример такой зависимости [57].

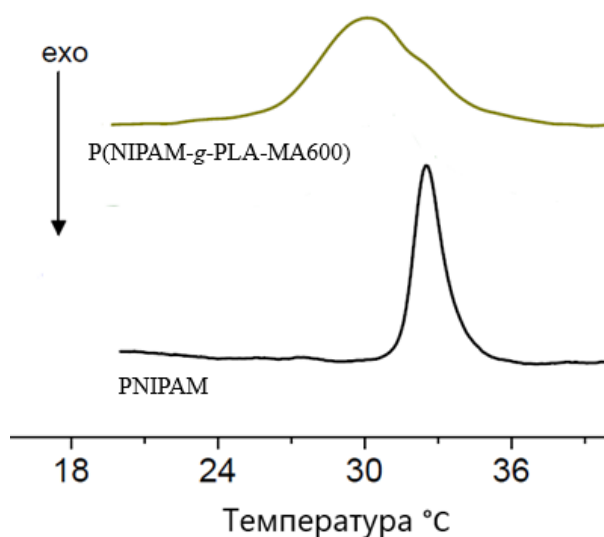


Рисунок 6. ДСК термограммы (режим нагревания) 5 масс.% водных растворов PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA-MA600) [57].

1.4.3. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [11]¹.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) – метод, используемый для диагностики систем с ненулевым суммарным электронным спиновым моментом. Поскольку большая часть материалов и соединений не обладает парамагнетизмом, метод спектроскопии ЭПР часто применяют в варианте методик спинового зонда или спиновой метки. Первый вариант заключается в добавлении к исследуемой системе небольшого количества стабильного парамагнитного соединения (спинового зонда). Во втором варианте парамагнитный фрагмент «пришивают» к исследуемому соединению химическими связями. Стабильные нитроксильные радикалы являются одними из наиболее широко применяемых спиновых зондов и спиновых меток [114–122]. Эти соединения характеризуются значительной пространственной анизотропией сверхтонкого взаимодействия (СТВ) неспаренного электрона с ядром атома азота ^{14}N ($I_{\text{N}}=1$). На рисунке 7 представлены формулы часто применяемых представителей класса нитроксильных радикалов.

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Иванова Т.А., Голубева Е.Н. Алифатические полиэфиры для биомедицинских целей: дизайн и кинетические закономерности деградации *in vitro*// Химическая физика. — 2022. — Vol. 41, №. 6. — Р. 34–54 [11]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 70%.

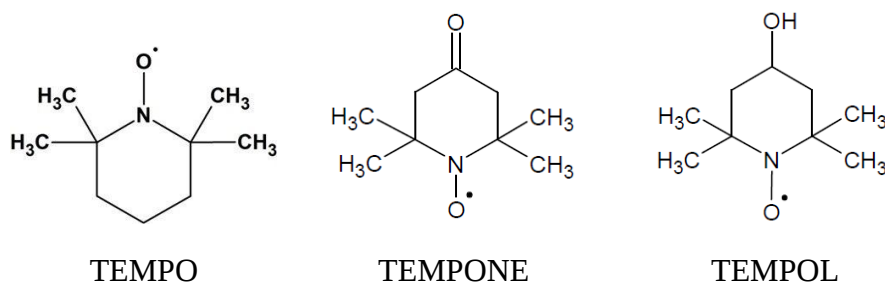


Рисунок 7. Формулы часто применяемых нитроксильных спиновых зондов.

Положение, ширина и относительная интенсивность компонент в спектре ЭПР зависят от взаимного расположения радикалов, их подвижности и физико-химических свойств окружения. Благодаря высокой анизотропии тензора сверхтонкого взаимодействия (СТВ) неспаренного электрона с парамагнитным ядром азота ^{14}N ($I=1$) спектры ЭПР нитроксидов проявляют высокую чувствительность к вращательной подвижности и ориентационной упорядоченности частиц с ненулевым спином. Количественно подвижность радикалов характеризуют при помощи времени вращательной корреляции – среднего времени, необходимого для поворота частицы на 180° . Спектроскопия ЭПР позволяет различать радикалы по времени вращательной корреляции в интервале $\sim 5 \cdot 10^{-11} - 1 \cdot 10^{-7}$ с [123]. Иллюстрация зависимости формы спектров ЭПР от времени вращательной корреляции изображена на рисунке 8 [123]. В случае локализации спинового зонда в жестком материале, где его молекулы ориентированы случайным образом, а подвижность заморожена (время вращательной корреляции меньше $1 \cdot 10^{-7}$ с), его спектр ЭПР называется спектром жесткого предела. Он имеет сложную структуру и представляет собой сумму спектров парамагнитных частиц всех возможных ориентаций. В менее вязких средах подвижность зонда выше (время вращательной корреляции $5 \cdot 10^{-11} - 1 \cdot 10^{-9}$ с), сверхтонкое взаимодействие усредняется, что отражается в сужении и сближении линий. В жидких невязких средах спектр ЭПР нитроксидов представляет собой узкий триплет, где расстояние между линиями соответствует значению изотропной константы СТВ. Благодаря заметному различию спектров ЭПР зондов, отличающихся по подвижности, можно путем моделирования при помощи специально разработанных программ [124,125] анализировать свойства различных фаз, окружающих зонд, в том числе, определяя времена вращательной корреляции [123].

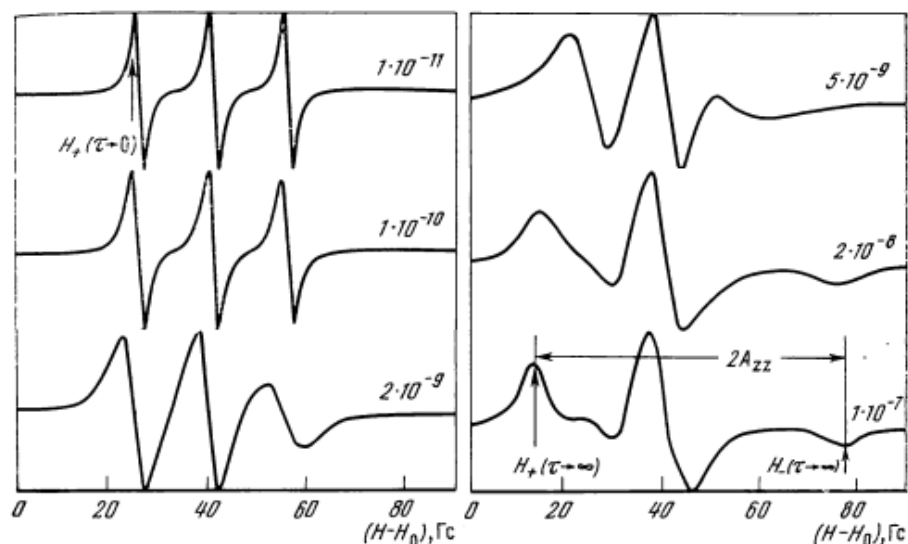


Рисунок 8. Зависимость формы спектров ЭПР от времени вращательной корреляции [123].

Величина константы СТВ парамагнитных соединений зависит от полярности среды, в которой они находятся. В случае нитроксильных радикалов окружающая среда влияет на полярность связи N-O, а, следовательно, и на величину спиновой плотности на атоме азота ^{14}N . Увеличение полярности приводит к росту значений констант СТВ. Так, например, для спинового зонда TEMPONE в неполярном толуоле константа СТВ (A_{zz}) составляет 3.33 мТл, а в полярном метаноле ее значение возрастает до 3.58 мТл [126]. В работе [109] было показано, что изотропное значение константы СТВ (a_{iso}) спинового зонда ТЕМРО внутри неполярных глобул РНИРАМ при 32 °С составляет 1.60 мТл, а во внешнем водном растворе оно значительно выше - 1.73 мТл.

Существует особый класс нитроксидов, форма спектров которых чувствительна к кислотности среды. С их помощью можно устанавливать pH локального окружения парамагнитной частицы за счет измерения расстояния между линиями сверхтонкой структуры. На рисунке 9 изображен принцип pH-чувствительности нитроксильных спиновых зондов на примере нитроксильных производных имидазолидина. В случае протонирования азота в положение 3 происходит уменьшение спиновой плотности на атоме азота нитроксильного фрагмента, что отражается в уменьшении константы СТВ. Если $\text{pH} \sim \text{pKa}$, то спектр ЭПР представляет собой суперпозицию спектров непротонированной и протонированной форм. Если значение pH сильно отличается от pKa, то образуется полностью протонированная или непротонированная форма нитроксида [115,127].

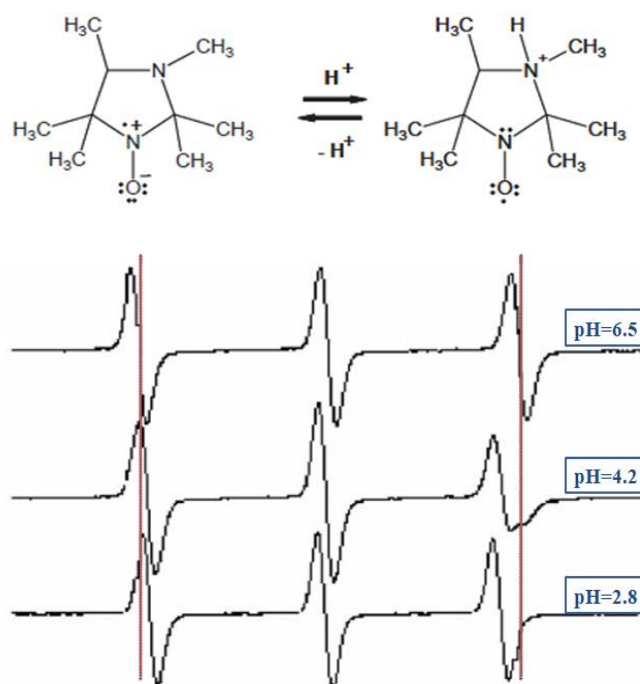


Рисунок 9. Принцип pH-чувствительности нитроксидов на примере нитроксильных производных имидазолидина.

Общее количество парамагнитных частиц в исследуемой системе пропорционально площади под спектром поглощения электромагнитного излучения. Поскольку спектр ЭПР представляет собой производную спектра поглощения, то для установления количества спинов в системе необходимо провести двойное интегрирование спектра. В отличие от спектрофотометрии в спектрах ЭПР, как правило, проявляются только разрешённые переходы. Известно два основных подхода для измерения абсолютного количества парамагнитных частиц в системе путем интегрирования спектров. Один из способов связан со сравнением с эталоном известной концентрации, а другой способ основан на методе абсолютных измерений. Последний не требует приготовления эталона, вследствие чего существенно уменьшаются погрешности, вносимые неодинаковыми объемами сравниваемых образцов и их различными положениями в резонаторе. Для этого метода важны три фактора: добротность Q резонатора, константа c и функция распределения $f(B_1, B_m)$ микроволнового поля, где c и $f(B_1, B_m)$ являются инвариантными характеристиками резонатора, определяются только один раз и могут быть использованы для всех последующих измерений с данным резонатором. В случае водных растворов с низкой концентрацией парамагнитного вещества (число спинов 10^{12} - 10^{13}) определение числа частиц в системе затруднительно. Авторы [128] предложили количественный метод, который основан на конволюции (свертке) экспериментального спектра со спектром нитроксида в той же среде с высоким соотношением сигнал/шум и известным количеством парамагнитных частиц.

На форму линий спектров ЭПР также влияют спин-обменные и диполь-дипольные взаимодействия [123]. В невязких средах преобладает первый тип взаимодействий, второй тип взаимодействий может проявляться в системах, где вращение заторможено, когда расстояние между парамагнитными центрами не превышает 30-40 Å. В случае локального концентрирования парамагнитных частиц форма спектра изменяется, анализ ее параметров позволяет оценивать расстояние между парамагнитными центрами. Локальную концентрацию парамагнитных частиц можно оценивать, используя значение среднего расстояния между ними. Авторами [129] предложена методика оценки средних расстояний между нитроксидами на основании анализа формы линий спектров ЭПР, зарегистрированных в жёстком пределе – в отсутствие вращения парамагнитных молекул. На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что описанный метод позволяет определить как среднюю, так и локальную концентрацию парамагнитных частиц в системе, а также установить наличие их локального концентрирования.

Таким образом, можно заключить, что спектроскопия ЭПР – это точный и неразрушающий метод, который открывает широкие возможности характеристики полимерных матриц, допированных парамагнитными соединениями, в том числе дает возможность устанавливать степень равномерности распределения парамагнитного зонда в полимерной матрице как на макроскопическом, так и на молекулярном уровне. Существенная зависимость формы спектра ЭПР нитроксильного спинового зонда от его вращательной подвижности и распределения спиновой плотности позволяет характеризовать локальное окружение зонда, одновременно наблюдая за парамагнитными молекулами, находящимися в разных средах (например, в полимерной матрице и в заполненных жидкостью порах). Кроме того, используя данные метода спектроскопии ЭПР, можно устанавливать внутреннюю структуру полимерной матрицы и механизмы ее набухания, а также кинетические закономерности высвобождения допанта во внешнюю среду [115,117,130].

Спектроскопия ЭПР в варианте методики спинового зонда также используется в качестве метода характеристики структурных изменений, происходящих с растворами термочувствительных полимеров при изменении температуры [36,37,109]. Для этого к раствору полимера добавляют раствор нитроксильного зонда, чаще всего используют амфифильный зонд ТЕМРО, размеры которого не превышают 1 нм. Ниже НКТР спектр зонда в полимерном растворе представляет собой узкий триплет, движение частиц в невязкой среде изотропно. Выше НКТР в растворе существуют две разные по полярности фазы – внешний водный раствор (полярная среда) и гидрофобные глобулы (неполярная среда). Зонд, локализованный в разных средах, обладает разными магнитно-резонансными параметрами и временами вращательной корреляции, в связи с этим форма спектра становится более сложной (рис. 10) [37]. При

температурах выше НКТР спектр зонда представляет собой сумму спектров частиц, свободно вращающихся во внешнем растворе, и тех, чье движение внутри вязких глобул заторможено. Моделирование такого спектра с целью получения информации о характеристиках зонда в разном локальном окружении, о распределении его между двумя фазами затруднительно. В работе [109] предложили воспользоваться методикой, основанной на уширении сигнала зондов во внешнем растворе вплоть до слияния с базовой линией в результате Гейзенберговского спинового обмена [131] за счет взаимодействия с ионами Cu^{2+} , дополнительно введенными в раствор. Это позволило получить индивидуальный спектр частиц в глобуле, провести его моделирование и использовать полученные магнитно-резонансные параметры и времена вращательной корреляции в качестве начального приближения для описания суммарного спектра зонда в полимерном растворе выше НКТР.

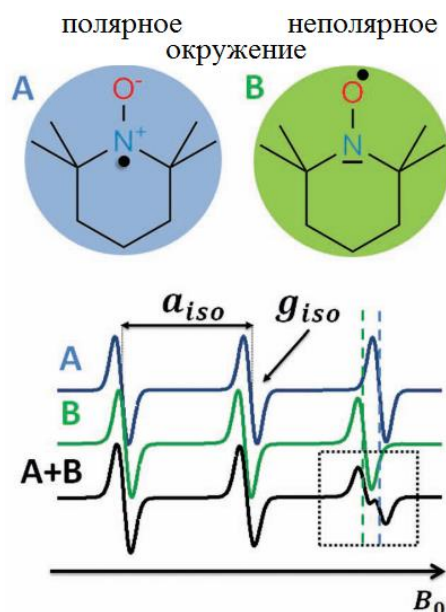


Рисунок 10. Изменение формы спектра зонда TEMPO в разном локальном окружении [37].

Моделирование температурной зависимости спектров ЭПР позволяет количественно оценить распределение зонда между глобулами и раствором. По зависимости количества зонда в глобулах от температуры можно установить температуру перехода клубок-глобула. Для наиболее широко используемого термочувствительного полимера PNIPAM температуру перехода клубок-глобула можно также оценить по зависимости амплитуды высокопольной компоненты спектра ЭПР от температуры [109].

Способность нитроксидов к окислению и восстановлению позволяет оценивать скорость проникновения восстановителей в полимерный материал [127]. Наряду с этим применение нитроксидов в качестве зондов для *ex vivo* и *in vivo* исследований биологических систем считается серьезной проблемой, поскольку они восстанавливаются аскорбиновой кислотой и

серосодержащими белками до диамагнитных гидроксиламинов [132]. Более подробно о химических превращениях нитроксильных радикалов написано в разделе 1.6.

1.4.4. Другие методы

Микроскопия – метод анализа, позволяющий оценивать пористость получаемых полимерных конструкций, в частности форму и размер пор, распределение пор по размерам [1,73,99,133]. Наиболее доступным и часто используемым методом является оптическая микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) более информативна, но в то же время является более дорогостоящим методом исследования. СЭМ позволяет отслеживать изменения, связанные с морфологией поверхности полимерного материала, формой и размером пор матрицы в ходе ее гидролиза и деградации [1,7,86,113,133–135]. Применение в качестве допантов флуоресцентных зондов позволяет характеризовать полимерные структуры при помощи флуоресцентной микроскопии (см., например, [136–138]), а именно описывать изначальное распределение фотоактивных допантов по полимерному материалу и регистрировать изменения в распределении флуоресцентных соединений по полимерной структуре, происходящие в ходе ее деградации.

Спектрофотометрия считается наиболее широко применимым методом для установления закономерностей высвобождения БАС из полимерных матриц. В зависимости от химической природы допанта может быть использована либо спектроскопия в УФ-видимой области [67,139–141], либо УФ спектроскопия [68,142,143]. Флуоресцентные методы тоже задействованы для исследования процессов высвобождения допанта из матрицы [133]. В литературе представлено множество работ, где оптические и хроматографические методы применяют совместно. Например, в работах [113,144–150] использовали системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и последующего УФ-детектирования. Другие методы, реализуемые для характеристики процессов деградации полимерных конструкций и высвобождения из них БАС и нитроксильных спиновых зондов, будут описаны совместно с рассмотрением закономерностей этих процессов.

1.5. Деградация полимерных матриц и высвобождение из них БАС

1.5.1. Деградация полимерных матриц

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [11]¹.

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Иванова Т.А., Голубева Е.Н. Алифатические полиэферы для биомедицинских целей: дизайн и кинетические закономерности деградации *in vitro*// Химическая физика. — 2022. — Vol. 41, №. 6. — Р. 34–54 [11]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 70%.

Применение полимерных материалов в биомедицине не осуществимо без понимания закономерностей набухания и разложения полимерных конструкций в биологических жидкостях, равно как и профилей высвобождения допанта из матрицы. Наиболее часто используемыми полимерами для формирования СДЛ и временных протезов различных органов и тканей являются полилактиды и полилактогликолиды. В водных средах эти полимеры разлагаются путем гидролиза сложноэфирной связи с образованием продуктов разложения, не причиняющих существенного вреда организму [151,152].

Известно множество химических, структурных и технологических факторов, которые влияют на процесс разложения полимеров [19]:

- Химический состав полимера, его молекулярная масса, молекулярно-массовое распределение (M_{WD});
- Форма и размеры полимерного образца;
- Морфология матрицы (степень кристалличности, наличие микроструктур, остаточные напряжения);
- Природа и количество введенного соединения;
- Адсорбированные и поглощенные полимером соединения (вода, липиды, белки, кислород, ионы и т.д.);
- Место имплантации полимерной матрицы.

Процессы набухания и гидролиза вносят основной вклад в деградацию матриц из алифатических полиэфиров [153]. Автокаталитический характер является важной особенностью гидролиза полиэфиров (см. Раздел 1.1.1.). В процессе разложения полиэфирной конструкции происходит закисление внутренних областей полимера из-за образования продуктов гидролиза - молочной и гликолевой кислот, вследствие чего разложение алифатических полиэфиров автокаталитически ускоряется [14–17].

Основными параметрами, позволяющими описать сложный процесс гидролитической деградации полимеров, считаются константа скорости гидролиза, коэффициенты диффузии отщепленных фрагментов цепей внутри набухшей полимерной матрицы, количество поглощенной воды и растворимость продуктов разложения [153]. pH и температура среды [154–157], молекулярная масса полимерного материала также могут влиять на процесс протекания гидролиза [157]. Из литературных источников известно, что если $M_n(PLLA)$ находится в диапазоне $8 \cdot 10^4$ - $4 \cdot 10^5$ г/моль, то влияние M_n на скорость разложения незначительно. Однако, если значение молекулярной массы ниже $4 \cdot 10^4$ г/моль, то прослеживается значительное ускорение гидролитического разложения [158,159]. Это связано с тем, что снижение молекулярной массы соответствует более высокой молекулярной подвижности и повышает

вероятность образования водорастворимых мономеров и олигомеров, а соответственно приводит к увеличению скорости диффузии воды и в итоге ускоряет деградацию PDLLA [158]. В матрицах на основе полилактогликолидов увеличение содержания гликолида приводит к ускорению деградации, так как гликолидный фрагмент обладает большей гидрофильностью по сравнению с лактидным - молекулы воды лучше проникают между полимерными цепями [160].

Разложение полимерной матрицы может протекать по двум механизмам: поверхностная (гетерогенная) и объемная (гомогенная) эрозия [161]. Во многом реализация того или иного механизма определяется конкуренцией процессов набухания и гидролиза полимерной матрицы. В случае объемного механизма вода сначала диффундирует в полимерную матрицу, а потом в объеме осуществляется реакция гидролиза. При этом поглощение воды системой происходит быстрее, чем разлагается матрица. В случае протекания процесса по поверхностному механизму полимер гидролизуются намного быстрее, чем вода проникает в объем, ввиду этого разложение происходит в основном во внешнем полимерном слое. Полимерные материалы могут разрушаться как по гомогенному, так и по гетерогенному механизму в зависимости от условий протекания процесса и архитектуры исследуемого образца [26].

Количественно процесс набухания полимерной матрицы можно описать с помощью индекса (степени) набухания $SI = (m_t - m_0) / m_0 \cdot 100\%$ [17,113,135], а при помощи гелепроникающей хроматографии оценить происходящие в ходе гидролиза изменения средневесовой (M_w) и среднечисловой (M_n) молекулярной массы, а также молекулярно-массового распределения полимера (M_{WD}) [68,113,148–150,162–164].

Как уже было описано выше, в ходе разложения полиэфирной матрицы внутренние области полимера закисляются в результате образования продуктов гидролиза - молочной и гликолевой кислот. Множество факторов может влиять на кислотность среды внутри полимерной матрицы на разных стадиях ее набухания и деградации, например, наличие и размер пор, степень набухания матрицы, присутствие олигомеров и мономеров, их кислотно-основные свойства и т.д. Наряду с этим закисление матрицы может оказывать существенное влияние на фармакокинетику БАС, введенного в полимерную матрицу, его биодоступность и растворимость, стабильность и, в конечном итоге, на его терапевтическую эффективность [115]. В настоящее время с целью установления pH внутри полимерной конструкции в качестве допантов используют pH-чувствительные радикалы [114–117,127]. Например, в работе [116] при помощи зонда 4-амино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-илокси было определено, что значение pH внутри микросфер PLGA в процессе эрозии находится ниже 4.7, а добавление в систему «основного» гентамицина приводит к повышению pH до 5.7.

В матрицах PLLA, характеризующихся определенной степенью кристалличности, процессы деградации протекают еще более сложным образом. Кристаллические участки по

сравнению с аморфными областями более устойчивы к гидролизу в связи с сильной ограниченностью доступа молекул воды к цепям внутри жестких кристаллических участков [165]. Гидролитическая деградация матриц, сформированных из частично закристаллизованных полимеров, происходит в две стадии. Сначала в результате диффузии вода проникает в аморфные области, в которых начинают гидролизироваться сложноэфирные связи. Степень кристалличности образца в таком случае может даже увеличиваться. Вторая стадия начинается лишь после деградации большей части аморфного участка. Гидролитическая атака происходит от края к центру кристаллических доменов [166].

В работе [167] была предложена математическая модель гидролиза алифатических полимеров, на примере изначально непористых дисков из PLGA толщиной 0.3, 0.5 и 1.0 мм. Эта модель учитывает диффузию воды в объеме полимера, участие воды как реагента в реакциях гидролиза полимерных макромолекул, образование и диффузию коротких олигомеров. Предполагая, что диффузия воды происходит по закону Фика, авторами была разработана программа расчета пространственно-временного распределения концентрации воды, коротких олигомеров, молекулярной массы полимера при деградации в водной среде. В результате чего было проанализировано влияние коэффициентов диффузии воды и коротких олигомеров, а также констант скоростей реакций гидролиза на закономерности деградации алифатических полиэфиров. Показано, что при достаточно больших коэффициентах диффузии воды ($D_w=10^{-7}$ м²/неделя) деградация PLGA происходит преимущественно в центральной части образца – объемная эрозия, а при более медленной диффузии воды ($D_w=10^{-9}$ м²/неделя) – преимущественно вблизи поверхности. Также авторами было показано, что при относительно низких концентрациях коротких олигомеров их диффузия может влиять на диффузию воды. При сравнении модельных расчетов с экспериментальными данными было выявлено хорошее соответствие с коэффициентом детерминации 0.97 ± 1 . Дальнейшее развитие модели авторы видят в учете вклада нефиковской диффузии воды, установлении механизмов образования макроскопических пор в объеме полимера и объяснении существования инкубационного периода, после которого деградация быстро ускоряется.

1.5.2. Высвобождение БАС из полимерных конструкций

1.5.2.1. Высвобождение БАС из матриц PDLA

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [11]¹.

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Иванова Т.А., Голубева Е.Н. Алифатические полиэфиры для биомедицинских целей: дизайн и кинетические закономерности деградации *in vitro*// Химическая физика. — 2022. — Vol. 41, №. 6. — Р. 34–54 [11]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 70%.

Высвобождение БАС из систем их контролируемой доставки на основе алифатических полиэфиров тесно, но не напрямую связано с процессами их деградации. Кривые высвобождения могут иметь различный вид (см., например, рис. 11), что свидетельствует о сложности механизма этого процесса. Наиболее желательным является равномерное и постепенное высвобождение БАС со временем, позволяющее не превышать токсический предел используемого лекарственного средства.

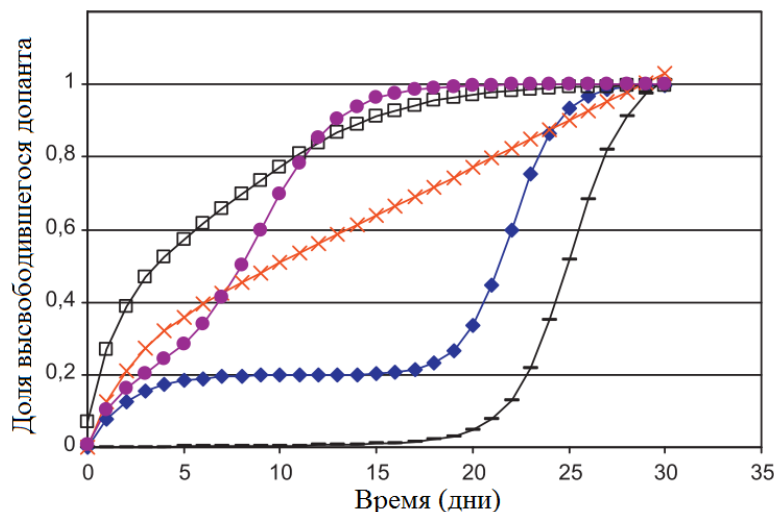


Рисунок 11. Типичные формы кривых высвобождения допантов из полимерных матриц [168].

Уже несколько десятилетий ученые пытаются моделировать процессы высвобождения БАС из полимерных матриц. Большинство разработанных ранее моделей высвобождения основаны на решениях уравнения диффузии Фика, предполагающих постоянство структуры полимерной матрицы:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (4)$$

В фармацевтической области, однако, применяют и ряд других моделей, приемлемых для описания высвобождения лекарств из таблеток, в частности, модель Хигучи [169], ее более точный аналог, разработанный Полом и МакСпадденом [170], модели Роузмана и Хигучи [171,172] и другие модели диффузии/растворения [173].

В том случае, когда полиэфирные матрицы содержат поры изначально, кривые высвобождения допантов в различных экспериментах близки по форме [72,105,160,174–177]. На рисунке 12 представлены типичные кривые высвобождения допантов из пористых полимерных матриц *in vitro* на примере профилей высвобождения факторов роста PDGF-BB, TGF-β1 и VEGF из скаффолдов PDLA [175]. На начальном этапе наблюдается быстрое высвобождение введенных соединений, затем скорость высвобождения снижается. В приведенных примерах через сутки высвобождается около 50% от общей массы введенных

факторов роста, количественно определяемых на протяжении всего эксперимента. По нашим оценкам, наблюдаемые зависимости могут быть описаны в координатах уравнения Фика [178]:

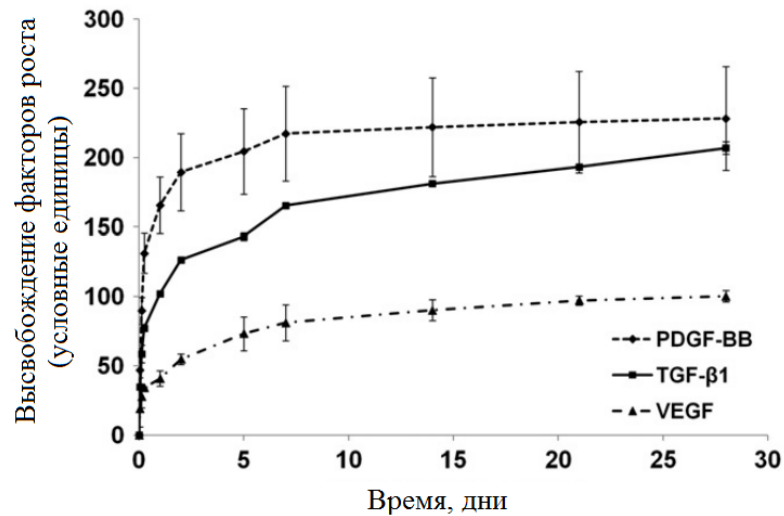


Рисунок 12. Типичные формы кривых высвобождения допантов из пористых полимерных матриц *in vitro* [175].

Однако для удовлетворительного количественного описания сложных кривых высвобождения из полимерных матриц различной архитектоники (см., например, рис. 12) необходимо учитывать изменения структуры матрицы в результате выдерживания в водной среде, связанные с этим изменения коэффициентов диффузии воды, БАС и продуктов гидролиза полимера и т.д. В работе [179] Ритгер и Пеппас предложили эмпирическое выражение, связывающее фракционное высвобождение БАС из ненабухающей матрицы M_t/M_∞ со временем высвобождения t :

$$M_t/M_\infty = k \cdot t^n \quad (5)$$

где t — время высвобождения, k — константа, а n — показатель, качественно характеризующий механизм высвобождения. Особенностью этого выражения является зависимость значения показателя диффузии n от способа высвобождения допанта из матрицы и ее геометрии.

В следующей работе [180] Ритгер и Пеппас рассмотрели применение описанного выше уравнения для набухающих систем, где скорость проникновения жидкости/среды может контролировать высвобождение БАС. В этом случае при определенных экспериментальных условиях высвобождение может протекать с постоянной скоростью, то есть описываться уравнением нулевого порядка по времени.

Моделирование высвобождения из набухающих полимерных систем связано с проблемой движущейся границы или проблемой Стефана-Неймана. Кранк отмечал, что необходимые для описания данных уравнения существенно отличаются и более сложны, чем те, которые представлены для ненабухающих систем. В этом случае вместо аналитических решений необходимо использовать численные. В качестве первого приближения Ритгер и

Пеппас предлагают использовать уравнение, подходящее для ненабухающих систем, если система набухает не более чем на 25% от своего первоначального объема (равновесный коэффициент набухания не превышает 1.33).

Авторы привели данные для разных по типу матриц: ненабухающих [179] и набухающих [180] тонких пленок, цилиндрических и сферических образцов (см. Табл. 3). Видно, что для ненабухающих матриц показатель степени n в уравнении 5 имеет предельные значения 0.50, 0.45 и 0.43 для пленок, цилиндров и сфер соответственно. Для таблеток в зависимости от соотношения сторон, т.е. отношения диаметра к толщине, показатель находится в диапазоне $0.43 < n < 0.50$. При высвобождении БАС из сферических частиц, имеющих широкое распределение по размеру, n зависит от ширины распределения. В случае высвобождения БАС 10-15% для сферических частиц, 15-20% для цилиндров и менее 60% для пленок профили высвобождения можно с хорошей точностью описать формулой с $n=0.5$. Из приведенных данных видно, что используемого степенного уравнения недостаточно для выявления истинного механизма высвобождения БАС из матрицы. Оно имеет ряд ограничений или подходит для описания только определенного участка зависимости, поэтому необходимо привлекать другие модели для установления механизма высвобождения зонда из матрицы.

Таблица 3. Значения характеристического показателя n для ненабухающих и набухающих полимерных конструкций разного типа и соответствующие им механизмы высвобождения [179,180].

Значения характеристического показателя n			Способ высвобождения
Ненабухающие конструкции			
Тонкие пленки	Цилиндрические образцы	Сферические образцы	
0.5	0.45	0.43	Фиковская диффузия
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 1.0$	$0.43 < n < 1.0$	Аномальный (нон-фиковский) транспорт
1.0	1.0	1.0	Высвобождение с постоянной скоростью («zero-order release»)
Набухающие конструкции			
Тонкие пленки	Цилиндрические образцы	Сферические образцы	
0.5	0.45	0.43	Фиковская диффузия
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Аномальный (нон-фиковский) транспорт
1.0	0.89	0.85	Процесс описывается характеристической константой релаксации

Механизмы процессов высвобождения допантов из полимерных матриц можно распределить на две группы: механизмы, определяющие способ высвобождения введенного соединения (так называемые истинные («true») механизмы), и механизмы, которые позволяют предсказывать скорость высвобождения введенного соединения на разных этапах гидролиза матрицы (их еще называют «rate-controlling release mechanisms») [168].

Авторы [168] описывают четыре истинных механизма высвобождения допантов из матриц в зависимости от особенностей взаимодействия полимера, из которого получена матрица, с введенным в нее соединением и растворителем:

- осмотическая откачка (природа процесса – конвекция растворителя в полимерном материале);
- эрозия (диффузия допанта не осуществляется, деградация матрицы лимитирует процесс высвобождения);
- диффузия по полимерному материалу;
- диффузия через поры, заполненные жидкостью.

Механизм осмотической откачки предполагает поддержание осмотического давления и равного притока и оттока воды. В этом случае набухание и деградация полимера должны быть незначительными в течение периода высвобождения лекарственного средства. Такое явление более характерно для гидрофобных полимеров с высокой молекулярной массой. Как правило, для полилактидных и полилактогликолидных матриц такой механизм реализуется редко [168], так как конструкции из них хорошо набухают и любое осмотическое давление будет компенсировано увеличением объема. Однако существует работа [181], где наблюдался такой механизм высвобождения для системы доставки лекарств из PLGA (85:15), внутреннее пространство которого было заполнено фактором роста фибробластов и осмотическим агентом PEG (полиэтиленгликоль). Через узкие каналы, соединяющие внутреннее пространство и поверхность системы доставки лекарств, всасывалась вода, и по мере растворения PEG внутри создавалось осмотическое давление, что и приводило к высвобождению лекарства через эти каналы.

Эрозия как истинный механизм высвобождения проявляется в схожести профилей высвобождения лекарственного средства и эрозии полимера, если предположить, что лекарственное средство однородно распределено по матрице. Механизм эрозии наблюдается, когда молекулы лекарства, находящиеся вблизи поверхности, высвобождаются без транспорта в полимерной матрице за счет эрозии материала. Например, в работе [182] профиль высвобождения тестостерона из пленки PLGA практически совпадал с профилем потери массы полимера до 90% высвобождения. Однако, поскольку гидратация обычно происходит намного

быстрее, чем эрозия, более вероятно высвобождение за счет диффузии через поры, образованные в результате поглощения воды. Эрозия может быть основным механизмом высвобождения для матриц из PLGA с низкой молекулярной массой, в которых значительная часть полимера имеет молекулярную массу чуть выше предела растворимости в воде. Однако, поскольку остатки полимера обычно обнаруживаются после полного высвобождения лекарственного средства, эрозия редко является доминирующим механизмом истинного высвобождения [168].

Наблюдение истинного механизма диффузии по полимерному материалу возможно в случае высвобождения небольших гидрофобных молекул. В работе [138] использовали конфокальную микроскопию для установления коэффициента диффузии небольшой гидрофобной молекулы *bodipy* из микрочастиц PLGA. Коэффициент диффузии не увеличивался при деградации полимера или при инкапсулировании порообразователя $MgCO_3$ вместе с бычьим сывороточным альбумином. Однако он существенно зависел от температуры, что подтверждало тот факт, что высвобождение гидрофобного *bodipy* из микрочастиц происходило за счет диффузии через полимерную фазу.

Основным механизмом высвобождения допантов из пористых полиэфирных матриц является диффузия через поры, заполненные жидкостью. От механизма поверхностной эрозии его можно отличить на основании анализа спектров ЭПР полимерных матриц, допированных нитроксильными спиновыми зондами [127]. Изначально спектр нитроксильных радикалов в жесткой полимерной матрице представляет собой спектр жесткого предела (см. Рис. 8, 13). В процессе диффузии вода проникает внутрь полимерного материала, что проявляется в появлении узких компонент в спектре, характерных для молекул зонда, быстро вращающихся в жидкой среде (рис. 8, 13). Так как растворенные нитроксиды из-за разницы концентраций диффундируют по порам в полимерной матрице, образующимся в результате ее деградации, во внешний раствор, то помимо изменения формы спектра ЭПР спинового зонда происходит уменьшение его интенсивности. Количество свободно вращающихся и иммобилизованных нитроксидов в системе можно определить путем моделирования спектров. Если истинным механизмом высвобождения является поверхностная эрозия, то вода не проникает в матрицу и введенный зонд не переходит в растворенное состояние, а остается иммобилизованным в полимере на протяжении всего процесса гидролиза материала. При этом форма спектра не меняется и наблюдается только уменьшение интенсивности сигнала, связанное с высвобождением зонда во внешний раствор за счет эрозии матрицы (рис. 13).

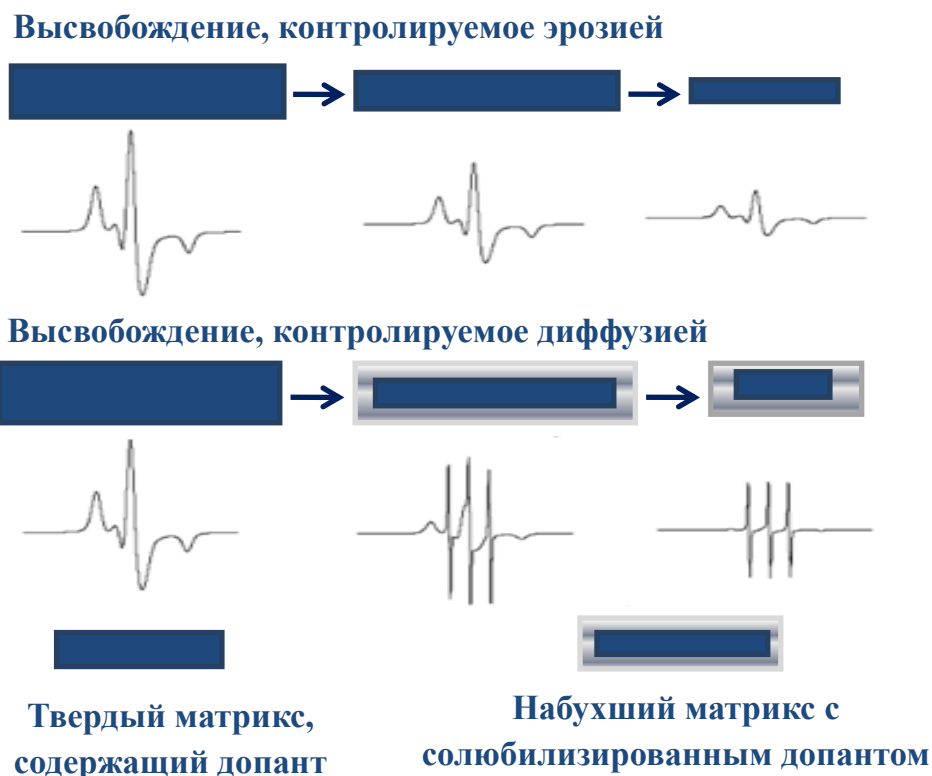


Рисунок 13. Изменения интенсивности и формы спектров ЭПР полимерной пленки, вызванные разными механизмами высвобождения зонда [127].

Вторая группа механизмов («rate-controlling release mechanisms») позволяет классифицировать процессы, которые контролируют скорость высвобождения допанта на разных этапах гидролиза матрицы. Среди них выделяют уже описанные нами ранее процессы набухания полимерной матрицы, гидролиза и эрозии (потери молекулярной массы) полимерного материала, изменений в подвижности и плотности полимерных цепей, гетерогенной деградации конструкции, образования и зарастания пор, растворения введенного соединения, взаимодействия между полимером и БАС и др. [168]. Выделить влияние каждого процесса в отдельности на высвобождение допанта из матрицы практически невозможно, поэтому далее остановимся на особенностях кинетических профилей высвобождения и совокупности процессов, их определяющих.

Конструкции из алифатических полиэфиров достаточно часто характеризуются быстрым высвобождением БАС на начальных этапах, которое в англоязычной литературе обозначают термином «burst» – вспышка [134,139,145,183,184]. Обычно такое быстрое высвобождение нежелательно, поскольку в таком случае общая продолжительность терапевтического эффекта БАС уменьшается, а чрезмерно быстрое высвобождение лекарственного средства может оказать токсическое действие на организм. Обычно появление «burst» связывают с наличием не включенного в полимерную матрицу БАС, который адсорбирован на поверхности или в порах [183]. В работе [185] при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии авторы

определяли равномерность распределения зонда по микрочастицам из полисебацеинового ангидрида и ее влияние на «burst». При поперечном сечении 20 мкм микрочастиц, допированных пироксикамом, во внутренней части матрицы были обнаружены крупные кристаллы лекарственного средства размером от 1 до 3 мкм, что подтвердило присутствие лекарственного средства по всей микросфере, в отличие от микрочастиц других размеров и допированных другими зондами: родамином Б и п-нитроанилином, где допанты были обнаружены только на поверхности. На кинетических профилях высвобождения «burst» наблюдался для всех исследуемых систем, однако важно отметить, что для 20 мкм микросфер, допированных пироксикамом, он был существенно меньше. В случае микрочастиц «burst» эффект можно уменьшить за счет увеличения размера частиц (более длинный путь диффузии способствует более медленному высвобождению) и молекулярной массы полимера [183].

Во многих работах описано, что высвобождение на начальном этапе также может происходить через приповерхностные поры, быстро образующиеся в результате сорбции воды [1,186,187]. Скорость высвобождения зонда из матрицы можно контролировать, изменяя размер и пористость матриц, природу и концентрацию введенного соединения, а также молекулярную массу полимера. Далее на примере микрочастиц рассмотрим влияние этих параметров [183]. Установлено, что высвобождение допантов из непористой системы происходит намного медленнее, чем из пористого аналога за счет меньшей площади поверхности и более длинного диффузионного пути. Эффект резкого высвобождения на начальном этапе проявляется тем ярче, чем больше концентрация допанта, так как в этом случае между средой и полимерным материалом наблюдается больший начальный градиент концентрации допанта. Этот эффект, как правило, незначителен, если концентрация допанта низкая. Скорость начального выброса контролируется скоростью десорбции БАС из полимерной конструкции, то есть растворением допанта с поверхностей частиц в объемной водной фазе. Этот эффект проявляется сильнее для гидрофильных лекарственных средств, чем для гидрофобных из-за их более высокой растворимости в воде. Частицы из PLGA, характеризующиеся более низкой молекулярной массой (при постоянном размере частиц и концентрации допанта), поглощают значительно большее количество воды, что облегчает диффузию БАС. Скорость растворения БАС может лимитировать скорость его высвобождения, если она меньше скорости транспорта допанта.

Наряду с этим поглощение полимером воды приводит к его набуханию и гидролизу, что в итоге проявляется в увеличении подвижности полимерных цепей и уменьшении его молекулярной массы. Поскольку эти факторы способствуют зарастанию пор, то совокупностью описанных выше процессов можно объяснить наличие участков замедления («lag time») на профилях высвобождения [1,188]. Также на процессы зарастания пор влияют температура, pH, гидрофобность и молекулярная масса полимера [168].

Автокаталитический эффект гидролиза может привести к такому процессу как гетерогенная деградация матриц. Внутри полимерной формы из-за закисления среды процесс гидролиза протекает более интенсивно, поэтому внутренний слой становится пористым быстрее, чем внешний (поверхностный), который может действовать как диффузионный барьер до тех пор, пока «не лопнет» из-за повышения осмотического давления. Такой эффект наблюдался для сформированных из PLGA микрочастиц диаметром около 10 мкм [189] и тонких пленок толщиной 10 мкм [190]. Также на примере микрочастиц из PLGA [191] было показано, что эрозия (потеря массы) полимера, начинающаяся при средней молекулярной массе 15 кДа, приводит к образованию пор, что увеличивает скорость диффузии БАС.

Описанные выше процессы объясняют последовательное протекание процессов быстрого первичного высвобождения, замедления и вторичного ускорения выхода БАС из полиэфирных матриц. Химические взаимодействия между полимером и допантом также существенно влияют на внешний вид профилей высвобождения БАС из матриц [149]. Допанты могут ускорять или замедлять процесс разложения полимера. Например, гидрофобные допанты обычно ограничивают поглощение воды, что приводит к уменьшению скорости разложения, в то время как гидрофильные соединения оказывают противоположное действие. «Кислые» БАС за счет кислотного катализа стимулируют более быстрый гидролиз сложноэфирных связей. Для основных лекарственных средств известно два противоположных эффекта: нейтрализация концевых карбоксильных групп полимерных цепей и расщепление сложноэфирной связи за счет основного катализа, что либо устраняет, либо минимизирует автокаталитический эффект кислотных концов цепи. Авторами [17,192] продемонстрировано, что деградация PDLA в присутствии тиоридазина - третичного амина (основное БАС) ускоряется из-за нуклеофильной природы аминогруппы. Взаимодействие молекул лекарства друг с другом, то есть образование физических или ковалентных агрегатов, может стать причиной более медленного и неполного высвобождения БАС [193,194].

Рассмотрим более подробно учет этих явлений на примере высвобождения из тонких полимерных пленок. Даже в этом случае формы кривых высвобождения молекул допантов из матрицы значительно различаются [67,68,113,139–141,144,145,147–150,182]. Наблюдается несколько типов кривых высвобождения – без периода индукции/с периодом индукции, без начального выброса/с начальным выбросом допанта, s-образные (рис. 14) [168,195]. Существует предположение, что и для пленок осуществляется механизм диффузии допанта через поры, но образование, рост и закрытие пор играют различную роль на разных этапах гидролиза матрицы [168]. При этом нельзя исключать механизм эрозии и диффузию малых гидрофобных молекул через набухший полимер [196,197].

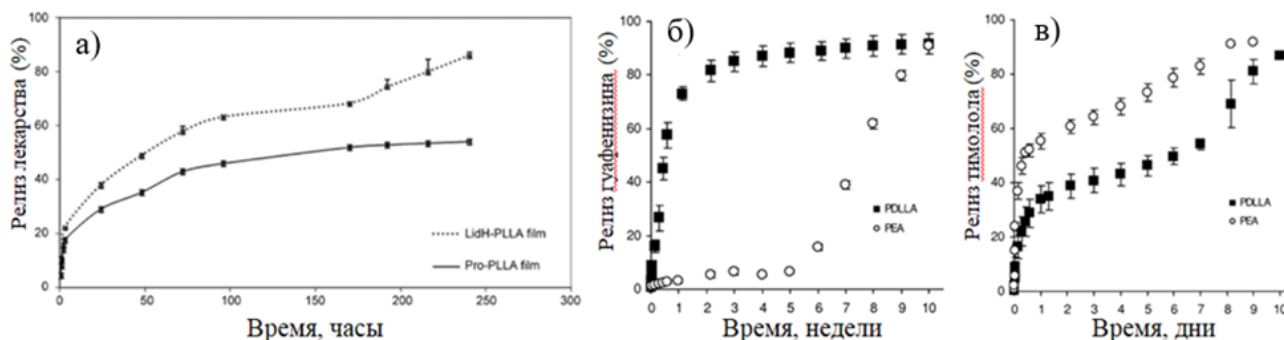


Рисунок 14. Кривые высвобождения молекул допантов из полимерных пленок [67,149]: а - пленки PLLA, допированные прогестероном (черная линия) и лидокаином (пунктирная линия); б - пленки PDLLA (черные квадраты) и PEA (полиэфирамида) (полые круги), допированные гуафенезином; в - пленки PDLLA (черные квадраты) и PEA (полиэфирамида) (полые круги), допированные салицилатом натрия.

В связи со сложностью количественного описания получаемых экспериментальных данных в некоторых работах прибегают к феноменологическому описанию профилей высвобождения. Так, авторы [198,199] привели описание кинетики высвобождения допанта, содержащее дополнительный параметр – время задержки (t_{lag}), которое отражает начало высвобождения вещества. В работе [200] предлагают вариант модификации модели в виде учёта начального выброса - «burst». Помимо этого модификацию модели фиковской диффузии можно проводить с учетом релаксационного вклада, описывающего высвобождение допанта за счёт релаксации полимерных цепей, которая вызвана пластифицирующим действием растворителя [201]. В работе [202] модель включает одновременную диффузию БАС через твердый полимер и через заполненные жидкостью поры, при этом эффективная модель диффузии БАС строится с учетом изменения молекулярной массы полимера, пористости и распределения БАС между твердой и водной фазами. Авторы делают предположение, что БАС равномерно распределяется между толщиной полимера и порами, заполненными жидкостью. На разных временных диапазонах механизмы высвобождения могут отличаться, ввиду этого можно проводить описание разных участков профилей высвобождения в рамках соответствующих им моделей, а затем сшивать фрагменты описания между собой [203,204]. Альтернативный способ описания кинетических кривых заключается в использовании коэффициента диффузии как параметра, зависящего от времени [202,205–208], поскольку выдерживание полимерной матрицы в жидкой среде приводит к ее набуханию, изменению свободного объёма полимера, упаковке цепей и т.д., что в итоге приводит к изменению вязкости системы. В случае матриц из полилактидов и полилактогликолидов необходимо дополнительно учитывать автокаталитическое протекание гидролиза, которое приводит к

изменению морфологии, архитектоники матриц и уменьшению средней молекулярной массы полимера. Более того, коэффициент диффузии может зависеть и от времени, и от пространственных координат [209], что дает возможность описывать высвобождение допантов из пространственно-неоднородных образцов. На основании вышеизложенного можно учесть вызванное набуханием полимера изменение коэффициента диффузии.

Знание «rate-controlling» механизмов позволяет создавать не только эмпирические, но и осознанные физические модели высвобождения допантов из матриц. Далее рассмотрим использование этих механизмов для описания кинетических профилей высвобождения зондов из матриц на примере работы [1]. Замедление высвобождения нитроксильных спиновых зондов TEMPOL и АТІ из пленок PDLLA толщиной 200 мкм авторы объясняют уменьшением количества открытых пор (рис. 15а). В то же время проникновение воды в пленку не останавливается, что способствует автокаталитическому протеканию гидролиза во внутренних областях матрицы, образованию новых внутренних пор, которые постепенно растут и в итоге соединяются с поверхностью пленки. Приповерхностный слой пленки окружает нейтральная внешняя среда, которая наоборот замедляет гидролиз, что в итоге приводит к существенной разнице в температурах стеклования разных зон полимерной матрицы (ранее в работе [189] Парк и др. продемонстрировали, что частицы PLGA, выдерживаемые в воде, имеют две температуры стеклования, меньшая из которых уменьшается со временем, в то время как большая из температур практически не меняется). При помощи спектроскопии ЭПР выявлено, что нитроксильный радикал высвобождается из полимерной матрицы в поры, заполненные водным раствором, и практически на всех этапах гидролиза существует бимодальное распределение допанта по подвижности: молекулы зонда, иммобилизованные в полимерном материале, и молекулы зонда, быстро вращающиеся в порах. Ускорение высвобождения БАС из эродировавших пленок происходит по мере соединения внутренних пор и их выхода на поверхность. Профили высвобождения для пленок толщиной 50 мкм практически линейны (рис. 15б).

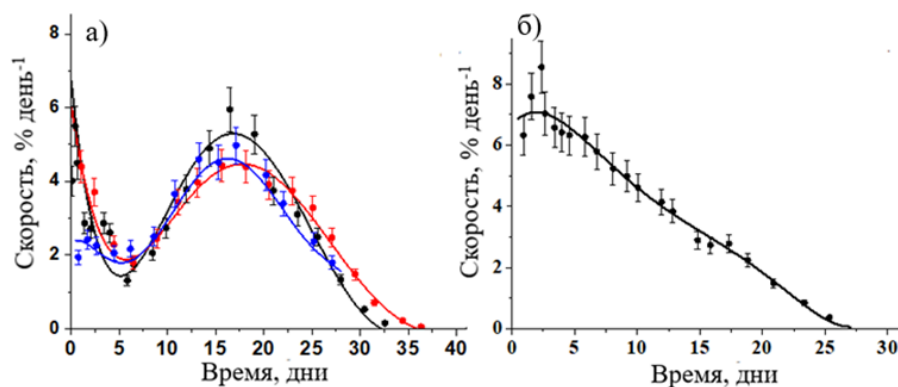


Рисунок 15. Профили высвобождения нитроксильных спиновых зондов из пленок PDLLA разной толщины [1]: а – пленки (200 мкм), допированные АТІ (синие символы) и TEMPOL

(красные и черные символы); б – пленка (50 мкм), допированная TEMPOL. Линии являются результатом полиномиальной аппроксимации.

Таким образом, на первом этапе высвобождение происходит через приповерхностные поры, затем частично «зарастающие» в случае более толстых пленок. Скорость высвобождения зонда снижается по мере зарастания пор. Наряду с этим локальное закисление матрицы вызывает более интенсивное протекание деградации внутри нее, чем на поверхности, и допант высвобождается во внутренние поры. На третьем этапе диффузия через образовавшиеся крупные внутренние поры, связанные с поверхностью, является основным способом высвобождения допанта. Разработанная авторами математическая модель описывает высвобождение допанта из пленок на начальном этапе как фиковскую диффузию без детального рассмотрения каждого процесса, происходящего с пленкой (диффузия воды в полимерную матрицу, гидролиз полимерных цепей, образование и рост пор, закрытие части пор на поверхности, диффузия растворимых олигомеров наружу). Для моделирования второго этапа кинетической зависимости авторы рассматривали диффузионную модель, которая описывает высвобождение зонда через протяженные поры, заполненные жидкостью и связанные с поверхностью [202]. Функция пористости $\phi(t)$ является одним из основных параметров модели. Она представляет собой объемную долю пор, сформированных в определенный момент времени и соединенных с поверхностью пленки (открытых пор). Представленная авторами модель хорошо описывает профили высвобождения допантов из пленок, но вместе с тем она использует 11 параметров – чрезмерно большой набор для описания экспериментальной зависимости с небольшим количеством особенностей. В связи с этим диффузионная модель была упрощена без ущерба для качества описания экспериментальных зависимостей, с учетом условий было решено дифференциальное уравнение и выведено выражение для расчета скорости высвобождения допанта из пленки, приведенной к начальному количеству зонда в образце (N_0).

Модель можно охарактеризовать при помощи следующих параметров:

- D_0, λ, μ, f – эмпирические параметры описания высвобождения зондов на первом этапе.
- t_{lag} – определяет начало открытия внутренних пор на поверхность пленки, т.е. начало второго этапа порообразования.
- $A = \kappa D_L k^{3/2}$ – регулирует интенсивность высвобождения зонда на втором этапе порообразования, является характеристикой сродства допанта к матрице и её гидролитической устойчивости (скорость открытия пор на поверхность).

Разработанная авторами модель позволяет описывать экспериментальные профили высвобождения спиновых зондов TEMPOL и АТІ из пленок PDLLA разной толщины (рис. 16).

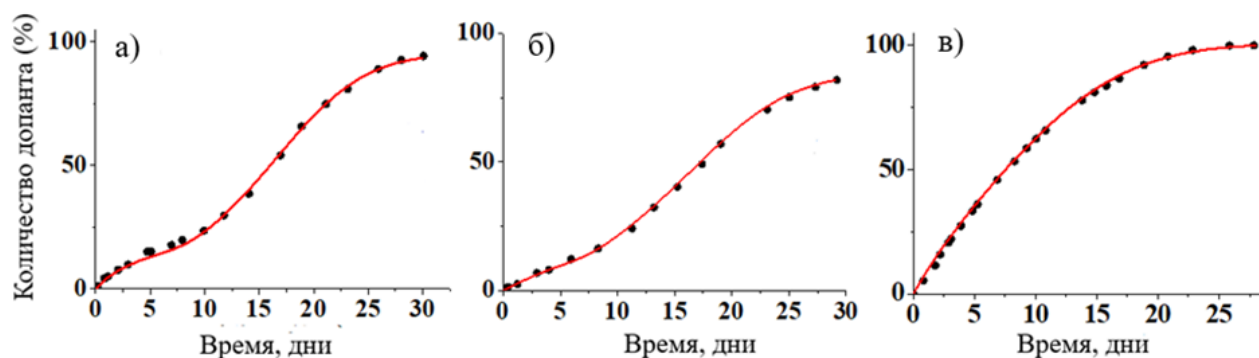


Рисунок 16. Экспериментальные зависимости (черные символы) и соответствующее им численное моделирование (красные линии) высвобождения из пленок PDLLA разной толщины [1]: а - пленка (200 мкм), допированная TEMPOL; б – пленка (200 мкм), допированная ATI; в - пленка (50 мкм), допированная TEMPOL.

Эксперименты по высвобождению БАС из полимерных матриц *in vitro* помогают моделировать аналогичные процессы *in vivo*. В этом случае используют среды, имитирующие биологические жидкости при температуре 37 °С. Наиболее распространенными среди них являются нейтральные буферные растворы (рН~7). Природа, состав, структура и степень полимеризации полимерного материала, природа введенного соединения, его распределение по матрице, способ формирования полимерной конструкции, ее архитектура, пористость, а также взаимодействие допанта с матрицей являются ключевыми факторами, определяющими тенденции высвобождения БАС из матрицы.

2.1.1.1. Высвобождение БАС из матриц термочувствительных полимеров

Термочувствительные полимеры также являются перспективными материалами для создания систем доставки и высвобождения лекарств [80,210]. Благодаря отклику полимера на изменение температуры окружающей среды появляется возможность контролировать интервал и выбирать зоны доставки БАС из такой полимерной матрицы [40,79]. Термочувствительный PNIPAM является одним из наиболее интенсивно изучаемых полимеров в отношении биомедицинских приложений из-за его НКТР, очень близкой к температуре тела, и быстрого отклика на изменение температуры.

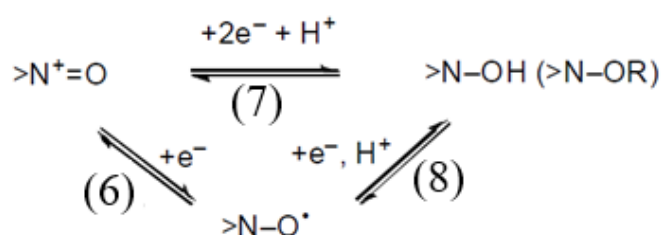
СДЛ из термочувствительных полимеров могут существовать в различной форме: физические и ковалентно связанные гели, мицеллы, пленки, микрочастицы и т.д. [210]. Физические гели образуются в результате координационного взаимодействия фрагментов полимерных цепей, их переплетения и/или упорядочения мицелл в концентрированных растворах; ниже НКТР физические гели обычно растворяются. Образованные в результате химического сшивания полимерных цепей ковалентно связанные гели ниже НКТР набухают, но не растворяются [210]. Из блок-сополимеров, содержащих гидрофильные и гидрофобные

мономеров, могут быть образованы упорядоченные структуры, такие как мицеллы [210]. Регулирование состава и соотношения мономеров позволяет получать мицеллы различного строения [35,69,211].

Характер высвобождения БАС из термочувствительных полимерных матриц зависит от конформации полимера при температуре высвобождения. Ниже НКТР полимерные цепи гидратированы и полимер либо растворен, либо находится в набухшем состоянии; основным механизмом высвобождения БАС из таких систем является диффузия. В работе [212] показано, что снижение температуры гидрогелей сополимеров NIPAM с бутилметакрилатом, содержащих индометацин, с 20 °С до 10 °С приводит к увеличению степени набухания и ускоренному высвобождению БАС. Выше НКТР высвобождение БАС из матриц термочувствительных полимеров ускоряется за счет деформации/коллапса матрицы [77,78,211,213]. Это может быть связано как с изменением гидрофобности полимера, из-за которого БАС становится «невыгодно» располагаться внутри матрицы, так и с изменением структуры матрицы, прежде всего с уменьшением внутреннего свободного объема полимера. Увеличение содержания введенного лекарственного соединения за счет увеличения гидрофобности матрицы сополимера может быть достигнуто за счет изменения ее состава. Однако таким образом может быть достигнут нежелательный эффект образования жестких неоднородностей, не обменивающихся с внешней средой. Например, как ниже (4 °С), так и выше (40 °С) НКТР адриамицин не высвобождается из мицелл PNIPAM-полистирол [213]. Имеющиеся в литературе данные ограничены для предсказания кинетических профилей высвобождения БАС, поэтому необходимо получение новых экспериментальных зависимостей, которые позволят приблизиться к прогнозированию профилей высвобождения БАС из матриц на основе термочувствительных полимеров.

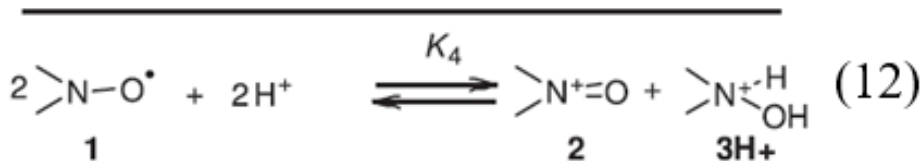
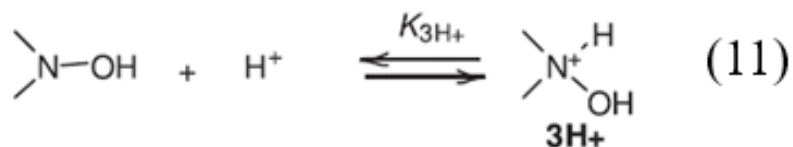
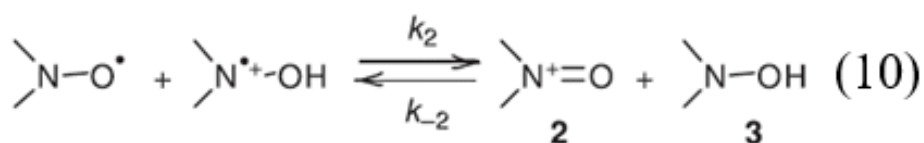
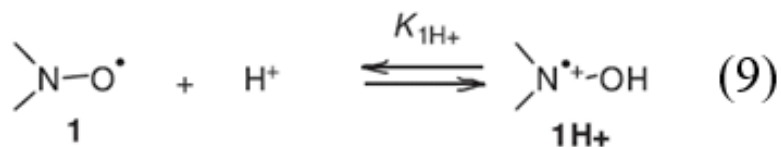
2.2. Химические превращения нитроксильных радикалов

В настоящей работе в качестве допантов, вводимых в полимерную матрицу, использованы нитроксильные спиновые зонды ($>\text{N-O}^\bullet$). В водной среде эти соединения способны обратимо окисляться до оксоаммониевых катионов и восстанавливаться до гидроксиламинов или алкоксиаминов:



где $>\text{N-O}^\bullet$ - нитроксильный радикал, $>\text{N}^+=\text{O}$ - оксоаммониевый катион, $>\text{N-OH}$ - гидроксилламин, $>\text{N-OR}$ - алкоксиламин.

В общем случае на редокс-равновесие влияют кислоты и основания [214]. Кинетика и равновесие кислотно-катализируемого диспропорционирования циклических нитроксильных радикалов на оксоаммониевые катионы и гидроксилламины определяются окислительно-восстановительными и кислотно-основными свойствами этих соединений. Кинетическая стабильность нитроксидов в кислых средах зависит от основности нитроксильной группы. В работе [215] была предложена схема реакций, в которые вступает нитроксильный радикал в кислой среде:



где 1 – нитроксильный радикал, 2- оксоаммониевый катион, 3 – гидроксилламин. Авторами было обнаружено, что лимитирующей стадией сопропорционирования является окисление гидроксилламина 3 оксоаммониевым катионом 2. Величина общей константы равновесия диспропорционирования K_4 зависит от строения нитроксильного радикала и в ряду соединений, представленных в статье [215], изменяется более чем на семь порядков. В случае TEMPONE обратимость диспропорционирования низка, что, вероятно, связано с низкой устойчивостью в кислой среде соответствующего ему оксоаммониевого катиона. Он дестабилизирован карбонильной группой, регенерация TEMPONE после нейтрализации его кислого раствора незначительна. Детальный механизм фрагментации оксоаммониевого катиона изучен в работах [216,217].

Легкость одно- и двухэлектронного переносов в стабильной органической редокс-триаде позволяет использовать эти соединения для различных приложений [214]:

- контролирующие агенты в «живой» полимеризации;
- стабилизация мономеров на этапах их получения, использования и хранения;

- ингибирование радикально-цепного окисления низкомолекулярных и полимерных органических материалов;
- защита клеток и тканей от окислительных повреждений в качестве антиоксидантов и миметиков фермента супероксид-дисмутазы.

С биомедицинской точки зрения окислительно-восстановительные свойства триады привлекательны тем, что позволяют исследовать процессы генерации/расходования $>\text{NO}^\bullet$, количественно по реакции окисления $>\text{NOH}$ до $>\text{NO}^\bullet$ определять содержание активных форм кислорода (reactive oxygen species), например, $\text{O}_2^{\bullet-}$, устанавливать механизмы окислительно-восстановительных реакций и природу активных радикалов. В биологических средах нитроксильные радикалы находятся в динамическом равновесии с продуктами их окисления и восстановления, могут модифицировать редокс-статус живой клетки, действуя либо как окислители (прооксиданты), либо как восстановители (антиоксиданты). В таком случае могут протекать реакции с активными формами кислорода (радикалами и пероксидами) и эндогенными антиоксидантами (аскорбиновая кислота, глутатион). В организме низкомолекулярные нитроксиды за времена порядка минут восстанавливаются до диамагнитного состояния, которое не обнаруживается методом ЭПР. Это может быть препятствием для инструментального применения этих соединений [132], поэтому ниже поподробнее остановимся на реакциях, которые могут к этому привести. При физиологическом pH нитроксиды обратимо окисляют аскорбат анионы (AscH^-), при этом для пиперидиноксилов ($3.5\text{--}7 \text{ л}/(\text{моль}\cdot\text{с})$) константа скорости прямой реакции на 1–2 порядка выше, чем для пирролидиноксилов ($0.07\text{--}0.3 \text{ л}/(\text{моль}\cdot\text{с})$) [214]:



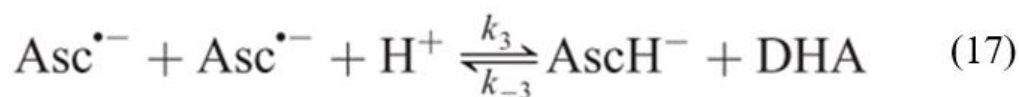
Нитроксиды не окисляют глутатион (GSH) напрямую, однако их добавка облегчает восстановление аскорбат анионом за счет перехвата радикалов аскорбата ($k=10 \text{ л}/(\text{моль}\cdot\text{с})$) [214]:



Другой путь непрямого восстановления $>\text{NO}^\bullet$ глутатионом и другими тиолами реализуется через промежуточные $>\text{NO}^+$, которые могут образовываться *in vivo* в случае окисления нитроксидов радикалами $\text{HO}_2^\bullet$. Например, с цистеином нитроксиды напрямую не реагируют, но будут его окислять, если в систему ввести источник $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{HO}_2^\bullet$. Среди изученных соединений скорость превращения для ТЕМПО максимальна, он характеризуется самой высокой константой скорости в реакции с $\text{HO}_2^\bullet$ [214]

В работе [132] А.А. Бобко и его коллегами были проведены сравнительные исследования восстановления пирролидинового, имидазолинового и имидазолидинового нитроксильных радикалов аскорбат ионом. Было установлено, что константы скорости реакции восстановления

нитроксида аскорбатом существенно выше для шестичленных нитроксидов пиперидинового типа (TEMPO, TEMPOL), чем для пятичленных циклов пирролидинового и имидазолидинового типов. Наличие двойной связи в положении 3 в пятичленном кольце пирролидинового и имидазолидинового типов увеличивает скорость их восстановления аскорбатом. Отрицательный заряд и стерическая защита радикального фрагмента повышают стабильность нитроксидов в аскорбат содержащих растворах. В работе [132] предложена схема превращений нитроксильных радикалов в присутствии аскорбат иона:



где NR – нитроксильный радикал, HA – соответствующий ему гидроксиламин, AscH^- - аскорбат ион, $\text{Asc}^{\bullet-}$ - радикал аскорбата, DHA – дегидроаскорбиновая кислота, DGA – дикетогулоновая кислота, OxDGA - продукт окисления дикетогулоновой кислоты NR.

Гидроксиламин можно окислить до NR при помощи генерации $\text{Asc}^{\bullet-}$ из AscH^- аскорбат оксидазой или в присутствии DHA. NR восстанавливается AscH^- в отсутствие аскорбат оксидазы и не восстанавливается в ее присутствии. Аскорбат оксидаза не окисляет HA в одиночку. Восстановление нитроксида AscH^- обратимо и может отличаться от реакции псевдопервого порядка в присутствии кислорода. Как было описано ранее, на реакцию восстановления NR в HA сильно не влияет присутствие только глутатиона, однако имеет сильное влияние в совокупности с аскорбатом. Глутатион значительно уменьшает квази-плато уровень NR за счет захвата $\text{Asc}^{\bullet-}$, отвечающего за окисление гидроксиламина. DHA окисляет HA до NR при высоких концентрациях реагентов, однако при низких концентрациях эффект незначительный. Форма кинетической кривой окисления HA сложная из-за образования продукта разложения DHA, ответственного за восстановление NR. Синтезированные авторами статьи тетраэтилзамещенных NR продемонстрировали эффективный механизм реокисления их гидроксиламинов обратно в исходный радикал в присутствии аскорбата. В связи с этим перспективны нитроксильные радикалы, чьи восстановительные и окислительные процессы

будут уравниваться, сохраняя значительную часть радикальной формы, которая сможет отражать окислительно-восстановительный статус микроокружения зонда.

2.3. Заключение

Таким образом, данные литературного обзора свидетельствуют о том, что алифатические полиэфиры и термочувствительные полимеры являются перспективными материалами для создания систем доставки лекарств. Они могут быть получены при помощи сверхкритических флюидных технологий в отсутствие токсичных органических растворителей. Варьируя параметры СКФ процесса, можно изменять характеристики формируемых полимерных матриц. Принцип действия СДЛ в зависимости от используемого полимера будет различным. В случае алифатических полиэфиров, в частности полилактидов, высвобождение БАС из матрицы связано с гидролизом полимера, образованием и зарастанием пор, деградацией конструкции. Если СДЛ сформирована из термочувствительных полимеров, то основной принцип их использования связан с наличием фазового перехода клубок-глобула при изменении внешнего стимула, например, температуры и pH. Это свойство может быть использовано как для допирования полимерных матриц БАС, так и для управления процессами высвобождения. Внедрение блоков различной природы в основную цепь термочувствительного полимера может существенно влиять на его поведение при фазовом переходе. Так, например, внедрение гидрофобного олиголактида в цепь поли-N-изопропилакриламида приводит к снижению НКТР [57]. Кроме того, наличие в системе полимерных блоков, которые могут быть подвержены гидролизу *in situ*, может привести к постепенному изменению НКТР и, следовательно, изменению закономерностей высвобождения БАС из глобул термочувствительного полимера. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса в рамках методики спинового зонда, как показано в литературном обзоре, может выступать основным методом характеристики систем доставки лекарств, допированных нитроксильными радикалами и спин-мечеными лекарственными соединениями, и установления кинетических закономерностей высвобождения зондов из полимерных матриц.

Однако в области создания систем доставки лекарств и установления механизмов высвобождения из них БАС еще есть нерешенные вопросы. Так, например, литературные данные по выбору параметров СКФ процесса для формирования допированных БАС полимерных матриц, удовлетворяющих критериям применимости в медицине, в среде scCO_2 неоднозначны. Опубликовано мало работ, где авторы уделяют внимание вопросу установления равномерности распределения зонда по полимерной матрице, что на самом деле является важным фактором, влияющим на кинетику высвобождения допанта. Не предложен механизм, предсказывающий кинетические профили высвобождения разных по природе БАС из матриц

разного типа. Таким образом, целью настоящей работы установление кинетических закономерностей и механизма высвобождения нитроксильных радикалов как моделей низкомолекулярных биологически активных соединений из биodeградируемых и термочувствительных матриц на основе полилактида. В качестве материалов для формирования СДЛ были использованы полилактид и термочувствительные графт-сополимеры N-изопропилакриламида с олиголактидом разного состава.

Глава 2. Экспериментальная часть

3.1. Вещества и материалы

Исходный поли-D,L-лактид (структурная формула приведена на рис. 17а) (PDL02 и PDL04) (Purac Biochem) представляет собой порошок с размером частиц 50-300 мкм. Выбор полимеров с разной молекулярной массой обусловлен ее влиянием на скорость гидролиза полимерного материала. Молекулярно-массовые характеристики полимеров, полученные методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ), приведены в таблице 4.

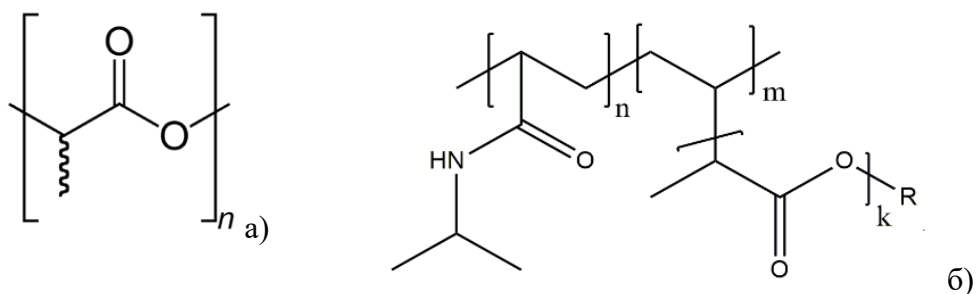


Рисунок 17. Полимеры, используемые в работе: а – PLA; б - P(NIPAM-*g*-PLA).

Таблица 4. Характеристики полимеров, полученные методом ГПХ.

	M_n	M_w	$\bar{D}=M_w/M_n$
PDL02 [*]	11800	19800	1.68
PDL04 ^{**}	14800	36100	2.43
PDL04 ^{**} после обработки в скCO ₂	15200	35800	2.36

^{*} результаты получены научной группой под руководством проф. Е.В. Черниковой (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва).

^{**} результаты получены научной группой под руководством проф. С.В. Костюка (НИИ физико-химических проблем, Минск, Беларусь).

Термочувствительный полимер поли(N-изопропилакриламид) (PNIPAM) и графт-сополимеры на основе N-изопропилакриламида и олиголактида (P(NIPAM-*g*-PLA)) (рис. 17б) с различным содержанием олиголактида (3, 9, 17 масс.%) были любезно предоставлены проф. С.В. Костюком (НИИ физико-химических проблем, Минск, Беларусь). Синтез PNIPAM проводили методом свободнорадикальной полимеризации в бензоле в течение 24 ч при температуре 60 °С с использованием азобисизобутиронитрила (AIBN) в качестве инициатора. Полученный полимер очищали растворением в ацетоне с последующим осаждением в гексане.

Процедуру очистки повторяли 3 раза, после чего высушивали полимер в вакуумной печи при температуре 45 °С. Среднечисловая молекулярная масса $M_n=175.5$ кДа, коэффициент полидисперсности $\bar{D}=4.3$.

Сополимеры были синтезированы следующим образом. На первой стадии в растворе CH_2Cl_2 при 20 °С в присутствии диазабициклоундецена в атмосфере аргона полимеризацией с раскрытием цикла димера молочной кислоты были синтезированы олиголактидные макромономеры. Затем в растворе CH_2Cl_2 при 0 °С в атмосфере аргона было проведено их ацилирование в присутствии пиридина и метакрилоил хлорида. На следующей стадии была осуществлена RAFT (reversible addition - fragmentation chain transfer) сополимеризация NIPAM с PLA, содержащим концевые метакрилатные группы. Реакция была проведена в растворе 1,4-диоксана при 20 °С в атмосфере аргона с использованием 2-(додецилтиокарбонотиоилтио)-2-метилпропановой кислоты в качестве RAFT агента и азобисизобутиронитрила в качестве инициатора [57]. Олиголактидные макромономеры с концевыми метакрилатными группами со среднечисловой молярной массой 600 и 1200 Да использовали в сополимеризации с NIPAM для получения графт-сополимеров, обозначаемых как PLA-MA600 и PLA-MA1200 в таблице 5 соответственно.

Таблица 5. Характеристики термочувствительных полимеров и используемые аббревиатуры [57,109]. M_n - среднечисловая молекулярная масса, $\bar{D}$ – полидисперсность.

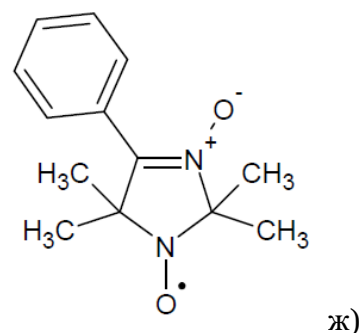
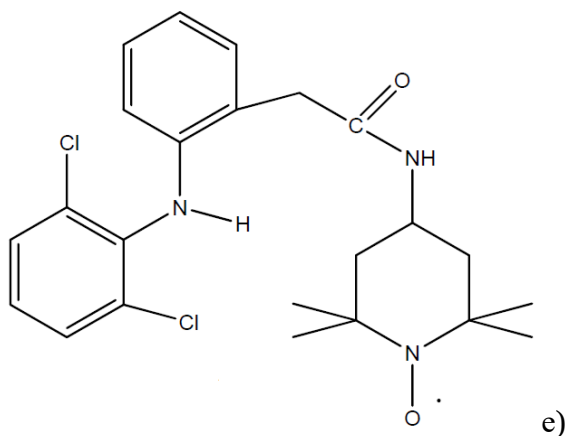
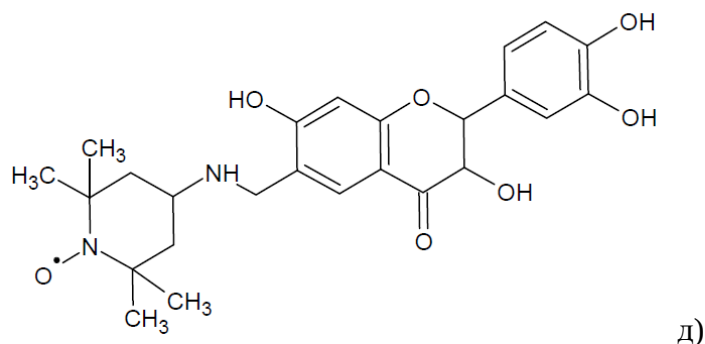
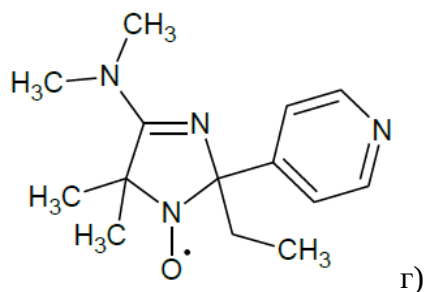
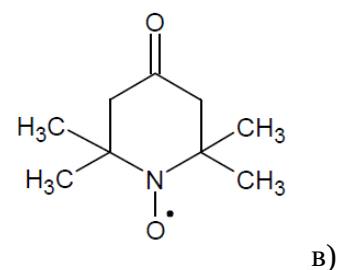
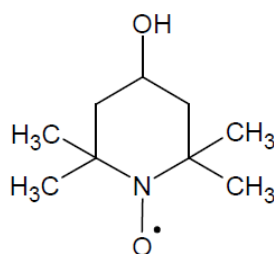
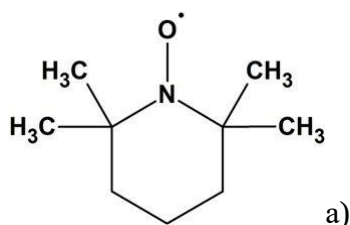
	Полимер	M_n , кДа	$\bar{D}$	НКТР, °С (ДСК / турбидиметрия)
I*	PNIPAM	175.5	4.3	32 / 32
II**	P(NIPAM- <i>g</i> -PLA-MA600) 97:3	23.5	1.25	31 / 26
III**	P(NIPAM- <i>g</i> -PLA-MA1200) 97:3	25.7	1.23	32 / 27
IV**	P(NIPAM- <i>g</i> -PLA-MA600) 91:9	27.7	1.23	28 / 22
V**	P(NIPAM- <i>g</i> -PLA-MA1200) 83:17	30.8	1.23	29 / 27

* данные из работы [109],

** данные из работы [57].

Стабильные нитроксильные радикалы (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (TEMPO) (рис. 18а), 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксид (TEMPOH) (рис. 18б) и 4-оксо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксид (TEMPONE) (рис. 18в) компании Sigma-Aldrich использовали без дополнительной очистки. 5,5-диметил-4-(диметиламино)-2-этил-2-пиридин-4-ил-2,5-дигидро-1Н-имидазол-1-оксид (DPI) (рис. 18г), спин-меченый дигидрохверцетин (sl-DHQ) (рис. 18д) и спин-меченый диклофенак (sl-DCF) (рис. 18е) были предоставлены проф. И.А. Григорьевым (Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО

РАН). Радикал 2,2,5,5-тетраметил-4-фенил-3-имидазолин-1-оксил-3-оксид (R5) (рис. 18ж) был предоставлен проф. Е.М. Плиссом (Ярославский Государственный университет им. П.Г. Демидова). Радикалы А3 и А5 были предоставлены проф. С. Боттлом (Университет Квинсленда, Квинсленд, Австралия) (рис. 18з, 18и). Хлорид меди (II) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ компании Sigma-Aldrich использовали без дополнительной очистки. Диоксид углерода марки о.с.ч. (99.998%, НИИ КМ, Москва, Россия) использовали без дополнительной очистки. Ацетонитрил и толуол были очищены путем перегонки. В качестве сред для высвобождения допантов из матриксов были использованы 0.01 М фосфатный буферный раствор с $\text{pH}=7.4$ (PBS) и сыворотка бычьих эмбрионов. PBS готовили путем растворения таблеток (Пушинские лаборатории, Пушкино, Россия) в дистиллированной воде. Сыворотка бычьих эмбрионов была предоставлена проф. Тимашевым П.С. (Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова).



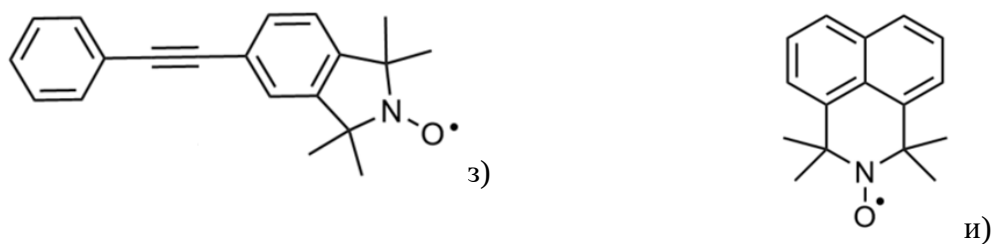


Рисунок 18. Используемые парамагнитные соединения: а – TEMPO; б – TEMPOL; в – TEMPONE; г – DPI; д - sl-DHQ; е - sl-DCF; ж - R5; з - A3; и - A5.

3.2. Приготовление образцов

3.2.1. Импрегнация PDLA парамагнитными молекулами в сверхкритическом диоксиде углерода

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [99]¹.

Для создания пористых полимерных матриц, импрегнированных парамагнитными молекулами, была использована «СКФ мини-лаборатория», созданная во ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника», РАН [218] (рис. 19). В качестве среды для СКФ импрегнации использовали диоксид углерода. Методику по вспениванию PDLA и импрегнации его парамагнитными соединениями в среде скCO₂ отработывали с использованием спинового зонда TEMPOL, а затем ее применяли для импрегнации PDLA радикалами TEMPONE, R5, DPI и спин-мечеными лекарствами sl-DHQ и sl-DCF. Навеску PDLA и спинового зонда TEMPOL загружали в реактор «СКФ мини-лаборатории»: полимер помещали в тefлоновый стаканчик со съемным дном, TEMPOL закладывали в лодочку из алюминиевой фольги на дно реактора. Реактор закрывали, заполняли жидким диоксидом углерода при комнатной температуре, после чего повышали давление и температуру для достижения сверхкритического состояния CO₂. Отсчет времени выдерживания образца в сверхкритических условиях начинали после достижения системой заданных параметров. После выдерживания полимера в растворе TEMPOL в скCO₂ в течение заданного времени осуществляли спуск давления в ручном режиме с использованием крана тонкой регулировки. Для оценки влияния параметров СКФ процесса на свойства получаемых структур их значения варьировались в диапазоне: давление - 16-22 МПа, температура - 40-43 °С, время выдерживания системы в СКФ условиях - 20-480 минут, время сброса давления - 3-80 минут. Точность термостатирования составляла ±1 °С, точность

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований: Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., **Иванова Т.А.**, Воробьева Н.Н., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н. ЭПР диагностика пористых матриц на основе D,L-полилактида, сформированных в среде сверхкритического CO₂ // Сверхкритические флюиды: теория и практика. — 2018. — т. 13, №1. — С. 86-93 [99]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 30%.

поддержания давления 0.1-0.2 МПа. Сосуд, содержащий зонд, по окончании процесса оказывался пустым, что свидетельствовало о перераспределении TEMPOL по объему реактора. В результате получали пористые полимерные структуры, высотой 1.0 см и диаметром 1.7 см, содержащие TEMPOL. Полученный матрикс разрезали на фрагменты размером 4x2x2 мм для определения содержания парамагнитного вещества в образце путем двойного интегрирования его спектра ЭПР (см. Раздел 2.3.2).

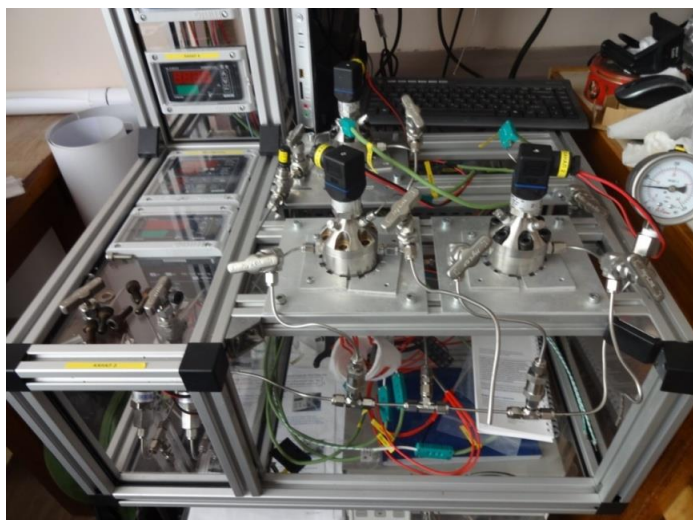


Рисунок 19. Фотография установки «СКФ мини-лаборатория», созданной во ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника», РАН [218].

Отношение объема пор к объему образца определяли путем взвешивания фрагментов образца известного объема. Для определения проницаемости пор использовали водный раствор красителя (чернила на водной основе Hewlett-Packard). Образец выдерживали в растворе красителя в течение суток, затем в течение суток сушили на воздухе при комнатной температуре. После высыхания образец разрезали и оценивали проницаемость пор для раствора красителя при помощи оптической микроскопии.

Для получения пленок пористые матриксы, допированные парамагнитными соединениями, размалывали в порошок, порошок помещали в стандартную форму для прессования между листами фольги и прессовали при температуре 60 °С и давлении 2 тонны на 1 см² в течение 30 секунд. Прессование выполнялось с помощью оборудования Specac Atlas Manual Hydraulic Press (25 ton). Для создания пленки толщиной 100-200 мкм использовали 0.25-0.35 г порошка. Типичная фотография получаемых пленок представлена на рисунке 20а. Для исследования вырезали образцы, не содержащие по данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) заметные дефекты (см. Рис. 20б).

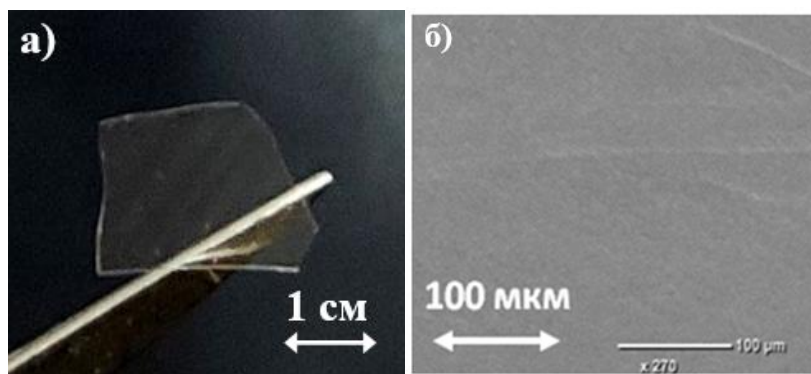


Рисунок 20. Полимерная пленка толщиной 200 мкм, допированная нитроксильным зондом: а - внешний вид; б - микрофотография образца, полученная при помощи СЭМ.

Для характеристики изменений, происходящих с пленками в ходе набухания и гидролиза полимера, использовали оптическую микроскопию (оптический микроскоп Soptor CX40M) и сканирующую электронную микроскопию (сканирующий электронный микроскоп JEOL JCM – 6000 Neoscope). Кривая набухания была получена в результате усреднения данных для пленок из PDL04 толщиной 200 мкм, массой 0.0047-0.0055 г и площадью 23-38 мм².

Импрегнацию P(NIPAM-*g*-PLA) спиновым зондом TEMPONE проводили в среде скСО₂ в установке, состоящей из ампулы диаметром 2 мм из полиэфирэфиркетона (PEEK) для регистрации спектров ЭПР при высоком давлении *in situ* и дополнительного сосуда для подготовки раствора спинового зонда в скСО₂ [219]. В ампулу помещали 2 мг сополимера P(NIPAM-*g*-PLA), в дополнительный сосуд помещали 3 мг спинового зонда TEMPONE в виде 80 мкл спиртового раствора. Для удаления кислорода и спирта ампулу и дополнительный сосуд вакуумировали, затем дополнительный сосуд заполняли скСО₂. Ампулу помещали в резонатор радиоспектрометра X-диапазона Bruker EMXplus-10/12 PX, производили напуск раствора спинового зонда TEMPONE в скСО₂ из дополнительного сосуда в ампулу и регистрировали спектры ЭПР в течение 4 часов при температуре 60 °С и давлении 10 МПа. Затем образец P(NIPAM-*g*-PLA) вынимали из ампулы из PEEK, помещали в кварцевую ампулу с внутренним диаметром 3 мм и регистрировали спектры ЭПР при 25 °С.

3.2.2. Приготовление растворов термочувствительных графт-сополимеров на основе N-изопропилакриламида и олиголактида (P(NIPAM-*g*-PLA))

Заданные количества сополимеров растворяли в предварительно приготовленном ~0.5 мМ растворе ТЕМРО в PBS для получения 5 масс.% растворов II-V и 10 масс.% растворов II-IV. Растворение сополимеров осуществляли в течение 24 часов при 4 °С. Затем ~7-9 мг растворов помещали в стеклянные капилляры с внутренним диаметром 2 мм и запаивали.

3.3. Спектроскопия ЭПР

3.3.1. Регистрация спектров

Спектры ЭПР регистрировали при помощи радиоспектрометра X-диапазона Bruker EMXplus-10/12 PX (Bruker, Карлсруэ, Германия) при комнатной температуре, а также при температуре $-183\text{ }^{\circ}\text{C}$ (90 K) в случае матриц из полилактида и в диапазоне температур $0\text{--}90\text{ }^{\circ}\text{C}$ в случае растворов термочувствительных полимеров. Для регистрации спектров при температуре, отличной от комнатной, резонатор с образцами обдували потоком газообразного азота. Температуру газа поддерживали с точностью $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ при помощи термостатирующей приставки фирмы Bruker. Перед регистрацией спектров образцы взвешивали на аналитических весах с точностью $\pm 2 \cdot 10^{-4}\text{ г}$.

Известно, что насыщение спектров ЭПР нитроксильных радикалов при температуре $-183\text{ }^{\circ}\text{C}$ обычно наблюдается при мощности электромагнитного излучения выше 0.5 мВт [129]. Предельная мощность, не вызывающая насыщения спектров растворов нитроксидов, регистрируемых при комнатной температуре, обычно составляет $1\text{--}2\text{ мВт}$. До начала работы с новыми системами нами были зарегистрированы зависимости интенсивности сигнала от квадратного корня из подаваемой мощности - кривые насыщения для разных систем. По границе линейного участка была определена максимально допустимая мощность излучения, не приводящая к насыщению сигнала. Величины, полученные для различных радикалов в матрице PDLLA при комнатной температуре, приведены в таблице 6. В качестве иллюстрации на рисунке 21 показана кривая насыщения сигнала TEMPONE в PDL04.

Таблица 6. Предельно допустимые значения мощности микроволнового излучения при регистрации спектров ЭПР парамагнитных соединений в матрице PDLLA при комнатной температуре.

Парамагнитное соединение	Предельно допустимая мощность излучения, мВт
TEMPONE	1.2
TEMPOL	0.8
sl-DCF	0.8
sl-DHQ	0.5
R5	0.25
DPI	0.4

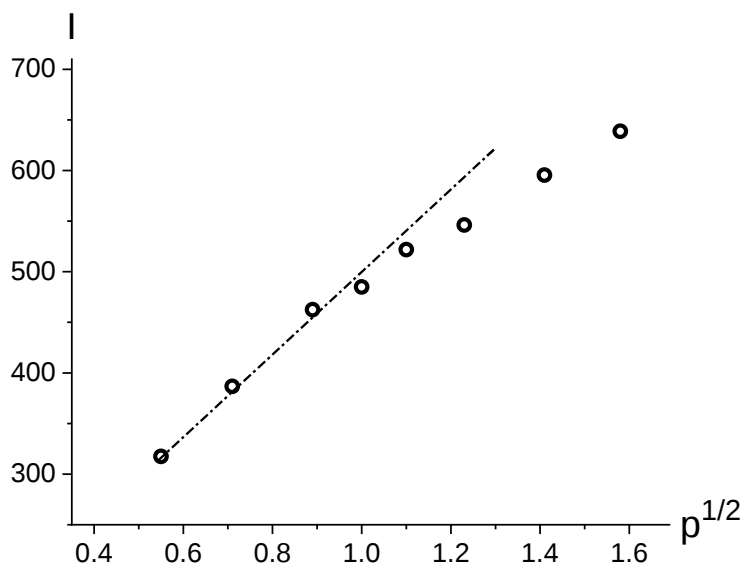


Рисунок 21. Кривая насыщения сигнала TEMPONE в PDL04 при комнатной температуре.

Образцы полимерных пленок и пористых матриц помещали в кварцевые ампулы с внутренним диаметром 3-4 мм. Высота образцов составляла ~ 5-10 мм, что соответствует геометрическим параметрам стандарта, используемого для калибровки спектрометра. Спектры водных растворов радикалов регистрировали в стеклянных капиллярах диаметром 1.0-1.6 мм, высота образцов не превышала 5 мм. Типичными параметрами записи спектров водных растворов были следующие значения: микроволновая мощность 0.8-1 мВт, амплитуда модуляции 0.04 мТл и ширина развертки 8 мТл.

В случае растворов термочувствительных полимеров каждый образец оставляли в резонаторе спектрометра при заданной температуре на 5 мин для установления равновесия. Типичными параметрами записи спектров были микроволновая мощность 0.8 мВт, амплитуда модуляции 0.04 мТл и ширина развертки 8 мТл. Подавление сигнала ЭПР быстрых спиновых зондов в фазе PBS осуществляли добавлением 10 мг $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ к 0.5 мл раствора полимера, как рекомендовано в [109].

3.3.2. Математическая обработка и моделирование спектров ЭПР

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работах [220,221]¹.

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Zubanova E.M., **Ivanova T.A.**, Ksendzov E.A., Kostyuk S.V., Timashev P.S., Melnikov M.Y., Golubeva E.N. Structure and dynamics of inhomogeneities in aqueous solutions of graft copolymers of N-isopropylacrylamide with lactide (P(NIPAM-graft-PLA)) by spin probe EPR spectroscopy // *Polymers*. — 2022. — Vol. 14, № 21. — P. 4746-4763 [263]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 60%.

Chumakova N.A., **Ivanova T.A.**, Golubeva E.N., Kokorin A.I. To the precision of measuring concentrations of nitroxide radicals in polymers by EPR technique // *Applied Magnetic Resonance*. — 2018. — Vol. 49 — P. 511–522 [221].

Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 20%.

Количество парамагнитных частиц в полимерных матрицах и в растворах определяли двумя методами. Первый подход основан на методе абсолютных измерений путем двойного интегрирования спектров ЭПР. Таким образом, определение концентрации вещества методом ЭПР не включает в себя трудозатратную и вносящую значительную погрешность стадию определения вероятности изучаемого перехода (в спектрофотометрии – коэффициента экстинкции). Однако из литературных источников известно [222], что существуют факторы, влияющие на точность измерения абсолютного числа парамагнитных центров с использованием данного подхода. Наиболее значимы среди них ошибки, связанные с использованием стандартов (неточное значение количества парамагнитных центров в них, различия в значениях g-факторов, геометрических размерах стандарта и исследуемого образца), насыщением мощности сигнала ЭПР, аппаратными погрешностями спектрометра (точность определения добротности, влияние шума при регистрации спектра, неоднородность магнитного поля в объеме образца, нелинейная развертка магнитного поля, нестабильность ЭПР спектрометра и др.), ошибки, связанные с обрезанием «хвостов» и двойным интегрированием спектра. Авторами работы [222] делался вывод, что общая ошибка расчета количества парамагнитных центров в основном зависит от погрешности интегрирования спектра ЭПР и может составлять 20–30%.

В работе [221] нами было показано, что при регистрации спектров с использованием современного ЭПР спектрометра, и программного обеспечения к нему, дающего возможность компьютерного анализа спектров, вклад ошибки интегрирования в общую ошибку становится менее существенным, чем считали ранее. Нами была проведена оценка влияния таких факторов как природа и концентрация радикала, отношение сигнал/шум и процедура интегрирования на точность измерения количества парамагнитного вещества в образце. В качестве исследуемых образцов разных типов были использованы следующие системы: растворы радикала A5 в толуоле и радикала A3 в ацетонитриле, пленки из PDLLA, допированного TEMPOL и sl-DHQ. Предварительно мы производили коррекцию базовой линии спектров. Ее считали удовлетворительной, если кривая двойного интегрирования начинала расти не раньше начала сигнала ЭПР. С целью определения ошибок, связанных с процедурой интегрирования, двойное интегрирование повторяли 5–6 раз при ширине развертки поля, значительно превышающей полную ширину анализируемого фрагмента спектра. Для определения погрешностей, зависящих от процедуры настройки спектрометра, проводили несколько экспериментов по схеме «установка образца в резонатор – настройка спектрометра – запись спектра – двойное интегрирование – подсчет количества парамагнитных центров». Погрешности измерений фактора добротности (Q-Value) оценивали путем наблюдения за соответствующим показателем спектрометра в течение ~1 мин. Известно также, что на градиент магнитного поля внутри

резонатора влияют масса и объем парамагнитного материала, связанные с высотой образца. В современных ЭПР спектрометрах фирмы Bruker эта зависимость учитывается автоматически. Тем не менее, во избежание дополнительных ошибок, высота наших образцов не превышала 5–7 мм; при этом все зонды находились в однородном магнитном поле.

Мы показали, что погрешности, возникающие при помещении образца в резонатор и настройке спектрометра, практически не зависят от его природы и не превышают 2–3 %. Этот вывод особенно важен при исследовании образцов полимеров, поскольку в таких случаях образец может содержать несколько отдельных фрагментов. Погрешность определения добротности не превышала 10 % независимо от образца (радикалы в жидких растворах в стандартной трубке диаметром 3 мм, в капилляре диаметром 1 мм или в полимерной пленке). Нами было установлено, что вклад ошибки интегрирования в значительной степени зависит от отношения сигнал/шум. Его влияние обусловлено в основном зависимостью точности коррекции базовой линии от степени зашумленности спектра ЭПР. Если отношение сигнал/шум больше 20, вклад ошибки интегрирования становится незначительным, и основной вклад в погрешность измерения концентрации вносят ошибки определения фактора добротности, обычно близкие к 8–10%. В среднем погрешность такого метода для определения количества нитроксильных радикалов в диапазоне $9.8 \cdot 10^{14}$ - $5.6 \cdot 10^{16}$ частиц в образце составляет 10-15%. В том случае, когда отношение сигнал-шум в спектре ЭПР менее 20, ошибка определения количества парамагнитных частиц путем двойного интегрирования спектра ЭПР резко возрастает.

Таким образом, если соотношение сигнал/шум составляло не менее 10, определение количества частиц осуществляли путем двойного интегрирования спектров ЭПР. Для определения числа частиц в водных растворах с низкой концентрацией парамагнитного вещества (число спинов 10^{12} - 10^{13}), использовался другой подход - количественный метод, основанный на конволюции экспериментальных зашумленных спектров со спектром ЭПР аналогичных частиц при больших концентрациях [128].

Средняя концентрация радикалов в различных пористых образцах, исследованных в данной работе, рассчитанная как общее количество парамагнитных молекул во всех фрагментах, отнесенное к массе образца, составляла $(2-8) \cdot 10^{18}$ частиц/г или $(2.5-10) \cdot 10^{18}$ частиц/см³ ($\rho_{PLA}=1.25$ г/см³). При такой концентрации зонда в случае его равномерного распределения по матрице расстояние между частицами составляет в среднем 50-70Å. При расстоянии между частицами больше 30Å диполь-дипольное взаимодействие не проявляется в спектрах стационарного метода ЭПР. Наличие диполь-дипольного уширения в спектрах ЭПР свидетельствует о наличии областей локального концентрирования парамагнитных молекул. Для обнаружения в исследуемых образцах областей локального концентрирования

парамагнитного вещества применяли методику, описанную в работе [129]. Используемый подход основан на анализе формы линий спектров ЭПР, зарегистрированных в отсутствие вращательной подвижности парамагнитных молекул (в жестком пределе). В качестве примера на рисунке 22а приведен спектр TEMPONE в PDL04, зарегистрированный при температуре -183 °С (90 К). Для установления локальной концентрации парамагнитного вещества определяли параметр

$$\Delta = (d_1/d) - (d_1/d)_0 \quad (20)$$

где $(d_1/d)_0 = 1.73 - 0.035 \cdot A_{zz}$. (см. рис. 22а). Градуировочная зависимость локальной концентрации от параметра Δ приведена на рисунке 22б.

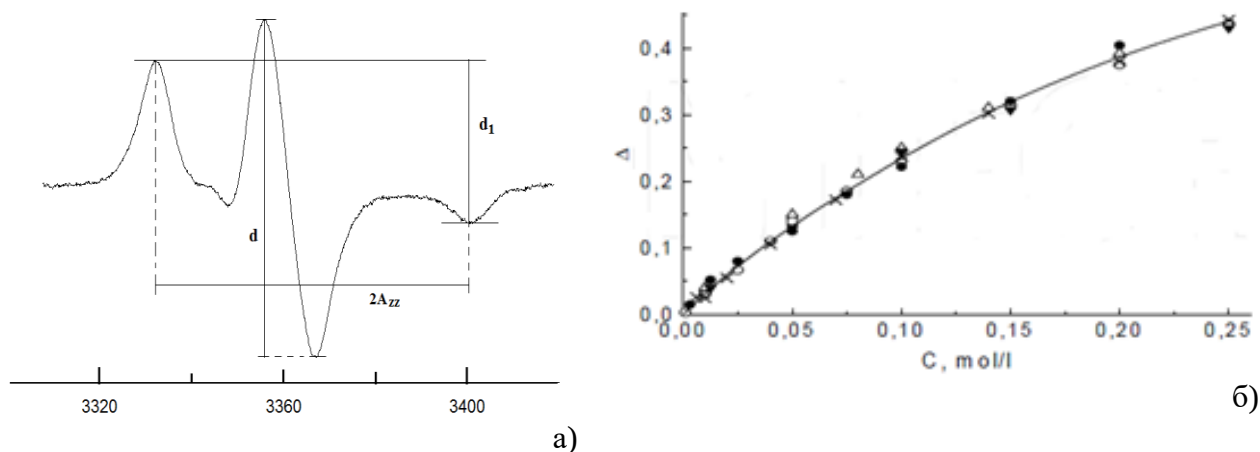


Рисунок 22. Иллюстрации к методу оценки локальной концентрации парамагнитных веществ: а - спектр ЭПР TEMPONE в PDL04, зарегистрированный при температуре -183 °С (90 К) и его параметры d , d_1 , $2A_{zz}$, необходимые для оценки Δ ; б - график зависимости локальной концентрации парамагнитных молекул от величины Δ [129].

Амплитуды и ширины спектральных линий измеряли с помощью программы ESRD (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) [125]. Также при помощи этой программы путем вычитания из спектра нитроксильного зонда в набухшей матрице спектра зонда в сухом полимере с определённым весовым коэффициентом k определяли интегральный вклад сигнала подвижных радикалов. Величина $1-k$ означает долю подвижного зонда в набухшем образце. Спектральные и динамические параметры нитроксидов были получены путем моделирования спектров ЭПР с использованием алгоритмов аппроксимации методом наименьших квадратов [223] при помощи программы MATLAB с надстройкой Easyspin (v. 5.2.28) [124]. Качество моделирования контролировали путем расчета среднеквадратичного отклонения теоретического спектра от экспериментального, которое составляло менее 1%.

В растворах термочувствительных полимеров выше НКТР амфифильный зонд ТЕМПО может находиться в двух разных по полярности окружениях: во внешнем полярном растворе и в неполярной глобуле. Магнитно-резонансные параметры и времена вращательной корреляции

для зонда в разных окружениях существенно различаются, поэтому в данной работе молекулы зонда, находящиеся во внешнем растворе, обозначим как частицы типа **А**, а молекулы зонда, находящиеся в неполярных глобулах, как частицы типа **Б**. Моделирование спектров радикалов в PBS и растворах полимеров, спектров частиц типа **А**, проводили согласно модели изотропного вращения, реализованной как функция «garlic» в Easyspin. Ширину линии варьировали путем изменения времени вращательной корреляции и дополнительной ширины линии, обусловленной неразрешенной СТВ на протонах. Форму линий спектров ЭПР описывали как конволюцию гауссовой и лоренцевой функции. Помимо расщеплений на ядрах ^{14}N для зондов типа **А** были учтены изотропное сверхтонкое расщепление на изотопах ^{13}C в четырех CH_3 -группах и пиперидинового кольца с $a_{\text{iso}}=0.54$ мТл. Чтобы упростить процедуру моделирования, вместо добавления шести парамагнитных ядер изменили содержание изотопов углерода (6% вместо 1%). В качестве начального приближения использовали следующие диагональные значения g-тензора и а-тензора сверхтонкого взаимодействия:

$$g_x = 2.0092, g_y = 2.0062, g_z = 2.0023;$$

$$A_{xx} = 0.73 \text{ мТл}, A_{yy} = 0.73 \text{ мТл}, A_{zz} = 3.65 \text{ мТл}.$$

Полученные в результате моделирования значения А-тензора сверхтонкого взаимодействия и времена вращательной корреляции для частиц типа **А** сравнивали со значениями соответствующих величин, полученными в результате моделирования спектров зонда ТЕМПО в PBS. Значения времен вращательной корреляции радикалов ТЕМПО в растворах сополимеров должны быть больше или равны значениям для ТЕМПО в PBS, так как из-за большей вязкости растворов сополимеров по сравнению с PBS частицы в них вращаются медленнее. Значения А-тензора сверхтонкого взаимодействия ТЕМПО в растворах сополимеров должны быть меньше или равны значениям в PBS, так как растворы сополимеров обладают меньшей полярностью, чем водные. Значения А-тензора сверхтонкого взаимодействия и времена вращательной корреляции, полученные в результате моделирования спектров ЭПР ТЕМПО в PBS, представлены в приложении 1. Получаемые в результате моделирования вклады гауссовой и лоренцевой функции в форму линии также сравнивали со значениями, полученными для ТЕМПО в PBS, их значения должны быть близки.

Моделирование спектров радикалов в полимерных глобулах (частицы типа **Б**) проводили согласно модели анизотропного «замедленного» движения при помощи функции «chili» в Easyspin. Эта модель основана на теории Шнайдера-Фрида [224], решающей уравнения для медленно вращающихся нитроксидов. Ширину линии варьировали путем изменения времен вращательной корреляции относительно трех осей X, Y и Z и дополнительного гауссовского вклада. В качестве начального приближения использовали следующие диагональные значения g-тензора и а-тензора сверхтонкого взаимодействия:

$$g_x = 2.0098, g_y = 2.0061, g_z = 2.0023;$$

$$A_{xx} = 0.73 \text{ мТл}, A_{yy} = 0.73 \text{ мТл}, A_{zz} = 3.35 \text{ мТл}.$$

Начальные значения магнитно-резонансных параметров были взяты из [225] для ТЕМПО в растворе каучука. При моделировании варьировали только компоненты g_x и A_{zz} , поскольку они более чувствительны к окружающей среде. Изотропные значения g_{iso} и a_{iso} рассчитывали как средние значения диагональных элементов:

$$g_{iso} = \frac{1}{3}(g_x + g_y + g_z) \quad (21)$$

$$a_{iso} = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (22)$$

Времена вращательной корреляции по разным осям и ширины линий варьировали независимо из-за их одновременного влияния на форму линии. Среднее (изотропное) время корреляции $t_{corr,iso}$ рассчитывали из значения коэффициента изотропной вращательной диффузии с использованием следующих уравнений:

$$D_{rot} = \frac{1}{3}(D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}) \quad (23)$$

$$D_{rot} = \frac{1}{6t} \quad (24)$$

Спектры радикалов ТЕМПО в системах, в которых зонд распределен как в водном растворе, так и в полимерных глобулах (суммарные спектры частиц **А** и **Б**), моделировали с помощью функции «chili» в Easyspin. Исходные параметры зондов в растворе были взяты из моделирования спектров радикала ТЕМПО в PBS при различных температурах. Исходные параметры для зондов в глобулах были взяты из моделирования спектров радикала ТЕМПО в полимер-водных системах, зарегистрированных в присутствии ионов Cu^{2+} при 70-90 °С. Мольную долю χ_B рассчитывали по значениям доли частиц в полимерных глобулах, полученных в результате моделирования спектров:

$$\chi_B = \frac{\text{weight}(B)}{1+\text{weight}(B)} * 100\% \quad (25)$$

Погрешности определения для моделируемых параметров были рассчитаны, как рекомендовано в [226] и составляли следующие значения:

$$a_{iso} \pm 0.01 \text{ мТл}$$

$$g_{iso} \pm 0.00003$$

$$t_{corr,x} \pm 3 \text{ нс}$$

$$t_{corr,y} \pm 0.1 \text{ нс}$$

$$t_{corr,z} \pm 0.2 \text{ нс}$$

Данные по содержанию зонда в глобулах, полученные из моделирования спектров ЭПР, с учетом ряда приближений позволяют рассчитать коэффициент распределения зонда (K_D) между глобулой и внешним раствором. Во-первых, предполагаем, что при температуре 45 °С и

выше весь полимер переходит в состояние глобулы. Во-вторых, необходимо оценить плотность полимерной глобулы. Плотность PNIPAM составляет 1.1 г/см³ и близка к плотности воды (1.0 г/см³). В глобуле PNIPAM может быть до 60 масс.% воды [227], соответственно плотность глобулы PNIPAM будет составлять около 1.06 г/см³. Плотность PLA выше - 1.2 г/см³, но так как его содержание в сополимере не более 17%, то предполагаем, что плотность глобул сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) будет выше, чем 1.06 г/см³, вероятно близка к 1.1 г/см³. Так как погрешность определения концентрации методом ЭПР оставляет около 10% и точное количество воды в глобуле неизвестно, то для удобства расчета можем плотность глобул принять равной 1.0 г/см³. Температура, при которой проводили расчет, была выбрана таким образом, чтобы не происходила гибель зонда в системе. С учетом этих допущений K_D при $T=47-50$ °C рассчитывали по следующей формуле:

$$K_D = \frac{c_{ТЕМПО, глобул}}{c_{ТЕМПО, p-p}} = \frac{n_{глоб}/v_{глоб}}{n_{p-p}/v_{p-p}} = \frac{\chi_{глоб} \cdot n/v_{глоб}}{\chi_{p-p} \cdot n/v_{p-p}} = \frac{\chi_{глоб} / \omega_p}{\chi_{p-p} / (1 - \omega_p)} = \frac{\chi_{глоб} \cdot (1 - \omega_p)}{\chi_{p-p} \cdot \omega_p} \quad (26)$$

3.4. Установление стабильности графт-сополимера P(NIPAM-*g*-PLA) в водных растворах

Применение систем доставки лекарств на основе термочувствительных сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) предполагает их контакт с биологическими жидкостями, что может привести к гидролизу полилактидного фрагмента и влиянию этого процесса на закономерности высвобождения БАС из матрицы. С целью установления стабильности P(NIPAM-*g*-PLA) в водных растворах был проведен следующий эксперимент. В качестве исследуемой системы нами был выбран раствор ТЕМПО в 5 масс.% водном растворе **V**, содержащем наибольшее количество полилактида по массе из используемых в данной работе сополимеров, чтобы гидролиз сополимера протекал более интенсивно. Виалы со свежеприготовленным раствором сополимера (~5 мл) помещали в шейкер-инкубатор ES-20 (Biosan, Латвия) и выдерживали в нем при постоянной температуре выше НКТР - 27 °C и 37 °C. Через определенные промежутки времени растворы перемещали в холодильник на ~1 сутки для полного растворения сополимера, затем измеряли pH и отбирали пробу раствора массой 0.007-0.008 г. и регистрировали ее спектр ЭПР в температурном диапазоне 25-70 °C. После отбора пробы виалы с раствором сополимера перемещали из холодильника обратно в шейкер для дальнейшего выдерживания системы при соответствующей температуре выше НКТР. Затем было проведено моделирование температурных зависимостей спектров ЭПР ТЕМПО проб (см. Раздел 2.3.2.), взятых через определенные промежутки времени, в диапазоне 25-70 °C и на основании полученных данных определяли НКТР в 5 масс.% водных растворах **V** при различных температурах (27 °C и 37 °C) и временах гидролиза сополимера в исследуемой системе.

3.5. Кинетика высвобождения парамагнитных молекул из полимерных структур в жидкую среду

3.5.1. Кинетика процессов с участием парамагнитных молекул при выдерживании матриксов из PDLLA в водных растворах

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работах [1,228,229]¹.

Часть полимерного образца (вспененного матрикса или пленки) известной массы (0.02-0.05 г), содержащую заранее определенное методом ЭПР количество парамагнитного допанта (10^{17} - 10^{18} спин/г), помещали в вialу с известным количеством водной среды (около 1.7 г). В качестве среды использовали PBS (pH=7.4) и сыворотку бычьих эмбрионов. Все эксперименты по высвобождению зонда из матриц PDLLA проводили при температуре 37 °С в шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия). Через определенные промежутки времени отбирали пробы раствора массой около 0.002-0.004 г, регистрировали спектры ЭПР и определяли количество парамагнитного вещества в пробе. На основании полученных данных определяли количество парамагнитного вещества, находящегося в жидкости, и, таким образом, устанавливали скорость высвобождения парамагнитных молекул из полимерной матрицы.

Известно, что гидролиз полилактида сопровождается образованием молочной кислоты, которая ускоряет процесс разложения полимера, и, следовательно, увеличивает скорость выхода молекул допанта из матрицы [230–234]. В связи с этим было необходимо поддерживать постоянную буферную емкость среды, в которую происходит высвобождение вещества. Данную проблему решали путем замены среды. В начале процесса раствор заменяли один раз в два дня, начиная с третьей недели - каждый день. При замене раствора большую часть жидкости отбирали и добавляли новый раствор, определенной массы, при этом значительная часть парамагнитных молекул, высвобожденных из полимерной матрицы, удаляли вместе с раствором.

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Иванова Т.А., Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., Лунин В.В. Кинетика высвобождения нитроксильного радикала TEMPONE из D,L-полилактида, вспененного в среде сверхкритического диоксида углерода // Сверхкритические флюиды: теория и практика. — 2019. — т. 14, №1. — С. 67-70 [228]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 50%.

Chumakova N.A., Golubeva E.N., Kuzin S.V., **Ivanova T.A.**, Grigoriev I.A., Kostjuk S.V., Melnikov M.Y. New insight into the mechanism of drug release from poly(D,L-lactide) film by electron paramagnetic resonance // Polymers. — 2020. — Vol. 12, № 12. — P. 3046-3067 [1]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 30%.

Kuzin S.V., **Ivanova T.A.**, Timashev P.S., Golubeva E.N. Mechanism based on formation, closure and overgrowth of pores describing zero-order release from polylactide films // Moscow University Chemistry Bulletin. — 2024. — Vol. 79, № 6. — P. 442–451 [229]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 50%.

Для оценки устойчивости нитроксильных радикалов в полимерной пленке, помещенной в различные среды, имитирующие биологические жидкости, был проведен следующий эксперимент. Пленки, допированные нитроксильными радикалами, были помещены в PBS и раствор аскорбиновой кислоты в PBS известной концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ г/мл, такая концентрация кислоты не приводит к пробою буфера). Через определенные промежутки времени пленки доставали из жидкости, обсушивали с помощью фильтровальной бумаги, регистрировали спектры ЭПР и определяли концентрацию радикала в пленке.

Для получения количественных характеристик процессов набухания полилактида образцы пленки через определенные промежутки времени доставали из PBS, обсушивали с помощью фильтровальной бумаги и взвешивали. В качестве характеристики набухания использовали индекс набухания (SI), рассчитанный по формуле: $SI = (m_t - m_0)/m_0$, где m_0 – масса полимерной пленки в начальный момент времени (до помещения в жидкую среду), m_t – масса пленки в момент времени t .

Моделирование высвобождения DPI из пленок PDL02 было выполнено с использованием модели, описанной в работе [1]. Первую стадию, описывающую высвобождение через приповерхностные поры не учитывали. Высвобождение зонда описывали средним коэффициентом диффузии:

$$D(t) = \frac{\varphi(t)}{1 - \varphi(t) + \kappa \varphi(t)} \kappa D_L \quad (27)$$

где $\kappa = C_S/C_L$ – константа распределения допанта между полимерной и жидкой фазами. В случае пленок толщиной 130 и 160 мкм высвобождение зонда начинается с задержкой $t_{lag} \approx 7$ -10 дней, поэтому функцию пористости $\varphi(t)$ сдвигали во временной области [1]:

$$\varphi(t) = \left(1 - \exp\left(-k(t - t_{lag})\right)\right)^{1.5} \quad (28)$$

Предполагается, что $\varphi(t) = 0$ при $t < t_{lag}$. Параметр k регулирует скорость роста функции. Предельное значение функции пористости на бесконечном времени равно 1, что означает открытие со временем всех пор в матрице.

Аппроксимация кинетических данных основывалась на решении закона Фика для нормированного распределения допанта в матрице $c(x, t) = C(x, t)/C_0$:

$$c_t(x, t) = (D(t)c_x(x, t))_x \quad (29)$$

где индексы x и t обозначают соответствующие частные производные. $x = 0$ соответствует поверхности пленки, а $x = L/2$ – ее центру. Были использованы следующие условия: начальное - $c(x, 0) = 1$ (равномерное распределение) и граничные - $c(0, t) = 0$ (условие идеального набухания) и $c_x(L/2, t) = 0$ (условие зеркальной симметрии пленки).

Нормализованную скорость высвобождения рассчитывали следующим образом:

$$\frac{1}{N_0} \frac{dN_{out}}{dt} = \frac{2D(x=0,t)}{L} c_x(x=0, t) \quad (30)$$

Кривые высвобождения для всех толщин пленок аппроксимировали в интегральной форме. Численное решение уравнения диффузии (30), связанные с ним расчеты кинетических кривых высвобождения и аппроксимация методом наименьших квадратов были выполнены в программе Mathematica 13.

3.5.2. Кинетика высвобождения ТЕМПО из глобул PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) в PBS

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [235]¹.

Пробы 5 масс.% растворов **I** и **V** в PBS, содержащих 0.5 мМ ТЕМПО (см. Таблицу 5), массой 0.006-0.010 г помещали в капилляры и регистрировали спектры ЭПР полученных образцов при температурах 32 и 37 °С для **V** и 37 °С для **I**. Затем капилляры перемещали в стакан с водой при 50 °С и выдерживали в течение 3 минут, дожидаясь разделения фаз полимер-вода вследствие протекания процессов коллапса. Затем, не вынимая капилляров с образцами из стакана с горячей водой, из капилляров отбирали максимально возможное количество жидкости (в образце оставалось менее 5% внешнего раствора) и регистрировали спектры ЭПР сформированных полимерных глобул при 50 °С. Путем двойного интегрирования зарегистрированных спектров ЭПР определяли количество спинов, оставшихся в системе после изъятия внешнего раствора, содержащего зонд. Затем в капилляры при 50 °С добавляли PBS и быстро переносили образцы в резонатор с заранее выставленной температурой: 32 или 37 °С для раствора **V** и 37 °С для раствора **I**. Температуры эксперимента выбирали таким образом, чтобы в растворе существовали неоднородности ($T_{эксп} > T_{НКТР}$) и температура системы была близка к физиологической. Через определенные промежутки времени регистрировали спектры ЭПР этих образцов, которые представляли собой сумму спектров зонда, локализованного в неполярных глобулах, и зонда, высвободившегося из глобул во внешнюю полярную среду. В перерывах между регистрацией спектров образцы выдерживали в шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия) при соответствующей температуре - 32 или 37 °С. Перед выдерживанием в шейкере капилляры запаивали для предотвращения испарения жидкости из образцов [235].

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Ivanova T.A., Zubanova E.M., Timashev P.S., Golubeva E.N. EPR study of controlled drug release from PNIPAM and P(NIPAM-*g*-PLA) globules // Russian Journal of Physical Chemistry B. — 2024. — Vol. 18, №. 3. — P. 780–787 [235]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 60%.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

4.1. Полимерные матрицы из PDLA, допированные нитроксильными зондами: методы формирования и кинетические закономерности высвобождения допантов

Пористые матрицы из алифатических полиэфиров (скаффолды) могут быть использованы в медицине в качестве временных протезов и систем доставки лекарств. В этом случае они должны содержать связанные между собой поры разного размера. Это необходимо для контролируемого высвобождения БАС из матрицы и прорастания в них клеточных культур. Сверхкритические флюидные технологии на основе scCO_2 – один из методов формирования пористых полимерных матриц. Также scCO_2 может применяться для импрегнации полимерных материалов БАС, при этом процессы вспенивания и импрегнации полимера можно проводить одновременно. Для полимерных конструкций, допированных лекарствами, очень важна равномерность распределения введенного соединения по матрице. Эта характеристика полимерной конструкции существенным образом влияет на кинетические закономерности высвобождения допанта из нее. Наличие областей локального концентрирования зонда может привести к появлению участков резкого выброса введенного вещества («burst») на кинетических кривых его высвобождения, что негативно сказывается при лечении, так как доставка БАС становится неконтролируемой. Использование нитроксильных радикалов в качестве допантов позволяет оценивать степень равномерности распределения зонда по матрице, устанавливать кинетические закономерности высвобождения зонда из нее, описывать изменения, происходящие с матрицей в результате гидролиза, методом спектроскопии ЭПР в рамках методики спинового зонда.

Полученные вспененные скаффолды, равномерно допированные БАС, могут служить материалом для формирования других систем доставки лекарств - пленок. Скаффолды измельчают и из полученных микрочастиц путем прессования получают пленки разной толщины, также допированные БАС. Таким образом, перед нами стояла задача подбора оптимальных условий СКФ процесса для получения макроскопически однородных матриц, имеющих систему взаимосвязанных пор разного размера и характеризующихся равномерным распределением допанта по матрице.

4.1.1. Пористые скаффолды на основе PDLA

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работах [99,228]¹.

4.1.1.1. Формирование вспененных скаффолдов из PDL04, допированных спиновыми зондами в среде scCO_2

На основании анализа литературных данных (см. Раздел 1.3) было выявлено, что вспенивание полилактида в среде scCO_2 рекомендуется проводить при давлении 10-20 МПа и температуре 40-45 °С. Кроме того, необходимо учитывать такие параметры как время выдерживания образца в СКФ условиях и время сброса давления. Литературные данные при подборе параметров СКФ процесса опираются, в основном, на оценку архитектоники получаемых матриц (среднего размера пор, их взаимосвязанности, ширины распределения пор по размерам). В данной работе кроме этих параметров мы также контролировали равномерность распределения зонда по матрице в зависимости от условий СКФ процесса, в которых она была получена [99].

Температуру процесса в данной работе не варьировали, и она находилась в диапазоне 40-43 °С. В ходе экспериментов нами было обнаружено, что давление, при котором полимер (PDL04) выдерживают в среде scCO_2 , влияет на равномерность вспенивания скаффолда: при давлении ниже 16 МПа образуются неравномерно вспененные полимерные конструкции (см. Рис. 23), что не удовлетворяет критериям применимости полимерных матриц в медицине. Все следующие эксперименты проводили при давлении 16 МПа и выше.

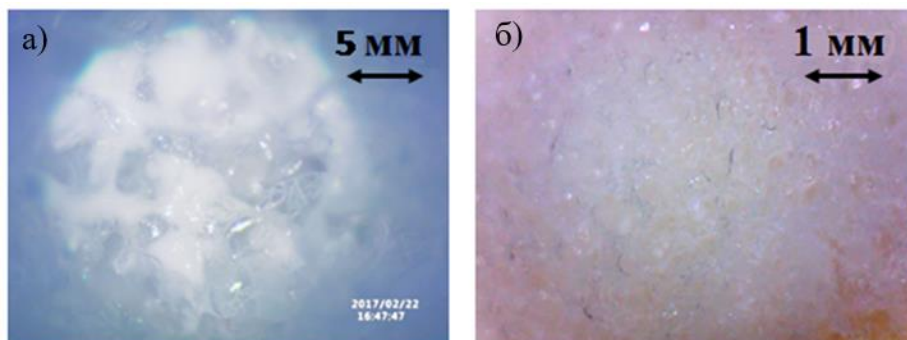


Рисунок 23. Микрофотографии образцов вспененного PDL04, полученных при давлении: а - 14 МПа; б - 16 МПа.

1 При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., **Иванова Т.А.**, Воробьева Н.Н., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н. ЭПР диагностика пористых матриц на основе D,L-полилактида, сформированных в среде сверхкритического CO_2 // Сверхкритические флюиды: теория и практика. — 2018. — т. 13, №1. — С. 86-93 [99]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 30%.

Иванова Т.А., Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., Лунин В.В. Кинетика высвобождения нитроксильного радикала TEMPONE из D,L-полилактида, вспененного в среде сверхкритического диоксида углерода // Сверхкритические флюиды: теория и практика. — 2019. — т. 14, №1. — С. 67-70 [228]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 50%.

Существенным фактором, определяющим качество импрегнации полимера парамагнитным веществом с использованием сверхкритического флюидного растворителя, является равномерность распределения допанта по образцу. Действительно, процессы набухания полимера в сверхкритическом флюиде и вспенивания полимерной матрицы при сбросе давления, как правило, являются неравновесными. В таком случае велика вероятность получения неравномерно импрегнированных образцов. Нами было выявлено, что макроскопическое распределение зонда по образцу, то есть количество допанта, приходящееся на единицу массы полимера в различных фрагментах полученного вспененного скаффолда, в значительной степени зависит от условий импрегнации - давления и времени выдерживания в СКФ условиях. В таблице 7 приведена зависимость максимального отношения количества TEMPOL, приходящегося на грамм полимера в различных фрагментах вспененного образца, от условий СКФ импрегнации. Усреднение проводилось по шести фрагментам образца. Видно, что при одинаковом давлении, составляющем 18 МПа, разница в содержании TEMPOL в различных частях скаффолда варьируется в зависимости от времени выдерживания полимера в сверхкритических условиях от 82 раз (20 минут) до 2.3 раз (120 минут). При проведении процесса при различных давлениях с одинаковым временем выдерживания была обнаружена обратная зависимость между давлением и равномерностью распределения TEMPOL по образцу: чем выше нагнетали давление, тем менее макроскопически однородные образцы получали. Скаффолды, характеризующиеся наиболее равномерным распределением TEMPOL, получены при давлении 16 МПа.

Таблица 7. Зависимость максимального отношения количества TEMPOL, приходящегося на грамм полимера в разных частях вспененного скаффолда, от условий сверхкритической флюидной импрегнации. Время спуска давления - 3 мин.

Время выдерживания образца в сверхкритических условиях, мин	Давление 16 МПа	Давление 18 МПа	Давление 22 МПа
20	-	82±17	-
40	-	40±8	-
120	1.8±0.4	2.3±0.5	4.0±0.8
480*	1.1±0.2	-	-

* Время спуска давления составляло 50 мин.

Система связанных пор является одной из наиболее важных характеристик скаффолдов, рассматриваемых с точки зрения формирования клеточно-инженерных конструкций. В

настоящей работе степень связанности пор полученных образцов анализировали на основании их проницаемости для водного раствора красителя. Нами было установлено, что проницаемость пор в значительной степени зависит от скорости спуска давления (см. Рис. 24). При увеличении времени спуска давления образцы становятся более проницаемыми для водного раствора красителя и при времени спуска давления 20 минут и более большинство пор прокрашены.

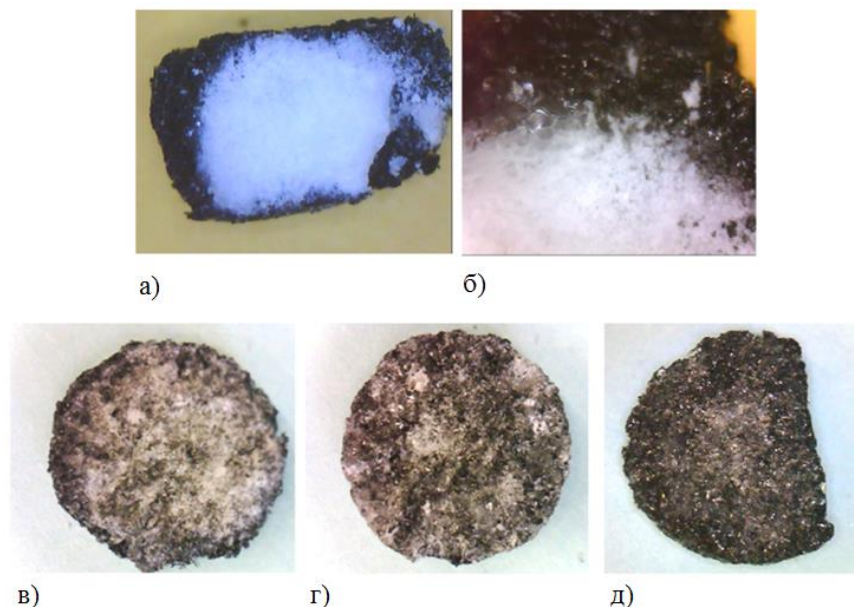


Рисунок 24. Фотографии срезов образцов, приготовленных при давлении 16 МПа и разных временах спуска давления: а, б - 3 мин; в - 5 мин; г - 7 мин; д - 20 мин. Срезы выполнены параллельно поверхности по середине образца.

Таким образом, наиболее равномерного распределения ТЕМПОЛ по образцу, характеризующемуся взаимосвязанными порами, удалось достичь при проведении СКФ импрегнации при температуре 41-43 °С, давлении 16 МПа, времени выдерживания 480 минут и времени спуска давления 50-80 минут (строка 5, табл. 7) [99]. Внешний вид такого скаффолда после СКФ формирования и микрофотография прокрашенного образца, показаны на рисунке 25. Видно, что полимер содержит как мезо- (5-10 мкм), так и макропоры (100 мкм и больше), которые связаны между собой и проницаемы для водной среды (рис. 25б). Кроме того, в таком скаффолде отношение объема пор к объему образца составляло около 75%. Согласно литературным данным [236,237] такая пористость соответствует требованиям, предъявляемым к матрицам медицинского назначения.

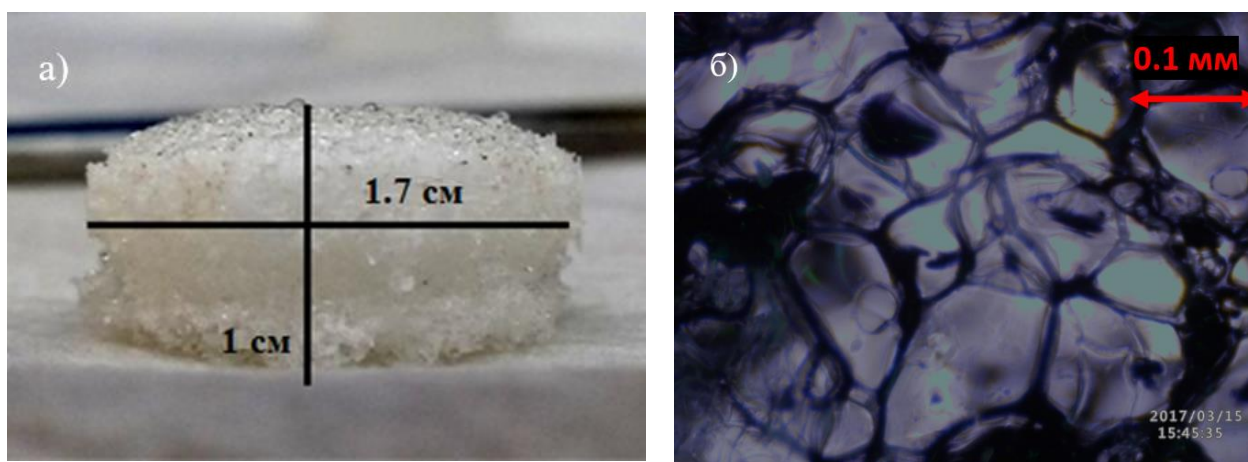


Рисунок 25. Скаффолд, полученный путем вспенивания полимера в СКФ условиях: при температуре 41 °С, давлении 16 МПа, времени выдерживания 480 минут и времени спуска давления 50 минут: а – внешний вид; б- микрофотография прокрашенного образца.

В полученном скаффолде определяли равномерность распределения парамагнитного вещества при помощи методики, описанной в работе [129]. Данный подход основан на анализе диполь - дипольного уширения спектра ЭПР образца, зарегистрированного в отсутствие подвижности парамагнитных молекул. В настоящей работе анализировали спектры, зарегистрированные при температуре -183 °С (90 К). Было установлено, что в спектрах PDLA, допированного TEMPONE, TEMPOL, sl-DHQ, sl-DCF, R5, DPI диполь - дипольное уширение не наблюдается, таким образом, импрегнация PDLA в подобранных нами условиях не приводит к заметному концентрированию парамагнитного вещества в полимерной матрице на молекулярном уровне.

На рисунке 26 представлены спектры ЭПР образцов вспененного PDL04, содержащего TEMPOL и sl-DHQ, зарегистрированные при температурах -183 °С и 25 °С. При температуре -183 °С расстояния между крайними компонентами в спектре ($2A_{zz}$) для обеих систем близки, и z компоненты тензора сверхтонкого взаимодействия составляют 3.42 и 3.41 мТл (34.2 Гс и 34.1 Гс) в случае TEMPOL и sl-DHQ соответственно. При комнатной температуре расстояние между крайними компонентами в спектре для обеих систем уменьшается за счет размораживания подвижности парамагнитных частиц. Для крупного зонда sl-DHQ оно существенно больше (6.64 мТл (66.4 Гс)), чем для компактного TEMPOL (6.58 мТл (65.8 Гс)), однако в обоих случаях форма спектра близка к форме спектра жесткого предела. Полученные результаты указывают на малую подвижность парамагнитных молекул - как крупного sl-DHQ, так и небольшого компактного TEMPOL в матрице PDL04.

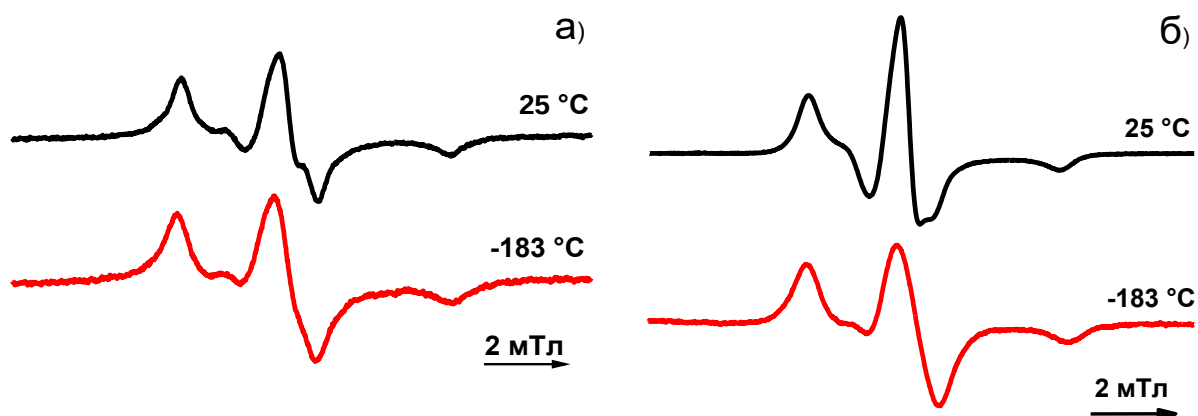


Рисунок 26. Зарегистрированные при температурах $-183\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ спектры ЭПР вспененных матриц PDL04, содержащих спиновые зонды: а - sl-DHQ; б - TEMPOL.

По мере набухания пористого матрикса на фоне сигнала радикалов в ненабухшем полимере появляется узкий триплет, форма которого совпадает с формой спектра ЭПР радикалов в PBS (рис. 27). Данный сигнал можно интерпретировать как сигнал зондов, находящихся в порах полимера, заполненных жидкостью. В таком случае относительная интегральная интенсивность триплета является характеристикой процессов набухания и порообразования внутри полимера. Со временем, однако, регистрация спектра набухшего скаффолда становится невозможной по причине значительного количества жидкости с высокой диэлектрической проницаемостью в его порах. Раствор, находящийся внутри матрикса, невозможно удалить, не повредив структуру образца. Таким образом, кинетические закономерности высвобождения допанта из пористого скаффолда можно анализировать только на основании интерпретации спектров проб внешнего раствора, в который высвобождается введенное соединение.

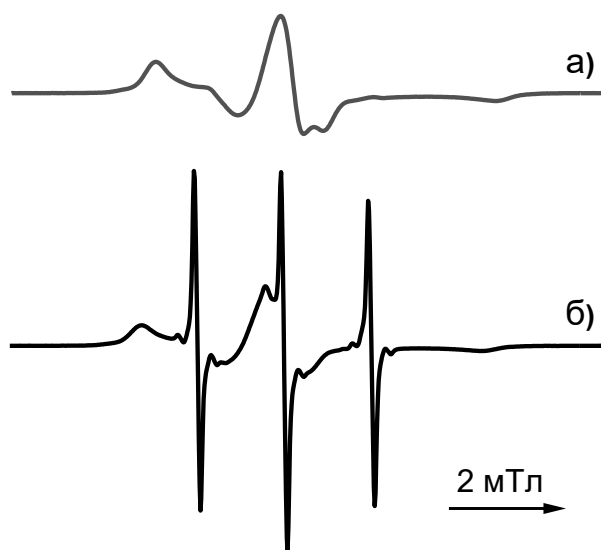


Рисунок 27. Спектры полимера PDL04, допированного радикалом TEMPONE: а – сухого; б – выдержанного в PBS в течение 8 дней при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.1.2. Кинетические закономерности высвобождения TEMPONE из полилактидных скаффолдов в PBS и сыворотку бычьих эмбрионов

Все эксперименты по установлению кинетических закономерностей высвобождения TEMPONE из матриц PDLLA проводили при температуре 37 °С. На рисунке 28 представлена кинетическая кривая высвобождения радикала TEMPONE из пористого матрикса PDL04 в PBS. Из рисунка видно, что молекулы допанта высвобождаются из матрикса в течение ~40 дней (рис. 28а) [228]. Эта зависимость, построенная в координатах от корня из времени (рис. 28б), может быть, в первом приближении описана законом Фика, следовательно, контролируется диффузией. Полученная кинетическая кривая качественно соответствует литературным данным по высвобождению допантов различной природы из пористых материалов [72,105,160,174–177].

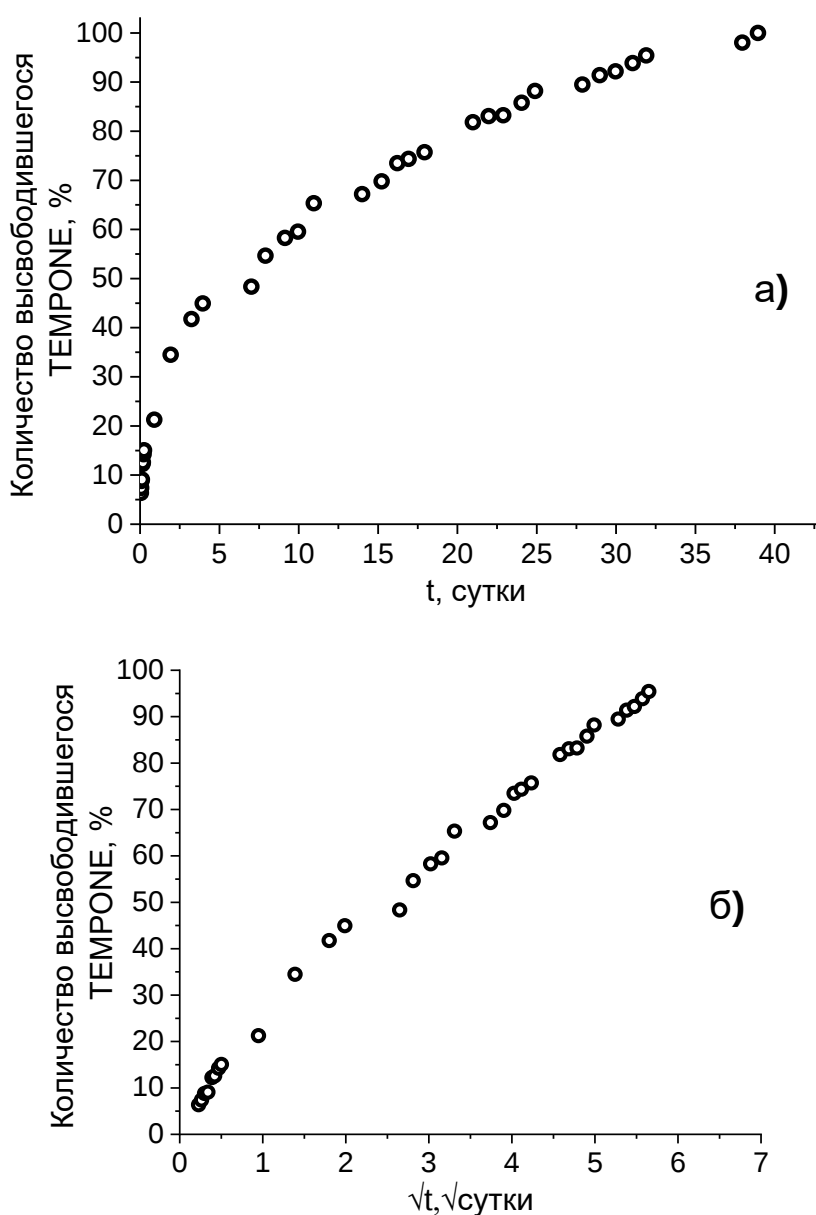


Рисунок 28. Кинетическая кривая высвобождения TEMPONE из пористого матрикса PDL04 в PBS при 37 °С: а – зависимость от времени; б – зависимость от корня из времени.

Необходимо отметить, что полное высвобождение TEMPONE из пористого матрикса PDL04 в PBS происходит задолго до момента разрушения полимерной структуры. В качестве иллюстрации на рисунке 29 представлена фотография набухшего полимерного матрикса PDL04 после полного высвобождения из него нитроксильного радикала TEMPONE.

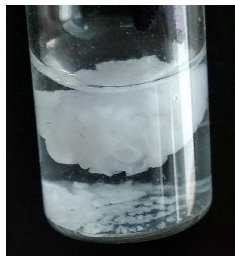


Рисунок 29. Набухший полимерный матрикс PDL04 после полного высвобождения из него радикала TEMPONE.

Для установления кинетических закономерностей высвобождения молекул допанта из полимерной матрицы в биологическую среду необходимо было предварительно определить стабильность парамагнитных молекул в этих условиях. Известно, что нитроксильные радикалы в биологических жидкостях превращаются в диамагнитные продукты, причем скорость превращения зависит от многих факторов. Так, аскорбат ионы восстанавливают нитроксиды до гидроксиламинов. Еще один компонент биологических сред - глутатионовый белок не окисляется нитроксильными радикалами напрямую, однако его добавка облегчает восстановление аскорбат анионом за счет перехвата радикалов аскорбата ($k=10$ л/(моль·с)) [214] (подробнее см. Раздел 1.6). На рисунке 30 приведена кинетическая кривая, демонстрирующая гибель нитроксильного радикала TEMPONE в сыворотке бычьих эмбрионов при 37 °С. В течение первых двух суток (период замены среды в экспериментах по высвобождению из полимерных матриксов) гибель радикала составляет около 17%.

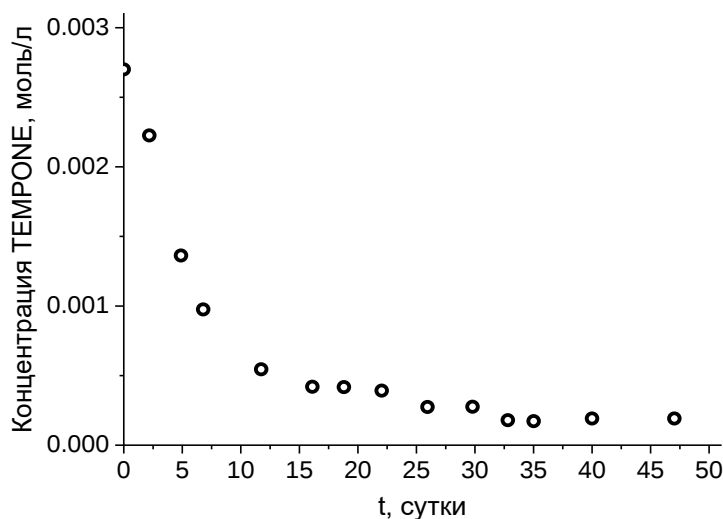


Рисунок 30. Зависимость концентрации радикала TEMPONE в сыворотке бычьих эмбрионов от времени, зарегистрированная при 37 °С.

На рисунке 31 представлена кинетическая кривая высвобождения радикала TEMPONE из пористого полимерного матрикса PDL04 в сыворотку бычьих эмбрионов. Количество высвободившегося TEMPONE не превышает 40% от первоначального количества зонда в матрице, что, вероятнее всего, связано с гибелью радикала в сыворотке. Эта зависимость, не описывается законом Фика (рис. 31б), что свидетельствует о более сложном механизме процесса высвобождения зонда в сыворотке по сравнению с PBS или о неприменимости метода спинового зонда для исследования таких процессов.

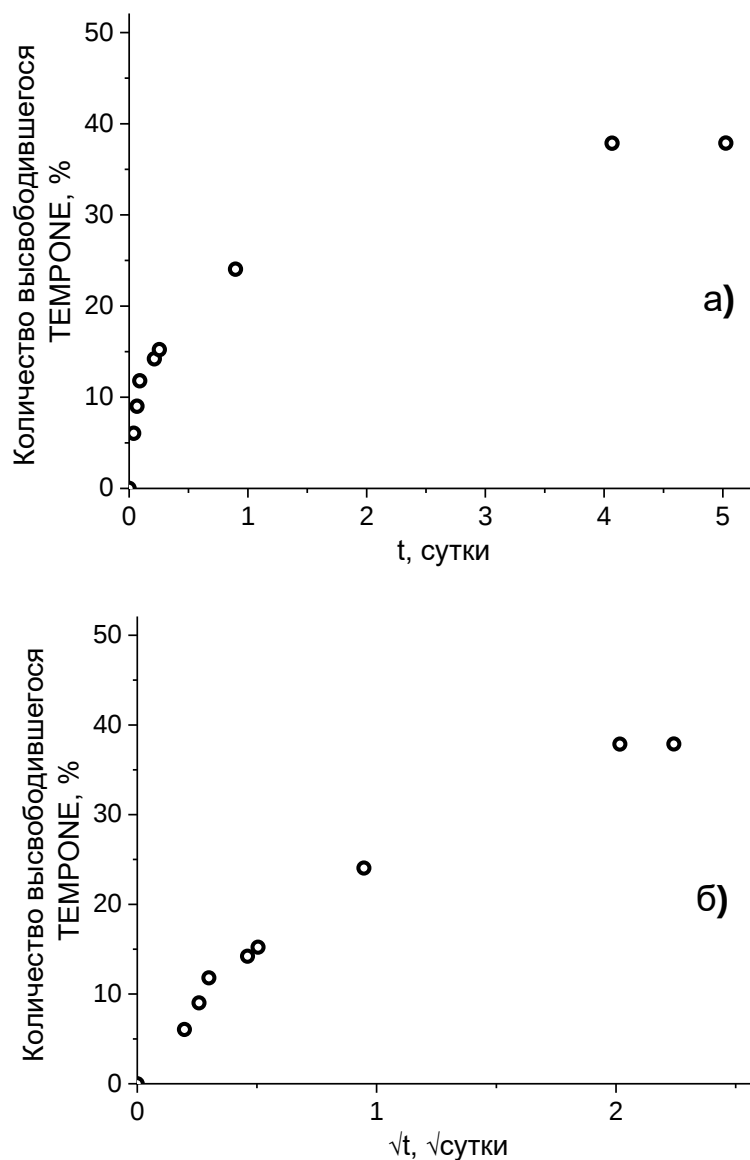


Рисунок 31. Кинетическая кривая высвобождения радикала TEMPONE из матрикса PDL04 в сыворотку бычьих эмбрионов при 37 °C: а – зависимость от времени; б - зависимость от корня из времени.

Кинетические закономерности высвобождения допанта определяются как архитектурой образца, так и процессами, протекающими в ходе набухания и гидролиза

полимера. В случае вспененных скаффолдов высвобождение определяется структурой пор, заранее сформированных в образце в результате СКФ процесса. Во время прорастания клеток внутрь скаффолда они контактируют непосредственно со стенками пор матрикса, хорошей моделью которых является полимерная пленка. В связи с этим она является наиболее подходящим объектом для установления механизма высвобождения малых органических молекул в водную среду. Во-первых, характеристики такого объекта – толщина и геометрические размеры образца – могут быть легко измерены и изменены в соответствии с целями эксперимента. Во-вторых, анализ формы спектров ЭПР набухших пленок позволяет отслеживать изменения, происходящие со структурой полимера в ходе его гидролиза на основании зависимости формы спектров от вращательной подвижности парамагнитных молекул.

4.1.2. Пленки PDLA

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работах [1,229,238]¹.

Погружение прозрачных сухих пленок PDLA в PBS приводит к их помутнению, что, по-видимому, связано с образованием пор, заполненных водным раствором. В качестве иллюстрации на рисунке 32а представлена пленка PDL02, выдержанная в PBS в течение 8 часов. Аналогичные изменения происходят и с пленкой PDL04. На рисунке 32б приведена временная зависимость индекса набухания (SI) пленки из PDL04 толщиной 200 мкм. Основное поглощение воды полимером происходит в течение 35 дней.

1 При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Chumakova N.A., Golubeva E.N., Kuzin S.V., **Ivanova T.A.**, Grigoriev I.A., Kostjuk S.V., Melnikov M.Y. New insight into the mechanism of drug release from poly(D,L-lactide) film by electron paramagnetic resonance // *Polymers*. — 2020. — Vol. 12, № 12. — P. 3046-3067 [1]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 30%.

Ivanova T.A., Melnikov M.Y., Timashev P.S., Golubeva E.N. pH-sensitive paramagnetic probe 4-(methyamino)-2-ethyl-5,5-dimethyl-4-pyridine-2-yl-2,5-dihydro-1h-imidazol-1-oxyl for controlling microacidity inside poly-D,L-lactide films during degradation in vitro // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. — 2023. — Vol. 17, № 2. — P. 471–477 [238]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 60%.

Kuzin S.V., **Ivanova T.A.**, Timashev P.S., Golubeva E.N. Mechanism based on formation, closure and overgrowth of pores describing zero-order release from polylactide films // *Moscow University Chemistry Bulletin*. — 2024. — Vol. 79, № 6. — P. 442–451 [229]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 50%.

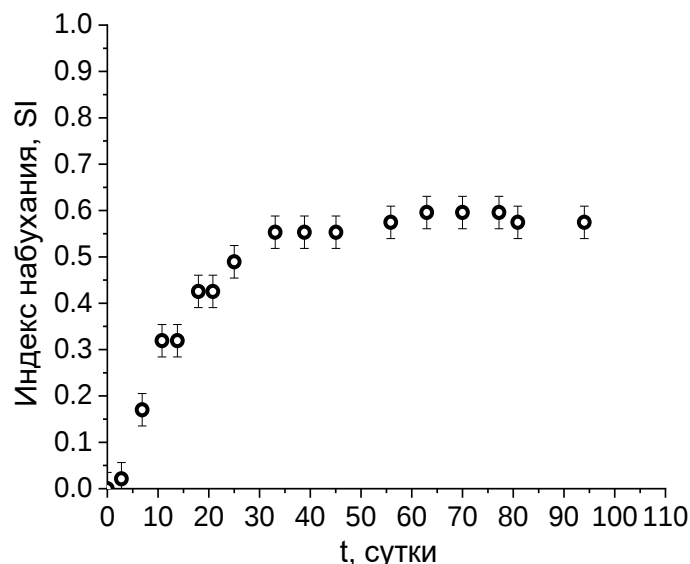


Рисунок. 32. а- внешний вид образца пленки PDL02 после выдерживания в PBS в течение 8 часов; б - зависимость индекса набухания пленки толщиной 200 мкм из PDL04 (0.0047 г, 28.5 мм²) от времени.

Поглощение воды, как известно [168], приводит к гидролизу полимерных цепей и образованию пор, заполненных водным раствором. Спектроскопия ЭПР в рамках методики спинового зонда позволяет характеризовать изменения, происходящие с микроокружением и микродинамикой парамагнитного зонда в результате этих процессов. На рисунке 33 показаны изменения формы спектра ЭПР TEMPONE в пленке PDL04 толщиной 200 мкм, погруженной в PBS, с течением времени. Уже через несколько часов на фоне сигнала радикалов в сухом полимере появляется узкий триплет, форма которого совпадает с формой спектра ЭПР радикалов в PBS. Данный сигнал соответствует сигналу зондов, находящихся в порах полимера, заполненных жидкостью. Спектры ЭПР пленок на всех этапах набухания могут быть представлены как сумма спектров радикалов в ненабухшем полимере и спектра радикалов в PBS, то есть в системе есть только два типа частиц: иммобилизованные в полимере и свободно вращающиеся в порах.

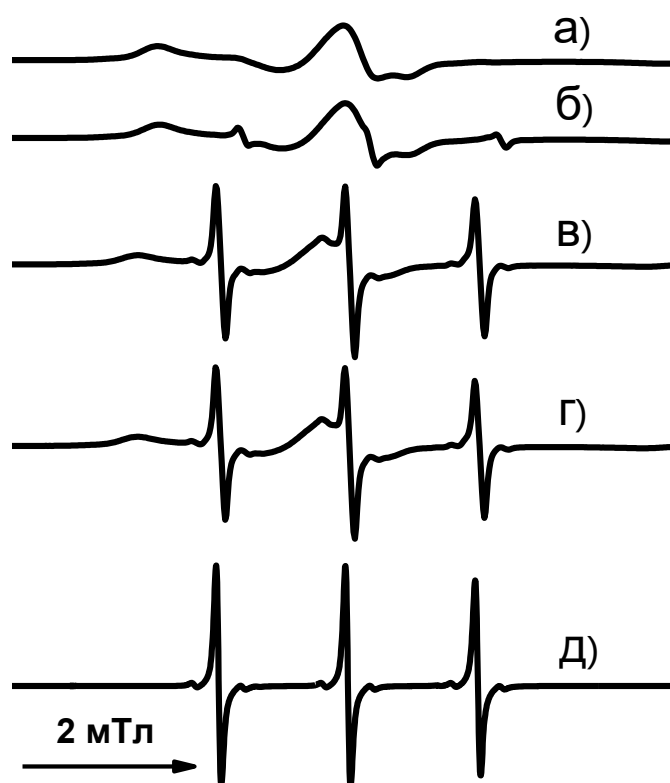


Рисунок 33. Изменение спектра ЭПР радикала TEMPONE в пленке PDL04 толщиной 200 мкм в ходе набухания образца в PBS при 37 °C: а – 0 суток; б – 1 сутки; в – 3 суток; г – 8 суток; д - спектр сравнения - радикал TEMPONE в PBS.

С целью определения влияния размера зондовой молекулы на характеристики процессов их высвобождения во внутренние полости и во внешнюю среду было проведено сравнение временных зависимостей количества подвижных парамагнитных молекул TEMPONE и спин-меченого диклофенака (sl-DCF) в пленках PDL04 толщиной 200 мкм при выдерживании образцов в PBS (рис. 34а). Для оценки размеров зондов была проведена оптимизация геометрических параметров TEMPONE и sl-DCF путем квантово-химических расчетов с использованием программного пакета ORCA [239,240] неограниченным методом функционала плотности с использованием функционала bp86 в базисе def2-SVP [241]. Расстояние между наиболее удаленными ядрами в молекуле TEMPONE составило 6.6 Å и 14.4 Å - в sl-DCF. Количество быстро вращающихся радикалов TEMPONE и sl-DCF со временем увеличивается и через 50-55 дней составляет около 85% от общего количества парамагнитных центров, содержащихся в материале к данному времени (рис. 34а). При этом скорости высвобождения в поры зондов разного размера близки, количество молекул допантов, локализованных в заполненных жидкостью порах симбатно степени набухания полимера (см. Рис. 34б).

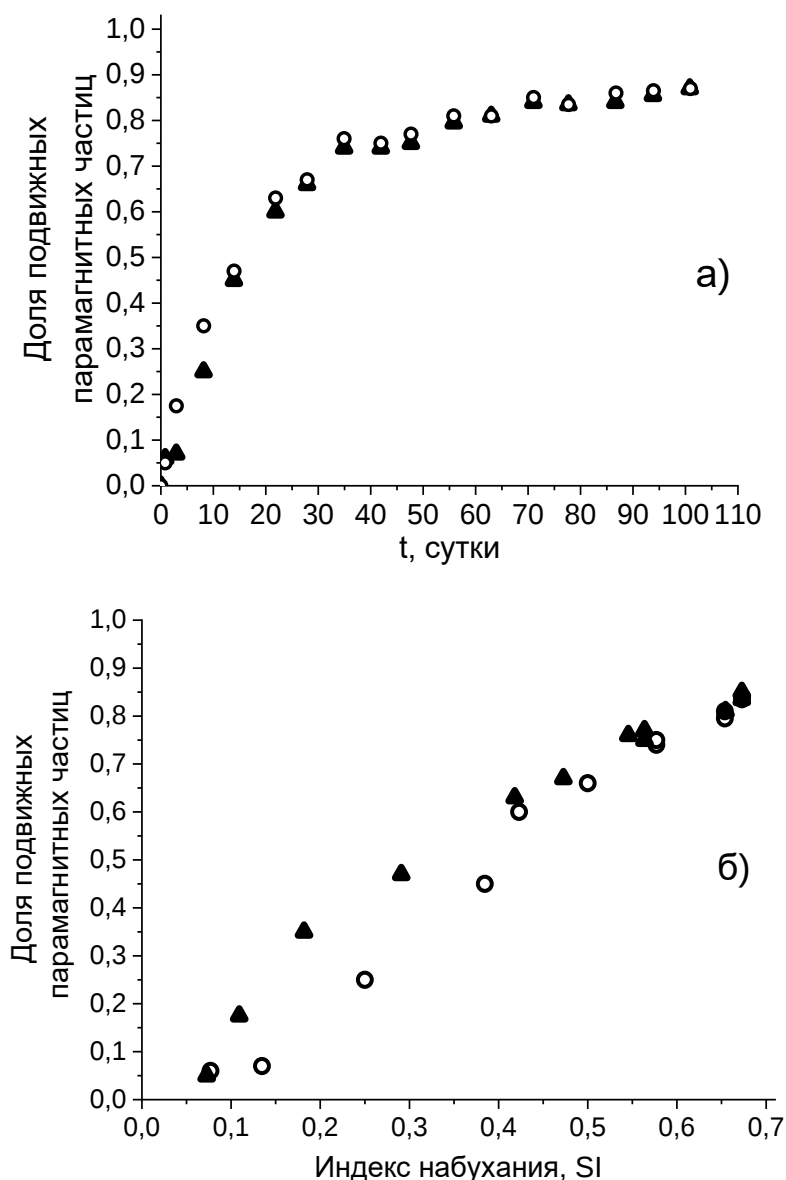


Рисунок 34. Зависимость количества быстро вращающихся парамагнитных молекул TEMPONE (○) и sl-DCF (▲) в пленках PDL04 толщиной 200 мкм, находящихся в PBS: а – от времени; б - от индекса набухания пленок.

Тот факт, что доля подвижных зондов зависит от времени выдерживания в PBS и от степени набухания, но практически не зависит от природы и размеров зонда, свидетельствует о том, что процесс высвобождения зондов в поры, образующиеся в полимерной пленке в результате набухания и гидролиза, лимитируется скоростью образования этих пор.

Со временем общее количество парамагнитных соединений в пленках PDL04 уменьшается (рис. 35). При этом высвобождение во внешний раствор зондовых молекул разного размера (TEMPONE, sl-DCF, R5) в течение ~90 дней после погружения образцов в водную среду практически не наблюдается. Таким образом, уменьшение количества парамагнитных частиц в пленке может быть связано только с их химическими превращениями.

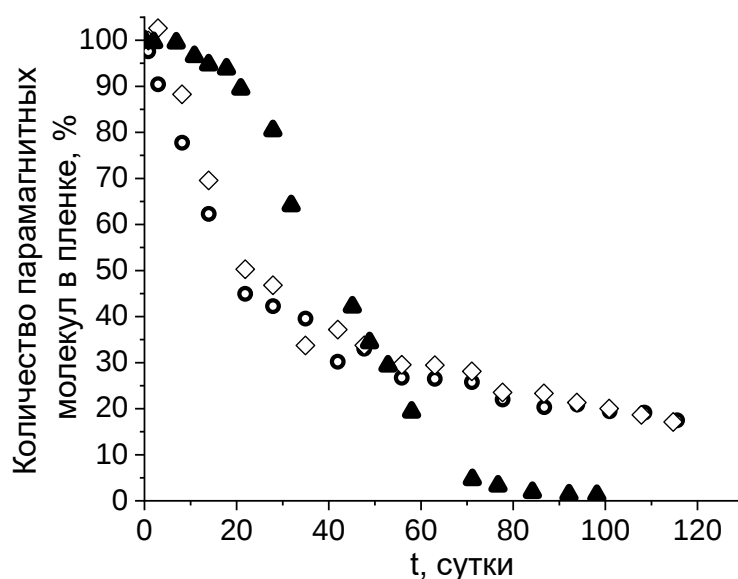


Рисунок 35. Зависимость количества радикалов в полимерных пленках R5/PDL04/180 мкм (▲), TEMPONE/PDL04/200 мкм (○), sl-DCF/PDL04/200 мкм (◇), помещенных в PBS, от времени.

Рассмотрим подробнее совокупность процессов, происходящих с участием спиновых зондов, на примере системы TEMPONE в пленке PDL04 (200 мкм). Кривая высвобождения TEMPONE из пленки PDL04 характеризуется длительным периодом индукции, составляющим около 100 дней (рис. 36) [1]. Уменьшение содержания TEMPONE в системе в этот период времени, происходит, вероятнее всего, в результате диспропорционирования радикалов в порах, заполненных раствором с низким pH, с образованием диамагнитных продуктов (см. Раздел 1.6., [214]). Однако с началом высвобождения зондов во внешний раствор общее число парамагнитных центров резко возрастает, что свидетельствует о протекании обратной реакции (8) в PBS с нейтральным pH, приводящей к частичному восстановлению парамагнетизма.

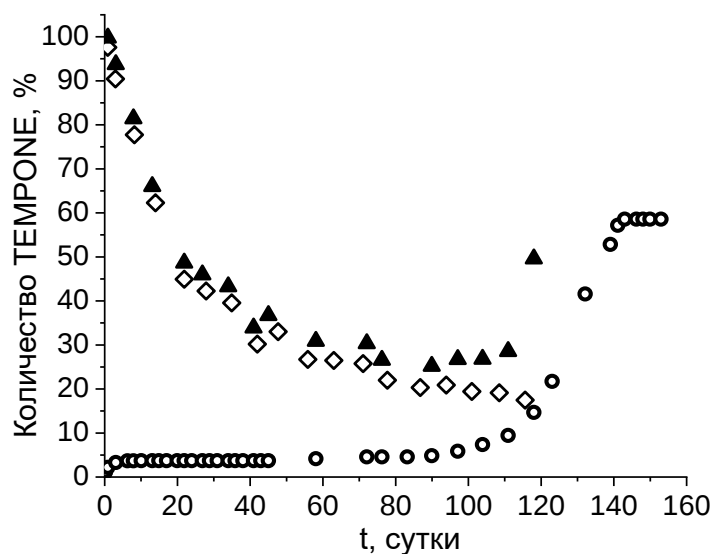


Рисунок 36. Временные зависимости количества TEMPONE в системе пленка PDL04 (200 мкм) – PBS: суммарная зависимость (▲), во внешнем растворе (○) и в пленке PDL04 (◇).

Еще одной причиной потери парамагнетизма в полимерной пленке может быть внешнее воздействие. Так, использование полимерных материалов, допированных БАС, предполагает их контакт с биологическими жидкостями - кровью, лимфой и т.д., которые содержат немало активных компонентов, вступающих в реакции с нитроксидами, прежде всего окислительно-восстановительного типа [132] (см. Раздел 1.6). Основным восстановителем, содержащимся в биологических жидкостях, является аскорбиновая кислота. На рисунке 37 представлены зависимости количества TEMPONE и sl-DCF в полимерных пленках, помещенных в PBS и в раствор аскорбиновой кислоты в PBS, от времени. Видно, что в пределах погрешности измерения кинетические кривые в присутствии и в отсутствие в растворе аскорбиновой кислоты совпадают. Эти данные также подтверждают тот факт, что в течение 90-100 дней поры, образующиеся в исследуемых пленках из PDL04, не контактируют с окружающей средой.

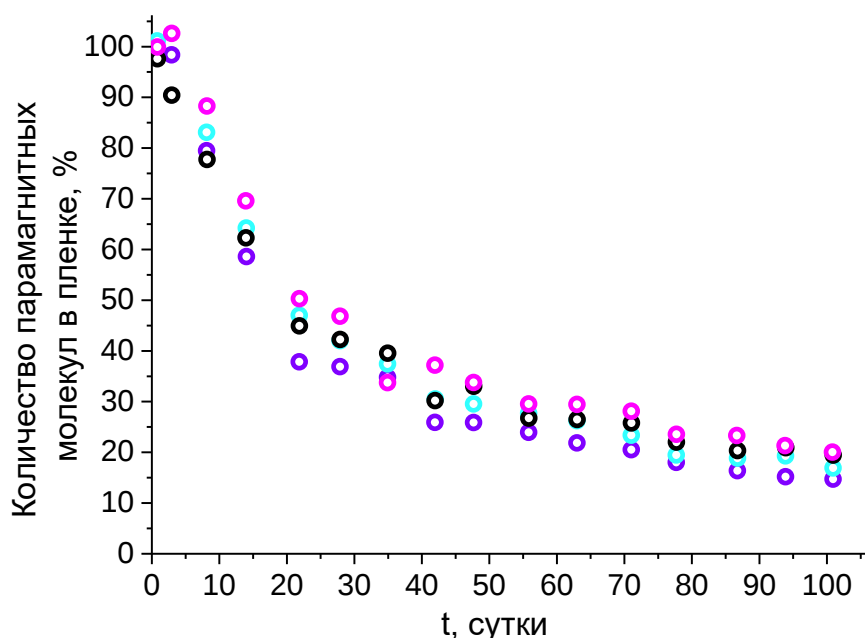


Рисунок 37. Зависимость количества парамагнитных соединений в полимерных пленках TEMPONE и sl-DCF в полимерных пленках PDL04, помещенных в PBS и раствор аскорбиновой кислоты в PBS от времени: TEMPONE/PBS – черные символы, TEMPONE/p-p аскорбиновой кислоты в PBS – фиолетовые символы, sl-DCF/PBS – розовые символы, sl-DCF/p-p аскорбиновой кислоты в PBS – голубые символы.

Среди факторов, влияющих на скорость высвобождения низкомолекулярных веществ из матриц алифатических полиэфиров, можно выделить скорость гидролиза полимерного материала. Известно, что полимеры с большей молекулярной массой гидролизуются медленнее [158]. Действительно, высвобождение TEMPOL из PDL02 [1], детектируемое по суммарному количеству парамагнитных частиц во внешней среде, протекает без периода индукции и значительно быстрее, чем в случае высвобождения близкого по строению зонда TEMPONE из

PDL04, характеризующегося большей молекулярной массой (см. Рис. 38). В связи с этим дальнейшие эксперименты были проведены с участием пленок из PDL02.

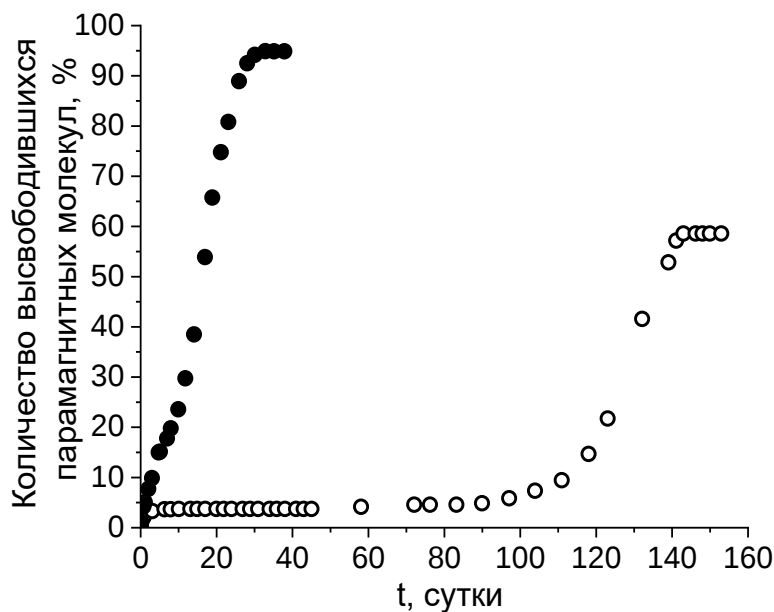


Рисунок 38. Кинетические кривые высвобождения зондов из полимерных пленок толщиной 200 мкм в PBS для систем: TEMPONE/PDL04 (○), TEMPOL/PDL02 (●) [1].

В целом, проведенные эксперименты позволяют заключить, что пленки PDL04 в течение 50 дней после погружения в жидкую среду постепенно набухают, поглощенная вода участвует в процессе гидролиза полимерных цепей. При этом высвобождение вещества из пор во внешнюю среду не наблюдается, так же как и не наблюдается проникновения молекул аскорбиновой кислоты в полимерную матрицу. Можно предположить, что поры образуются, в основном, в результате локального протекания автокаталитической реакции гидролиза полимера и не связаны с поверхностью образца. Действительно, изображения поверхности пленок PDL04, полученные при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (см. Рис. 39), демонстрируют, что первые поры на поверхности появляются только после 100 дней, хотя процессы набухания приводят к незначительным изменениям профиля поверхности – со временем она становится все более рельефной. При этом по данным ЭПР поры, заполненные жидкостью, образуются уже через сутки после погружения пленки в водную среду. На 101 сутки на поверхности образца отчетливо видны участки, содержащие много крупных и мелких пор, связанных с поверхностью. Полученные данные согласуются с отсутствием высвобождения молекул допанта из пленок PDL04 в течение 90 суток и началом высвобождения через ~100 суток. Напротив, многочисленные поры, связанные с поверхностью, возникают уже через 2 часа после погружения пленки из PDL02 в PBS, что согласуется с данными по кинетике высвобождения TEMPOL [1].

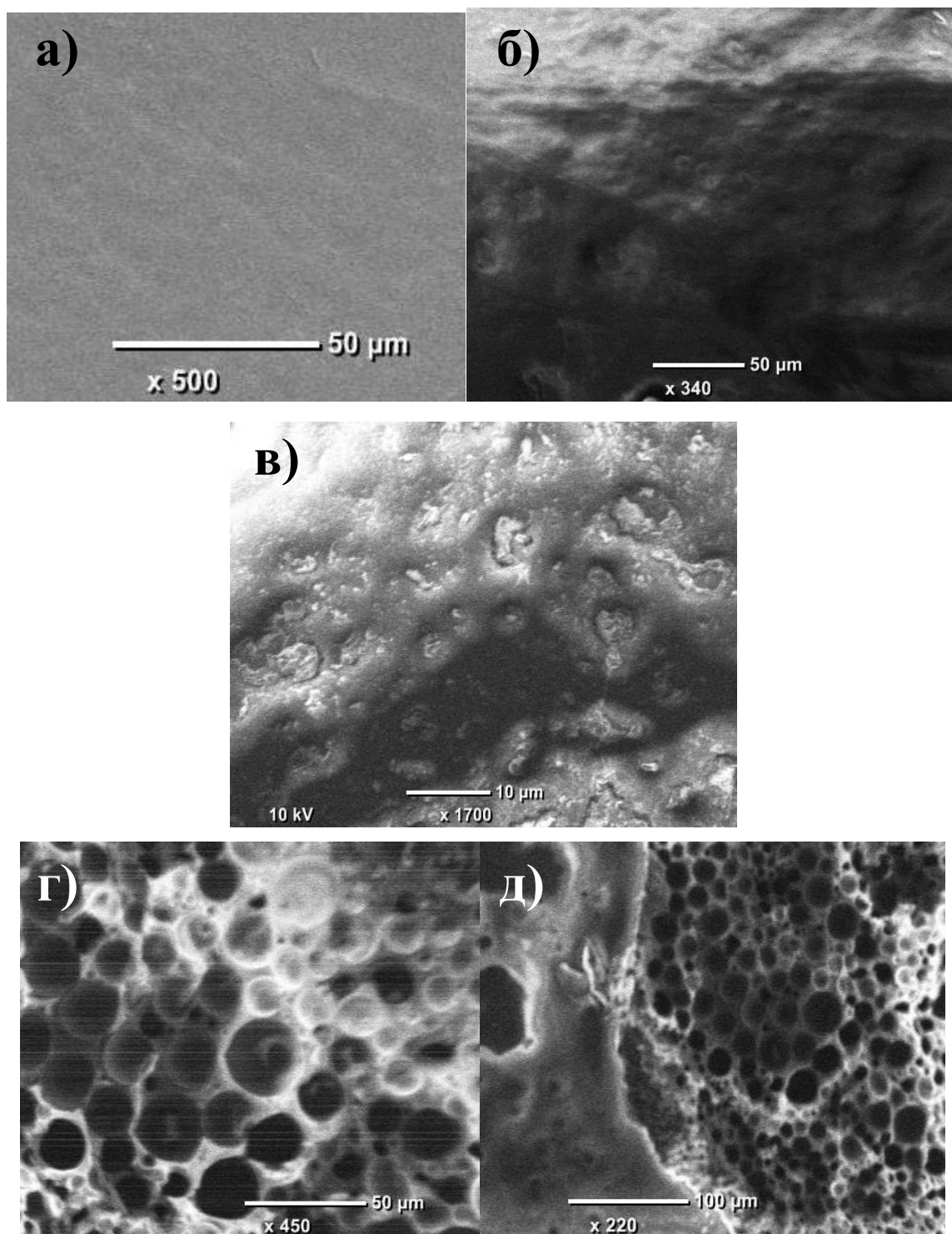


Рисунок 39. Изображения СЭМ пленки PDL04, находящейся в PBS в течение разного времени выдерживания: а - 1 сутки; б - 5 суток; в - 90 суток; г, д - 101 сутки.

Вопрос о механизме зарождения пор в матрицах алифатических полиэфиров неоднозначен. Многие авторы считают [167,188], что образование пор стартует с акта некаталитического гидролиза полиэфирной связи, сопровождаемого образованием кислотной группы, так как в большинстве случаев используется полимер с концевыми группами, закрытыми алкильными радикалами. Впоследствии реакция гидролиза алифатических

полиэфиров может протекать с гораздо более высокой скоростью за счет кислотного катализа, то есть автокаталитически. По нашему мнению, кислотные центры автокаталитического гидролиза могут присутствовать в матрицах алифатических сложных эфиров как изначально из-за неполного проведения реакции этерификации, так и образовываться в процессах хранения и транспортировки полимера. Для проверки этой гипотезы нами была предпринята попытка определения концентрации карбоксильных групп в используемом PDLA.

Существуют работы, в которых наличие карбоксильных концевых групп в полилактиде, определяли при помощи метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на основании анализа ^1H и ^{13}C спектров полимера [153,242–246]. К сожалению, метод ЯМР не обнаруживает наличие карбоксильных групп в исследуемых нами полимерах, что может быть связано с их высокими молекулярными массами и нестереорегулярностью. В работе [247] авторы описывают способ количественного определения карбоксильных концевых групп в поли-D,L-лактиде методом спектрофотометрии с применением раствора родамина 6G. В том случае, если в полимере присутствуют группы $-\text{COOH}$, в спектре поглощения появляется новый сигнал, отвечающий образуемому комплексу атома кислорода карбоксильной группы с иминной группой родамина 6G [248]. Данная методика была протестирована нами для PDL02, однако появление нового сигнала не было обнаружено. Следовательно, количество карбоксильных концевых групп в PDL02 ниже концентраций, определяемых при помощи данной методики, а именно менее $3.7 \cdot 10^{-6}$ моль/г. Это означает, что на одну COOH -группу приходится не менее чем 10 полимерных цепей [247].

Данные о наличии закисленных участков в полимерной матрице могут быть получены методом спектроскопии ЭПР в рамках методики спинового зонда. Использование pH-чувствительного нитроксильного радикала DPI в качестве допанта позволяет определять локальный pH внутри заполненных жидкостью пор набухших пленок. Этот зонд может существовать в трех состояниях (нейтральном, протонированном и дважды протонированном) (рис. 40), магнитно-резонансные параметры которых (g -фактор и константа сверхтонкого взаимодействия (a_{iso})) различаются. Величина a_{iso} может быть оценена как расстояние между компонентами спектров ЭПР свободно вращающихся радикалов. Диапазон значений pH, определяемый с помощью этого зонда, составляет 2–7, что соответствует значениям расстояния между левой и центральной компонентами (ΔB) равным 1.40–1.52 мТл (13.95–15.24 Гс) [249]. Калибровочная кривая для нитроксильного радикала DPI представлена на рисунке 41а.

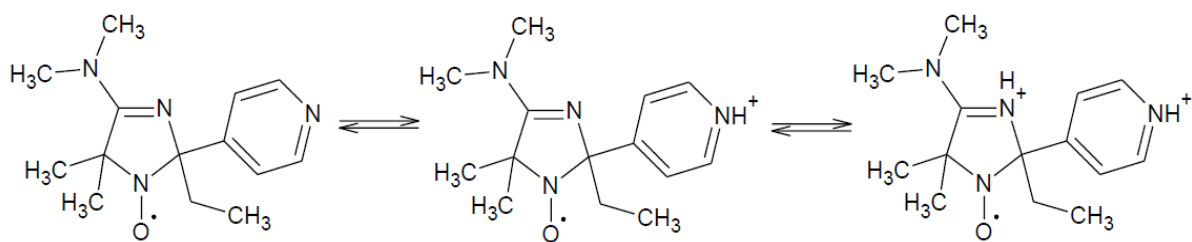


Рисунок 40. Три состояния зонда DPI: нейтральное, протонированное и дважды протонированное.

На рисунке 41б изображены спектры водных растворов зонда при pH=4 и pH=7. Высокопольная компонента спектра при pH=4 сдвинута влево по сравнению с той же компонентой при pH=7. Расстояния между левой и центральной компонентами в спектре составляют 1.44 и 1.52 мТл (14.36 Гс и 15.24 Гс) для pH=4 и pH=7 соответственно [249].

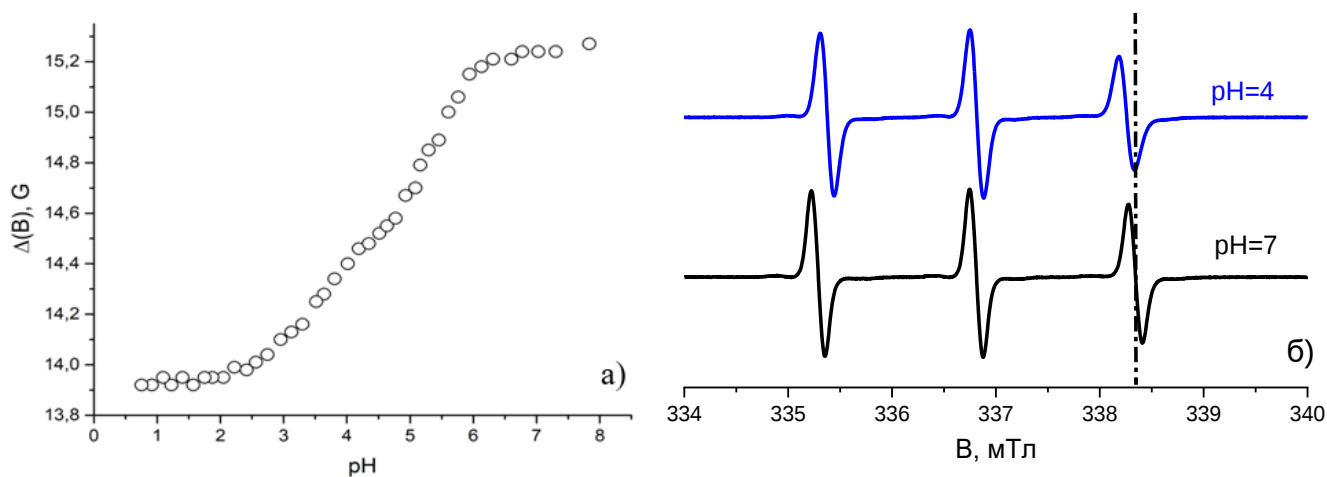


Рисунок 41. Зависимость расстояния между левой и центральной компонентами в спектре ЭПР зонда DPI от pH в водных растворах: а – калибровочная зависимость [249]; б – внешний вид спектров при pH=4 и pH=7.

Спектр DPI в набухшей пленке (рис. 42а) представляет собой сумму спектра DPI, иммобилизованного в полимерной матрице, и спектра зонда, свободно вращающегося в заполненных жидкостью порах. Расстояние между компонентами спектра «быстрого предела» составляет 1.38 мТл (13.8 Гс), что свидетельствует о существовании в порах зонда в дважды протонированном состоянии и соответствует pH жидкой среды внутри пор равному или ниже 2 [238]. Для спектра зонда во внешнем буферном растворе с pH~7 (PBS), куда DPI высвобождается из пленки, соответствующее расстояние равно 1.52 мТл (15.21 Гс), что характерно для нейтральной формы зонда (см. Рис. 42б). Расстояния между компонентами и, следовательно, значения pH как внутри пленки, так и во внешнем растворе остаются постоянными в ходе эксперимента (от 4 до 60 дней).

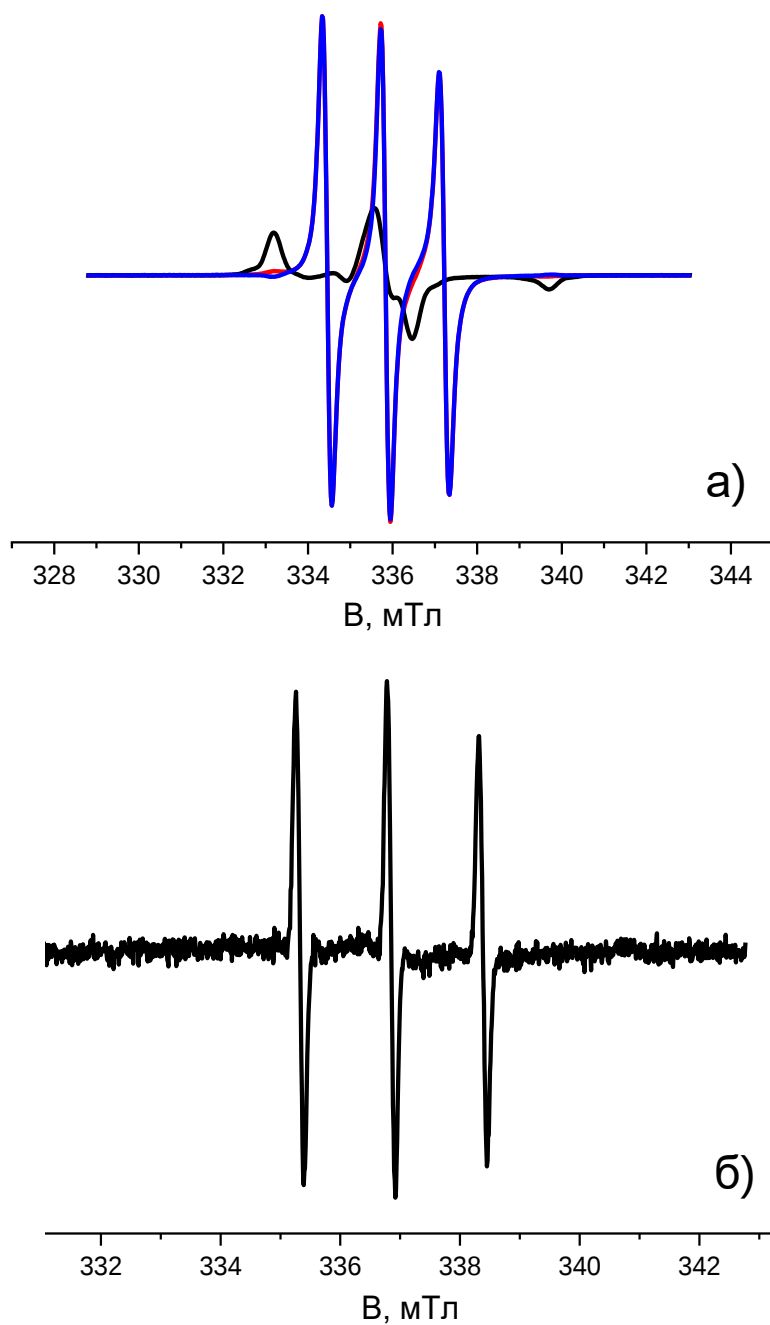


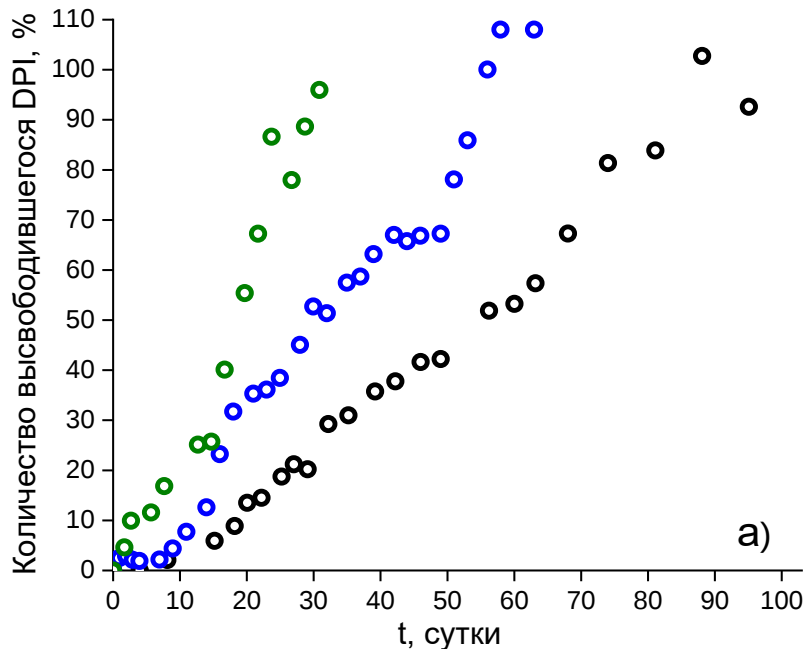
Рисунок 42. Спектр зонда DPI: а – в набухшей пленке PDL02 (красная линия) через 4 дня выдерживания в PBS, представляющий собой сумму спектров зонда, иммобилизованного в полимере (черная линия), и зонда, высвободившегося в поры, заполненные жидкостью (синяя линия); б – высвободившегося из пленки во внешнюю среду - PBS.

Таким образом, полученные данные не противоречат высказанной нами гипотезе о том, что гидролиз полиэфирных матриц стартует на кислотных центрах, присутствующих в матрицах алифатических сложных эфиров как изначально из-за неполного проведения реакции этерификации, так и за счет образования в процессах хранения и транспортировки полимера.

Гибель нитроксильных радикалов, как правило, затрудняет использование их в качестве спиновых зондов [132], и исследования в основном протекают в направлении создания более

стабильных систем [250]. Однако, на наш взгляд, данные о потере парамагнетизма также могут быть использованы для установления деталей механизма высвобождения низкомолекулярных веществ из полимерных матриц. Рассмотрим это более подробно на примере систем пленки PDL02-DPI.

На рисунке 43а представлены кинетические кривые высвобождения рН-чувствительного радикала DPI из пленок PDL02 разной толщины (110, 130, 160 мкм) [229]. Видно, что чем тоньше пленка, тем быстрее происходит высвобождение зонда. В случае высвобождения из пленок толщиной 160 и 130 мкм наблюдается период индукции, причем с уменьшением толщины он уменьшается и практически незаметен для пленок толщиной 110 мкм. Интересно, что во всех случаях высвобождение зонда после периода индукции протекает с постоянной скоростью вплоть до ~100%. Как было отмечено ранее, такой характер поступления лекарственных веществ из матрицы в организм является наиболее желательным (см. Раздел 1.5.2.1.). Для сравнения на рисунке 43б представлены кривые высвобождения DPI из пленки толщиной 160 мкм и стандартного нитроксильного радикала TEMPOL из пленки 200 мкм в PBS [1]. Видно, что и скорость высвобождения, и вид кривых высвобождения в этих случаях существенно различаются. Меньшие по размеру нейтральные радикалы TEMPOL выходят во внешнюю среду в несколько раз быстрее, чем DPI.



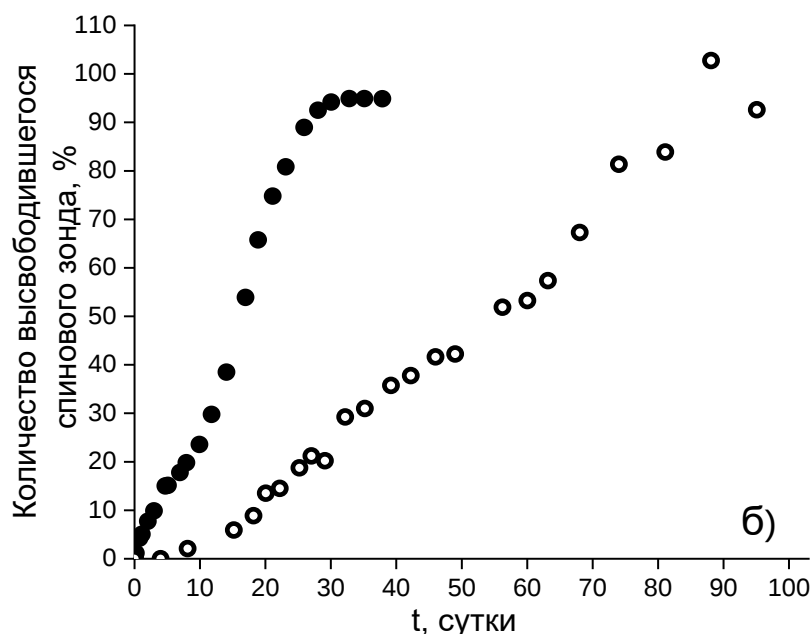
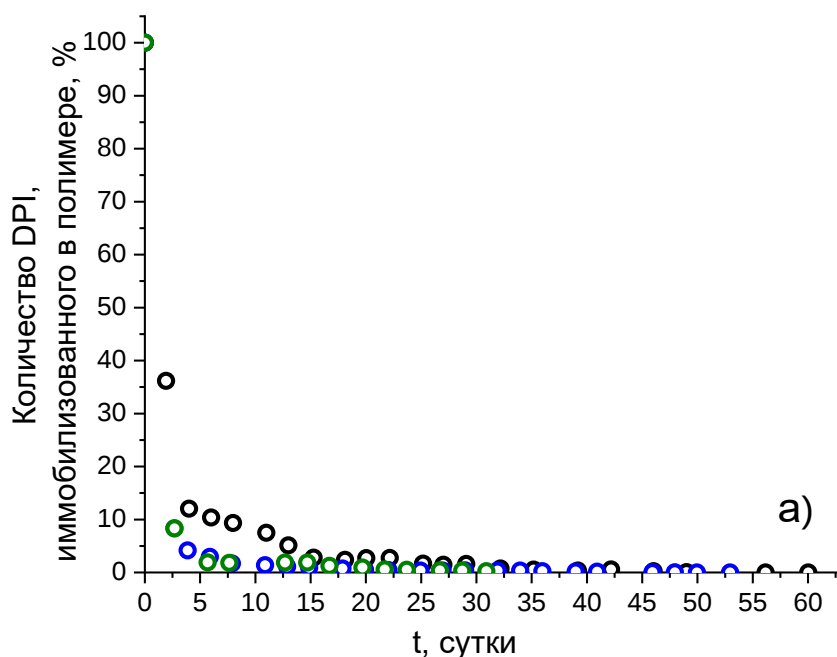


Рисунок 43. Кинетические кривые высвобождения парамагнитных соединений из полимерных пленок PDLLA разной толщины в PBS для систем: а - DPI/PDL02/110 мкм (зеленые символы), DPI/PDL02/130 мкм (синие символы), DPI/PDL02/160 мкм (черные символы); б - TEMPOL/PDL02/200 мкм (●), DPI/PDL02/160 мкм (○).

Количество парамагнитных частиц в полимерных пленках после погружения в PBS быстро, в течение 10-15 дней, снижается почти до нуля (см. Рис. 44а), при этом содержание подвижной формы DPI, локализованной в порах, проходит через максимум (рис. 44б) [229]. В данном случае, так же как и в случае системы TEMPONE-PDL04 и в отличие от процессов с участием пленки PDL02, импрегнированной TEMPOL [1], общее количество парамагнитных частиц проходит через минимум, но затем восстанавливается до первоначального значения (рис. 45).



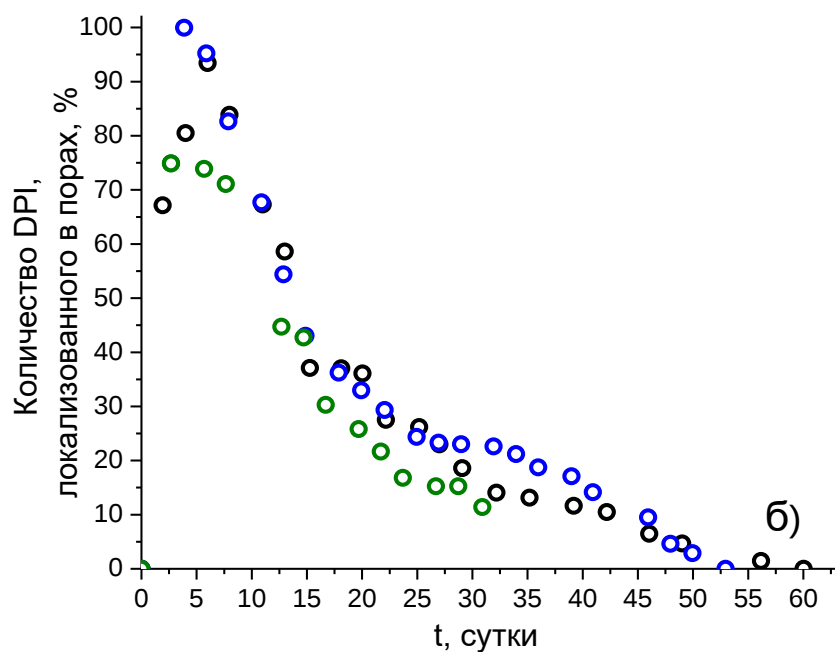


Рисунок 44. Зависимость количества зонда DPI в полимерных пленках PDL02, находящихся в PBS, от времени - толщина пленки 110 мкм (зеленые символы), толщина пленки 130 мкм (синие символы), толщина пленки 160 мкм (черные символы): а – зонд, иммобилизованный в полимере; б – зонд в порах.

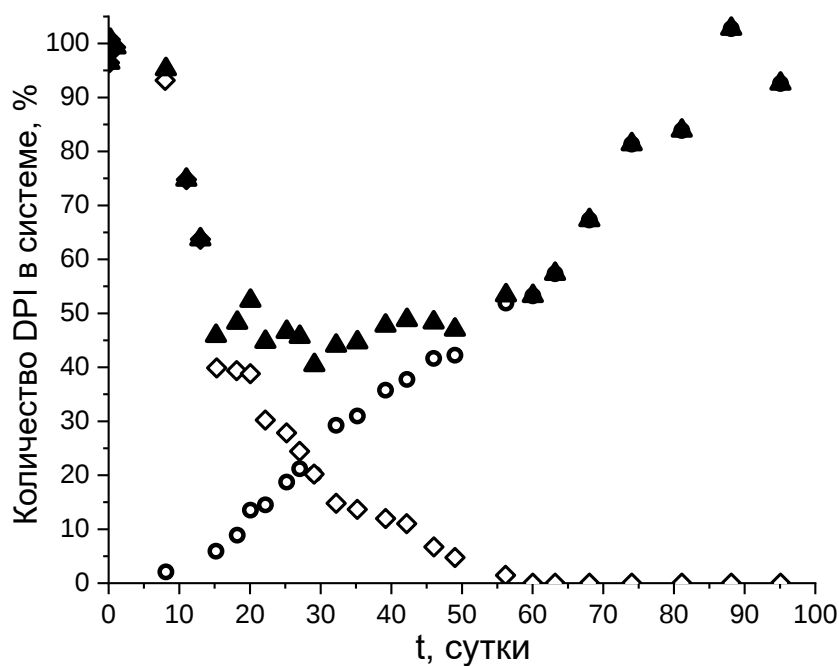


Рисунок 45. Суммарная зависимость количества зонда DPI в системе (▲), представляющая собой сумму кинетических кривых высвобождения DPI во внешний раствор из пленки PDL02 (160 мкм) (○) и уменьшения количества зонда в пленке PDL02 (160 мкм) (◇).

Как уже было отмечено, закономерности высвобождения DPI и TEMPOL или ATI из пленок PDL02 существенно различаются. Прежде всего, это относится к нулевому порядку по

DPI на кривых накопления зонда во внешнем растворе. Обычно такие зависимости объясняют диффузией из постоянного источника [251] или наличием осмотического насоса [252]. Оба этих предположения в данном случае не находят своего подтверждения, так как во внешнюю среду выходит практически все 100% молекул зонда.

На наш взгляд, предложенная в [1] модель (см. Раздел 1.5.2.1.), которая описывает закономерности высвобождения TEMPOL и АТІ из пленок PDLLA, может быть использована и в этом случае несмотря на существенные различия в профилях высвобождения. Так, более низкая по сравнению с TEMPOL скорость высвобождения DPI, на наш взгляд, обусловлена связыванием протонированной формы DPI с анионами олиголактида или полилактида (см. Рис. 46), что приводит к существенному увеличению размеров диффундирующей частицы, а также замедлению диффузии за счет обмена противоионов, в том числе локализованных на поверхности пор [238]. С этим, вероятно, связано и пренебрежимо малое количество DPI во внешнем растворе на начальном этапе по сравнению с заметным выбросом радикалов TEMPOL. Тот факт, что скорость высвобождения DPI практически не зависит от его содержания в полимерной пленке, можно объяснить взаимной компенсацией двух эффектов: снижением общего количества зонда в пленке и увеличением доли пор, связанных с поверхностью, по которым и происходит диффузия.

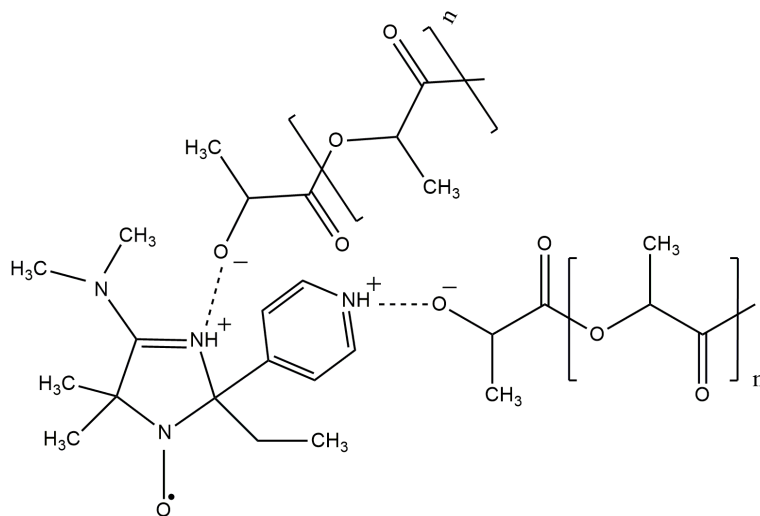


Рисунок 46. Связывание дважды протонированной формы DPI с анионами олиголактида.

Экстремальный характер зависимости количества парамагнитных частиц в отличие от аналогичной зависимости для TEMPOL, представляющей собой монотонно растущую кривую, связан с диспропорционированием радикалов в кислой среде в порах, образующихся в полимерной матрице в результате ее гидролиза. Зонд, иммобилизованный в полимерной матрице в парамагнитном состоянии, высвобождается в поры, заполненные жидкостью с $\text{pH} < 2$, где протекает реакция его диспропорционирования, приводящая к образованию диамагнитных форм. Зонд в пара- и диамагнитном состояниях диффундирует по порам во внешний раствор,

где поддерживается нейтральная среда ($\text{pH} \sim 7$). В таких условиях диамагнитные продукты вступают в обратную реакцию с образованием нитроксильных радикалов (см. Рис. 47).

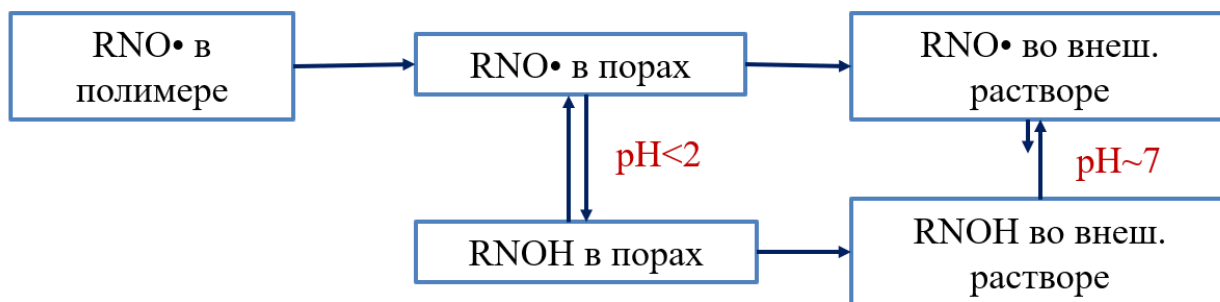


Рисунок 47. Схема превращений DPI в процессе высвобождения зонда из пленки PDLA.

Профили высвобождения DPI из пленок PDL02 разной толщины были описаны с использованием модели, подробно описанной в разделе 1.5.2.1. и разделе 2.5.1. [1] (рис. 48) [229]. Полученные в результате моделирования параметры представлены в таблице 8. Высвобождением из приповерхностных пор, образующихся на начальном этапе, пренебрегали. Видно, что t_{lag} – параметр, отражающий время задержки высвобождения из внутренних пор, связанных с поверхностью, уменьшается и становится пренебрежимо малым с уменьшением толщины пленки. Параметры t_{lag} и k варьируемые, коэффициент диффузии допанта D_L и константа распределения k не могут быть определены отдельно, поэтому рассматриваются как составной переменный параметр κD_L , который приняли одинаковым для всех трех систем. Полное высвобождение допанта может наблюдаться до того, как функции пористости достигнут максимального значения 1 из-за динамического перехода допанта между плотными областями полимера и порами. Значение параметра k для более тонких пленок больше и примерно соответствует закону L^{-3} . Это демонстрирует, что образовавшимся порам в тонких пленках требуется меньше времени, чтобы соединиться с внешним раствором и, следовательно, считаться проводящими для диффузии допанта, t_{lag} в различных экспериментах коррелирует с этим наблюдением. Другими словами, параметр k связан со временем перколяции пор. Такой вывод означает также, что в диапазоне от 110 до 160 мкм скорость роста пор и их средние размеры достаточно близки.

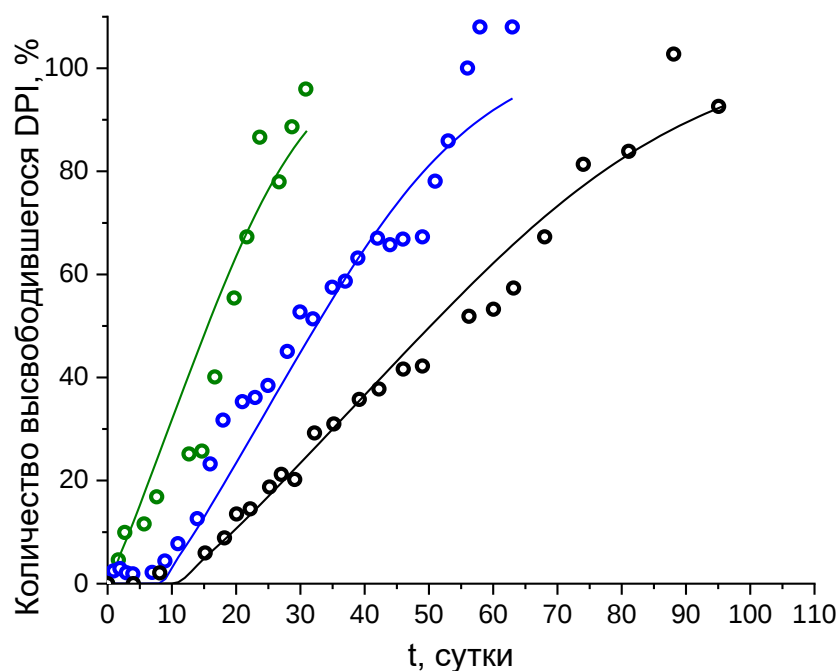


Рисунок 48. Результаты моделирования профилей высвобождения спинного зонда DPI из пленок PDL02 разной толщины: зеленые символы – 110 мкм, синие символы – 130 мкм, черные символы – 160 мкм.

Таблица 8. Оптимальные параметры моделирования кривых высвобождения DPI из пленок PDL02, в том числе характеристические времена формирования пор (T_{pores}) и диффузии допанта (T_D).

L, мкм	t_{lag} , сутки	k, сутки ⁻¹	κD_L , $\frac{\text{мкм}^2}{\text{сутки}}$	T_{pores} , сутки	T_D , сутки
110	0	0.060	144	17	42
130	8 ± 1	0.035		29	59
160	10 ± 1	0.020		50	89

Таким образом, основная разница между процессами высвобождения DPI и TEMPOL определяется природой лимитирующей стадии высвобождения. По-видимому, высвобождение DPI контролируется диффузией в образовавшихся порах, а высвобождение TEMPOL контролируется образованием пор [1]. Чтобы оценить это различие количественно, можно сравнить две величины в единицах времени: $T_{pores} = 1/k$ и $T_D = L^2 / (2 \cdot \kappa D_L)$, где T_{pores} — характерное время открытия пор на поверхности пленки, а T_D — характерное время диффузии допанта через пленку. Для каждой из пленок, допированных DPI, T_D больше, чем T_{pores} . В случае высвобождения TEMPOL из PDL02 T_{pores} и T_D можно оценить путем экстраполяции зависимости $k(L)$, полученной в этой работе, и данных из работы [1]. Полученные значения составляют $T_{pores} = 100$ суток и $T_D = 2$ суток и демонстрируют обратную зависимость между

диффузией и раскрытием пор. Значение T_D является формальным параметром для количественной оценки эффективных диффузионных свойств допанта. Скорость объемной диффузии ослабляется функцией пористости, как описано в уравнении (27).

Благодаря модели квазилинейный режим высвобождения можно объяснить, как баланс нескольких факторов. Во-первых, исследованные системы демонстрируют задержку высвобождения в течение нескольких дней. За этот период материал подвергается частичному гидролизу, пластификации и образованию первичных закрытых пор. Во-вторых, соединение внутренних пор с поверхностью происходит плавно без резких изменений в структуре материала, что делает диффузию допанта из пленок достаточно равномерной. Небольшие отклонения от теоретических зависимостей мы связываем как с возможной незначительной неоднородностью толщин и плотности получаемых пленок, так и с допущениями самой модели, рассматривающей, например, диффузию только в цилиндрических порах перпендикулярных к поверхности.

Информация о процессах, происходящих внутри полилактидных пленок при их набухании и гидролизе, может помочь дополнить механизм, описывающий высвобождение из них низкомолекулярных допантов. В частности, анализ временных профилей быстро- и медленно вращающихся радикалов TEMPOL в пленках PDL02 доказал динамическое равновесие между этими формами во время высвобождения [1]. Несмотря на сложную совокупность физико-химических процессов, происходящих с участием матрицы PDLLA и pH-чувствительного спинового зонда DPI (рис. 49), зонд в парамагнитной форме полностью (в пределах погрешности эксперимента) перешел во внешний раствор. Это указывает на то, что диамагнитная форма зонда количественно возвращается в парамагнитное состояние при нейтральном pH. Следовательно, предполагая одинаковые диффузионные свойства диамагнитных и парамагнитных форм, химической реакцией при моделировании описания скорости высвобождения можно пренебречь. Тем не менее учет окислительно-восстановительных реакций с участием нитроксильных радикалов необходим в случае количественного анализа спинового зонда в полилактидной матрице.

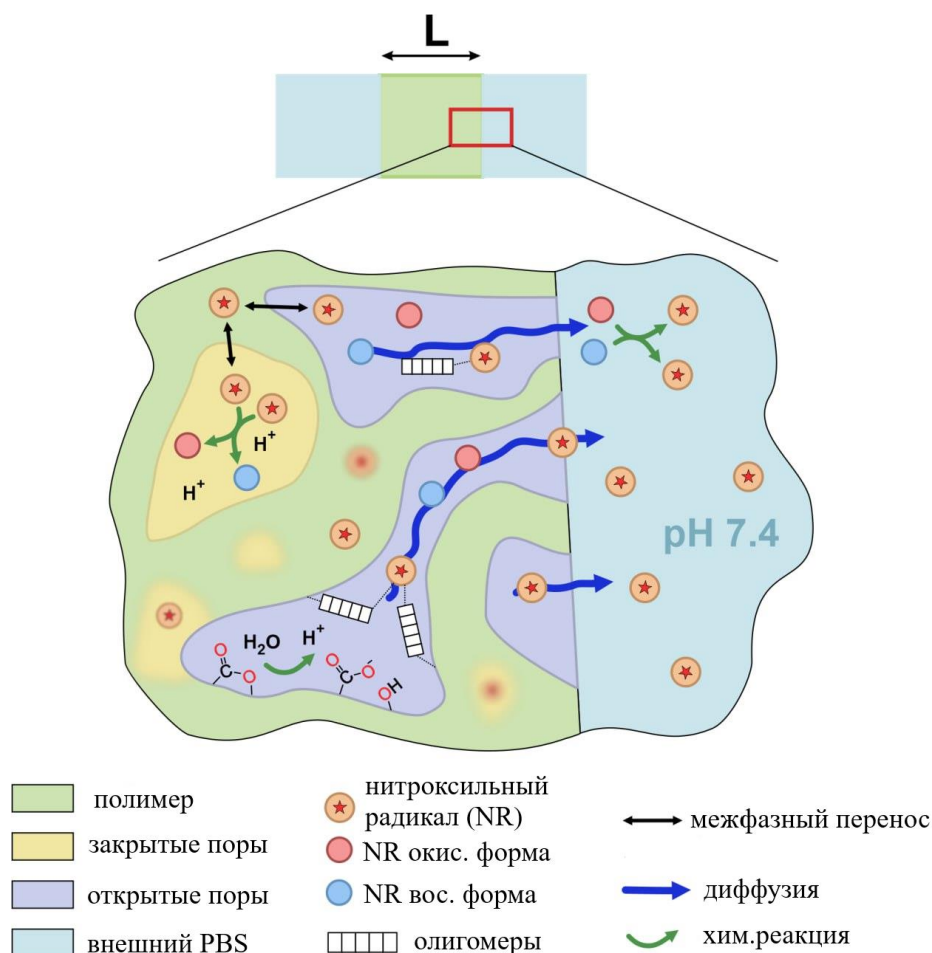


Рисунок 49. Схема процессов в системе «пленка PDL02/DPI/PBS».

Таким образом, предложенная в [1] модель, предполагающая образование и зарастание узких приповерхностных пор, гидролиз полимерных цепей с образованием в полимерной матрице пор, заполненных жидкостью, постепенно соединяющихся с поверхностью пленки, позволяет описывать профили высвобождения разного вида – как «простые», с монотонным падением скорости выхода или кривые псевдонулевого порядка, так и S-образные зависимости, характеризующиеся наличием первоначального выброса, торможением и последующим ускорением процесса. Полученные кинетические закономерности высвобождения с практически постоянными скоростями при использовании полимерного носителя базовой геометрии открывают широкие возможности для доставки лекарственных средств, существующих в катионной форме. Полученные данные можно использовать для предсказания закономерностей высвобождения низкомолекулярных БАС в зависимости от толщины пленок, размера молекул и их заряда.

В целом, понимание механизма процессов, протекающих *in vitro* с участием моделей временных протезов и средств контролируемой доставки лекарств из матриц на основе полилактида позволяет осуществлять направленный выбор полимера определенной молекулярной массы, оценивать стабильность допанта в ходе высвобождения и т.д.

Спектроскопия ЭПР в рамках методики спинового зонда дает уникальную возможность качественно и количественно контролировать одним методом процессы, происходящие как во внешней среде, так и в полимерной матрице.

В данных системах доставки лекарств использована способность полилактида к химической деградации за счет гидролиза сложноэфирных связей. Однако он может быть использован как компонент систем доставки лекарств на основе другого класса материалов - стимул-чувствительных, прежде всего термочувствительных полимеров, с целью регулирования их гидрофобности.

4.2. Термочувствительные графт-сополимеры P(NIPAM-*g*-PLA) как материалы для создания систем доставки лекарств

4.2.1. Стабильность графт-сополимера P(NIPAM-*g*-PLA) в водных растворах

Введение в цепь PNIPAM гидрофобного заместителя олиголактида приводит к повышению гидрофобности графт-сополимера по сравнению с гомополимером. Как уже обсуждалось ранее (см. Раздел 1.1.), олиголактидные фрагменты P(NIPAM-*g*-PLA) в водной среде способны подвергаться гидролизу, что может приводить к их разрушению, а, следовательно, и к понижению гидрофобности и увеличению НКТР. Такой эффект, с одной стороны, может приводить к нежелательным последствиям, например, неконтролируемому выделению допантов из СДЛ, с другой стороны, он может стать инструментом управления доставкой БАС *in situ* в течение длительного времени.

Влияние выдерживания в водном растворе (начальное значение pH=7) на характеристики сополимера P(NIPAM-*g*-PLA) V определяли при температурах выше НКТР и близких к физиологическим - 27 °C и 37 °C. Нами было установлено, что pH среды понижается до ~4, что свидетельствует об образовании карбоксильных групп. При этом изменения НКТР системы при 27 °C в течение 6 недель и при 37 °C в течение 8 недель пренебрежимо малы. Возможно, это связано с тем, что полимер при этих температурах находится в конформации глобулы, причем олиголактидный фрагмент преимущественно локализован внутри полимерной глобулы и не контактирует с внешним водным раствором, что замедляет процессы гидролиза.

Отсутствие существенных изменений в НКТР растворов P(NIPAM-*g*-PLA) в течение 8 недель при 37 °C свидетельствует о стабильности систем доставки лекарств на основе данных сополимеров, в том числе вблизи опухолевых областей, где кислотность среды может быть понижена [253].

4.2.2. Импрегнация графт-сополимера P(NIPAM-*g*-PLA) нитроксильным зондом в среде scCO_2

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [254]¹.

Применение полиакриламидов в качестве материалов для СДЛ сопряжено с необходимостью введения БАС в полимерную матрицу. Импрегнация полимера может быть осуществлена при помощи СКФ технологий на основе scCO_2 . Этот метод активно используется для допирования систем на основе алифатических полиэфиров и других синтетических и природных полимеров [99,255–258]. Однако ввиду высокой полярности полиакриламидов, и, в частности, PNIPAM, ожидать высокой степени набухания в среде scCO_2 не стоит, растворимость полиакриламидов в scCO_2 в диапазоне температур 40-60 °C и давлений 9-18 МПа [259] пренебрежимо мала (около $0.6\text{--}2.3 \times 10^{-10}$ моль*моль⁻¹ для PNIPAM с молекулярной массой $M_n=14$ кДа). Однако введение в боковую цепь PNIPAM заместителей, обладающих способностью к набуханию в scCO_2 , например, биосовместимого олиголактида [99], может способствовать импрегнации такого сополимера БАС в среде scCO_2 и улучшению биосовместимости полимерной матрицы [260,261].

В связи с этим нами была осуществлена импрегнация P(NIPAM-*g*-PLA) (V) (см. Раздел 2.1., табл. 5) спиновым зондом TEMPONE, контролируемая методом ЭПР *in situ* [254]. При выдерживании полимера в растворе TEMPONE в scCO_2 наблюдается появление спектра ЭПР, представляющего собой узкий триплетный сигнал, характерный для нитроксильных радикалов в вязких жидкостях (рис. 50а). Изотропная константа СТВ составляет 14.8 Гс (1.48 мТл), что говорит о бóльшей полярности локального окружения зонда в набухшем полимере, чем в scCO_2 , где изотропная константа СТВ составляет 14.4 Гс (1.44 мТл) [254]. Спектр радикала TEMPONE в матрице полимера P(NIPAM-*g*-PLA), зарегистрированный после импрегнации и спуска давления, представлен на рисунке 50б. Форма линий спектра при 25 °C отвечает заторможенному вращению нитроксильного радикала.

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Иванова Т.А., Зубанова Е.М., Попова А.А., Громов О.И., Голубева Е.Н., Ксендзов Е.А., Костюк С.В., Тимашев П.С. Диффузия радикала TEMPONE в графт-сополимере N-изопропилакриламида с олиголактидом в присутствии сверхкритического диоксида углерода методом ЭПР *in situ* // Сверхкритические флюиды: теория и практика. — 2021. — т. 16, №3. — С. 33-41 [254]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 30%.

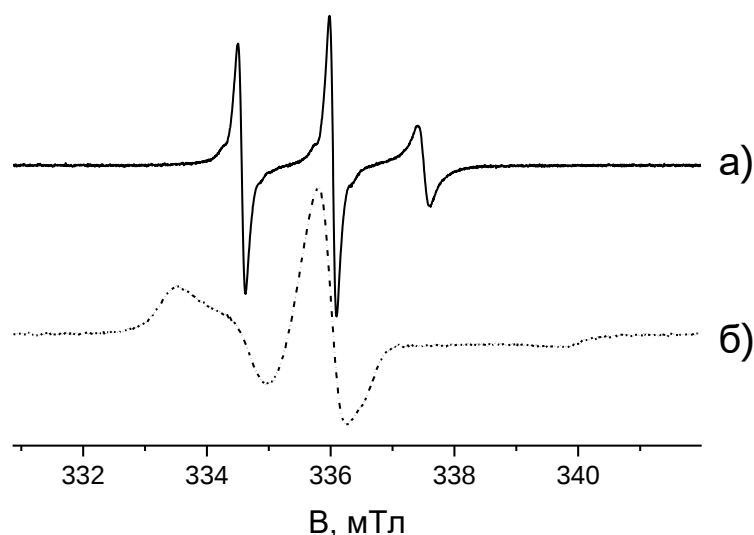


Рисунок 50. Спектр ЭПР спинового зонда TEMPONE в P(NIPAM-*g*-PLA): а - набухшем в скCO₂ при 60°C и 10 МПа через 4 часа импрегнации; б - при 25°C, зарегистрированный после импрегнации и спуска давления.

На рисунке 51 представлено изменение абсолютного числа частиц радикала TEMPONE в P(NIPAM-*g*-PLA) (V), набухшем в скCO₂ при 60 °C и 10 МПа, от корня из времени. Представленная зависимость линейна, что указывает на протекание диффузии по закону Фика [262]. Через 4 часа после начала импрегнации концентрация допанта составила 1.5 мкг на 1 мг полимера (0.15 масс.%).

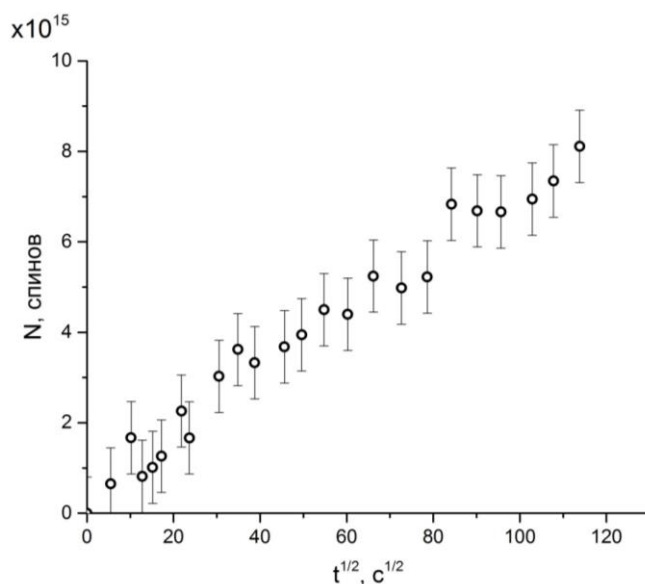


Рисунок 51. Зависимость числа частиц TEMPONE в P(NIPAM-*g*-PLA) (V), набухшем в скCO₂ при 60 °C и 10 МПа, от времени.

Таким образом, нами впервые с использованием реактора высокого давления, позволяющего регистрировать спектры ЭПР *in situ*, установлены кинетические закономерности импрегнации парамагнитным зондом TEMPONE термочувствительного графт-сополимера

P(NIPAM-*g*-PLA) в среде scCO_2 . Показано, что введение в боковую цепь PNIPAM гидрофобного заместителя олиголактида, обладающего способностью к набуханию в scCO_2 , позволяет использовать технологию сверхкритической флюидной импрегнации для введения БАС в полимеры на основе PNIPAM. Кроме того, из литературы известно, что природа и количество введенного заместителя оказывают влияние на НКТР сополимера. Это может быть использовано для доставки лекарств в матрицах из термочувствительных полимеров в более широком температурном диапазоне. Таким образом, необходимо охарактеризовать влияние концентрации введенного гидрофобного олиголактида на процесс коллапса полимерных цепей, и НКТР, в частности, графт-сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) разного состава.

4.2.3. Спектроскопия ЭПР спинового зонда ТЕМПО в водных растворах графт-сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) разного состава

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [263]¹.

4.2.3.1. Влияние состава графт-сополимера P(NIPAM-*g*-PLA) на температуру коллапса полимерных цепей

Одним из важных параметров растворов термочувствительных полимеров является нижняя критическая температура растворения (НКТР, в англ. LCST [264]). При температурах выше НКТР в растворах термочувствительных полимеров образуются неоднородности в результате коллапса полимерных цепей. Состав термочувствительного полимера может существенно влиять на его поведение при фазовом переходе, например, внедрение гидрофобных мономеров, каким является олиголактид, в сополимер приводит к снижению НКТР [36] (см. Раздел 1.1.2). Спектроскопия ЭПР в варианте методики спинового зонда позволяет характеризовать структурные изменения, происходящие с растворами термочувствительных полимеров при изменении температуры [36,37,109]. Наиболее широко используемым зондом является амфифильный зонд ТЕМПО. Во-первых, благодаря своей природе он может находиться как внутри неполярных глобул, так и во внешнем полярном растворе, что позволяет более детально характеризовать систему. Во-вторых, его небольшой размер, не превышающий 1 нм, дает возможность детектировать неоднородности нанометрового размера.

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:
Zubanova E.M., **Ivanova T.A.**, Ksendzov E.A., Kostyuk S.V., Timashev P.S., Melnikov M.Y., Golubeva E.N. Structure and dynamics of inhomogeneities in aqueous solutions of graft copolymers of N-isopropylacrylamide with lactide (P(NIPAM-graft-PLA)) by spin probe EPR spectroscopy // *Polymers*. — 2022. — Vol. 14, № 21. — P. 4746-4763 [263].
Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 60%.

Для интерпретации данных в системах водный раствор термочувствительного полимера – спиновый зонд была проанализирована температурная зависимость спектров ЭПР растворов ТЕМПО в PBS, который был использован для поддержания нейтрального pH. Форма линий спектров ЭПР ТЕМПО в PBS представляет собой узкий триплет из-за сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона с магнитными ядрами ^{14}N с ядерным спином $I=1$. Такая форма линий характерна для спектров быстро вращающихся нитроксидов [109]. Кроме того, в спектрах наблюдаются низкоинтенсивные сигналы дополнительного расщепления каждой из трех линий (сателлиты), обусловленные сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона с магнитными ядрами ^{13}C ($I=1/2$) метильных групп и атомами углерода в пиперидиновом цикле. При повышении температуры в диапазоне 0-80 °C наблюдается небольшое уширение линий, которое становится заметным выше 30 °C. Согласно данным моделирования спектров, уширение происходит за счет увеличения вклада лоренцевской ширины линии, в основном связанного со спин-обменным взаимодействием [265]. Константа сверхтонкого взаимодействия a_{iso} уменьшается при нагревании, что связано с уменьшением диэлектрической проницаемости воды [266].

Спектры ЭПР радикала ТЕМПО в 5 и 10 масс.% растворах полимеров P(NIPAM-*g*-PLA) **II-V** (см. Табл. 5) были зарегистрированы при температурах 0-90 °C. На рисунке 52 представлены изменения спектров ЭПР радикала ТЕМПО в 5 масс.% растворе полимера **IV** в PBS при повышении температуры. Интенсивность сигнала несколько снижается при 4-25 °C из-за уширения линий спектра аналогично сигналу ТЕМПО в PBS. Начиная с 25 °C (обозначено T_{start} , см. Табл. 9) амплитуда сигнала начинает падать быстрее, при этом число парамагнитных частиц остается постоянным, а при 60-70 °C в спектре явно проявляется дополнительный сигнал. Аналогичные тенденции наблюдаются для 5 и 10 масс.% растворов сополимеров другого состава. Полученные в результате моделирования таких спектров в рамках модели изотропного вращения константы сверхтонкого взаимодействия (СТВ) a_{iso} и времена вращательной корреляции $t_{\text{corr,iso}}$ представлены в таблице 9. Ниже НКТР значения a_{iso} практически не зависят от состава сополимера, близки к аналогичным значениям в PBS, что указывает на близкое окружение спинового зонда в PBS в отсутствие и в присутствии полимеров. Судя по значениям времен вращательной корреляции, вращение молекул ТЕМПО в 5 и 10 масс.% растворах сополимеров **II-V** происходит медленнее, чем в чистом PBS и растворах PNIPAM, и растет с ростом содержания олиголактидов в полимерной цепи, что указывает на большую вязкость растворов сополимеров.

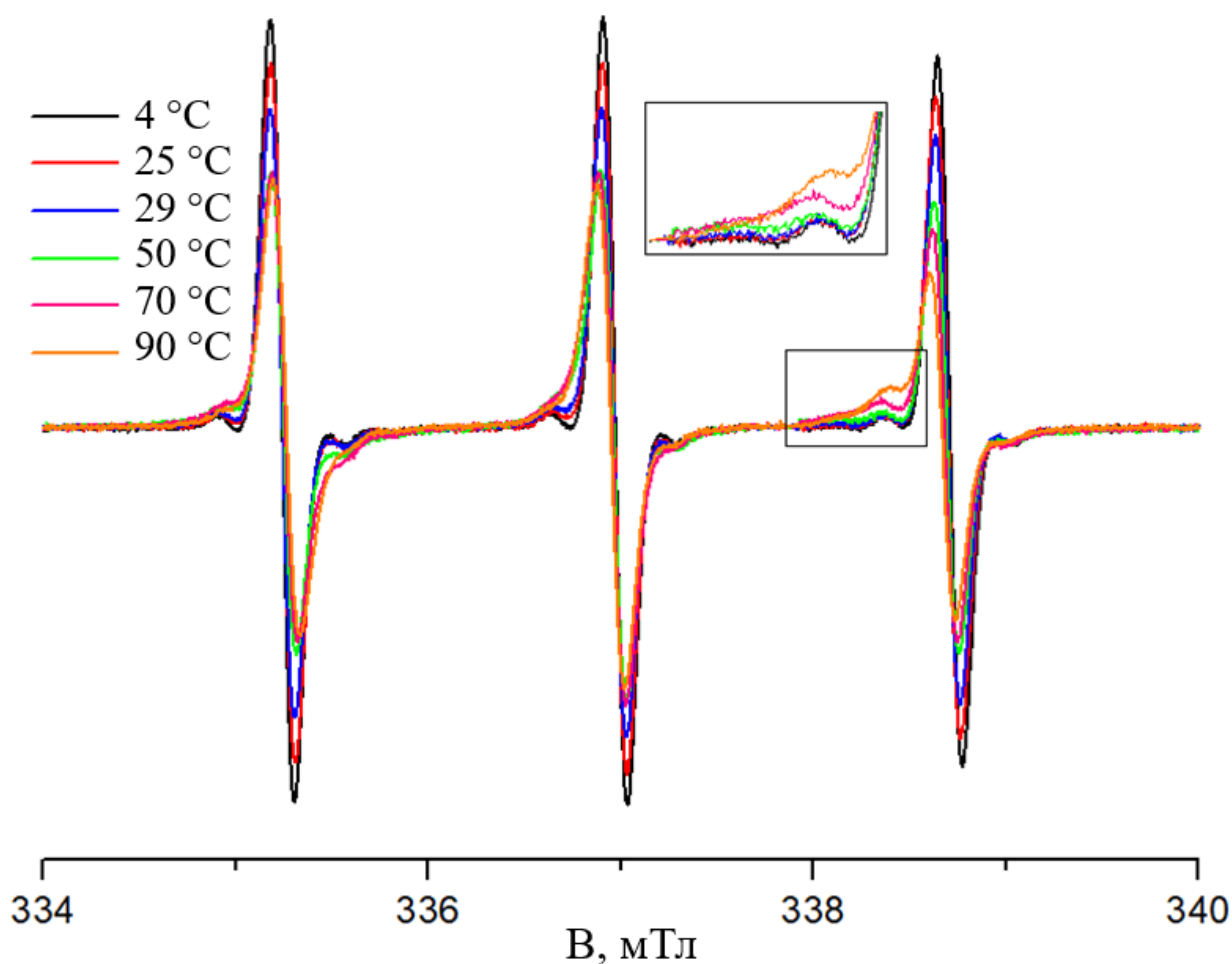


Рисунок 52. Спектр ЭПР ТЕМПО в 5 масс.% растворе полимера **IV** в PBS в диапазоне температур 4-90 °C.

Таблица 9. Изотропные константы сверхтонкого взаимодействия a_{iso} и времена вращательной корреляции $t_{corr,iso}$ ТЕМПО и НКТР 5 масс.% и 10 масс.% растворов графт-сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) в PBS. T_{sim} – температура раствора, для которого выполнено моделирование спектра, T_{start} – температура начала уменьшения амплитуды сигнала спектра ЭПР, T_{glob} – температура начала образования глобул в растворах P(NIPAM-*g*-PLA) в присутствии ионов Cu^{2+} . T_{start} и T_{glob} получены методом ЭПР.

Система, концентрация	НКТР, °C**(ДСК/ турбидиметрия)	T_{sim} , °C	a_{iso} , мТл	$t_{corr,iso}$, пс	T_{start} , °C	T_{glob} , °C
ТЕМПО / PBS	- / -	0	1.74	12	-	-
I , 10 масс.% *	32 / 32	22	1.73	11	32±1	29±1
III , 5 масс.%	32 / 27	8	1.74	22	28±2	25±1
IV , 5 масс.%	28 / -	4	1.74	12	25±3	20±1
V , 5 масс.%	29 / 27	3	1.74	29	25±2	13±1
II , 10 масс. %	-	22	1.73	30	26±1	-

III , 10 масс. %	-	0	1.74	30	25±1	23±1
IV , 10 масс. %	-	3	1.74	50	25±1	21±1

* водный раствор, данные из работы [109],

** данные из работы [57].

Подобные изменения в спектрах ЭПР ТЕМПО в растворах термочувствительных полимеров наблюдались ранее для водных растворов PNIPAM [109] и сополимеров полоксамеров [36]. Было показано, что уменьшение интенсивности сигнала, имеющее место при температурах выше НКТР, связано с частичным переходом радикалов ТЕМПО в менее полярную и более плотную среду - полимерные глобулы, что свидетельствует о начале процессов коллапса полимерных цепей.

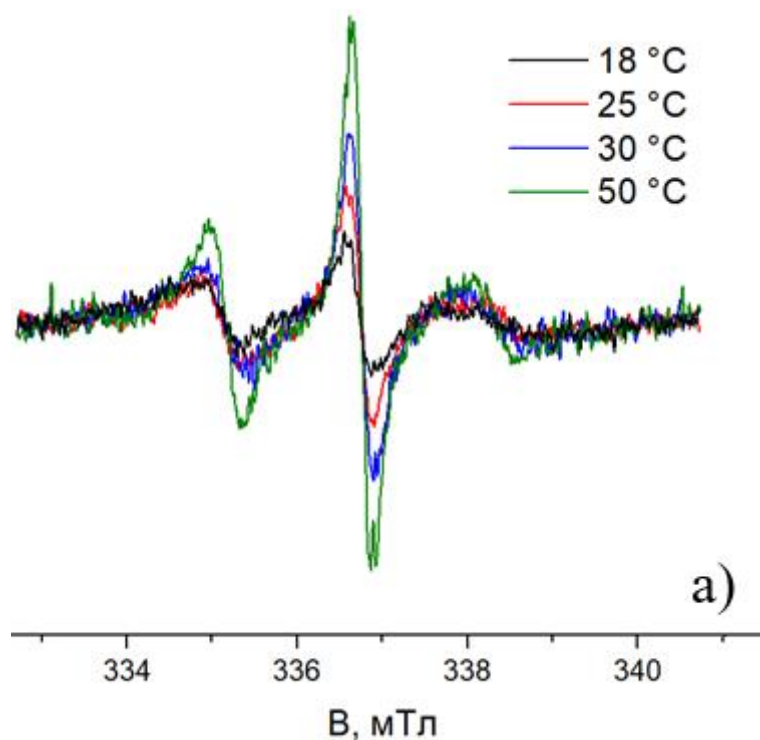
4.2.3.2. Установление структуры и динамики неоднородностей в водных растворах графт-сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA)

Моделирование спектров ЭПР растворов графт-сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) в PBS при разных температурах может дать информацию о соотношении числа частиц в растворе и глобулах, а также о свойствах глобул (локальная полярность, микровязкость и др.). При этом моделирование экспериментальных спектров, представляющих собой сумму спектров двух видов частиц: **А** – ТЕМПО в водном растворе и **Б** – ТЕМПО в полимерных глобулах, неоднозначно из-за близости их магнитно-резонансных параметров. Один из способов решения этой проблемы – подавление сигнала подвижных радикалов **А** в водном растворе за счет спин-обменного уширения спектров ЭПР в присутствии других парамагнитных частиц, например, ионов Cu^{2+} . Как было показано в работе [131], оптимальная концентрация ионов Cu^{2+} составляет около 0.2 М для водного раствора ТЕМПО с концентрацией 0.5 мМ. Действительно, в растворах полимеров **II-V** и CuCl_2 (0.12 М) при температуре ниже 12 °С наблюдается уширение сигнала частиц **А** вплоть до слияния с базовой линией. При дальнейшем нагревании появляется спектр, форма которого существенно отличается от формы спектра ТЕМПО в аналогичных условиях в отсутствие ионов Cu^{2+} и который соответствует частицам зонда, локализованным в полимерных глобулах и не контактирующим с парамагнитными ионами Cu^{2+} . Подобные изменения наблюдались и в случае гомополимера **I** [109], что позволяет получать индивидуальный спектр ЭПР ТЕМПО в глобулах и определять температуру их появления (T_{glob}).

Температуры появления сигнала частиц типа **Б** (T_{glob}) в растворах полимеров приведены в таблице 9. Существенной разницы между T_{glob} для 5 и 10 масс.% растворов не наблюдается. Увеличение содержания олиголактида в сополимерах приводит к снижению T_{glob} . Например, T_{glob} уменьшается с 29 °С для раствора гомополимера **I** до 13 °С для раствора сополимера **V**. Во

всех случаях T_{glob} меньше НКТР, измеренной макроскопическими методами, и T_{start} , что свидетельствует о преимуществе методики подавления сигнала подвижных радикалов для более раннего детектирования образования глобул. Например, первое появление неоднородностей в растворах полимера **V** происходит на 14 °С ниже НКТР, измеренной методом турбидиметрии, и на 12 °С ниже по сравнению с T_{start} . Подобное образование полимерных агрегатов в сополимерах P(NIPAM-*g*-PLA) наблюдалось ранее методом динамического рассеяния света (DLS) Ксендзовым с соавторами [57]. Агрегаты размером 17–23 нм обнаруживаются уже при 10 °С в 0.25 масс.% водных растворов **II** и **III**, образование более крупных агрегатов (50–75 нм) происходит выше 30 °С.

При нагревании выше T_{glob} вплоть до 50 °С форма линий спектров ТЕМПО в водных растворах полимеров **II-V** в присутствии ионов Cu^{2+} существенно не меняется (спектры ТЕМПО в растворе сополимера **V** представлены на рис. 53а). С повышением температуры интенсивность спектров увеличивается за счет роста количества молекул зонда, находящихся в глобулах, что может быть связано с увеличением размеров или числа глобул. Выше 50 °С проявляется сужение спектральных линий за счет увеличения подвижности ТЕМПО в глобулах, при этом наблюдается сдвиг правой компоненты спектра ТЕМПО в область высоких полей (данные для раствора сополимера **V** представлены на рис. 53б) [263].



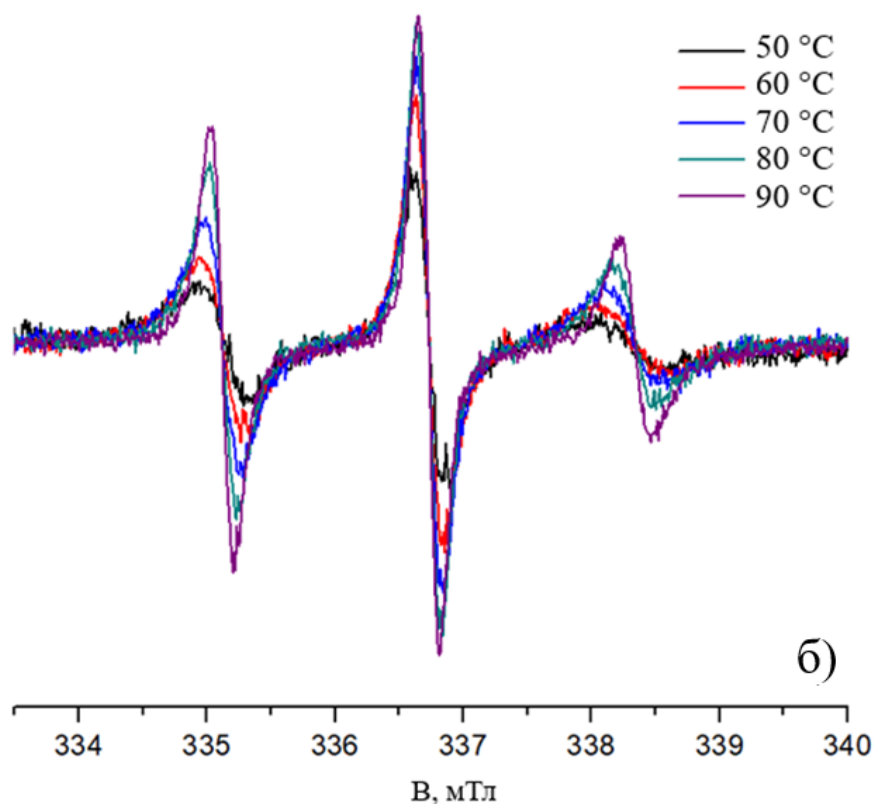


Рисунок 53. Спектры ТЕМПО в глобулах в растворе сополимера **V** (5 масс.%, PBS), зарегистрированные в присутствии ионов Cu^{2+} в температурном диапазоне: а – 18-50 °С, б - 50-90 °С.

Спектры ЭПР ТЕМПО в 5 и 10 масс.% растворах P(NIPAM-*g*-PLA) в присутствии ионов Cu^{2+} (спектры частиц типа **Б**) при различных температурах были успешно промоделированы в рамках модели анизотропного замедленного вращения нитроксильного радикала. Пример такого моделирования приведен на рисунке 54, а полученные в результате моделирования магнитно-резонансные и динамические параметры зонда при 70-90 °С представлены в таблице 10 [263].

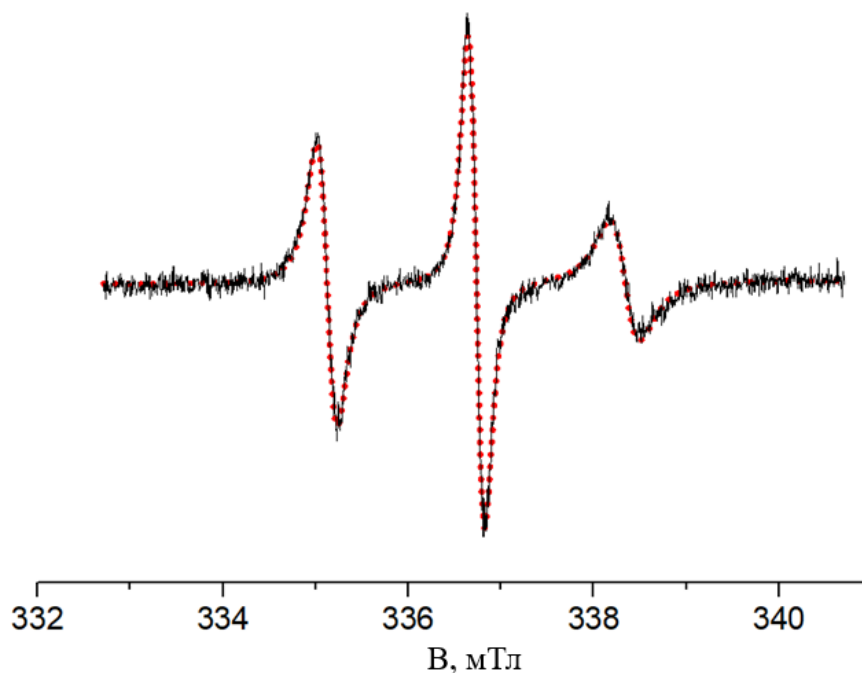


Рисунок 54. Спектр ЭПР ТЕМПО в глобулах раствора полимера **V** (5 масс.%, PBS) в присутствии ионов Cu^{2+} , зарегистрированный при 80 °С. Черная линия – экспериментальный спектр, красные точки – модельный спектр. Параметры модельного спектра: $g_{\text{iso}}=2.00607$, $a_{\text{iso}}=1.60$ мТл, $t_{\text{corr},x}=16.2$ нс, $t_{\text{corr},y}=0.3$ нс, $t_{\text{corr},z}=1.7$ нс ($t_{\text{corr},\text{iso}}=0.7$ нс).

Таблица 10. Полученные в результате моделирования параметры спектров ЭПР ТЕМПО в 5 и 10 масс.% растворах полимеров в присутствии Cu^{2+} при 70-90 °С.

Полимер, концентрация	T, °С	g_{iso}	a_{iso} , мТл	$t_{\text{corr},x}$, нс	$t_{\text{corr},y}$, нс	$t_{\text{corr},z}$, нс	$t_{\text{corr},\text{iso}}$, нс
I , 10 масс.%	80	2.00615	1.60	21.9	1.9	0.3	0.7
III , 10 масс.%	90	2.00620	1.62	17.8	0.2	1.0	0.6
	80	2.00620	1.60	25.1	0.3	1.8	0.7
	70	2.00617	1.60	25.1	0.4	2.0	0.9
III , 5 масс.%	90	2.00610	1.62	17.8	0.3	1.1	0.7
	80	2.00607	1.60	25.1	0.3	1.8	0.8
	70	2.00607	1.60	25.1	0.4	2.1	1.1
IV , 10 масс.%	90	2.00613	1.62	17.8	0.3	1.1	0.7
	80	2.00613	1.60	17.8	0.3	1.9	0.8
	70	2.00607	1.60	18.6	0.4	2.2	1.1
IV , 5 масс.%	90	2.00597	1.62	17.8	0.3	1.1	0.7
	80	2.00597	1.60	17.8	0.3	1.9	0.8
	70	2.00590	1.60	18.6	0.4	2.2	1.1

V, 5 масс.%	90	2.00610	1.61	9.8	0.2	1.0	0.5
	80	2.00607	1.60	16.2	0.3	1.7	0.7
	70	2.00607	1.58	16.6	0.4	2.3	0.9

Значения констант изотропного сверхтонкого взаимодействия (a_{iso}) радикала ТЕМПО в глобулах сополимеров **II-IV** при 70 °C ниже, чем соответствующие значения в растворе PBS, и близки таковым в растворе гомополимера **I** и в нитрометане [267]. Полярность глобул в растворе сополимера **V** ниже по сравнению с другими сополимерами и аналогична полярности диметилформамида [267]. Параметры спин-гамильтониана (a_{iso} , g_{iso}) и динамические параметры (времена вращательной корреляции t_{cor}) ТЕМПО в глобулах растворов **III** и **IV** и, следовательно, полярность и жесткость глобул не зависят от концентрации полимера (в интервале 5-10 масс.%) и молекулярной массы олиголактида (600-1200 Да).

При повышении температуры от 70 °C до 90 °C a_{iso} частиц **Б** в глобулах сополимеров **III** - **V** возрастает с 1.58-1.60 мТл до 1.61-1.62 мТл. Увеличение a_{iso} может быть связано с обменом молекул зондов между полярным внешним раствором и гидрофобными глобулами. Действительно, a_{iso} во внешнем водном растворе выше, чем в глобулах, поэтому обмен приводит к увеличению эффективной величины a_{iso} частиц **Б**. Такой обмен наблюдался ранее в водных растворах сополимеров полиоксамеров [36] и указывает на наличие динамических неоднородностей в растворах сополимеров. Напротив, в водных растворах PNIPAM неоднородности остаются статическими (то есть зонд в глобуле не обменивается с окружающей средой) вплоть до 80 °C [109].

Значения параметров спин-гамильтониана и динамические параметры ТЕМПО, полученные при моделировании спектров, зарегистрированных в присутствии ионов Cu^{2+} , использовали в качестве начального приближения для параметров частиц типа **Б** при моделировании спектров ТЕМПО в растворах P(NIPAM-*g*-PLA). В качестве начального приближения параметров для частиц типа **А** во внешнем водном растворе использовали результаты моделирования спектров ТЕМПО в растворе PBS (см. Приложение 1). Полученные параметры частиц типа **Б** при моделировании суммарных спектров сополимеров близки к полученным ранее для индивидуальных спектров (70-90 °C), что свидетельствует о том, что добавление Cu^{2+} практически не влияет на полярность и микровязкость образующихся глобул. Пример разложения спектра ЭПР ТЕМПО в растворах привитых сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) на индивидуальные спектры частиц **А** и **Б** представлен на рисунке 55. Параметры, полученные в результате моделирования суммарных спектров представлены в приложении 2 [263].

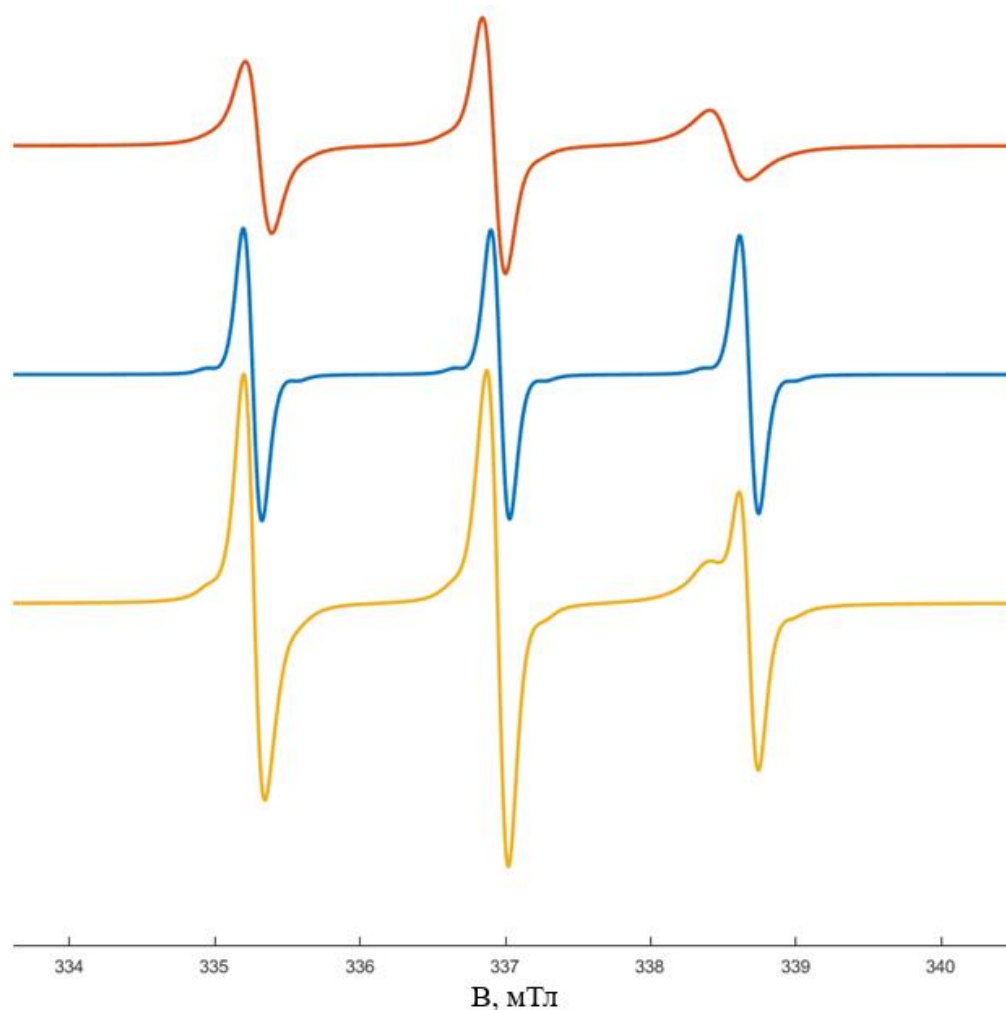
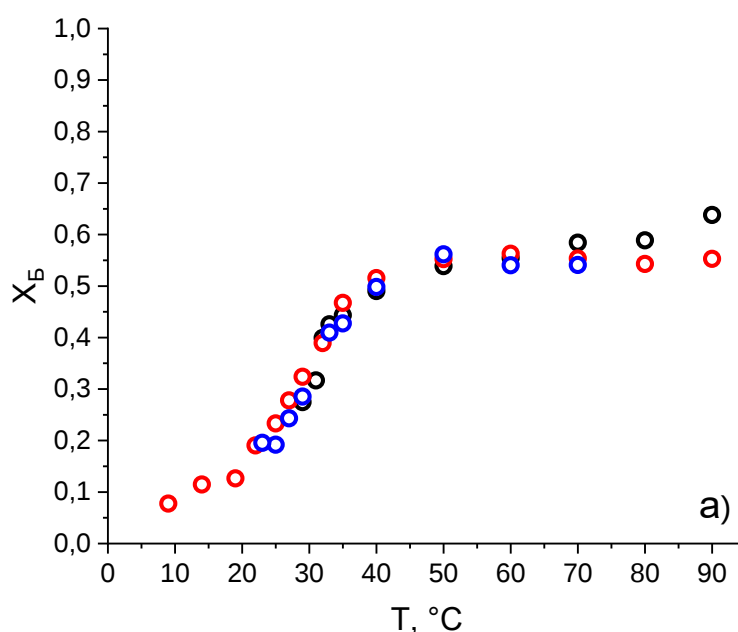


Рисунок 55. Разложение модельного спектра ЭПР ТЕМПО в растворе полимера **IV** (10 масс.%) при 90 °С. Красная линия – ТЕМПО в глобулах, синяя линия – ТЕМПО во внешнем растворе, желтая линия – суммарный спектр ТЕМПО в глобулах и внешнем растворе.

Значения a_{iso} радикалов ТЕМПО типа **A** в растворах P(NIPAM-*g*-PLA) полимеров **II-V** снижается с 1.73 мТл до 1.71 мТл при нагревании от 22 °С до 90 °С, что связано с уменьшением полярности воды при нагревании. Эти изменения аналогичны изменениям, происходящим в растворах ТЕМПО в PBS. Магнитно-резонансные и динамические параметры частиц типа **B** в растворах P(NIPAM-*g*-PLA) полимеров **II-V** также изменяются с температурой: a_{iso} постоянна до 40 °С, а затем увеличивается. Этот факт подтверждает образование динамических неоднородностей начиная с 50 °С. Напротив, константа сверхтонкого взаимодействия частиц типа **B** в растворах PNIPAM не меняется в диапазоне 32-80 °С [109], что свидетельствует об образовании статических неоднородностей [36]. Значение a_{iso} частиц типа **B** в 10 масс.% растворах сополимеров слабо зависит от длины олиголактидного фрагмента, так например, a_{iso} (**II**, 600 Да) составляет 1.57-1.59 мТл, а a_{iso} (**III**, 1200 Да) – 1.58-1.60 мТл в диапазоне 50-70 °С. В случае 5 масс.% растворов сополимеров прослеживается зависимость a_{iso} от содержания

олиголактида в сополимере. Чем оно выше (при одинаковой длине олиголактидного фрагмента), тем меньше значение a_{iso} , что указывает на менее полярное окружение зонда: $a_{iso}(\text{III}, 1200 \text{ Да})$ составляет 1.58-1.60 мТл, а $a_{iso}(\text{V}, 1200 \text{ Да})$ – 1.56-1.58 мТл в диапазоне 50-70 °С. При сравнении изотропных значений константы сверхтонкого взаимодействия частиц типа **Б** в 5 масс.% растворах **IV** и **V**, характеризующихся разным содержанием и длиной олиголактидного фрагмента, значение a_{iso} ниже там, где выше содержание и больше длина олиголактидного фрагмента ($a_{iso}(\text{IV}, 600 \text{ Да})=1.56-1.60 \text{ мТл}$ по сравнению с $a_{iso}(\text{V}, 1200 \text{ Да})=1.56-1.58 \text{ мТл}$ при 50-70 °С). Температурная зависимость изотропного времени вращательной корреляции $t_{corr,iso}$ зондов типа **Б** в растворах сополимеров показывает, что во всех случаях $t_{corr,iso}$ проходит через максимум при определенной температуре T_{max} , которая находится в пределах 35-40 °С и 33 °С для сополимеров **II-IV** и полимера **V** соответственно. Аналогичная тенденция наблюдалась и для растворов PNIPAM, однако T_{max} была значительно выше (50 °С).

Помимо магнитно-резонансных и динамических параметров спиновых зондов в глобулах, на основании моделирования спектров ЭПР ТЕМПО в растворах графт-сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) была оценена зависимость распределения частиц ТЕМПО между раствором и глобулами от температуры (см. Рис. 56). Видно, что для всех сополимеров количество зондов типа **Б** плавно увеличивается с ростом температуры в широком температурном интервале (не менее 20 °С) в отличие от растворов PNIPAM, где концентрация частиц типа **Б** возрастает скачком от 0 до 40% при увеличении температуры на 1 °С вблизи НКТР, равной 32 °С. При температурах 50-70 °С содержание частиц типа **Б** практически не меняется и составляет около 55% и 60-70% для растворов с концентрацией 5 и 10 масс.% соответственно [263].



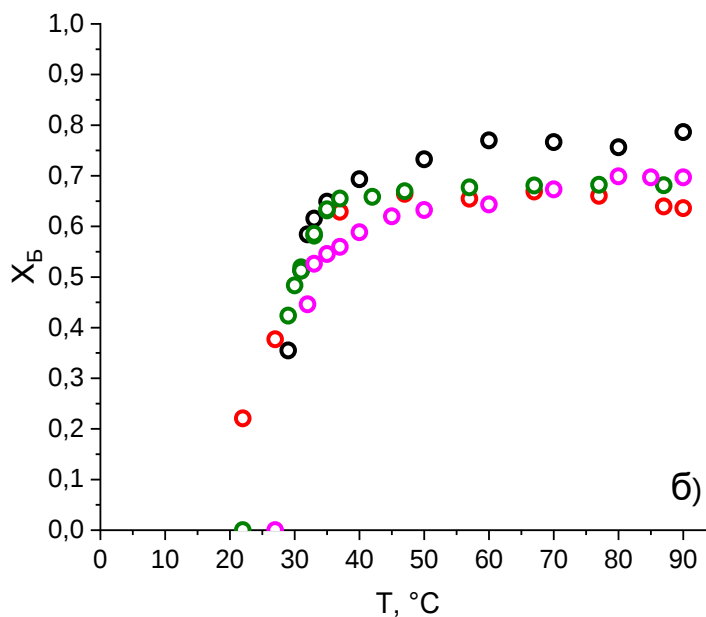


Рисунок 56. Температурная зависимость количества ТЕМПО в глобулах (X_B), полученная в результате моделирования спектров ЭПР: а - для 5 масс.% растворов; б - для 10 масс.% растворов. **I** – пурпурный, **II** – зеленый, **III** – черный, **IV** – красный, **V** – синий. Данные для гомополимера **I** взяты из работы [109].

Полученные в результате моделирования спектров ЭПР данные по содержанию зонда в глобулах позволяют рассчитать эффективный коэффициент распределения зонда (K_D) между глобулой и внешним раствором с учетом ряда допущений (см. Раздел 2.3.2.) по формуле (26) (см. Таблицу 11). Полученные коэффициенты распределения для сополимеров разного состава совпадают в пределах ошибки измерений.

Таблица 11. Результаты расчета коэффициента распределения ТЕМПО в 5 и 10 масс.% растворах сополимеров **II-V** для температур 47-50 °С.

Система	Концентрация, масс. %	Длина олиголактидного фрагмента, Да	T, °C	X_B , %	K_D
II	10	600	47	67	18
III	10	1200	50	73	24
III	5	1200	50	54	22
IV	10	600	47	66	17
IV	5	600	50	55	23
V	5	1200	50	56	24

Таким образом, по данным спектроскопии ЭПР в рамках методики спинового зонда, процесс коллапса в водных растворах сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) происходит постепенно в

широком диапазоне температур (около 20-35 °C) и первые полимерные агрегаты формируются ниже НКТР, измеренной турбидиметрией или ДСК. Эти результаты согласуются с данными, полученными для растворов P(NIPAM-*g*-PLA) методом DLS [57]. Однако спектроскопия ЭПР в рамках методики спинового зонда позволила оценить не только существование наноразмерных неоднородностей в условиях ниже НКТР, но и природу, и свойства этих неоднородностей, включая их полярность и жесткость. Судя по значениям a_{iso} спинового зонда в глобулах, глобулы P(NIPAM-*g*-PLA) более гидрофобны, чем PNIPAM, поэтому поверхность привитых сополимеров будет более адгезивной для клеток и белков [55,268].

Увеличение эффективной константы сверхтонкого взаимодействия a_{iso} зондов в глобулах привитых сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) в температурном интервале 50-80 °C указывает на динамический характер образующихся неоднородностей, то есть на обмен зондовыми молекулами между слабополярными полимерными глобулами и полярным водным раствором [36] (см. Приложение 2). В аналогичных условиях значения изотропной константы СТВ радикала ТЕМПО в глобулах PNIPAM практически не меняются [109], следовательно, молекулы ТЕМПО не выходят из глобул во внешнюю среду. Такие неоднородности называют статическими [36]. Увеличение плотности прививки олиголактидных фрагментов приводит к трансформации статических неоднородностей в динамические при более низких температурах. Эту температуру можно оценить как начальную точку повышения a_{iso} , и она уменьшается с увеличением плотности боковых цепей олиголактида. При этом даже 3 масс.% олиголактида приводит к образованию динамических неоднородностей, а увеличение содержания олиголактида увеличивает температурный диапазон их существования. По-видимому, олиголактидные группы в привитых сополимерах способствуют образованию менее плотных глобул с большим свободным объемом по сравнению с PNIPAM.

Наблюдаемые особенности перехода клубок-глобула в водных растворах привитого P(NIPAM-*g*-PLA) следует учитывать при использовании этих сополимеров в биомедицинских приложениях. Существование неоднородностей практически при 12 °C и расширенный температурный диапазон фазового перехода могут приводить к проблемам при откреплении клеточных листов от покрытий на основе привитых сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA). Полимерные цепи и полимерные агрегаты могут проникать во внеклеточный матрикс и ингибировать процесс отслоения при охлаждении. Однако существование динамических неоднородностей при физиологических температурах (37 °C) расширяет возможности применения изучаемых полимеров. Обмен молекулами зонда между глобулами и раствором позволяет применять трансплантат P(NIPAM-*g*-PLA) для регенерации тканей в виде инъекционных гелей, содержащих лекарственные препараты. Биоактивные соединения,

захваченные сколлапсированными полимерными глобулами в полимерном геле, могут высвобождаться *in vivo* за счет обмена с внешним раствором.

4.2.4. Кинетические закономерности высвобождения ТЕМПО из глобул PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) в водный раствор

Результаты, представленные в данном разделе, изложены в работе [235]¹.

Термочувствительные полимеры являются перспективными материалами для создания систем доставки лекарств. Для доставки при температурах ниже НКТР обычно используют гидрогели (см., например [212]). Выше НКТР высвобождение БАС из матриц термочувствительных полимеров стимулируется за счет деформации/коллпаса матрицы [77,78,211,213]. На наш взгляд, можно использовать еще один способ контролируемого высвобождения, основанный на наличии обмена молекулами допанта между полимерной глобулой и водной средой при температурах выше НКТР. При этом для формирования системы доставки лекарств из термочувствительных полимеров можно использовать перспективный метод, основанный на захвате БАС полимерными глобулами, образующимися в результате коллпаса полимерных цепей выше НКТР. Чем выше температура растворов термочувствительных полимеров, в том числе PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA), тем большее количество зонда находится в сколлапсированной глобуле [109,263]. Образовавшиеся выше НКТР глобулы можно отделить путем фильтрования или декантации. Именно таким способом нами были сформированы матрицы на основе PNIPAM (I) и P(NIPAM-*g*-PLA) (V), допированные ТЕМПО, в качестве модели БАС с использованием простых приемов – нагревания системы до 50 °С и последующей декантации (см. Раздел 2.5.2.) [235]. Моделирование процесса высвобождения БАС из матрицы проводили путем замены удаленного буферного раствора новой порцией PBS того же объема при 32 °С или 37 °С.

Спектры ЭПР систем полимер-ТЕМПО после декантации приведены на рисунке 57а (красная линия). Видно, что большая часть зонда локализуется в глобулах. Узкий триплет соответствует ТЕМПО, локализованному в остаточной внешней жидкости. Добавление PBS приводит к изменению формы линий — увеличению амплитуды узкого триплета, что свидетельствует о выходе зонда из глобул во внешний раствор (рис. 57а, синий спектр). Такая тенденция сохраняется в течение 4 часов, а затем спектр существенно не меняется (рис. 57б). Аналогичные тенденции изменения формы спектральных линий при выдерживании системы

¹ При описании данного раздела диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2 – 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Ivanova T.A., Zubanova E.M., Timashev P.S., Golubeva E.N. EPR study of controlled drug release from PNIPAM and P(NIPAM-*g*-PLA) globules // Russian Journal of Physical Chemistry B. — 2024. — Vol. 18, №. 3. — P. 780–787 [235]. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Ивановой Т.А. составил 60%.

при температуре выше НКТР наблюдаются для системы P(NIPAM-*g*-PLA)-ТЕМПО при 32 °С. В случае PNIPAM-ТЕМПО те же изменения выявляются в течение более длительного периода времени ~12 часов.

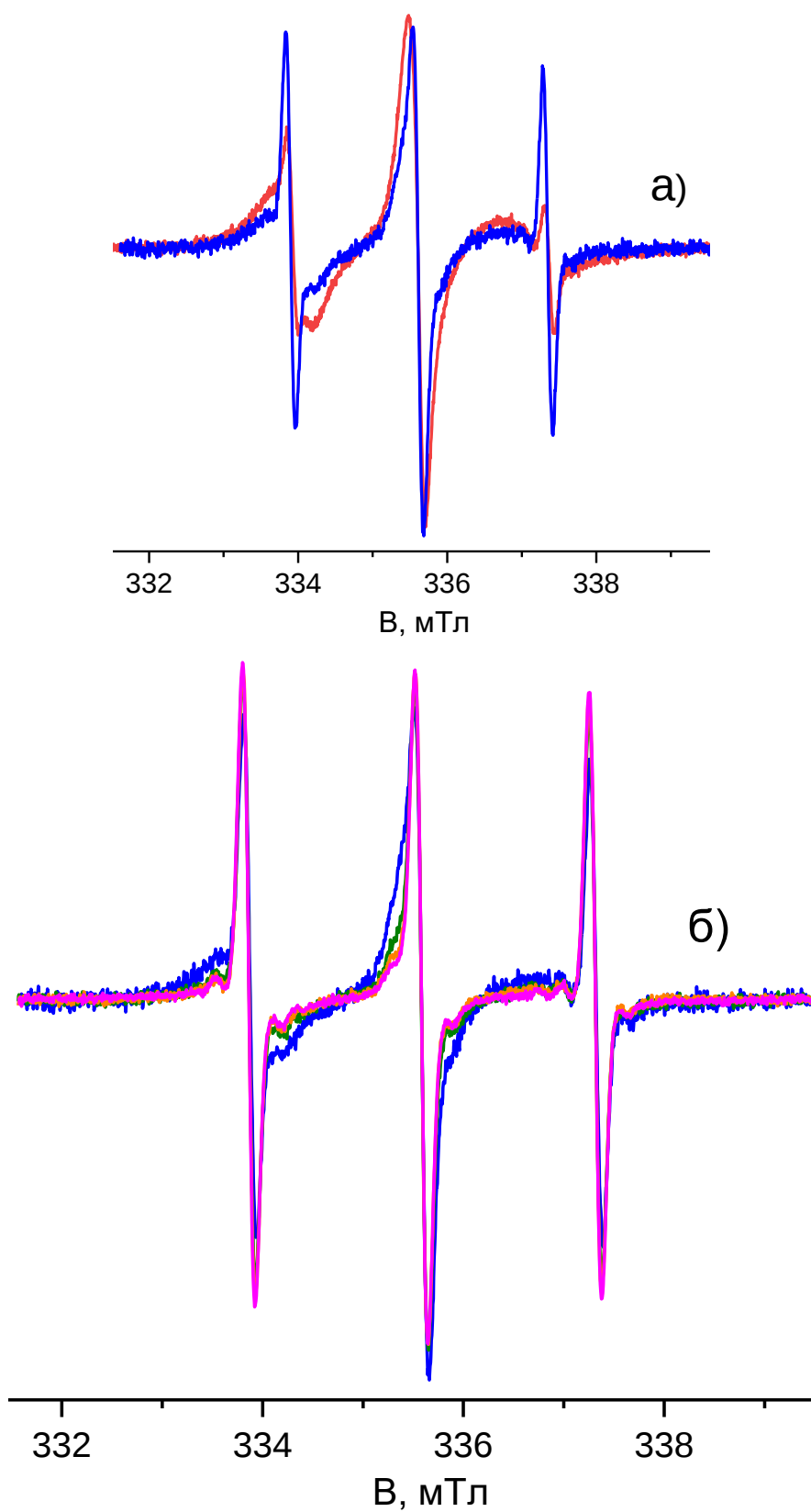


Рисунок 57. Спектры ЭПР системы P(NIPAM-*g*-PLA)-ТЕМПО: а - образец после отбора максимально возможного количества PBS при 50 °С (красная линия), после добавления PBS и

выдерживания при 37 °С в течение 5 мин (синяя линия); б – образец после добавления PBS и выдерживания при 37 °С в течение 5 мин (синяя линия), 1 часа (зеленая линия), 4 часов (оранжевая линия), 46 часов (розовая линия).

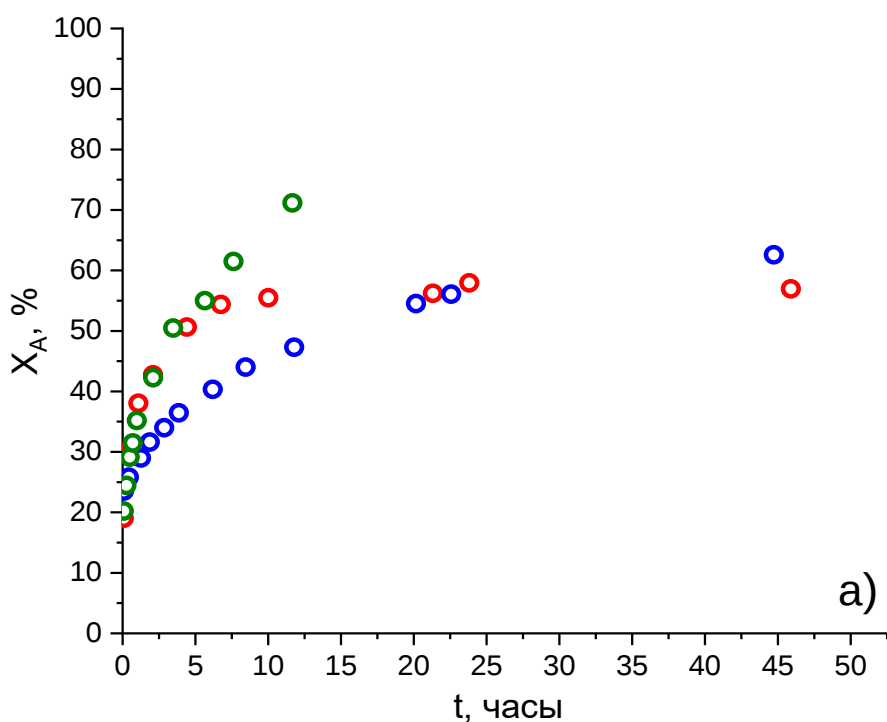
Время изотропной вращательной корреляции радикалов ТЕМПО в глобулах PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) ($t_{\text{corr,iso,B}}$) в зависимости от времени при 32 °С и 37 °С приведено в таблице 12. Время вращательной корреляции, соответствующее частицам **Б** в начальный момент времени несколько выше, чем для молекул-зондов, локализованных в глобулах, образующихся при этой же температуре при постепенном нагревании [109,263]. Оно со временем уменьшается и постепенно приближается к равновесным значениям. Известно, что при более высоких температурах образуются более плотные глобулы [269], и, по-видимому, с понижением температуры от 50 °С до 32 °С и 37 °С мы наблюдаем релаксацию плотности глобул.

Таблица 12. Параметры ТЕМПО в глобулах PNIPAM (**I**) и P(NIPAM-*g*-PLA) (**V**) в ходе высвобождения.

PNIPAM, 37 °С			P(NIPAM- <i>g</i> -PLA), 37 °С			P(NIPAM- <i>g</i> -PLA), 32 °С		
t, часы	$t_{\text{corr,iso, Б}}$, нс	X _A , %	t, часы	$t_{\text{corr,iso, Б}}$, нс	X _A , %	t, часы	$t_{\text{corr,iso, Б}}$, нс	X _A , %
0.1	1.4	24	0.1	2.1	19	0.1	2.3	20
0.4	1.4	26	0.6	2.1	31	0.3	2.3	24
1.3	1.4	29	1.1	2.1	38	0.5	2.3	29
1.9	1.4	32	2.1	2.1	43	0.7	2.3	31
2.9	1.4	34	4.41	1.9	51	1.0	2.2	35
3.9	1.4	36	6.8	1.9	54	2.1	2.2	42
6.2	1.4	40	10.0	1.9	55	3.5	2.2	50
8.5	1.4	44	21.3	1.9	56	5.7	2.2	55
11.8	1.4	47	23.8	1.9	58	7.6	2.2	61
20.2	1.4	55	45.9	1.9	57	11.7	2.2	71
22.6	1.3	56						
44.7	1.3	63						

Количество зонда ТЕМПО, выделившегося из глобул PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) при 32 °С и 37 °С, определяли путем моделирования спектров ЭПР, зарегистрированных через определенные промежутки времени. На рисунке 58а представлена зависимость количества зонда для систем PNIPAM-ТЕМПО и P(NIPAM-*g*-PLA)-ТЕМПО от времени при температурах выше НКТР. На начальном этапе полученные зависимости для P(NIPAM-*g*-PLA)-ТЕМПО при

32 °С и 37 °С близки, но через 5 часов между глобулами и раствором при 37 °С устанавливается равновесие, при этом выделение при 32 °С продолжается. Это может быть связано с тем, что при более низких температурах коэффициент распределения зонда в системе полимер-вода снижается, например, за счет уменьшения гидрофобности глобул. Высвобождение из глобул PNIPAM происходит медленнее, что можно объяснить образованием более компактных и жестких глобул PNIPAM по сравнению с P(NIPAM-*g*-PLA). На рисунке 58б представлены те же зависимости, построенные в координатах уравнения диффузии Фика (концентрация от корня из времени). Эти зависимости линейны не менее чем до 60%, что позволяет сделать вывод, что основным механизмом высвобождения ТЕМПО из глобул термочувствительных полимеров при температурах выше НКТР является механизм фиковской диффузии [179]. Угол наклона прямых (рис. 58б), пропорциональный коэффициенту диффузии, для матриц P(NIPAM-*g*-PLA) при обеих температурах больше соответствующей величины для системы из PNIPAM.



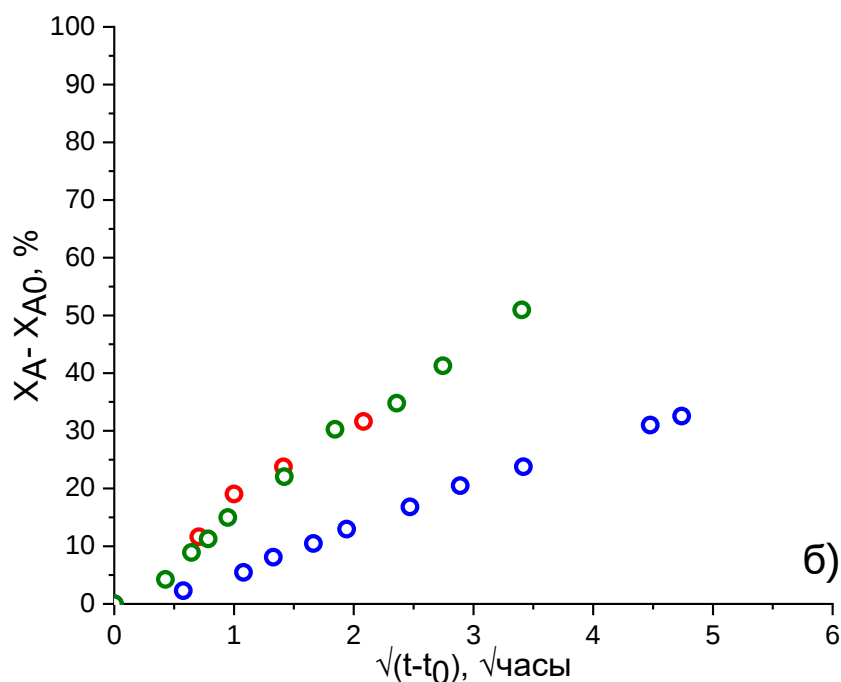


Рисунок 58. Зависимости количества спинового зонда ТЕМПО, высвободившегося из неоднородностей 5 масс.% растворов термочувствительных полимеров PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) при разных температурах от времени: красные символы – P(NIPAM-*g*-PLA)/37 °C, синие символы - PNIPAM/37 °C, зеленые символы – P(NIPAM-*g*-PLA)/32 °C: а – зависимость от времени; б – зависимость от корня из времени.

Таким образом, нами был предложен простой и эффективный метод получения системы доставки лекарств на основе термочувствительных полимеров с использованием в качестве модельной системы PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) и спинового зонда ТЕМПО. Он основан на получении полимерных глобул, которые в процессе коллапса захватывают молекулы-зонды в результате нагревания растворов термочувствительного полимера и ТЕМПО при температуре значительно выше НКТР (50 °C). Профиль высвобождения ТЕМПО из образовавшихся глобул PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA) при температурах выше НКТР и близких к физиологическим (32 °C и 37 °C) описывается механизмом фиковской диффузии.

Заключение

Таким образом, с использованием сверхкритического диоксида углерода созданы полимерные матриксы на основе PDLA с взаимосвязанной системой пор и равномерным распределением допанта – нитроксильного радикала по матрице. Кроме того, из данных пористых матриксов путем измельчения и последующего прессования получен другой перспективный вид СДЛ – пленки толщиной 110-160 мкм. Впервые показано, что введение в боковую цепь термочувствительного полимера PNIPAM гидрофобного заместителя олиголактида, обладающего способностью к набуханию в scCO_2 , позволяет использовать технологию СКФ импрегнации для введения БАС в полимеры на основе PNIPAM. В результате установления закономерностей коллапса полимерных цепей в водных растворах графт-сополимеров на основе N-изопропилакриламида и олиголактида P(NIPAM-*g*-PLA) с разным содержанием олиголактидных фрагментов предложен простой и эффективный метод получения СДЛ на основе термочувствительных полимеров на примере PNIPAM, P(NIPAM-*g*-PLA) и спинового зонда ТЕМПО. Установлены профили высвобождения нитроксильных радикалов как моделей БАС *in vitro* из матриксов PDL04, пленок PDL02 и PDL04, глобул PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA).

На основании проведенного исследования можно сформулировать следующие основные результаты и выводы:

1. Определены оптимальные параметры формирования систем доставки лекарств, обладающих системой взаимосвязанных пор и равномерным распределением биологически активного вещества, путем вспенивания поли-D,L-лактида с его одновременной импрегнацией нитроксильными спиновыми зондами и спин-мечеными лекарственными веществами в среде сверхкритического CO_2 . Показано, что основным процессом, определяющим кинетику и механизм высвобождения спинового зонда TEMPONE из полученных таким образом систем, в водный раствор, является фиковская диффузия зонда в порах, сформированных при вспенивании полимера.
2. Установлено, что профили высвобождения низкомолекулярных веществ из пленок поли-D,L-лактида в водную среду могут быть описаны в рамках одной модели, предполагающей образование и зарастание узких приповерхностных пор, гидролиз полимерных цепей с образованием пор, заполненных жидкостью, постепенно соединяющихся с поверхностью пленки, и определяются соотношением скоростей диффузии и гидролиза полимерных цепей, зависящим от толщины пленок, молекулярной массы полимера, строения молекулы допанта.

3. Процесс коллапса полимерных цепей в водных растворах сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) происходит в широком диапазоне температур (около 20-35 °C). Согласно измеренным магнитно-резонансным параметрам спинового зонда ТЕМПО неоднородности в водных растворах сополимеров P(NIPAM-*g*-PLA) имеют меньшую полярность, чем в растворах PNIPAM, и при нагревании выше 40°C из статических неоднородностей переходят в динамические.
4. Показано, что высвобождение нитроксильного радикала ТЕМПО из глобул термочувствительных полимеров PNIPAM и P(NIPAM-*g*-PLA), сформированных в результате коллапса полимерных цепей, протекает по механизму фиковской диффузии.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки

Разработана методика формирования в среде scCO_2 пористых матриц из PDLLA, содержащих низкомолекулярные БАС (нитроксильные радикалы и спин-меченые лекарственные соединения) и применимых в качестве временных протезов. Установленные в работе кинетика и механизм высвобождения спиновых зондов и спин-меченых лекарств могут быть использованы для прогнозирования кинетических профилей высвобождения БАС различной природы из пористых матриц и пленок PDLLA разной толщины.

Установленные в работе закономерности коллапса полимерных цепей в растворах термочувствительных полимеров P(NIPAM-*g*-PLA), происходящего в широком температурном интервале (около 20-35 °C), а также кинетические закономерности высвобождения нитроксильных радикалов из глобулярных структур могут быть использованы для расширения области применения этих материалов в качестве матриц для формирования СДЛ.

Список сокращений и обозначений

a_{iso} – изотропная константа сверхтонкого взаимодействия

$\mathcal{D}$ – полидисперсность

DLS - dynamic light scattering – метод динамического рассеяния света

DPI - 5,5-диметил-4-(диметиламино)-2-этил-2-пиридин-4-ил-2,5-дигидро-1H-имидазол-1-оксил

D_w - коэффициент диффузии воды

g_{iso} – изотропное значение g-фактора

K_D - коэффициент распределения зонда

M_n - среднечисловая молекулярная масса

M_w - средневесовая молекулярная масса

M_{WD} – молекулярно-массовое распределение

NIPAM - N-изопропилакриламида

NTBA - N-трет-бутилакриламид

PBS - фосфатно-буферный раствор (pH=7.4)

PDL02 – поли-D,L-лактид со среднечисловой молекулярной массой 11.8 кДа

PDL04 – поли-D,L-лактид со среднечисловой молекулярной массой 14.8 кДа

PDLLA – поли-D,L-лактид

PGA - полигликолиды

PLA - полилактиды

PLGA - полилактогликолиды

PLLA – поли-L-лактид

PMMA - полиметилметакрилат

PNIPAM – поли(N-изопропилакриламид)

P(NIPAM-*g*-PLA) - графт-сополимер на основе N-изопропилакриламида и олиголактида

R5 - 2,2,5,5 – тетраметил-4-фенил-3-имидазолин-1-оксил-3-оксид

SI – индекс (степень) набухания

sl-DCF - спин-меченый диклофенак

sl-DHQ - спин-меченый дигидрокверцетин

TEMPO - 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил

TEMPOL - 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксид

TEMPONE - 4-оксо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксид

t_{corr} - время вращательной корреляции

$t_{corr,iso}$ – изотропное время вращательной корреляции

T_g – температура стеклования

T_{glob} - температура начала образования глобул в растворах P(NIPAM-*g*-PLA) в присутствии ионов Cu^{2+}

T_{sim} – температура раствора, для которого выполнено моделирование спектра

T_{start} – температура начала уменьшения амплитуды сигнала спектра ЭПР

БАС – биологически активные соединения

ГПХ - гель-проникающая хроматография

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

НКТР - нижняя критическая температура растворения

СДЛ – система доставки лекарств

ск CO_2 - сверхкритический диоксид углерода

СКФ – сверхкритический флюид или сверхкритический флюидный

СТВ – сверхтонкое взаимодействие

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Список литературы

1. Chumakova N.A., Golubeva E.N., Kuzin S. V., Ivanova T.A., Grigoriev I.A., Kostjuk S. V., Melnikov M.Y. New insight into the mechanism of drug release from poly(D,L-lactide) film by electron paramagnetic resonance // *Polymers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 12. P. 3046–3067.
2. Ramakrishna S., Mayer J., Wintermantel E., Leong K.W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review // *Compos. Sci. Technol.* 2001. Vol. 61, № 9. P. 1189–1224.
3. Vert M. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything // *Biomacromolecules*. 2005. Vol. 6, № 2. P. 538–546.
4. Freyman T.M., Yannas I. V., Gibson L.J. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering // *Prog. Mater. Sci.* 2001. Vol. 46, № 3–4. P. 273–282.
5. Kaushik K., Sharma R.B., Agarwal S. Natural polymers and their applications // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2016. Vol. 37, № 2. P. 30–36.
6. Asghari F., Samiei M., Adibkia K., Akbarzadeh A., Davaran S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review // *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2017. Vol. 45, № 2. P. 185–192.
7. Iqbal N., Khan A.S., Asif A., Yar M., Haycock J.W., Rehman I.U. Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: a critical review // *Int. Mater. Rev.* Taylor & Francis, 2019. Vol. 64, № 2. P. 91–126.
8. Sionkowska A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review // *Prog. Polym. Sci.* Elsevier Ltd, 2011. Vol. 36. P. 1254–1276.
9. Gunatillake P., Mayadunne R., Adhikari R. Recent developments in biodegradable synthetic polymers // *Biotechnology Annual Review*. 2006. Vol. 12, № 06. P. 301–347.
10. Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review // *Int. J. Polym. Sci.* 2011. Vol. 2011. P. 1–19.
11. Иванова Т.А., Голубева Е.Н. Алифатические полиэфиры для биомедицинских целей: дизайн и кинетические закономерности деградации in vitro // *Химическая физика*. 2022. Т. 41, № 6. С. 34–54.
12. Arif Z.U., Khalid M.Y., Noroozi R., Sadeghianmaryan A., Jalalvand M., Hossain M. Recent advances in 3D-printed polylactide and polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering applications // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V., 2022. Vol. 218. P. 930–968.
13. Mahar R., Chakraborty A., Nainwal N., Bahuguna R., Sajwan M., Jakhmola V. Application of PLGA as a Biodegradable and Biocompatible Polymer for Pulmonary Delivery of Drugs // *AAPS PharmSciTech*. 2023. Vol. 24, № 39. P. 1–20.
14. Grizzi I., Garreau H., Li S., Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic

- acid) size-dependence // *Biomaterials*. 1995. Vol. 16, № 4. P. 305–311.
15. Tsuji H., Ikada Y. Properties and morphology of poly(l-lactide). Effects of structural parameters on long-term hydrolysis of poly(l-lactide) in phosphate-buffered solution // *Polym. Degrad. Stab.* 2000. Vol. 67, № 1. P. 179–189.
 16. Jong S.J., Arias E.R., Rijkers D.T.S., Nostrum C.F., Kettenes-van den Bosch J.J., Hennink W.E. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus // *Polymer (Guildf)*. 2001. Vol. 42, № 7. P. 2795–2802.
 17. Proikakis C.S., Mamouzelos N.J., Tarantili P.A., Andreopoulos A.G. Swelling and hydrolytic degradation of poly(d,l-lactic acid) in aqueous solutions // *Polym. Degrad. Stab.* 2006. Vol. 91, № 3. P. 614–619.
 18. Washington K.E., Kularatne R.N., Karmegam V., Biewer M.C., Stefan M.C. Recent advances in aliphatic polyesters for drug delivery applications // *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2017. Vol. 9.
 19. Commandeur S., Van Beusekom H.M.M., Van Der Giessen W.J. Polymers, Drug Release, and Drug-Eluting Stents // *J. Interv. Cardiol.* 2006. Vol. 19, № 6. P. 500–506.
 20. Gentile P., Chiono V., Carmagnola I., Hatton P. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15, № 3. P. 3640–3659.
 21. Rich J., Korhonen H., Hakala R., Korventausta J., Elomaa L., Seppälä J. Porous biodegradable scaffold: Predetermined porosity by dissolution of poly(ester-anhydride) fibers from polyester matrix // *Macromol. Biosci.* 2009. Vol. 9, № 7. P. 654–660.
 22. Rhim J.-W., Mohanty A.K., Singh S.P., Ng P.K.W. Effect of the processing methods on the performance of polylactide films: Thermocompression versus solvent casting // *J. Appl. Polym. Sci.* 2006. Vol. 101, № 6. P. 3736–3742.
 23. Chang L., Liu J., Zhang J., Deng L., Dong A. pH-sensitive nanoparticles prepared from amphiphilic and biodegradable methoxy poly(ethylene glycol)-block-(polycaprolactone-graft-poly(methacrylic acid)) for oral drug delivery // *Polym. Chem.* 2013. Vol. 4, № 5. P. 1430–1438.
 24. Vacanti J.P., Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation // *Lancet*. 1999. Vol. 354, № 1. P. S32–S34.
 25. Ma P.X. Scaffolds for tissue fabrication // *Mater. Today*. Elsevier B.V., 2004. Vol. 7, № 5. P. 30–40.
 26. Holland S.J., Jolly A.M., Yasin M., Tighe B.J. Polymers for biodegradable medical devices // *Biomaterials*. 1987. Vol. 8, № 4. P. 289–295.
 27. Bergsma J.E., Bruijn W.C., Rozema F.R., Bos R.R.M., Boering G. Late degradation tissue

- response to poly(L-lactide) bone plates and screws // *Biomaterials*. 1995. Vol. 16, № 1. P. 25–31.
28. You Y., Lee S.W., Youk J.H., Min B.-M., Lee S.J., Park W.H. In vitro degradation behaviour of non-porous ultra-fine poly(glycolic acid)/poly(l-lactic acid) fibres and porous ultra-fine poly(glycolic acid) fibres // *Polym. Degrad. Stab.* 2005. Vol. 90, № 3. P. 441–448.
 29. Baino F. Biomaterials and implants for orbital floor repair // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2011. Vol. 7, № 9. P. 3248–3266.
 30. You Y., Min B.-M., Lee S.J., Lee T.S., Park W.H. In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide) // *J. Appl. Polym. Sci.* 2005. Vol. 95, № 2. P. 193–200.
 31. Agrawal C.M., Ray R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res.* 2001. Vol. 55, № 2. P. 141–150.
 32. Sarazin P., Roy X., Favis B.D. Controlled preparation and properties of porous poly(l-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers // *Biomaterials*. 2004. Vol. 25, № 28. P. 5965–5978.
 33. Vert M., Li S., Garreau H., Mauduit J., Boustta M., Schwach G., Engel R., Coudane J. Complexity of the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters // *Angew. Makromol. Chemie*. 1997. Vol. 247, № 1. P. 239–253.
 34. Galaev I.Y., Mattiasson B. ‘Smart’ polymers and what they could do in biotechnology and medicine // *Tibtech*. 1999. Vol. 17. P. 335–340.
 35. Gil E.S., Hudson S.M. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates // *Prog. Polym. Sci.* 2004. Vol. 29, № 12. P. 1173–1222.
 36. Kurzbach D., Schömer M., Wilms V.S., Frey H., Hinderberger D. How structure-related collapse mechanisms determine nanoscale inhomogeneities in thermoresponsive polymers // *Macromolecules*. 2012. Vol. 45, № 18. P. 7535–7548.
 37. Kurzbach D., Junk M.J.N., Hinderberger D. Nanoscale inhomogeneities in thermoresponsive polymers // *Macromol. Rapid Commun.* 2013. Vol. 34, № 2. P. 119–134.
 38. Mithun R.D., Prabakaran A., Hafiz A., Mukta A., Upal R., Amit A. PCL-PEG copolymer based injectable thermosensitive hydrogels // *J. Control. Release*. 2022. Vol. 343. P. 217–236.
 39. Zhang K., Xue K., Loh X.J. Thermo-Responsive Hydrogels: From Recent Progress to Biomedical Applications // *Gels*. 2021. Vol. 7, № 3. P. 77.
 40. Samal S.K., Dash M., Dubruel P., Vlierberghe S. V. Smart polymer hydrogels: properties, synthesis and applications // *Smart Polymers and their Applications*. Woodhead Publishing Limited, 2014. 237–270 p.
 41. Hoffman A.S., Stayton P.S. Applications of “Smart Polymers” as Biomaterials // *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic P. Elsevier, 2020. 191–203 p.

42. Ottaviani M.F., Winnik F.M., Bossmann S.H., Turro N.J. Phase Separation of Poly(N - isopropylacrylamide) in Mixtures of Water and Methanol : A Spectroscopic Study of the Phase-Transition Process with a Polymer Tagged with a Fluorescent Dye and a Spin Label // *Helv. Chim. Acta*. 2001. Vol. 84. P. 2476–2492.
43. Liechty W.B., Kryscio D.R., Slaughter B. V., Peppas N.A. Polymers for Drug Delivery Systems // *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2010. Vol. 1, № 1. P. 149–173.
44. Ansari M.J., Rajendran R.R., Mohanto S., Agarwal U., Panda K., Dhotre K., Manne R., Deepak A., Zafar A., Yasir M., Pramanik S. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review of the State-of-the-Art // *Gels*. 2022. Vol. 8. P. 454.
45. Heskins M., Guillet J.E. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide) // *J. Macromol. Sci. Part A - Chem.* 1968. Vol. 2, № 8. P. 1441–1455.
46. Schmaljohann D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006. Vol. 58, № 15. P. 1655–1670.
47. Cao M., Wang Y., Hu X., Gong H., Li R., Cox H., Zhang J., Waigh T.A., Xu H., Lu J.R. Reversible Thermoresponsive Peptide–PNIPAM Hydrogels for Controlled Drug Delivery // *Biomacromolecules*. 2019. Vol. 20, № 9. P. 3601–3610.
48. Wu J.-Y., Liu S.-Q., Heng P.W.-S., Yang Y.-Y. Evaluating proteins release from, and their interactions with, thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels // *J. Control. Release*. 2005. Vol. 102, № 2. P. 361–372.
49. Agnihotri P., Sangeeta, Aery S., Dan A. Temperature- And pH-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) microgels as a carrier for controlled protein adsorption and release // *Soft Matter*. Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 17, № 42. P. 9595–9606.
50. Kanazawa H., Okano T. Temperature-responsive chromatography for the separation of biomolecules // *J. Chromatogr. A*. 2011. Vol. 1218, № 49. P. 8738–8747.
51. Gao X., Cao Y., Song X., Zhang Z., Xiao C., He C., Chen X. pH- and thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid derivative) copolymers and hydrogels with LCST dependent on pH and alkyl side groups // *J. Mater. Chem. B*. 2013. Vol. 1, № 41. P. 5578–5587.
52. Efremov Y.M., Zurina I.M., Presniakova V.S., Kosheleva N. V., Butnaru D. V., Svistunov A.A., Rochev Y.A., Timashev P.S. Mechanical properties of cell sheets and spheroids: the link between single cells and complex tissues // *Biophys. Rev.* 2021. Vol. 13, № 4. P. 541–561.
53. Li M., Ma J., Gao Y., Yang L. Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine // *Cytotherapy*. 2019. Vol. 21, № 1. P. 3–16.
54. Takezawa T., Mori Y., Yoshizato K. Cell Culture on a Thermo-Responsive Polymer Surface // *Nat. Biotechnol.* 1990. Vol. 8, № 9. P. 854–856.
55. Nash M.E., Fan X., Carroll W.M., Gorelov A. V., Barry F.P., Shaw G., Rochev Y.A.

- Thermoresponsive Substrates used for the Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells and the Preservation of Immunophenotype // *Stem Cell Rev. Reports*. 2013. Vol. 9, № 2. P. 148–157.
56. Frolova A., Ksendzov E., Kostjuk S., Efremov Y., Solovieva A., Rochev Y., Timashev P., Kotova S. Thin Thermoresponsive Polymer Films for Cell Culture: Elucidating an Unexpected Thermal Phase Behavior by Atomic Force Microscopy // *Langmuir*. 2021. Vol. 37, № 38. P. 11386–11396.
 57. Ksendzov E.A., Nikishau P.A., Zurina I.M., Presniakova V.S., Timashev P.S., Rochev Y.A., Kotova S.L., Kostjuk S.V. Graft Copolymers of N -Isopropylacrylamide with Poly(d, l -lactide) or Poly(ϵ -caprolactone) Macromonomers: A Promising Class of Thermoresponsive Polymers with a Tunable LCST // *ACS Appl. Polym. Mater.* 2022. Vol. 4, № 2. P. 1344–1357.
 58. Ikada Y., Tsuji H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications // *Macromol. Rapid Commun.* 2000. Vol. 21, № 3. P. 117–132.
 59. Lee B.H., Vernon B. Copolymers of N-isopropylacrylamide, HEMA-lactate and acrylic acid with time-dependent lower critical solution temperature as a bioresorbable carrier // *Polym. Int.* 2005. Vol. 54, № 2. P. 418–422.
 60. Tebong Mbah V., Pertici V., Lacroix C., Verrier B., Stipa P., Gigmes D., Trimaille T. A Sacrificial PLA Block Mediated Route to Injectable and Degradable PNIPAAm-Based Hydrogels // *Polymers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 4. P. 925.
 61. Pertici V., Pin-Barre C., Rivera C., Pellegrino C., Laurin J., Gigmes D., Trimaille T. Degradable and Injectable Hydrogel for Drug Delivery in Soft Tissues // *Biomacromolecules*. 2019. Vol. 20, № 1. P. 149–163.
 62. Rana M.M., De la Hoz Siegler H. Tuning the Properties of PNIPAm-Based Hydrogel Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering // *Polymers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 18. P. 3154.
 63. Charifson P.S., Walters W.P. Acidic and basic drugs in medicinal chemistry: A perspective // *J. Med. Chem.* 2014. Vol. 57, № 23. P. 9701–9717.
 64. Corry D., Moran J. Assessment of acrylic bone cement as a local delivery vehicle for the application of non-steroidal anti-inflammatory drugs // *Biomaterials*. 1998. Vol. 19, № 14. P. 1295–1301.
 65. González Corchón M.A., Salvado M., de la Torre B.J., Collía F., de Pedro J.A., Vázquez B., Román J.S. Injectable and self-curing composites of acrylic/bioactive glass and drug systems. A histomorphometric analysis of the behaviour in rabbits // *Biomaterials*. 2006. Vol. 27, № 9. P. 1778–1787.
 66. Егорихина М.Н., Мухина П.А., Бронникова И.И. Скаффолды как системы доставки биологически активных и лекарственных веществ // *Комплексные Проблемы Сердечно-Сосудистых Заболеваний*. 2020. Т. 9, № 1. С. 92–102.

67. Mashak A., Mobedi H., Mahdavi H. A Comparative Study of Progesterone and Lidocaine Hydrochloride Release from Poly(L-lactide) Films // *Pharm. Sci.* 2015. Vol. 21, № 2. P. 77–85.
68. Klose D., Siepmann F., Elkharraz K., Siepmann J. PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry // *Int. J. Pharm.* 2008. Vol. 354, № 1–2. P. 95–103.
69. Doorty K.B., Golubeva T.A., Gorelov A. V., Rochev Y.A., Allen L.T., Dawson K.A., Gallagher W.M., Keenan A.K. Poly(N-isopropylacrylamide) co-polymer films as potential vehicles for delivery of an antimitotic agent to vascular smooth muscle cells // *Cardiovasc. Pathol.* 2003. Vol. 12. P. 105–110.
70. Wilson S.J., Gorelov A. V., Rochev Y.A., McGillicuddy F., Dawson K.A., Gallagher W.M., Keenan A.K. Extended delivery of the antimitotic agent colchicine from thermoresponsive N-isopropylacrylamide-based copolymer films to human vascular smooth muscle cells // *Cardiovasc. Pathol.* 2003. Vol. 12, № 2. P. 105–110.
71. Cabezas L.I., Fernández V., Mazarro R., Gracia I., de Lucas A., Rodríguez J.F. Production of biodegradable porous scaffolds impregnated with indomethacin in supercritical CO₂ // *J. Supercrit. Fluids.* Elsevier B.V., 2012. Vol. 63. P. 155–160.
72. Velasco D., Benito L., Fernández-Gutiérrez M., San Román J., Elvira C. Preparation in supercritical CO₂ of porous poly(methyl methacrylate)–poly(l-lactic acid) (PMMA–PLA) scaffolds incorporating ibuprofen // *J. Supercrit. Fluids.* Elsevier B.V., 2010. Vol. 54, № 3. P. 335–341.
73. Cabezas L.I., Gracia I., García M.T., de Lucas A., Rodríguez J.F. Production of biodegradable porous scaffolds impregnated with 5-fluorouracil in supercritical CO₂ // *J. Supercrit. Fluids.* Elsevier B.V., 2013. Vol. 80. P. 1–8.
74. Ramchandani M., Robinson D. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants // *J. Control. Release.* 1998. Vol. 54, № 2. P. 167–175.
75. Choi C., Chae S.Y., Nah J.-W.N. Thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide)-b-poly (3-caprolactone) nanoparticles for efficient drug delivery system // *Polymer (Guildf).* 2006. Vol. 47. P. 4571–4580.
76. Chaw C.-S., Chooi K.-W., Liu X.-M., Tan C.-W., Wang L., Yang Y.-Y. Thermally responsive core-shell nanoparticles self-assembled from cholesteryl end-capped and grafted polyacrylamides: drug incorporation and in vitro release // *Biomaterials.* 2004. Vol. 25. P. 4297–4308.
77. Zhang H., Niu Q., Wang N., Nie J., Ma G. Thermo-sensitive drug controlled release PLA core/PNIPAM shell fibers fabricated using a combination of electrospinning and UV photopolymerization // *Eur. Polym. J.* Elsevier Ltd, 2015. Vol. 71. P. 440–450.

78. Wei H., Zhang X.-Z., Zhou Y., Cheng S.-X., Zhuo R.-X. Self-assembled thermoresponsive micelles of poly (N-isopropylacrylamide-b-methyl methacrylate) // *Biomaterials*. 2006. Vol. 27. P. 2028–2034.
79. Aguilar M.R., Román J.S. *Introduction to Smart Polymers and Their Applications* // *Smart Polymers and their Applications*. Second Edi. Elsevier Ltd., 2019. 1–11 p.
80. Bordbar-Khiabani A., Gasik M. *Smart Hydrogels for Advanced Drug Delivery Systems*. 2022.
81. Ramkissoo-Ganorkar C., Liu F., Baydys M., Kim S.W. Effect of molecular weight and polydispersity on kinetics of dissolution and release from pH/temperature-sensitive polymers // *J. Biomater. Sci.* 1999. Vol. 10, № 10. P. 1149–1161.
82. Serres A., Baudys M., Kim S.W. Temperature and pH-sensitive polymers for human calcitonin delivery // *Pharm. Res.* 1996. Vol. 13, № 2. P. 196–201.
83. Gomes M.E., Reis R.L. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: From catgut to tissue engineering Part 2 Systems for temporary replacement and advanced tissue regeneration // *Int. Mater. Rev.* 2004. Vol. 49, № 5. P. 274–285.
84. Santos-rosales V., Iglesias-mejuto A., Garc C.A. Solvent-Free Approaches for the Processing of Scaffolds in Regenerative Medicine // *Polymers (Basel)*. 2020. Vol. 12. P. 533.
85. Vedunova M. V, Timashev P.S., Mishchenko T.A., Mitroshina E. V, Koroleva A. V, Chichkov B.N., Panchenko V.Y., Bagratashvili V.N., Mukhina I. V. Formation of Neural Networks in 3D Scaffolds Fabricated by Means of Laser Microstereolithography // *Cell Technol. Biol. Med.* 2016. № 2. P. 616–621.
86. Zhang E., Zhu C., Yang J., Sun H., Zhang X., Li S., Wang Y., Sun L., Yao F. Electrospun PDLA/PLGA composite membranes for potential application in guided tissue regeneration // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier B.V.*, 2016. Vol. 58. P. 278–285.
87. García-González C.A., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C. Processing of Materials for Regenerative Medicine Using Supercritical Fluid Technology // *Bioconjugate Chem.* 2014. Vol. 26, № 7. P. 1159–1171.
88. Tai H., Mather M., Howard D., Wang W., White L., Crowe J., Morgan S., Chandra A., Williams D., Howdle S., Shakesheff K. Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing // *Eur. Cells Mater.* 2007. Vol. 14. P. 64–77.
89. Song C., Zhang J., Li S., Yang S., Lu E., Xi Z., Cen L., Zhao L., Yuan W. Highly interconnected macroporous MBG / PLGA scaffolds with enhanced mechanical and biological properties via green foaming strategy // *Chinese J. Chem. Eng. Elsevier B.V.*, 2021. Vol. 29. P. 426–436.
90. Floren M., Spilimbergo S., Motta A., Migliaresi C. Porous poly(D, L -lactic acid) foams with tunable structure and mechanical anisotropy prepared by supercritical carbon dioxide // *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 2011. Vol. 99 B, № 2. P. 338–349.

91. Moghadam M.Z., Hassanajili S., Esmaeilzadeh F., Ayatollahi M., Ahmadi M. Formation of porous HPCL/LPCL/HA scaffolds with supercritical CO₂ gas foaming method // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. Elsevier, 2017. Vol. 69. P. 115–127.
92. Santos-Rosales V., Gallo M., Jaeger P., Alvarez-lorenzo C., Gómez-amoz J.L., García-gonzález C.A. New insights in the morphological characterization and modelling of poly (ε-caprolactone) bone scaffolds obtained by supercritical CO₂ foaming // J. Supercrit. Fluids. 2020. Vol. 166. P. 105012.
93. Bhamidipati M., Scurto A.M., Detamore M.S. The Future of Carbon Dioxide for Polymer Processing in Tissue Engineering // Tissue Eng. Part B Rev. 2013. Vol. 19, № 3. P. 221–232.
94. White L.J., Hutter V., Tai H., Howdle S.M., Shakesheff K.M. The effect of processing variables on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering // Acta Biomater. Acta Materialia Inc., 2012. Vol. 8, № 1. P. 61–71.
95. Reverchon E., Adami R., Cardea S., Porta G. Della. Supercritical fluids processing of polymers for pharmaceutical and medical applications // J. Supercrit. Fluids. 2009. Vol. 47, № 3. P. 484–492.
96. Golubeva E.N., Chumakova N.A., Kuzin S.V., Grigoriev I.A., Kalai T., Korotkevich A.A., Bogorodsky S.E., Krotova L.I., Popov V.K., Lunin V.V. Paramagnetic bioactives encapsulated in poly(D,L-lactide) microparticles: Spatial distribution and in vitro release kinetics // J. Supercrit. Fluids. Elsevier B.V., 2020. Vol. 158. P. 104748.
97. Howdle S.M., Watson M.S., Whitaker M.J., Popov V.K., Davies M.C., Mandel F.S., Wang J.D., Shakesheff K.M. Supercritical fluid mixing: Preparation of thermally sensitive polymer composites containing bioactive materials // Chem. Commun. 2001. № 1. P. 109–110.
98. Antonov E.N., Dunaev A.G., Minaeva S.A., Krotova L.I., Popov V.K. Effects of Pharmaceutical Preparations on the Rate of Degradation of Poly(Lactide-Co-Glycolide) Scaffolds // Pharm. Chem. J. 2018. Vol. 52, № 1. P. 69–76.
99. Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., Иванова Т.А., Воробьева Н.Н., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н. ЭПР диагностика пористых матриксов на основе D,L-полилактида, сформированных в среде сверхкритического CO₂ // Сверхкритические Флюиды Теория И Практика. 2018. Т. 1. С. 86–93.
100. Hitchen S.M., Dean J.R. Properties of supercritical fluids // Appl. Supercrit. Fluids Ind. Anal. 1993. P. 1–11.
101. Залепугин Д.Ю., Тилькунова Н.А., Чернышова И.В., Поляков В.С. Развитие технологий, основанных на использовании сверхкритических флюидов // Сверхкритические Флюиды Теория И Практика. 2006. Т. 1, № 1. С. 27–51.
102. Zimnyakov D.A., Popov V.K., Minaev N. V., Epifanov E.O., Parenago O.O., Zdrajevsky R.A.,

- Vereshagin D.A., Ushakova O. V. Competition of Phase Separation Processes during Quasi-Isothermal Foaming of Polylactide in Carbon Dioxide Environment // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2020. Vol. 14, № 8. P. 1268–1276.
103. Zalepugin D.Y., Tilkunova N.A., Chernyshova I. V. Impregnation of Polymer Materials in Supercritical Media (a Review) // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2020. Vol. 14, № 7. P. 1067–1076.
 104. Valor D., Montes A., Monteiro M., Garc I., Pereyra C., Mart E., Ossa D. Determining the Optimal Conditions for the Production by Supercritical CO₂ of Biodegradable PLGA Foams for the Controlled Release of Rutin as a Medical Treatment // *Polymers (Basel)*. 2021. Vol. 13. P. 1645.
 105. Duarte A.R.C., Santo V.E., Alves A., Silva S.S., Moreira-Silva J., Silva T.H., Marques A.P., Sousa R.A., Gomes M.E., Mano J.F., Reis R.L. Unleashing the potential of supercritical fluids for polymer processing in tissue engineering and regenerative medicine // *J. Supercrit. Fluids*. Elsevier B.V., 2013. Vol. 79. P. 177–185.
 106. Duarte A.R.C., Mano J.F., Reis R.L. Thermosensitive polymeric matrices for three-dimensional cell culture strategies // *Acta Biomater*. 2011. Vol. 7, № 2. P. 526–529.
 107. Zhang Q., Weber C., Schubert U.S., Hoogenboom R. Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperature: from fundamental aspects and measuring techniques to recommended turbidimetry conditions // *Mater. Horizons*. 2017. Vol. 4, № 2. P. 109–116.
 108. Manella G.A., Carrubba V.L., Brucato V. Measurement of cloud point temperature in polymer solutions // *Rev. Sci. Instrum*. 2013. Vol. 84, № 075118.
 109. Zubanova E.M., Kostjuk S. V., Timashev P.S., Rochev Y.A., Kokorin A.I., Melnikov M.Y., Golubeva E.N. Inhomogeneities in PNIPAM Aqueous Solutions: The Inside View by Spin Probe EPR Spectroscopy // *Polymers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 21. P. 3829–3845.
 110. Berlin H. Investigation of Polymers with Differential Scanning Calorimetry. *Adv. Lab DSC Investig. Polym.*, 2009. 1–17 p.
 111. Perez-Davila S., Gonzalez-Rodriguez L., Lama R., Lopez-Alvarez M., Oliveira A.L., Serra J., Novoa B., Figueras A., Gonzalez P. 3D-Printed PLA Medical Devices : Physicochemical Changes and Biological Response after Sterilisation Treatments // *Polymers (Basel)*. 2022. Vol. 14. P. 4117.
 112. Cuiffo M.A., Snyder J., Elliott A.M., Romero N., Kannan S., Halada G.P. Impact of the Fused Deposition (FDM) Printing Process on Polylactic Acid (PLA) Chemistry and Structure // *Appl. Sci*. 2017. Vol. 7. P. 579.
 113. Frank A., Rath S.K., Venkatraman S.S. Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition // *J. Control. Release*. 2005. Vol. 102, № 2. P. 333–344.
 114. Kroll C., Mäder K., Stöber R., Borchert H.. Direct and continuous determination of pH values in

- nontransparent w/o systems by means of EPR spectroscopy // *Eur. J. Pharm. Sci.* 1995. Vol. 3, № 1. P. 21–26.
115. Mader K. Non-invasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low-frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy // *Biomaterials*. 1996. Vol. 17, № 4. P. 457–461.
 116. Brunner A., Mäder K., Göpferich A. pH and osmotic pressure inside biodegradable microspheres during erosion // *Pharmaceutical Research*. 1999. Vol. 16, № 6. P. 847–853.
 117. Katzhendler I., Mäder K., Friedman M. Structure and hydration properties of hydroxypropyl methylcellulose matrices containing naproxen and naproxen sodium // *Int. J. Pharm.* 2000. Vol. 200, № 2. P. 161–179.
 118. Kempe S., Metz H., Mader K. Do in situ forming PLG/NMP implants behave similar in vitro and in vivo? A non-invasive and quantitative EPR investigation on the mechanisms of the implant formation process // *J. Control. Release*. 2008. Vol. 130, № 3. P. 220–225.
 119. Kempe S., Metz H., Pereira P.G.C., Mäder K. Non-invasive in vivo evaluation of in situ forming PLGA implants by benchtop magnetic resonance imaging (BT-MRI) and EPR spectroscopy // *Eur. J. Pharm. Biopharm. Elsevier B.V.*, 2010. Vol. 74, № 1. P. 102–108.
 120. Kempe S., Metz H., Mäder K. Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research – Chances and challenges // *Eur. J. Pharm. Biopharm. Elsevier B.V.*, 2010. Vol. 74, № 1. P. 55–66.
 121. Eisenächer F., Schädlich A., Mäder K. Monitoring of internal pH gradients within multi-layer tablets by optical methods and EPR imaging // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 417. P. 204–215.
 122. Бучаченко, А.Л. Вассерман А.М. Стабильные радикалы. Электронное строение, реакционная способность и применение. Москва: Химия, 1973. 408 с.
 123. Вассерман, А.М. Коварский А.Л. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров. Москва: Наука, 1986. 244 с.
 124. Stoll S., Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR // *J. Magn. Reson.* 2006. Vol. 178, № 1. P. 42–55.
 125. Nitroxides - Theory, Experiment and Applications / ed. Kokorin A. London, UK: InTechOpen, 2012.
 126. Розанцев Э.Г., Жданов Р.И. Нитроксильные радикалы: синтез, химия, приложения. Москва: Наука, 1987. 271 с.
 127. Lurie D., Mader K. Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques—principles and applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. Vol. 57, № 8. P. 1171–1190.
 128. Chumakova N.A., Kuzin S. V., Grechishnikov A.I. Spectral Convolution for Quantitative Analysis in EPR Spectroscopy // *Appl. Magn. Reson. Springer Vienna*, 2019. Vol. 50, № 9. P.

- 1125–1147.
129. Kokorin A.I. Forty Years of the $d1/d$ Parameter // Nitroxides - Theory, Experiment and Applications. InTech, 2012.
 130. Blank A., Freed J.H., Kumar N.P., Wang C.-H. Electron spin resonance microscopy applied to the study of controlled drug release // J. Control. Release. 2006. Vol. 111, № 1–2. P. 174–184.
 131. Caragheorgheopol A., Schlick S. Hydration in the Various Phases of the Triblock Copolymers EO13PO30EO13 (Pluronic L64) and EO6PO34EO6 (Pluronic L62), Based on Electron Spin Resonance Spectra of Cationic Spin Probes // Macromolecules. 1998. Vol. 31. P. 7736–7745.
 132. Bobko A.A., Kirilyuk I.A., Grigor'ev I.A., Zweier J.L., Khramtsov V. V. Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines: Roles for ascorbate and glutathione // Free Radic. Biol. Med. 2007. Vol. 42. P. 404–412.
 133. Xu Q., Chin S.E., Wang C.-H., Pack D.W. Mechanism of drug release from double-walled PDLLA(PLGA) microspheres // Biomaterials. 2013. Vol. 34, № 15. P. 3902–3911.
 134. Strobel C., Bormann N., Kadow-Romacker A., Schmidmaier G., Wildemann B. Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants // J. Control. Release. 2011. Vol. 156, № 1. P. 37–45.
 135. Wan Y., Fang Y., Wu H., Cao X. Porous polylactide/chitosan scaffolds for tissue engineering // J. Biomed. Mater. Res. Part A. 2007. Vol. 80A, № 4. P. 776–789.
 136. Determan A.S., Trewyn B.G., Lin V.S.Y., Nilsen-Hamilton M., Narasimhan B. Encapsulation, stabilization, and release of BSA-FITC from polyanhydride microspheres // J. Control. Release. 2004. Vol. 100, № 1. P. 97–109.
 137. Kim B.S., Oh J.M., Kim S.K., Seo K.S., Cho J.S., Khang G., Lee H.B., Park K., Kim M.S. Biomaterials BSA-FITC-loaded microcapsules for in vivo delivery // Biomaterials. 2009. Vol. 30, № 5. P. 902–909.
 138. Kang J., Schwendeman S.P. Determination of Diffusion Coefficient of a Small Hydrophobic Probe in Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles by Laser Scanning Confocal Microscopy // Macromolecules. 2003. Vol. 36. P. 1324–1330.
 139. Jonnalagadda S., Robinson D.H. Effect of the inclusion of PEG on the solid-state properties and drug release from polylactic acid films and microcapsules // J. Appl. Polym. Sci. 2004. Vol. 93, № 5. P. 2025–2030.
 140. Wang Y., Challa P., Epstein D.L., Yuan F. Controlled release of ethacrynic acid from poly(lactide-co-glycolide) films for glaucoma treatment // Biomaterials. 2004. Vol. 25, № 18. P. 4279–4285.
 141. Wu C., Ramaswamy Y., Zhu Y., Zheng R., Appleyard R., Howard A., Zreiqat H. The effect of

- mesoporous bioactive glass on the physiochemical, biological and drug-release properties of poly(dl-lactide-co-glycolide) films // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, № 12. P. 2199–2208.
142. Brannon-Peppas L., Peppas N.A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IX. The mechanisms of drug release from pH-sensitive swelling-controlled systems // *J. Control. Release*. 1989. Vol. 8, № 3. P. 267–274.
 143. Fayzullin A., Churbanov S., Ignatieva N., Zakharkina O., Tokarev M., Mudryak D., Khristidis Y., Balyasin M., Kurkov A., Golubeva E.N., Aksenova N.A., Dyuzheva T., Timashev P., Guller A., Shekhter A. Local Delivery of Pirfenidone by PLA Implants Modifies Foreign Body Reaction and Prevents Fibrosis // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, № 8. P. 853.
 144. Dong Y., Zhang Z., Feng S.-S. d- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) modified poly(l-lactide) (PLLA) films for localized delivery of paclitaxel // *Int. J. Pharm.* 2008. Vol. 350, № 1–2. P. 166–171.
 145. Owen G.R., Jackson J.K., Chehroudi B., Brunette D.M., Burt H.M. An in vitro study of plasticized poly(lactic-co-glycolic acid) films as possible guided tissue regeneration membranes: Material properties and drug release kinetics // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2010. Vol. 95, № 3. P. 857–869.
 146. Lee K., Silva E.A., Mooney D.J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments // *J. R. Soc. Interface*. 2011. Vol. 8, № 55. P. 153–170.
 147. Ma D., McHugh A.J. The interplay of membrane formation and drug release in solution-cast films of polylactide polymers // *Int. J. Pharm.* 2010. Vol. 388. P. 1–12.
 148. Burke J., Donno R., D'Arcy R., Cartmell S., Tirelli N. The Effect of Branching (Star Architecture) on Poly(D,L -lactide) (PDLLA) Degradation and Drug Delivery // *Biomacromolecules*. 2017. Vol. 18, № 3. P. 728–739.
 149. Tarvainen T., Karjalainen T., Malin M., Pohjolainen S., Tuominen J., Seppälä J., Järvinen K. Degradation of and drug release from a novel 2,2-bis(2-oxazoline) linked poly(lactic acid) polymer // *J. Control. Release*. 2002. Vol. 81, № 3. P. 251–261.
 150. Tarvainen T., Malin M., Barragan I., Tuominen J., Seppälä J., Järvinen K. Effects of incorporated drugs on degradation of novel 2,2'-bis(2-oxazoline) linked poly(lactic acid) films // *Int. J. Pharm.* 2006. Vol. 310, № 1–2. P. 162–167.
 151. Griffith L.G. Polymeric biomaterials // *Acta Mater.* 2000. Vol. 48, № 1. P. 263–277.
 152. Merkli A., Tabatabay C., Gurny R., Heller J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs // *Prog. Polym. Sci.* 1998. Vol. 23, № 3. P. 563–580.
 153. Schliecker G., Schmidt C., Fuchs S., Kissel T. Characterization of a homologous series of D,L-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro // *Biomaterials*.

2003. Vol. 24. P. 3835–3844.
154. Vert M., Schwarch G., Coudane J. Present and Future of PLA Polymers // *J. Macromol. Sci. Part A*. 1995. Vol. 32, № 4. P. 787–796.
 155. Aso Y., Yoshioka S., Li Wan Po A., Terao T. Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(d,l-lactide) microspheres // *J. Control. Release*. 1994. Vol. 31, № 1. P. 33–39.
 156. Heya T., Okada H., Ogawa Y., Toguchi H. In Vitro and in Vivo Evaluation of Thyrotrophin Releasing Hormone Release from Copoly (dl-lactic/glycolic acid) Microspheres // *J. Pharm. Sci.* 1994. Vol. 83, № 5. P. 636–640.
 157. Gorraasi G., Pantani R. Hydrolysis and Biodegradation of Poly(lactic acid) // *Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid)* / ed. Lorenzo M.L. Di, Androsch R. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG, 2018. P. 119.
 158. Saha S.K., Tsuji H. Effects of molecular weight and small amounts of d-lactide units on hydrolytic degradation of poly(l-lactic acid)s // *Polym. Degrad. Stab.* 2006. Vol. 91, № 8. P. 1665–1673.
 159. Saha S.K., Tsuji H. Hydrolytic Degradation of Amorphous Films of L-Lactide Copolymers with Glycolide and D-Lactide // *Macromol. Mater. Eng.* 2006. Vol. 291, № 4. P. 357–368.
 160. Cabezas L.I., Gracia I., de Lucas A., Rodríguez J.F. Novel Model for the Description of the Controlled Release of 5-Fluorouracil from PLGA and PLA Foamed Scaffolds Impregnated in Supercritical CO₂ // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2014. Vol. 53, № 40. P. 15374–15382.
 161. Siepmann J., Gopferich A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 48. P. 229–247.
 162. Witt C., Mäder K., Kissel T. The degradation, swelling and erosion properties of biodegradable implants prepared by extrusion or compression moulding of poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers // *Biomaterials*. 2000. Vol. 21, № 9. P. 931–938.
 163. Tsuji H., Ikada Y. Properties and morphology of poly (L-lactide). II. Hydrolysis in alkaline solution // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 1998. Vol. 36, № 1. P. 59–66.
 164. Tsuji H. Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made polylactides: effects of l-lactide content, tacticity, and enantiomeric polymer blending // *Polymer (Guildf)*. 2002. Vol. 43, № 6. P. 1789–1796.
 165. Tsuji H. Hydrolytic Degradation // *Degradation and environmental issues*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. P. 343–381.
 166. Fischer E.W., Sterzel H.J., Wegner G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions // *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polym.* 1973. Vol. 251, № 11. P. 980–990.

167. Borovikov P.I., Sviridov A.P., Antonov E.N., Dunaev A.G., Krotova L.I., Fatkhudinov T.K., Popov V.K. Model of aliphatic polyesters hydrolysis comprising water and oligomers diffusion // *Polym. Degrad. Stab.* 2019. Vol. 159. P. 70–78.
168. Fredenberg S., Wahlgren M., Reslow M., Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems — A review // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 415. P. 34–52.
169. Higuchi T. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension // *J. Pharm. Sci.* 1961. Vol. 50, № 10. P. 874–875.
170. Paul D.R., McSpadden S.K. Diffusional release of a solute from a polymer matrix // *J. Membrane Sci.* 1976. Vol. 1. P. 33–48.
171. Roseman T.J., Higuchi W.I. Release of Medroxyprogesterone Acetate from a Silicone Polymer // *J. Pharm. Sci.* 1970. Vol. 59, № 3. P. 353–357.
172. Roseman J. Release of Steroids from a Silicone Polymer // *J. Pharm. Sci.* 1972. Vol. 61, № 1. P. 46–50.
173. Peppas N.A. A model of dissolution-controlled solute release from porous drug delivery polymeric systems // *J. Biomed. Mater. Res.* 1983. Vol. 17, № 6. P. 1079–1087.
174. Cardea S., Baldino L., Scognamiglio M., Reverchon E. 3D PLLA/Ibuprofen composite scaffolds obtained by a supercritical fluids assisted process // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2014. Vol. 25, № 4. P. 989–998.
175. Santo V.E., Duarte A.R.C., Popa E.G., Gomes M.E., Mano J.F., Reis R.L. Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming // *J. Control. Release.* 2012. Vol. 162. P. 19–27.
176. Nof M., Shea L.D. Drug-releasing scaffolds fabricated from drug-loaded microspheres // *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. Vol. 59, № 2. P. 349–356.
177. Richardson T.P., Peters M.C., Ennett A.B., Mooney D.J. Polymeric system for dual growth factor delivery // *Nat. Biotechnol.* 2001. Vol. 19, № 11. P. 1029–1034.
178. Crank J. *The mathematics of diffusion*. 2d ed. Oxford: Clarendon Press, 1975. 414 p.
179. Ritger P.L., Peppas N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs // *J. Control. Release.* 1987. Vol. 5. P. 23–36.
180. Ritger P.L., Peppas N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices // *J. Control. Release.* 1987. Vol. 5. P. 37–42.
181. Ryu W., Huang Z., Prinz F.B., Goodman S.B., Fasching R. Biodegradable micro-osmotic pump for long-term and controlled release of basic fibroblast growth factor // *J. Control. Release.* 2007.

- Vol. 124. P. 98–105.
182. Shah S.S., Cha Y., Pitt C.G. Poly (glycolic acid-co-dl-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery? // *J. Control. Release*. 1992. Vol. 18, № 3. P. 261–270.
 183. Yoo J., Won Y. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020. Vol. 6, № 11. P. 6053–6062.
 184. Jain G.K., Pathan S.A., Akhter S., Ahmad N., Jain N., Talegaonkar S., Khar R.K., Ahmad F.J. Mechanistic study of hydrolytic erosion and drug release behaviour of PLGA nanoparticles: Influence of chitosan // *Polym. Degrad. Stab.* 2010. Vol. 95. P. 2360–2366.
 185. Berklund C., Kipper M.J., Narasimhan B., Kevin K., Pack D.W. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres // *J. Control. Release*. 2004. Vol. 94. P. 129–141.
 186. Mochizuki A., Niikawa T., Omura I., Yamashita S. Controlled Release of Argatroban from PLA Film — Effect of Hydroxylesters as Additives on Enhancement of Drug Release // *J. Appl. Polym. Sci.* 2008. Vol. 108. P. 3353–3360.
 187. Webber W.L., Lago F., Thanos C., Mathiowitz E. Characterization of soluble , salt-loaded , degradable PLGA films and their release of tetracycline // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. Vol. 41. P. 18–29.
 188. Fredenberg S., Wahlgren M., Reslow M., Axelsson A. Pore formation and pore closure in poly(D,L-lactide-co-glycolide) films // *J. Control. Release*. 2011. Vol. 150. P. 142–149.
 189. Park T.G. Degradation of poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition // *Biomaterials*. 1995. Vol. 16. P. 1123–1130.
 190. Lu L., Garcia C.A., Mikos A.G. In vitro degradation of thin poly (DL-lactic-co-glycolic acid) films // *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. Vol. 46, № 2. P. 236–244.
 191. Husmann M., Schenderlein S., Lu M. Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method // *Int. J. Pharm.* 2002. Vol. 242. P. 277–280.
 192. Maulding H. V., Tice T.R., Cowsar D.R., Fong J.W., Pearson J.E., Nazareno J.P. Biodegradable microcapsules: Acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of a basic medicament // *J. Control. Release*. 1986. Vol. 3, № 1–4. P. 103–117.
 193. Wong H.M., Wang J.J., Wang C.-H. In Vitro Sustained Release of Human Immunoglobulin G from Biodegradable Microspheres // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2001. Vol. 40, № 3. P. 933–948.
 194. Zhu G., Schwendeman S.P. Stabilization of Proteins Encapsulated in Cylindrical Poly (lactide-co-glycolide) Implants : Mechanism of Stabilization by Basic Additives // *Pharm. Res.* 2000. Vol. 17, № 3. P. 351–357.
 195. Xu Y., Kim C.S., Saylor D.M., Koo D. Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug–polymer applications: A review of experiments and theories // *J. Biomed. Mater. Res.* -

- Part B Appl. Biomater. 2017. Vol. 105, № 6. P. 1692–1716.
196. Raman C., Berklund C., Kevin K., Pack D.W. Modeling small-molecule release from PLG microspheres : effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution // J. Control. Release. 2005. Vol. 103. P. 149–158.
 197. Wischke C., Schwendeman S.P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA / PLGA microparticles // Int. J. Pharm. 2008. Vol. 364. P. 298–327.
 198. Ford L.J., Mitchell K., Rowe P., Armstrong J.D., Elliott P.N.C., Rostron C., Hogan E.J. Mathematical modelling of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices : Effect of temperature // Int. J. Pharm. 1991. Vol. 71. P. 95–104.
 199. Kao C., Chen S., Sheu M. Lag time method to delay drug release to various sites in the gastrointestinal tract // J. Control. Release. 1997. Vol. 44. P. 263–270.
 200. Lindner W.D., Lippold B.C. Drug Release From Hydrocolloid Embeddings with High or Low Susceptibility to Hydrodynamic Stress // Pharm. Res. 1995. Vol. 12. P. 1781–1785.
 201. Peppas N.A., Sahlin J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation // Int. J. Pharm. 1989. Vol. 57. P. 169–172.
 202. Zhu X., Braatz R.D. A mechanistic model for drug release in PLGA biodegradable stent coatings coupled with polymer degradation and erosion // J. Biomed. Mater. Res. Part A. 2015. Vol. 103, № 7. P. 2269–2279.
 203. Lao L.L., Venkatraman S.S., Peppas N.A. Modeling of drug release from biodegradable polymer blends // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008. Vol. 70. P. 796–803.
 204. Batycky R.P., Hanes J., Langer R., Edwards D.A. A Theoretical Model of Erosion and Macromolecular Drug Release from Biodegrading Microspheres // J. Pharm. Sci. 1997. Vol. 86, № 12. P. 1464–1477.
 205. Charlier A., Leclerc B., Couarraze G. Release of mifepristone from biodegradable matrices : experimental and theoretical evaluations // Int. J. Pharm. 2000. Vol. 200. P. 115–120.
 206. Faisant N., Akiki J., Siepmann F., Benoit J.P., Siepmann J. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles : Experiment and theory // Int. J. Pharm. 2006. Vol. 314. P. 189–197.
 207. Casalini T., Rossi F., Lazzari S., Perale G., Masi M., Chimica D., Chimica I., Natta G., Milano P. Mathematical Modeling of PLGA Microparticles: From Polymer Degradation to Drug Release // Mol. Pharm. 2014. Vol. 11, № 11. P. 4036–4048.
 208. Wada R., Hyon S., Ikada Y. Kinetics of diffusion-mediated drug release enhanced by matrix degradation // J. Control. Release. 1995. Vol. 37. P. 151–160.
 209. Joshi A., Himmelstein K.J. Dynamics of controlled release from bioerodible matrices // J. Control. Release. 1991. Vol. 15, № 2. P. 95–104.

210. Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery / ed. Siepmann J., Siegel R.A., Rathbone M.J. Springer New York, NY, 2012. 593 p.
211. Wei H., Zhang X.-Z., Chen W.-Q., Cheng S.-X., Zhuo R.-X. Self-assembled thermosensitive micelles based on poly(L-lactide-star block-N-isopropylacrylamide) for drug delivery // J. Biomed. Mater. Res. 2007. Vol. 83A, № 4. P. 980–989.
212. Okuyama Y., Yoshida R., Sakai K. Swelling controlled zero order and sigmoidal drug release from thermo-responsive poly (N-isopropylacrylamide-co-butyl methacrylate) hydrogel // J. Biomater. Sci. 1993. Vol. 4, № 5. P. 545–556.
213. Chung J.E., Yokoyama M., Okano T. Inner core segment design for drug delivery control of thermo-responsive polymeric micelles // J. Control. Release. 2000. Vol. 65. P. 93–103.
214. Плисс, Е.М., Сень, В.Д., Тихонов И.В. Нитроксильные радикалы в химических и биохимических процессах. Lambert Academic Publishing, 2013. 104 с.
215. Sen V.D., Tikhonov I. V., Borodin L.I., Pliss E.M., Golubev V.A., Syroeshkin M.A., Rusakov A.I. Kinetics and thermodynamics of reversible disproportionation – comproportionation in redox triad oxoammonium cations – nitroxyl radicals – hydroxylamines // J. Phys. Org. Chem. 2015. Vol. 28, № 1. P. 17–24.
216. Golubev V.A., Sen V.D. Mechanism of disproportionation of 2,2,6,6-tetramethyl-1,4-dioxopiperidinium perchlorate in acidic aqueous medium // Russ. Chem. Bull. 2009. Vol. 58, № 9. P. 1824–1827.
217. Golubev V.A., Sen V.D. Mechanism of Autoreduction of 2,2,6,6-Tetramethyl-1,4-dioxopiperidinium Cation in Alkaline Medium // Russ. J. Org. Chem. 2011. Vol. 47, № 6. P. 869–876.
218. Minaev N.V. Лабораторная установка для исследования и проведения физико-химических процессов: pat. 147199 USA. 2014.
219. Минаев Н.В., Громов О.И., Голубева Е.Н., Воробьев А.Х., Баграташвили В.Н. Реактор высокого давления для регистрации спектров электронного парамагнитного резонанса в сверхкритическом диоксиде углерода // Приборы и техника эксперимента. 2019. Т. 62, № 2. С. 151–153.
220. Mäder K., Basic G., Domb A., Elmalak O., Langer R., Swartz H.M. Noninvasive in Vivo Monitoring of Drug Release and Polymer Erosion from Biodegradable Polymers by EPR Spectroscopy and NMR Imaging // J. Pharm. Sci. 1997. Vol. 86, № 1. P. 126–134.
221. Chumakova N.A., Ivanova T.A., Golubeva E.N., Kokorin A.I. To the Precision of Measuring Concentrations of Nitroxide Radicals in Polymers by EPR Technique // Appl. Magn. Reson. 2018. Vol. 49, № 5. P. 511–522.
222. Molin Y.N., Chibrikov V.M., Shabalkin V.A., Shuvalov V.F. Accuracy of the EPR (electron

- paramagnetic resonance) measurement of paramagnetic-particles concentration // *Zavod. Lab.* 1966. Vol. 32. P. 933.
223. Stoll S. Computational Modeling and Least-Squares Fitting of EPR Spectra // *Handb. Multifrequency Electron Paramagn. Reson. Data Tech.* 2014. P. 69–138.
 224. Schneider D.J., Freed J.H. Calculating Slow Motional Magnetic Resonance Spectra // *Spin Labeling: Theory and Applications* / ed. Berliner L.J., Reuben J. Boston, MA: Springer US, 1989. P. 1–76.
 225. Lebedev Y.S., Grinberg O.Y., Dubinsky A.A., Poluektov O.G. Investigation of Spin Labels and Probes by Millimeter Band EPR // *Bioactive Spin Labels*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1992. P. 227–278.
 226. Bogdanov A. V., Vorobiev A.K. Orientation order and rotation mobility of nitroxide biradicals determined by quantitative simulation of EPR spectra // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. Vol. 18, № 45. P. 31144–31153.
 227. Wu C., Wang X. Globule-to-Coil Transition of a Single Homopolymer Chain in Solution // *Phys. Rev. Lett.* 1998. Vol. 80, № 18. P. 4092–4094.
 228. Иванова Т.А., Чумакова Н.А., Голубева Е.Н., Лунин В.В. Кинетика высвобождения нитроксильного радикала TEMPONE из D,L- полилактида, вспененного в среде сверхкритического диоксида углерода // *Сверхкритические Флюиды Теория И Практика*. 2019. Т. 14, № 1. С. 67–70.
 229. Kuzin S. V., Ivanova T.A., Timashev P.S., Golubeva E.N. Mechanism Based on Formation, Closure and Overgrowth of Pores Describing Zero-Order Release from Polylactide Films // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2024. Vol. 79, № 6. P. 442–451.
 230. Codari F., Lazzari S., Soos M., Storti G., Morbidelli M., Moscatelli D. Kinetics of the hydrolytic degradation of poly(lactic acid) // *Polym. Degrad. Stab.* 2012. Vol. 97, № 11. P. 2460–2466.
 231. Wang Y., Pan J., Han X., Sinka C., Ding L. A phenomenological model for the degradation of biodegradable polymers // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, № 23. P. 3393–3401.
 232. Gleadow A., Pan J., Kruff M.-A., Kellomäki M. Degradation mechanisms of bioresorbable polyesters. Part 1. Effects of random scission, end scission and autocatalysis // *Acta Biomater.* 2014. Vol. 10, № 5. P. 2223–2232.
 233. Zweers M.L.T., Engbers G.H.M., Grijpma D.W., Feijen J. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on dl-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide) // *J. Control. Release*. 2004. Vol. 100, № 3. P. 347–356.
 234. Dunne M., Corrigan O.I., Ramtoola Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles // *Biomaterials*. 2000. Vol. 21, № 16. P. 1659–1668.

235. Ivanova T.A., Zubanova E.M., Timashev P.S., Golubeva E.N. EPR Study of Controlled Drug Release from PNIPAM and P(NIPAM-g-PLA) Globules // *Russ. J. Phys. Chem. B.* 2024. Vol. 18, № 3. P. 780–787.
236. Reinwald Y., Johal R.K., Ghaemmaghami A.M., Rose F.R.A.J., Howdle S.M., Shakesheff K.M. Interconnectivity and permeability of supercritical fluid-foamed scaffolds and the effect of their structural properties on cell distribution // *Polymer (Guildf)*. 2014. Vol. 55, № 1. P. 435–444.
237. Tayton E., Purcell M., Aarvold A., Smith J.O., Kalra S., Briscoe A., Shakesheff K., Howdle S.M., Dunlop D.G., Oreffo R.O.C. Supercritical CO₂ fluid-foaming of polymers to increase porosity: A method to improve the mechanical and biocompatibility characteristics for use as a potential alternative to allografts in impaction bone grafting? // *Acta Biomater.* 2012. Vol. 8. P. 1918–1927.
238. Ivanova T.A., Melnikov M.Y., Timashev P.S., Golubeva E.N. pH-Sensitive Paramagnetic Probe 4-(Methylamino)-2-Ethyl-5,5-Dimethyl-4-Pyridine-2-Yl-2,5-Dihydro-1H-Imidazol-1-Oxyl for Controlling Microacidity Inside Poly-D, L-Lactide Films during Degradation In Vitro // *Russ. J. Phys. Chem. B.* 2023. Vol. 17, № 2. P. 471–477.
239. Neese F. The ORCA program system // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2012. Vol. 2, № 1. P. 73–78.
240. Neese F. Software update: the ORCA program system, version 4.0 // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2017. Vol. 8, № 1. P. e1327.
241. Weigend F., Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005. Vol. 7. P. 3297–3305.
242. Mohite K.K., Garnaik B. Kinetic and Biocompatibility Investigation on the Catalytic Ring Opening Polymerization of L-Lactide in Bulk Using Cyclic Bu₂Sn Initiators Derived from Ethylene Glycol, Pentaerythritol and Cloisite 30B // *Polyhedron*. 2019. Vol. 175. P. 114202.
243. Shyamroy S., Garnaik B., Sivaram S. Structure of poly(L-lactic acid)s prepared by the dehydropolycondensation of L-lactic acid with organotin catalysts // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2005. Vol. 43, № 10. P. 2164–2177.
244. Shyamroy S., Garnaik B., Sivaram S. High molecular weight poly(L-lactic acid)s by polyesterification using diisopropylcarbodiimide (DIPC) and 4-(dimethylamino) pyridinium-p-toluene sulfonate (DPTS) // *Polym. Bull.* 2015. Vol. 72. P. 405–415.
245. Harrane A., Belaouedj M.A., Meghabar R., Belbachir M. Bulk polycondensation of lactic acid by Maghnite-H⁺ a non-toxic catalyst // *J. Polym. Res.* 2012. Vol. 19. P. 9785.
246. Silvino C.A., Martins D.B.A.T., Rodrigues A.C., Dias M.L. Kinetic Behavior in Melt State and Solid State Polymerization of Lactide Using Magnesium Stearate as Catalyst // *J. Polym.*

- Environ. 2013. Vol. 21. P. 1002–1008.
247. Атаманова А.А., Спирин О.А., Седуш Н.Г. Синтез поли (D,L- лактида) с контролируемой молекулярной массой и типом концевых групп // Пластические массы. 2023. Т. 9–10. С. 6–8.
 248. Haroon M., Wang L., Yu H., Summe R., Ullah R., Chen Q., Liu J. Synthesis of carboxymethyl starch-g-polyvinylpyrrolidones and their properties for the adsorption of Rhodamine 6G and ammonia // Carbohydr. Polym. 2018. Vol. 186. P. 150–158.
 249. Yankova T.S., Chumakova N.A. pH of water intercalated into graphite oxide as determined by EPR spectroscopy // Appl. Magn. Reson. 2023. Vol. 54. P. 311–320.
 250. Usatov M.S., Dobrynin S.A., Polienko Y.F., Morozov D.A., Glazachev Y.I., Ankov S. V., Tolstikova T.G., Gatilov Y. V., Bagryanskaya I.Y., Raizvikh A.E., Bagryanskaya E.G., Kirilyuk I.A. Hydrophilic Reduction-Resistant Spin Labels of Pyrrolidine and // Int. J. Mol. Sci. Artic. 2024. Vol. 25. P. 1550.
 251. Бекман И.Н. Математика диффузии. Москва: ОнтоПринт, 2016. 400 с.
 252. Herrlich S., Spieth S., Messner S., Zengerle R. Osmotic micropumps for drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. 2012. Vol. 64, № 14. P. 1617–1627.
 253. Heller J., Barr J., Ng S.Y., Abdellauoi K.S., Gurny R. Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses // Adv. Drug Deliv. Rev. 2002. Vol. 54, № 7. P. 1015–1039.
 254. Иванова Т.А., Зубанова Е.М., Попова А.А., Громов О.И., Голубева Е.Н., Ксендзов Е.А., Костюк С.В., Тимашев П.С. Диффузия радикала TEMPONE в графт-сополимере N изопропилакриламида с олиголактидом в присутствии сверхкритического диоксида углерода методом ЭПР in situ // Сверхкритические Флюиды Теория И Практика. 2021. Т. 16, № 3. С. 33–41.
 255. Golubeva E.N., Chumakova N.A. Spin Probe Method for Diagnostics of Polyester Porous Matrixes Formed in Supercritical Carbon Dioxide (Review) // Russ. J. Phys. Chem. B. 2019. Vol. 13, № 7. P. 1088–1094.
 256. Champeau M., Thomassin J.M., Tassaing T., Jérôme C. Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review // J. Control. Release. 2015. Vol. 209. P. 248–259.
 257. Manna L., Banchero M., Sola D., Ferri A., Ronchetti S., Sicardi S. Impregnation of PVP microparticles with ketoprofen in the presence of supercritical CO₂ // J. Supercrit. Fluids. 2007. Vol. 42. P. 378–384.
 258. Weidner E. Impregnation via supercritical CO₂–What we know and what we need to know // J. Supercrit. Fluids. 2018. Vol. 134. P. 220–227.
 259. Wang H.L., Sang J.R., Guo L.T., Zhu J., Jin J.S. Solubility of polyacrylamide in supercritical

- carbon dioxide // *J. Chem. Eng. Data*. 2017. Vol. 62, № 1. P. 341–347.
260. Chen S., Jiang X., Sun L. Effects of end groups on the thermal response of poly(N-isopropylacrylamide) microgels // *J. Appl. Polym. Sci.* 2013. Vol. 130, № 2. P. 1164–1171.
 261. García-Peñas A., Biswas C.S., Liang W., Wang Y., Yang P., Stadler F.J. Effect of Hydrophobic Interactions on Lower Critical Solution Temperature for // *Polymers (Basel)*. 2019. Vol. 11. P. 991.
 262. Rabek J.F. *Experimental Methods in Polymer Chemistry*. John Wiley & Sons, 1980. 888 p.
 263. Zubanova E.M., Ivanova T.A., Ksendzov E.A., Kostjuk S. V., Timashev P.S., Melnikov M.Y., Golubeva E.N. Structure and Dynamics of Inhomogeneities in Aqueous Solutions of Graft Copolymers of N-Isopropylacrylamide with Lactide (P(NIPAM-graft-PLA)) by Spin Probe EPR Spectroscopy // *Polymers (Basel)*. 2022. Vol. 14, № 21. P. 4746–4763.
 264. Constantin M., Cristea M., Ascenzi P., Fundueanu G. Lower critical solution temperature versus volume phase transition temperature in thermoresponsive drug delivery systems // *Express Polym. Lett.* 2011. Vol. 5, № 10. P. 839–848.
 265. Salikhov K.M. Current state of the spin exchange theory in dilute solutions of paramagnetic particles. New paradigm of spin exchange and its manifestations in EPR spectroscopy // *Physics-Uspekhi*. 2019. Vol. 62, № 10. P. 951–975.
 266. Ellison W.J. Permittivity of Pure Water, at Standard Atmospheric Pressure, over the Frequency Range 0–25THz and the Temperature Range 0–100°C // *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 2007. Vol. 36, № 1. P. 1–18.
 267. Kecki, Z., Lyczkowski, Z. K.W. Critical Comparison of Empirical Systems Used to Describe Solvent Properties // *J. Solution Chem.* 1986. Vol. 15, № 5. P. 413–422.
 268. Xia Y., Tang D., Wu H., Wang X., Cao M., He H., Wang S. Cell attachment/detachment behavior on poly(N-isopropylacrylamide)-based microgel films : the effect of microgel structure and swelling ratio // *J. Mater. Sci.* 2018. Vol. 53, № 12. P. 8795–8806.
 269. Wang X., Qiu X., Wu C. Comparison of the coil-to-globule and the globule-to-coil transitions of a single poly(N-isopropylacrylamide) homopolymer chain in water // *Macromolecules*. 1998. Vol. 31. P. 2972–2976.

Приложение

Приложение 1

Параметры моделирования спектров ЭПР ТЕМРО в PBS при 0-80 °С.

T, °C	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс
0	1.74	12.1
10	1.74	10.9
20	1.73	10.0
30	1.73	10.0
40	1.73	10.0
50	1.73	10.0
60	1.72	10.0
70	1.72	10.0
80	1.72	10.0

Приложение 2

Параметры, полученные в результате моделирования спектров ЭПР ТЕМРО в 5 и 10 масс.% растворах сополимеров II-V при 22-90 °С.

II, 10 масс.% раствор							
T, °C	Частицы типа А			Частицы типа Б			
	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	X _B , %
87	2.00591	1.72	10.0	2.00609	1.62	0.7	68
77	2.00590	1.72	10.0	2.00611	1.60	0.8	68
67	2.0059	1.72	10.0	2.00606	1.59	1.1	68
57	2.00588	1.73	10.0	2.00602	1.58	1.3	68
47	2.00586	1.73	10.0	2.00598	1.57	1.7	67
42	2.00586	1.73	10.0	2.00595	1.57	1.8	66
37	2.00585	1.73	10.0	2.00588	1.57	1.9	66
35	2.00585	1.73	10.0	2.00589	1.57	1.9	63
33	2.00585	1.73	10.0	2.00588	1.57	1.9	59
31	2.00586	1.73	10.0	2.00587	1.57	1.8	51
30	2.00584	1.73	10.0	2.00587	1.57	1.8	48
29	2.00585	1.73	10.0	2.00587	1.57	1.7	42

III, 10 масс.% раствор							
T, °C	Частицы типа А			Частицы типа Б			
	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	X _B , %
90	2.00591	1.71	10.0	2.00609	1.62	0.6	79
80	2.00590	1.72	10.0	2.00608	1.60	0.8	76
70	2.00590	1.72	10.0	2.00605	1.60	1.0	77
60	2.00589	1.72	10.0	2.00602	1.59	1.2	77
50	2.00587	1.73	10.0	2.00598	1.58	1.5	73
40	2.00586	1.73	10.0	2.00596	1.57	1.9	69
35	2.00585	1.73	10.0	2.00588	1.57	1.8	65
33	2.00585	1.73	10.0	2.00586	1.57	1.8	62
32	2.00585	1.73	10.0	2.00584	1.57	1.8	58
31	2.00583	1.73	10.0	2.00581	1.57	1.6	51
29	2.00580	1.73	10.0	2.00570	1.57	1.6	36

III, 5 масс.% раствор							
T, °C	Частицы типа А			Частицы типа Б			
	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	X _B , %
90	2.00584	1.71	10.0	2.00602	1.62	0.6	64
80	2.00583	1.72	10.0	2.00601	1.60	0.8	59
70	2.00582	1.72	10.0	2.00596	1.60	1.0	58
60	2.00581	1.72	10.0	2.00591	1.59	1.3	55
50	2.00580	1.73	10.0	2.00585	1.58	1.6	54
40	2.00580	1.73	10.0	2.00580	1.56	2.0	49
35	2.00580	1.73	10.0	2.00574	1.56	2.0	44
33	2.00579	1.73	10.0	2.00574	1.56	2.0	43
32	2.00579	1.73	10.0	2.00574	1.56	2.0	40
31	2.00579	1.73	10.0	2.00574	1.56	2.0	32
29	2.00579	1.73	10.0	2.00574	1.56	2.0	28

IV, 10 масс.% раствор							
Т, °С	Частицы типа А			Частицы типа Б			
	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	X _В , %
90	2.00586	1.71	10.0	2.00608	1.62	0.6	64
87	2.00586	1.71	10.0	2.00607	1.62	0.6	64
77	2.00585	1.72	10.0	2.00607	1.60	0.8	66
67	2.00585	1.72	10.0	2.00602	1.59	1.0	67
57	2.00584	1.72	10.0	2.00601	1.59	1.3	66
47	2.00584	1.73	10.0	2.00596	1.58	1.6	66
37	2.00584	1.73	10.0	2.00594	1.58	1.9	63
27	2.00584	1.73	12.4	2.00584	1.58	1.9	38
22	2.00585	1.73	18.7	2.00577	1.58	1.9	22

IV, 5 масс.% раствор							
Т, °С	Частицы типа А			Частицы типа Б			
	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	g _{iso}	a _{iso} , мТл	t _{corr,iso} , нс	X _В , %
90	2.00594	1.71	10.0	2.00613	1.62	0.7	55
80	2.00593	1.72	10.0	2.00613	1.60	0.8	54
70	2.00592	1.72	10.0	2.00607	1.60	1.0	55
60	2.00591	1.72	10.0	2.00603	1.58	1.3	56
50	2.00590	1.73	10.0	2.00600	1.56	1.7	55
40	2.00589	1.73	10.0	2.00595	1.56	2.0	52
35	2.00590	1.73	10.0	2.00592	1.56	2.1	47
32	2.00589	1.73	10.0	2.00588	1.56	2.1	39
29	2.00591	1.73	10.0	2.00587	1.56	2.0	32
27	2.00591	1.73	11.0	2.00587	1.56	2.0	28
25	2.00588	1.73	12.2	2.00587	1.56	2.0	23
22	2.00593	1.73	12.2	2.00587	1.56	2.0	19
19	2.00590	1.73	12.2	2.00587	1.56	0.5	13
14	2.00586	1.73	12.2	2.00587	1.56	0.8	12
9	2.00590	1.74	12.2	2.00587	1.56	0.2	8

V, 5 масс.% раствор							
T, °C	Частицы типа А			Частицы типа Б			
	g_{iso}	a_{iso} , мТл	$t_{corr,iso}$, нс	g_{iso}	a_{iso} , мТл	$t_{corr,iso}$, нс	X_B , %
70	2.00585	1.72	10.0	2.00603	1.58	1.0	54
60	2.00585	1.72	10.0	2.00595	1.58	1.4	54
50	2.00583	1.73	10.0	2.00587	1.56	1.9	56
40	2.00577	1.73	10.0	2.00587	1.56	1.9	50
35	2.00576	1.73	10.0	2.00587	1.56	1.9	43
33	2.00576	1.73	10.0	2.00587	1.56	2.2	41
29	2.00575	1.73	10.0	2.00587	1.56	0.8	29
27	2.00575	1.73	11.3	2.00587	1.56	0.8	24
25	2.00575	1.73	11.3	2.00587	1.56	0.8	19
23	2.00576	1.73	11.3	2.00587	1.56	1.2	20