

На правах рукописи

ГУСИХИНА МАРИЯ СЕРГЕЕВНА

**МОНОСЛОИ, ТОНКИЕ ПЛЕНКИ И ВЕЗИКУЛЫ
НА ОСНОВЕ СТАТИСТИЧЕСКИХ СОПОЛИМЕРОВ И ЛЕЦИТИНА**

02.00.04. – физическая химия

02.00.06. – высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Нижний Новгород – 2005

Работа выполнена на кафедре высокомолекулярных соединений и коллоидной химии химического факультета Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского.

Научные руководители: доктор химических наук, профессор
Семчиков Юрий Денисович

доктор химических наук, профессор
Мельникова Нина Борисовна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Смирнова Наталья Николаевна

доктор химических наук, профессор
Троицкий Борис Борисович

Ведущая организация: Московский государственный
университет им. М.В.Ломоносова, г. Москва

Защита состоится "26" декабря 2005 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.08 по химическим наукам при Нижегородском государственном университете им. Н.И.Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, ГСП-20, пр.Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского.

Автореферат разослан "25" декабря 2005 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук



Е.В.Сулейманов

2006-4
26326

2244755

3

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Мембраны на основе моно- и бимолекулярных слоев липидов – поверхностно активных веществ биоорганического происхождения играют ключевую роль в функционировании живых организмов. Это определяет исключительную актуальность исследований, направленных на изучение строения и моделирования биологических мембран. Важнейшим направлением подобных исследований, стимулированным запросами медицины, является поиск путей направленного транспорта лекарственных веществ к пораженному органу, исключая их возможное вредное влияние на здоровые ткани. Одним из путей решения этой проблемы является использование везикул (липосом) – одно- или многослойных замкнутых мембран (сферы, эллипсоиды и т.п.) в качестве наноконтейнеров лекарственных веществ. Однако ряд нерешенных вопросов сдерживает развитие соответствующей биомедицинской технологии, к ним в первую очередь относятся:

1. Низкая агрегативная устойчивость липосом. Ясно, что их разрушение сопряжено с попаданием токсичных препаратов в плазму крови со всеми вытекающими отсюда последствиями.

2. Обеспечение достаточной заполняемости везикул лекарственным препаратом. Здесь помимо эффекта Донана, имеющего общий характер, большую роль могут сыграть адсорбционные, хемосорбционные явления, в плане достижения эффективных концентраций.

К настоящему времени развито направление по получению достаточно стабильных липосом путем полимеризации аналогов фосфолипидов, содержащих полимеризуемые группы. Они активно используются при изучении различных биологических процессов с участием липосом, в том числе и при разработке средств направленного транспорта биологически активных веществ в организм¹. Вместе с этим представляется перспективным другое направление – с участием

¹ Чупин В В, Аникин А В, Серебрянников Г А //Биологические мембраны, Т 10, №3, 1993, С 229-251



природных липидов и синтетических полимеров. В единичных работах, в том числе и с участием диссертанта², было показано, что добавки полимеров заметно повышают агрегативную устойчивость везикул. Отсюда возникает задача направленного поиска таких полимеров (выбор которых, по-видимому, ограничен) и всестороннего изучения моно- и бимолекулярных липидных слоев с иммобилизованными полимерами.

Цель настоящего исследования связана с созданием научной основы липосомальной технологии применительно к системе: липид лецитин, противоопухолевый препарат доксорубицин гидрохлорид (ДР), амфифильные сополимеры. Конкретные задачи исследования связаны в основном с физической химией поверхности полимер-коллоидных систем и состоят в следующем:

- поиск (со)полимеров, увеличивающих агрегативную устойчивость везикул лецитина, экспериментальное определение поверхностной и межфазной энергии Гиббса, а также их полярных и дисперсионных составляющих, определяющих средство к водной и олеофильной средам;
- изучение свойств тонких пленок, моно- и бимолекулярных слоев полимер-коллоидных композиций, лецитина и (со)полимеров;
- выявление возможности заполнения везикулярных структур на основе лецитина и сополимеров лекарственным препаратом на примере доксорубицина (ДР);
- разработка методики визуального контроля агрегативной устойчивости везикул лецитина методом атомной силовой микроскопии.

Научная новизна

Определены значения поверхностной γ_s и межфазной $\gamma_{s(w)l}$ энергии Гиббса, их полярной и дисперсионной составляющих $\gamma_{s(w)l}^p$, $\gamma_{s(w)l}^d$ (со)полимеров стирол (Ст)-Nвинилпирролидон (НВПД), Ст-4винилпирридин

² Гусихина М С., Ю Д Семчина, Ю Ю Гущина, А А Волков, Н Б Мельникова //Высокомолек сод А 2005 Т 47 №7, С 1220-1224

(4ВП), Ст-метакриловая кислота (МАК) различного состава. Отношение $\frac{\gamma_{s(w)l}^d}{\gamma_{s(w)l}^p}$ предложено в качестве параметра, отражающего липофильно-гидрофильное соотношение. В качестве компонента липид-полимерной мембраны предложены амфифильные (со)полимеры с минимальными значениями $\gamma_{s(w)l}^p$ (Ст-НВПД $m_2=0.5$, Ст-4ВП $m_2=0.9$).

Впервые показано, что малые и сверхмалые добавки амфифильных сополимеров приводят к существенной гидрофиллизации мембраны, образованной лецитиновым бислоем, и увеличению удельной площади лецитинового монослоя. Оба явления связаны с локализацией двумерных макромолекул на границе раздела.

Методом атомной силовой микроскопии показано, что малые добавки амфифильных сополимеров приводят к значительному увеличению агрегативной устойчивости лецитиновых везикулярных структур (100-300нм). Экспериментально доказано включение онкологического вещества ДР, как во внутреннюю полость везикул, так и на поверхность бислоя.

Практическая значимость работы

Результаты исследований мономолекулярных слоев лецитина в присутствии амфифильных статистических сополимеров могут быть использованы для нахождения оптимальных условий формирования монослоев с большой удельной поверхностью и ячеистой структурой («нано-размерные окна»), увеличивающей проницаемость биологически активных веществ, а также, с применением техники Ленгмюра-Блоджетт, пористых полимолекулярных слоев.

Стабилизация везикул статистическими амфифильными сополимерами позволяет улучшить фармакологические свойства липосомальных лекарственных средств и представляет большой интерес для специалистов в области фармации и медицины.

Методологический подход к оценке средства ВМС к липофильным и гидрофильным поверхностям на основе расчета составляющих поверхностной и

межфазной энергии Гиббса может быть использован при получении материалов с заданными функциональными свойствами.

Апробация работы

Результаты работы докладывались на Третьей Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры 2004» (г.Москва); IV Всероссийской конференции молодых ученых «Современные проблемы химии и химической технологии» (г.Саратов, 2003); VII Нижегородской сессии молодых ученых. «Голубая Ока» 2002, 2004г; научной конференции «Химия и медицина» (г.Уфа, 2005). По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и 6 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и списка печатных трудов. Первая глава работы содержит обзор литературы, в котором основное внимание уделено формированию лэнгмюровских мономолекулярных слоев, термодинамике смачивания, проблеме биосовместимости (в коллоидно-химическом аспекте); известным формам самоорганизации липидов, в том числе везикулам. Рассмотрены конформационные изменения макромолекул при их переходе из объемной фазы на границу раздела, а также некоторые примеры самоорганизации. В заключении рассмотрена возможность повышения агрегативной устойчивости везикул. Сделан вывод, что использование полимеризуемых липидов позволяет получить достаточно устойчивую липидную мембрану, однако направление, связанное с использованием композиций липиды – синтетический полимер, явно недостаточно развито. Вторая глава работы посвящена описанию методик эксперимента: получение монослоев, везикул, синтез сополимеров, аналитические методики.

В третьей главе диссертации представлены и обсуждены экспериментальные данные. Путем измерения углов смачивания, рассчитаны термодинамические характеристики поверхности сополимеров с учетом действия полярных и дисперсионных сил. Охарактеризовано влияние малых добавок сополимеров на природу поверхности тонкой пленки лецитина. Методом

Ленгмюра, с использованием пленочных весов, охарактеризованы молекулярные параметры монослоя лецитина и сополимеров на границе раздела фаз. Методом атомно-силовой микроскопии показано увеличение агрегативной устойчивости лецитиновых везикул в присутствии малых добавок сополимеров. Методом Гиббса количественно охарактеризована адсорбция доксорубина на поверхности сополимера; путем диализа доказана его концентрация внутри везикул вследствие эффекта Донана. Работа изложена на 125 страницах, включая 34 рисунков, 11 таблиц и 91 литературных ссылок.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были использованы статистические сополимеры стирола с N-винилпирролидоном (Ст-НВПД), 4-винилпиридином (Ст-4ВП), метакриловой кислотой (Ст-МАК); яичный лецитин (фосфатидилхолин); лекарственный препарат доксорубин гидрохлорид (ДР) (фирма «Феррейн»).

Радикальную сополимеризацию стирола с МАК и НВПД проводили в массе при 60°C до 7% конверсии в присутствии ДАК.

Состав сополимеров Ст-МАК определяли по содержанию карбоксильных групп кислоты методом кондуктометрического титрования, состав сополимеров Ст-НВПД – по содержанию азота методом Кьельдаля. Соплимер Ст-4ВП являлся коммерческим продуктом, фирмы "ALDRICH chemical corp. inc". Значения ММ сополимеров Ст-4ВП и Ст-МАК определяли вискозиметрическим методом. В первом случае характеристическая вязкость составляла 2.40 л/г (хлороформ, 291 К). Использование коэффициентов уравнения Марка-Куна-Хаувинка для поли-4винилпиридина применительно к данному сополимеру, содержащему 90 мол.% звеньев 4ВП, привело к $\overline{M}_n = 1.16 \times 10^6$. В случае сополимера Ст-МАК после предварительного метилирования диазометаном значения $[\eta] = 0.520$ дл/г и $\overline{M}_n = 1.69 \times 10^5$. ММ сополимера Ст – НВПД ($m_2 = 0.5$) была измерена осмометрическим методом и равна 1.7×10^5 .

Лецитин получали из желтков куриных яиц, выделяли 1-олеил-2-пальмитоил-sn-глицерилфосфатидилхолин реакцированием в виде комплекса с хлоридом кадмия и дополнительно очищали многократным растворением в петролейном эфире и пересаживанием ацетоном в среде аргона.

Монослой лецитина и его смесей с (co)полимерами исследовали на оригинальной автоматической установке, включающей пленочные весы Ленгмюра, снабженные ИК-датчиком³. Точность измерения поверхностного давления π была не менее 0.05мН/м, погрешность определения молекулярной площади по стандарту – арахидиновая кислота – составляла не более 2-5%. Размеры тefлоновой ванны 200·137·2(мм). Условная скорость сжатия (на молекулу или звено) при указанных размерах ванны Ленгмюра составляла $\sim 1.2\text{Å}^2/\text{мин}\cdot\text{молекула}(\text{звено})$. Сжатие тонких пленок на водной субфазе осуществлялось в дискретном режиме две минуты сжатия с последующей двухминутной остановкой.

Измерение вязкости $\eta_{\text{уд}}$ раствора полимера Ст-НВПД, лецитина и их смесей проводили на вискозиметре Оствальда с диаметром капилляра 0.56мм. Поправка на кинетическую энергию течения составляла менее 1.5% и поэтому при расчете приведенной вязкости $\eta_{\text{уд}}/C$ (л/г) не учитывалась ($\eta_{\text{уд}}$ – удельная вязкость, C – концентрация полимера в растворе (г/л)).

Величину $\eta_{\text{уд}}$ определяли как $\eta_{\text{уд}} = \eta_{\text{отп}} - 1$, где $\eta_{\text{отп}} = \tau/\tau_0$, τ и τ_0 – время истечения растворов лецитина (или Ст-НВПД) и хлороформа, соответственно.

Электронные спектры поглощения растворов полимера и его смесей с лецитином в области 240нм – 800нм были получены на приборе «Bio line Specord S 100» фирмы Analytik Jena AG, толщина кварцевой кюветы 10мм.

Краевые углы смачивания измеряли гонеометрически. Величину θ рассчитывали, исходя из 20 опытов. Полимер наносили на стеклянную подложку путем погружения пластинки в вертикальном положении в раствор полимера.

³ Мельникова Н Б, Волков А А, Куликов М В, Гуляев И В // Известия Вузов Химия и химическая технология Т 47 В 9, 2004, с 22-26

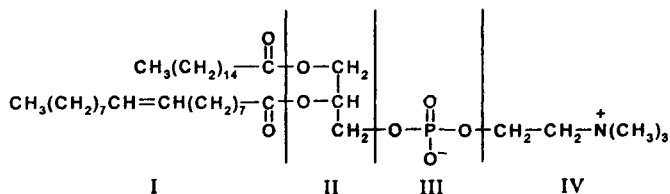
Везикулы готовили по методу обращения фаз, инъекцией и набуханием на подложке. Топографию везикул исследовали на сканирующем зондовом микроскопе "Solver Bio NT-MDT" (Зеленоград) в неконтактном режиме. Образцы готовили нанесением эмульсии везикул из микрошприца на предметное стекло (толщина 1 мм) с последующим высушиванием под вакуумом.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты работы и их обсуждение

1. Смачивание и термодинамические свойства тонких пленок амфифильных (co)полимеров и их смесей с лецитином

Из приведенной формулы лецитина видно, что это соединение содержит как ионогенные, так и неполярные группы, т.е. является амфифильным.



I – жирнокислотные остатки, II – остаток глицерина, III – фосфатная группа, IV – холин.

1-олеил-2-пальмитоил-*sn*-фосфатидилхолин

Исходя из этого для включения в фосфолипидную мембрану были использованы амфифильные сополимеры (Ст-НВПД, Ст-4ВП, Ст-МАК). Выбор оптимального из них был сделан путем оценки сродства как к полярным, так и к неполярным средам, исходя из соответствующих составляющих межфазной и поверхностной энергии Гиббса. Поэтому существенная часть данной работы связана с оценкой гидрофильно-липофильного сродства сополимеров, а также, учитывая целевое назначение последних, с их совместимостью с биологической среде.

1.1. Поверхностная и межфазная энергия Гиббса как мера сродства ВМС к полярным и липофильным средам

Под совместимостью полимерного материала с биологической средой, например плазмой крови и ее заменителями, водными растворами лекарств, понимается межфазное взаимодействие на границе раздела полимер – водная среда. Количественной мерой данного межфазного взаимодействия является термодинамическая работа адгезии на границе раздела полимер – водная среда. В свою очередь, величина работы адгезии ($W_{\text{адг}}$) характеризуется значениями поверхностной и межфазной энергии Гиббса (γ_s, γ_{sl}). Согласно теории Джирифалко-Гуда-Фоукса⁴, $W_{\text{адг}}$ на межфазной границе раздела можно представить как аддитивную величину, включающую полярную и неполярную составляющие,

$$\left\{ \begin{array}{l} W_{s-l}^d = \gamma_l^d + \gamma_s^d - \gamma_{s-l}^d \quad (1) \\ W_{s-l}^p = \gamma_l^p + \gamma_s^p - \gamma_{s-l}^p \quad (2) \end{array} \right.$$

Поскольку в качестве среды выбрана полярная жидкость – вода, полярная составляющая которой намного превышает дисперсионную ($\gamma_l^p = 51 \text{ мДж м}^{-2}$, $\gamma_l^d = 22 \text{ мДж м}^{-2}$), то работа адгезии главным образом обусловлена величиной полярной составляющей межфазной энергии Гиббса: $W_{\text{адг}}$ тем больше, чем меньше γ_{s-l}^p .

Расчет γ и γ_{sl} осуществлен при использовании термодинамической теории равновесных углов смачивания θ . Измерения θ были проведены в условиях натекания $\theta_{\text{н}}$, оттекания $\theta_{\text{т}}$ и избирательного смачивания в среде двух несмешивающихся жидкостей $\theta_{\text{д}(l)}$, $\theta_{\text{т}(l)}$, где l – смачивающая жидкость или среда. Равновесные значения краевых углов θ были выбраны равными значениям θ , соответствующим плато кинетических кривых $\theta=f(\tau)$.

⁴ R. F. Good, J. Colloid Interface Sci. 59, 398 (1977)

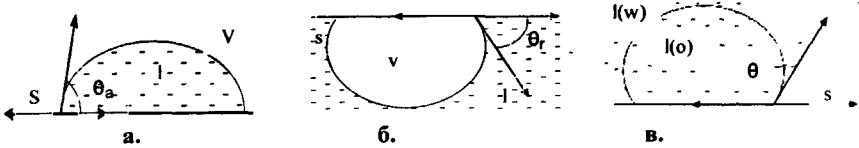


Рис.1. Методики анализа краевых углов смачивания θ : а – контактный угол натекания θ_a ; б – контактный угол оттеkania θ_r ; в – контактный угол натекания методом избирательного смачивания $\theta_{a(l)}$.

Поверхностная энергия γ_s , его полярная и дисперсионная составляющие были рассчитаны на основе решения уравнений:

$$\begin{cases} \gamma_{CH_2J_2}(1 + \cos\theta_{CH_2J_2}) = (\gamma_{CH_2J_2}^d \gamma_s^d)^{1/2} + (\gamma_{CH_2J_2}^p \gamma_s^p)^{1/2} & (3) \\ \gamma_{H_2O}(1 + \cos\theta_{H_2O}) = (\gamma_{H_2O}^d \gamma_s^d)^{1/2} + (\gamma_{H_2O}^p \gamma_s^p)^{1/2} & (4), \end{cases}$$

где θ_{H_2O} и $\theta_{CH_2J_2}$ – углы натекания H_2O и CH_2J_2 на поверхности полимера, находящегося в равновесии с насыщенным паром смачивающей жидкости. Рассчитанные термодинамические параметры приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Значения углов смачивания, поверхностной энергии Гиббса и ее составляющих, сополимеров

сополимер	m_2	$(\theta_{\pm 1})$ град. капля H_2O	$(\theta_{\pm 1})$ град. капля CH_2J_2	$(\gamma_s^d \pm 0.7)$ мДж/м ²	$(\gamma_s^p \pm 0.4)$ мДж/м ²	$(\gamma_s \pm 1.1)$ мДж/м ²	γ_s^d / γ_s^p
Ст-НВПД	0.1	76	24	49.0	3.0	52.0	16.4
	0.2	67	12	52.0	6.2	58.0	8.3
	0.4	62	15	53.0	8.3	61.3	6.5
	0.5	60	12	54.2	10.5	64.7	5.2
Ст-4ВП	0.9	46	26	48	17	65.0	13.4
Ст-МАК	0.35	70	5	13.2	4.3	17.5	26.4

Данные таблицы.1 показывают, что критерий γ_s^d/γ_s^p эффективен для (со)полимеров с m_2 от 0.1 до 0.5. При большем содержании полярного звена значение этого критерия малоинформативно. С другой стороны, для липидов большое значение имеют (со)полимеры с $m_2 > 0.4$. В связи с этим, для изучения (со)примеров желателен поиск других показателей гидрофильно-липофильного соотношения.

Бислой фосфолипидов в биологической мембране отрицательно заряжен ($\sigma_0 = -0.2 \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2}$) и способен структурировать воду в тонком слое у поверхности мембраны. В результате между полярными фрагментами липидных молекул возникает взаимодействие, опосредованное слоем структурированной воды и называемое гидратационным. Поэтому поверхностные свойства гидратационного липидного слоя сополимеров необходимо было также изучить с учетом неизбежной гидратации в водной фазе.

Расчет равновесных величин полярной $\gamma_{s(w)w}^p$ и дисперсионной $\gamma_{s(w)w}^d$ составляющих энергии Гиббса, межфазной энергии $\gamma_{s(o)w}$ в полярном окружении (среда – вода) выполнены с привлечением методологического подхода Е.Рукенштейна⁵ по следующим уравнениям:

$$\gamma_{s(o)w}^p = \Phi^2 \frac{(\gamma_{ow} \cos \theta_{w(o)} + \gamma_w - \gamma_o)^2}{4\gamma_w^p}, \quad (5)$$

$$\gamma_{s(w)w}^p = \frac{(-\gamma_{ow} \cos \theta_{o(w)} + \gamma_w - \gamma_o)^2}{4\gamma_w^p} \quad (6)$$

$$\gamma_{s(w)w}^d = \frac{(\gamma_{ow} \cos \theta_{o(w)} - \gamma_w \cos \theta_{w(o)} + \gamma_o)^2}{4\gamma_o} \quad (7),$$

где символы O, W – октан, вода,

$\theta_{w(o)}$ – равновесный краевой угол капли воды в октане,

⁵ Rukenstein E Lee S H Free interface energy as criterion of biocompatibility // J.Colloid and Interface Sci 1987 V 120 №1 P 153 – 161.

γ_{ow} , γ_w и γ_o – межфазное натяжение, $\gamma_{ow} = 51.0$ мДж/м², и поверхностное натяжение воды (w), октана (o), соответственно,

$\theta_{o(w)}$ – равновесный краевой угол капли октана в воде,

$\theta_{v(w)}$ – равновесный угол оттекания (пузырек воздуха в воде).

$\gamma_{s(w)o}$ – неравновесная величина межфазного натяжения гидратированной полимерной пленки;

$\gamma_{s(w)w}$ – равновесная величина межфазного натяжения гидратированной полимерной пленки;

Φ – параметр, учитывающий межмолекулярное взаимодействие ($\Phi \cong 1$).

Экспериментальные значения краевых углов θ , а также общая характеристика рассчитанных энергетических параметров представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Количественные характеристики межфазного взаимодействия на границе раздела «пленка сополимера – среда»

сополимер	m_2	$\theta_{v(w)}$, (± 1) град	$\theta_{w(o)}$, (± 1) град.	$\theta_{o(w)}$, (± 1) град.	$\gamma_{s(w)w}^p$ (± 0.05) мДж/м ²	$\gamma_{s(w)w}^d$ (± 0.05) мДж/м ²	γ_{so}^p (± 0.06) мДж/м ²	$\frac{\gamma_{s(w)w}^d}{\gamma_{s(w)w}^p}$
Ст-НВПД	0.1	49	23	49	1.2	6.2	22.7	5.2
	0.2	66	49	66	0.85	4.5	14.9	5.3
	0.4	59	73	59	0.59	3.2	6.6	5.4
	0.5	70	80	37	0.11	5.3	2.0	48
Ст-4ВП	0.9	30	55	30	0.1	0.3	12	3
Ст-МАК	0.35	45	78	50	0.3	1.5	21	5

Согласно теории Джирифалко-Гуда-Фоукса, величины $\gamma_{s(w)w}^p$ и γ_{so}^p определяют сродство сополимера к гидрофильной и олеофильной среде – чем меньше данные величины, тем больше сродство к соответствующей среде. Из таблицы 2 видно, что наилучшим образом первому условию отвечают сополимер Ст-НВПД ($m_2=0.5$) и сополимер Ст-4ВП, однако последний значительно уступает первому в отношении γ_{so}^p . Поэтому сополимер Ст-НВПД

($m_2=0.5$) следует признать оптимальным для модификации фосфолипидных мембран, как возможный компонент полимер-коллоидного комплекса.

По мере развития представлений о коллоидно-химической природе биосовместимости, в качестве ее критерия были предложены поверхностная и межфазная энергии Гиббса, дисперсионная и полярная их составляющие. В соответствии с упомянутым выше подходом, именно их минимальные значения соответствуют максимальной биосовместимости. Оценивая данные таблиц 1, 2, следует обратить внимание на существенно меньшие значения поверхностной энергии сополимера Ст-МАК по сравнению с другими сополимерами, а также наименьшие значения полярной и дисперсионной составляющих межфазной энергии Гиббса в полярной и липофильной средах для сополимеров Ст-НВПД ($m_2=0.5$) и Ст-4ВП ($m_2=0.9$). Таким образом, именно эти три сополимера были в дальнейшем использованы для модификации липидных мембран.

Из данных таблицы 2 следует, что отношение $\gamma_{s(w)w}^d/\gamma_{s(w)w}^p$ резко возрастает для эквимолярного сополимера. Предположительно, это может указывать на достижение оптимального гидрофильно-липофильного соотношения сополимера при данном соотношении звеньев. Однако, проверить это предположение не представлялось возможным из-за частичной растворимости сополимера с большим содержанием винилпирролидона.

1.2. Смесевые пленки «лецитин – ВМС». Зависимость краевого угла смачивания от состава, химической природы ВМС и pH

Для выявления оптимального относительного содержания статистического амфифильного сополимера в липидной мембране нами изучена зависимость краевого угла смачивания от состава смеси пленки.

Измерение углов смачивания смесей разного состава выявило экстремальную зависимость (рис.2). Область минимума смещена в область малого (Ст-НВПД) и очень малого (Ст-4ВП, Ст-МАК) относительного содержания сополимеров и соответствует максимальной гидрофилизации поверхности, обусловленной, по-видимому, оптимальной ориентацией полярных звеньев

сополимера к воде. Смещение минимума зависимости $\theta = f(C_{\text{ВМС}})$ в область малых и сверхмалых концентраций добавок для ионогенных сополимеров по сравнению с неионогенными, но включающими гидрофильные звенья ВПД, свидетельствует о большей степени гидратируемости ионогенных полярных групп по сравнению с неионогенными. Следует заметить, что эффект влияния сверх малых добавок наиболее ярко выражен для сополимера Ст-МАК, обладающего наименьшими значениями поверхностной энергии Гиббса, что исходя из упомянутого выше критерия, должно соответствовать наилучшей адсорбируемости. Повышение относительного содержания сополимера приводит к постепенному увеличению угла смачивания.

Влияние pH среды на гидрофильно – гидрофобные и кислотно-основные взаимодействия было изучено на основе изменения смачиваемости тонких пленок полимеров и их смесей с лецитином под действием капли буферного раствора в широком интервале pH (рис. 3).

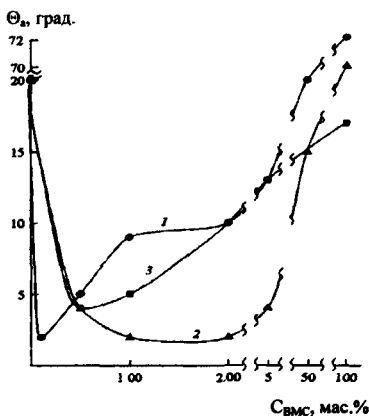


Рис.2. Зависимость угла смачивания (натекания) θ_a от содержания сополимера в смеси с лецитином : 1- Ст-МАК ($m_2=0.35$), 2 – Ст-НВПД ($m_2=0.5$), 3 – Ст-4ВП ($m_2=0.9$).

Низкие значения углов смачивания, а также характер влияния pH указывают на достаточно высокую полярность поверхности. Уменьшение углов смачивания как при низких, так и при высоких значениях pH, связано с увеличением степени диссоциации ионогенных групп лецитина. Аналогичный эффект имеет место для пленок, образованных сополимерами с основной и

кислотной группами. Естественно, что в данном случае углы смачивания уменьшаются лишь в одной области рН.

Смесевая пленка лецитин – сополимер (Ст-4ВП) оказалась подверженной влиянию рН по отношению к смачиваемости только лишь в области больших значений рН, поскольку основные группы сополимера препятствуют дополнительной ионизации основной группы лецитина в кислой среде. Поскольку смачивание определяет межмолекулярное взаимодействие в поверхностном слое, то полученные результаты свидетельствуют о существенном изменении природы поверхности лецитина в присутствии малых добавок ВМС.

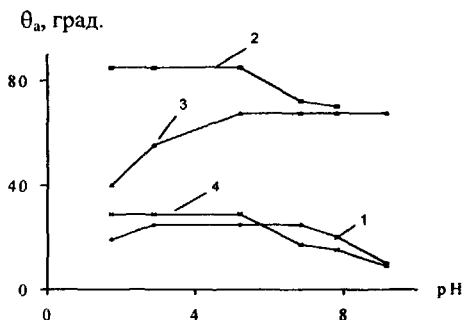


Рис.3. Изотерма смачивания $\theta=f(\text{pH})$: 1 – лецитин; 2 – Ст-МАК; 3 – Ст-4ВП; 4 – 98% лецитин + 2% Ст-4ВП

2. Физико-химические закономерности формирования и свойства ленгмюровских монослоев амфифильных сополимеров и их смесей с лецитином на воде

Метод поверхностного сжатия мономолекулярного слоя нерастворимых и нелетучих молекул (метод Ленгмюра) позволяет получить изотермы сжатия π -А, отражающие состояние «двумерного газа». В идеальном случае (неионогенные ПАВ) такие изотермы соответствуют известным уравнениям идеального и реального газов, с той разницей, что давление заменяется на площадь. По аналогии с агрегатными состояниями обычного вещества мономолекулярные пленки можно разделить на три типа: газообразные, жидкие и твердые. Газообразные пленки могут неограниченно расширяться, не претерпевая фазовых изменений, постоянные контакты между молекулами отсутствуют. В жидких

пленках эти контакты, обусловленные межмолекулярным взаимодействием, возникают. Различают растянутые и конденсированные жидкие пленки. В последних большие оси молекул ориентируются перпендикулярно поверхности. Твердые пленки характеризуются строго линейными зависимостями π - A . Сжимаемость таких пленок мала и близка к сжимаемости твердого вещества, что указывает на плотную упаковку углеводородных цепей.

На рис. 4 а, б, в приведены изотермы поверхностного сжатия $\pi=f(A_0)$ для монослоя яичного лецитина и его смесей с сополимерами Ст-NBПД и Ст-4ВП. Экстраполяция на $\pi=0$ позволяет оценить молекулярную площадь лецитина $A_0=0.54\text{nm}^2$ (рис.4в). Теоретический расчет площади, занимаемой двумя плотно упакованными гидрофобными цепями лецитина (модель щетки), дает величину $A_0=0.41\text{nm}^2$. Однако, в реальных условиях молекула лецитина в монослое содержит адсорбированную воду в своей полярной части и A_0 является равной $0.52\text{-}0.56\text{nm}^2$.

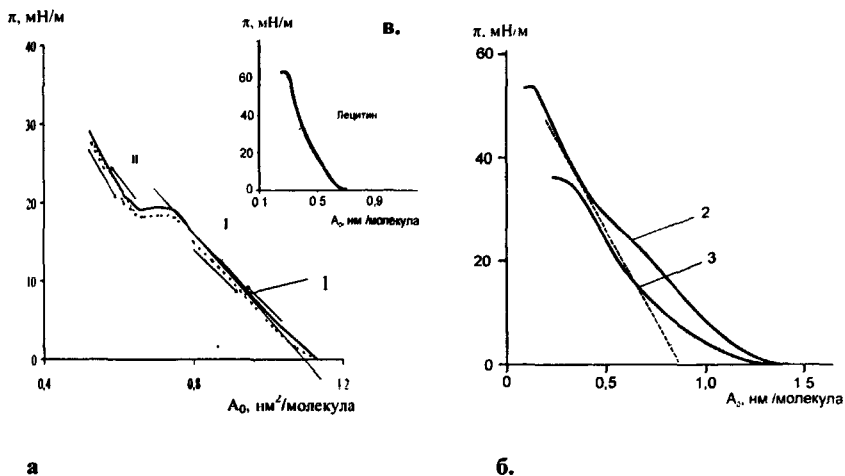


Рис.4.а,б,в. Изотермы сжатия монослоя лецитина и смесей при массовом соотношении компонентов 100:3 на водной субфазе при $T=298\text{K}$; 1 - лецитин-Ст-4ВП: сплошной линией обозначен прямой процесс (сжатие), прерывистой линией – обратный (растяжение); 2 - лецитин-Ст-NBПД (свежеприготовленная смесь); 3 - лецитин- Ст-NBПД (выдержанная смесь в течение суток).

Принципиально иной характер имеют изотермы сжатия смесей лецитин – сополимер (рис.4а,б). На соответствующих кривых $\pi=f(A_0)$ можно отметить две области, разделенные плато, что особенно ярко выражено для смеси лецитина с сополимером Ст-4ВП (рис.4а). В последнем случае экстраполяционные величины A_0 ($\pi=0$) в I и во II областях равны $(1.1 \pm 0.15) \text{ нм}^2$ и $(0.90 \pm 0.05) \text{ нм}^2$, соответственно. Рассчитанные величины параметров сжимаемости $\beta \approx (0.2-0.7) \cdot 10^{17} \text{ Н/М}^3$ позволяют рассматривать фазовые состояния монослоев как «жидко-твердые» пленки, т.е. пленки, содержащие воду, связанную водородными связями с полярными группами сополимера. Переходная область, соответствующая двумерному фазовому переходу (т.е. переходу к плотно упакованному мономолекулярному слою), сопровождаемому вытеснением части гидратационной воды, более четко выражена для смесей лецитина с сополимером Ст-4ВП (рис.4а).

Следует отметить, что эффективная молекулярная площадь A_0 в I и II областях значительно увеличивается по сравнению с A_0 для лецитинового монослоя. Отсюда следует, что макромолекулы иммобилизуются упомянутым слоем. На это же указывают заметно меньшие величины поверхностного давления, отвечающего коллапсу (разрушению) мономолекулярного слоя лецитина при малых добавках сополимера.

Состояние монослоев смесей лецитина и сополимеров при массовом соотношении компонентов 100:3 практически не зависит от условий формирования монослоя на водной субфазе. В области поверхностных давлений от 0 до 30 Н/м практически отсутствует гистерезис сжатия, что следует из практического совпадения кривых сжатия и обратного ему растяжения.

В данной серии экспериментов было обнаружено необычное явление. Показано, что при уменьшении концентрации сополимера Ст-НВПД ($m_2=0.5$) его раствора, наносимого на субфазу, существенно возрастает удельная площадь ВМС в монослое – от 0.34 до 30.5 нм²/звено (рис.5).

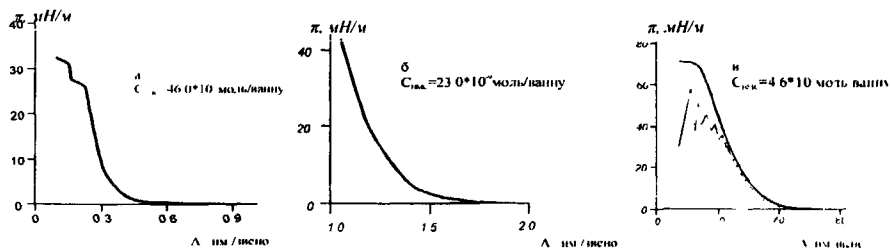


Рис.5. Изотермы сжатия $\pi=f(A_0)$ монослоев сополимера Ст-NBPD на водной субфазе при $T=298\text{K}$. Концентрации сополимера в хлороформных растворах, из которых формируется монослой: а) $C=1.00\text{г/л}$, $V=10\text{мкл}$; б) $C=0.5\text{г/л}$, $V=10\text{мкл}$; в) $C=0.01\text{г/л}$, $V=100\text{мкл}$.

Для объяснения этого явления были проведены дополнительные эксперименты. Измерена вязкость растворов сополимера Ст-NBPD двух составов в широком диапазоне концентраций. Это означает, что вязкость растворов полимеров становится меньше вязкости растворителя. При концентрации полимера $0.05 - 0.5\text{г/л}$ найдены отрицательные и крайне низкие значения приведенных вязкостей: $\eta_{sp}/C(0.05\text{г}\cdot\text{с}^{-1}) = -0.4\text{г}\cdot\text{с}^{-1}$; $\eta_{sp}/C(0.5\text{г}\cdot\text{с}^{-1}) = -0.04\text{г}\cdot\text{с}^{-1}$.

Подобные явления хорошо изучены в 80-е годы. Природа этого эффекта связана с разворачиванием макромолекул и их ориентацией по потоку, что способствует переходу от турбулентного течения к ламинарному. Визуализация процесса растекания раствора сополимера на поверхности воды при формировании мономолекулярного слоя показала, что раствор растекается ровным фронтом, а растворы сополимеров сверхмалых концентраций растекаются нестабильным фронтом с неравномерной и периодически меняющейся скоростью соседних участков. Это можно связать с локальной ориентацией и разворачиванием макромолекул по потоку, что приводит к возрастанию скорости растекания в данной области. Процесс разворачивания макромолекул в потоке термодинамически невыгоден, поскольку при этом теряется конфигурационная энтропия. В какой-то степени эти потери могут быть компенсированы образованием локальных ассоциатов частично вытянутых и

ориентированных макромолекул за счет гидрофобного взаимодействия последовательностей стирольных звеньев. В результате, после испарения хлороформа на границе раздела, наряду с одиночными макромолекулами, присутствуют их агрегаты из вытянутых в той или иной степени макромолекул, в которых последовательности стирольных звеньев, связанных гидрофобным взаимодействием, чередуются с гидратированными последовательностями гидрофильных звеньев Ст-НВПД. Наличие гидратированных областей придает этим образованиям ячеистый характер, что вызывает увеличение удельной площади мономолекулярного слоя.

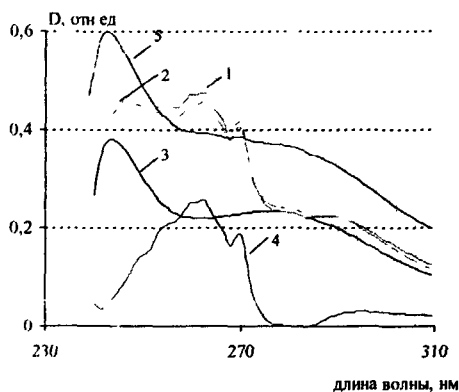


Рис.6. Электронные спектры поглощения реакционной смеси лецитина со Ст-НВПД ($m_2=0.5$). Состав: лецитин— $1.45 \cdot 10^{-5}M$; Ст-НВПД— $2mg/l$. 1-теоретический спектр смеси; 2-свежеприготовленная смесь; 3-раствор исходного компонента смеси—лецитин $C=1.45 \cdot 10^{-5}M$; 4-раствор исходного компонента смеси — Ст-НВПД $C=2mg/l$; 5-выделенная смесь.

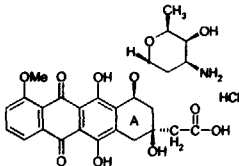
На рис.6 приведены электронные спектры растворов смеси лецитина с сополимером Ст-НВПД. Отмечено увеличение коэффициента, характеризующего отношение оптических плотностей поглощения при $\lambda=243nm$ - полосы поглощения фосфатидилхолиновой группы липида и $\lambda=259nm$ - реперной полосы группы НВПД, $k=D_{243}/D_{259}$ от 0.96 до 1.5 при хранении в течение суток (рис.6, кривые 2,5). Вероятно, это свидетельствует о донорно-акцепторном взаимодействии между компонентами, что в конечном счете может привести к образованию полимер-коллоидных комплексов между полимером и лецитином.

3. Амфифильные статистические сополимеры как компоненты мембраны фосфолипидных везикул

К везикулам относят полые наночастицы, имеющие форму сферы или эллипсоида, с замкнутой оболочкой из липидной мембраны (одно- или многослойной), внутри которых находится вода. Основной проблемой создания везикулярных частиц является их невысокая термодинамическая (агрегативная) и кинетическая устойчивость.

В настоящей работе рассмотрена возможность стабилизации везикулярных структур введением в липиды амфифильных сополимеров, поскольку совокупность рассмотренных выше данных указывает на иммобилизацию амфифильных сополимеров би- и монослой лецитина. Из данных, полученных методом атомной силовой микроскопии видно, что в ряду изученных (со)полимеров наилучшие результаты были достигнуты с использованием сополимера Ст-4ВП ($m_2=0.9$), в отсутствие сополимера наблюдаются следы слияния везикул. В присутствии малого количества сополимера в смесевой пленке, близкого к тому, что соответствует минимуму на кривых зависимости $\theta_a=f(C_{ВМС})$, следы слияния везикул практически отсутствуют, размер частиц колеблется в пределах 100-300нм, т.е. находится в «нано» диапазоне. Можно полагать, что в данном случае фрагменты ламелей лецитина армированы цепями амфифильных сополимеров, как это было постулировано для полимер-коллоидных комплексов синтетических ПАВ с полиэлектролитами⁷.

Следует также отметить, что независимо от метода формирования (метод обращения фаз, инъекция или набухание на подложке) преимущественно образуются везикулы с размерами от 0.1 до 0.3мкм (малые и большие).



Доксорубин гидрохлорид (DR)

Исследование механизма введения лекарственного вещества в полимерсодержащие

⁷ Отдельнова М.В., Захарова Ю.А., Ивлева Е.М., Касакин В.А., Кабанов В.А. //Высокомолекулярная химия А.2003 Т 45 №9, С.1524.

везикулы для снижения токсичности лекарства было выполнено на примере противоопухолевого антибиотика – доксорубина гидрохлорида (ДР).

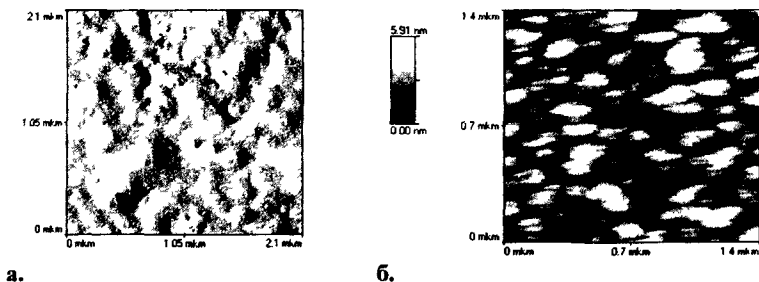


Рис.7. Микрофотографии везикулярных структур. а. - лецитин; б -лецитин-Ст-4ВП (97:3%)

Была изучена адсорбция из водных растворов ДР на поверхности тонкой пленки сополимера Ст-НВПД ($m_2=0.5$) и на поверхности подложки с липид-полимерными везикулами.

Исследование адсорбции ДР на поверхности тонкой пленки Ст-НВПД было проведено на основе анализа зависимости $\gamma=f(C_{ДР})$ в растворе до и после адсорбции (рис.7). Равновесная (текущая) концентрация ДР определялась по установленному значению поверхностного натяжения после 12 часов выдержки Ст-НВПД в растворе.

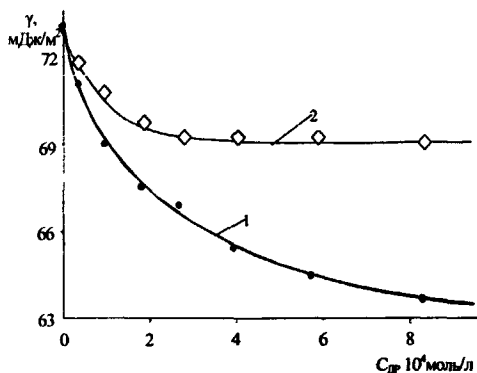


Рис.7. Изотермы поверхностного натяжения $\gamma=f(C_{ДР})$; 1 - до адсорбции; 2 - после адсорбции.

Величина эффективной адсорбции $A_{\text{эфф}} = \Gamma_{\text{ДР}}$, вычислялась по формуле (8) Она оказалась равна $(3.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-10}$ моль/см².

$$\Gamma_{\text{ДР}} = A_{\text{эфф}} = \frac{(C_{\text{ДР}}^0 - C_{\text{ДР}}) \cdot V}{A} \quad (8);$$

где $C_{\text{ДР}}^0$ и $C_{\text{ДР}}$ - начальная и текущая молярная концентрации, A - площадь; V - объем пробы (л).

Второй способ был основан на измерении углов смачивания пленки сополимера (Ст-NBПД) растворами ДР различной концентрации.

Удельная адсорбция Гиббса на межфазной границе Γ_{s-l} была рассчитана, используя уравнение Юнга (9):

$$\cos \theta \cdot \gamma_{l-v} = \gamma_{s-v} - \gamma_{s-l} \quad (9)$$

и фундаментальное адсорбционное уравнение Гиббса для разбавленного раствора, содержащего одно поверхностно активное вещество (10):

$$\Gamma_{s-l} = -\frac{d\gamma_{s-l}}{dC} \frac{C}{RT} \quad (10),$$

где C - равновесная концентрация ДР; R - универсальная газовая постоянная, $R=8.31$ Дж/К·моль; T -температура, К.

Принимая во внимание, что при смачивании полимеров $\gamma_{s-v} = \text{const}$ и $\frac{d\gamma_{s-v}}{dC} = 0$, с учетом уравнения (9) адсорбционная изотерма (10) принимает вид:

$$\Gamma_{s-l} = \frac{d(\gamma_{l-v} \cos \theta)}{dC} \frac{C}{RT} \quad (11)$$

Графическое решение уравнения (11) в координатах $\gamma \cdot \cos \theta = f(\ln C_{\text{ДР}})$ (рис.8) позволило рассчитать $\Gamma_{s-l} = (4.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-10}$ моль/см².

Близкие значения рассчитанных величин Γ_{s-l} и $A_{\text{эфф}}$ говорят о незначительном влиянии состояния поверхности Ст-NBПД на характер адсорбции.

Адсорбцию ДР на поверхности липид-полимерного везикулярного слоя, изучали следующим образом. Везикулы состава липид-полимер 1:1 получали методом обращения фаз и наносили на стеклянную подложку

инжектированием через хроматографический шприц. Высушенные подложки погружали в растворы ДР на несколько часов. В данном случае использование зависимостей (рис.7) для определения концентрации ДР не представлялось возможным ввиду возможного перехода лецитина в раствор, поэтому концентрацию ДР определяли спектральным методом, используя калибровочный график по реперным полосам ДР 480нм и 500нм.

Величина эффективной удельной адсорбции $\Gamma_{\text{ДР}}=A_{\text{эфф}}$ на поверхности липид-полимерной пленки, рассчитанная по формуле (8), равна $0.83(\pm 0.2)10^{-10}$ моль/см². Предварительными опытами установлено, что адсорбция ДР на лецитине ничтожно мала ($\Gamma_{\text{ДР}}=A_{\text{эфф}}\approx 0.01\cdot 10^{-10}$ моль·см⁻²).

Концентрацию ДР внутри везикул (заполняемость или «загруженность» везикул) устанавливали по анализу диализованного раствора ДР. Диализ осуществляли с использованием мембран из целлюлозы (ММ=10000) при ионной силе 0.1-0.2. В качестве электролита были использованы растворы хлорида натрия, фосфатный буферный раствор. Концентрацию HCl и ДР оценивали титриметрически и методом электронной спектроскопии, соответственно.

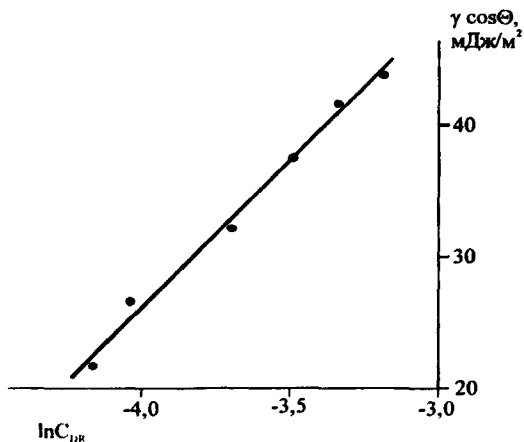


Рис.8. Графическое решение уравнения (11).

Отношение протонированных форм доксорубина гидрохлорида внутри и снаружи везикулы рассчитано по формуле:

$$a = \frac{\left[\frac{DP \cdot H^+}{DP \cdot H^+} \right]_{in}}{\left[\frac{H^+}{H^+} \right]_{in}} = \frac{\left[\frac{H^+}{H^+} \right]_{in}}{\left[\frac{H^+}{H^+} \right]_{out}} \quad (12)$$

При $[DP]_{in} \approx 0.96 \cdot 10^{-3}$ моль/л и $[DP]_{out} \approx 1.1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $a \approx 1 \cdot 10^3$, этот результат совпадает с литературными данными* и отвечает практически 100% "загруженности" везикул.

ВЫВОДЫ

1. Выполнен комплекс физико-химических исследований по модификации липидных мембран синтетическими амфифильными сополимерами, применительно к «наноконтейнерной» технологии транспорта лекарственных средств.

2. Осуществлен первичный выбор статистических сополимеров, как возможных компонентов липидных мембран методом смачивания. Измерены углы натекания и оттекания на поверхности раздела пленок сополимеров стирола с N-винилпирролидоном, 4-винилпирридином, метакриловой кислотой с воздухом, водой, неполярными жидкостями. найдены значения поверхностной и межфазной энергии Гиббса, их полярной и дисперсионной составляющих $\gamma_{s(n)}^d$, $\gamma_{s(n)}^p$, $\gamma_{s(o)}^p$. В соответствии с коллоидно-химическими критериями биосовместимости, в качестве оптимальных были выбраны сополимеры Ст-НВПД ($m_2=0.5$), Ст-4ВП ($m_2=0.9$) и Ст-МАК ($m_2=0.35$) с минимальными значениями $\gamma_{s(n)}^p$, $\gamma_{s(o)}^p$, γ .

3. Методом смачивания и поверхностного сжатия монослоя (анализ π -А изотерм с использованием пленочных весов Ленгмюра) изучены свойства тонких

пленок лецитин-(со)полимерных композиций. Впервые выявлено два взаимосвязанных эффекта, вызванного малыми (1-5%) и сверхмалыми (0.1-1%) добавками амфифильных (со)полимеров:

- значительное повышение гидрофильности липидного бислоя;
- увеличение эстраполяцияционной величины удельной площади ($\pi=0$) липид-полимерного слоя по сравнению с липидным; $A_0(\text{лецитин})=0.54\pm 0.02 \text{ нм}^2$; $A_0(\text{лецитин-(со)полимер})$ в I и во II областях соответственно равны $(1.1\pm 0.15)\text{нм}^2$ и $(0.90\pm 0.05)\text{нм}^2$. Высказана гипотеза, что оба явления связаны с локализацией на границе раздела двумерных макромолекулярных клубков.

4. Показана принципиальная возможность заполнения везикул лецитина, армированных амфифильным сополимером Ст-NBПД ($m_2=0.5$), противоопухолевым лекарственным препаратом за счет эффектов сорбции на (со)полимере и эффекта Донана.

Методом Гиббса, а также сочетанием методов Гиббса и смачивания, измерена величина эффективной $A_{\text{эф}}$ и гиббсовской адсорбции на межфазной границе пленка-раствор $\Gamma_{s,l}$. Найдены близкие значения $A_{\text{эф}}=(3.7\pm 0.1)\cdot 10^{-10}$ моль·см⁻², $\Gamma_{s,l}=(4.0\pm 0.1)\cdot 10^{-10}$ моль/см².

С использованием данных электронной спектроскопии по реперной полосе доксорубина $\lambda=480\text{нм}$ рассчитано отношение концентрации лекарственного препарата, вовлеченного внутрь везикул к его концентрации во внешнем растворе после диализа, которое оказалось близким к 10^3 .

5. Методом атомной силовой микроскопии доказано, что амфифильные (со)полимеры приводят к существенному возрастанию агрегативной устойчивости лецитиновых везикул. Так везикулы, полученные методом озвучивания водного раствора лецитин – (со)полимер Ст-4ВП ($m_2=0.9$) с 3% добавкой (со)полимера, имели размер в пределах 100-300нм и оставались агрегативно устойчивыми в течении недели. В отсутствие (со)полимера в течение указанного срока произошла практически полная коалесценция (слияние) везикул.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ ТРУДОВ

1. Н.Б. Мельникова, М.С. Гусихина, А.А. Туршатов, Ю.Д. Семчиков. Энергетические свойства тонких пленок статистических сополимеров как критерий их биосовместимости с онкологическими препаратами // Известия ВУЗов. Сер. "Химия и химическая технология"; 2004. Вып.8, -С. 101-109.

2. М.С. Гусихина, Ю.Д. Семчиков, Ю.Ю. Гушина, А.А. Волков, Н.Б. Мельникова. Влияние амфифильных сополимеров на свойства ламеллярных и везикулярных структур лецитина. // Высокомолек. соед., Сер. А.-2005, - Т.47,- №7, -С.1220-1224.

3. М.С.Гусихина, Ю.Д.Семчиков, О.В.Бирюкова, Н.Б.Мельникова. Влияние малых и сверхмалых добавок сополимера Ст-NВПД на состояние монослоев лецитина. // Известия ВУЗов. Сер. «Химия и химическая технология»; 2005. Вып.9, -С.110-115.

4. А.А.Волков, М.С.Гусихина, Ю.Д.Семчиков, С.В.Кононова, Н.Б.Мельникова. Особенности адсорбции доксорубина на поверхности полимеров, содержащих физиологически активное звено. // Известия ВУЗов. Сер. «Химия и химическая технология»; 2005. Вып.9,-С.85-91.

5. Н.Б. Мельникова, М.С. Гусихина, А.А. Туршатов, Ю.Д. Семчиков. Поверхностные характеристики тонких пленок статистических сополимеров стирола с N-винилпирролидоном и 4-винилпирридином, на границе раздела водных растворов. // III Всерос. Каргинская . конф.: Тезисы докл.: г. Москва, 27 января-1 февраля, 2004 г., -С. 244

6. А.А. Волков, М.В. Куликов, М.С. Гусихина. Исследование токсичного действия онкологического препарата "доксорубин" на моделях биосистем физико-химическими методами. // IV Всерос. конференции молодых ученых "Современные проблемы химии и химической технологии": Тезисы докл. г.Саратов, 23-25 июня. 2003 г., - С.54

7. М.С. Гусихина, А.А. Волков. Межфазная энергия Гиббса на границе раздела модельной биосистемы и раствора онкологического антибиотика доксорубицина как критерий биосовместимости и проникновения лекарства через мембрану. // VII Нижегородская сессия молодых ученых. "Голубая Ока": Тезисы докл.; г.Н.Новгород, 25-30 апреля, 2002 г., -С.62.

8. А.А. Волков, М.С. Гусихина. Взаимодействие противоопухолевого антибиотика антрахинонового типа с ионами меди в системах, моделирующих биологические среды. // VII Нижегородская сессия молодых ученых. «Голубая Ока»: Тезисы докл.; г.Н.Новгород, 25-30 апреля, 2002 г, -С.63.

9. М.С.Гусихина, А.А.Туршатов, Ю.Д.Семчиков. Поверхностные характеристики тонких пленок статистических сополимеров с природным ПАВ как критерий их биосовместимости. // IX Нижегородская сессия молодых ученых «Голубая Ока»: Тезисы докл.; г.Н.Новгород, 25-30 апреля 2004г., -С.53.

10. М.С.Гусихина, Ю.Д.Семчиков, Н.Б.Мельникова. Стабилизирующий эффект сополимеров на основе Ст-НВПД и Ст-4ВП на состояние липосом. // Всеросс. конференция молодых ученых «Химия и медицина»: Тезисы докл.; г.Уфа, 5-8 сентября 2005г.

Подписано в печать 22.11.2005 г. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 2. Заказ № 1584. Тираж 100 экз.

Отпечатано с готового оригинал-макета в типографии
Нижегородского госуниверситета им. Н.И. Лобачевского
Лиц. ПЦ № 18-0099 от 4.05.01.
603000, г. Нижний Новгород, ул. Б. Покровская, 37

...

...

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

№ 24 154

РНБ Русский фонд

2006-4

26326