

УДК 544.77.022.532:544.022.51

## Самоорганізовані наноносії для доставки меланіну

Н.М. Пермякова<sup>1</sup>, Т.Б. Желтоножська<sup>1</sup>, Т.В. Берегова<sup>2</sup>, Д.О. Климчук<sup>3</sup>, Т.М. Фалалєєва<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, хімічний факультет, кафедра високомолекулярних сполук

60, вул. Володимирська, Київ, 01033, Україна

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ “Інститут біології та медицини”

2, пр. Глушкова, Київ, 03187, Україна

<sup>3</sup>Інститут Ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України

2, вул. Терещенківська, Київ, 01601, Україна

*Міцели асиметричних блок-кополімерів на основі поліетиленоксиду та поліакрилової кислоти були використані для інкапсуляції протиракового препарату еумеланіну, який є продуктом життєдіяльності чорних дріжджів “Nadsoniella nigra sp. X-1”. Методами <sup>1</sup>H ЯМР- і FTIR-спектроскопії та потенціометричного титрування проведено детальне вивчення хімічної структури, розчинності у воді, електрохімічних та абсорбційних властивостей зразка еумеланіну. Показано цвіттер-іонний характер його макромолекул і визначено характеристичні значення рK<sub>0</sub> кислотних та основних груп. Встановлено сильну компактизацію макромолекул еумеланіну в області рН < 6, яка супроводжується фазовим розділенням системи. Методами електронної та FTIR-спектроскопії досліджено інкапсуляцію зразка еумеланіну міцелами блок-кополімерів і стабільність утворених міцелярних систем залежно від морфології та розміру наноносіїв і способу проведення інкапсуляції (ex situ або in situ). Розкрита природа взаємодії макромолекул еумеланіну з міцелами блок-кополімерів різної будови. Методом TEM встановлено реальний стан міцелярної системи з інкапсульованим еумеланіном; показана можливість його одночасної взаємодії з поверхнею декількох міцел, що призводить до зміни розміру та морфології останніх.*

**Ключові слова:** блок-кополімер, міцела, еумеланін, цвіттер-іон, інкапсуляція.

### Вступ.

Використання міцел блок-кополімерів розглядається сьогодні як один з найбільш перспективних способів інкапсуляції та доставки погано розчинних і/або токсичних лікарських сполук у біомедицині [1–4]. Нещодавно ми розробили принципово нові міцелярні наноносії для доставки погано розчинного вітаміну Е та його аналогів, зокрема, α-токоферолацетату (α-ТОКА) [5]. Ці носії є продуктами самозбірки асиметричних диблок- і триблок-кополімерів, що містять хімічно комплексовані блоки (метокси)поліетиленоксиду та поліакрилової кислоти (МОПЕО-*b*-ПАК і ПАК-*b*-ПЕО-*b*-ПАК). Ці блок-кополімери формують у кислих водних розчинах стійкі міцели, які містять комплексне гідрофобне “ядро” з підвищеною зв’язувальною здатністю до ліків різної природи та гідрофільну “корону” з незв’язаних ланок довших блоків, яка забезпечує їх агрегативну стійкість у водному середовищі [5, 6]. Випробування таких міцелярних носіїв для інкапсуляції і доставки аналога вітаміну Е *in vivo* в організмах білих мишей, кролів, порослих свинюматок та поросят довело їх

біосумісність, не токсичність, гарне виведення з організму і, в результаті, дало змогу створити водорозчинну форму цього препарату, запобігти його швидкій деградації у ферментативних і метаболічних процесах та істотно (у 25 разів) знизити його терапевтичну дозу [5, 7, 8]. У поданій роботі показана можливість застосування розроблених міцелярних носіїв також як засобів інкапсуляції (і подальшої пасивної доставки) погано розчинного протиракового препарату еумеланіну.

Меланіни – це біологічні пігменти, які наявні в тканинах рослин, тварин і багатьох мікроорганізмів [9–15]. В організмі людини цей пігмент забарвлює волосся, брови, вії, райдужну оболонку ока, шкіру та забезпечує захисну реакцію організму на дію ультрафіолетового опромінення [9–14]. Сильно пігментована шкіра з високим рівнем меланіну, який виробляється шкірними меланоцитами, є показником ефективного захисту від шкідливого інтенсивного або хронічного впливу сонця та зниження сприйнятливості до меланоми й інших агресивних форм раку шкіри [9].

Меланін не лише захищає шкіру від опромінення, а й виконує функції антиоксиданту, який нейтралізує вільні радикали. Він здатний також поглинати рентгєнівське опромінення, новоутворені активні форми кисню, іони металів зі змінною валентністю, токсичні речовини – метаболіти, канцерогени, лікарські препарати [10-14]. Крім того, в роботі [14] меланін розглядається як речовина з протистресовими властивостями, яка діє за антиоксидантним механізмом.

Проте меланіни не лише ефективні фото- і радіопротектори. За умов організму розчинні форми меланіну можуть виконувати також і транспортну функцію, сприяючи переносу важливих метаболітів. Такі меланіни проходять через гематоенцефалічний бар'єр, транспортуючи речовини, що не можуть самостійно його долати [14]. Меланіни беруть участь у ліквідації будь-якого стресового впливу, який руйнує рівновагу на клітинному рівні, та являються складовими імунної системи організму [14].

У шкірі людини виявлено 2 форми меланіну: чорні або коричневі *еумеланіни* та жовті *феомеланіни*. Найбільш інтенсивно вивчається структура еумеланіну (ЕМ) у роботі [14]. Таким чином, важливість біологічної ролі цих речовин у живих організмах не викликає сумніву, а їх багатофункціональність вказує на те, що вони очолюють список найсильніших природних адаптогенів.

Разом з тим, погана розчинність меланінів у воді заважає їх повноцінному засвоєнню при штучному введенні в живий організм з лікувальною метою. Тому ця робота була спрямована на розробку водорозчинних форм ЕМ з використанням міцелярних носіїв на основі блок-кополімерів МОПЕО-*b*-ПАК і ПАК-*b*-ПЕО-*b*-ПАК та забезпечення агрегативної стійкості отриманих композицій у часі.

#### Експериментальна частина.

##### Матеріали.

Для отримання міцелярних носіїв використовували зразки асиметричних диблок- та триблок-кополімерів МОПЕО-*b*-ПАК (ДБК) і ПАК-*b*-ПЕО-*b*-ПАК (ТБК) зі змінною довжиною блоків, які були синтезовані методом радикальної матричної блок-кополімеризації ПАК з (МО)ПЕГ за методикою [5, 6]. Їхня молекулярна структура, наведена в таблиці, та особливості міцелотворення у водних розчинах були детально охарактеризовані раніше [5, 6].

У зразках ДБК, де молекулярна маса МОПЕО була постійною, довжина блоків ПАК зростала і перевищувала довжину поліетерних блоків (параметр  $n > 1$ ). Таким чином, ступінь асиметрії блоків при переході від ДБК1 до ДБК2 збільшувався. На відміну від цього, в зразках ТБК при загальному зростанні молекулярної маси обох блоків бічні ланцюги ПАК були значно коротшими, ніж центральний ( $n < 1$ ); при цьому ступінь асиметрії блоків залишався близьким (таблиця).

Як дослідний протираковий препарат використо-

ували зразок ЕМ, який був продуктом життєдіяльності чорних дріжджів "*Nadsoniella nigra sp. X-1*" [14, 15].

##### Характеристика зразка еумеланіну.

Хімічну структуру зразка ЕМ встановлювали за допомогою  $^1\text{H}$  ЯМР- і FTIR-спектроскопії.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр ЕМ вимірювали на спектрометрі Mercury-400 фірми "Varian" (США) на частоті 400 МГц у дейтеродиметилсульфоксиді (ДМСО- $d_6$ ,  $C_{EM} = 1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ ) за  $T = 20^\circ\text{C}$ . Як внутрішній стандарт використовували тетраметилсилан.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр отримували за умов тривалого накопичення сигналів для підвищення співвідношення сигнал/шум. FTIR спектр тонкої (1~10 мкм) плівки ЕМ записували в області 1000–4000  $\text{см}^{-1}$  за  $T = 20^\circ\text{C}$  на спектрометрі Nexus-470 "Nicolet" (США). Плівку відливали на флюоритовому склі з водного розчину і висушували спочатку на повітрі, а потім у вакуум-ексикаторі над  $\text{CaCl}_2$  впродовж тижня.

Електрохімічні властивості ЕМ у водному середовищі вивчали методом потенціометричного титрування. Водну суспензію ЕМ за  $C_{EM} = 1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$  готували прямо у термостатованій комірці, а потім препарат повністю розчиняли при додаванні 0,2 н. NaOH до рН~11. Далі проводили титрування лужного розчину ЕМ 0,2 н. HCl до рН=2 за умов перемішування магнітною мішалкою і постійного току аргону. Температура становила  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Е.р.с. комірки (скляний і хлорсрібний електроди) вимірювали на рН-метрі П-215 (Білорусь). Значення е.р.с. переводили в одиниці рН аналітичним способом за коефіцієнтами калібрувальної прямої, яку отримували за стандартними буферними розчинами. Точність визначення рН становила 0,02 одиниці. За аналогічних умов титрували деіонізовану воду ("холостий розчин"). За результатами титрування ЕМ і деіонізованої води лугом та кислотою розраховували величини поглинання гідроксил-іонів і протонів ( $\sigma_{\text{OH}^-}$  і  $\sigma_{\text{H}^+}$ ) за такими формулами [16]:

$$\sigma_{\text{H}^+} = \frac{C}{g} (1 - 10^{\text{pH}_0 - \text{pH}}) \text{ (ммоль}\cdot\text{г}_{EM}^{-1}\text{)},$$

$$\sigma_{\text{OH}^-} = \frac{C}{g} (1 - 10^{\text{pH} - \text{pH}_0}) \text{ (ммоль}\cdot\text{г}_{EM}^{-1}\text{)},$$

де:  $C$  – концентрація добавленого титранту з урахуванням його розведення при титруванні ( $\text{моль}\cdot\text{м}^{-3}$ );  $g$  – концентрація кополімеру ( $\text{г}\cdot 100 \text{ см}^{-3}$ ); рН – значення від'ємного логарифма концентрації  $\text{H}^+$  іонів у розчині кополімеру за певних значень  $C$ ;  $\text{pH}_0$  – аналогічні значення в "холостому розчині" за тих же самих значень  $C$ .

##### Дослідження інкапсуляції еумеланіну міцелями блок-кополімерів.

Взаємодію ЕМ з міцелями ДБК і ТБК контролювали методами електронної та FTIR-спектроскопії, а також за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Електронні спектри сумішей ЕМ з міцелями ДБК/ТБК і вихідних компонентів вимірювали за  $T = 22^\circ\text{C}$

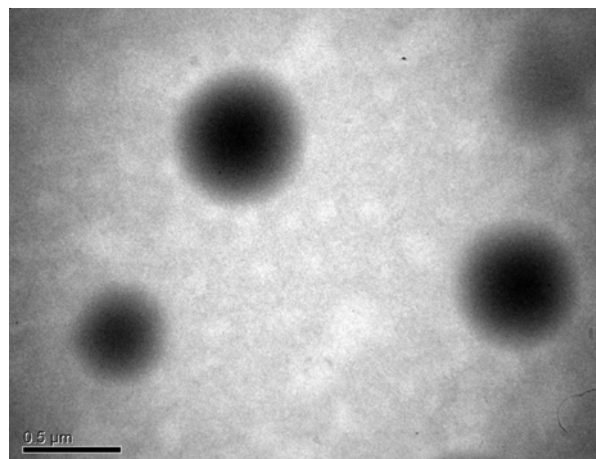
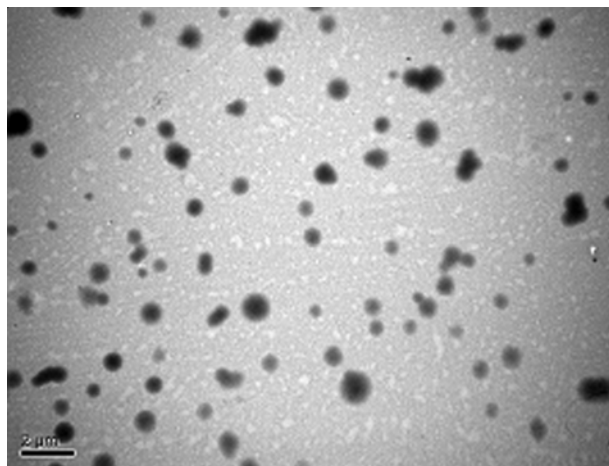


Рис. 1. Електронні мікрофотографії “квіткоподібних” міцел ТБК2, отриманих у водному розчині за рН=2,5, при малому (а) та великому (б) збільшенні.  $C=0,5 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$

на спектрофотометрі Cary 50 Scan фірми “Varian” (США), використовуючи кварцову комірку з  $l=1 \text{ см}$ .

FTIR-спектри тонких плівок сумішей ЕМ з міцелами отримували за методикою, описаною вище.

Дослідження морфології міцелярних композицій з ЕМ методом ТЕМ проводили на електронному мікроскопі JEM-1230 фірми “JEOL” (Японія) за напруги 90 кВ. Для приготування композицій використовували розбавлені міцелярні дисперсії кополімерів, отримані у деіонізованій воді за рН=2,5÷3,5. Малі краплинки ( $1\cdot 10^{-4} \text{ см}^3$ ) розбавлених міцелярних композицій з ЕМ наносили на мідні сіточки, вкриті плівкою формвару та вуглецю, і далі швидко висушували впродовж  $\sim 0,5\text{--}1,0 \text{ хв}$ . на повітрі, а потім впродовж доби у вакуум-ексикаторі за кімнатної температури.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

##### Будова і розміри міцел диблок- та триблок-кополімерів.

Процес самозбірки макромолекул ДБК і ТБК у водних розчинах з утворенням міцелярних структур, а також параметри та морфологія міцел описані нами раніше [5, 6]. Було показано, що визначальним фактором міцелоутворення цих блок-кополімерів у водних розчинах є кооперативна взаємодія хімічно комплементарних блоків (МО)ПЕО і ПАК, наслідком якої була сегрегація гідрофобних ділянок зв'язування полімерних блоків і формування комплексного “ядра” міцел [5, 6]. Гідрофільну “корону” таких міцел складали надлишкові незв'язані сегменти істотно довших блоків [5, 6]. Морфологічні дослідження, проведені методом ТЕМ, показали наявність у розчинах ДБК1 так званих “обрізаних” (“crew-cut”) міцел з відносно короткою “коронаю”, утвореною незв'язаними ланками ПАК, у розчинах ДБК2 – “волохатих” (“hairy-type”) міцел з розвинутою “коронаю” з ланок ПАК, а у розчинах ТБК1 і ТБК2 – “квіткоподібних” (“flower-like”) міцел, корону яких формували “петлі” з незв'язаних ланок ПЕО [5]. У розчинах усіх кополімерів спостерігали міцели як моно-, так і полімолекулярного типів. Розміри сферичних

моно- і полімолекулярних міцел ДБК1, ДБК2 та ТБК1 були в межах  $2\div 16$  і  $8\div 68 \text{ нм}$  відповідно [5]. Мікрофотографії “квіткоподібних” міцел ТБК2, які мають єдине “ядро” та чітку “корону” з гладкою поверхнею, наведено на рис. 1. Видно, що розмір мономолекулярних міцел ТБК2 також невеликий ( $4\div 16 \text{ нм}$ ), проте розмір гарно сформованих і строго сферичних полімолекулярних міцел цього блок-кополімеру істотно зростає до  $270\div 1280 \text{ нм}$ . На мікрофотографії “квіткоподібних” міцел ТБК2 помітні також окремі агрегати цих міцел.

Саме такі міцели за термодинамічними параметрами демонстрували найбільшу стабільність у водному середовищі [5].

##### Хімічна структура еумеланіну.

Меланіни різного природного походження належать до поліфенольних сполук [10–15]. Важливу роль в їх утворенні відіграють амінокислота тирозин і фермент тирозиназа, який “запускає” перші етапи біосинтезу меланінів [10–14]. Еумеланіни утворюються при окисненні тирозину (і/або фенілаланіну) за участі тирозинази до о-дигідроксифенілаланіну і його хінонового похідного, який в подальшому піддається циклізації до

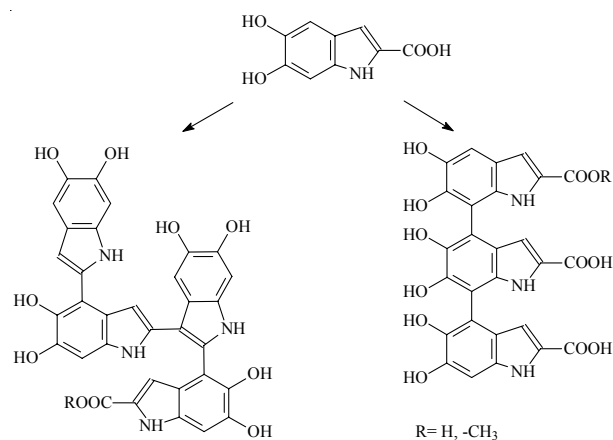


Рис. 2. Еумеланіни на основі 5,6-дигідроксіндол-2-карбонової кислоти

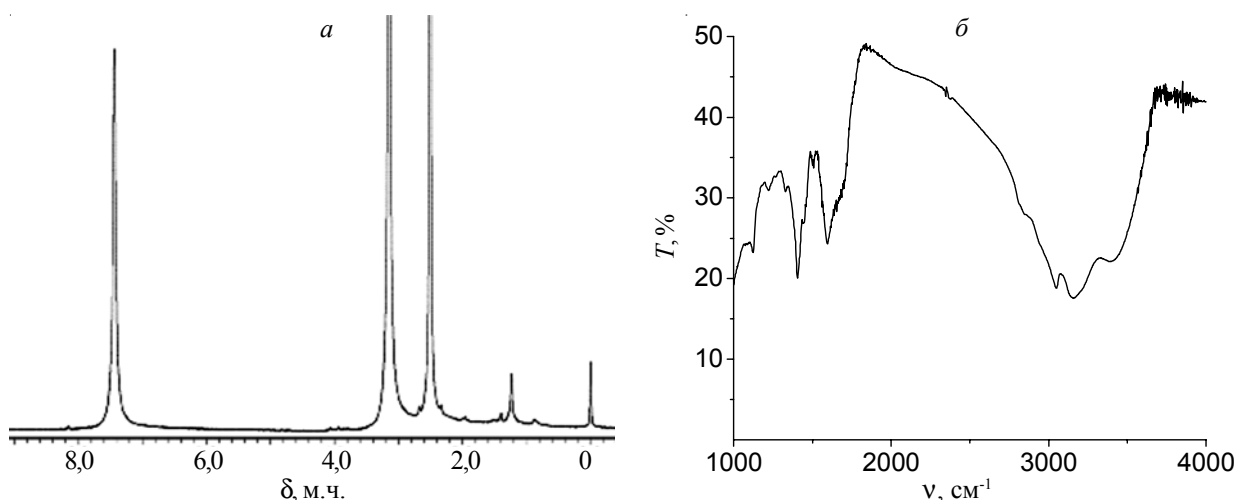


Рис. 3.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр ЕМ за  $C=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$  у  $\text{DMCO-d}_6$  (а) та FTIR спектр тонкої ( $l=10 \text{ мкм}$ ) плівки ЕМ на флюоритовому склі (б).  $T=20^\circ\text{C}$

5,6-дигідроксііндолу або 5,6-дигідроксііндол-2-карбонової кислоти (рис. 2). Мономери 5,6-дигідроксііндолу та 5,6-дигідроксііндол-2-карбоксильної кислоти розглядаються як прекурсори (попередники) ЕМ, які піддаються оксидативній полімеризації з утворенням меланінів [10–14]. Натуральний ЕМ складається з комбінації 5,6-дигідроксііндолу та 5,6-дигідроксііндол-2-карбонової кислоти з різноманітною комбінацією цих двох попередників у великій молекулі пігменту [10–14]. Отже, вторинна структура ЕМ або його супрамолекулярна організація, яка є складною аморфною сумішшю нерозчинних полімерних сполук, досі не встановлена [10–14].

У цій роботі використовували зразок ЕМ, отриманий в ННЦ "Біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Хімічну структуру цього зразка підтверджували за допомогою  $^1\text{H}$  ЯМР- і FTIR-спектроскопії. Відповідні спектри показані на рис. 3. За  $^1\text{H}$  ЯМР-спектром (рис. 3а) в молекулах

ЕМ встановлено наявність ароматичних кілець індолу з інтенсивним сигналом протонів при хімічному зсуві за  $\delta=7,44 \text{ м.ч.}$ , фенольних гідроксильних груп зі слабким сигналом протонів за  $\delta=8,15 \text{ м.ч.}$  та невеликої кількості естерних  $-\text{OCOCH}_3$ -груп (вони демонструють слабкі сигнали протонів за  $\delta=1,23; 1,38 \text{ і } 1,95 \text{ м.ч.}$ ), утворених замість відповідних  $-\text{COOH}$ -груп [17]. Хоча для ЯМР досліджень ЕМ було обрано дейтерований  $\text{DMCO-d}_6$ , який в принципі дає можливість ідентифікувати не тільки протони ароматичних кілець індолу, а й рухомі протони гідроксильних,  $>\text{NH}$ - і  $-\text{COOH}$ -груп, завдяки наявності невеликої кількості води в цьому розчиннику нам не вдалося спостерігати в дослідженому ЯМР-спектрі (рис. 3а) сигнали найбільш рухомих протонів  $-\text{COOH}$  і  $>\text{NH}$ -груп ЕМ.

У FTIR-спектрі тонкої плівки ЕМ, відлитої з водного розчину на флюоритових скельцях (рис. 3б), наявні характеристичні смуги  $\nu_{\text{SC=O}}$  і  $\nu_{\text{asC=O}}$  коливань карбоксилат-іонів за  $1406 \text{ і } 1597 \text{ см}^{-1}$ , а також 3 смуги коливань,

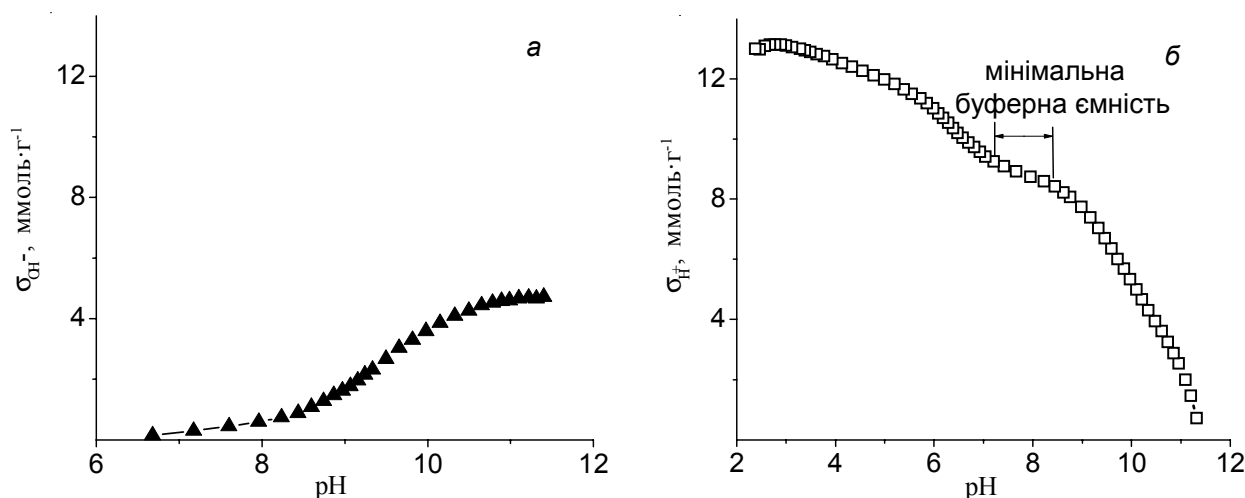


Рис. 4. Криві поглинання гідроксил-іонів (а) та протонів (б) у водних розчинах ЕМ.  $C=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ ,  $T=25^\circ\text{C}$



що сильно перекриваються, для заряджених аміногруп індолу ( $\sim 2040$ ,  $\sim 2600$  і  $\sim 2850$   $\text{cm}^{-1}$ ) [17]. Це вказує на цвіттер-іонний характер макромолекул ЕМ, який притаманний поліамфолітам. FTIR-спектр ЕМ вказує також на існування великої кількості водневих зв'язків між фенольними  $-\text{OH}$ -групами (смуга  $\nu_{\text{O-H}}$  коливань Н-зв'язаних гідроксильних груп за  $3394$   $\text{cm}^{-1}$ ) та між гідроксильними і карбонільними групами (смуга  $\nu_{\text{O-H}}$  коливань Н-зв'язаних гідроксилів за  $3155$   $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **Розчинність і стан еумеланіну у водному середовищі.**

Відомо, що меланіни розчиняються у воді тільки за  $\text{pH} \geq 10$  [14]. Досліджений нами зразок ЕМ також не розчинявся у воді, кислотах та органічних розчинниках. Однак він повністю розчинявся при підвищенні  $\text{pH}$  розчину до  $\sim 11$  і випадав у високодисперсний осад при підкисленні розчину. Тому вивчення поведінки макромолекул цього зразка ЕМ у водному розчині та його поліамфолітних властивостей було проведено методом потенціометричного титрування.

Для переведення ЕМ у розчинний стан ми спочатку титрували його дисперсію  $0,2$  н.  $\text{NaOH}$  до  $\text{pH} = 11,4$ , а потім у тій самій кюветі здійснювали обернене титрування його лужного розчину  $0,2$  н.  $\text{HCl}$  до  $\text{pH} \sim 2$ . Відповідні криві поглинання гідроксил-іонів і протонів, розраховані за даними титрування, подані на рис. 4а, б.

Крива поглинання гідроксил-іонів (рис. 4а) мала класичний  $S$ -подібний характер і досягала "насичення" за  $\text{pH} = 11$ , що свідчило про закінчення титрування основних груп ЕМ. Крива поглинання протонів (рис. 4б), яка відповідала повній кривій титрування природного поліамфоліту, містила характерну ділянку "мінімальної буферної ємності", яка чітко розділяла області титрування його кислотних та основних груп [16]. Протонування кислотних груп ЕМ повністю завершувалось за  $\text{pH} \sim 2,5$ . Існування ділянки мінімальної буферної ємності на кривій рис. 4б дало змогу розрахувати кількість кислотних і основних груп в  $1$  г ЕМ ( $4,02$  та

$4,29$  ммоль·г $^{-1}$  відповідно). Таким чином було встановлено у дослідженому зразку ЕМ невеликий надлишок ( $7\%$  моль) основних груп щодо кислотних.

Для характеристики кислотних властивостей обох типів груп ЕМ були розраховані залежності від'ємного логарифма ефективної константи дисоціації кожного типу груп ( $\text{pK}_a$ ) від ступеня їх дисоціації ( $\alpha$ ), використовуючи відповідні ділянки кривої поглинання протонів на рис. 4б і формулу [16]:

$$\text{pK}_a = \text{pH} - \lg \frac{\alpha}{1 - \alpha}.$$

Результати розрахунків показані на рис. 5. Шляхом екстраполяції початкових лінійних ділянок кривих  $\text{pK}_a = f(\alpha)$  на рис. 5а, б до  $\alpha = 0$  були знайдені величини  $\text{pK}_0$  для кислотних та основних груп ЕМ ( $4,55$  і  $9,27$  відповідно), які характеризують їхні кислотні властивості. Отримані характеристичні значення  $\text{pK}_0$  вказують на те, що кислотними групами ЕМ є безумовно карбоксильні групи фрагментів 5,6-дигідроксііндол-2-карбонової кислоти (рис. 2), в той час як основними групами ЕМ, що титруються, можуть бути не тільки вторинні аміногрупи, а й гідроксильні групи фрагментів 5,6-дигідроксііндолу та 5,6-дигідроксііндол-2-карбонової кислоти. Дійсно, як свідчать літературні дані, для багатьох низькомолекулярних і полікислот, зокрема ПАК, значення  $\text{pK}_0$  карбоксильних груп становить  $4,6$  [18]. Однак, для вторинних аміногруп індолу та спиртових груп фенолів ці значення близькі ( $9,7$  і  $9,9$  відповідно) [19, 20], тобто ці групи повинні титруватися одночасно.

Слід звернути увагу також на той факт, що крива на рис. 5а для кислотних груп (на ділянці  $\alpha > 0,5$ ) і аналогічна крива на рис. 5б для основних груп (у всій області зміни  $\alpha$ ) відображають повільне зростання величини  $\text{pK}_a$  від  $\alpha$ , тобто невеликий тангенс кута нахилу, який характеризує силу електростатичної взаємодії між сусідніми іоногенними групами [16]. Це вказує на значне віддалення іоногенних груп на ланцюзі ЕМ та його

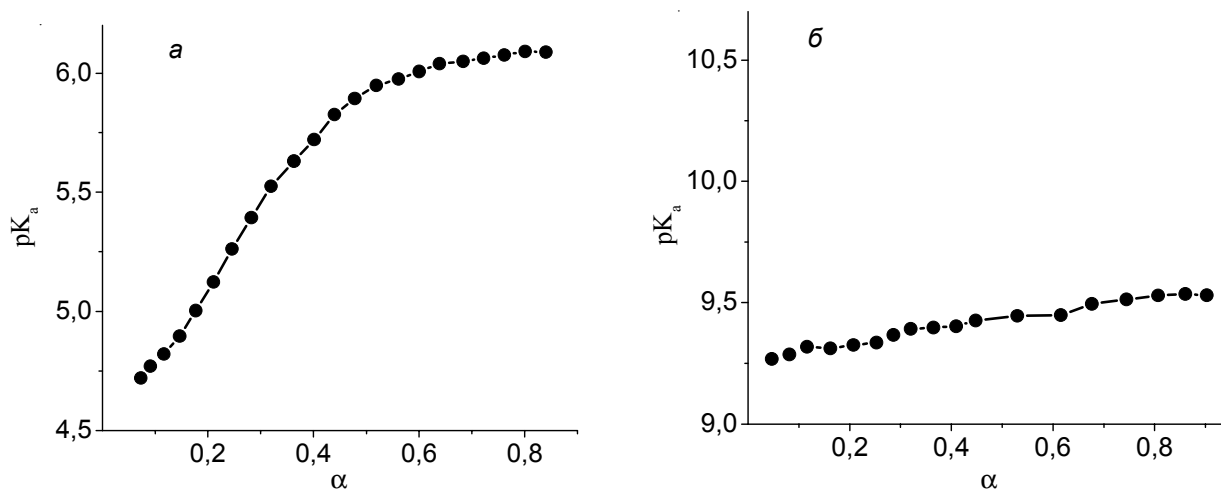


Рис. 5. Залежності від'ємного логарифма ефективної константи дисоціації кислотних (а) та основних (б) груп ЕМ від ступеня їх дисоціації

достатньо розгорнуту (набухлу) конформацію. Однак, в області  $\alpha < 0,5$  ( $pH < 6$ ) на рис. 5а спостерігається різке збільшення тангенса кута нахилу кривої  $pK_a = f(\alpha)$ , що вказує на посилення електростатичної взаємодії заряджених карбоксильних груп у цій області рН, яке зумовлене компактизацією макроклубків.

Отже, часткова розчинність ЕМ у воді тісно пов'язана з його поліамфолітними властивостями. Сильна компактизація його макромолекул у кислому середовищі, яка приводить до фазового розділення розчину в області  $pH < 6$ , може бути пояснена зменшенням кількості заряджених карбоксильних груп на ланцюгах ЕМ і збільшенням кількості водневих зв'язків між незарядженими карбоксильними та гідроксильними групами на сусідніх ланцюгах (рис. 2).

### Зв'язування еумеланіну з мицелами блок-кополімерів різної морфології.

Гомогенного змішування ЕМ з мицелами ДБК і ТБК досягали шляхом додавання невеликого об'єму (7% об.) лужного розчину ЕМ ( $pH=11$ ) до великих об'ємів (93% об.) водних розчинів блок-кополімерів за концентрації  $1 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-3}$ , яка перевищувала відповідні значення ККМ [5], за співвідношення компонентів  $\varphi=0,01$

осн-моль<sub>ЕМ</sub>/осн-моль<sub>ПАК</sub>. Як було показано нами раніше, взаємодія блоків ПАК і (МО)ПЕО в макромолекулах ДБК і ТБК з утворенням інтрамолекулярних полікомплексів (ІнтраПК) за рахунок Н-зв'язків та подальша самозбірка декількох ІнтраПК у мицелярні структури реалізується лише в області низьких значень рН, де значна частина -COOH-груп ПАК неіонізована [5,6]. Тому змішування меланіну з розчинами блок-кополімерів проводили в "кислій" області рН. Для кожного кополімеру було обрано різні значення рН, від яких залежав стан їх мицел, а саме: стан слабкого ( $pH=3,5$ ) та сильного ( $pH=3,0$ ) мицелування ДБК і ТБК. Отже, ми досліджували взаємодію молекул меланіну з мицелами кополімерів у процесі їх утворення (*in situ* інкапсуляція), або зі сформованими мицелами (*ex situ* інкапсуляція).

На рис. 6 і 7 показані електронні спектри водного розчину ЕМ, доведеного до  $pH=2,6$ , індивідуальних розчинів блок-кополімерів та їх сумішей з ЕМ за  $pH=3,5$  і  $3,0$ , які готували як описано вище і знімали через певний час після змішування компонентів. Розглянемо спочатку дані для систем ЕМ/ДБК1 (ДБК2) (рис. 6).

Як видно на наведених спектрах, в області  $\lambda > 400 \text{ нм}$

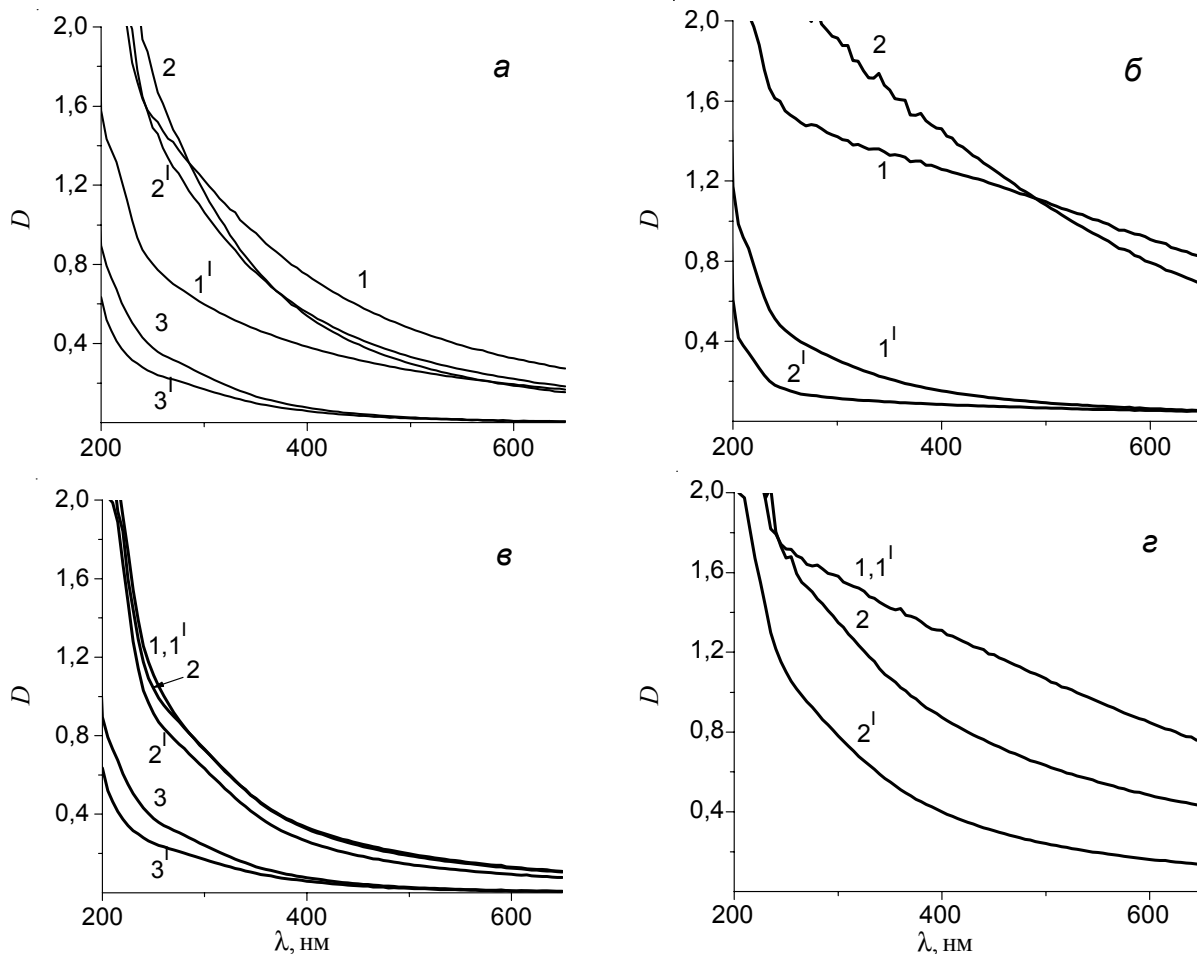


Рис. 6. Електронні спектри розчинів ДБК1 (а) і ДБК2 (в)–1, 1'; сумішей ЕМ/ДБК1 (б) і ЕМ/ДБК2 (г)–2, 2' та розчину ЕМ з  $pH=2,6-3, 3'$ , записані через 1 (1–3) і 24 год (1'–3').  $C_{\text{ДБК}}=1 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-3}$ ;  $C_{\text{ЕМ}}=1,63 \cdot 10^{-2}$  (а, б) та  $1,67 \cdot 10^{-2} \text{ кг} \cdot \text{м}^{-3}$  (в, г);  $\varphi=0,01$  осн-моль<sub>ЕМ</sub>/осн-моль<sub>ПАК</sub>;  $pH_{\text{сум}}=3,5$  (а, в) та  $3,0$  (б, г);  $T=22 \text{ }^\circ\text{C}$

Таблиця. Молекулярні параметри та позначення диблок- і триблок-кополімерів

Кополімер	$M_{n(\text{МО})\text{ПЕО}}$ , кДа	$M_{n\text{ПАК}}$ , кДа	$M_{\text{ДБК/ТБК}}^{1)}$ , кДа	$n^{2)}$
ДБК1	5,3	9,3	14,6	1,1
ДБК2	5,3	17,6	22,9	2,0
ТБК1	6,0	5,8	17,6	0,6
ТБК2	35,0	28,3	91,6	0,5

<sup>1)</sup>  $M_{n\text{ДБК}} = M_{n\text{МОПЕО}} + M_{n\text{ПАК}}$ ;  $M_{n\text{ТБК}} = M_{n\text{ПЕО}} + 2 \cdot M_{n\text{ПАК}}$  <sup>2)</sup> Співвідношення ланок у блоках ПАК і (МО)ПЕО, осн-моль/(осн-моль)<sup>-1</sup>.

відсутні смуги поглинання індивідуальних компонентів ЕМ і ДБК. Таким чином, ми вправі використати значення оптичної густини за  $\lambda=500$  нм, яка прямо пропорційна мутності відповідних розчинів [21], для характеристики зміни мутності цих систем за різних умов. Зокрема, у разі додавання ЕМ до розчинів обох зразків ДБК за рН=3,5, в яких фіксували лише початок міцелотворення блок-кополімерів (випадок *in situ* інкапсуляції), різких змін у стані міцелярних систем не відбувалось навіть через 24 год (рис. 6а, в, криві 2, 2'). Обидві суміші демонстрували лише слабку опалесценцію і залишались досить стабільними у часі. Одночасно, оптична густина у комірках з розчином чистого ЕМ за

рН=2,6 (рис. 6 а, в, криві 3, 3') та чистою міцелярною дисперсією ДБК1 (рис. 6а, криві 1, 1') дещо зменшувалась через 24 год внаслідок часткового фазового розділення систем. На відміну від цього, чиста міцелярна дисперсія ДБК2 зберігала повну стабільність у часі і за рН=3,5, і за рН=3,0 (рис. 6в, г, криві 1, 1').

Додавання ЕМ до вже добре сформованих міцелярних структур обох зразків ДБК за рН=3,0 (випадок *ex situ* інкапсуляції) викликало агрегацію міцел і подальше фазове розділення обох систем у комірках, яке розвивалось у часі і супроводжувалося різким зменшенням оптичної густини (мутності) систем через 24 год (рис. 6б, г, криві 2, 2'). Такий ефект можна пояснити

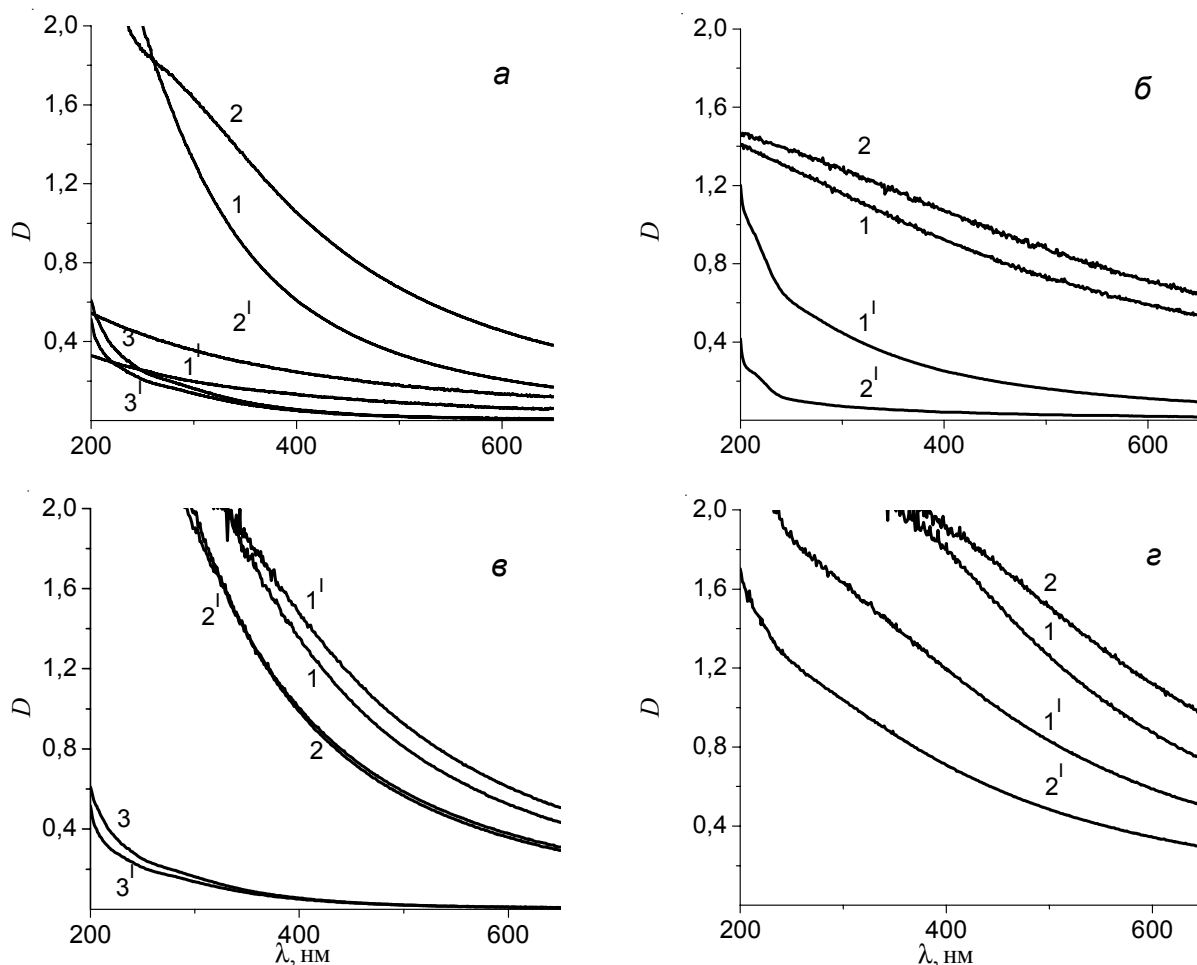


Рис. 7. Електронні спектри розчинів ТБК1 (а) і ТБК2 (б) – 1, 1'; сумішей ЕМ/ТБК1 (б) і ЕМ/ТБК2 (г) – 2, 2' та розчину ЕМ за рН=2,6–3, 3', записані через 1 (1–3) і 24 год (1'–3').  $C_{\text{ТБК}}=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ ;  $C_{\text{ЕМ}}=1,46\cdot 10^{-2}$  (а, б) та  $1,39\cdot 10^{-2} \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$  (в, г);  $\varphi=0,01$  осн-моль<sub>ЕМ</sub>/осн-моль<sub>ПАК</sub>; рН<sub>сум</sub>=3,5 (а, в) та 3,0 (б, г);  $T=22^\circ\text{C}$

взаємодією ЕМ переважно з “коронами” міцел ДБК (які були сформовані незв’язаними ланками блоків ПАК), що призводило до сильної гідрофобізації поверхні міцел і втрати їх агрегативної стабільності. Більш стабільними у часі були суміші ЕМ з “волохатими” міцелами ДБК2 (рис. 6г, криві 2, 2’), які мали більшу за розмірами корону з незв’язаних ланок ПАК (таблиця).

Ситуація після додавання ЕМ до міцелярних розчинів ТБК показана на рис. 7.

Слід одразу відзначити, що “квіткоподібні” міцели

ТБК1 і ТБК2 при додаванні ЕМ демонстрували різну поведінку. Так, міцели ТБК1 і їх композиція з ЕМ були нестабільні у часі за обох значень рН, що призводило до фазового розділення в комірках і різкого зменшення оптичної густини обох розчинів (рис. 7а, б криві 1, 1’ і 2, 2’). Навпаки, індивідуальні міцели ТБК2 показували відносну стабільність у часі за обох значень рН (рис. 7в, г криві 1, 1’), а їх композиція з ЕМ, отримана за рН=3,5, взагалі не змінювала свій стан у часі (рис. 7в, г криві 2, 2’). Проте, в тій же самій системі ЕМ/ТБК2, але

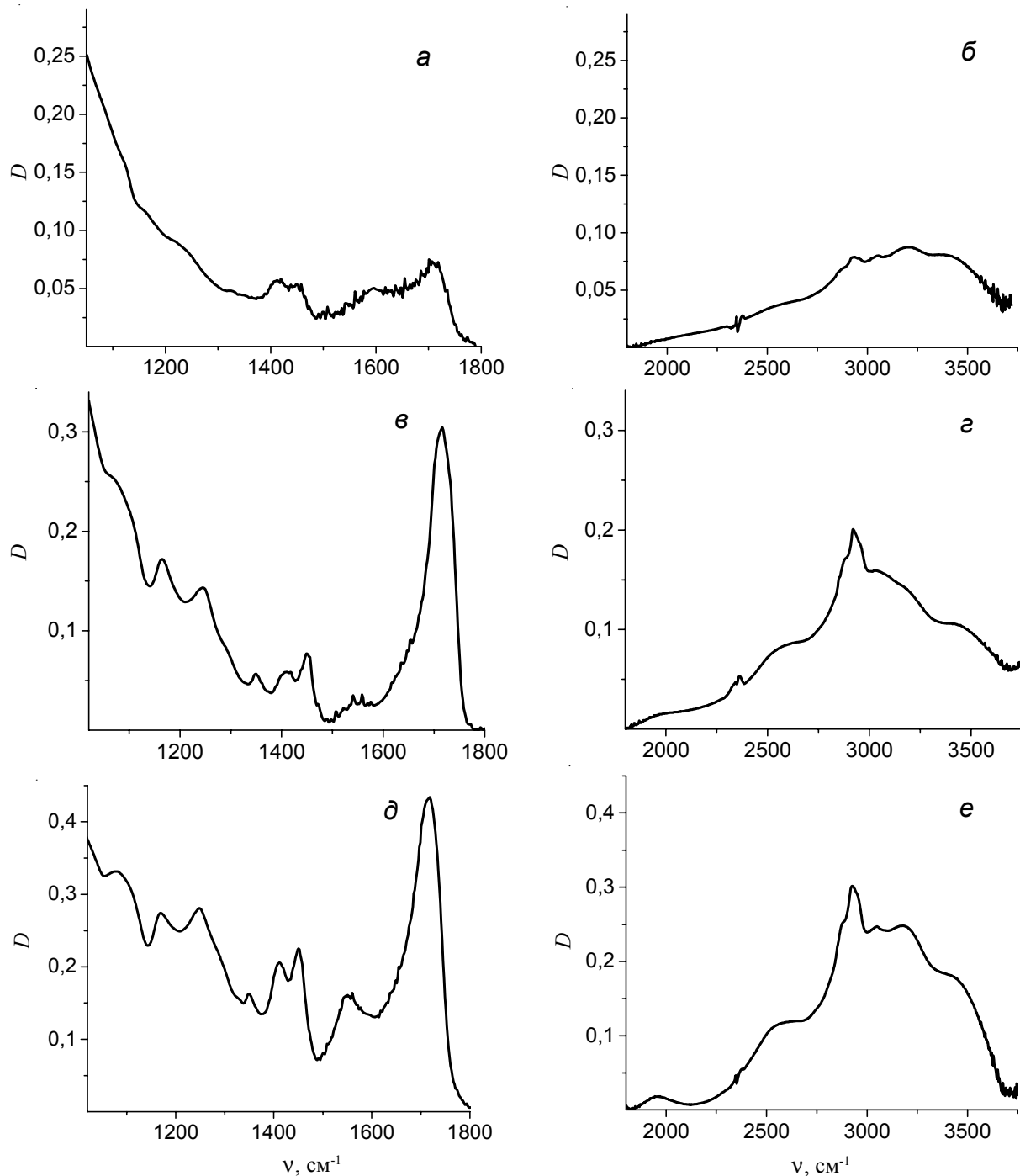


Рис. 8. FTIR спектри тонких плівок (~10 мкм) чистого ЕМ за рН=2,6 (а, б), чистого ДБК2 за рН=2,75 (в, г) та суміші ЕМ/ДБК2 за рН~3,0 (д, е).  $T=20^{\circ}\text{C}$



утвореній за  $pH=3.0$  (в режимі *ex situ* інкапсуляції), фазове розділення через 24 год відбувалось також (рис. 7з, криві 2, 2'). Отже, у випадках *ex situ* інкапсуляції ЕМ сформованими “квіткоподібними” міцелами ТБК1 і ТБК2 лікарська субстанція взаємодіяла також переважно з “петлями” міцелярної “корони”, утвореними незв'язаними ланками ПЕО [5], що знижувало розчинність і агрегативну стійкість обох міцелярних систем.

Природу взаємодії макромолекул ЕМ з міцелярними носіями досліджували за допомогою FTIR-спектроскопії на прикладі міцел ДБК2 з розвинутою “кораною” із сегментів ПАК. Зазначимо, що в цьому експерименті розчин ЕМ додавали до вже сформованих міцел за  $pH=3$  (*ex situ* інкапсуляція). На рис. 8 показані FTIR-спектри чистого ЕМ за  $pH=2,6$  (а, б), чистого ДБК2 (в, г) і суміші ЕМ/ДБК2 (д, е) в областях  $\nu_{C=O}$  (а, в, д) та  $\nu_{C-H}$ ,  $\nu_{N-H}$  і  $\nu_{O-H}$  коливань (б, г, е).

FTIR-спектр чистого ЕМ за вказаним  $pH=2,6$  містить широку інтенсивну смугу  $\nu_{C=O}$  коливань за  $\sim 1710$ – $1720$   $cm^{-1}$  (рис. 8а), яка відображала валентні коливання незаряджених  $-COOH$  груп, які утворювали Н-зв'язки, очевидно, з гідроксильними групами біфенольних фрагментів. В області  $\nu_{C=O}$  коливань ЕМ були наявні також дві характеристичні смуги  $\nu_{sC=O}$  і  $\nu_{asC=O}$  коливань карбоксилат-іонів за  $\sim 1410$  і  $\sim 1600$   $cm^{-1}$  відповідно, які зумовлені переносом протона з частини  $-COOH$ -груп на вторинні аміногрупи і утворенням у молекулах цього поліамфоліту цвіттер-іонів. Існування цвіттер-іонів підтверджували також смуги  $\nu_{N-H}$  коливань середньої інтенсивності, що сильно перекривалися:  $\sim 2040$ ,  $\sim 2600$  і  $\sim 2850$   $cm^{-1}$  (рис. 8б), які відповідали зарядженим аміногрупам індоли [17]. Фрагмент FTIR-спектра на рис. 8б свідчив також про існування в макромолекулах ЕМ великої кількості Н-зв'язків за участю гідроксильних і карбоксильних груп. На це вказували дві смуги  $\nu_{O-H}$  коливань за  $\sim 3200$  та  $\sim 3400$   $cm^{-1}$ .

У спектрі чистого ДБК2 ( $pH=2,75$ ) була наявна інтенсивна смуга  $\nu_{C=O}$  коливань незаряджених  $-COOH$ -груп блока ПАК за  $1720$   $cm^{-1}$ , які утворюють Н-зв'язки між собою за типом “циклічного” димеру, а також з блоком МОПЕО (рис. 8в) [17]. Про наявність Н-зв'язків першого типу свідчила характеристична широка смуга  $\nu_{O-H}$  коливань циклічних димерів в області  $2600$ – $2700$   $cm^{-1}$  (рис. 8г), а щодо Н-зв'язків карбоксильних груп з атомами кисню МОПЕО, то їх існування підтверджувала смуга  $\nu_{O-H}$  коливань зв'язаних гідроксилів поблизу  $3200$   $cm^{-1}$  (рис. 8г).

Аналіз FTIR-спектра суміші ЕМ/ДБК2 ( $pH\sim 3,0$ ) дав змогу помітити появу поряд з інтенсивною смугою  $\nu_{C=O}$  коливань незаряджених  $-COOH$ -груп ( $1718$   $cm^{-1}$ ), що утворюють водневі зв'язки, також смугу середньої інтенсивності за  $1540$ – $1550$   $cm^{-1}$  (рис. 8д), яку за наявності другої характеристичної смуги  $\sim 1410$   $cm^{-1}$  правомірно віднести до  $\nu_{as}$  коливань карбоксилат-іонів [17]. Разом з тим, у спектрі суміші відстань  $\Delta$  між положеннями смуг  $\nu_s$  та  $\nu_{as}$  коливань  $-COO^-$ -груп була значно

меншою, ніж у спектрі чистого ЕМ, тобто ці групи не можна було віднести до складових цвіттер-іонів. Проте, спираючись на відомий факт зміни вказаної величини  $\Delta$  для заряджених  $-COO^-$ -груп ПАК залежно від природи утвореного ними сольового зв'язку [22], можна було допустити, що такі групи утворились внаслідок дисоціації частини  $-COOH$ -груп блоків ПАК у “короні” міцел ДБК2 та їх електростатичної взаємодії з протилежно зарядженими аміногрупами індольних фрагментів ЕМ. Крім електростатичних зв'язків із сегментами ПАК у “короні” міцел ДБК2, меланін може приєднуватися також до ланцюгів ПЕО за рахунок різноманітних Н-зв'язків. Певним підтвердженням цього припущення слід вважати збільшення в спектрі суміші відносної інтенсивності смуги  $\nu_{O-H}$  коливань поблизу  $3200$   $cm^{-1}$  (рис. 8е).

Отже, за даними цих досліджень можна зробити висновок про те, що *ex situ* інкапсуляція ЕМ міцелами ДБК2 (і ДБК1) відбувається переважно в “короні” міцел за рахунок сильних електростатичних взаємодій між зарядженими аміногрупами індольних фрагментів ЕМ і зарядженими карбоксильними групами вільних сегментів ПАК. Щодо *ex situ* інкапсуляції ЕМ міцелами ТБК, то вона відбувається, очевидно, зовсім іншим чином, враховуючи альтернативну будову цих міцел. Дійсно, в “квіткоподібних” міцелах ТБК коротші бічні блоки ПАК за рахунок їх взаємодії з істотно довшим центральним блоком “сховані” в “ядрах” міцел, а стабілізаційну “корону” формують “петлі” з надлишкових (незв'язаних) ланок ПЕО. Отже, інкапсуляція ЕМ такими міцелами починається з утворення слабших водневих зв'язків між фенольними групами ЕМ та атомами кисню ПЕО. Але потім може відбуватися проникнення певної частини макромолекул ЕМ в “ядро” міцел і реалізація сильніших електростатичних взаємодій із зарядженими групами блоків ПАК. У разі здійснення цього процесу слід очікувати перебудови вихідних міцелярних структур ТБК.

Дуже цікавими в такому плані виявились результати електронно-мікроскопічних досліджень сумішей, отриманих у випадку *ex situ* інкапсуляції ЕМ міцелами ТБК2, які за раніше визначеними термодинамічними параметрами виявляли найбільшу стабільність у кислому водному середовищі [5]. Відповідні електронні мікрофотографії, отримані методом TEM за  $\phi=0,01$  осн-моль<sub>ЕМ</sub>/осн-моль<sub>ПАК</sub>, наведені на рис. 9.

Аналіз зображень на цьому рисунку дає декілька важливих висновків. По-перше, досліджений зразок ЕМ не до кінця розчиняється у воді і являє собою набір набухлих наночастинок різного розміру (рис. 9а, б). По-друге, набухлі частинки ЕМ сильно взаємодіють з поверхнею міцел ТБК2 при *ex situ* інкапсуляції і навіть проникають у внутрішню частину міцел (рис. 8з–е). У разі, якщо набухла частинка ЕМ має великий розмір і не утримується на поверхні однієї міцели, вона одночасно зв'язується з поверхнею декількох міцел (рис. 8е).

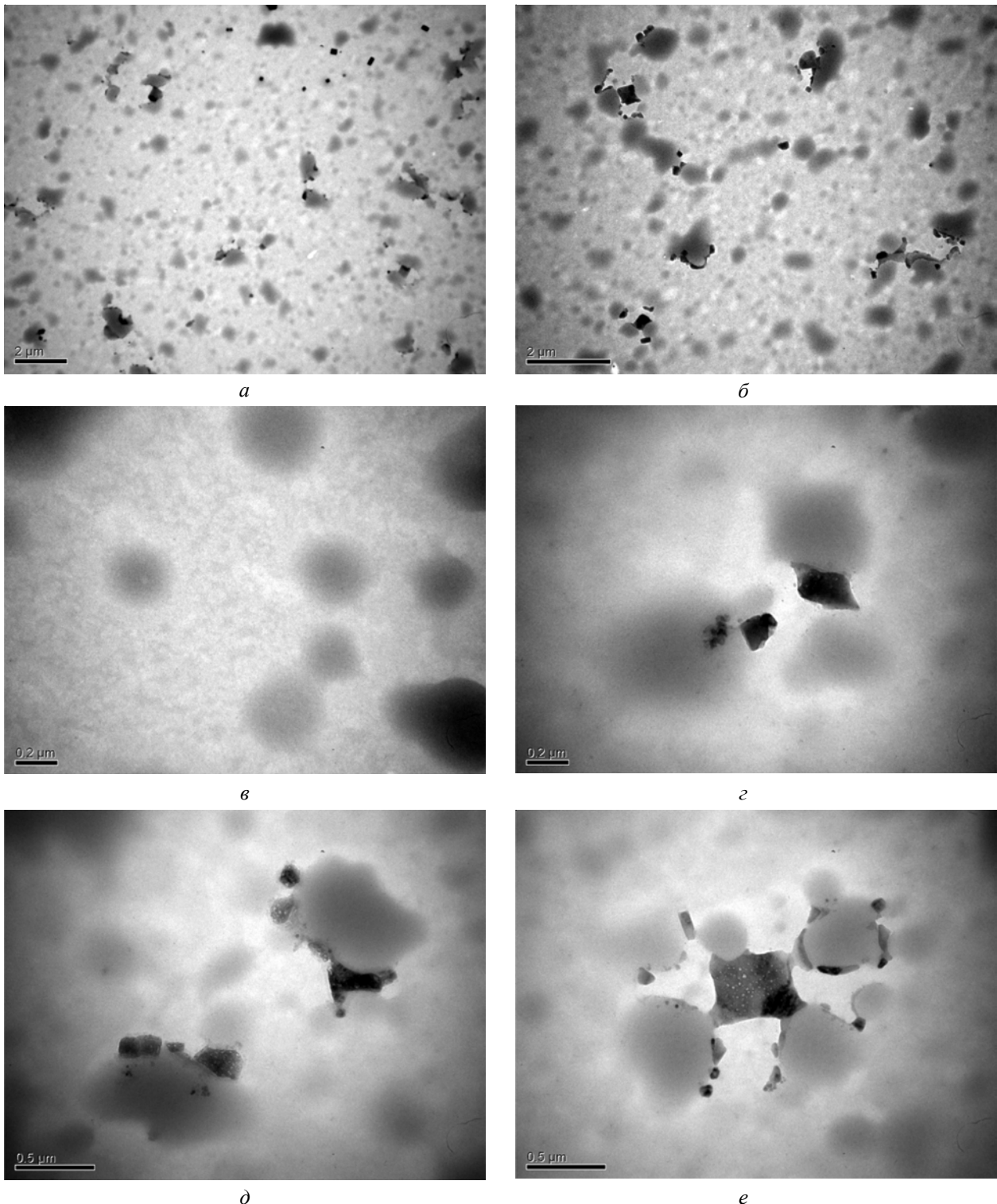


Рис. 9. Електронні мфiкрофотографiї загального вигляду системи ЕМ/ТБК2 у розчинi при малому збiльшеннi (а, б) та її окремих складових при великому збiльшеннi, а саме: вiльних мiцел ТБК2 (в) i мiцел, зв'язаних з набухлими частинками ЕМ (г-е).  $C_{\text{ТБК}}=0,5 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$ ,  $\varphi=0,01 \text{ осн-моль}_{\text{ЕМ}}/\text{осн-моль}_{\text{ПАК}}$ ,  $T=20 \text{ }^\circ\text{C}$

По-третє, досліджена мiцелярна система за вибраного спiввiдношення  $\varphi$  мiстить крiм зв'язаних частинок ЕМ також багато вiльних мiцел ТБК2 (рис. 9 а-в), тобто система не насичена щодо ЕМ. Нарештi, пiд впливом взаємодiї з ЕМ розмiр i морфологiя мiцел ТБК2 дiйсно

змiнюються. Останнiй висновок пiдтверджує порiвняння рис. 9в-е. Це означає, що такі мiцели достатньо лабiльнi i здатнi "пiдлаштовуватись" до частинок такого протиракового препарату.

Зрозумiло, що у разi проведення iнкапсуляцiї ЕМ

за *in situ* методом, тобто в процесі формування міцел блок-кополімерів, можна реалізувати найкраще “підлаштування” міцел до макромолекул/наночастинок препарату і отримати таким чином найбільш стабільні міцелярні системи, що й було зафіксовано реально на прикладі систем ЕМ/ДБК2 та ЕМ/ТБК2 (рис. 6, 7в).

#### Висновки.

Отже, розчинність у воді лікарського препарату еумеланіну, який є продуктом життєдіяльності чорних дріжджів “*Nadsoniella sp. X-1*” тісно пов’язана з його хімічною будовою і поліамфолітними властивостями. Зокрема, вона визначається складним балансом електростатичних взаємодій і водневих зв’язків у його макромолекулах/наночастинок. Сильна компактизація макромолекул/наночастинок ЕМ у воді в області  $\text{pH} < 6$  призводить до фазового розділення системи, що перешкоджає його засвоєнню при безпосередньому введенні в живий організм. Переведення вказаної лікарської субстанції у стійку розчинну форму можна досягти за рахунок *in situ* інкапсуляції ЕМ міцелями асиметричних диблок- і триблок-кополімерів різної морфології на основі хімічно комплементарних поліе-

тиленоксиду та поліакрилової кислоти, але за умови наявності достатньо розвинутої “корони” міцел, яка забезпечує високу стабільність усій міцелярній системі.

*Ex situ* інкапсуляція ЕМ “обрізними” та “волохатими” міцелями ДБК, “корону” яких складають вільні сегменти ПАК, відбувається за рахунок переважно електростатичних взаємодій між зарядженими аміногрупами лікарського препарату і поверхневими карбоксилат-іонами ПАК. Результатом цього є сильна гідрофобізація поверхні міцел і швидкий розвиток їх агрегації до фазового розділення. Аналогічний процес за участі “квіткоподібних” міцел ТБК, “корону” яких утворюють “петлі” ПЕО, ініціюється водневими зв’язками між фенольними групами ЕМ та атомами кисню ПЕО. Але потім процес зв’язування препарату може розвиватись і далі до утворення більш сильних сольових зв’язків з блоками ПАК у міцелярному “ядрі”. Разом з тим, при інкапсуляції ЕМ за методом *in situ*, тобто на початку формування міцелярних структур, слід очікувати одночасне утворення як сольових, так і водневих зв’язків препарату з міцелями.

## Література

- Zheltonozhskaya T., Partsevskaya S., Fedorchuk S., Klymchuk D., Gomza Yu., Permyakova N., Kunitzskaya L. Micellar nanocontainers based on PAAm-*b*-PEO-*b*-PAAm triblock copolymers for poorly soluble drugs. *Europ. Polym. J.*, 2013, **49**, no. 2: 405–418.
- Torchilin V.P. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**: 1532–1555.
- Mozafari M.R. Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications, The Netherlands. Springer: Dordrecht, 2007.
- Riess G. Micellization of block copolymers. *Prog. Polym. Sci.*, 2003, **28**: 1107–1170.
- Permyakova N.M., Zheltonozhskaya T.B., Ignatovskaya M.V., Maksin V.I., Iakubchak O.N., Klymchuk D.O., Poliyan M.Ya., Grishchenko L.N. Double-hydrophilic block copolymer micelles for drug delivery of poorly soluble vitamins in living organisms. *Polym. J. (Ukr.)*, 2016, **38**, no. 1: 81–90.
- Permyakova N., Zheltonozhskaya T., Revko O., Grishchenko L. Self-assembly and metalation of pH-sensitive double hydrophilic block copolymers with interacting polymer components. *Macromol. Symp.*, 2012, **317-318**, no. 1: 63–74.
- Permyakova N.M., Zheltonozhskaya T.B., Maksin V.I., Iakubchak O.N., Ignatovskaya M.V., Kaplunenko V.G. The method of encapsulation and delivery of vitamin E analogues by block copolymer micelles. *Ukrainian Patent 110262 C2*, December 10, 2015.
- Karpovsky V.V., Postoi R.V., Zheltonozhskaya T.B., Permyakova N.M., Karpovsky P.V., Trokoz A.V., Karpovsky V.I., Trokoz V.O., Landsman A.O., Danchuk O.V., Danchuk V.V., Skrypkin V.M., Efimov V.G., Maksin V.I. A method for the increasing of the intensity of the lipid metabolism in pigs. *Ukrainian Patent on the useful model 106067*, April 11, 2016.
- Schweitzer A. D., Revskaya E., Chu P., Pazo V., Friedman M., Nosanchuk J. D., Cahill S., Frases S., Casadevall A., Dadachova E. Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010, **78**, no. 5: 1494–1502.
- Costa T. G., Feldhaus M. J., Vilhena F. S., Heller M., Mücke G. A., Oliveira A. S., Brighente I. M. C., Monteiro F. B. F., Creczynski-Pasa T. B., Szpogancz B. Preparation, Characterization, Cytotoxicity and Antioxidant Activity of DOPA Melanin Modified by Amino Acids: Melanin-Like Oligomeric Aggregates. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2015, **26**, no. 2: 273–281.
- Huijser A, Pezzella A., Sundström V. Functionality of epidermal melanin pigments: current knowledge on UV-dissipative mechanisms and research perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**: 9119–9127.
- Zonios G. Dimou A. Melanin optical properties provide evidence for chemical and structural disorder *in vivo*. *Optics express*, 2008, **16**, no. 11: 8263–8268.
- Corani A., Huijser A., Iadonisi A., Pezzella A., Sundström V., d’Ischia M. Bottom-Up Approach to Eumelanin Photoprotection: Emission Dynamics in Parallel Sets of Water-Soluble 5,6-Dihydroxyindole-Based Model Systems. *J. Phys. Chem. B.*, 2012, **116**: 13151–13158.
- Chizhanska N.V. In: Investigation of the melanin antistress action mechanisms. A thesis for the scientific degree of candidate of biological sciences, Kyiv, Ukraine,



2008: 125.

15. Kondratyuk T.O., Kondratyuk S.Y., Morgaienko O.O., Khimich M.V., Bereгова T.V., Ostapchenko L.I.. *Pseudonadsoniella brunnea* (Meripilaceae, Agaricomycotina), a new brown yeast-like fungus producing melanin from the Antarctic; with notes on nomenclature and type confusion of *Nadsoniella nigra*. Acta Botanica Hungarica, 2015, **57**, no. 3–4: 291–320.

16. Zheltonozhskaya T, Pop G, Eremenko B, Uskov I. Study of properties and conformations in solution of copolymer of styrene with N,N-diethylaminopropylmonoamide of maleic acid. Polymer science (in Russian), 1981, **23**, no. 11: 2425–2435.

17. Pretsch E., Bullman F., Affolter C.. Structure determination of organic compounds. Tables of spectra data. Moscow: Mir, 2006: 438.

18. Wisniewska M, Urban T, Grzadka E, Zarko VI, Gun'ko VM. Comparison of adsorption affinity of polyacrylic acid for surfaces of mixed silica–alumina. Colloid Polym Sci., 2014, **292**, no. 3: 699–705.

19. Perez G. V., Perez A. L. Organic Acids without a Carboxylic Acid Functional Group. Journal of Chemical Education, 2000, **77**, no. 7: 910–915.

20. Corani A., Pezzella A., Pascher T., Gustavsson T., Markovitsi D., Huijser A., d'Ischia M., Sundstrom V. Excited-State Proton-Transfer Processes of DHICA Resolved: From Sub-Picoseconds to Nanoseconds. J. Phys. Chem. Lett., 2013, **4**: 1383–1388.

21. Eskin V.E. Light scattering by polymer solutions, Moscow: Nauka, 1973: 350.

22. Nakamoto K., Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Moscow: Mir, 1991: 536.

Надійшла до редакції 17 травня 2018 р.

## Самоорганізуючі наноносії для доставки меланіну

Н.М. Пермякова<sup>1</sup>, Т.Б. Желтоножська<sup>1</sup>, Т.В. Берегова<sup>2</sup>, Д.О. Климчук<sup>3</sup>, Т.М. Фалалеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, хімічний факультет, кафедра високомолекулярних сполучень

60, ул. Владимирская, Киев, 01033, Украина; permyakova@ukr.net

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, УНЦ “Інститут біології і медицини”

2, пр. Глушкова, Киев, 03187, Украина

<sup>3</sup>Інститут Ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України

2, ул. Терещенковская, Киев, 01601, Украина

*Мицелли асимметричных блок-сополимеров на основе полиэтиленоксида и полиакриловой кислоты были использованы для инкапсуляции противоракового препарата эумеланина, который является продуктом жизнедеятельности черных дрожжей “Nadsoniella nigra sp. X-1”. Методами <sup>1</sup>H ЯМР- и FTIR-спектроскопии, а также потенциометрического титрования проведено детальное изучение химической структуры, растворимости в воде, электрохимических и абсорбционных свойств данного образца эумеланина. Показано цвиттер-ионный характер его макромолекул, определены значения pK<sub>a</sub> для кислотных и основных групп. Установлена сильная компактизация его макромолекул в области pH < 6, которая сопровождается фазовым разделением системы. Методами электронной и FTIR-спектроскопии исследовано инкапсуляцию данного образца эумеланина мицеллами блок-сополимеров и стабильность образованных мицеллярных композиций в зависимости от морфологии и размера носителей, а также способа проведения инкапсуляции (ex situ или in situ). Раскрыта природа взаимодействий макромолекул эумеланина с мицеллами блок-сополимеров различного строения. Методом ТЭМ установлено реальное состояние мицеллярной системы с инкапсулированным эумеланином; показана возможность его одновременного взаимодействия с поверхностью нескольких мицелл, что приводит к изменению размера и морфологии последних.*

**Ключевые слова:** блок-сополимер, мицелла, эумеланин, цвиттер-ион, инкапсуляция.

## Self-assembly nanocarriers for melanin delivery

*N.M. Permyakova<sup>1</sup>, T.B. Zheltonozhskaya<sup>1</sup>, T.V. Beregova<sup>2</sup>, D.O. Klymchuk<sup>3</sup>, T. M. Falalyeyeva<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Faculty of Chemistry, Department of Macromolecular Chemistry 60, Vladimirskaya str., Kyiv, 01033, Ukraine, permyakova@ukr.net

<sup>2</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology" 2, Glushkova av, Kyiv, 03187, Ukraine

<sup>3</sup>M.G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine 2, Tereshchenkivskaya str., Kyiv, 01601, Ukraine

*Micelles of asymmetric block copolymers based on poly(ethylene oxide) and poly(acrylic acid) have been used for encapsulation of the anticancer drug eumelanin, which is the vital activity product of black yeast "Nadsoniella nigra sp. X-1. The detailed study of the chemical structure, solubility in water, electrochemical and absorption properties of this eumelanin sample was carried out using <sup>1</sup>H NMR and FTIR spectroscopy and potentiometric titration. It is revealed the zwitter-ionic character of eumelanin macromolecules due to a presence the charged >NH<sub>2</sub><sup>+</sup> and -COO<sup>-</sup> groups in a solid EMel sample. So some excess (in 7 mol %) of secondary amine groups against carboxylic ones was determined. Acidic properties of both the groups were characterized. The values of pK<sub>0</sub> were equaled to 4.44 and 9.27 for carboxylic and amine groups consequently. A strong compactization of eumelanin macromolecules in the pH>6 region, which is accompanied by a phase separation of the system, was established. Thus, it was shown that the state and solubility of melanin in aqueous medium is determined by a complex balance of electrostatic interactions and hydrogen bonds. The eumelanin encapsulation into micellar nanocarriers and a state of the obtained drug/micelle systems, depending on the morphology and the size of nanocarriers, and also the method of encapsulation (ex situ or in situ) were studied by UV-Vis and FTIR spectroscopy. It was shown the essential influence a state of micellar systems, parameters of micellization process, sizes and morphology of micelles, nature and length of micellar "coronas" for eumelanin connection. The actual state of the micellar system with encapsulated eumelanin was established by TEM. It was revealed that eumelanin could simultaneous interact with the surface of several micelles, which leads to changes in their size and morphology.*

**Key words:** block copolymer, micelle, eumelanin, zwitter-ion, encapsulation.