

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПРИВОЛЖСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Дубовская Наталья Александровна

**РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРНОГО ПРОИЗВОДНОГО 5-ФТОРУРАЦИЛА
НА ОСНОВЕ ПОЛИАНИОНА
С СОБСТВЕННОЙ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент

Жукова Ольга Вячеславовна

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Хохлов Александр Леонидович

Нижний Новгород – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: РОЛЬ ХИМИОТЕРАПИИ И ПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1. Особенности противоопухолевой терапии	16
1.2. 5-фторурацил: механизм действия и роль в терапии.....	18
1.3. Системы доставки противоопухолевых лекарственных средств	21
1.3.1. Особенности строения опухолевых сосудов и микроокружения опухоли....	21
1.3.2. Полимерные носители в онкотерапии.....	24
1.3.3. Классификация и применение полимерных систем	35
1.4. Различные системы доставки на основе 5-фторурацила	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1. Методология исследования	43
2.2. Объекты исследования и используемое оборудование	45
2.3. Физико-химические методы исследования	47
2.4. Фармакологические методы исследования.....	70
2.5. Математико-статистические методы исследования.....	81
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	86
3.1. Физико-химическая характеристика полиметакриловой кислоты.....	86
3.1.1. Исследование полиметакриловой кислоты на наличие остаточного мономера и остаточных растворителей.....	86
3.1.1.1. Валидация методики количественного определения остаточной метакриловой кислоты методом газовой хроматографии	86
3.1.1.2. Количественное определение остаточной метакриловой кислоты в образце полиметакриловой кислоты	94

3.1.1.3. Валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии	96
3.1.1.4. Количественное определение остаточных органических растворителей в образце полиметакриловой кислоты	117
3.1.2. Оценка острой токсичности полиметакриловой кислоты	119
3.1.3. Оценка собственной иммуностимулирующей активности полиметакриловой кислоты	123
3.2. Получение и оценка физико-химических свойств полимерного комплекса 5-фторурацила.....	127
3.2.1. Исследование стабильности полимерного комплекса 5-фторурацила	139
3.2.2. Валидация методики количественного определения 5-фторурацила в составе полимерного комплекса методом УФ-спектроскопии в разных средах.....	140
3.3. Фармакокинетический профиль и биораспределение полимерного комплекса 5-фторурацила.....	155
3.3.1. Оценка острой токсичности полимерного комплекса 5-фторурацила	155
3.3.2. Валидация ВЭЖХ-определения 5-фторурацила в составе полимерного комплекса в плазме крови лабораторных животных	156
3.4. Анализ эффективности и иммуностимулирующего действия полимерного комплекса 5-фторурацила в противоопухолевой терапии.....	168
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	171
4.1. Полиметакриловая кислота как биосовместимый носитель с собственной иммуностимулирующей активностью	171
4.2. Физико-химические основы синтеза полимерного комплекса 5-фторурацила.....	178
4.3. Острая токсичность полимерного комплекса 5-фторурацила	180

4.4. Влияние полимерного комплекса на фармакокинетику и биораспределение 5-фторурацила	180
4.5. Синергизм прямого цитотоксического и иммуномодулирующего действия полимерного комплекса 5-фторурацила.....	182
4.6. Общая концепция и перспективы разработки	185
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	190
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	192
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	195
Приложение А.....	235
Приложение Б	237
Приложение В.....	239
Приложение Г	240
Приложение Д.....	241
Приложение Е	242
Приложение Ж.....	243
Приложение И.....	244
Приложение К.....	245
Приложение Л.....	247

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время отмечается устойчивый рост заболеваемости злокачественными новообразованиями, что обуславливает необходимость поиска новых стратегий повышения эффективности фармакотерапии. Несмотря на значительный арсенал химиотерапевтических агентов, их применение зачастую сопровождается ограниченной терапевтической эффективностью и выраженными побочными эффектами, связанными с низкой селективностью действия.

Основные недостатки классических химиотерапевтических препаратов включают: неспецифичность фармакологического действия, приводящую к повреждению пролиферирующих клеток здоровых тканей (костного мозга, эпителия желудочно-кишечного тракта, волосяных фолликулов); высокую системную токсичность, проявляющуюся миелосупрессией, нефро- и гепатотоксичностью, нейропатией; быструю элиминацию, требующую частого введения высоких доз лекарственных препаратов; развитие резистентности опухолевых клеток вследствие активации механизмов детоксикации и репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Одним из направлений преодоления данных ограничений является разработка систем направленной доставки лекарственных средств (ЛС) на основе полимерных носителей. Данные системы обладают рядом преимуществ, к которым относятся: контролируемое высвобождение активного вещества, пролонгированное действие, снижение системной токсичности, улучшение или сохранение растворимости ЛС.

Благодаря высоким значениям молекулярной массы полимеры изменяют фармакокинетику ЛС, увеличивая время циркулирования и улучшая процесс захвата (эндоцитоза) ЛС опухолевыми клетками.

Известно, что первичные и метастатические опухоли имеют прерывистую систему сосудов, что и определяет повышенный уровень поглощения

в опухолевых тканях ЛС на полимерном носителе (увеличение специфичности действия) [168; 172].

Особый интерес среди полимерных носителей вызывают полианионы – соединения, обладающие уникальными физико-химическими свойствами, которые делают их востребованными в различных областях науки. К одному из таких полимеров относится полиметакриловая кислота (ПМАК). По своей химической структуре ПМАК принадлежит к классу карбоцепных синтетических полимеров [33], макромолекулярная цепь которых построена исключительно из атомов углерода. В отличие от гетероцепных полимеров (например, полиэфиров или полиамидов), содержащих в основной цепи лабильные связи, карбоцепные полимеры с С–С-скелетом характеризуются фундаментальной устойчивостью к ферментативному гидролизу и не относятся к классу биоразлагаемых материалов [107]. Экспериментально доказано, что сополимеры на основе метакриловой кислоты в условиях *in vivo* обладают исключительной стабильностью и выводятся из организма главным образом через почки, причем ключевым параметром, определяющим скорость элиминации, является молекулярная масса [64]. Это подтверждает небiodeградируемую природу ПМАК и обосновывает ее потенциал в качестве основы для систем направленной доставки лекарственных средств.

Данный полимер характеризуется наличием повторяющихся метакрилатных звеньев, соединенных ковалентными связями, что формирует линейную макромолекулу с выраженными анионными свойствами, обусловленными карбоксильными группами. Анионная природа ПМАК обуславливает ее способность к образованию комплексов, что находит применение в разработке систем доставки. Кроме того, ПМАК обладает собственным фармакологическим действием: еще в 1960-х гг. было выяснено, что она проявляет противовирусную активность и стимулирует выработку интерферона [91; 92], который играет важную роль в противоопухолевом иммунитете.

Способность полимеров активировать иммунную систему особенно важна в онкологии. Известно, что синтетические полиэлектролиты, в том числе полианионы, обладают адъювантным действием – при введении в организм вместе с

антигенами они усиливают иммунный ответ, что лежит в основе разработки вакцин [8; 9; 21]. Хотя классическое применение полимерных адъювантов связано с вакцинацией против инфекций, этот же принцип может быть распространен и на противоопухолевый иммунитет. В современной иммунотерапии полимер рассматривается не просто как пассивный носитель, а как активное звено, самостоятельно инициирующее каскад иммунных реакций. Такая активность характерна как для полианионов, так и поликатионов, которые способны модулировать работу иммунной системы без дополнительных антигенов.

Ключевую роль в противоопухолевом иммунитете играют макрофаги – клетки врожденной иммунной системы, обладающие способностью непосредственно уничтожать опухолевые клетки и координировать адаптивный иммунный ответ [166; 296]. Их функциональная поляризация во многом определяет баланс между противоопухолевой защитой и иммуносупрессией [166; 181]. Одним из ключевых внутриклеточных процессов, регулирующих функциональную активность макрофагов, является аутофагия. Современными исследованиями установлено, что индукция аутофагии в макрофагах напрямую способствует их переходу в противоопухолевый M1-фенотип, усиливая экспрессию провоспалительных цитокинов и запуская уничтожение опухолевых клеток [185].

Интересно, что для полимеров на основе метакриловой кислоты (структурного аналога ПМАК) экспериментально подтверждена способность индуцировать аутофагию в раковых клетках [63], что указывает на их потенциал как внешнего триггера этого процесса. Более того, полианионы, к которым относится ПМАК, известны своей способностью напрямую активировать макрофаги, проявляя противоопухолевую активность [221].

Таким образом, ПМАК может выступать в роли внешнего стимула, который через активацию макрофагального звена и возможную индукцию аутофагии запускает иммунный ответ, направленный против собственных опухолевых клеток организма. Несмотря на эти многообещающие свойства, дальнейшее изучение ПМАК в качестве системного полимерного носителя длительное время было ограничено из-за невозможности синтеза образцов с контролируемой

молекулярной массой, позволяющей преодолевать почечный порог фильтрации и обеспечивать предсказуемую элиминацию из организма.

Повышение эффективности противоопухолевой терапии, расширение терапевтического диапазона лекарственных препаратов, модификация фармакокинетики, снижение токсичности, преодоление лекарственной устойчивости, стимуляция иммунитета опухоленосителя, а также создание лекарственных форм на основе полимерных носителей и валидация методик их контроля являются актуальными задачами современной науки.

Степень разработанности темы исследования. Исторической основой для создания направленных систем доставки стала модель полимер-лекарственных конъюгатов, предложенная Гельмутом Рингсдорфом в 1975 году. Данная модель предполагала ковалентное присоединение биологически активного вещества к полимерному носителю для контроля его высвобождения и распределения в организме [237].

Дальнейшее развитие этой концепции показало, что полимерные носители не являются инертными, а сами способны проявлять фармакологическую активность. Значительный вклад в систематизацию знаний о фармакологически активных полимерах внес академик Н. А. Платэ. В его работах фармакологическая активность полимеров рассматривается в зависимости от заряда; выделяют полимеры: полианионы, поликатионы и нейтральные гидрофильные полимеры. Было установлено, что каждая группа обладает уникальными фармакологическими свойствами [24].

Исследования в области иммуномодулирующих свойств полианионов были углублены в работах Р. В. Петрова и Р. М. Хаитова, которые обнаружили способность этих полимеров усиливать иммунный ответ, выступая в роли адъювантов, что открыло новые перспективы для их применения в разработке вакцин [20].

Качественно новый этап в развитии полимерной фармакологии связан с работами академика А. В. Кабанова. Ключевым достижением стало обоснование роли полимеров как активных модуляторов биологических процессов, способных влиять на функции клеток и преодолевать физиологические барьеры [156; 157].

На этом фоне ПМАК представляет собой перспективный полианионный полимер для создания систем доставки противоопухолевых препаратов. Особый интерес вызывают собственные фармакологические свойства ПМАК. Еще в 1968 году группа ученых под руководством Р. De Somer впервые продемонстрировала выраженную противовирусную активность ПМАК [89; 91; 92]. Современные исследования подтверждают ее мощные иммуномодулирующие эффекты: способность активировать макрофаги [158], усиливать продукцию интерферона и модулировать цитокиновый профиль [310].

5-ФУ является низкомолекулярным ЛС, широко используемым в терапии опухолевых заболеваний на протяжении последних 50 лет. В последние годы различными коллективами разрабатываются формы контролируемой доставки 5-ФУ [81; 122; 149; 277] для повышения специфичности действия.

Особую актуальность при разработке новых систем доставки приобретает валидация аналитических и биоаналитических процедур для обеспечения воспроизводимости, достоверности и объективности получаемых экспериментальных данных, что является особенно важным для оценки качества сложных полимерных систем.

Настоящее исследование направлено на разработку и оценку качества полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК с последующим анализом его фармакокинетических параметров, токсичности и противоопухолевой активности *in vivo*. Разработка полимерного носителя на основе ПМАК с собственной иммуностимулирующей активностью и получение на ее основе комплекса с 5-ФУ, позволяющего модифицировать фармакокинетику и биораспределение, снизить токсичность стандартного химиопрепарата при сохранении (или незначительном снижении) прямого противоопухолевого эффекта, является актуальной задачей для создания пролонгированных и менее токсичных форм терапии.

Цель исследования – разработать систему доставки противоопухолевого лекарственного средства 5-фторурацила (5-ФУ) на основе анионноактивной полиметакриловой кислоты с собственной иммуностимулирующей активностью.

Задачи исследования:

1. Оценить собственное иммуностимулирующее действие ПМАК *in vivo* при развитии опухолевого процесса.
2. Получить и охарактеризовать водорастворимый полимерный комплекс 5-ФУ на основе ПМАК, определить оптимальные условия его получения (влияние pH среды) и изучить его физико-химические свойства (стабильность, pH-зависимое высвобождение).
3. Сравнить фармакокинетический профиль и биораспределение 5-ФУ и его полимерного комплекса на основе ПМАК в условиях опухолевого процесса *in vivo*.
4. Оценить противоопухолевую эффективность полимерного комплекса 5-ФУ *in vivo*.

Научная новизна. Впервые установлено и охарактеризовано собственное иммуностимулирующее действие ПМАК ($M_n \cdot 10^3 = 31,8$ кДа; $M_w \cdot 10^3 = 37,3$ кДа; $\bar{D} = 1,17$; $n \sim 365$) на модели опухолевого процесса *in vivo*. Показано, что ПМАК способствует усилению противоопухолевого иммунного ответа. Это было подтверждено в эксперименте, в котором ПМАК вводили на ранней стадии онкогенеза (до формирования опухолевого узла). Торможение роста опухоли составило 77–79 %, что является новым доказательством противоопухолевой активности этого полимера.

Получен новый водорастворимый полимерный комплекс 5-ФУ на основе ПМАК, содержащий 10 мол.% 5-ФУ (степень включения 5-ФУ – 59,90 %). Выявлено, что высвобождение 5-ФУ из полученного комплекса в кислой среде (при pH 5,1) на 15,92 % выше, чем в слабощелочной (при pH 7,4). Впервые разработана и валидирована методика количественного определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса методом УФ-спектроскопии в трёх различных средах – воде очищенной, фосфатном буферном растворе с pH 7,4 и цитратном буферном растворе с pH 5,1 – по показателям специфичности, линейности, правильности и прецизионности, что обеспечивает надёжный контроль качества разработанной системы доставки.

Впервые проведён сравнительный анализ фармакокинетического профиля и биораспределения полимерного комплекса 5-ФУ и свободного 5-ФУ. Доказано, что разработанный комплекс демонстрирует принципиально иную кинетику по сравнению с низкомолекулярным препаратом, характеризующуюся увеличением периода полувыведения в 5,10 раза, снижением клиренса в 5,12 раза, что свидетельствует о пролонгирующем действии. Для проведения этих исследований впервые валидирована биоаналитическая ВЭЖХ-методика количественного определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса в плазме крови лабораторных животных по показателям селективности, линейности, правильности, прецизионности и оценке влияния переноса.

Наконец, впервые в эксперименте *in vivo* на модели холангиоцеллюлярной карциномы РС-1 доказана противоопухолевая эффективность разработанного полимерного комплекса 5-ФУ, проявляющаяся в статистически значимом ($p < 0,05$; критерий Манна – Уитни) уменьшении объёма опухоли на 35,3 % по сравнению с группой контроля.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов комплексообразования поликислот с низкомолекулярными ЛС и расширяют знания об иммунофармакологической активности синтетических полиэлектролитов. Полученные данные углубляют представления о фармакокинетике и биораспределении макромолекулярных комплексов, демонстрируя различия в поведении низкомолекулярного ЛС и его полимерного комплекса в организме.

Разработанная методика получения полимерного комплекса 5-ФУ, а также валидированные методики контроля качества могут стать основой создания полимерных систем доставки в отношении других низкомолекулярных противоопухолевых ЛС. Созданная в работе методологическая база, включающая протоколы экспериментов, методики пробоподготовки и валидированные аналитические и биоаналитические методики, может быть использована в качестве основы для проведения доклинических исследований других систем доставки на основе 5-ФУ.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс: методика синтеза и анализа полимерных комплексов на основе полиметакриловой кислоты используется при проведении практических занятий со студентами химического факультета на кафедре высокомолекулярных соединений и коллоидной химии Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского, а также применяется в научно-исследовательской и учебной работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России при подготовке студентов III–IV курсов фармацевтического факультета, что подтверждено соответствующими актами внедрения (Приложение А).

Методология и методы исследования. Методология настоящего исследования была основана на системном подходе, направленном на комплексную разработку, изучение и доклиническую оценку нового полимерного комплекса противоопухолевого ЛС – 5-ФУ. Все работы проводились в соответствии с дизайном исследования. В процессе разработки системы доставки можно выделить пять этапов: информационно-поисковый; исследование токсических и иммуностимулирующих свойств ПМАК; получение и оценка полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК; исследование фармакокинетики и биораспределения полимерного комплекса; оценка влияния ПМАК, полимерного комплекса 5-ФУ на развитие опухолевого процесса *in vivo*.

На первом, информационно-поисковом этапе, был проведен всесторонний анализ научной литературы, патентных источников и нормативной документации с использованием современных информационно-поисковых систем, включая PubMed, Scopus, Web of Science, eLIBRARY и Патентный фонд РФ.

В рамках второго блока была проведена оценка острой токсичности используемого полимера, которая показала его безопасность. Параллельно изучались иммуностимулирующие свойства ПМАК методом иммуноферментного анализа (ИФА).

На третьем этапе был осуществлен жидкофазный синтез полимерного комплекса и определение характеристик полученного продукта с использованием

физико-химических методов анализа [ультрафиолетовая (УФ) – и инфракрасная (ИК) – спектроскопия, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)] для характеристики полученного соединения. Важной составляющей методологии работы явилась разработка и валидация методики количественного определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса методом УФ-спектроскопии в трех различных средах (вода очищенная, фосфатный буферный раствор с pH 7,4, цитратный буферный раствор с pH 5,1) по показателям специфичности, линейности, правильности и прецизионности. Показано, что методика является линейной в диапазоне концентраций 0,0016–0,0167 мг/мл ($R^2 \geq 0,9997$), правильность составляет 98,48–99,23 %, RSD не превышает 1,45 %. Разработанная методика пригодна для количественного анализа 5-ФУ в составе комплекса как при исследовании стабильности, так и при изучении кинетики высвобождения.

На четвертом этапе разработанный полимерный комплекс 5-ФУ был оценен в биологическом эксперименте сравнительного исследования фармакокинетики и биораспределения, в качестве референтного препарата использовался коммерческий лекарственный препарат (ЛП) – Фторурацил-ЛЭНС (раствор для внутрисосудистого введения, 50 мг/мл, № 10; производитель: Верофарм ООО (Россия). Для биоаналитических исследований валидирована ВЭЖХ-методика количественного определения 5-ФУ в плазме крови и органах лабораторных животных в соответствии с руководством ICH M10 и Решением Совета ЕЭК № 85. Методика признана валидной по показателям селективности (отсутствие мешающих пиков), линейности (диапазон 0,0030–0,0500 мкг/мл, $R^2 > 0,999$), правильности (отклонение от номинала не более ± 15 %), прецизионности ($RSD < 15$ %) и оценке влияния переноса.

Завершающий пятый этап включал сравнительный анализ влияния самостоятельно ПМАК и полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК на показатели опухоли (биологический эксперимент), что позволило охарактеризовать противоопухолевую активность разработанного полимерного комплекса 5-ФУ.

Математико-статистическая обработка результатов проводилась с использованием современных программных средств (Microsoft Office Excel, IBM SPSS Statistics 27.0.1) с применением параметрических (например, t-критерий Стьюдента) и непараметрических критериев (например, Манна – Уитни), что обеспечило достоверность и воспроизводимость полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Используемый в работе образец ПМАК является малотоксичным соединением ($LD_{50} > 1500$ мг/кг) и обладает собственной иммуностимулирующей активностью, что подтверждено в эксперименте на ранней стадии онкогенеза: введение полимера приводило к торможению роста опухоли на 77–79 %. Высокий профиль безопасности и биосовместимость в сочетании с иммуномодулирующими свойствами обосновывают применение ПМАК в качестве активного компонента терапевтических систем на основе полимерных носителей.

2. Разработан и охарактеризован по физико-химическим свойствам новый малотоксичный полимерный комплекс 5-ФУ на основе ПМАК ($LD_{50} > 1500$ мг/кг), который демонстрирует улучшенные физико-химические характеристики – контролируемое высвобождение активного вещества в зависимости от pH среды – по сравнению со свободным химиотерапевтическим агентом.

3. Результаты фармакокинетики и биораспределения разработанного полимерного комплекса 5-ФУ показали его способность к увеличению времени циркулирования в системном кровотоке ($T_{1/2}$ увеличился в 5,10 раза, AUC – в 5,12 раза).

4. Разработанный полимерный комплекс 5-ФУ на основе ПМАК оказывает противоопухолевое действие *in vivo*, подтверждённое статистически значимым ($p < 0,05$; критерий Манна – Уитни) уменьшением объёма опухоли на 35,3 % и снижением массовых коэффициентов опухоли в 2,4 раза по сравнению с группой контроля.

Достоверность научных положений и выводов. Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне и соответствует актуальным требованиям к исследованиям в данной области. Для решения

поставленных задач применены актуальные аналитические методы (газовая хроматография – ГХ, ЯМР, спектроскопия в УФ- и ИК-диапазонах, ВЭЖХ). Всё используемое оборудование внесено в государственный реестр средств измерений и имеет действующие сертификаты поверки, что обеспечило достоверность экспериментальных данных. Обработка экспериментальных данных проведена с применением современных методов и программных средств (Microsoft Office Excel, IBM SPSS Statistics 27.0.1) математической статистики, что обеспечило высокую точность и воспроизводимость. Научные положения, выводы и рекомендации, представленные в работе, обоснованы, логически вытекают из полученных данных и подтверждены статистической значимостью результатов, апробацией на конференциях и наличием публикаций.

Апробация результатов исследования. Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием VolgaMedScience (Нижний Новгород, 2022); Sechenov International Biomedical Summit (Москва, 2022); Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2023, 2024).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, и 2 статьи в изданиях, включённых в международные базы Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвящённой методам и объектам исследования, главы собственных исследований, главы обсуждения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 248 страницах машинописного текста, содержит 76 таблиц и 70 рисунков. Список литературы включает 313 работ, из них 39 – отечественных и 274 – иностранных.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: РОЛЬ ХИМИОТЕРАПИИ И ПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Особенности противоопухолевой терапии

В 2024 году в Российской Федерации было впервые зарегистрировано 698 693 новых случая злокачественных новообразований. Прирост этого показателя по сравнению с 2023 годом составил 3,6 % [32].

Онкология – это общее название для группы заболеваний, характеризующихся аномальным клеточным ростом [71; 312].

В процессе митоза нормальные клетки демонстрируют зависимый рост, требующий наличия внешних факторов роста (ограничение или прекращение поступления этих сигналов приводит к ингибированию клеточного деления), характеризуются контактным торможением роста (при достижении определённого порога плотности популяции деление клеток прекращается), а также ограниченным жизненным циклом (клетка делится примерно 50 раз, после чего подвергается апоптозу, заменяясь новой клеткой). В отличие от нормальных клеток, опухолевые клетки обладают способностью к автономному росту, независимо от внешних факторов, лишены контактного торможения, что способствует неконтролируемому росту и формированию опухолевых масс, а также обладают высокой активностью фермента теломеразы, который обеспечивает бесконечные циклы деления [12; 15; 61; 291].

Процесс опухолеобразования включает несколько этапов. На первой стадии происходит неконтролируемое деление клеток, приводящее к гиперплазии. Затем следует дисплазия, характеризующаяся аномальным ростом клеток. На следующем этапе атипичные клетки начинают локально распространяться, теряя свои функциональные свойства, что называется анаплазией. Опухоль на этой стадии остаётся доброкачественной и не является инвазивной [40]. Опухолевый

процесс обычно характеризуется последовательным развитием, начиная с относительно медленно прогрессирующих доброкачественных новообразований и заканчивая метастатическими поражениями в отдаленных органах. В ходе этого процесса наблюдаются различные стадии: от неваккуляризованных узелков до ваккуляризованных опухолей, от первичных новообразований с быстрым ростом до опухолей, инфильтрирующих окружающие ткани [2; 16; 172; 190; 284]. Последняя стадия этого процесса характеризует злокачественные опухоли, которые трудно поддаются лечению. Именно проникновение в ближние или отдаленные ткани, что соответствует состоянию метастазирования, в конечном итоге приводит к смерти.

Однако раннее выявление и лечение опухолей могут предотвратить их прогрессирование [40; 82; 88; 160].

Злокачественный рост обусловлен накоплением генетических и эпигенетических изменений, приводящих к нарушению регуляции клеточного цикла, апоптоза и механизмов репарации ДНК [167; 172].

Согласно приказу Министерства здравоохранения РФ от 19 февраля 2021 г. № 116н выделяют три вида противоопухолевого лечения [26]:

- 1) хирургический;
- 2) радиотерапевтический;
- 3) лекарственный.

Химиотерапевтические препараты, используемые в клинической практике, обладают разными механизмами действия и классифицируются на разные группы, включая алкилирующие субстраты, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы I и II, митотические ингибиторы и кортикостероиды. «Классические» низкомолекулярные химиотерапевтические агенты (5-ФУ, доксорубин, цисплатин) оказывают токсическое воздействие не только на опухолевые клетки, но и на все быстро делящиеся клетки. Это приводит к угнетению функции костного мозга, повреждению эпителия желудочно-кишечного тракта и потере слуховых волосковых клеток [213].

1.2. 5-фторурацил: механизм действия и роль в терапии

5-ФУ – один из наиболее часто применяемых ЛС в химиотерапии [217].

5-ФУ был синтезирован и разработан в качестве потенциального противоопухолевого препарата в 1957 году [98; 138].

С тех пор данное вещество приобрело статус одного из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов. Его механизм действия подвергся детальному изучению [74; 77; 224].

5-ФУ подавляет пролиферацию опухолевых клеток посредством ингибирования фермента тимидилатсинтазы. Это приводит к включению метаболитов 5-ФУ в молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК) и ДНК, что вызывает цитотоксичность и последующую гибель клеток [74; 119; 306].

Вследствие низкой специфичности 5-ФУ при клиническом использовании часто возникают нежелательные побочные эффекты [211].

Несмотря на высокую токсичность и выраженные побочные эффекты, данное ЛС используется в качестве одного из ключевых методов терапии при различных онкологических заболеваниях, таких как рак молочной железы, колоректальный рак и опухолевые заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [116; 133; 153; 255; 272].

При этом проблема его системной токсичности продолжает оставаться актуальной, ограничивая терапевтические возможности и ухудшая качество жизни пациентов.

Токсикологический профиль 5-ФУ является уникальным среди химиотерапевтических агентов, поскольку качественные проявления токсичности напрямую зависят от режима его введения [59; 194; 206]. Болюсное введение ассоциируется преимущественно с миелосупрессией, при этом исключение болюсной инъекции 5-ФУ из обычно используемых схем химиотерапии на основе 5-ФУ при опухолевых заболеваниях ЖКТ с применением только инфузии 5-ФУ может снизить риск гематологической токсичности, такой как нейтропения и тромбоцитопения, без ущерба для выживаемости при метастазировании [59; 140;

148; 159; 194]. В то время как пролонгированные инфузии чаще приводят к развитию мукозита, синдрома ладонно-подошвенной эритродизестезии и тяжелой диареи [51; 194]. Кроме того, была выявлена демографическая вариабельность: пациенты старше 70 лет и женщины демонстрируют повышенную чувствительность к токсическим эффектам 5-ФУ [194; 267]. Сочетание 5-ФУ с лейковорином (фолинат кальция), применяемое для усиления противоопухолевого действия, также потенцирует токсичность, особенно со стороны ЖКТ [137; 174; 194].

Проведенный анализ токсических эффектов 5-ФУ показал значительное влияние на систему кроветворения, ЖКТ, сердечно-сосудистую систему, центральную нервную систему, кожу. Также 5-ФУ проявляет гепато- и нефротоксичность. 5-ФУ, как и многие другие ЛС, применяемые для лечения онкологических заболеваний, обладает тератогенным и эмбриотоксическим действием.

Токсичность 5-ФУ носит системный характер, затрагивая практически все быстро пролиферирующие ткани.

Гематологическая токсичность 5-ФУ связана с развитием миелосупрессии, затрагивающей все стадии кроветворения [179]. Степень и тяжесть миелосупрессии напрямую зависят от режима дозирования ЛС. При использовании 5-ФУ начальная тромбоцитопения сменяется выраженным реактивным тромбоцитозом, что связано с воздействием на пул зрелых предшественников мегакариоцитов с последующей компенсаторной гиперпролиферацией устойчивых к 5-ФУ примитивных стволовых клеток [231]. 5-ФУ также вызывает глубокую супрессию эритроидных предшественников, что может привести к чистой эритроцитарной аплазии [236].

Наиболее частыми и клинически значимыми проявлениями гастроинтестинальной токсичности являются диарея и мукозит [58; 300], часто требующие коррекции дозы или прерывания терапии. Механизмы их развития сложны и включают: прямое цитотоксическое действие на быстро обновляющийся эпителий крипт тонкой и толстой кишки [132; 239]; нарушение

кишечного барьера и водно-электролитного баланса, связанное со снижением экспрессии аквапоринов [242; 243]; развитие дисбиоза и синдрома избыточного бактериального роста, особенно при комбинации с иринотеканом, что усугубляет воспаление [203; 298].

Кардиотоксичность, индуцированная 5-ФУ, является второй по частоте после антрациклинов и представляет серьезную проблему [55; 247; 248; 259]. Её проявления варьируют от стенокардии и обратимой дисфункции миокарда до острого инфаркта миокарда, жизнеугрожающих аритмий (включая фибрилляцию предсердий [113; 115; 214; 293]), токсического миокардита и кардиогенного шока [48; 285]. Основными патогенетическими механизмами считаются эндотелиальная дисфункция, коронарный вазоспазм и прямое повреждение кардиомиоцитов, опосредованное окислительным стрессом [105; 302]. Факторами риска являются пожилой возраст, предшествующие сердечно-сосудистые заболевания (гипертензия, гиперлипидемия, диабет) [247; 261; 293].

Неврологические осложнения включают периферическую нейропатию, обратимые энцефалопатии (вплоть до синдрома, сходного с энцефалопатией Вернике [46; 127; 292; 301; 311]), острые психотические и маниакальные эпизоды [109; 129], а также долгосрочные когнитивные нарушения, известные как «химический мозг» [126].

При использовании 5-ФУ помимо синдрома ладонно-подошвенной эритродизестезии, часто наблюдаются изменение цвета ногтей (хромонихия) [56; 108; 146; 210; 253; 313] и различные формы дерматита [52; 94], кератоз [139].

Повреждение печени и почек при применении 5-ФУ связано преимущественно с индукцией окислительного стресса и воспаления [41; 101; 212; 254].

5-ФУ, как и многие другие противоопухолевые ЛП, обладает тератогенным и эмбриотоксическим потенциалом, что ограничивает его применение у пациентов репродуктивного возраста [217; 299].

Классические подходы по снижению токсичности 5-ФУ включают модификацию режимов дозирования, премедикацию и симптоматическую терапию. Фармакогенетическое тестирование позволяет предотвратить развитие

токсического эффекта за счет анализа полиморфизмов генов ферментов метаболизма 5-ФУ для персонализации дозы. Также наблюдается использование кардиопротекторов и гепатопротекторов, исследуется потенциал таких соединений, как мирицетин, эмпаглифлозин, силимарин для снижения специфических органных повреждений [50; 235; 254].

Современные стратегии снижения токсичности направлены на повышение специфичности взаимодействия 5-ФУ с опухолевыми клетками и изменение фармакокинетики ЛС.

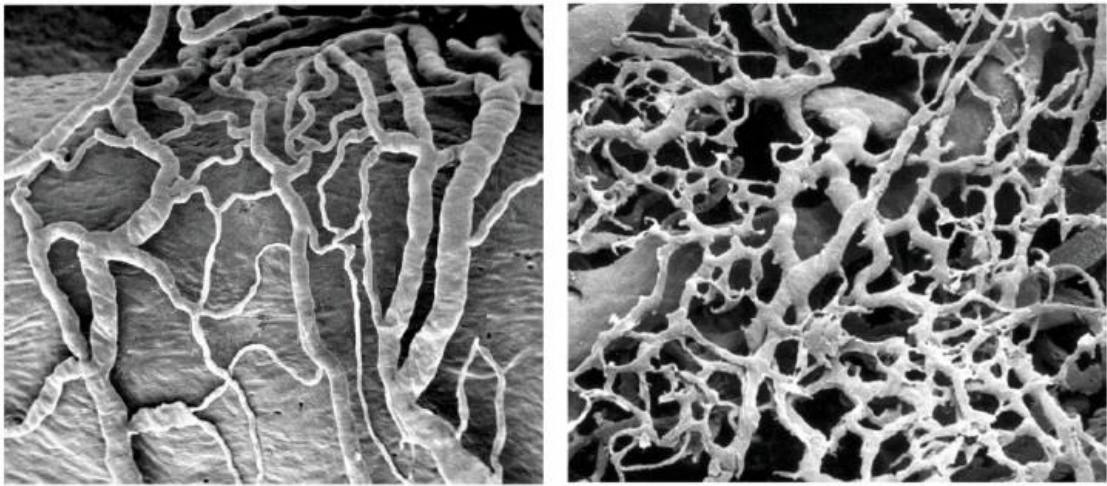
Токсичность 5-ФУ представляет собой сложный, мультисистемный и зависящий от режима введения феномен. Понимание молекулярных механизмов повреждения (окислительный стресс, эндотелиальная дисфункция, прямое цитотоксическое действие) и интеграция современных технологий – таргетных систем доставки, фармакогенетики и фармакопротекции – являются ключевыми направлениями для повышения терапевтического индекса этого незаменимого, но высокотоксичного противоопухолевого агента.

1.3. Системы доставки противоопухолевых лекарственных средств

1.3.1. Особенности строения опухолевых сосудов и микроокружения опухоли

Эффективность системы доставки ЛС напрямую определяется уникальными свойствами опухолевой сосудистой сети и формируемого ею микроокружения. Понимание этих особенностей является ключом к рациональному конструированию новых терапевтических систем.

Опухолевая сосудистая сеть, формирующаяся в процессе ангиогенеза, принципиально отличается от нормальной как в структурном, так и в функциональном отношении [6; 38; 184; 197]. В отличие от иерархически организованной сосудистой сети здоровых тканей, сосуды опухоли хаотичны и дезорганизованы, для них характерны многочисленные петли, переплетения, параллельные соединения и тупиковые ветви, что приводит к неравномерному кровотоку (Рисунок 1) [38; 145; 184].



А

Б

Рисунок 1 – Сосудистая система здоровой ткани (А) и опухолевой ткани (Б) на примере сосудов сонной артерии крысы [184]

Микроокружение опухолевой ткани существенно отличается от здоровой, включая аномалии сосудов, уровни оксигенации и перфузии, pH и метаболический статус. Солидные опухоли характеризуются гетерогенной популяцией клеток, снабженных эндотелием неправильной формы, а также аномально толстыми или тонкими базальными мембранами, где перициты слабо прикреплены к эндотелиальным клеткам [111]. Эндотелий опухолевых сосудов характеризуется выраженными дефектами. Эндотелиальные клетки расположены неравномерно – между ними образуются значительные промежутки и разрывы, а базальная мембрана часто утолщена или отсутствует [6; 38; 282; 307]. Такие дефекты создают поры величиной 0,3–0,4 мкм и огромные просветы, нарушая целостность эндотелиального барьера [19; 152; 184]. Некоторые эндотелиальные клетки не экспрессируют характерные маркеры и претерпевают апоптоз, формируя «мозаичные сосуды», что облегчает метастазирование [38; 175].

Аномалии затрагивают и клетки сосудистой стенки – перициты. Данные об их количестве противоречивы, однако установлено, что ассоциированные с опухолью перициты имеют аномальную морфологию, слабый контакт с эндотелием и, что парадоксально, могут секретировать VEGF (англ. Vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов), повышая проницаемость сосудов вместо их стабилизации (Рисунок 2) [38; 118; 150].

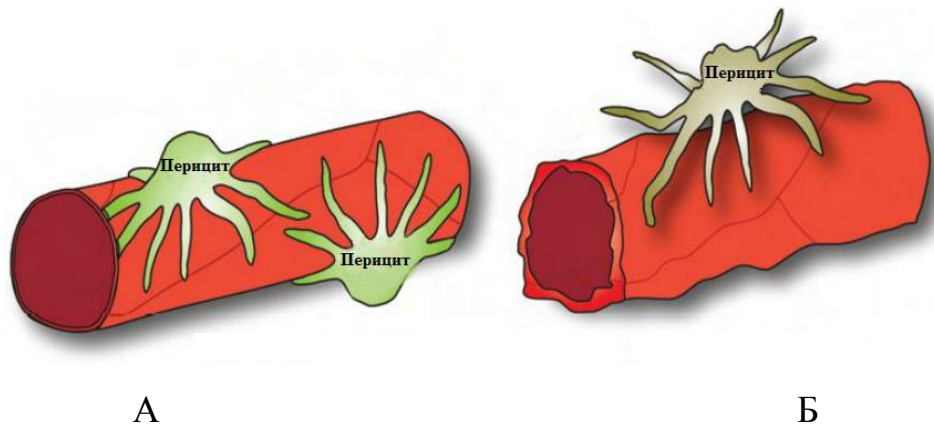


Рисунок 2 – Перициты в здоровых тканях (А) находятся в тесном контакте с эндотелием, перициты в опухолях (Б) слабо прикреплены к сосудам [215]

Неравномерное распределение, диаметр, плотность и извилистая форма опухолевых сосудов являются причиной плохой перфузии, что приводит к чрезмерной экстравазации жидкости и повышению давления интерстициальной жидкости. Двумя основными причинами такой неоднородности являются пространственное напряжение от быстрого роста опухоли и аномальный внеклеточный матрикс, который может сдавливать сосуды. Индекс внутрисосудистого объёма выше всего в центре солидных опухолей и уменьшается к периферии, что способствует оттоку жидкости из центральной области. Это явление снижает транскапиллярный перенос терапевтических препаратов и их накопление в центре опухоли [111]. Происхождение опухолевых эндотелиальных клеток также может быть связано с стволовыми клетками, что делает их ключевыми для неоангиогенеза [175].

В результате структурных дефектов кровотоков становится хаотичным, а проницаемость сосудов резко возрастает [38; 118]. Это, в сочетании с давлением пролиферирующих опухолевых клеток и отсутствием функционального лимфатического дренажа, приводит к формированию патологической микросреды [6; 152]. Для неё характерны ключевые признаки: интерстициальная гипертензия, гипоксия и ацидоз ($\text{pH} < 7,0$) [6; 78; 111; 145]. Гипоксия, в свою очередь, является мощным стимулом для дальнейшего ангиогенеза, индуцируя экспрессию VEGF-A и других проангиогенных факторов [118; 175]. Аномальная морфология сосудов и метаболический дисбаланс (ацидоз, накопление лактата) активно способствуют

формированию иммуносупрессивного опухолевого микроокружения, подавляя противоопухолевый иммунный ответ [78; 145].

Совокупность повышенной проницаемости опухолевого эндотелия и нарушенного лимфодренажа лежит в основе феномена избирательного накопления в опухоли – эффекта повышенной проницаемости и удержания (EPR-эффекта) [6; 19; 161; 184].

Благодаря этому, макромолекулярные препараты и наночастицы (например, липосомы диаметром 100–300 нм) способны пассивно экстравазироваться через дефектный эндотелий и длительно удерживаться в опухолевой ткани, в отличие от здоровых тканей с плотным эндотелием [19; 152]. В то же время низкомолекулярные химиотерапевтические агенты быстро диффундируют обратно в кровоток, не достигая необходимой терапевтической концентрации в опухоли [6]. Этот принцип является фундаментом для разработки систем пассивной таргетной доставки на основе полимерных носителей, мицелл и липосом [111; 152].

Таким образом, опухолевые сосуды представляют собой не просто неполноценную транспортную сеть, их уникальное строение формирует специфическое микроокружение, которое, с одной стороны, создаёт серьёзные барьеры для эффективности стандартной терапии, а с другой – открывает стратегические возможности для разработки систем доставки ЛС.

1.3.2. Полимерные носители в онкотерапии

Для повышения эффективности и безопасности, существующих ЛС применяются различные способы и формы доставки ЛС, целью которых является повышение эффективности (включая тропность действия и уменьшение токсичности).

Большинство клинически используемых ЛС относятся к низкомолекулярным соединениям, характеризующимся коротким периодом полувыведения и высокой скоростью клиренса. Эти ЛС быстро диффундируют в здоровые ткани, обеспечивая равномерное распределение по организму [189; 257]. В результате

лишь незначительное количество ЛС достигает целевого участка, что приводит к снижению эффективности терапии и увеличению частоты побочных эффектов [180].

Основной задачей систем доставки ЛС в онкологии является обеспечение транспорта достаточного количества ЛС к очагам заболевания при минимизации воздействия на здоровые ткани. Система доставки ЛС представляет собой перспективное решение для преодоления проблем, связанных с токсичностью, обеспечивая специфическое проникновение ЛС в опухолевые клетки через молекулу-носитель [43; 47; 80; 241; 278; 297].

Идеальная система доставки ЛС должна обладать способностью направленно доставлять терапевтический агент в опухолевый очаг и полностью высвобождать его в месте воздействия [104; 178; 225].

Полимерные производные представляют собой перспективные и актуальные носители противоопухолевых ЛС.

Полимеры представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из макромолекул с протяжёнными цепями, содержащими множественные функциональные группы. Они демонстрируют способность к формированию гомогенных систем при смешении с веществами как низкой, так и высокой молекулярной массы. В современной фармацевтической технологии полимеры приобретают ключевое значение при разработке систем доставки лекарственных средств [67; 227; 304].

Разработка полимерных систем доставки лекарственных средств (ЛС) является стратегическим направлением современной фармакологии, позволяющим преодолеть ключевые недостатки традиционных химиотерапевтических агентов, такие как низкая селективность, системная токсичность и короткий период полувыведения [54; 244]. Полимерные носители обеспечивают защиту активного вещества, контролируемое высвобождение, увеличение времени циркуляции и возможность пассивного или активного таргетинга [177]. Исторически использование полимеров в фармакологии начиналось с природных биополимеров, которые обладают рядом

фундаментальных преимуществ, таких как биосовместимость, биоразлагаемость и низкая токсичность [54; 111].

Природные (био)полимеры – это высокомолекулярные соединения, выделяемые из растительного, животного или микробного сырья. Их основными классами являются полисахариды и белки. Благодаря своей биосовместимости, биоразлагаемости и, как правило, низкой токсичности, они стали первыми материалами, исследуемыми для доставки ЛС [111]. Наиболее изученные из природных полимеров представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Природные полимеры

Природный полимер	Его характеристика
Хитозан	Катионный полисахарид, получаемый деацетилированием хитина. Он привлекает внимание благодаря уникальному сочетанию свойств: мукоадгезии, биосовместимости, способности к самоорганизации в наноструктуры, а также собственной иммуностимулирующей, антимикробной и даже противоопухолевой активности [147; 234; 252]. Многочисленные функциональные группы ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) позволяют легко модифицировать его структуру и конъюгировать с ЛС или таргетными лигандами [275]
Альгинат	Анионный полисахарид из бурых водорослей, образующий гели в присутствии ионов кальция. Широко используется для инкапсуляции клеток и препаратов, создания гидрогелей и микросфер [111; 136; 165; 171]
Гиалуроновая кислота	Естественный компонент внеклеточного матрикса. Является лигандом для рецептора CD44, гиперэкспрессируемого на многих опухолевых клетках, что делает её перспективной для активного таргетинга [53; 111; 226]
Альбумин	Эндогенный белок крови. Наночастицы на его основе (например, Abrahane® с паклитакселом) используют естественные пути транспорта и механизм EPR-эффекта для накопления в опухоли, демонстрируя пролонгированную циркуляцию [111; 186]
Желатин	Продукт гидролиза коллагена, биосовместимый, нетоксичный и легко модифицируемый полимер [111; 117; 207; 216]
Декстран и его производные (например, ацетилированный декстран, Ac-DEX).	Является отличным исходным биополимером для создания конструкций. Его узкое молекулярно-массовое распределение и большое количество активных гидроксильных групп благоприятны для химической модификации [143]. Чувствительный к pH Ac-DEX деградирует в кислой среде опухоли или эндосом, обеспечивая контролируемое высвобождение вакцин или химиотерапевтических агентов [288]

Несмотря на многочисленные преимущества, широкое клиническое применение природных полимеров в качестве систем доставки сталкивается с рядом существенных технологических и биологических ограничений, подробно описанных в литературе за последние годы.

- Сложность контроля молекулярно-массовых характеристик и воспроизводимости. Природные полимеры, в отличие от синтетических, характеризуются высокой полидисперсностью и вариабельностью молекулярной массы, которые зависят от источника сырья, условий его получения и методов очистки [128]. Это приводит к трудностям в стандартизации и воспроизводимости свойств конечных лекарственных форм (размера частиц, скорости деградации, профиля высвобождения), что является критическим требованием для фармацевтических продуктов [111].

- Проблемы с очисткой и риск контаминации. Процессы выделения полимеров из биологического сырья (животных, растений, водорослей) требуют сложных многоступенчатых процедур очистки для удаления потенциальных аллергенов, эндотоксинов, вирусов и других контаминантов. Неполная очистка может привести к нежелательным иммунным реакциям и проблемам с безопасностью [230; 233].

- Иммуногенность и риск аллергических реакций. Многие природные полимеры, особенно белкового происхождения (например, желатин) или полученные из чужеродных биологических источников (например, хитозан из панцирей ракообразных), могут вызывать иммунный ответ, что ограничивает их повторное применение и повышает риск побочных эффектов [111; 195; 228].

- Ограниченные возможности химической модификации. Хотя природные полимеры часто содержат функциональные группы (гидроксильные, amino-, карбоксильные), их разнообразие, доступность и реакционная способность для направленного химического конструирования часто уступают синтетическим аналогам. Это затрудняет создание сложных многофункциональных систем с точно заданными свойствами, такими как управляемое высвобождение или активный таргетинг [54].

- Трудности с масштабированием производства. Получение природных полимеров с постоянными и стабильными характеристиками в промышленных масштабах является сложной и дорогостоящей задачей из-за зависимости от биологических источников, сезонных колебаний и необходимости сложных процессов очистки [111; 229].

Эти системные ограничения стали ключевой движущей силой для интенсивного развития и доминирования в современных исследованиях синтетических полимеров, свойства которых (молекулярная масса, состав, архитектура, функциональность) могут быть точно запрограммированы и воспроизведены, что обеспечивает необходимый уровень контроля, безопасности и эффективности для создания передовых терапевтических систем [54; 102].

Синтетические полимеры производятся химическими методами из низкомолекулярных мономеров. Это позволяет с высокой точностью задавать их ключевые параметры: молекулярную массу, полидисперсность, химический состав, архитектуру цепи (линейная, разветвленная, звездообразная) и наличие специфических функциональных групп. Такой уровень контроля обеспечивает необходимую воспроизводимость, предсказуемость фармакокинетики и безопасности [54; 102].

В области доставки ЛС можно выделить три класса синтетических полимеров:

I. Биоразлагаемые синтетические полимеры.

Эти полимеры гидролизуются *in vivo* на нетоксичные низкомолекулярные метаболиты (молочная кислота, гликолевая кислота, ϵ -гидроксикапроновая кислота и др.), которые включаются в естественные метаболические пути и выводятся из организма (например, через цикл Кребса или почки). Они являются основой для большинства клинически одобренных и исследуемых наносистем, так как не накапливаются в организме.

Поли(D,L-лактид-ко-гликолид) (PLGA) – «золотой стандарт» биоразлагаемых полимеров, одобренный FDA (Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США) и EMA (European Medicines Agency – Европейское агентство лекарственных средств,

Европейский союз). Его ключевое преимущество – возможность настраивать скорость деградации и высвобождения ЛС (от недель до месяцев) путем изменения соотношения лактида к гликолиду и молекулярной массы [152; 258]. PLGA обеспечивает высокую нагрузку препаратом, пролонгированное действие и EPR-опосредованное накопление в опухоли [223].

Поли-ε-капролактон (PCL) – относится к числу наиболее распространенных типов полимерных наночастиц наряду с полилактидом и его сополимерами [244]. PCL отличается более медленной скоростью деградации (до нескольких лет) по сравнению с PLGA, что делает его подходящим для создания долговременных имплантатов, систем пролонгированного высвобождения и носителей для тканевой инженерии [111].

Эти полимеры выполняют роль высокоэффективных, но в основном пассивных носителей, чья основная функция – доставить и высвободить лекарство в нужном месте и в нужное время.

II. Небиоразлагаемые, но биосовместимые синтетические полимеры.

Эти полимеры не расщепляются на составляющие мономеры в организме в разумные сроки, но при определенной молекулярной массе могут выводиться почками. Их используют благодаря уникальным Физико-химическим свойствам.

Полиэтиленгликоль (PEG) – наиболее яркий представитель. PEG не является биоразлагаемым, но он биосовместим, гидрофилен и нетоксичен. Его ключевая роль – создание гидратной («водной») оболочки вокруг наночастицы или конъюгата лекарство-полимер. Эта оболочка эффективно маскирует носитель от распознавания белками иммунной системы (опсонинами) и клетками ретикулоэндотелиальной системы (печень, селезенка). Данный эффект, известный как «стелс-эффект» или пегилирование, приводит к резкому (в десятки раз) увеличению времени циркуляции частиц в крови, что является критически важным условием для их успешного накопления в опухоли за счет EPR-эффекта [106; 111]. Таким образом, PEG решает проблему быстрого клиренса, не требуя биоразлагаемости.

Как био-, так и небиоразлагаемые полимеры в основном выполняют роль высокоэффективных пассивных носителей и модификаторов фармакокинетики.

III. Синтетические полиэлектролиты (СПЭ) с иммуномодулирующей активностью.

Традиционный подход к использованию полимеров в фармакологии воплощён в модели Рингсдорфа (1975 г.), где полимер выступает пассивным каркасом для доставки лекарств (подробнее рассматривается в разделе 1.3.3) [227]. Однако дальнейшие исследования, в частности работы Н. А. Платэ, А. Е. Васильева, Р. В. Петрова, Р. М. Хаитова и А. В. Кабанова, показали, что полимеры сами по себе могут быть физиологически активны, модулируя функции клеток и иммунные реакции [20; 24; 60; 156; 157]. Это привело к концепции СПЭ с иммуномодулирующей активностью как отдельного и принципиально важного класса.

Иммуностимулирующие полиэлектролиты представляют собой синтетические макромолекулы, несущие в своей структуре множественные ионогенные группы (поликатионы или полианионы), которые способны напрямую модулировать функциональную активность клеток иммунной системы [36; 230]. Их уникальность заключается в том, что они не являются иммуногенами сами по себе (не вызывают выработки специфических антител против своей структуры), но при этом способны потенцировать иммунный ответ на сопряженные с ними антигены или проявлять неспецифическую иммуномодулирующую активность [230].

Ключевые механизмы иммуностимулирующего действия, выявленные в фундаментальных исследованиях, включают мембранотропное действие, стимуляцию миграции и дифференцировки клеток, активацию антиген-презентирующих клеток и прямую модуляцию цитокинового профиля (Таблица 2).

Классическим примером такого истинного иммуномодулятора, сконструированного как высокомолекулярное физиологически активное соединение, является отечественный препарат «Полиоксидоний» (азоксимера бромид). Это синтетический водорастворимый поликатион, представляющий собой тройной сополимер 1,4-этиленпиперазина, его N-оксида и (N-карбоксиметилен-1,4-этиленпиперазиния бромида с молекулярной массой 60–100 кДа [45; 230]. Биоразложение до нетоксичных олигомеров с молекулярной массой 1–2 кДа

обеспечивает лёгкое выведение азоксимера бромида из организма, его низкую почечную токсичность и хороший профиль безопасности [273].

Таблица 2 – Механизмы действия СПЭ

Название механизма	Суть
Мембранотропное действие	СПЭ способны к многоточечной сорбции на поверхности лимфоцитов и других иммунокомпетентных клеток за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий. Это приводит к быстрому (в течение секунд) повышению проницаемости плазматической мембраны для ионов K^+ и Ca^{2+} , активации ионтранспортирующих АТФаз и запуску каскада внутриклеточных сигналов, ведущих к активации, пролиферации и дифференцировке клеток [36]
Стимуляция миграции и дифференцировки клеток	Показано, что СПЭ стимулируют пролиферацию и миграцию гемопоэтических стволовых клеток, способствуют расселению Т- и В-лимфоцитов из центральных органов иммунитета (тимуса, костного мозга) в периферические лимфоидные органы, создавая благоприятный фон для развития иммунного ответа [36]
Активация антиген-презентирующих клеток	Современные исследования, в частности на модели полиоксидония, показывают, что СПЭ способны индуцировать созревание дендритных клеток (ДК). Это выражается в повышении экспрессии на их поверхности ко-стимуляторных молекул (CD80, CD86) и молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС II), а также в усиленной секреции провоспалительных цитокинов. Зрелые ДК становятся эффективными индукторами клеточного иммунного ответа, в частности, активируя цитотоксические Т-лимфоциты, играющие ключевую роль в противоопухолевой и противовирусной защите [45]
Прямая модуляция цитокинового профиля	СПЭ могут влиять на продукцию ключевых цитокинов, таких как интерфероны (IFN), интерлейкин-12 (IL-12), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), смещая баланс в сторону Th1-типа (Т-хелперы 1-го типа) иммунного ответа, ассоциированного с клеточными механизмами защиты [230]

Его ключевое свойство – способность оказывать положительное влияние на все звенья защиты организма, повышая пониженные и понижая повышенные показатели иммунитета, что соответствует определению иммуномодулятора [23]. Первичными мишенями для азоксимера бромида являются клетки фагоцитарной системы (нейтрофилы, моноциты/макрофаги) и естественные киллеры (NK-клетки). ЛС способно стимулировать или оказывать ко-стимулирующий эффект на продукцию этими клетками ключевых цитокинов: IL-1 β , IL-6, TNF- α и IFN- α ,

а также усиливать бактерицидную способность фагоцитов и антителообразование при недостаточности гуморального иммунитета [22; 23].

Азоксимера бромид представляет собой универсальный адъювант, включенный в состав российских субъединичных вакцин, таких как «Гриппол». Его применение позволяет снизить антигенную нагрузку, одновременно усиливая как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [17; 34]. В онкологии ЛС используется в качестве иммунокорректора в комплексной терапии заболеваний, в том числе у детей, для снижения иммуносупрессии, вызванной химио- и лучевой терапией. Клинические данные свидетельствуют о его способности уменьшать частоту инфекционных и гематологических осложнений, улучшая качество жизни пациентов [5; 10]. Кроме того, азоксимера бромид выступает в роли индуктора противоопухолевого иммунитета: продемонстрирована его способность активировать ДК и, как следствие, цитотоксический Т-лимфоцитарный ответ против опухолевых клеток, что открывает перспективы для интеграции препарата в современные схемы иммуноонкологии [45].

Синтетические полианионы, такие как полиакриловая (ПАК) и полиметакриловая (ПМАК) кислоты, представляют собой особый класс полимеров с выраженной способностью стимулировать иммунную систему. Их действие основано на уникальном механизме взаимодействия с клетками. Благодаря высокому отрицательному заряду и гибкости, эти макромолекулы активно связываются с поверхностью лимфоцитов. Это приводит к быстрому изменению потока ионов через клеточную мембрану, что служит мощным сигналом для активации, деления и функционального созревания иммунных клеток. Такой мембранотропный эффект лежит в основе их способности усиливать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ на конъюгированные с ними антигены, что было детально исследовано в фундаментальных работах [36].

Полиакриловая и полиметакриловая кислоты представляют собой перспективные полимерные носители для создания систем доставки противоопухолевых препаратов. Их широкое применение обусловлено наличием реакционноспособных карбоксильных групп, которые позволяют формировать

стабильные комплексы и конъюгаты с лекарственными веществами, а также рядом уникальных фармакологических свойств.

Многочисленные исследования демонстрируют эффективность комплексных систем на основе этих полимеров. Так, Stoyanova и соавт. (2020) разработали наночастицы на основе комплексов хлорида берберина с ПМАК и ПАК, которые показали выраженную цитотоксичность *in vitro* в отношении опухолевых клеток [269].

В другом исследовании Ghalekhondabi и коллеги (2021) создали pH-чувствительные наносферы ПМАК, конъюгированные с фолиевой кислотой, для направленной доставки доксорубина. Эти системы продемонстрировали повышенную эффективность против клеток рака молочной железы по сравнению со свободным препаратом [120].

Выбор ПМАК в качестве полимерного носителя обусловлен рядом преимуществ:

1) pH-зависимым поведением, позволяющим контролируемо высвобождать ЛС в кислой среде опухоли [120; 121; 295];

2) наличием реакционноспособных карбоксильных групп, обеспечивающих возможность химической модификации и образования стабильных комплексов и конъюгатов с ЛС [168; 205];

3) хорошей биосовместимостью и низкой токсичностью [183; 309].

Особый интерес представляют фармакологические свойства ПМАК, выявленные в ходе исследований. Помимо способности усиливать действие противоопухолевых ЛС за счет направленной доставки к опухолевому очагу, ПМАК обладает собственной фармакологической активностью.

В 1968 году группа бельгийских исследователей под руководством Р. De Somer опубликовала серию основополагающих работ, в которых впервые была продемонстрирована выраженная противовирусная активность ПАК и ПМАК, которая была связана с прямым взаимодействием с вирусными частицами, индукцией интерферона и активацией макрофагов [89; 91; 92]. Это заложило основу для понимания их иммуномодулирующих эффектов: способности

активировать макрофаги [158; 204], усиливать продукцию интерферона [89; 90] и модулировать цитокиновый профиль (в частности, влиять на уровни IL-10 и IL-17) [310]. Помимо прямой иммуностимуляции, ПМАК обладает ключевыми свойствами для создания современных систем доставки лекарств. Она является рН-чувствительным полимером. Карбоксильные группы в ее составе имеют рКа около 5,5, что близко к кислотности опухолевой среды и внутриклеточных компартментов [238]. В нейтральном рН крови полимер находится в набухшем, заряженном состоянии, а в кислых условиях (в опухоли или внутри клетки) он сворачивается, становясь более гидрофобным. Это позволяет создавать «умные» носители, которые стабильны при циркуляции, но высвобождают ЛС именно в нужном месте [263].

В исследованиях полианионных иммуностимуляторов ПАК стала важной моделью, продемонстрировавшей сам принцип иммуномодулирующего действия синтетических полианионов [36]. Однако её структурный аналог – ПМАК – обладает рядом дополнительных и более контролируемых свойств, которые делают её особенно перспективной для создания современных терапевтических систем. Ключевое отличие, помимо химического строения, заключается в возможности точного контроля её молекулярной массы в процессе синтеза, что открывает уникальные возможности для регулирования её активности и безопасности [238; 263]. Этот контроль позволяет одновременно решить несколько критических задач: создать полимерную цепь, достаточно длинную для эффективной иммуностимуляции и оптимального накопления в опухоли за счёт EPR-эффекта, но при этом достаточно короткую для гарантированного выведения почками и минимизации риска долгосрочной токсичности [102; 111].

Современные синтетические полимеры, и особенно полиэлектролиты типа ПМАК, представляют собой полимеры, которые не только решают проблему доставки, но и активно участвуют в терапевтическом процессе, открывая путь к созданию комбинированных и персонализированных противоопухолевых стратегий.

1.3.3. Классификация и применение полимерных систем

Полимеры для доставки ЛС должны обладать водорастворимостью, нетоксичностью, низкой иммуногенностью и обеспечивать безопасную элиминацию из организма [65; 67; 93; 117; 266]. Молекулярная масса носителя должна обеспечивать продолжительную циркуляцию, но не превышать ~40 кДа для гарантии почечной элиминации [93; 183].

Фундаментальной основой для разработки направленных систем доставки стала модель Рингсдорфа, предложенная Гельмутом Рингсдорфом в 1975 году. Эта концепция интегрирует химические и биологические принципы, обеспечивая контролируемое высвобождение активных веществ, снижение токсичности и повышение терапевтической эффективности. Модель включает три основных элемента: полимерный каркас, лекарственное средство (ЛС), таргетные и сольбилизирующие группы (Рисунок 3) [155].

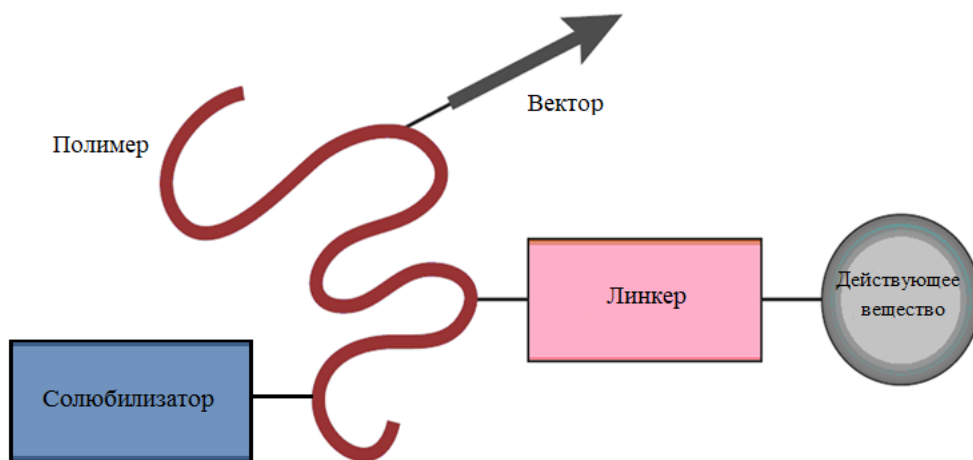


Рисунок 3 – Модель Рингсдорфа

В качестве полимерного каркаса используются биосовместимые или биоразлагаемые полимеры. Критически важными параметрами используемого полимера являются: молекулярная масса, гибкость цепи, наличие функциональных групп для конъюгации [103; 237].

Линкер – это бифункциональное химическое соединение, используемое для ковалентного соединения двух молекул (например, полимерного носителя и ЛС) с целью создания управляемой системы доставки [260; 268]. Его ключевая

функция – обеспечение контролируемого высвобождения активного агента в специфических условиях (например, под действием ферментов, изменений pH или редокс-окружения) [96; 188].

Солюбилизатор в модели Рингсдорфа – это гидрофильный компонент (чаще всего полиэтиленгликоль, PEG), который ковалентно присоединяется к полимеру для придания амфифильных свойств всей структуре. Его основная функция – обеспечение водорастворимости полимерного носителя и стабилизация системы [44; 97; 237].

Вектор или таргетный лиганд (фолиевая кислота, трансферрин) предназначен для направленной доставки биологически активных соединений (например, ЛС) в специфические клетки (например, клетки иммунной системы) или ткани (например, опухолевые) [44; 173; 237].

Среди основных ограничений модели выделяют: затруднение проникновения через биологические барьеры [103], преждевременное высвобождение ЛС в кровотоке из-за нестабильности линкера [84; 142], некоторые полимеры могут вызывать иммунный ответ [173]. Несмотря на свою фундаментальность и неизменное значение, модель Рингсдорфа очертила границы первой парадигмы – полимера как пассивного каркаса. Дальнейший прогресс в химии полимеров, молекулярной биологии и науке о материалах позволил преодолеть многие из её изначальных ограничений и породил новое поколение «интеллектуальных» систем доставки. Ключевым сдвигом стало расширение функциональности полимерного носителя: из инертного транспортировщика он превратился в активного участника терапевтического процесса. Современные полимерные системы не просто доставляют лекарство – они реагируют на специфические стимулы в организме (pH, ферменты, редокс-потенциал, температура), обеспечивая таргетное высвобождение именно в патологическом очаге.

Сегодня на основе этих принципов разработан широкий спектр полимерных систем доставки, каждая из которых решает конкретные задачи повышения эффективности и безопасности лекарств. Их сравнительный анализ представлен ниже (Таблица 3).

Таблица 3 – Полимерные системы доставки ЛС

Система доставки ЛС на основе полимеров	Описание	Преимущества	Недостатки
Полимер-лекарственные конъюгаты, или модель Рингсдорфа	Представляют собой ковалентные соединения биологически активных молекул с полимерным носителем [192; 227]	• Улучшение растворимости гидрофобных препаратов (актуально для 40–60 % разрабатываемых ЛС) [173]. • Контролируемое высвобождение, снижающее токсичность и повышающее терапевтический индекс [173; 227]. • Увеличение периода полувыведения и объема распределения [173]. • Возможность таргетинга за счет эффекта EPR в опухолях [112]	• Зависимость эффективности от стабильности линкера и условий высвобождения (pH, ферменты) [173]. • Необходимость дополнительного таргетинга для преодоления биологических барьеров [227]
Дендримеры	Сильно разветвлённые трёхмерные макромолекулы наноразмера (1–10 нм) с высокой плотностью функциональных групп на поверхности, с внутренним пустым пространством, способным инкапсулировать другие молекулы [39; 281]	• Монодисперсность структуры с индексами полидисперсности (M_w/M_n) < 1,05 и точность синтеза [173]. • Возможность конъюгации лекарств, таргетных лигандов и диагностических агентов [173]. • Улучшение растворимости плохо водорастворимых препаратов [39]. • Большая площадь поверхности и наличие активных функциональных участков для иммобилизации препаратов [281]	• Токсичность из-за взаимодействия с биологическими молекулами (белки, липиды) [173]. • Ограниченная клиническая применимость из-за сложности стандартизации и синтеза [39; 173]
Полимерные наночастицы	Твердые коллоидные частицы или дисперсии размером 10–1000 нм, способные инкапсулировать различные терапевтические агенты [42; 102]	• Универсальность, биосовместимость, возможность инкапсуляции различных ЛС [42]. • Обеспечение контролируемого высвобождения, повышение эффективности, минимизация побочных эффектов [42]. • Возможность создания «умных» систем, чувствительных к стимулам (например, pH в опухолевой среде) [102; 186]. • Маленький размер позволяет проникать в капилляры и эффективно поглощаться клетками [281]	Возможность преждевременного высвобождения ЛС; сложность масштабирования и стандартизации производства для некоторых типов [42]

Продолжение таблицы 3

Система доставки ЛС на основе полимеров	Описание	Преимущества	Недостатки
Полиэлектролитные комплексы	Образуются за счет электростатического взаимодействия между противоположно заряженными химическими соединениями (например, полимером и ЛС) [246; 286]	• Простота получения и биосовместимость [246]. • Контроль высвобождения препарата в зависимости от pH и ионной силы среды [286]	• Чувствительность к pH и ионной силе, что может приводить к преждевременной диссоциации [246; 286]. • Ограниченная нагрузка гидрофобных препаратов из-за полярности полиэлектролитов [286]
Полимерные мицеллы	Коллоидные частицы (5–150 нм), образующиеся при самосборке амфифильных блок-сополимеров [219]	• Простота изготовления и высокая нагрузка гидрофобных препаратов [219]. • Уменьшение побочных эффектов за счет таргетинга на опухоли [198]	• Низкая стабильность <i>in vivo</i> (диссоциация при разведении) [219]. • Ограниченная эффективность для системной доставки [73; 198]
Липосомы	Сферические везикулы (25–2500 нм) на основе фосфолипидов, способные инкапсулировать гидрофильные и гидрофобные препараты [220].	• Биоразлагаемость и низкая токсичность [220]. • Увеличение периода полувыведения (например, липосомальный доксорубицин) [289]	• Физическая нестабильность (агрегация, утечка препарата) [220; 289]. • Ограниченное время хранения в жидкой форме [289]
Гидрогели / Взаимопроникающие полимерные сети (ВППС)	Объемные трёхмерные полимерные сети, способные удерживать большое количество воды или биологических жидкостей. ВППС – структуры, в которых две или более полимерные сети проникают друг в друга на молекулярном уровне [262; 263]	• Высокая биосовместимость и способность к набуханию [130]. • Возможность пролонгированного и контролируемого высвобождения ЛС [199; 262]. • «Умный» ответ на внешние стимулы (pH, температура) для таргетной доставки [263]. • Широкие возможности настройки физических свойств (пористость, эластичность) при использовании синтетических полимеров [130]. • Клиническое применение в онкологии (например, SpaceOAR® для защиты тканей при лучевой терапии, Vantas® для гормональной терапии) [130; 199]	• Ограниченная механическая прочность у некоторых составов. • Сложность инкапсуляции гидрофобных ЛС. • Для некоторых природных гидрогелей – сложность стандартизации и риск иммуногенности [130]

1.4. Различные системы доставки на основе 5-фторурацила

Введение систем направленной доставки 5-ФУ является важнейшим шагом в преодолении ключевых недостатков этого классического химиотерапевтического средства – его низкой селективности, высокой системной токсичности и короткого периода полувыведения. В последние годы был достигнут значительный прогресс в разработке разнообразных наноразмерных носителей, способных обеспечить контролируемое высвобождение ЛС и его адресную доставку в опухолевую ткань.

Одним из перспективных направлений являются полимерные наночастицы. Наночастицы на основе природных полимеров, таких как альгинат, в комбинации со слоистыми двойными гидроксидами, формируют системы с выраженным pH-зависимым высвобождением, что повышает селективность действия в кислом микроокружении опухоли [131]. Наночастицы на основе окисленного альгината натрия также показывают эффективную инкапсуляцию и контролируемое высвобождение 5-ФУ [277].

Широко исследуются неорганические наносистемы. Наночастицы золота, благодаря своим уникальным Физико-химическим свойствам, служат эффективными платформами для адсорбции и доставки 5-ФУ [122]. Системы на основе оксидов металлов демонстрируют синергетический противоопухолевый эффект. Например, «зеленый» синтез наночастиц оксида меди (CuO) с последующим их включением в гели на основе пектина и ксантановой камеди создает эффективную местную терапевтическую стратегию против рака шейки матки [99]. Комбинированные наночастицы CuO-ZnO , инкапсулированные в pH-чувствительные желатиновые нанокапсулы, значительно снижают показатель IC_{50} для клеток HeLa по сравнению с отдельными компонентами, подтверждая комбинированный механизм действия [100]. Мезопористые наночастицы диоксида кремния, функционализированные аминогруппами и покрытые полидопамином, реализуют стратегию «умной» доставки, высвобождая 5-ФУ в ответ на кислый pH опухолевой среды [81]. Магнитные наночастицы, нагруженные 5-ФУ и экстрактами пчелиной пыльцы, открывают

мультифункциональный подход, сочетающий противоопухолевую, антиоксидантную и пребиотическую активность, что особенно актуально для лечения колоректального рака на фоне дисбиоза [149]. Более традиционные желатиновые микросферы доказали свою эффективность в увеличении концентрации 5-ФУ в легких *in vivo* по сравнению со свободной формой препарата [134].

Липидные наноносители, такие как ниосомы и липосомы, остаются важным инструментом для улучшения фармакокинетики 5-ФУ. Исследования показывают, что метод приготовления ниосом (например, тонкослойная гидратация) существенно влияет на эффективность инкапсуляции, размер частиц и, как следствие, на продолжительность цитотоксического действия *in vitro* [280]. Липосомальные формы 5-ФУ обеспечивают статистически значимое накопление ЛС в опухолевой ткани, что было продемонстрировано в фармакокинетических исследованиях [290].

Отдельного внимания заслуживают гидрогелевые системы для локальной терапии. Так, наногели на основе полиэтиленгликоля (PEG) успешно применяются для сочетанной доставки 5-ФУ и лейковорина, демонстрируя стабильность и чувствительность к pH среде толстой кишки, что подтверждается *in vitro* и *in vivo* исследованиями [208]. Динамические гидрогели на основе полиглицидола/полиакриламида, способные к самовосстановлению, создают непрерывный резервуар для 5-ФУ, обеспечивая эффективную монотерапию против рака шейки матки без увеличения общей токсичности [125].

Важным достижением стало создание биоразлагаемых систем на основе бактериальной наноцеллюлозы для лечения колоректального рака, которые сочетают в себе биосовместимость и контролируемое высвобождение [201]. Также перспективна стратегия сочетанной доставки 5-ФУ с другими химиотерапевтическими агентами (например, паклитакселом или доксорубицином) в составе единого наноносителя, что позволяет преодолевать резистентность и снижать терапевтические дозы [283].

Кроме использования биополимеров и стратегий комбинированной доставки, значительный научный интерес представляет разработка систем

на основе синтетических полимеров с заданными свойствами, в частности полиэлектролитов.

Актуальность создания новых систем доставки 5-ФУ на основе синтетических полиэлектролитов, в частности полианионов, таких как ПМАК или её сополимеров, обусловлена их уникальным двойным механизмом действия. Во-первых, эти полимеры, обладая выраженными рН-зависимыми свойствами, способны обеспечить контролируемое и направленное высвобождение 5-ФУ в кислой среде опухоли, что подтверждается исследованиями аналогичных систем. Например, гидрогели на основе метакриловой кислоты демонстрируют чёткую реакцию на кислотность внутри опухолевых клеток, регулируемо высвобождая лекарственное средство [209; 232]. Более того, аналогичные полимеры, такие как полиметилметакрилат (ПММА), широко используются в создании носителей для 5-ФУ, демонстрируя повышенное высвобождение ЛС при снижении рН [135; 305]. Во-вторых, и это представляет особый интерес, многие синтетические полианионы, включая ПМАК, обладают собственным, независимым фармакологическим эффектом. Они могут проявлять иммуномодулирующую, противовоспалительную активность. Таким образом, использование подобных полиэлектролитов в качестве основы для носителей позволяет не только решить задачу контролируемой доставки, но и создать комбинированную терапевтическую систему, где полимерная матрица выступает не пассивным носителем, а активным фармакологическим агентом, потенциально усиливая общий противоопухолевый эффект 5-ФУ и преодолевая механизмы лекарственной устойчивости. Этот подход соответствует современной тенденции разработки многофункциональных платформ, объединяющих доставку, контролируемое высвобождение и собственное фармакологическое действие.

Таким образом, современные исследования в области систем доставки 5-ФУ фокусируются на создании многофункциональных, биосовместимых и «интеллектуальных» платформ. Особый интерес в этом контексте представляет разработка систем на основе синтетических полиэлектролитов, таких как ПМАК. Объединение 5-ФУ и ПМАК в единую систему может привести к

синергетическому терапевтическому эффекту, где полимерная матрица будет выступать не просто пассивным носителем, а активным компонентом, модулирующим микроокружение опухоли и усиливающим цитотоксическое действие химиотерапевтического агента. Эти разработки направлены на кардинальное повышение эффективности и безопасности терапии, открывая новые горизонты в лечении онкологических заболеваний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методология исследования

Все работы проводились в соответствии с дизайном исследования (Рисунок 4).



Рисунок 4 – Дизайн исследования

В процессе разработки системы доставки можно выделить пять этапов: информационно-поисковый; исследование токсических и иммуностимулирующих свойств ПМАК; получение и оценка полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК; исследование фармакокинетики и биораспределения полимерного комплекса; оценка влияния ПМАК, полимерного комплекса 5-ФУ на развитие опухолевого процесса *in vivo*.

Первый этап– информационно-поисковый. Проведён всесторонний анализ научной литературы, патентных источников и нормативной документации с использованием современных информационно-поисковых систем, включая PubMed, Scopus, Web of Science, eLibrary и Патентный фонд РФ. Систематизация

и анализ данных позволили обосновать выбор ПМАК в качестве полимерного носителя и сформулировать дизайн исследования.

Второй этап – оценка токсических и иммуностимулирующих свойств ПМАК. Проводилась оценка острой токсичности полимера и его влияния на цитокиновый профиль (IL-6, IL-10, IL-17) методом ИФА, а также исследование влияния ПМАК на развитие опухолевого процесса на ранних стадиях онкогенеза *in vivo*, что в дальнейшем позволило обосновать использование ПМАК в качестве носителя для 5-ФУ.

Третий этап – получение и оценка полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК. Для получения комплекса использован метод жидкофазного синтеза; для характеристики соединения применялись УФ- и ИК-спектроскопия, ЯМР, ВЭЖХ. Проведена валидация методики количественного определения 5-ФУ в составе комплекса методом УФ-спектроскопии. Разработанная методика пригодна для количественного анализа 5-ФУ в составе комплекса при исследовании стабильности и изучении кинетики высвобождения.

Четвёртый этап – сравнительное исследование фармакокинетики и биораспределения разработанного полимерного комплекса 5-ФУ. В качестве референтного препарата использовался коммерческий лекарственный препарат (ЛП) – Фторурацил-ЛЭНС (раствор для внутрисосудистого введения, 50 мг/мл, № 10; производитель ООО «Верофарм», Россия). Для биоаналитических исследований валидирована ВЭЖХ-методика количественного определения 5-ФУ в плазме крови и органах лабораторных животных в соответствии с руководством ICH M10 и Решением Совета ЕЭК № 85. Валидация проведена по показателям селективности, линейности, правильности, прецизионности и оценке влияния переноса. Полученные данные позволили охарактеризовать фармакокинетический профиль и биораспределение полимерного комплекса 5-ФУ в сравнении со свободным препаратом.

Пятый этап – оценка влияния ПМАК и разработанного полимерного комплекса 5-ФУ на развитие опухолевого процесса *in vivo*. Исследование выполнялось на модели злокачественной перевиваемой опухоли РС-1

(холангиоцеллюлярная карцинома крысы). В качестве ключевого маркера иммуностимулирующего действия оценивали динамику концентрации IFN- γ в сыворотке крови лабораторных животных методом ИФА. Противоопухолевую эффективность оценивали по объёму опухолевого узла и массовым коэффициентам опухоли; для расчёта использовали показатель торможения роста опухоли (ТРО). Полученные данные позволили оценить вклад иммуностимулирующего и прямого цитотоксического компонентов в общий противоопухолевый эффект разработанного комплекса.

Статистическая обработка результатов всех этапов исследования проводилась с использованием программ Microsoft Office Excel и IBM SPSS Statistics 27.0.1. Применялись параметрические и непараметрические критерии. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

2.2. Объекты исследования и используемое оборудование

В экспериментальных исследованиях использовались субстанции и вспомогательные вещества, полученные от заводов-изготовителей, имеющие документы, подтверждающие качество и соответствующие требованиям нормативной документации.

Реактивы: вода очищенная (ФС.2.2.0020; pH 5,6–5,9; $\sigma < 0,05$ мкСм/см); ацетонитрил (Fisher Chemical, Китай, $\geq 99,9$ %); аммиак водный (Aldosa, Россия, ОСЧ); метакриловая кислота (Sigma-Aldrich, США, 99 %); фосфатно-солевой буфер (таблетки) pH 7,2-7,6 (ЭКО-Сервис, Россия); калия дигидрофосфат (Aldosa, Россия, ХЧ); динатрия гидрофосфат додекагидрат (Aldosa, Россия, ХЧ); кислота лимонная (Химреактив, Россия, ХЧ); хлористоводородная кислота (Башкирская содовая компания, Россия, ХЧ); этиловый спирт (Кемеровская фармацевтическая фабрика, Россия, 95 %); диэтиловый эфир (Кузбассоргхим, Россия, ЧДА); тетрагидрофуран (Thermoscientific, Китай, 99,5 %); диметилформамид (SriChem, Индия, 99,9 %); ацетон (ХлоренХима, Россия, ХЧ); метиловый спирт (Aldosa, Россия, ОСЧ); раствор натрия хлорида (Solopharm, Россия, 0,9 %); калия бромид

(Spencas, Великобритания, для спектроскопии); трихлоруксусная кислота (Scharlab S. L., Испания, ЧДА); 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин (Merck Life Science, LLC, Германия, номер CAS: 59277-89-3); гидроксид натрия (Вектон, Россия, ХЧ); фосфорная кислота (Fisher Chemical, Китай, $\geq 85,0$ %).

Материалы: диализный мешок M-Cel, MW: 3,5 кДа (Viscose, США).

Основные объекты исследования: ПМАК (синтез – Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского); 5-фторурацил (Shaanxi Dideu Medichem Co. Ltd, Китай, 99 %); Фторурацил-ЛЭНС (раствор для внутрисосудистого введения, 50 мг/мл, № 10; производитель: Верофарм ООО (Россия); полимерный комплекс 5-ФУ.

Наборы ИФА: SEA049Ra ELISA Kit for Interferon Gamma (Cloud-Clone Corp., США), SEA056Ra ELISA Kit for Interleukin 10 (IL-10), 96T (Cloud-Clone Corp., США), SEA063Ra ELISA Kit for Interleukin 17 (IL-17), 96T (Cloud-Clone Corp., США), HEA079Ra High Sensitive ELISA Kit for Interleukin 6 (IL-6), 96T (Cloud-Clone Corp., США).

Перечень оборудования, с помощью которого проведены экспериментальные исследования: установка для получения очищенной воды и воды для инъекций АКВАЛАБ УВОИ-МФ-1812-1 (Россия, Медиана-Фильтр, 2022 год); магнитная мешалка ПЭ-6100 (Россия, ООО «Экротхим», 2017); магнитная мешалка инфракрасная нагревательная WH260-R (Китай, Wiggins GmbH, 2024); реакционная станция параллельного синтеза PRS-6 (Китай, Wiggins GmbH, 2024); лиофильная сушка EV-DF10A в комплекте с форвакуумным насосом (Россия, ERSTEVAK Ltd., 2022); весы неавтоматического действия HR-100AZG (Япония, A&D Company Ltd., 2021); высокоэффективный жидкостной хроматограф LC-20 Prominence (Япония, Shimadzu, 2013); система упаривания и концентрирования SMART EVAPORATOR K4 (Япония, BioChromato, 2022); центрифуга лабораторная ПЭ-6900 (Россия, ООО «Экротхим», 2017); спектрометр ЯМР Bruker Avance III WB 400 МГц (Германия, Bruker Corporation, 2007); комплекс аппаратно-программной для медицинских исследований на базе хроматографа «Хроматэк-Кристалл 5000» (Россия, СКБ Хроматэк, 2022);

инфракрасный Фурье-спектрофотометр IRAffinity-1S (Япония, Shimadzu, 2015); ручной гидравлический мини-пресс Specac (Великобритания, Specac Ltd, 2018); спектрофотометр UV-1800 сканирующий 2-лучевой (Япония, Shimadzu, 2013); стационарный pH-метр FiveEasy pH-meter F20-Std-Kit (Швейцария, Mettler-Toledo GmbH, 2023); климатическая камера с технологией Пельтье HPP110eco (Германия, Memmert, 2022); фармацевтический холодильник Pozis ХФД-280 (Россия, АО «ПОЗиС», 2021); стерилизатор сухожарочный ГП-20 СПУ (Россия, Смоленское СКТБ СПУ, 2021).

2.3. Физико-химические методы исследования

Жидкофазный синтез

Для получения полимерного комплекса 5-ФУ использовался метод жидкофазного синтеза (ЖФС), особенностью которого является жидкая среда протекания реакций. К преимуществам данного метода относится высокая скорость реакций, возможность контролирования температуры, pH, ионной силы и др.

Исходя из предполагаемой стехиометрии взаимодействия, в расчёте использовали 20 мол.% звеньев ПМАК, что с учётом стехиометрии соответствует 10 мол.% связанного 5-ФУ.

Определение количества полимера проводилось по формуле (1):

$$m(5 - \text{ФУ}) = \frac{m(\text{ПМАК}) \cdot 0,2 \cdot M(5 - \text{ФУ})}{M(\text{МАК}) \cdot 2}, \quad (1)$$

где $m(\text{ПМАК})$ – масса взятого полимера, г;

0,2/2 – 10 мол.% по 5-ФУ;

$M(5 - \text{ФУ})$ – молекулярная масса 5-ФУ (130,078 г/моль);

$M(\text{МАК})$ – молекулярная масса остатка метакриловой кислоты (МАК), являющейся мономером ПМАК (86,1 г/моль).

Получение полимерного комплекса 5-ФУ в среде с ацетонитрилом

Для этого 0,2 г (точная навеска) ПМАК помещали в химический стакан и добавляли 10 мл воды очищенной. 0,0151 г (точная навеска) субстанции 5-ФУ помещали в другой химический стакан и добавляли 2 мл ацетонитрила. Раствор ПМАК добавляли в стакан с суспензией 5-ФУ в ацетонитриле, помещали на магнитную мешалку и перемешивали в течение 48 ч. Полученный раствор переливали в чашки Петри или флаконы пенициллиновые и помещали в лиофильную сушилку.

Получение полимерного комплекса 5-ФУ при различных условиях pH среды

Для этого 0,2 г (точная навеска) ПМАК помещали в химический стакан и добавляли 10 мл воды очищенной. После растворения ПМАК, добавляли по каплям раствор аммиака (0,25; 10 %) до достижения нужного значения pH. 0,0151 г (точная навеска) субстанции 5-ФУ добавляли без предварительного растворения в химический стакан с раствором полимера, перемешивали на электромагнитной мешалке в течение 48 ч. Полученный раствор переливали в чашки Петри или флаконы пенициллиновые и помещали в лиофильную сушилку.

Процесс высушивания образцов состоял из двух этапов: предварительная заморозка и сублимационная сушка под вакуумом. Процесс считали завершенным после достижения образцом постоянной массы.

Изучение растворимости полимерных комплексов 5-ФУ

Определение растворимости проводили согласно требованиям ГФ XV издания (ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость») [4]. Испытания проводились при температуре от 24,5 до 25,5 °С. В качестве растворителей использовали разные полярные и неполярные растворители: вода очищенная, спирт этиловый, хлороформ.

Изучение стабильности полимерных комплексов 5-ФУ

Стабильность ЛФ является комплексным показателем, характеризующим способность ЛС сохранять, в первую очередь, исходные Физико-химические свойства в течение установленного срока годности.

Изучение стабильности синтезированного полимерного комплекса проводилось в соответствии с ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности

лекарственных средств» ГФ XV издания [4]. Образцы полимерных комплексов (по 3 шт.) помещали на хранение в разные условия (Таблица 4).

Таблица 4 – Режимы хранения при исследовании стабильности полимерных комплексов 5-ФУ

№, режим хранения	Температура, °С	Относительная влажность, %	Длительность эксперимента, месяц
1. Условия с высокой температурой (климатическая камера с технологией Пельтье HPP110eco)	+70	25	1
2. Условия холодильника (фармацевтический холодильник Pozis ХФД–280)	+3,8	50	2
3. Комнатные условия	+20...+25	20–63	18

По окончании хранения были взяты пробы для визуального анализа, определения растворимости (ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость») [4], а также для УФ- и ИК-спектроскопии (в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» ГФ XV издания [4] и ОФС.1.2.1.1.0002 «Спектрометрия в средней инфракрасной области» ГФ XV издания [4]).

*УФ-спектроскопия*¹

Количественное содержание 5-ФУ в полимерных комплексах, а также степень его высвобождения определяли методом УФ-спектроскопии.

Определение проводилось в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» ГФ XV издания [4].

Поскольку полимерное производное 5-ФУ представляет собой 5-ФУ, связанный водородными связями с карбоксильными группами ПМАК, то для анализа готовили растворы исходных веществ.

Приготовление испытуемых растворов

¹ Автор выражает искреннюю благодарность ассистенту кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Зыковой Дарье Александровне за неоценимую помощь в валидации методики количественного определения 5-фторурацила в составе полимерного комплекса.

0,00083 % раствор 5-ФУ. Точную навеску субстанции 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде, после доводили объем колбы тем же растворителем до метки и перемешивали. Отбирали аликвоту 8,3 мл, переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем колбы растворителем до метки, перемешивали.

Раствор ПМАК 0,01 %. Точную навеску ПМАК (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в воде очищенной и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,01 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в воде очищенной и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Растворы полимерного комплекса 5-ФУ 0,01 %, приготовленные из образцов, хранившихся при температуре 70 °C; 20,0 °C; 3,8 °C. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в воде очищенной и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Ультрафиолетовые спектры поглощения получали с помощью спектрофотометра UV-1800 (Япония, Shimadzu) в пределе длин волн 190-400 нм. У полученных растворов измеряли оптическую плотность при длине волны 265 нм (для определения 5-ФУ) в кювете толщиной 1 см.

Линейная зависимость между поглощением и концентрацией образца позволяет проводить количественное определение. Поэтому, содержание 5-ФУ рассчитывалось также спектрофотометрически, основываясь на законе Бугера – Ламберта – Бэра.

Калибровочная кривая определялась путем измерения поглощения нескольких стандартных растворов известной концентрации.

Приготовление стандартных растворов 5-ФУ для оценки показателя «Линейность»

Стандартный раствор 5-ФУ 0,01 % в водной среде. Точную навеску субстанции 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в воде очищенной и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Стандартный раствор 5-ФУ 0,01 % в среде фосфатного буферного раствора. Точную навеску субстанции 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в фосфатном буферном растворе и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Стандартный раствор 5-ФУ 0,01 % в среде цитратного буферного раствора. Точную навеску субстанции 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в цитратном буферном растворе и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Из каждого из вышеперечисленных стандартных растворов отбирали аликвоту 5 мл и разводили ее в 2 раза. Затем последовательно отбирали по 5 мл из полученных растворов и также разводили в два раза. Всего процедура повторялась 5 раз. Для получения промежуточных концентраций из второго, третьего, четвертого и пятого разведения отбирались аликвоты объемом 3 мл и смешивались с 1,5 мл соответствующего растворителя.

Приготовление испытуемых растворов для оценки показателя «Правильность»

Для оценки правильности методики в диапазоне её применения (80–120 % от номинальной концентрации) были приготовлены три раствора полимерного комплекса 5-ФУ: 0,008 % (80 %), 0,010 % (100 %) и 0,012 % (120 %).

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,008 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в соответствующем растворителе и доводили его объем до метки. Из полученного раствора отбирали аликвоту в объеме 40 мл, переносили в мерную колбу на 50 мл, доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,010 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в соответствующем растворителе и доводили его объем до метки.

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,012 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,012 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в соответствующем растворителе и доводили его объем до метки.

Все перечисленные растворы готовили трижды в различных средах: вода очищенная, фосфатный буферный раствор (рН 7,4) и цитратный буферный раствор (рН 5,1).

Приготовление испытуемых растворов для оценки показателя «Прецизионность»

Для оценки повторяемости (сходимости) методики в трех различных средах готовили серии растворов. Для каждого растворителя – воды очищенной, фосфатного буферного раствора (рН 7,4) и цитратного буферного раствора (рН 5,1) – было приготовлено по шесть параллельных 0,01 % растворов полимерного комплекса 5-ФУ.

Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в соответствующем растворителе и доводили его объем до метки.

Все 18 растворов анализировали параллельно.

Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность оценивали путем сравнения результатов, полученных двумя разными исследователями в разные дни. Каждый исследователь готовил и анализировал по три серии растворов трех концентраций: 0,008 % (нижний уровень), 0,010 % (средний уровень) и 0,012 % (верхний уровень) в каждом из трех растворителей (вода очищенная, фосфатный буферный раствор (рН 7,4), цитратный буферный раствор (рН 5,1)).

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,008 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в соответствующем растворителе и доводили его объем до

метки. Из полученного раствора отбирали аликвоту в объеме 40 мл, переносили в мерную колбу на 50 мл, доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,010 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,01 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в соответствующем растворителе и доводили его объем до метки.

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,012 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,012 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в соответствующем растворителе и доводили его объем до метки.

Для каждой концентрации выполняли по 6 параллельных определений.

Оптическая плотность приготовленных растворов полимерного комплекса 5-ФУ в разных средах измерялась при длинах волн от 264–268 нм ($n = 5$), в зависимости от рН среды и от использованного буферного раствора.

Содержание 5-ФУ вычисляли по уравнениям калибровочных кривых (формула 2):

$$X = \frac{A}{b}, \quad (2)$$

где X – содержание 5-ФУ, мг/мл;

A – оптическая плотность, усл. ед.;

b – коэффициент линейной регрессии соответствующей калибровочной кривой.

Предложенная методика количественного определения 5-ФУ в полимерном комплексе валидирована в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методик» (ГФ XV ОФС.1.1.0012) по показателям специфичности, линейности, правильности, прецизионности [повторяемость (сходимость), промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность] [4].

ИК-спектроскопия

Проводилась согласно ОФС.1.2.1.1.0002 «Спектрометрия в средней инфракрасной области» ГФ XV издания [4].

Исследованию данным методом подвергались: субстанция 5-ФУ, ПМАК, полимерные комплексы 5-ФУ.

Подготовка фонового образца

Спектроскопически чистый KBr тщательно измельчали в агатовой ступке до получения однородного порошка. Полученную смесь помещали в пресс-форму и прессовали под давлением 1,5 тонны, используя ручной гидравлический мини-пресс Specac (Великобритания, Specac Ltd).

После получения фонового образца проводили сканирование фона для учета возможных примесей.

Подготовка испытуемого образца

Анализируемое вещество тщательно смешивалось со спектроскопически чистым KBr в агатовой ступке до получения однородного порошка. Полученную смесь помещали в пресс-форму и прессовали под давлением 1,5 тонны, используя ручной гидравлический мини-пресс Specac (Великобритания, Specac Ltd). На выходе получали прозрачную таблетку, готовую для дальнейшего анализа.

Для снятия ИК-спектра таблетка фиксировалась в держателе, а затем проводилось сканирование.

Инфракрасные спектры поглощения снимали с помощью инфракрасного Фурье-спектрофотометра IRAffinity-1S (Япония, Shimadzu). Диапазон сканирования: 4000–400 см⁻¹; число сканов – 45.

¹H ЯМР-спектроскопия²

¹H ЯМР-спектроскопия проводилась для подтверждения строения синтезированной ПМАК, субстанции 5-ФУ, а также для доказательства образования полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК. Анализ выполнялся в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XV издания (ОФС.1.2.1.1.0007 «Спектрометрия ядерного магнитного резонанса») [4].

² Автор выражает искреннюю благодарность доктору химических наук, доценту кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Османову Владимиру Кимовичу за неоценимую помощь в проведении ЯМР-спектроскопии, квалифицированную интерпретацию полученных данных и ценные консультации при подтверждении строения синтезированных соединений.

Подготовка испытуемых образцов

Навеску анализируемого вещества (10–20 мг) растворяли в 0,7 мл дейтерированного диметилсульфоксида (DMSO-d_6) в вials для ЯМР-спектроскопии. Раствор тщательно перемешивали до полного растворения образца. При необходимости проводили фильтрование раствора для удаления механических примесей. Полученный раствор переносили в стандартный ЯМР-спектрометр (5 мм) и помещали в магнитное поле спектрометра.

Регистрацию ^1H ЯМР-спектров проводили на спектрометре ядерного магнитного резонанса Bruker Avance III WB 400 МГц (Германия, Bruker Corporation, 2007). Рабочая частота для протонов составляла 400 МГц. Химические сдвиги (δ) измеряли в миллионных долях (м. д.) относительно сигнала остаточного протона растворителя DMSO-d_6 (δ 2,50 м. д.) в качестве внутреннего стандарта.

Регистрацию спектров осуществляли при температуре 298 К. Для подавления шумов и улучшения соотношения сигнал/шум проводили накопление 16 сканов. Обработку полученных спектров (коррекцию фазового угла, выравнивание базовой линии, интегрирование сигналов) выполняли с использованием программного обеспечения MestReNova (версия: 6.0.2–5475).

Потенциометрическое определение рН

Водородный показатель рН для полимерного комплекса определялся в соответствии с ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия» ГФ XV издания [4]. В качестве прибора для потенциометрического определения рН использовался стационарный рН-метр FiveEasy рН-meter F20-Std-Kit (Швейцария, Mettler-Toledo GmbH).

Приготовление раствора для определения рН

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,4 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,1 г) помещали в мерную колбу на 25 мл, растворяли в воде очищенной при перемешивании, доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Затем измеряли значение рН полученного раствора.

Раствор ПМАК 0,4 %. Точную навеску ПМАК (~0,1 г) помещали в мерную колбу на 25 мл, растворяли в воде очищенной при перемешивании, доводили

объем раствора тем же растворителем до метки. Затем измеряли значение pH полученного раствора.

Буферные растворы. Отмеряли 20 мл буферного раствора, перемешивали на магнитной мешалке, измеряли значение pH.

Диализ

Приготовление растворов

Фосфатный буферный раствор pH 7,4 (ФБ). 1 таблетку фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) помещали в химический стакан, прибавляли 100 мл воды очищенной, перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения, отбирали аликвоту в объеме 20 мл, измеряли значение pH, полученное значение соответствовало заявленному (pH 7,4).

Цитратный буферный раствор pH 5,1 (ЦБ). В мерную колбу вместимостью 1 000 мл вносили следующие точные навески: дигидрофосфата натрия 12-водного (~36,520 г), лимонной кислоты (~9,605). К смеси солей приливали приблизительно 500 мл воды очищенной и перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения. Объем раствора доводили водой до метки и тщательно перемешивали. Значение pH полученного буфера измеряли потенциометрически. При необходимости pH доводили до 5,1, по каплям добавляя 10 % раствор хлористоводородной кислоты.

Хлористоводородная кислота 10 %. В мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую примерно 65 мл воды очищенной, осторожно, при охлаждении и перемешивании, приливали 28,0 г концентрированной хлористоводородной кислоты. После охлаждения до комнатной температуры объем раствора доводили водой до метки и тщательно перемешивали.

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,1 %. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (~0,1 г) количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, растворяли в небольшом количестве соответствующего буферного раствора и доводили объем тем же растворителем до метки.

Условия диализа

Исследование кинетики высвобождения проводили методом диализа через полупроницаемую мембрану, вырезанную из диализного мешка M-Cel (MW: 3,5 кДа). В донорный отсек диализной ячейки помещали 0,1 % раствор полимерного комплекса в буферном растворе. В акцепторный отсек заливали чистый буферный раствор соответствующего pH. Собранную ячейку помещали в термостат при 37 °С.

Отбор проб и анализ

Через заданные временные интервалы (1, 2, 3, 7, 22, 30, 50, 74, 146 ч) проводили полную замену буфера в акцепторном отсеке: весь объём отбирали шприцем и замещали равным объёмом свежего подогретого буфера.

Собранные пробы немедленно анализировали методом УФ-спектроскопии для количественного определения концентрации свободного 5-ФУ, диффундировавшего через мембрану.

Высокоэффективная жидкостная хроматография³

Валидацию ВЭЖХ-методики количественного определения 5-ФУ в плазме крови лабораторных животных проводили в соответствии с руководством ICH M10 «Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis» [151] и Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 85 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [28].

Условия хроматографирования

Хроматографическая система: ВЭЖ хроматограф LC-20 Prominence (Япония, Shimadzu) в обращено-фазовом режиме с двухплунжерным насосом градиента низкого давления (LC-20AD), термостатом колонки (СТО-20АС), контроллером (СВМ-20А) и матричным фотодиодным детектором УФ и видимого спектров (SPD-M20А).

³ Автор выражает искреннюю благодарность кандидату фармацевтических наук, доценту кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Воробьевой Ольге Александровне за неоценимую помощь в валидации ВЭЖХ-методики количественного определения 5-фторурацила в плазме крови лабораторных животных, ценные рекомендации при интерпретации полученных данных и всестороннее содействие на всех этапах выполнения работы.

Колонка – Hawach® XChroma™ HPLC Column C18-Low PH, 5 µm particle size, 120 Å, length x I.D. 25 cm × 4.6 mm.

Обработка данных – LCsolution.

Поток – 1 мл/мин.

Подвижная фаза – раствор трихлоруксусной кислоты с pH = 3,1.

УФ детектор – 265 нм.

Температура – 40 °C.

Объём вводимой пробы 20 µл.

Приготовление подвижной фазы

Раствор трихлоруксусной кислоты с pH 3,1. Точную навеску трихлоруксусной кислоты (~0,093 г) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяли в воде очищенной и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. При необходимости pH полученного раствора доводили до 3,1, добавляя по каплям 0,5 % раствор трихлоруксусной кислоты.

0,5 % раствор трихлоруксусной кислоты. Точную навеску трихлоруксусной кислоты (~0,5 г) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде очищенной и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Приготовление стандартных растворов

Раствор полимерного комплекса 5-ФУ 0,0055 %

Растворы полимерного комплекса 5-ФУ готовили поэтапно методом последовательного разведения.

Раствор А. Точную навеску полимерного комплекса 5-ФУ (масса комплекса 1,4286 г, содержание 5-ФУ в пересчете составляет 0,1 г) растворили в 10 мл горячей воды очищенной.

Раствор Б. 1 мл раствора А поместили в мерную колбу объемом 100 мл, довели объем до метки водой очищенной.

Раствор В. К 0,2 мл раствора Б прибавили 5 мл воды очищенной.

Приготовление рабочих растворов

Приготовление рабочих растворов стандарта осуществляли по схеме, представленной в таблице 5.

Приготовление раствора внутреннего стандарта (2-амино-9-((2-гидроксиэтокси)метил)-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он) 0,001 %

Растворы внутреннего стандарта готовили поэтапно методом последовательного разведения.

Раствор А. Точную навеску субстанции внутреннего стандарта (0,1000 г) помещали в мерную колбу объемом 100 мл, растворяли в горячей воде очищенной, доводили объем мерной колбы водой очищенной до метки.

Раствор Б. К 0,1 мл раствора А прибавляли 10 мл воды очищенной.

Таблица 5 – Условия приготовления рабочих растворов внутреннего стандарта методом последовательного разведения

Номер рабочего раствора	Раствор В, мл	Вода очищенная, мл	Концентрация 5-ФУ в растворе, мкг/мл
I	0,008	1,992	0,0151
II	0,350	1,650	0,6598
III	0,620	1,380	1,1687
IV	0,890	1,110	1,6777
V	1,160	0,840	2,1866
VI	1,350	0,650	2,5448

Приготовление модельных смесей

К 0,1 мл чистой плазмы прибавляли 2 мкл соответствующего рабочего раствора полимерного комплекса и 2 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта.

Пробоподготовка образцов

К каждой модельной смеси прибавляли 0,5 мл ацетонитрила для хроматографии, перемешивали, центрифугировали при 3 000 об./мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, упаривали в концентраторе проб (Япония, BioChromato) досуха при комнатной температуре, сухой остаток растворяли

в 100 мкл подвижной фазы при нагревании. Полученную пробу хроматографировали трижды.

*Газовая хроматография*⁴

Исследование на остаточные органические растворители (ОР)

Поскольку ПМАК представляет собой продукт полимерного синтеза, в ходе которого используются ОР, то возникает необходимость контроля остаточных растворителей в конечном продукте.

Анализу на остаточные растворители были подвергнуты образцы ПМАК, полученные в ходе исследования.

Подготовка образцов

Точные навески испытуемых образцов (~0,2 г) количественно переносили в мерные колбы вместимостью 50 мл. Образцы растворяли в воде очищенной и доводили объём раствора тем же растворителем до метки, получая исходные растворы. Для анализа из каждого раствора отбирали аликвоту объёмом 2,0 мл, которую переносили в вials.

Анализ проводился на базе хроматографа «Хроматэк-Кристалл 5000» (Россия, СКБ Хроматэк). Параметры дозатора равновесного пара: 110 °С – нагрев вials (5 мл образца), 120 °С – нагрев шприца.

Приготовление растворов ОР для качественного подтверждения их присутствия в образце

В качестве ОР были выбраны: этиловый спирт (ЭС) – использовался для процесса переосаждения при синтезе полимера; диэтиловый эфир (ДЭ) – использовался для процесса переосаждения при синтезе полимера; тетрагидрофуран (ТГФ) – использовался для удаления концевой группы агента после синтеза полимера, диметилформамид (ДМФА) – использовался как растворитель при процессе полимеризации.

⁴ Автор выражает искреннюю благодарность инженеру кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Грубовой Елизавете Владимировне за неоценимую помощь в валидации методик количественного определения остаточной метакриловой кислоты и остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии, а также за содействие в проведении аналитических исследований.

Заданный объём чистого органического растворителя (Таблица 6) вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл с помощью дозатора. Объём раствора доводили водой очищенной до метки при комнатной температуре и тщательно перемешивали. Из каждого полученного раствора отбирали аликвоту 2,0 мл для анализа и помещали в виалу.

Таблица 6 – Составы стандартных водных растворов органических растворителей

Водный раствор	Исходный растворитель	Объём, вносимый в колбу, мкл
ДЭ 0,4 %	Диэтиловый эфир, 99,5 %	402
ЭС 0,4 %	Этиловый спирт, 95 %	421
ТГФ 0,4 %	Тетрагидрофуран, 99,5 %	402
ДМФА 0,4 %	Диметилформамид, 99,9 %	400,4

Приготовление растворов для валидации методики

Валидацию проводили для методик количественного определения остаточных органических растворителей: ЭС, ДЭ и ТГФ.

Приготовление стандартных растворов ОР для оценки показателя «Специфичность»

Заданный объём чистого органического растворителя (Таблица 7) вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл с помощью дозатора. Объём раствора доводили водой очищенной до метки при комнатной температуре и тщательно перемешивали. Из каждого полученного раствора отбирали аликвоту 2,0 мл для анализа и помещали в виалу.

Таблица 7 – Составы стандартных водных растворов органических растворителей

Водный раствор	Исходный растворитель	Объём, вносимый в колбу, мкл
ДЭ 0,4 %	Диэтиловый эфир, 99,5 %	402
ЭС 0,4 %	Этиловый спирт, 95 %	421
ТГФ 0,4 %	Тетрагидрофуран, 99,5 %	402

Приготовление стандартных растворов ОР для оценки показателя «Линейность»

Водные растворы органических растворителей заданной концентрации готовили последовательным разбавлением в мерных колбах (Таблица 8). Рассчитанный объем растворителя вносили в мерную колбу дозатором, после чего доводили объем раствора водой очищенной до метки при комнатной температуре и тщательно перемешивали. Из каждого полученного раствора отбирали аликвоту 2,0 мл для анализа и помещали в виалу.

Таблица 8 – Составы стандартных водных растворов органических растворителей для построения калибровочных кривых

Водный раствор	Исходный растворитель	Объем, вносимый в колбу, мкл	Объем мерной колбы, мл
ЭС 0,0004 %	Этиловый спирт, 95 %	0,84	200
ЭС 0,0005 %		1,05	
ЭС 0,001 %		1,05	
ЭС 0,002 %		2,11	100
ЭС 0,003 %		3,16	
ДЭ 0,0005 %	Диэтиловый эфир, 99,5 %	1	200
ДЭ 0,001 %		1	100
ДЭ 0,005 %		5	
ДЭ 0,01 %		10	
ДЭ 0,016 %		16	
ТГФ 0,0001 %	Тетрагидрофуран, 99,5 %	1	1000
ТГФ 0,0002 %		1	500
ТГФ 0,0003 %		1,5	
ТГФ 0,0004 %		2	
ТГФ 0,0005 %		2,5	

Учитывая низкое значение требуемых концентраций водных растворов (0,000000044 % ДЭ, 0,00000014 % ТГФ, 0,00000019 % ЭС), их приготовление проводили методом последовательного разбавления.

Водный раствор ДЭ 0,000000044 %

Раствор А. 1 мкл ДЭ вносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводили объем дистиллированной водой до метки. Концентрация полученного промежуточного раствора (раствор А) составила 0,0001 %.

Раствор Б. 100 мкл полученного раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и вновь доводили объем водой до метки. В результате получали целевой раствор с концентрацией 0,0000001 %.

Раствор В. 44 мл полученного раствора Б переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и вновь доводили объем водой до метки. В результате получали целевой раствор с концентрацией 0,000000044 %.

Водный раствор ТГФ 0,00000014 %

Раствор А. 1 мкл ТГФ вносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводили объем дистиллированной водой до метки. Концентрация полученного промежуточного раствора (раствор А) составила 0,0001 %.

Раствор Б. 140 мкл полученного раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и вновь доводили объем водой до метки. В результате получали целевой раствор с концентрацией 0,00000014 %.

Водный раствор ЭС 0,00000019 %

Раствор А. 1,05 мкл ЭС вносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводили объем дистиллированной водой до метки. Концентрация полученного промежуточного раствора (раствор А) составила 0,0001 %.

Раствор Б. 190 мкл полученного раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и вновь доводили объем водой до метки. В результате получали целевой раствор с концентрацией 0,00000019 %.

Приготовление испытуемых растворов для оценки показателя «Правильность»

Водные растворы органических растворителей заданной концентрации готовили последовательным разбавлением в мерных колбах (Таблица 9). Рассчитанный объем растворителя вносили в мерную колбу дозатором, после чего доводили объем раствора водой очищенной до метки при комнатной температуре и тщательно перемешивали. Из каждого полученного раствора отбирали аликвоту 2,0 мл для анализа и помещали в виалу.

Приготовление водных растворов 0,000000044 % ДЭ, 0,00000014 % ТГФ и 0,00000019 % ЭС проводили аналогично приготовлению стандартных растворов для оценки показателя «Линейность», описанной выше. Каждый из растворов готовили трижды.

Таблица 9 – Составы стандартных водных растворов органических растворителей для оценки показателя «Правильность»

Водный раствор	Исходный растворитель	Объём, вносимый в колбу, мкл	Объем мерной колбы, мл
ЭС 0,00253 %	Этиловый спирт, 95 %	2,53	100
ЭС 0,00300 %		3,157	
ДЭ 0,00280 %	Диэтиловый эфир, 99,5 %	2,8	
ДЭ 0,00336 %		3,36	
ТГФ 0,00032 %	Тетрагидрофуран, 99,5 %	3,2	
ТГФ 0,00038 %		3,8	

Приготовление испытуемых растворов для оценки показателя «Повторяемость»

Водные растворы органических растворителей заданной концентрации готовили последовательным разбавлением в мерных колбах (Таблица 10). Рассчитанный объём растворителя вносили в мерную колбу дозатором, после чего доводили объём раствора водой очищенной до метки при комнатной температуре и тщательно перемешивали. Из каждого полученного раствора отбирали аликвоту 2,0 мл для анализа и помещали в виалу.

Таблица 10 – Составы стандартных водных растворов органических растворителей для оценки показателя «Повторяемость»

Водный раствор	Исходный растворитель	Объём, вносимый в колбу, мкл	Объем мерной колбы, мл
ЭС 0,00253 %	Этиловый спирт, 95 %	2,66	100
ДЭ 0,00280 %	Диэтиловый эфир, 99,5 %	2,8	
ТГФ 0,00032 %	Тетрагидрофуран, 99,5 %	3,2	1000

Процедуру для каждого растворителя повторяли 6 раз.

Приготовление испытуемых растворов для оценки показателя «Прецизионность»

Испытуемые растворы для оценки показателя «Прецизионность» готовили в соответствии с методикой, использованной при определении правильности. Процедуру выполняли независимо два исследователя для трех концентраций каждого ОР (Таблица 9). Для каждой концентрации каждый исследователь приготовил по шесть параллельных проб.

Для количественного определения ОР в составе ПМАК анализ проводился на пламенно-ионизационном детекторе (ПИД) в паровой фазе (Таблица 11).

Таблица 11 – Режим анализа ПМАК на ПИД на предмет ОР, МАК

Инструментальный метод	Остаточные органические растворители	Остаточный мономер (МАК)
Канал старта – 1		
Время анализа, мин	24	21,357
Время продувки, мин	0	0
Время стабилизации, мин	0	0
Порт ввода – 1		
Режим ввода пробы	С делением	С делением
Деление потока	30	30
Предстарт	Выкл.	Выкл.
Порт ввода – 1		
Расход сбросной, мл/мин	15,0	15,0
Обдув мембраны, мл/мин	5,0	5,0
Температура, °С	200,0	200,0
Порт ввода – 2		
Режим ввода пробы	Без деления, с экономией газа	Без деления, с экономией газа
Предстарт	Выкл.	Выкл.
Расход сбросной, мл/мин	(0; 1)(0; 30; 3)(200; 10; 0,0)	(0; 1)(0; 30; 3)(200; 10; 0,0)
Обдув мембраны, мл/мин	(0; 1)(0; 3; 0,0)	(0; 1)(0; 3; 0,0)
Температура, °С	250,0	250,0
Клапан – 1		
Предстарт	Выкл.	Выкл.
Время переключения, мин	(Выкл.; 0)	(Выкл.; 0)
Клапан – 2		
Предстарт	Вкл.	Вкл.
Время переключения, мин	(Вкл.; 1)	(Вкл.; 1)
Колонка – 1		
Поток, мл/мин	0,500	0,500
Режим газа-носителя	Постоянный поток	Постоянный поток
Колонка – 2		
Поток, мл/мин:	1,000	1,000
Режим газа-носителя	Постоянный поток	Постоянный поток
ПИД – 1		
Температура, °С	250	250
Расход воздуха, мл/мин	250	250
Расход водорода, мл/мин	25	25
Расход поддувного газа, мл/мин	25	25
Термостат колонок	1	1
Температура, °С	(30; 10) (20; 210; 5)	(30; 1) (20; 180; 0) (35; 280; 10)
Порт ввода – 3		
Экономия газа	Выкл.	Выкл.
Порт ввода – 4		
Экономия газа	Выкл.	Выкл.

Шум хроматографической системы, измеренный на хроматограмме холостой пробы, составил 0,0002485. Данное значение использовали для расчета пределов обнаружения (ПО) и предварительной оценки пределов количественного определения (ПКО) для всех определяемых компонентов (МАК, ДЭ, ТГФ, ЭС) по формулам (3), (4), (5).

Расчет пределов обнаружения (ПО) и количественного определения (ПКО)

Для газохроматографических методик количественного определения (остаточный мономер МАК, остаточные органические растворители) предел обнаружения (ПО) рассчитывали на основе соотношения сигнал/шум (S/N), принимая критерий $S/N \geq 3$ в качестве условия надежного обнаружения аналита. Шум хроматографической системы определяли по хроматограмме холостой пробы на приборе.

Минимальный детектируемый сигнал ($S_{\text{мин}}^{\text{ПО}}$) рассчитывали по формуле (3):

$$S_{\text{мин}}^{\text{ПО}} = 3 \cdot \text{шум}, \quad (3)$$

Значение ПО (формула 4) в единицах концентрации находили путем подстановки $S_{\text{мин}}^{\text{ПО}}$ в уравнение калибровочного графика $y = b \cdot x$:

$$\text{ПО} = \frac{3 \cdot \text{шум}}{b}, \quad (4)$$

где b – коэффициент регрессии (чувствительность);

Значение ПКО оценивали аналогичным образом, используя критерий $S/N \geq 10$ (формула 5):

$$\text{ПКО} = \frac{10 \cdot \text{шум}}{b}, \quad (5)$$

Полученное значение ПКО принимали в качестве нижней границы рабочего диапазона для количественного определения.

Подготовка образцов и очистка ПМАК от ОР

Было использовано 2 метода:

Образец ПМАК для высушивания с помощью стерилизатора сухожарочного.

Сухой образец ПМАК, содержащий следы тетрагидрофурана и других ОР, помещали на чашку Петри, накрывали перфорированной плёнкой для

контролируемого испарения. Образцы помещали в сушильный шкаф, нагретый до температуры, близкой к точке кипения тетрагидрофурана (66 °C).

Образец ПМАК для высушивания с помощью лиофильной сушилки EV-DF10A в комплекте с форвакуумным насосом.

Водный раствор ПМАК заливали в чашки Петри и подвергали лиофильной сушке на установке EV-DF10A. Процесс состоял из двух этапов: 1) глубокая заморозка до -40...-50 °C; 2) сублимационная сушка под вакуумом. Критерием завершения процесса служило достижение образцом постоянной массы.

Исследование на остаточный мономер (ОМ)

ОМ представляют собой непрореагировавшие исходные вещества, сохраняющиеся в полимерной матрице после завершения синтеза. ОМ для ПМАК служит МАК.

Основным методом анализа ОМ также является ГХ.

Аналізу на ОМ были подвергнуты образцы ПМАК.

Подготовка образцов

Точную навеску испытуемого образца (~0,2 г) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в воде очищенной и доводили объём раствора тем же растворителем до метки. Для анализа отбирали аликвоту объёмом 5,0 мл и переносили её в виалу.

Для обнаружения и количественного определения МАК в составе ПМАК анализ проводился на пламенно-ионизационном детекторе (ПИД) в паровой фазе. Хроматографические условия для определения остаточного мономера приведены в таблице 11 [столбец «Остаточный мономер (МАК)»].

Приготовление растворов для валидации методики

Приготовление стандартного раствора мономера для оценки показателя «Специфичность»

В качестве стандарта использовался раствор МАК.

В мерную колбу на 100 мл вносили 404 мкл раствора МАК, объём раствора доводили до метки водой очищенной. Полученный раствор перемешивали, отбирали аликвоту 5 мл и помещали в виалу.

Приготовление стандартных растворов МАК для оценки показателя «Линейность»

Водные растворы органических растворителей с заданной концентрацией остаточного мономера готовили методом последовательного разбавления в мерных колбах (Таблица 12). Рассчитанный объем растворителя вносили в мерную колбу с помощью дозатора, затем доводили объем раствора водой очищенной до метки при комнатной температуре и тщательно перемешивали. Из каждого полученного раствора отбирали аликвоту объемом 5,0 мл для анализа и помещали её в виалу.

Таблица 12 – Составы стандартных водных растворов МАК для построения калибровочной кривой

Водный раствор	Исходный реактив	Объем, вносимый в колбу, мкл	Объем мерной колбы, мл
МАК 0,0005 %	Метакриловая кислота, 99 %	1	200
МАК 0,001 %		1	100
МАК 0,002 %	Метакриловая кислота, 99 %	2	100
МАК 0,004 %		4	
МАК 0,008 %		8	

Приготовление 0,00000075 % водного раствора МАК проводили методом последовательного двухстадийного разбавления:

Раствор А. 1 мкл МАК вносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводили объем дистиллированной водой до метки. Концентрация полученного промежуточного раствора (раствор А) составила 0,0001 %.

Раствор Б. 750 мкл полученного раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем водой до метки. В результате получали целевой раствор с концентрацией 0,00000075 %.

Приготовление испытуемых растворов для оценки показателя «Правильность»

Водные растворы органических растворителей заданной концентрации готовили последовательным разбавлением в мерных колбах (Таблица 13). Рассчитанный объем растворителя вносили в мерную колбу дозатором, после чего

доводили объём раствора водой очищенной до метки при комнатной температуре и тщательно перемешивали. Из каждого полученного раствора отбирали аликвоту 2,0 мл для анализа и помещали в виалу.

Таблица 13 – Составы стандартных водных растворов МАК для оценки показателя «Правильность»

Водный раствор	Исходный реактив	Объём, вносимый в колбу, мкл	Объём мерной колбы, мл
МАК 0,0024 %	Метакриловая кислота, 99 %	2,4	100
МАК 0,0027 %		2,7	

Приготовление 0,00000075 % водного раствора МАК проводили аналогично приготовлению стандартного раствора МАК для оценки показателя «Линейность», описанной выше. Каждый из растворов готовился трижды.

Приготовление испытуемых растворов для оценки показателя «Повторяемость»

В мерную колбу вместимостью 100 мл дозатором вносили 2,4 мкл исходного мономера (метакриловая кислота, 99 %), доводили объём раствора водой очищенной до метки при комнатной температуре и тщательно перемешивали.

Процедуру повторяли 6 раз.

Приготовление испытуемых растворов для оценки показателя «Прецизионность»

Приготовление растворов МАК проводили аналогично приготовлению стандартных растворов МАК для оценки показателя «Правильность» (Таблица 13). Процедуру выполняли независимо два исследователя для трех концентраций: 0,00000075; 0,0024; 0,0027 %. Для каждой концентрации каждый исследователь приготовил по шесть параллельных проб.

2.4. Фармакологические методы исследования⁵

Эксперименты проводились на аутбредных лабораторных крысах Wistar. Животные содержались в сертифицированной виварии ЦДИ ИФМ ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России согласно требованиям санитарно-эпидемиологических правил СП 2.2.1.3218–14. Эксперименты выполнялись согласно международным правилам «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011), отвечая требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Общее количество задействованных животных – 103.

Критерии включения животных в исследование: здоровые животные крысы линии Wistar массой 180–220 г.

Критерии исключения животных из исследования: больные животные, животные с поврежденным кожным покровом, животные весом более 220 г и менее 180 г.

Перед проведением эксперимента лабораторные животные находились на карантине в течение 14 дней.

Животные были выращены в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, и естественном чередовании суточного освещения.

В процессе экспериментов у лабораторных животных оценивалось их общее состояние.

Исследования были одобрены локальным этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета (протокол № 06 от 14 апреля 2023 г. – Приложение Б);

⁵ Автор выражает искреннюю благодарность коллективу Центра доклинических исследований Института фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (ЦДИ ИФМ ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России) за неоценимую помощь в проведении биологических экспериментов, содействие в работе с лабораторными животными и всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения исследования.

Модель злокачественной перевиваемой опухоли in vivo

Экспериментальные модели неоплазии были созданы с использованием двух перевиваемых штаммов, приобретенных в онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина:

1. РМК-1 – карцинома молочной железы крысы;
2. РС-1 – холангиоцеллюлярная карцинома (альвеолярный слизистый рак печени) крысы.

Метод перевивки: животным под изофлюрановой анестезией подкожно вводили суспензию жизнеспособных опухолевых клеток.

Суспензию готовили в стерильном растворе Хэнкса из расчета 50 мг опухолевой биомассы на 0,5 мл среды. Место введения было специфично для каждого штамма:

- для штамма РМК-1 – область подмышечной впадины;
- для штамма РС-1 – область передней брюшной стенки (ближе к тазовой конечности).

День введения опухолевой суспензии считали нулевым днем (0-е сутки) развития опухоли.

Определение сроков начала терапии. Время начала экспериментального лечения было установлено на основе литературных данных о биологических характеристиках каждого штамма:

- для модели РМК-1 лечение начинали на 10-е сутки. Данный временной интервал соответствует началу онкогенеза и формированию пальпируемого опухолевого узла, что описано в оригинальной характеристике штамма [164];
- для модели РС-1 терапия инициировалась на 21-е сутки после перевивки. Этот срок соответствует началу активной экспоненциальной фазы роста данной опухоли [14].

На начальном этапе исследования эффективность полимерного комплекса 5-ФУ была изучена на модели РМК-1. Эта модель хорошо охарактеризована и позволяет оценить базовую фармакологическую активность новых соединений в условиях контролируемого опухолевого роста.

Для оценки истинного терапевтического потенциала в более сложных условиях комплекс был далее исследован на модели РС-1. Этот переход обоснован контрастом в прогнозе соответствующих заболеваний у человека.

Клинически рак молочной железы (аналог модели РМК-1) при современном лечении характеризуется относительно благоприятным прогнозом: медиана выживаемости составляет в среднем 48 месяцев [62], а 5-летняя относительная выживаемость достигает 90 % [264].

В то же время холангиоцеллюлярная карцинома (аналог модели РС-1) относится к опухолям с крайне неблагоприятным течением: медиана выживаемости пациентов составляет около 24 месяцев, а 5-летняя выживаемость не превышает 10 % [29]. Эта форма онкологии представляет собой серьезную нерешенную проблему в клинической онкологии, поскольку обладает высокой резистентностью к стандартным методам лечения.

Таким образом, изучение состава на модели РС-1 позволяет оценить его эффективность в условиях, максимально приближенных к наиболее агрессивным и резистентным формам онкологии. Демонстрация активности в этой прогностически неблагоприятной модели будет свидетельствовать о высоком терапевтическом потенциале разрабатываемого комплекса и его перспективах для лечения онкологических заболеваний.

Оценка острой токсичности

Оценка острой токсичности ПМАК

Для определения безопасности ПМАК как потенциального полимерного носителя был проведен эксперимент по оценке острой токсичности.

Лабораторные животные были разделены на 2 группы (по 6 самцов и 6 самок в каждой группе, итого $n = 24$):

1) опытная группа 1: животные, которым двукратно внутрибрюшинно вводили 4,5 мл раствора ПМАК в дозе 750 мг/кг (т. е. суммарно 1500 мг/кг);

2) интактная группа: животные, которым внутрибрюшинно двукратно вводили эквивалентный по объему стерильный физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl).

Данная методика введения может приравниваться к однократному внутривенному введению исследуемого вещества [30]. Концентрация и дозировка раствора ПМАК была подобрана, исходя из максимальной вязкости раствора полимера, которую можно ввести животным [25; 31].

Наблюдение за лабораторными животными осуществлялось на протяжении 14 суток. Ежедневная регистрация клинической картины интоксикации проводилась визуально в клетке для содержания и в руках. Ежедневная оценка клинических проявлений интоксикации выполнялась методом визуального наблюдения как в условиях естественного пребывания в клетке, так и при фиксации животных в руках.

По окончании эксперимента животных декапитировали, затем проводилось макроскопическое исследование внутренних органов: головной мозг, сердце, легкие, тимус, печень, почки, надпочечники, селезенка, желудок, тонкий кишечник, слизистая оболочка толстой кишки, мочевого пузыря, поджелудочная железа, лимфатические узлы (подмышечные), яичники, семенники.

Оценка острой токсичности полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК

Для определения безопасности разработанного полимерного комплекса 5-ФУ был проведен отдельный эксперимент по оценке острой токсичности. Дизайн эксперимента и условия содержания животных соответствовали схеме, что и в эксперименте по оценке острой токсичности ПМАК.

Лабораторные животные были разделены на две группы (по 6 самцов и 6 самок в каждой группе, итого $n = 24$):

1) опытная группа: животные, которым двукратно внутрибрюшинно вводили раствор полимерного комплекса 5-ФУ в дозе, эквивалентной 750 мг/кг по ПМАК (суммарно 1 500 мг/кг; содержание 5-ФУ 10 мол.%);

2) интактная группа: животные, которым внутрибрюшинно двукратно вводили эквивалентный по объему стерильный физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl).

Выбор дозы был основан на результатах предварительного эксперимента по токсичности ПМАК, показавшего отсутствие летальности при данном уровне

введения. Концентрация раствора комплекса также определялась максимальной вязкостью, позволяющей провести инъекцию лабораторным животным [25; 31].

На протяжении 14 суток после введения проводили ежедневное наблюдение за животными, оценивая по тем же критериям, что и в эксперименте с ПМАК: общее состояние, поведенческие реакции, состояние шерстного покрова и слизистых оболочек, реакцию на внешние раздражители.

По окончании эксперимента животных выводили из эксперимента путем декапитации, после чего проводили макроскопическое исследование внутренних органов по тому же перечню, что и в эксперименте с ПМАК.

Исследование уровня цитокинов в сыворотке крови лабораторных животных методом иммуноферментного анализа

Модель злокачественной перевиваемой опухоли *in vivo* – РМК-1.

Для оценки влияния полимерного носителя (ПМАК) на системный цитокиновый профиль в условиях опухолевого роста был проведен сравнительный анализ изменений концентрации цитокинов (IL-6, IL-10, IL-17) в крови лабораторных животных. Животные были распределены на три группы (по 4 особи в каждой, итого $n = 12$):

1) опытная группа (опухоль + ПМАК): животные с перевитой опухолью РМК-1, которым однократно внутрибрюшинно вводили раствор ПМАК в дозе 9 мг/кг;

2) интактная группа: здоровые животные без опухоли, которым внутрибрюшинно вводили эквивалентный по объему стерильный физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl);

3) группа контроля (опухоль): животные с перевитой опухолью РМК-1, не получавшие специфической терапии. Вместо исследуемого состава им внутрибрюшинно вводили эквивалентный по объему стерильный физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl) с той же частотой и по той же схеме.

Доза и способ введения ПМАК были выбраны на основе литературных данных, свидетельствующих о ее иммуномодулирующей и противовирусной активности. Доза 9 мг/кг была пересчитана (с учетом видовых коэффициентов

пересчета с мыши на крысу) от эффективных доз, использованных в классическом исследовании [92].

Введение составов осуществлялось на 10-е сутки, на 16-е сутки животных декапитировали под наркозом изофлураном.

Забор крови для определения уровня цитокинов (IL-6, IL-10, IL-17) проводили перед декапитацией, кровь отбирали в пробирку, центрифугировали и отбирали сыворотку.

Определение цитокинов (IL-6, IL-10, IL-17) в сыворотке крови крыс проводился методом ИФА с использованием коммерческих наборов «Cloud-Clone Corp» (США) на спектрофотометре Epoch (BioTek, USA). Используемая длина волны составляла 450 нм.

Изучение влияния ПМАК на развитие опухолевого процесса на ранних стадиях онкогенеза

Модель злокачественной перевиваемой опухоли *in vivo* – РС-1.

Для объективной оценки результатов в качестве основного критерия использовалось измерение объемов опухолей, что позволило количественно сравнить их рост в опытных группах с контрольной группой, не получавшей лечения.

Используемый состав: ПМАК (раствор для внутривенного введения, 20 мг/кг).

Увеличение дозировки ПМАК с 9 мг/кг до 20 мг/кг в данном и последующих биологических экспериментах было обосновано предварительными данными о хорошей переносимости полимера лабораторными животными, а также необходимостью моделирования более интенсивного терапевтического воздействия. Параллельно был изменен путь введения с внутрибрюшинного на внутривенный. Такая коррекция режима введения была проведена для достижения более быстрого и полного системного распределения препарата, а также для максимального приближения условий эксперимента к потенциальному клиническому сценарию применения, при котором внутривенное введение

является стандартным путем введения для большинства системных химиотерапевтических и иммуномодулирующих средств.

Животные были распределены на три группы (по 5 особей в каждой группе, итого $n = 15$):

1) опытная группа 1 (режим А): животные с перевитой опухолью РС-1, которым впервые внутривенно вводили ПМАК до перевивки опухоли за 24 часа;

2) опытная группа 2 (режим Б): животные с перевитой опухолью РС-1, которым впервые внутривенно вводили ПМАК через 3 часа после перевивки опухоли;

3) группа контроля (опухоль): животные с перевитой опухолью РС-1, не получавшие специфической терапии. Вместо исследуемого состава им внутривенно вводили эквивалентный по объему стерильный физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl) с той же частотой и по тем же схемам.

Схема последующих введений была одинаковой для обоих режимов (А и Б): повторные инъекции проводили на 3-и, 7-е и 14-е сутки после перевивки опухоли. Всего животные получали 4 инъекции.

Эксперимент продолжался 21 сутки. По окончании эксперимента животных декапитировали, проводили полное вскрытие. Опухолевый узел извлекали и взвешивали для оценки противоопухолевой активности ПМАК. Печень, легкие, почки и селезенку также извлекали для оценки потенциального токсического влияния ПМАК на эти органы. Все образцы фиксировали в 10 % нейтральном формалине для последующего гистологического исследования.

Оценка режимов противоопухолевой терапии

Модель злокачественной перевиваемой опухоли *in vivo* – РС-1.

При проведении исследования были использованы следующие составы: фторурацил-ЛЭНС 50 мг/мл (раствор для внутрисосудистого введения, 12 мг/кг); полимерный комплекс 5-ФУ (раствор для внутривенного введения, 12 мг/кг по 5-ФУ).

Дозировка 12 мг/кг по 5-ФУ выбрана, так как она является рекомендованной в официальной инструкции по применению от производителя [35].

Животные были распределены на три группы (по 6 особей в каждой группе, итого $n = 18$):

1) опытная группа 1 (опухоль + фторурацил–ЛЭНС): животные с перевитой опухолью РС-1, которым внутривенно вводили «Фторурацил-ЛЭНС», (Россия);

2) опытная группа 2 (опухоль + полимерный комплекс 5-ФУ): животные с перевитой опухолью РС-1, которым внутривенно вводили полимерный комплекс 5-ФУ;

3) группа контроля (опухоль): животные с перевитой опухолью РС-1, не получавшие специфической терапии. Вместо исследуемых составов им внутривенно вводили эквивалентный по объему стерильный физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl) с той же частотой и по той же схеме.

Общая продолжительность эксперимента составила 42 суток (21 сутки до лечения + 21 сутки наблюдения).

Составы вводили внутривенно (в латеральную хвостовую вену) по схеме: пять ежедневных инъекций с 21-х по 25-е сутки после перевивки.

Забор крови осуществлялся во всех группах на 21, 22, 23, 24, 31, 35, 42-е сутки. Фоновые измерения на 21-е сутки были необходимы для установления исходного уровня IFN- γ . Забор на 22-е сутки проводился для оценки острой фазы иммунной реакции на введение составов. 23–24-е сутки были периодом ожидаемого максимального иммуностимулирующего эффекта полимерного комплекса. Последние точки отбора (31–42-е сутки) использовались для анализа продолжительности действия и возможных отсроченных эффектов.

В контрольной группе для оценки фоновой динамики кровь дополнительно отбирали на 3-и, 10-е и 14-е сутки.

Оценка фармакокинетики и биораспределения 5-фторурацила и полимерного комплекса 5-ФУ

Модель злокачественной перевиваемой опухоли *in vivo* – РС-1.

При проведении исследования были использованы следующие составы: полимерный комплекс 5-ФУ (раствор для внутривенного введения, 12 мг/кг по 5-ФУ); фторурацил-ЛЭНС 50 мг/мл (раствор для внутрисосудистого введения, 12 мг/кг).

Животные были распределены на две группы (по 5 особей в каждой группе, итого $n = 10$):

1) опытная группа 1 (Опухоль + фторурацил-ЛЭНС): животные с перевитой опухолью РС-1, которым внутривенно вводили «Фторурацил-ЛЭНС», (Россия);

2) опытная группа 2 (Опухоль + полимерный комплекс 5-ФУ): животные с перевитой опухолью РС-1, которым внутривенно вводили полимерный комплекс 5-ФУ.

Контрольная группа в данном эксперименте не предусматривалась, так как целью было прямое сравнение фармакокинетических профилей.

Введение составов осуществлялось в латеральную хвостовую вену лабораторных животных трижды: на 21, 22, 23-е сутки после перевивки опухоли.

Первый (фоновый) забор крови проводили на 21-е сутки перед первой инъекцией составов. Затем забор крови проводился согласно плану через 0,17; 0,33; 1; 3; 6; 24; 24,17; 48; 48,17; 48,33; 49; 51; 54 ч после первого введения составов.

По прошествии 3 суток, в течение которых длился эксперимент, животных декапитировали. Следом проводили полное вскрытие с извлечением, взвешиванием следующих органов: мозг, печень, лёгкие, почки, сердце, селезенка и опухолевый узел.

Концентрацию 5-ФУ в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ). По полученным кривым «концентрация – время» рассчитывали основные фармакокинетические параметры: площадь под кривой (AUC), максимальную концентрацию ($C_{\max}$), время её достижения ($T_{\max}$), константу элиминации ($k_{\text{эл}}$) период полувыведения ($T_{1/2}$), общий клиренс (CL) и объём распределения (V_d).

Площадь под кривой (AUC) по формуле (6):

$$AUC_{0-24} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(C_i + C_{i+1})}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i), \quad (6)$$

где C_i и C_{i+1} – концентрации в соседние моменты времени t_i и t_{i+1} ;

n – общее количество точек.

Общую площадь под кривой определяли методом суммирования площадей трапеций между последовательными экспериментальными точками.

Для определения константы элиминации ($k_{эл}$) строили зависимость натурального логарифма концентрации ($\ln C$) от времени (t), которую представляли в полулогарифмических координатах. Константу элиминации ($k_{эл}$) определяли по наклону прямолинейного участка, взятого по модулю, т. е. $\text{tg}\alpha = k_{эл}$.

$C_{\max}$ и $T_{\max}$ определяли непосредственно по графику зависимости концентрации 5-ФУ и полимерного комплекса 5-ФУ в плазме крови от времени.

Период полувыведения ($T_{1/2}$) рассчитывали по формуле (7):

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{эл}} = \frac{0,693}{k_{эл}}, \quad (7)$$

где $k_{эл}$ – константа скорости процесса элиминации ЛС, $1/\text{ч}$.

CL рассчитывали по формуле (8):

$$CL = \frac{D}{AUC_{0-24}}, \quad (8)$$

где D – введённая доза, мкг/кг ;

AUC_{0-24} – площадь под кривой «концентрация – время» от 0 до 24 ч, $\text{мкг} \cdot \text{ч/мл}$.

V_d рассчитывали по формуле (9):

$$V_d = \frac{D}{k_{эл} \cdot AUC_{0-24}}, \quad (9)$$

где D – введённая доза, мкг/кг ;

$k_{эл}$ – константа скорости процесса элиминации ЛС, $1/\text{ч}$;

AUC_{0-24} – площадь под кривой «концентрация – время» от 0 до 24 ч, $\text{мкг} \cdot \text{ч/мл}$.

Оценка массовых показателей

Является количественным параметром, используемым для выявления токсичности, определения эффективности и прогноза рисков для клинических исследований. Показатель рассчитывался по формуле (10):

$$\text{Массовый коэффициент} = \frac{m(\text{органа или опухоли})}{m(\text{животного})} \cdot 1000, \quad (10)$$

где массовый коэффициент – относительная масса органа или опухоли, усл. ед.;

m (органа или опухоли) – масса органа или опухоли, изъятых у лабораторного животного, г;

m (животного) – масса лабораторного животного, г.

Показатель торможения роста опухоли (ТРО)

Является количественным параметром, используемым в доклинических исследованиях для оценки эффективности противоопухолевой терапии. Он отражает степень замедления или остановки роста новообразования под действием лечения по сравнению с контрольной группой. ТРО рассчитывался по формуле (11):

$$\text{ТРО} = \frac{(\bar{V}_{\text{контроль}} - \bar{V}_{\text{состав}})}{\bar{V}_{\text{контроль}}} \cdot 100 \%, \quad (11)$$

где ТРО – торможение роста опухоли, %

$\bar{V}_{\text{контроль}}$ – средние значения объема опухолей у группы контроля, мм³;

$\bar{V}_{\text{состав}}$ – средние значения объема опухолей у групп, которым вводились составы, мм³.

Гистологическое исследование

Экспериментальный материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине, затем обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм получали на микротоме Leica RM2245 (Германия, Leica), окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали с помощью микроскопа DM2000 (Германия, Leica).

2.5. Математико-статистические методы исследования

Статистическая обработка результатов исследований осуществлялась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XV издания с использованием программ Microsoft Office Excel, IBM SPSS Statistics 27.0.1.

Проверка характера распределения данных

Для определения соответствия данных закону нормального распределения использовался критерий Шапиро – Уилка. Нормальность распределения является необходимым условием для применения параметрических статистических методов.

Основные статистические показатели, рассчитываемые при валидации методик

При валидации методик рассчитывались следующие показатели:

Размах варьирования (формула 12):

$$R = |X_1 - X_n|, \quad (12)$$

где R – размах варьирования;

X_1 – минимальное значение в упорядоченной выборке;

X_n – максимальное значение в упорядоченной выборке.

Среднее значение (формула 13):

$$\bar{X} = \frac{\sum_1^n X_i}{n}, \quad (13)$$

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение выборки;

X_i – i -й элемент выборки;

n – объем выборки.

Дисперсия (формула 14):

$$S^2 = \frac{\sum_1^n X_i^2 - n \cdot \bar{X}^2}{f}, \quad (14)$$

где S^2 – выборочная дисперсия;

f – число степеней свободы.

Стандартное отклонение (формула 15):

$$S = \sqrt{S^2}, \quad (15)$$

где S – стандартное отклонение.

Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации, RSD) (формула 16):

$$RSD = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \%, \quad (16)$$

где RSD – относительное стандартное отклонение (в %).

Доверительный интервал для единичного определения (формула 17):

$$\Delta X = S \cdot t(P, f), \quad (17)$$

где ΔX – полуширина доверительного интервала для отдельного результата;

$t(P, f)$ – табличное значение критерия Стьюдента;

P – доверительная вероятность.

Доверительный интервал для среднего результата (формула 18):

$$\Delta \bar{X} = \frac{S \cdot t(P, f)}{\sqrt{n}}, \quad (18)$$

где $\Delta \bar{X}$ – полуширина доверительного интервала для среднего значения.

Относительная ошибка среднего результата (формула 19):

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta \bar{X}}{\bar{X}} \cdot 100 \%, \quad (19)$$

где $\bar{\varepsilon}$ – относительная ошибка среднего результата (в %).

Критерий Стьюдента (расчетное значение) для проверки систематической ошибки (формула 20):

$$t_{\text{расч}} = \frac{|\mu - \bar{X}| \cdot \sqrt{n}}{S}, \quad (20)$$

где $t_{\text{расч}}$ – расчетное значение критерия Стьюдента;

μ – истинное (эталонное) значение.

Оценка однородности выборки и исключение грубых ошибок

Для выборок малого объема ($n < 10$) использовался критерий Q , основанный на размахе варьирования R (формула 21):

$$Q_{\text{max}} = \frac{|X_n - X_{n-1}|}{R}, \quad (21)$$

где Q_{max} – расчетное значение контрольного критерия для проверки грубых ошибок;

X_n – максимальное значение в выборке;

X_{n-1} – предмаксимальное значение в выборке.

Или для крайних вариант (формула 22):

$$Q_{min} = \frac{|X_1 - X_2|}{R}, \quad (22)$$

где Q_{min} – критерий для минимального значения;

X_1 – минимальное значение в выборке;

X_2 – второе минимальное значение в выборке.

Выборка считалась однородной, если $Q < Q_{табл.}(P, n)$.

Для $n = 5$ использовалось табличное значение $Q(99\%, 5) = 0,76$.

Оценка линейности калибровочной зависимости

Зависимость оптической плотности y от концентрации x описывалась уравнением (формула 23):

$$y = b \cdot x + a, \quad (23)$$

где y – измеряемая величина (оптическая плотность);

x – концентрация определяемого вещества;

b – угловой коэффициент (коэффициент регрессии);

a – свободный член уравнения.

Коэффициент корреляции (формула 24):

$$r = \frac{n \sum_1^n x_i y_i - \sum_1^n x_i \sum_1^n y_i}{\sqrt{[n \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2] \cdot [n \sum_1^n y_i^2 - (\sum_1^n y_i)^2]}}, \quad (24)$$

где r – коэффициент корреляции;

X_i, Y_i – экспериментальные значения;

$\bar{X}, \bar{Y}$ – средние значения переменных.

Коэффициент детерминации (формула 25):

$$R^2 = r^2, \quad (25)$$

где R^2 – коэффициент детерминации.

Значимость коэффициентов a и b проверялась по критерию Стьюдента (формула 26):

$$t_{\text{расч.},b} = \frac{b}{S_b}, t_{\text{расч.},a} = \frac{a}{S_a}, \quad (26)$$

где $t_{\text{расч.},b}$ и $t_{\text{расч.},a}$ – расчетные значения критерия Стьюдента для коэффициентов;
 S_b, S_a – стандартные отклонения коэффициентов b и a .

Общая величина дисперсии (формула 27)

$$S_0^2 = \frac{\sum_1^n (y_i - \bar{y})^2}{f} = \frac{\sum_1^n y_i^2 - a \sum_1^n y_i - b \sum_1^n x_i y_i}{f}, \quad (27)$$

где S_0^2 – общая величина дисперсии; a – свободный член линейной зависимости;
 b – угловой коэффициент линейной зависимости.

Дисперсии констант b и a находят по формулам (28–29)

$$S_b^2 = \frac{n S_0^2}{n \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2}, \quad (28)$$

$$S_a^2 = \frac{S_b^2}{n} \sum_1^n x_i^2, \quad (29)$$

где S_b^2 и S_a^2 – дисперсии коэффициентов линейной зависимости.

Сравнение дисперсий (критерий Фишера)

Для сравнения воспроизводимости двух методов или двух серий измерений использовался критерий Фишера (при $S_1^2 > S_2^2$) (формула 30):

$$F_{\text{выч.}} = \frac{S_1^2}{S_2^2}, \quad (30)$$

где $F_{\text{выч.}}$ – расчетное значение критерия Фишера;

S_1^2 и S_2^2 – дисперсии первой и второй выборок.

Если $F_{\text{выч.}} < F_{\text{табл.}}(P, f_1, f_2)$, различия считались статистически незначимыми.

Общая ошибка (формула 31)

$$TE = |\varepsilon| + RSD, \quad (31)$$

где TE (total error) – общая ошибка, %;

$|\varepsilon|$ – модуль относительной ошибки (правильность), %.

Результаты статистической обработки валидационных исследований представлялись в виде таблиц, включающих:

- объем выборки n ;
- число степеней свободы f ;
- истинное значение μ ;

- среднее $\bar{X}$;
- дисперсию S^2 ;
- стандартное отклонение S ;
- доверительную вероятность P ;
- критерий Стьюдента $t(P, f)$;
- полуширину доверительного интервала ΔX и $\Delta \bar{X}$;
- относительную ошибку $\bar{\epsilon}$;
- относительное стандартное отклонение RSD .

Эти статистические показатели определялись при валидации методики количественного определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса. С их помощью были рассчитаны и подтверждены ключевые валидационные характеристики предлагаемой методики в рабочем диапазоне концентраций: её специфичность, правильность, прецизионность (воспроизводимость результатов в условиях повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости) и линейность [4].

Статистический анализ биологических данных

Для статистического анализа данных, полученных в ходе биологических экспериментов, был выбран непараметрический U-критерий Манна – Уитни. Основанием для его применения послужил относительно небольшой объём выборок ($n \geq 4$), который не позволяет достоверно проверить соответствие данных закону нормального распределения, что является обязательным условием для использования параметрических критериев [3]. Как отмечается в современных исследованиях, метод Манна – Уитни сохраняет статистическую валидность и обеспечивает надёжность выводов даже при сверхмалом количестве наблюдений в сравниваемых группах [308]. Таким образом, выбранный критерий является адекватным для корректного сравнения результатов в рамках настоящих исследований.

Для наглядного представления результатов по изучаемым показателям были построены диаграммы «ящик с усами», которые отображают медиану, разброс данных и возможные аномальные значения в каждой группе. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Физико-химическая характеристика полиметакриловой кислоты

Для получения полимерного комплекса 5-ФУ использовалась полиметакриловая кислота ($M_n \cdot 10^3 = 31,8$ кДа; $M_w \cdot 10^3 = 37,3$ кДа; $\bar{D} = 1,17$; $n \sim 365$), синтез которой осуществлялся в соответствии с описанной методикой в патенте⁶ [7].

3.1.1. Исследование полиметакриловой кислоты

на наличие остаточного мономера и остаточных растворителей

Количественное определение остаточного мономера (МАК) в полимере проводили методом газовой хроматографии. Перед анализом образцов была выполнена валидация методики, подтвердившая ее специфичность, линейность, правильность и прецизионность в исследуемом диапазоне концентраций.

3.1.1.1. Валидация методики количественного определения остаточной метакриловой кислоты методом газовой хроматографии

Оценка показателя «Специфичность»

Специфичность метода определялась путем сравнения хроматограмм исследуемых образцов и возможных мешающих компонентов в используемых растворителях.

Для этого были записаны хроматограммы: холостая проба, МАК (0,4 % раствор), ПМАК (0,4 % раствор).

Установлено, что хроматографическая система в условиях выбранного газохроматографического режима не создает посторонних сигналов в области времени удерживания 6,0–6,1 мин: на хроматограмме холостой пробы какие-либо

⁶ Автор выражает искреннюю благодарность коллективу кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии ФГБОУ ВО «ННГУ им. Н. И. Лобачевского», а также лично доктору химических наук, профессору, заведующему кафедрой Зайцеву Сергею Дмитриевичу за проведение синтеза полимерного носителя на основе метакриловой кислоты и ценные консультации в ходе выполнения работы.

пики в данном интервале отсутствуют, что исключает влияние фонового шума и компонентов матрицы на детектирование целевого компонента (Рисунок 5).

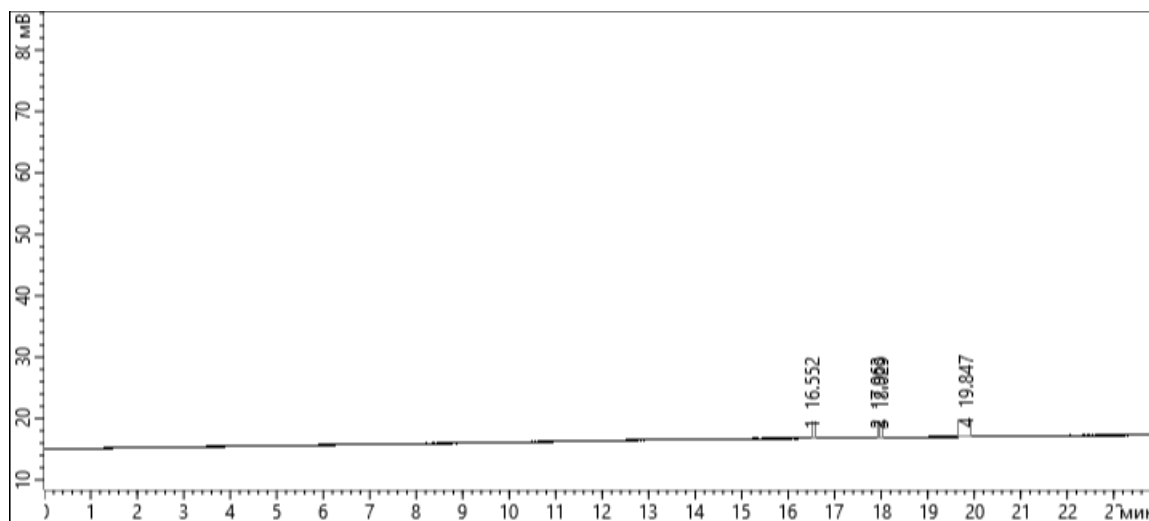


Рисунок 5 – Хроматограмма холостой пробы

Хроматограмма раствора стандартного образца МАК в подходящем растворителе характеризуется четким пиком с временем удерживания 6,0–6,3 мин (Рисунок 6), подтверждая, что данная зона элюирования является специфичной для МАК в выбранных газохроматографических условиях.

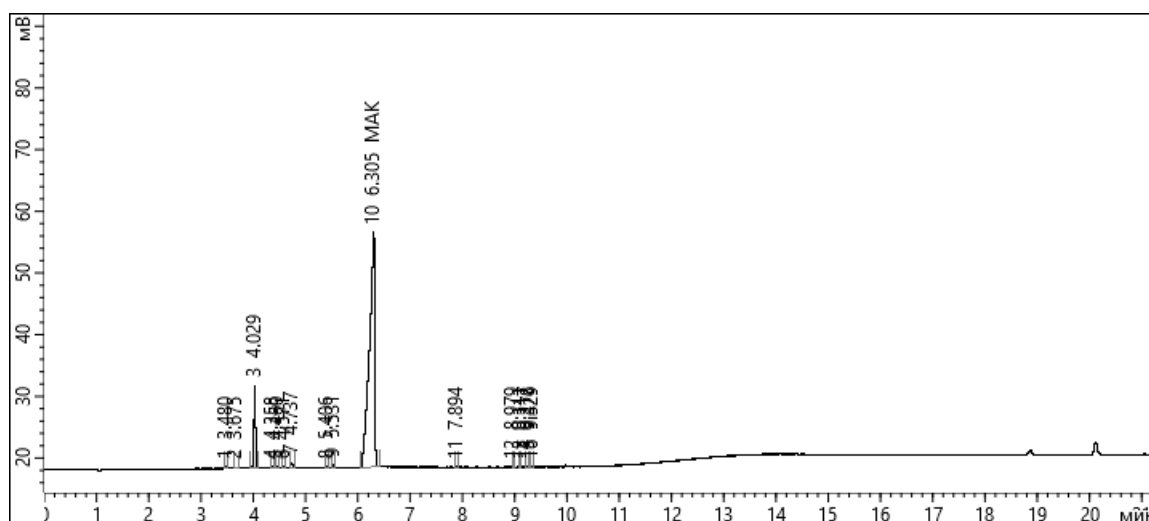


Рисунок 6 – Раствор МАК 0,4 %

Для проверки специфичности метода в отношении определения остаточного МАК в составе полимера была зарегистрирована хроматограмма раствора ПМАК,

синтезированного с использованием МАК, после соответствующей пробоподготовки (Рисунок 7). На хроматограмме ПМАК в области 6,0–6,3 мин наблюдается четко выраженный пик, полностью совпадающий по времени удерживания с пиком стандартного образца МАК.

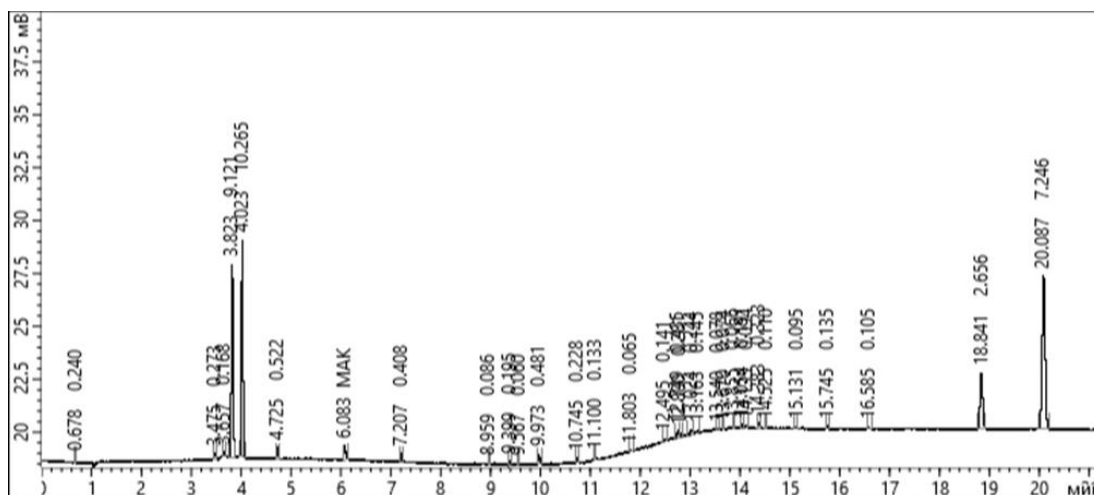


Рисунок 7 – Хроматограмма 0,4 % раствора ПМАК

Оценка показателя «Линейность»

Строилась калибровочная кривая в диапазоне концентраций от 0,0005 до 0,008 % (Рисунок 8).

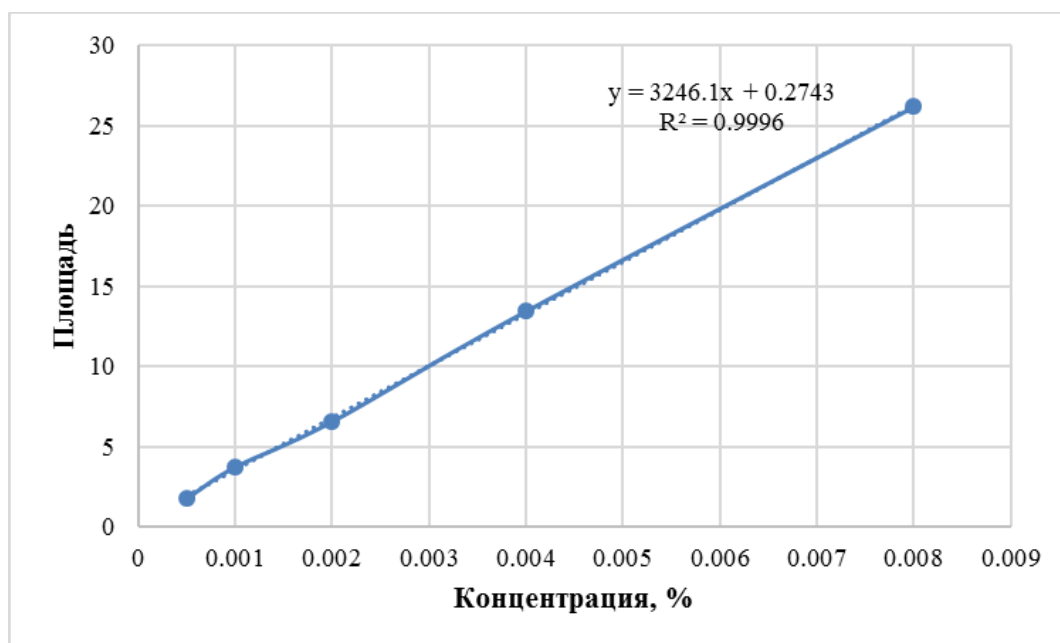


Рисунок 8 – Предварительный вид калибровочного графика и уравнение прямой

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 14).

Таблица 14 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{\text{расч.,b}}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{\text{расч.,a}}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t(P, f)_{\text{табл.}}$	$P, \%$	f
92,2985	35,1700	1,8887	0,1452	5,841	99	3

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 9).

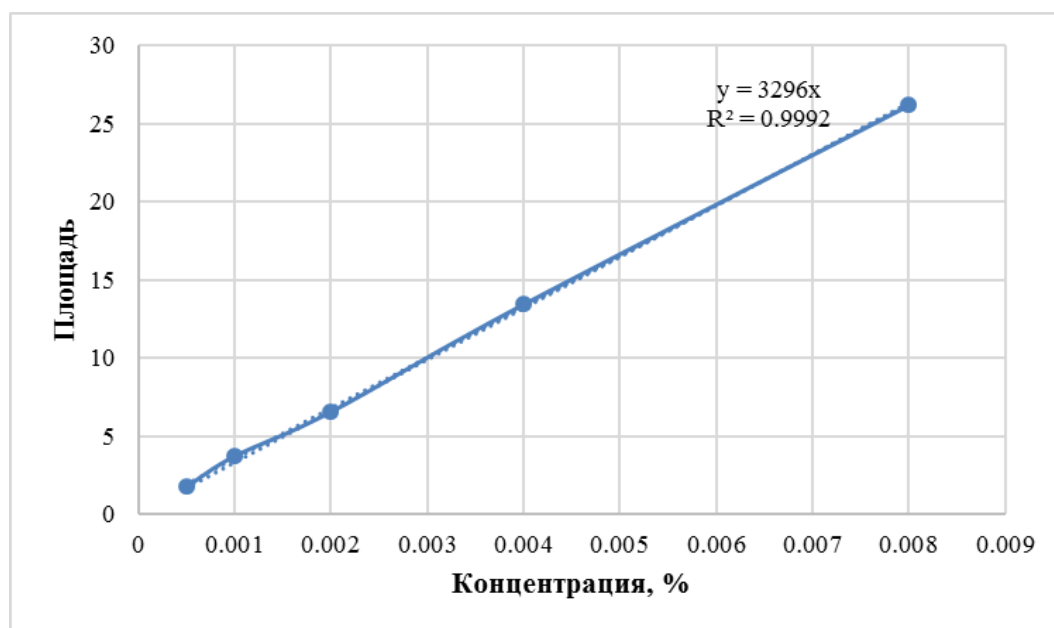


Рисунок 9 – Калибровочный график и уравнение прямой для расчета ПО и ПКО МАК

Определение показателя «Предел обнаружения»

ПО для МАК, рассчитанный по соотношению сигнал/шум ($S/N \geq 3$), составил 0,00000021 %.

Определение показателя «Предел количественного определения»

Значение ПКО для МАК, оцененное по соотношению сигнал/шум ($S/N \geq 10$), составило 0,00000075 %.

Рассчитанная концентрация ПКО была принята в качестве нижней границы при построении новой калибровочной зависимости. Таким образом, рабочий диапазон определяемых концентраций составил от 0,00000075 до 0,008 %.

Перед статистической обработкой данных для построения калибровочной зависимости была проведена проверка однородности измерений для каждой приготовленной концентрации стандартных растворов.

Для выявления грубых ошибок в малых выборках использовали Q-критерий (Таблица 15).

Таблица 15 – Однородность выборки при построении калибровочной зависимости

Концентрация, %	№ опыта			R	R ₁	Q _{min}	R ₂	Q _{max}	Q (Р, n) табл.	Р, %
	1	2	3							
0,00000075	0,00239	0,00247	0,00252	0,00013	0,00008	0,615	0,00005	0,385	0,99	99
0,001	3,388	3,891	3,911	0,523	0,503	0,962	0,020	0,038		
0,002	6,362	6,483	6,854	0,492	0,121	0,246	0,371	0,754	0,99	
0,004	13,259	13,314	13,749	0,490	0,055	0,112	0,435	0,888		
0,008	25,149	26,558	26,847	1,698	1,409	0,830	0,289	0,170		

При доверительной вероятности $p = 0,99$ все вычисленные значения Q-критерия для экспериментальных данных не превысили критического значения $Q(99\%; 3)_{\text{табл.}}$. Это подтвердило однородность выборки и отсутствие статистических выбросов, что позволило перейти к дальнейшему анализу.

Представленная на рисунке 10 зависимость площади сигнала от концентрации носит линейный характер в изученном диапазоне и описывается уравнением регрессии $y = bx + a$.

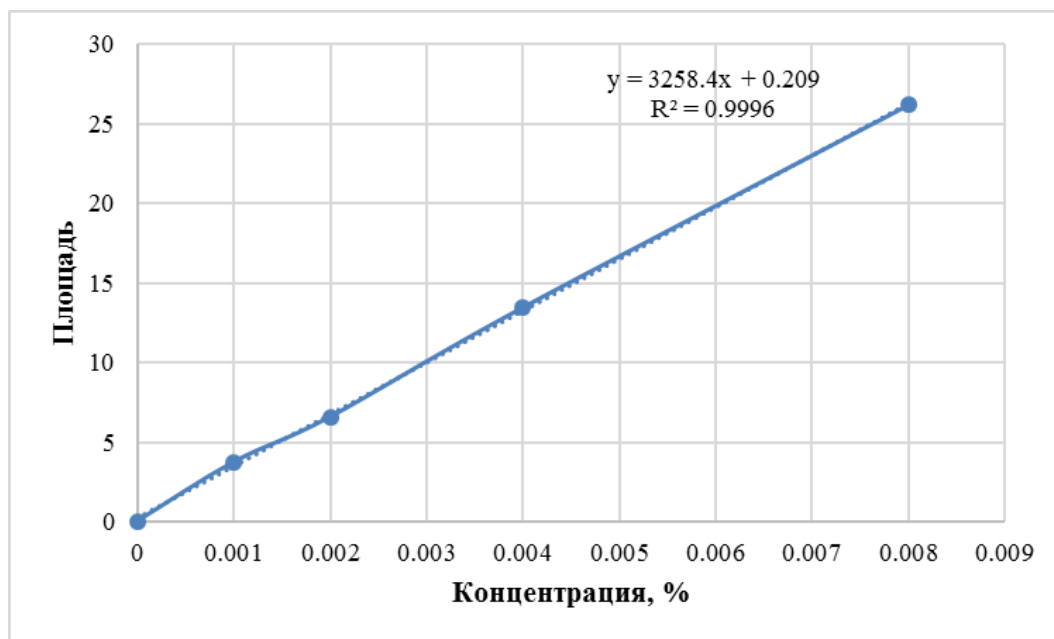


Рисунок 10 – Вид калибровочного графика и уравнение прямой с учетом включения точки ПКО МАК

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 16).

Таблица 16 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{расч.,b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{расч.,a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t(P, f)_{табл.}$	$P, \%$	f
82,8329	39,3374	1,2888	0,1622	5,841	99	3

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 11). Коэффициент детерминации R^2 равен 0,9993.

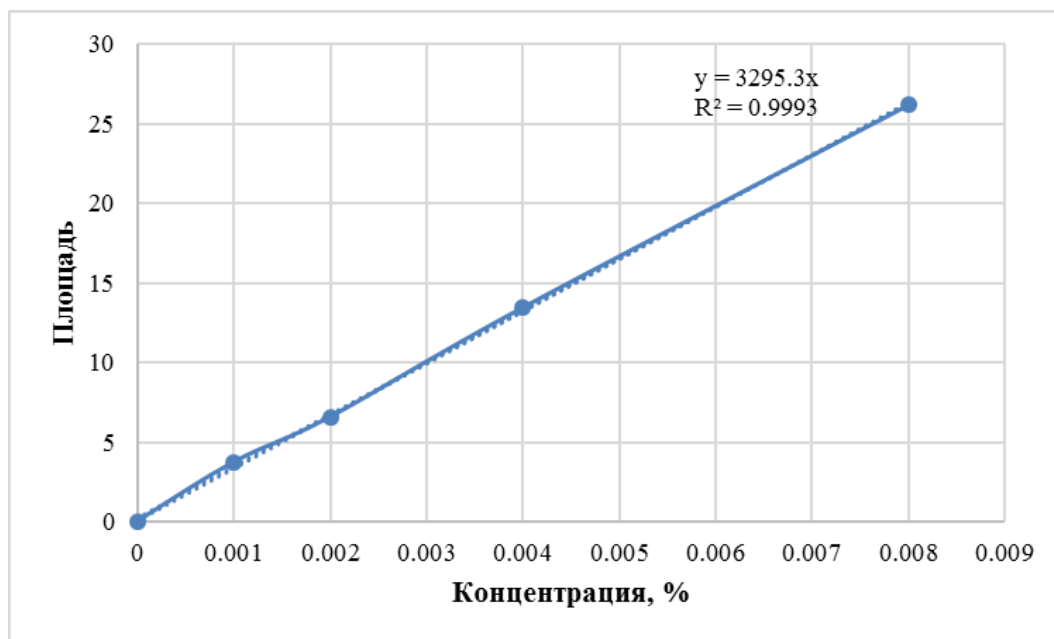


Рисунок 11 – Итоговый вид калибровочного графика и уравнение прямой

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости, представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости

f	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	b	a	t (P, f)	Δb	S_0^2	r	P, %
3	0,0030	9,9848	3295,3	0	5,841	286,3964	0,0962	0,9997	99

Оценка показателя «Правильность»

Правильность оценивалась для 9 определений 3 концентраций (0,00000075; 0,0024; 0,0027 %). Номинальное содержание МАК (0,0024 %) было установлено в образце ПМАК на основании результатов предварительных анализов, выполненных на этапе отработки методики. Для проверки правильности в области завышенных значений использовали концентрацию, составляющую 120 % от номинальной (0,0027 %). Метрологические характеристики представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Метрологические характеристики методики количественного определения МАК методом ГХ

n	f	μ	$\bar{X}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	ϵ_{cp} , %	RSD, %
9	8	100	99,91	2,0677	1,4379	99	3,36	4,8315	1,6105	1,6118	1,4392

Оценка показателя «Прецизионность»

Прецизионность исследовалась на однородных образцах и оценивалась в двух вариантах: повторяемость (сходимость) (Таблица 19), внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность. Расчеты проводились на основании 6 определений концентрации с известным содержанием МАК (0,0024 %).

Таблица 19 – Метрологические характеристики определения повторяемости при количественном определении МАК методом ГХ

n	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f) _{табл.}	ΔX	$\Delta \bar{X}$	RSD, %
6	5	100,17	0,8191	99	4,03	3,3010	1,3476	0,8178

Внутрिलाбораторная прецизионность (Таблица 20) определялась в течение малого промежутка времени в одной и той же лаборатории, на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, с использованием одного и того же прибора, но разными исследователями.

Таблица 20 – Метрологические характеристики определения внутрिलाбораторной прецизионности при количественном определении МАК методом ГХ

Концентрация, %	Исследователь	μ	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f) табл.	Δx	ϵ	$t_{расч.}$	F(P,f1,f2) табл.	F _{выч.}
0,000000075	1	100	5	98,99	1,6319	99	4,03	6,5766	6,6432	1,5067	10,97	1,2079
0,000000075	2	100	5	100,48	1,4848	99	4,03	5,9838	5,9552	0,7915	10,97	1,2079
0,0024	1	100	5	100,82	1,3304	99	4,03	5,3616	5,3178	1,5158	10,97	0,8786
	2	100	5	101,84	1,4193	99	4,03	5,7199	5,6168	3,1666	10,97	
0,0027	1	100	5	100,83	0,9032	99	4,03	3,6399	3,6101	2,2461	10,97	0,0492
	2	100	5	99,39	4,0726	99	4,03	16,4126	16,5141	0,3694	10,97	

Воспроизводимость оценивалась по критерию Стьюдента. Поскольку $t_{расч.} < t_{табл.}$ (99 %, 5), то результаты двух выборок следует считать свободными от систематической ошибки, а значит воспроизводимыми.

3.1.1.2. Количественное определение остаточной метакриловой кислоты в образце полиметакриловой кислоты

Перед получением полимерных комплексов проведено исследование по анализу ПМАК на наличие ОМ и ОР. Методика пробоподготовки образцов описана в главе 2 «Материалы и методы».

На первом этапе методом ГХ на ПИД был получен хроматографический профиль стандартного образца МАК (0,4 %), представленный на рисунке 8, что позволило идентифицировать характерные для мономера сигналы в области 6 мин.

Эти данные использовали как референсные для последующего определения наличия остаточного мономера МАК в полимерном образце, результаты которого показаны на рисунке 12.

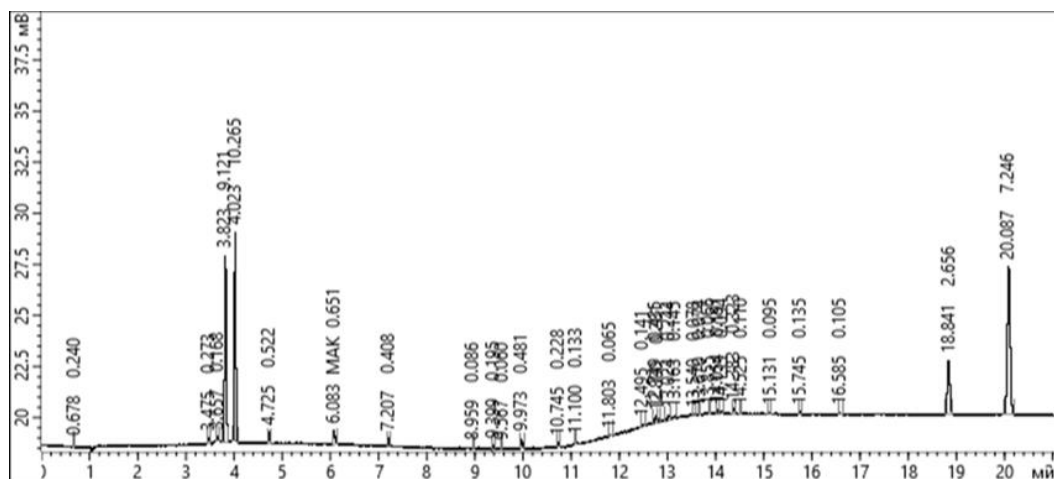


Рисунок 12 – Хроматограмма 0,4 % раствора ПМАК

После подтверждения наличия МАК в 0,4 % растворе ПМАК была проведена количественная оценка содержания МАК (Таблица 21).

Таблица 21 – Количественный анализ ПМАК на наличие МАК на ПИД (паровая фаза)

Компонент	Время	Площадь	Высота	Концентрация
МАК	6,083	1,391	0,651	0,00042 %

ПМАК содержит минимальное количество ОМ (0,00042 %).

Раствор ПМАК также был подвергнут анализу на ОР. В качестве ОР определялись те, которые использовались при синтезе полимера или при оценке

его молекулярно-массовых характеристик (Таблица 22). Согласно ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» предельно допустимые концентрации ОР также перечислены в таблице 22 [4].

Таблица 22 – Остаточные растворители, определяемые в процессе анализа

Растворитель	Структурная формула	Класс согласно классификации по степени риска	Предельно допустимая концентрация
ДМФА	$\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$	2	880 ppm
ТГФ		2	720 ppm
ДЭ	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$	3	0,5 %
ЭС	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	3	0,5 %

В ходе исследования было определено отсутствие в образце ДМФА. Качественно обнаружено присутствие ТГФ, ДЭ и ЭС (Рисунок 13).

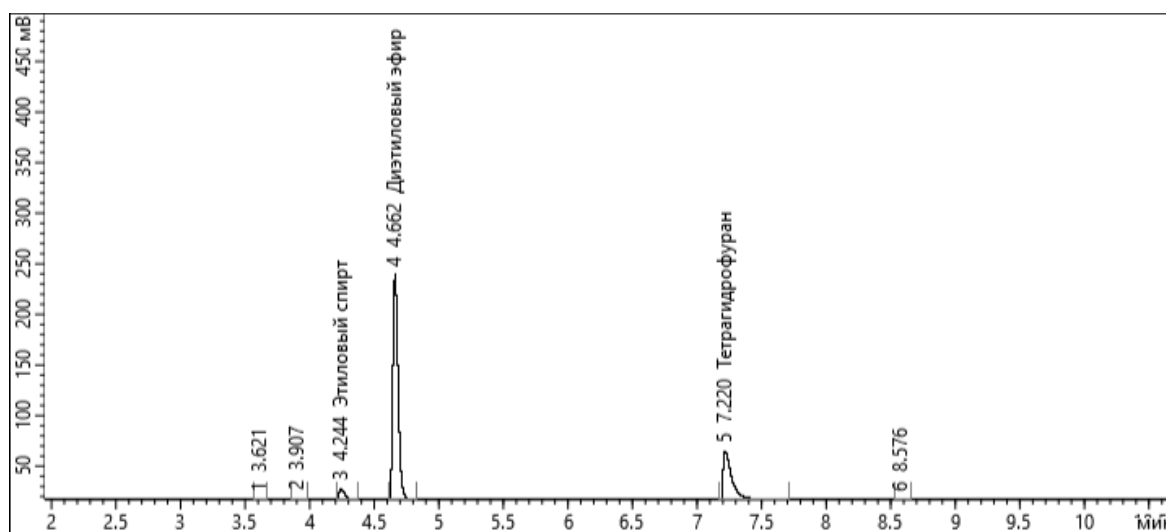


Рисунок 13 – Хроматограмма 0,4 % водного раствора ПМАК, проанализированного на ПИД

Для расчета концентрации каждого из идентифицированных в образце остаточных растворителей была проведена валидация методик их количественного определения.

3.1.1.3. Валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии

Диэтиловый эфир

Оценка показателя «Специфичность»

Специфичность метода определялась путем сравнения хроматограмм исследуемых образцов и возможных мешающих компонентов в используемых растворителях.

Для этого были записаны хроматограммы: холостая проба, ДЭ (0,4 % раствор), ПМАК (0,4 % раствор).

Установлено, что хроматографическая система в условиях выбранного газохроматографического режима не создает посторонних сигналов в области времени удерживания 4,6–4,8 мин: на хроматограмме холостой пробы какие-либо пики в данном интервале отсутствуют, что исключает влияние фонового шума и компонентов матрицы на детектирование целевого компонента (Рисунок 14).

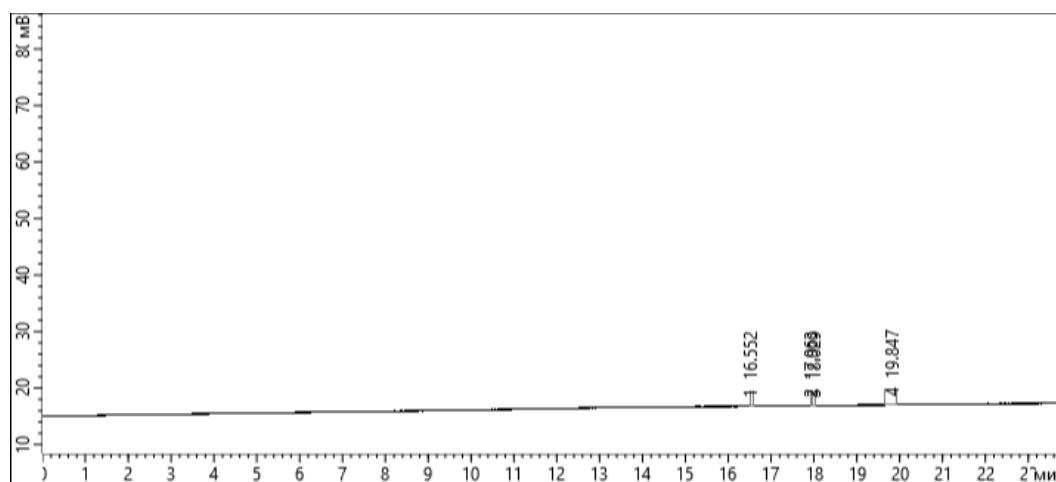


Рисунок 14 – Хроматограмма холостой пробы

Хроматограмма раствора стандартного образца ДЭ в подходящем растворителе характеризуется четким симметричным пиком с временем удерживания 4,6–4,8 мин (Рисунок 15), подтверждая, что данная зона элюирования является специфичной для ДЭ в выбранных газохроматографических условиях.

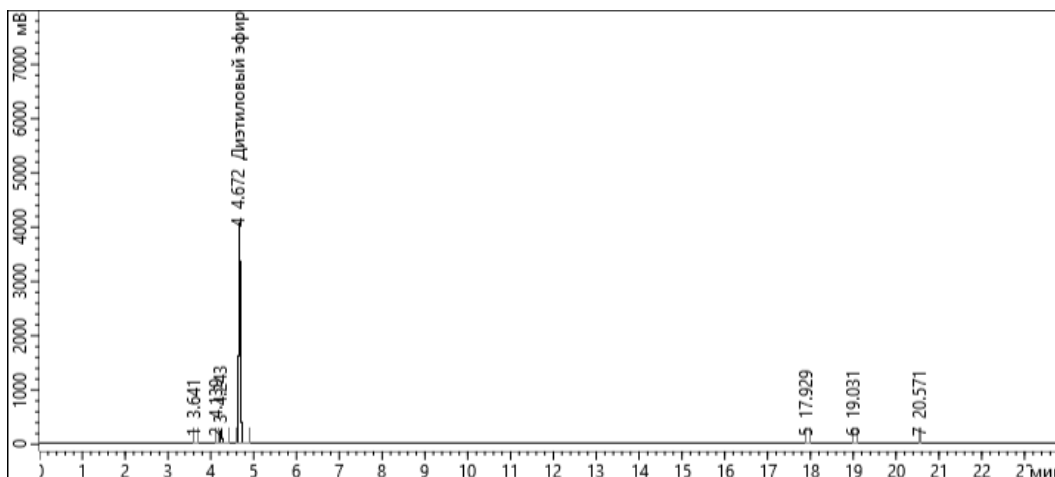


Рисунок 15 – Хроматограмма раствора ДЭ 0,4 %

Для проверки специфичности метода в отношении определения остаточного ДЭ в составе полимера была зарегистрирована хроматограмма раствора ПМАК, синтезированного с использованием ДЭ, после соответствующей пробоподготовки (Рисунок 16).

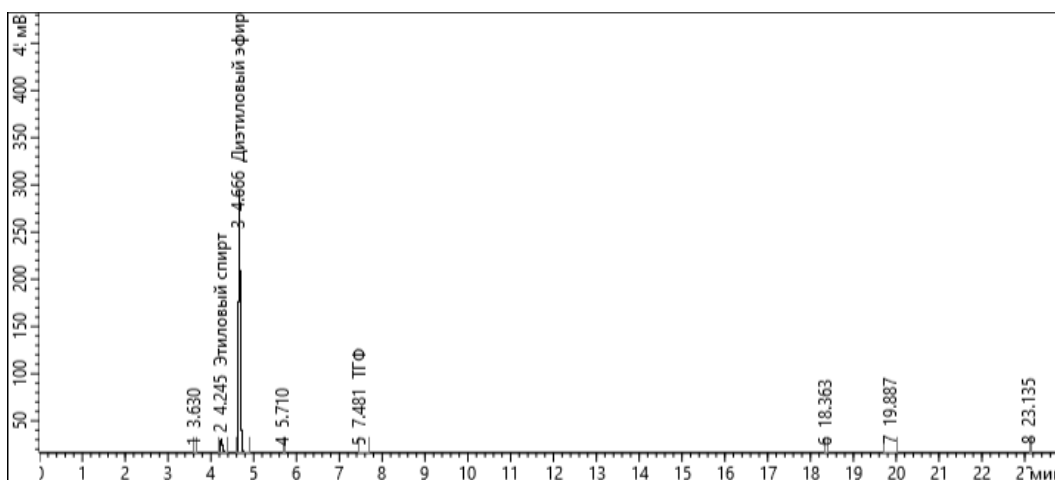


Рисунок 16 – Хроматограмма раствора ПМАК 0,4 %

На хроматограмме ПМАК в области 4,6–4,8 мин наблюдается четко выраженный пик, полностью совпадающий по времени удерживания с пиком стандартного образца ДЭ. Это доказывает, что предложенный газохроматографический метод является специфичным для определения остаточных количеств ДЭ в полимере ПМАК, а полимерная матрица и другие летучие компоненты не создают помех для детектирования ДЭ на выбранном времени удерживания.

Оценка показателя «Линейность»

Строилась калибровочная кривая в диапазоне концентраций от 0,005 до 0,16 мкл/мл (Рисунок 17).

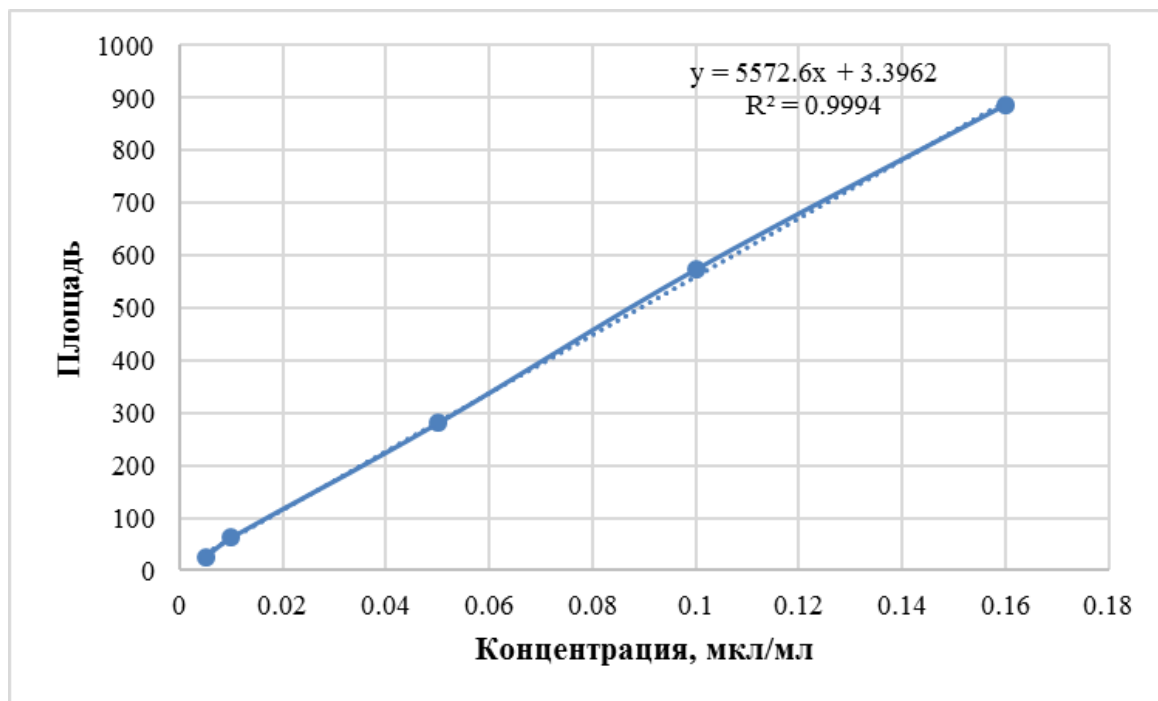


Рисунок 17 – Предварительный вид калибровочного графика и уравнение прямой

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 23).

Таблица 23 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{\text{расч.},b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{\text{расч.},a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t(P, f)_{\text{табл.}}$	$P, \%$	f
73,4453	75,8736	0,5119	6,6341	5,841	99	3

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 18).

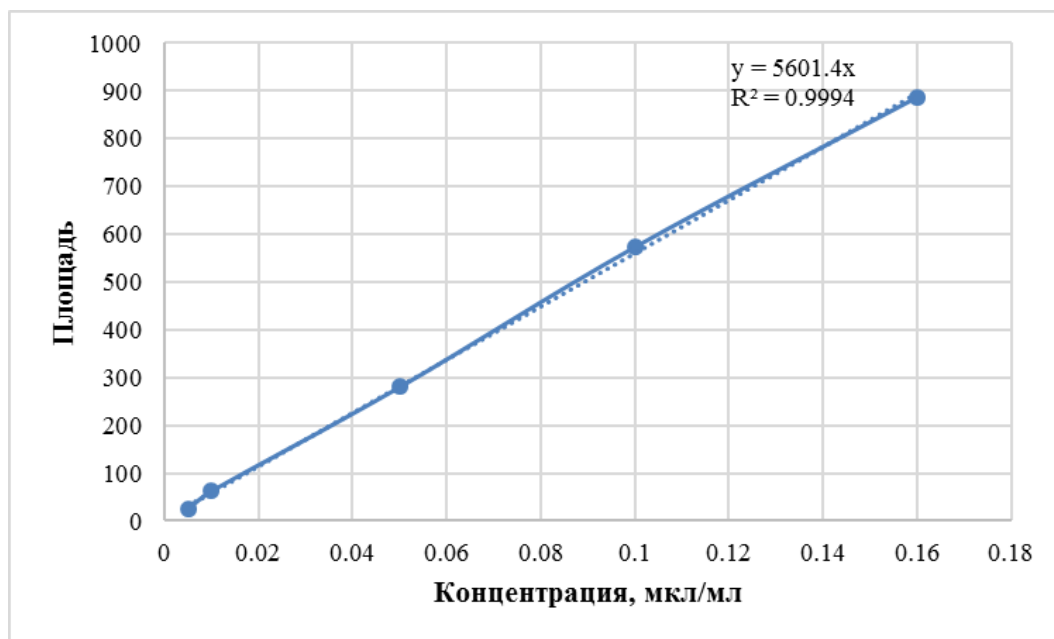


Рисунок 18 – Калибровочный график и уравнение прямой для расчета ПО и ПКО ДЭ

Определение показателя «Предел обнаружения»

ПО для ДЭ, рассчитанный по соотношению сигнал/шум ($S/N \geq 3$), составил 0,00000012 мкл/мл.

Определение показателя «Предел количественного определения»

Значение ПКО для ДЭ, оцененное по соотношению сигнал/шум ($S/N \geq 10$), составило 0,00000044 мкл/мл.

Рассчитанная концентрация ПКО была принята в качестве нижней границы при построении новой калибровочной зависимости. Таким образом, рабочий диапазон определяемых концентраций составил от 0,00000044 до 0,16 мкл/мл.

Перед статистической обработкой данных для построения калибровочной зависимости была проведена проверка однородности измерений для каждой приготовленной концентрации стандартных растворов. Для выявления грубых ошибок в малых выборках использовали Q-критерий (Таблица 24).

При доверительной вероятности $p = 0,99$ все вычисленные значения Q-критерия для экспериментальных данных не превысили критического значения Q (99 %; 3)_{табл.}. Это подтвердило однородность выборки и отсутствие статистических выбросов, что позволило перейти к дальнейшему анализу.

Таблица 24 – Однородность выборки при построении калибровочной зависимости

Концентрация, мкл/мл	№ опыта			R	R ₁	Q _{min}	R ₂	Q _{max}	Q (P, n) табл.	P, %
	1	2	3							
0,00000044	0,00246	0,00249	0,00253	0,00007	0,00003	0,429	0,00004	0,571	0,99	99
0,01	61,991	62,659	63,488	1,497	0,668	0,446	0,829	0,554		
0,05	271,119	278,063	291,958	20,866	6,944	0,333	13,922	0,667		
0,1	568,781	574,280	577,814	9,033	5,499	0,609	3,534	0,391		
0,16	873,755	887,475	901,011	27,256	13,72	0,503	13,536	0,497		

Представленная на рисунке 19 зависимость площади сигнала от концентрации носит линейный характер в изученном диапазоне и описывается уравнением регрессии $y = bx + a$.

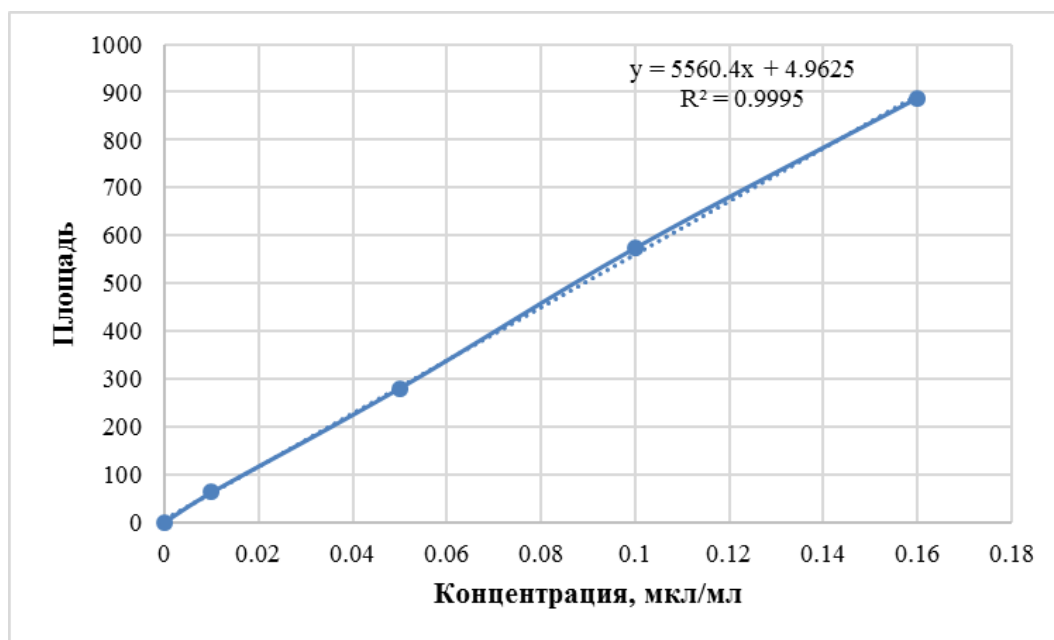


Рисунок 19 – Вид калибровочного графика и уравнение прямой с учетом включения точки ПКО ДЭ

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 25).

Таблица 25 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{расч.,b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{расч.,a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t (P, f)_{табл.}$	P, %	f
81,5222	68,2071	0,8324	5,9618	5,841	99	3

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 20). Коэффициент детерминации R^2 равен 0,9994.

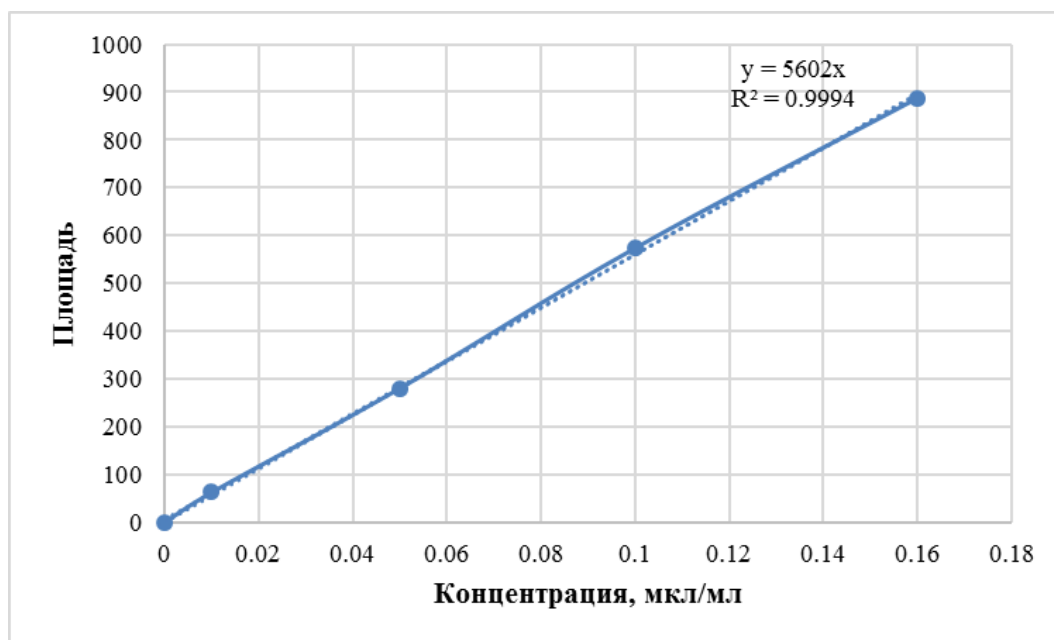


Рисунок 20 – Итоговый вид калибровочного графика и уравнение прямой

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости

f	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	b	a	$t(P, f)$	Δb	S_0^2	r	$P, \%$
3	0,064	360,8286	5602	0	5,841	442,0162	101,4762	0,9997	99

Оценка показателя «Правильность»

Правильность оценивалась для 9 определений трех концентраций (0,00000044; 0,0280; 0,0360 мкл/мл). Номинальное содержание (0,0280 мкл/мл) было рассчитано исходя из ПДК для ДЭ, прописанного в ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» [4]. Для проверки правильности в области завышенных значений использовали концентрацию, составляющую

120 % от номинальной (0,0360 мкл/мл). Метрологические характеристики представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Метрологические характеристики методики количественного определения ДЭ методом ГХ

n	f	μ	$\bar{X}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	$\varepsilon_{\text{ср.}}$, %	RSD, %
9	8	100	100,74	1,5902	1,2611	99	3,36	4,2371	1,4124	1,4019	1,2517

Оценка показателя «Прецизионность»

Прецизионность исследовалась на однородных образцах и оценивалась в двух вариантах: повторяемость (сходимость) (Таблица 28), внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность. Расчеты проводились на основании 6 определений концентрации с известным содержанием ДЭ (0,0280 мкл/мл).

Таблица 28 – Метрологические характеристики определения повторяемости количественного определения ДЭ методом ГХ

n	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	RSD, %
6	5	100,36	1,0483	99	4,03	4,2247	1,7247	1,0446

Внутрिलाбораторная прецизионность (Таблица 29) определялась в течение малого промежутка времени в одной и той же лаборатории, на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, с использованием одного и того же прибора, но разными исследователями.

Таблица 29 – Метрологические характеристики определения внутрिलाбораторной прецизионности при количественном определении ДЭ методом ГХ

Концентрация, мкл/мл	Исследователь	μ	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f) табл.	Δx	ε	$t_{\text{расч.}}$	F(P, f1, f2) табл.	F _{выч.}
0,00000044	1	100	5	100,95	1,3435	99	4,03	5,4144	5,3633	1,7348	10,97	0,7833
0,00000044	2	100	5	100,21	1,5179	99	4,03	6,1175	6,1048	0,3352	10,97	0,7833
0,0280	1	100	5	99,93	1,1988	99	4,03	4,8310	4,8343	0,1368	10,97	0,7354
	2	100	5	99,95	1,3979	99	4,03	5,6335	5,6365	0,0937	10,97	
0,0360	1	100	5	100,91	0,9849	99	4,03	3,9694	3,9338	2,2576	10,97	1,7802
	2	100	5	100,45	0,7382	99	4,03	2,9751	2,9619	1,4824	10,97	

Воспроизводимость оценивалась по критерию Стьюдента. Поскольку $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$ (99 %, 5), то результаты двух выборок следует считать свободными от систематической ошибки, а значит воспроизводимыми.

Тетрагидрофуран

Оценка показателя «Специфичность»

Специфичность метода определялась путем сравнения хроматограмм исследуемых образцов и возможных мешающих компонентов в используемых растворителях.

Для этого были записаны хроматограммы: холостая проба, ТГФ (0,4 % раствор), ПМАК (0,4 % раствор).

Установлено, что хроматографическая система в условиях выбранного газохроматографического режима не создает посторонних сигналов в области времени удерживания 7–8 мин: на хроматограмме холостой пробы какие-либо пики в данном интервале отсутствуют, что исключает влияние фонового шума и компонентов матрицы на детектирование целевого компонента (Рисунок 21).

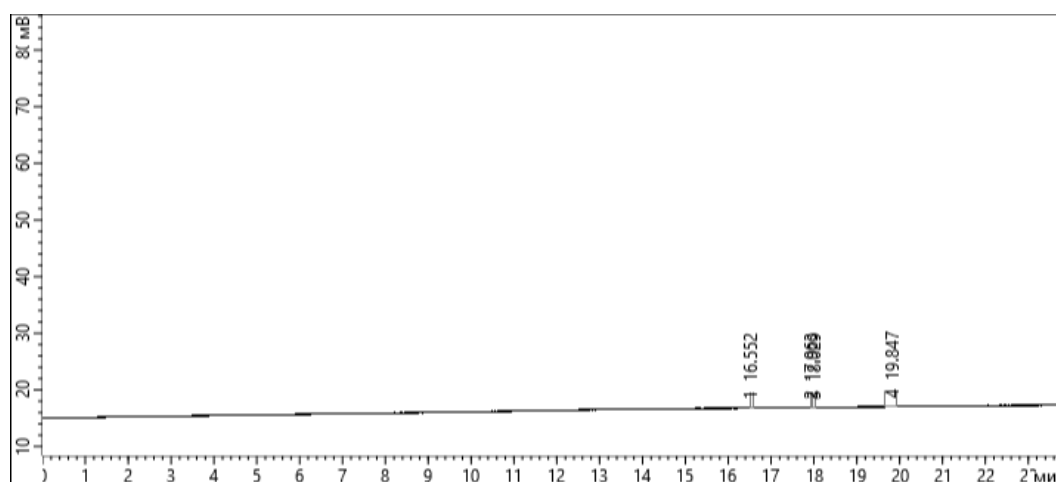


Рисунок 21 – Хроматограмма холостой пробы

Хроматограмма раствора стандартного образца ТГФ в подходящем растворителе характеризуется четким пиком с временем удерживания 7,3 мин (Рисунок 22), подтверждая, что данная зона элюирования является специфичной для ТГФ в выбранных газохроматографических условиях.

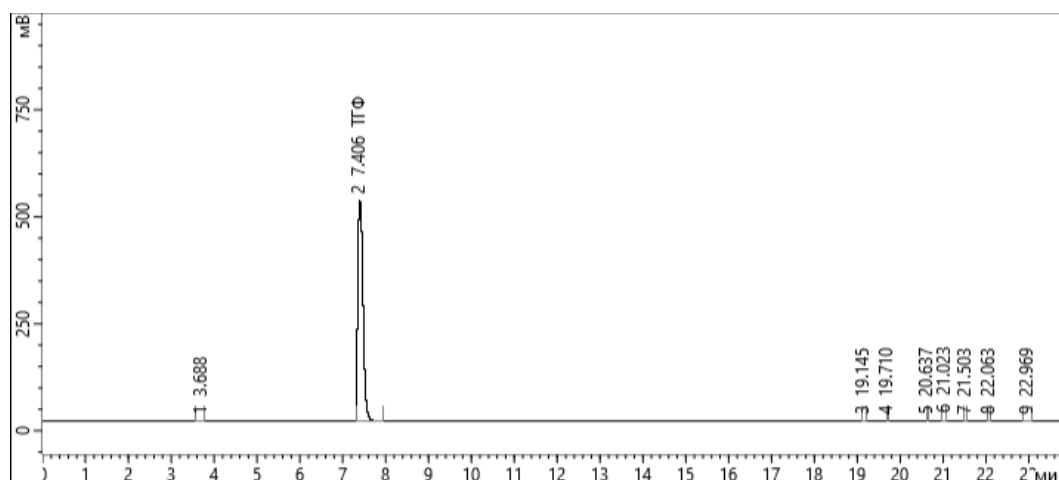


Рисунок 22 – Хроматограмма раствора тетрагидрофурана 0,4 %

Для проверки специфичности метода в отношении определения остаточного ТГФ в составе полимера была зарегистрирована хроматограмма раствора ПМАК, синтезированного с использованием ТГФ, после соответствующей пробоподготовки (Рисунок 23). На хроматограмме ПМАК в области 7–8 мин наблюдается четко выраженный пик, полностью совпадающий по времени удерживания (7,3 мин) с пиком стандартного образца ТГФ. Это доказывает, что предложенный газохроматографический метод является специфичным для определения остаточных количеств ТГФ в полимере ПМАК, а полимерная матрица и другие летучие компоненты не создают помех для детектирования ТГФ на выбранном времени удерживания.

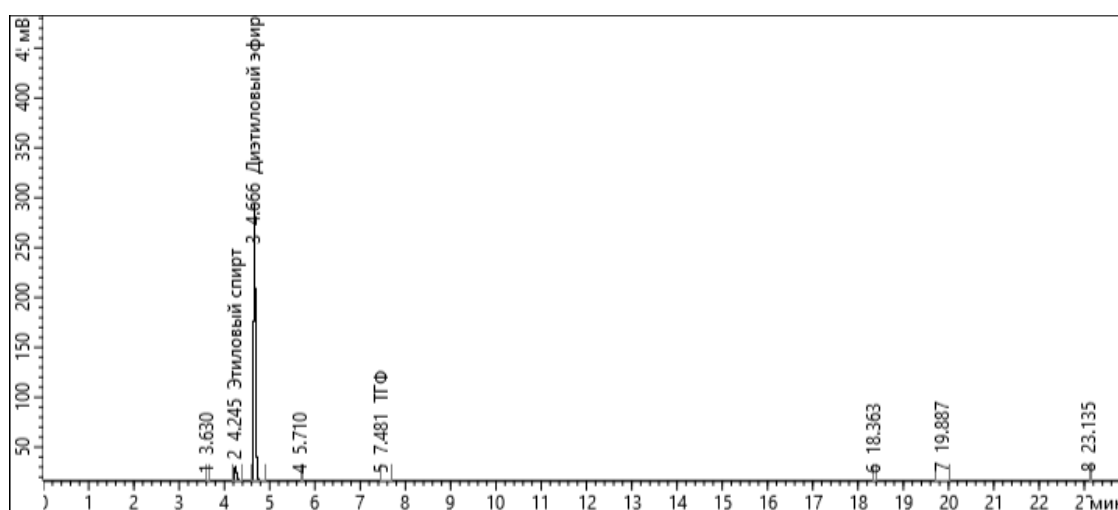


Рисунок 23 – Хроматограмма раствора ПМАК 0,4 %

Оценка показателя «Линейность»

Строилась калибровочная кривая в диапазоне концентраций от 0,001 до 0,005 мкл/мл (Рисунок 24).

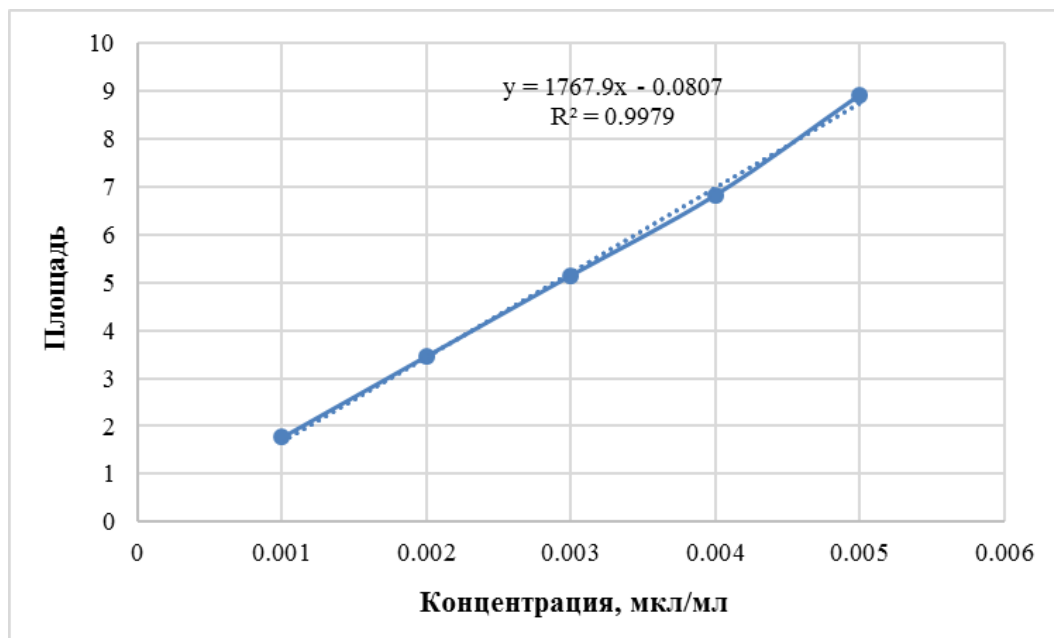


Рисунок 24 – Предварительный вид калибровочного графика и уравнение прямой

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 30).

Таблица 30 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{\text{расч.},b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{\text{расч.},a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t(P, f)_{\text{табл.}}$	$P, \%$	f
38,0775	46,4299	0,5243	0,1539	5,841	99	3

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 25).

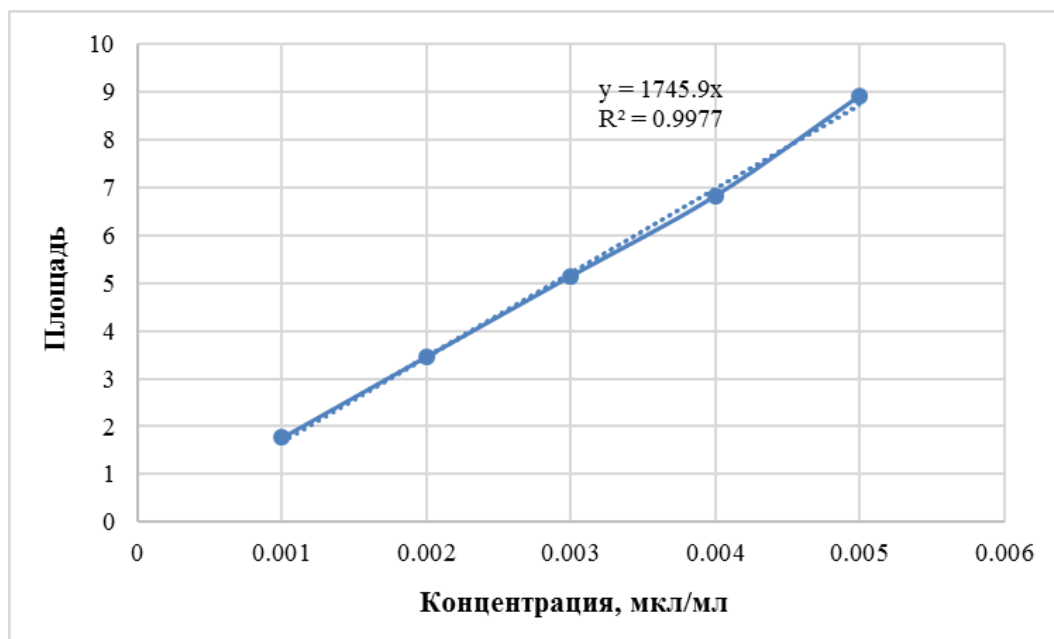


Рисунок 25 – Калибровочный график и уравнение прямой для расчета ПО и ПКО ТГФ

Определение показателя «Предел обнаружения»

ПО для ТГФ, рассчитанный по соотношению сигнал/шум ($S/N \geq 3$), составил 0,0000004 мкл/мл.

Определение показателя «Предел количественного определения»

Значение ПКО для ТГФ, оцененное по соотношению сигнал/шум ($S/N \geq 10$), составило 0,0000014 мкл/мл.

Рассчитанная концентрация ПКО была принята в качестве нижней границы при построении новой калибровочной зависимости. Таким образом, рабочий диапазон определяемых концентраций составил от 0,0000014 до 0,005 мкл/мл.

Перед статистической обработкой данных для построения калибровочной зависимости была проведена проверка однородности измерений для каждой приготовленной концентрации стандартных растворов. Для выявления грубых ошибок в малых выборках использовали Q-критерий (Таблица 31).

При доверительной вероятности $p = 0,99$ все вычисленные значения Q-критерия для экспериментальных данных не превысили критического значения $Q(99\%; 3)_{\text{табл.}}$. Это подтвердило однородность выборки и отсутствие статистических выбросов, что позволило перейти к дальнейшему анализу.

Таблица 31 – Однородность выборки при построении калибровочной зависимости

Концентрация, мкл/мл	№ опыта			R	R ₁	Q _{min}	R ₂	Q _{max}	Q (P, n) табл.	P, %
	1	2	3							
0,0000014	0,00240	0,00243	0,00248	0,00008	0,00003	0,375	0,00005	0,625	0,99	99
0,002	3,391	3,415	3,573	0,182	0,024	0,132	0,158	0,868		
0,003	5,082	5,116	5,244	0,162	0,034	0,210	0,128	0,790		
0,004	6,791	6,829	6,857	0,066	0,038	0,576	0,028	0,424		
0,005	8,342	9,154	9,263	0,921	0,812	0,882	0,109	0,118		

Представленная на рисунке 26 зависимость площади сигнала от концентрации носит линейный характер в изученном диапазоне и описывается уравнением регрессии $y = bx + a$.

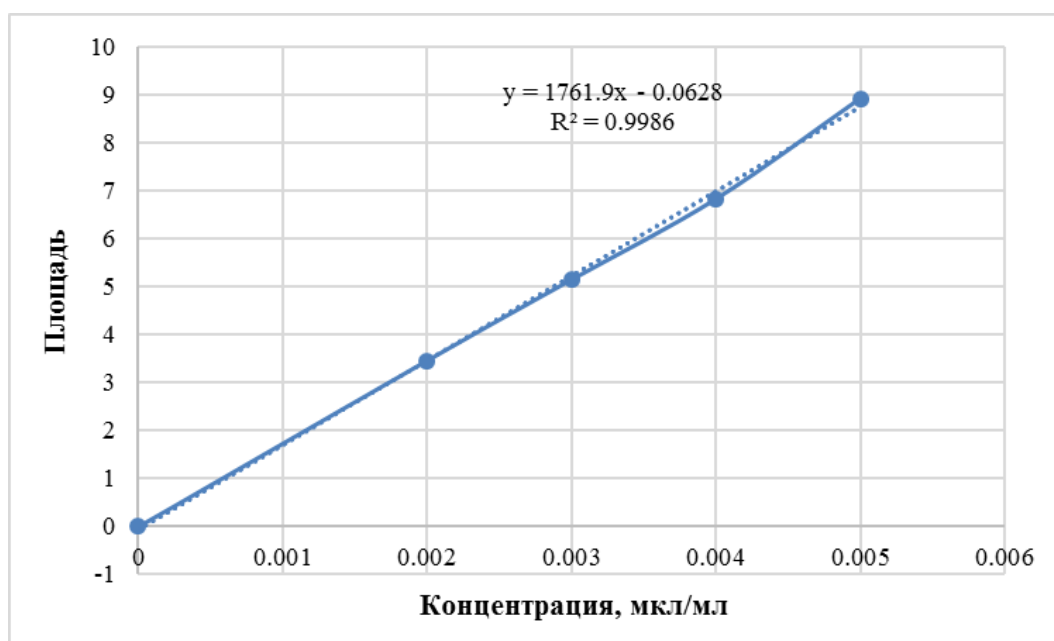


Рисунок 26 – Вид калибровочного графика и уравнение прямой с учетом включения точки ПКО ТГФ

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 32).

Таблица 32 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{расч.,b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{расч.,a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t (P, f)_{табл.}$	P, %	f
46,0740	38,2404	0,4999	0,1257	5,841	99	3

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 27). Коэффициент детерминации R^2 равен 0,9985.

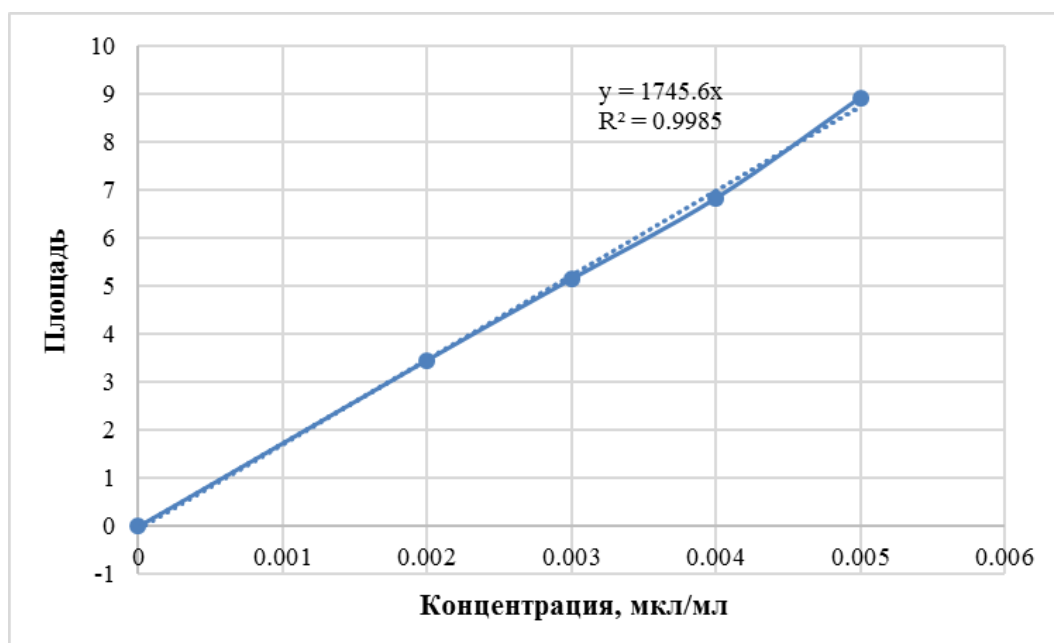


Рисунок 27 – Итоговый вид калибровочного графика и уравнение прямой

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости, представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости

f	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	b	a	t (P, f)	Δb	S_0^2	r	P, %
3	0,003	4,8709	1745,6	0	5,841	232,4817	0,0234	0,9993	99

Оценка показателя «Правильность»

Правильность оценивалась для 9 определений трех концентраций (0,0000014 мкл/мл; 0,0032 мкл/мл; 0,0038 мкл/мл). Номинальное содержание (0,0032 мкл/мл) было рассчитано исходя из ПДК для ТГФ, прописанного в ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» [4]. Для проверки правильности в области завышенных значений использовали концентрацию,

составляющую 120 % от номинальной (0,0038 мкл/мл). Метрологические характеристики представлены в таблице 34.

Таблица 34 – Метрологические характеристики методики количественного определения ТГФ методом ГХ

n	f	μ	$\bar{X}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	$\varepsilon_{\text{ср.}}$, %	RSD, %
9	8	100	99,19	1,9071	1,3809	99	3,36	4,6400	1,5467	1,5592	1,3922

Оценка показателя «Прецизионность»

Прецизионность исследовалась на однородных образцах и оценивалась в двух вариантах: повторяемость (сходимость) (Таблица 35), внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность. Расчеты проводились на основании 6 определений концентрации с известным содержанием ТГФ (0,0032 %).

Таблица 35 – Метрологические характеристики определения повторяемости количественного определения ТГФ методом ГХ

n	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	RSD, %
6	5	98,57	1,6983	99	4,03	6,8443	2,7942	1,7229

Внутрिलाбораторная прецизионность (Таблица 36) определялась в течение малого промежутка времени в одной и той же лаборатории, на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, с использованием одного и того же прибора, но разными исследователями.

Таблица 36 – Метрологические характеристики определения внутрिलाбораторной прецизионности при количественном определении ТГФ методом ГХ

Концент-рация, мкл/мл	Исследо-ватель	μ	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f) табл.	Δx	ε	$t_{\text{расч.}}$	F(P,f1,f2) табл.	F _{выч.}
0,0000014	1	100	5	100,39	1,5883	99	4,03	6,4009	6,3761	0,5991	10,97	0,8759
	2	100	5	100,25	1,6970	99	4,03	6,8391	6,8219	0,3638	10,97	
0,0032	1	100	5	98,38	1,2815	99	4,03	5,1645	5,2496	3,0997	10,97	0,6689
	2	100	5	98,52	1,5668	99	4,03	6,3144	6,4089	2,3066	10,97	
0,0038	1	100	5	99,29	0,9485	99	4,03	3,8222	3,8492	1,8083	10,97	1,0579
	2	100	5	98,73	0,92221	99	4,03	3,7162	3,7638	3,3617	10,97	

Воспроизводимость оценивалась по критерию Стьюдента. Поскольку $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$ (99 %, 5), то результаты двух выборок следует считать свободными от систематической ошибки, а значит воспроизводимыми.

Этиловый спирт

Оценка показателя «Специфичность»

Специфичность метода определялась путем сравнения хроматограмм исследуемых образцов и возможных мешающих компонентов в используемых растворителях.

Для этого были записаны хроматограммы: холостая проба, ЭС (0,4 %), ПМАК (0,4 % раствор).

Установлено, что хроматографическая система в условиях выбранного газохроматографического режима не создает посторонних сигналов в области времени удерживания 4,2–4,3 мин: на хроматограмме холостой пробы какие-либо пики в данном интервале отсутствуют, что исключает влияние фонового шума и компонентов матрицы на детектирование целевого компонента (Рисунок 28).

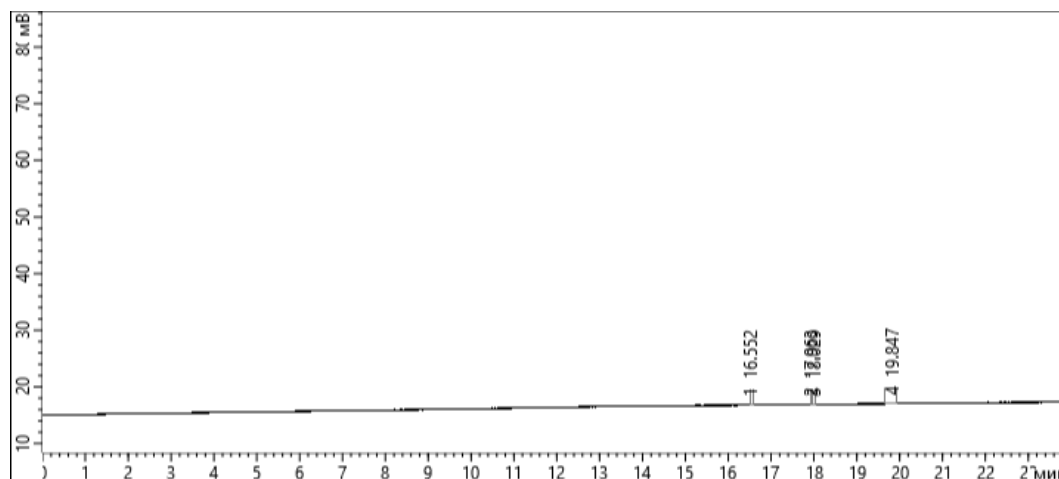


Рисунок 28 – Хроматограмма холостой пробы

Хроматограмма раствора стандартного образца ЭС в подходящем растворителе характеризуется четким симметричным пиком с временем удерживания 4,2–4,3 мин (Рисунок 29), подтверждая, что данная зона элюирования является специфичной для ЭС в выбранных газохроматографических условиях.

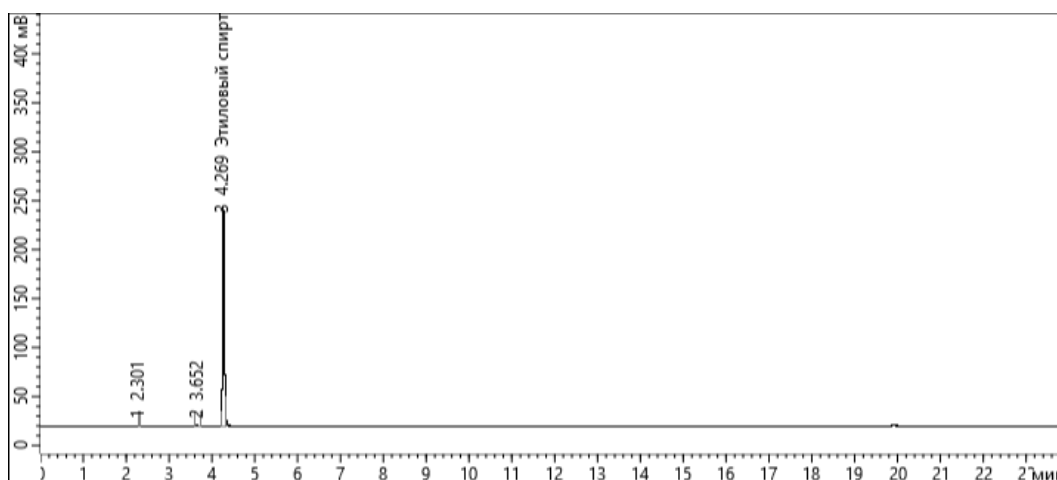


Рисунок 29 – Хроматограмма раствора ЭС 0,4 %

Для проверки специфичности метода в отношении определения остаточного ЭС в составе полимера была зарегистрирована хроматограмма раствора ПМАК, синтезированного с использованием этанола, после соответствующей пробоподготовки (Рисунок 30).

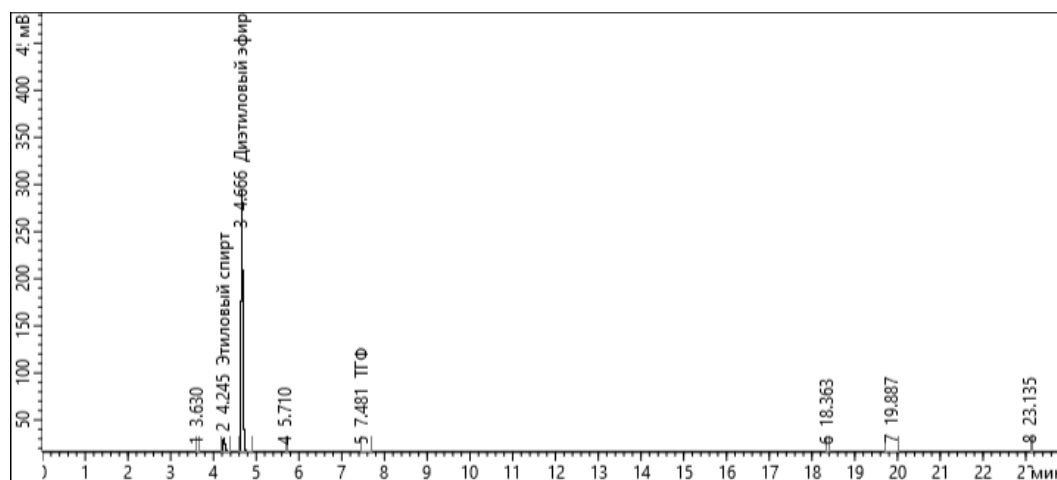


Рисунок 30 – Хроматограмма раствора ПМАК 0,4 %

На хроматограмме ПМАК в области 4,2–4,3 мин наблюдается четко выраженный пик, полностью совпадающий по времени удерживания с пиком стандартного образца ЭС. Это доказывает, что предложенный газохроматографический метод является специфичным для определения остаточных количеств ЭС в полимере ПМАК, а полимерная матрица и другие

летучие компоненты не создают помех для детектирования ЭС на выбранном времени удерживания.

Оценка показателя «Линейность»

Строилась калибровочная кривая в диапазоне концентраций от 0,004 до 0,03 мкл/мл (Рисунок 31).

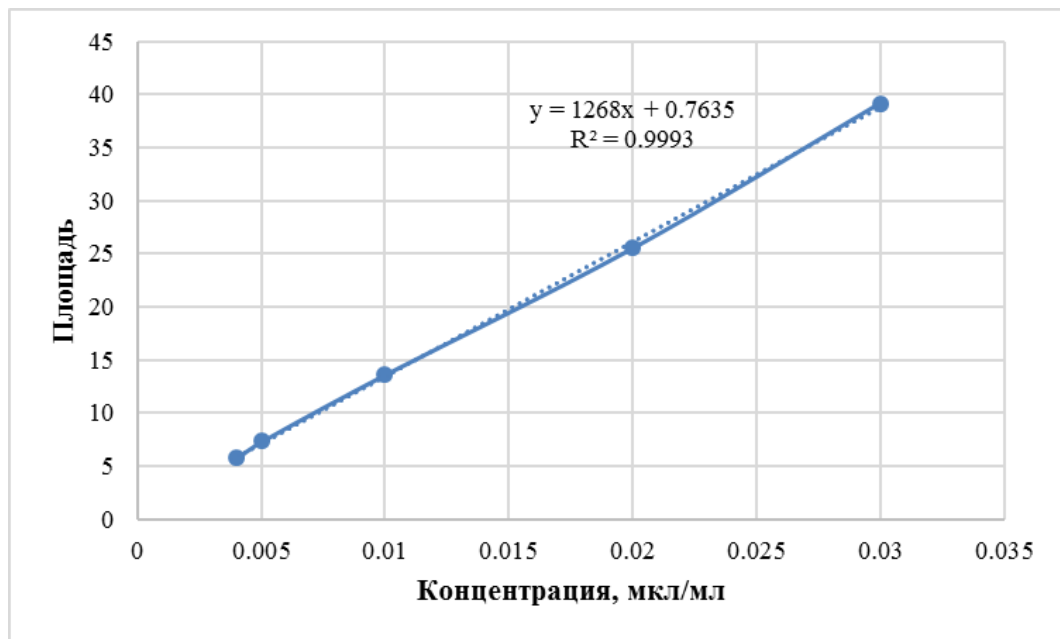


Рисунок 31 – Предварительный вид калибровочного графика и уравнение прямой

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 37).

Таблица 37 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{\text{расч.},b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{\text{расч.},a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t(P, f)_{\text{табл.}}$	$P, \%$	f
63,8828	19,8482	2,2658	0,3369	5,841	99	3

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 32).

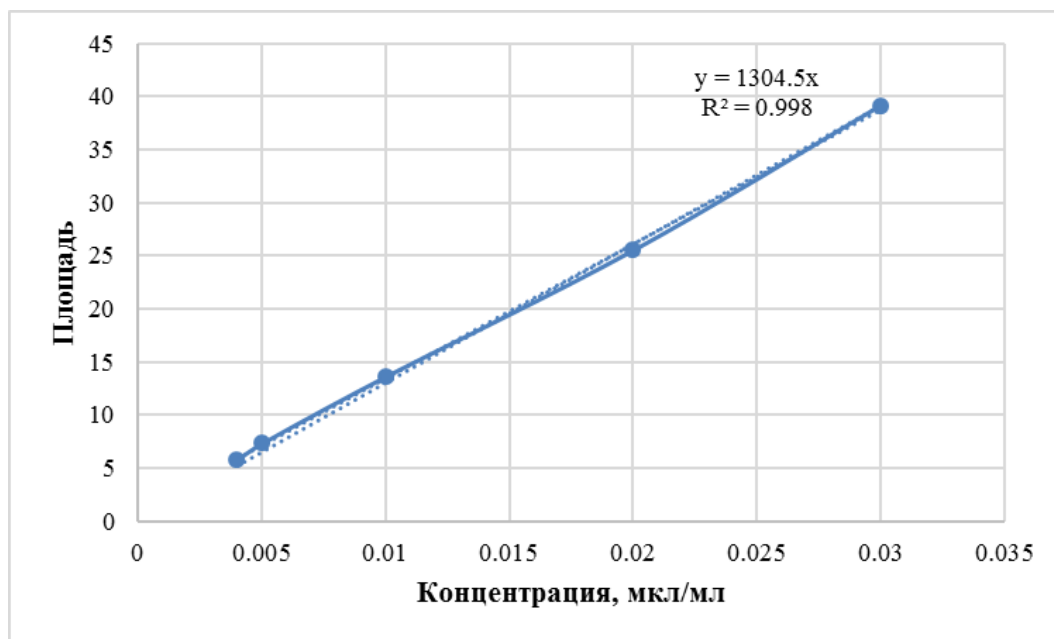


Рисунок 32 – Калибровочный график и уравнение прямой для расчета ПО и ПКО ЭС

Определение показателя «Предел обнаружения»

ПО для ЭС, рассчитанный по соотношению сигнал/шум ($S/N \geq 3$), составил 0,0000005 мкл/мл.

Определение показателя «Предел количественного определения»

Значение ПКО для ЭС, оцененное по соотношению сигнал/шум ($S/N \geq 10$), составило 0,0000019 мкл/мл.

Рассчитанная концентрация ПКО была принята в качестве нижней границы при построении новой калибровочной зависимости. Таким образом, рабочий диапазон определяемых концентраций составил от 0,0000019 до 0,03 мкл/мл.

Перед статистической обработкой данных для построения калибровочной зависимости была проведена проверка однородности измерений для каждой приготовленной концентрации стандартных растворов. Для выявления грубых ошибок в малых выборках использовали Q-критерий (Таблица 38).

При доверительной вероятности $p = 0,99$ все вычисленные значения Q-критерия для экспериментальных данных не превысили критического значения $Q(99\%; 3)_{\text{табл.}}$. Это подтвердило однородность выборки и отсутствие статистических выбросов, что позволило перейти к дальнейшему анализу.

Таблица 38 – Однородность выборки при построении калибровочной зависимости

Концентрация, мкл/мл	№ опыта			R	R ₁	Q _{min}	R ₂	Q _{max}	Q (P, n) табл.	P, %
	1	2	3							
0,0000019	0,00247	0,00248	0,00250	0,00003	0,00001	0,333	0,00002	0,667	0,99	99
0,005	7,301	7,309	7,318	0,017	0,008	0,471	0,009	0,529		
0,01	13,525	13,610	13,659	0,134	0,085	0,634	0,049	0,366		
0,02	25,358	25,497	25,641	0,283	0,139	0,491	0,144	0,509		
0,03	39,060	39,120	39,248	0,188	0,060	0,319	0,128	0,681		

Представленная на рисунке 33 зависимость площади сигнала от концентрации носит линейный характер в изученном диапазоне и описывается уравнением регрессии $y = bx + a$.



Рисунок 33 – Вид калибровочного графика и уравнение прямой с учетом включения точки ПКО ЭС

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 39).

Таблица 39 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{расч.,b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{расч.,a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t (P, f)_{табл.}$	P, %	f
56,0298	22,9141	1,0842	0,3868	5,841	99	3

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 34).

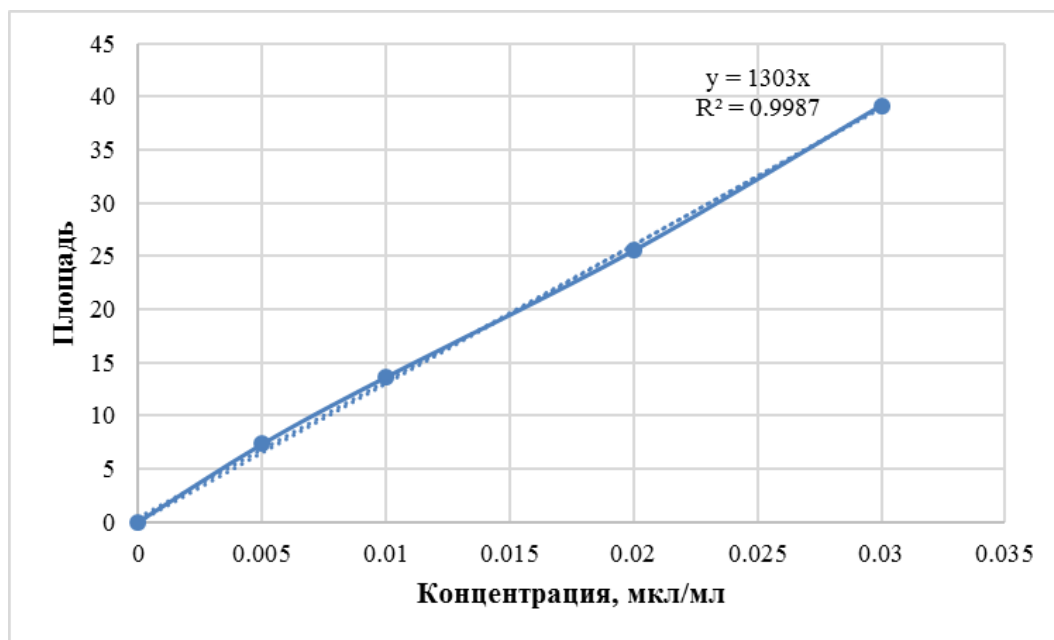


Рисунок 34 – Итоговый вид калибровочного графика и уравнение прямой

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости, представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости

f	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	b	a	$t(P, f)$	Δb	S_0^2	r	$P, \%$
3	0,013	17,1102	1303	0	5,841	157,90	0,4238	0,9994	99

Оценка показателя «Правильность»

Правильность оценивалась для 9 определений трех концентраций (0,0000019; 0,0253; 0,0303 мкл/мл). Номинальное содержание (0,0253 мкл/мл) было рассчитано исходя из ПДК для ЭС, прописанного в ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» [4]. Для проверки правильности в области завышенных значений использовали концентрацию, составляющую

120 % от номинальной (0,0303 мкл/мл). Метрологические характеристики представлены в таблице 41.

Таблица 41 – Метрологические характеристики методики количественного определения ЭС методом ГХ

n	f	μ	$\bar{X}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	$\varepsilon_{\text{ср.}}$, %	RSD, %
9	8	100	99,11	1,5241	1,2345	99	3,36	4,1480	1,3827	1,3951	1,2457

Оценка показателя «Прецизионность»

Прецизионность исследовалась на однородных образцах и оценивалась в двух вариантах: повторяемость (сходимость) (Таблица 42), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Расчеты проводились на основании 6 определений концентрации с известным содержанием ЭС (0,0253 мкл/мл).

Таблица 42 – Метрологические характеристики определения повторяемости количественного определения ЭС методом ГХ

n	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	RSD, %
6	5	98,09	1,5692	99	4,03	6,3241	2,5818	1,5997

Внутрилабораторная прецизионность (Таблица 43) определялась в течение малого промежутка времени в одной и той же лаборатории, на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, с использованием одного и того же прибора, но разными исследователями.

Таблица 43 – Метрологические характеристики определения внутрилабораторной прецизионности при количественном определении ЭС методом ГХ

Концентрация, мкл/мл	Исследователь	μ	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f) табл.	Δx	ε	$t_{\text{расч.}}$	F(P,f1,f2) табл.	F _{выч.}
0,0000019	1	100	5	99,73	0,8881	99	4,03	3,5789	3,5883	0,7279	10,97	0,7349
	2	100	5	99,96	1,0359	99	4,03	4,1746	4,1764	0,1019	10,97	
0,0253	1	100	5	98,28	1,4108	99	4,03	5,6857	5,7852	2,9848	10,97	0,7036
	2	100	5	98,23	1,6920	99	4,03	6,7785	6,9009	2,5846	10,97	
0,0303	1	100	5	97,92	1,9241	99	4,03	7,7541	7,9188	2,6469	10,97	1,9420
	2	100	5	98,14	1,3807	99	4,03	5,5643	5,6697	3,2969	10,97	

Воспроизводимость оценивалась по критерию Стьюдента. Поскольку $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$ (99 %, 5), то результаты двух выборок следует считать свободными от систематической ошибки, а значит воспроизводимыми.

3.1.1.4. Количественное определение остаточных органических растворителей в образце полиметакриловой кислоты

С использованием валидированных методик был проведен анализ образца ПМАК. Найденные концентрации остаточных растворителей представлены в таблице 44.

Таблица 44 – Результаты количественного анализа остаточных органических растворителей в образце ПМАК

Растворитель	Предельно допустимая концентрация	Найденная концентрация
Тетрагидрофуран	720 ppm	28 565 ppm
Диэтиловый эфир	0,5 %	1,98 %
Этиловый спирт	0,5 %	0,47 %

После анализа образца появилась необходимость в его повторной очистке от ОР (тетрагидрофурана, диэтилового эфира).

Выбор эффективного способа очистки проводили между использованием стерилизатора сухожарочного ГП-20 СПУ (Россия, Смоленское СКТБ СПУ, 2021) и лиофильной сушки EV-DF10A (Россия, ERSTEVAK Ltd., 2022).

В ходе исследования в образце, который очищался с помощью стерилизатора сухожарочного ГП-20 СПУ в течение 7,5 ч, было обнаружено присутствие тетрагидрофурана, диэтилового эфира и этилового спирта (Рисунок 35).

Несмотря на присутствие ОР в образце было выявлено уменьшение их содержания в пробе. Так, по окончании использования стерилизатора сухожарочного количество диэтилового эфира в образце снизилось в 1,88 раза, тетрагидрофурана в 1,37 раза, этилового спирта в 4,45 раза. Найденные концентрации диэтилового эфира и тетрагидрофурана также не соответствуют предельно допустимым концентрациям.

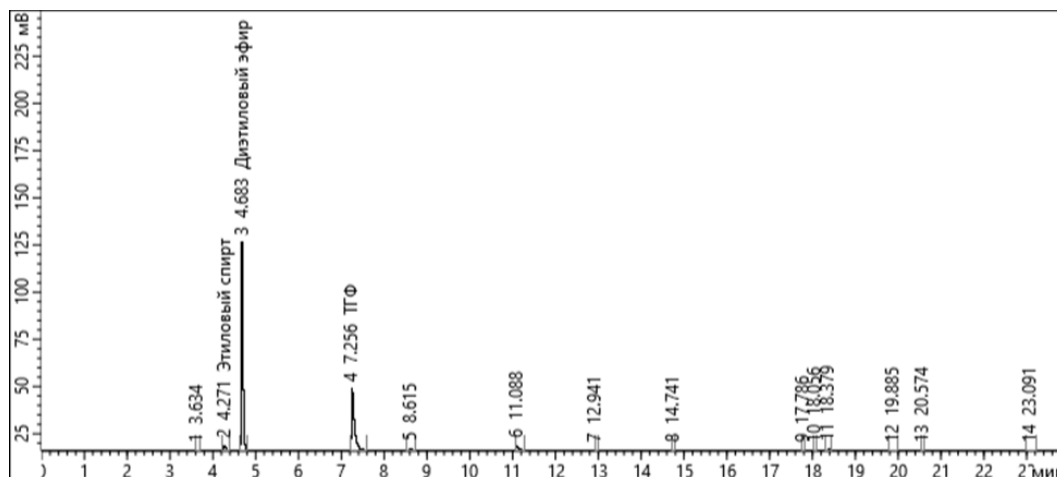


Рисунок 35 – Хроматограмма 0,4 % водного раствора ПМАК, очищенного с помощью стерилизатора сухожарочного в течение 7,5 ч, проанализированного на ПИД

Далее была исследована возможность применения лиофильной сушилki EV-DF10A в комплекте с форвакуумным насосом.

Хроматограмма образца, высушенного с помощью лиофильной сушилki EV-DF10A в комплекте с форвакуумным насосом в течение 12 ч, представлена на рисунке 36.

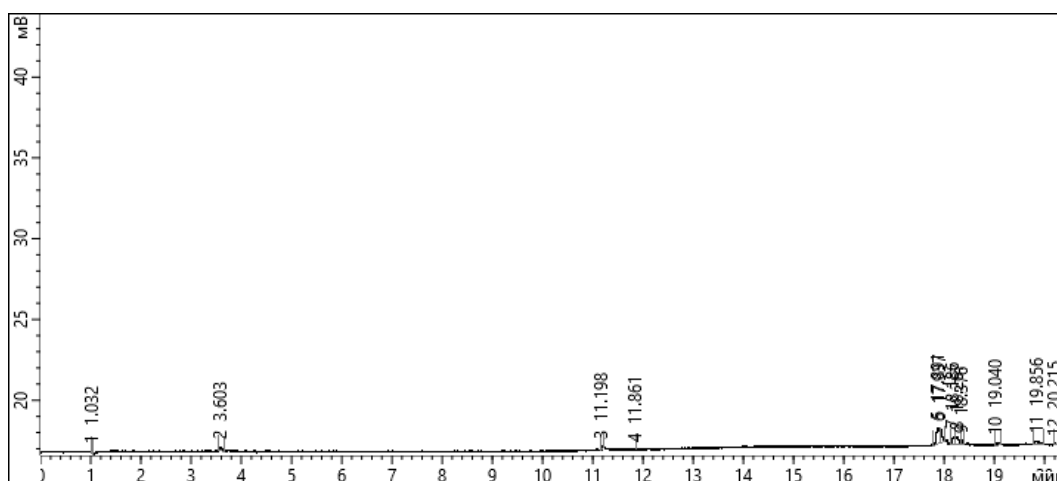


Рисунок 36 – Хроматограмма 0,4 % водного раствора ПМАК, очищенного с помощью лиофильной сушилki EV-DF10A в комплекте с форвакуумным насосом в течение 12 ч, проанализированного на ПИД

После проведения анализа было обнаружено, что для удаления ОР, таких как тетрагидрофуран и диэтиловый эфир, наиболее эффективным методом оказалась лиофильная сушка (Таблица 45).

Таблица 45 – Остаточные растворители, найденные в образце ПМАК, очищенном с помощью стерилизатора сухожарочного и лиофильной сушилки

Растворитель	Исходная концентрация	Метод с использованием стерилизатора сухожарочного	Метод с использованием лиофильной сушилки
Диэтиловый эфир	1,98 %	1,05 %	Не обнаружено
Тетрагидрофуран	28 565 ppm	20 885 ppm	Не обнаружено
Этиловый спирт	0,47 %	0,11 %	Не обнаружено

Поэтому в качестве дополнительной очистки от ОР был выбран именно метод с лиофильной сушкой.

Все дальнейшие исследования проводились на образцах ПМАК, очищенных от остаточных органических растворителей с помощью лиофильной сушилки. Эти образцы использовали в качестве полимерного носителя.

3.1.2. Оценка острой токсичности полиметакриловой кислоты

Оценка острой токсичности раствора ПМАК была необходима для определения его безопасности при потенциальном применении в качестве носителя ЛС.

Наблюдение за лабораторными животными осуществлялось на протяжении 14 суток. Ежедневная оценка клинических проявлений интоксикации выполнялась методом визуального наблюдения как в условиях естественного пребывания в клетке, так и при фиксации животных в руках.

После введения исследуемого вещества через 10 минут наблюдалось снижение двигательной активности, увеличение частоты и изменение ритма дыхания, пилоэрекция. Данные показатели сохранялись в течение 4 часов, затем восстанавливались до физиологической нормы.

Далее внешний вид и поведение животных в группе исследуемого вещества не отличались от интактных. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители стандартная. Вокализация у всех животных не отмечена.

Ширина глазной щели была в пределах нормы. Отечности, слезотечения, патологического отделяемого и гиперемии слизистой оболочки глаз не отмечалось.

Нос розовый, умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений у лабораторных животных не было. Зубы у всех сохранены. Нарушений слюноотделения не отмечено.

Частота, амплитуда, ритм дыхания были нормальными у всех животных.

Шерсть была опрятной, блестящей, без очагов облысения.

Видимые слизистые оболочки бледно-розовой окраски, блестящие. Половые органы самцов развиты правильно, молочные железы самок без уплотнений на ощупь, выделения из сосков отсутствовали. Деформации или отека конечностей нет. Кожа без признаков раздражения или воспаления. Тонус мускулатуры у подопытных групп не отличался от мышечного тонуса контрольных групп, был умеренным.

В ходе 14-суточного эксперимента по оценке острой токсичности раствора ПМАК на лабораторных животных при введении в дозировке 1500 мг/кг не было зарегистрировано случаев гибели животных. Отсутствие летальных исходов в течение всего периода наблюдения не позволило определить среднюю летальную дозу (LD_{50}), что свидетельствует о низкой токсичности исследуемого соединения в тестируемой дозировке.

Анализ динамики массы тела подопытных животных в течение 14-суточного эксперимента выявил характерные изменения. В первые 7 дней после введения раствора ПМАК наблюдалось статистически значимое снижение массы тела ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой (Таблица 46).

Таблица 46 – Масса тела лабораторных животных во время эксперимента по острой токсичности ($Me [Q_1; Q_3]$), г

Период наблюдения	Интактная группа		Опытная группа (ПМАК)	
	самцы	самки	самцы	самки
Фон	307,00 [301,25; 318,75]	246,50 [228,50; 266,00]	306,00 [303,25; 313,25]	238,00 [230,75; 258,00]
7-й день	346,50 [337,75; 359,00]	265,00 [245,75; 278,25]	308,00 [303,25; 312,00]*	240,50 [233,00; 252,50]
14-й день	388,50 [376,00; 403,25]	280 [267,75; 293,00]	350,50 [343,25; 352,50]	256,50 [248,50; 268,25]
Примечание: * $p < 0,05$, достоверные отличия от интактной группы (критерий Манна – Уитни).				

В последующий период (8–14-е сутки) отмечалась выраженная тенденция к нормализации антропометрических показателей. Однако, ввиду ограниченной продолжительности эксперимента, животные опытной группы не достигли полного восстановления исходной массы тела и не вышли на показатели, сопоставимые с интактной группой ($p > 0,05$).

Макроскопическое исследование внутренних органов

Проведенное макроскопическое исследование внутренних органов лабораторных животных не выявило существенных патологических изменений в большинстве органов как в интактной группе, так и у животных, получавших раствор ПМАК.

Головной мозг. Оболочки головного мозга тонкие, прозрачные. Вещество мозга обычной плотности, поверхность мозга гладкая. На фронтальных разрезах мозга отчетливо выделяются серое и белое вещество. Желудочки мозга обычной величины.

Сердце. Величина и форма обычные. Листки перикарда тонкие, прозрачные, гладкие. В правом и левом желудочках содержится незначительное количество темной жидкой крови. Клапаны сердца тонкие, блестящие, гладкие. Мышца сердца на разрезе однородной вишнево-коричневатой окраски, умеренно плотная.

Тимус обычной формы, серо-белого цвета, плотно-эластичной консистенции.

Легкие воздушные, однородные на ощупь, бледно-розовой окраски.

Печень. В интактной группе животных форма и величина без изменений, на ощупь плотно-эластичной консистенции. Поверхность печени гладкая, однородной темно-красной окраски. Капсула органа тонкая, прозрачная. Ткань печени на разрезе полнокровная, однородная. В группе с введением исследуемого вещества у самцов и самок отмечается утолщение и уплотнение ткани печени. Капсула серо-белого цвета.

Почки. Величина и форма не изменены. Поверхность почек коричневатого цвета, гладкая. Капсула тонкая, прозрачная, легко снимаемая. На разрезе органа хорошо различимы корковое и мозговое вещество.

Надпочечники округлой формы, коричневого цвета, с гладкой поверхностью, умеренно плотные. На разрезе четко выделяется темно окрашенное мозговое вещество.

Селезенка животных контрольной группы обычной формы, темно-вишневого цвета, умеренно плотной консистенции. Поверхность органа гладкая, капсула тонкая. На разрезе на темно-красном фоне селезенки видны мелкие сероватого цвета фолликулы. У животных с введением исследуемого вещества капсула селезенки серо-белого цвета.

Желудок обычной величины и формы, заполнен пищевыми массами. Слизистая оболочка тела желудка складчатая, розоватая, блестящая.

Тонкий кишечник. Слизистая оболочка тонкого кишечника бледно-розового цвета, блестящая. Просвет кишечника заполнен химусом (без изменений) или свободен.

Слизистая оболочка толстой кишки сероватого цвета, блестящая. Кишечное содержимое соответствует отделу кишечника.

Мочевой пузырь заполнен небольшим количеством светло-желтой, прозрачной мочи. Слизистая оболочка пузыря блестящая, бледно-розовая, складчатая.

Поджелудочная железа серо-розового цвета, плотно-эластичной консистенции, поверхность гладкая, блестящая.

Лимфатические узлы (подмышечные) овальной формы, бледно-желтого или розоватого цвета, с гладкой поверхностью, тонкой капсулой, не спаяны между собой и подлежащими тканями. При разрезе поверхность среза однородной окраски.

Яичники округлые, плотные, гроздевидные, серо-розового цвета, компактные, обычного размера.

Семенники беловатого цвета, нормальной плотности, обычного размера.

Статистический анализ массовых коэффициентов органов выявил достоверные изменения ($p < 0,05$; критерий Манна – Уитни) в опытной группе по сравнению с интактной (Таблица 47).

Таблица 47 – Влияние ПМАК на массовые коэффициенты органов лабораторных животных (Me [Q₁; Q₃])

Органы	Интактная группа		Опытная группа (ПМАК)	
	самцы	самки	самцы	самки
Сердце	4,19 [4,06; 4,54]	4,06 [3,95; 4,25]	4,03 [3,78; 4,29]	4,32 [3,62; 4,52]
Легкие	6,78 [6,19; 8,13]	8,24 [7,58; 9,03]	10,49 [10,18; 11,13]*	8,93 [7,80; 10,78]
Печень	43,05 [40,65; 48,05]	47,41 [42,99; 53,29]	54,14 [52,01; 57,28]*	55,04 [53,02; 57,28]*
Почки	7,64 [7,28; 8,04]	7,90 [7,15; 8,04]	8,80 [8,70; 9,26]*	8,97 [8,03; 9,41]
Селезенка	2,71 [2,56; 2,91]	2,91 [2,74; 3,24]	3,92 [3,83; 4,10]*	4,43 [3,91; 4,99]*
Надпочечники	0,18 [0,17; 0,18]	0,35 [0,32; 0,36]	0,22 [0,22; 0,24]*	0,43 [0,37; 0,48]
Семенники/ яичники	8,50 [7,91; 9,23]	0,56 [0,51; 0,58]	9,42 [8,35; 10,04]	0,57 [0,54; 0,59]
Примечание: *p < 0,05, достоверные отличия от интактной группы (критерий Манна – Уитни)				

3.1.3. Оценка собственной иммуностимулирующей активности полиметакриловой кислоты

Для оценки собственной иммуностимулирующей активности ПМАК был проведен биологический эксперимент, в котором раствор полимера вводили однократно на момент устойчивого формирования опухолевого узла.

Было выявлено, что уровень IL-6 в сыворотке крови значительно повышен у животных группы контроля (4,91 [4,71; 5,44] пг/мл) по сравнению с интактными (2,58 [2,36; 3,11] пг/мл). При этом на фоне введения ПМАК отмечалось значительное снижение концентрации IL-6 в сыворотке крови лабораторных животных-опухоленосителей (3,63 [3,11; 3,76] пг/мл) (Рисунок 37).

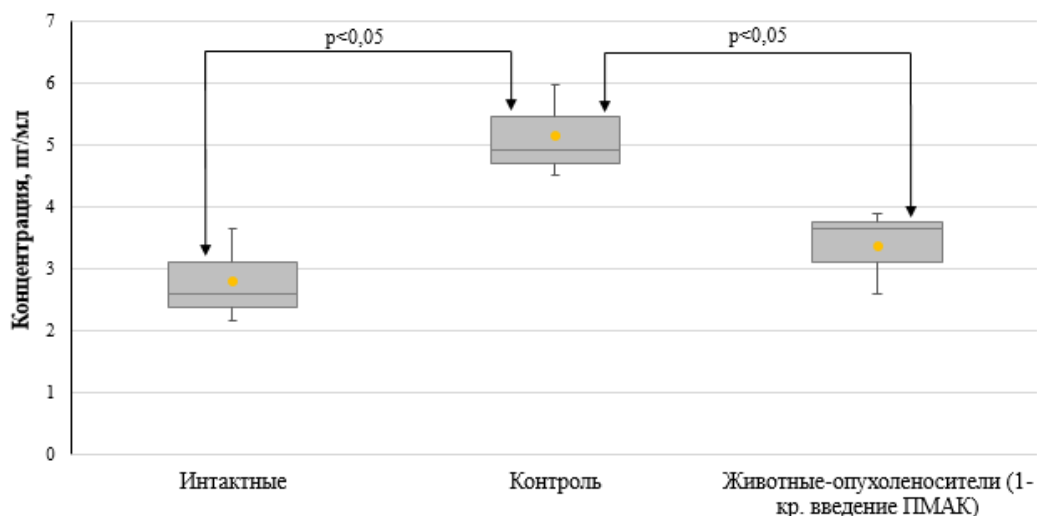


Рисунок 37 – Концентрация IL-6 в сыворотке крови лабораторных животных. p < 0,05 – достоверные отличия от группы контроля (критерий Манна – Уитни)

Также в ходе исследования было оценено изменение концентрации IL-10.

Концентрация IL-10 в группе контроля имела тенденцию к повышению (59,62 [47,79; 64,63] пг/мл) по сравнению с интактными животными (34,50 [32,53; 35,23] пг/мл). После однократного введения ПМАК животным с опухолью также наблюдалась тенденция, но уже к снижению уровня IL-10 до 40,75 [39,48; 44,49] пг/мл по сравнению с контролем (Рисунок 38).

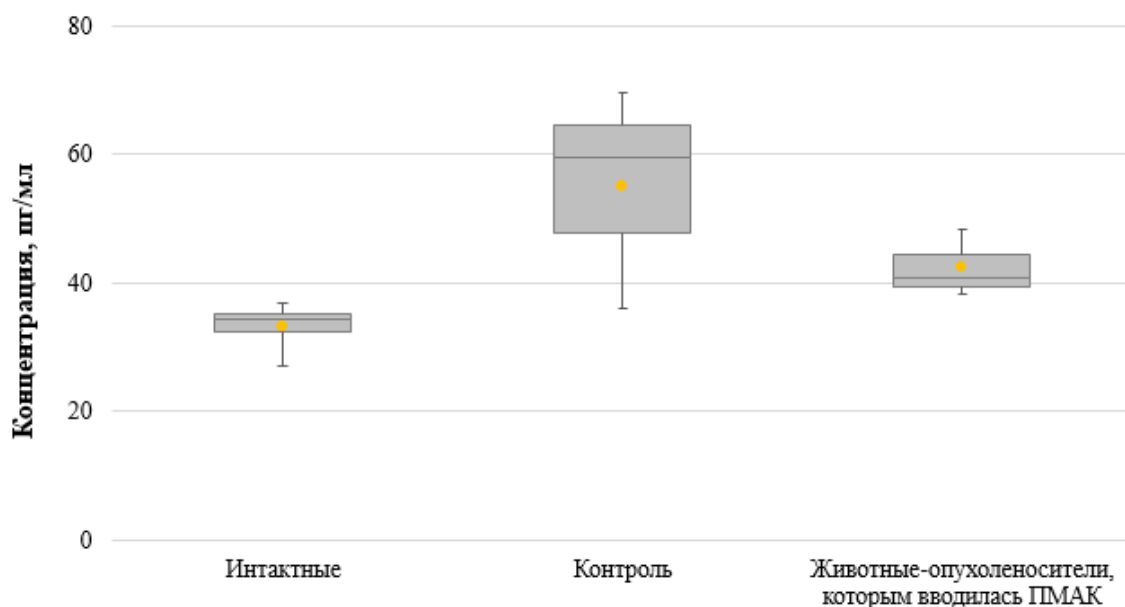


Рисунок 38 – Изменение концентрации IL-10 в ответ на введение ПМАК

Наряду с IL-10, в ходе исследования был оценен уровень IL-17 – цитокина, играющего сложную роль в онкогенезе. Полученные в ходе эксперимента данные демонстрируют, что концентрация IL-17 значительно снижалась на ранних стадиях опухолевого процесса – с 356,30 [296,19; 416,76] пг/мл до 137,12 [122,06; 167,20] пг/мл у лабораторной животной группы контроля. Однократное введение ПМАК животным-опухоленосителям значительно повышало концентрацию IL-17 до 307,24 [300,58; 309,92] пг/мл, что свидетельствует о нормализации показателя (Рисунок 39).

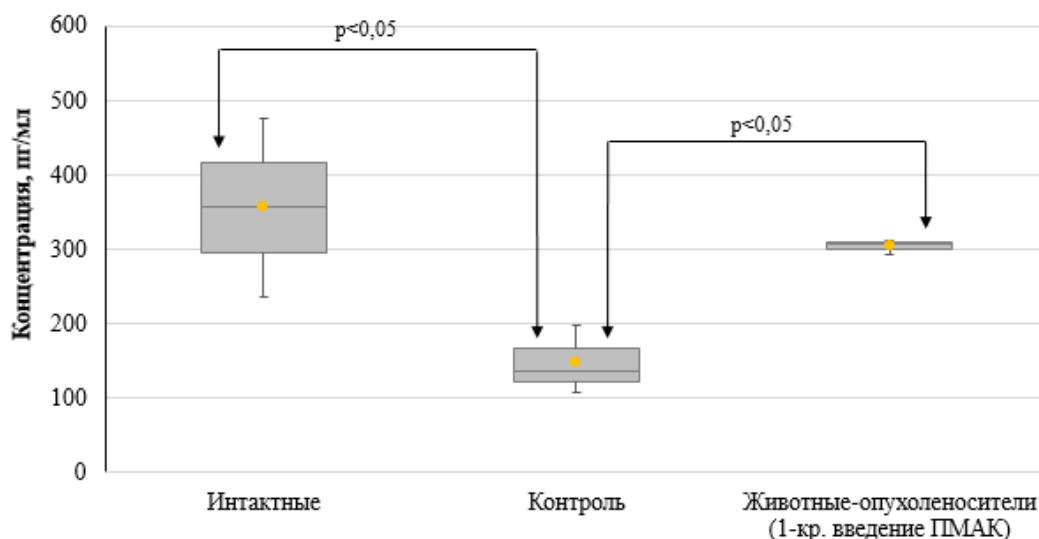


Рисунок 39 – Изменение концентрации IL-17 в ответ на введение ПМАК. $p < 0,05$ – достоверные отличия от группы контроля (критерий Манна – Уитни)

Для оценки влияния полимерного носителя ПМАК на развитие опухолевого процесса на ранних стадиях онкогенеза был проведен дополнительный биологический эксперимент. С целью анализа были использованы две различные схемы введения: режим А (первое введение ПМАК осуществлялось за 24 часа до перевивки опухолевых клеток) и режим Б (первое введение ПМАК проводилось через 3 часа после перевивки опухолевых клеток). Такой подход позволил смоделировать различные сценарии взаимодействия полимера с организмом: оценку его способности усиливать естественную сопротивляемость к развитию опухоли ещё до её появления (режим А) и проверку эффективности против уже инициированного опухолевого роста (режим Б).

Для объективной оценки результатов в качестве основного критерия использовалось измерение объемов опухолей, что позволило количественно сравнить их рост в опытных группах с контрольной группой, не получавшей лечения.

Полученные результаты (Рисунок 40) продемонстрировали выраженное ингибирующее действие ПМАК на ранний рост опухоли. При обеих схемах введения средний объём опухолей в группах, которым вводили ПМАК, был статистически достоверно ниже, чем в контрольной группе (без лечения): 748,00

[671,50; 774,00] мм³ (режим А) и 792,00 [663,00; 900,00] мм³ (режим Б) против 3570,00 [2497,50; 3891,00] мм³ в контроле ($p < 0,05$).

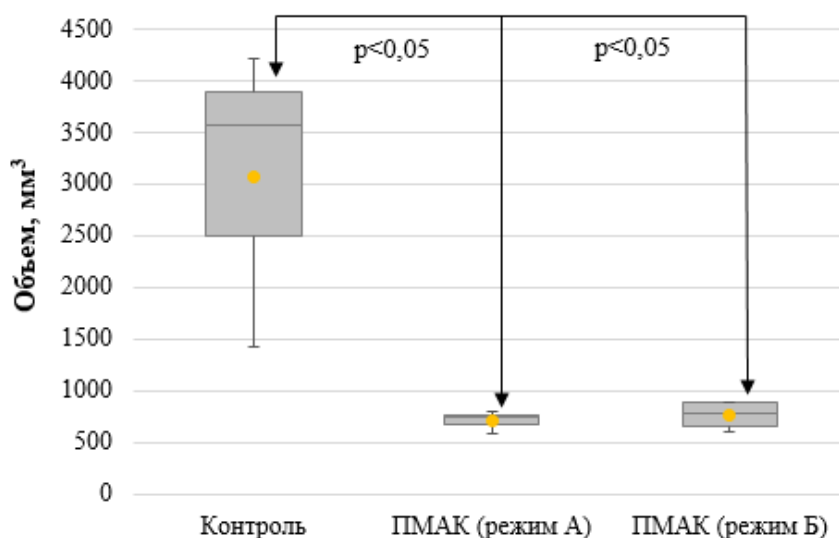


Рисунок 40 – Объем опухоли лабораторных животных при разных режимах введения ПМАК. $p < 0,05$ – достоверные отличия от группы контроля (критерий Манна – Уитни)

Для количественной оценки противоопухолевой активности ПМАК был рассчитан показатель торможения роста опухоли (ТРО) (Таблица 48).

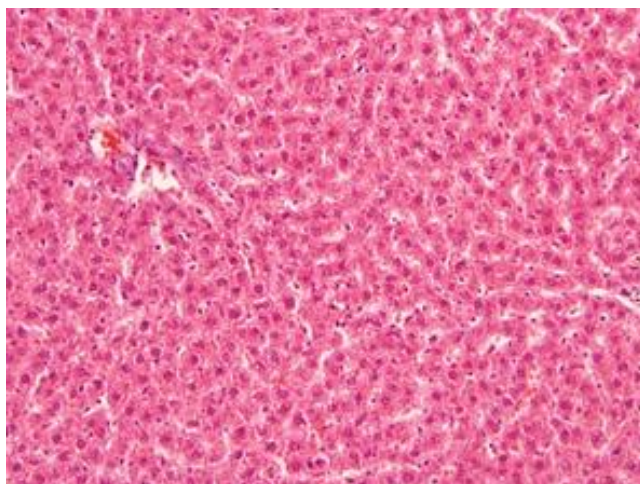
Таблица 48 – Торможение роста опухоли при введении ПМАК с разными режимами введения

Режим А	Режим Б
79,05 %	77,82 %

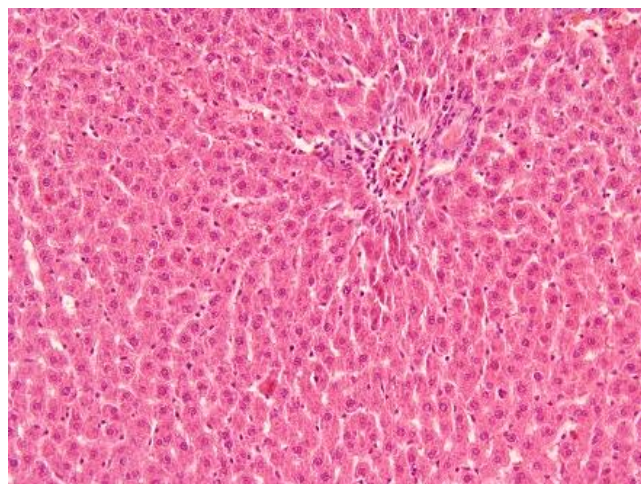
По окончании эксперимента для оценки потенциального токсического влияния на органы было проведено гистологическое исследование легких, селезенки, почек и печени.

Исследование легких, селезенки и почек не выявило статистически достоверных отличий в морфологической структуре этих органов между животными контрольной группы и группой, получавшей ПМАК. Это свидетельствует об отсутствии выраженного органоспецифического токсического воздействия полимера на данные системы.

Однако гистологический анализ печени выявил различия в состоянии гепатоцитов. У животных контрольной группы (опухоль без лечения) наблюдались выраженные дистрофические изменения клеток печени, что, вероятно, связано с системным токсическим воздействием развивающейся опухоли РС-1 и продуктов её метаболизма (Рисунок 41).



Группа контроля



Группа животных, которой вводился раствор ПМАК

Рисунок 41 – Срез печени крысы (ув. 200; окраска гематоксилином и эозином)

В группе животных, получавших раствор ПМАК, были зафиксированы лишь минимальные и очаговые дистрофические изменения.

3.2. Получение и оценка физико-химических свойств полимерного комплекса 5-фторурацила

Перед экспериментальным изучением ЛС целесообразна оценка его потенциальных токсических свойств с использованием современных методов *in silico*. Такой прогноз позволяет оптимизировать дизайн доклинических исследований и спрогнозировать потенциальные риски. В настоящей работе для первичной оценки опасности 5-ФУ был применен модуль GUSAR платформы Way2Drug, позволяющий прогнозировать показатели острой токсичности на грызунах [13].

Прогноз для 5-ФУ по различным путям введения единообразен и указывает на его высокую токсичность (Таблица 49).

Таблица 49 – Прогноз острой токсичности 5-ФУ для крыс по данным GUSAR (Way2Drug)

Путь введения	LD ₅₀ (прогноз), мг/кг	Класс токсичности (OECD)
Внутрибрюшинный	461,1	4 (токсичный)
Внутривенный	273,1	4 (токсичный)
Пероральный	964,5	4 (токсичный)
Подкожный	303,7	4 (токсичный)

Класс 4 по классификации Организации экономического сотрудничества и развития (англ. Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD) подтверждает высокий острый токсический потенциал 5-ФУ.

Учитывая прогнозируемую высокую токсичность исходного 5-ФУ, основной задачей работы стало создание полимерного комплекса, призванного модифицировать его фармакокинетику и снизить системную токсичность за счет связывания с полимером. Для характеристики полученного соединения был проведён комплекс исследований его физико-химических свойств.

Полимерный комплекс 5-ФУ на основе ПМАК в среде с ацетонитрилом был получен методом жидкофазного синтеза (Приложение В).

ПМАК растворяли в воде и добавляли к раствору 5-ФУ в ацетонитриле. Полученную смесь выдерживали в темноте при перемешивании на электромагнитной мешалке в течение 48 часов. Затем растворитель удаляли, путем высушивания в лиофильной сушилке. Подтверждение образования полимерного комплекса между ПМАК и 5-ФУ являются данные УФ- и ИК-спектроскопии.

Для 5-ФУ (Рисунок 42) характерна полоса поглощения при 260 нм, которая закономерно отсутствует в спектре раствора полимера. В УФ-спектре полимерного комплекса наблюдается интенсивное поглощение в области 260 нм, что свидетельствует о присутствии 5-ФУ в составе комплекса.

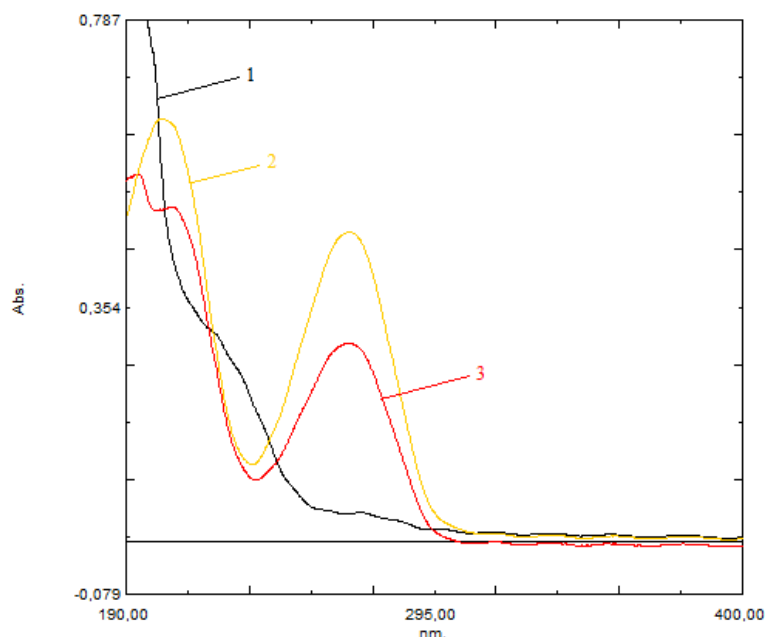


Рисунок 42 – УФ-спектры ПМАК (0,1 мг/мл), 5-ФУ (0,0083 мг/мл), полимерного комплекса 5-ФУ (0,1 мг/мл): 1 – раствор ПМАК; 2 – раствор, содержащий субстанцию 5-ФУ; 3 – раствор полимерного комплекса 5-ФУ

ИК-спектроскопия также является качественным методом подтверждения образования полимерного комплекса.

По данным ИК-спектроскопии 5-ФУ, в его спектре содержатся полосы поглощения в области $1670\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания --C=O группы пиримидинового цикла), полимер также имеет полосу поглощения, что соответствует валентным колебаниям карбонильной группы (--C=O), но уже в области 1708 см^{-1} . ИК-спектр полимерного комплекса 5-ФУ с ПМАК содержат также указанные полосы поглощения, что и в исходных веществах (Таблица 50).

Таблица 50 – Частоты скелетных колебаний (см^{-1}) ПМАК, 5-ФУ и их полимерного комплекса

Полосы поглощения ИК-спектра	ПМАК	5-ФУ	Полимерный комплекс 5-ФУ
1708 см^{-1}	--C=O карбонильная группа алифатической карбоновой кислоты	–	--C=O карбонильная группа алифатической карбоновой кислоты
$1670\text{--}1700\text{ см}^{-1}$	–	--C=O карбонильная группа пиримидинового цикла	
1249 см^{-1}	–	Валентные колебания C--F	
814 см^{-1}	–	деформационные колебания C--H пиримидинового кольца	

Несмотря на установленную способность ПМАК к образованию комплексов с 5-ФУ, эффективность данного процесса существенно ограничена компактной конформацией полимерной цепи в водных растворах. Спиралевидная структура ПМАК, стабилизированная внутримолекулярными водородными связями, затрудняет доступ к карбоксильным группам, что снижает вероятность их взаимодействия с молекулами лекарственного вещества. Для преодоления этого ограничения возникает необходимость в контролируемом «раскрытии» полимерной цепи, обеспечивающем увеличение доступности функциональных групп. Как показано в работах по конформационным превращениям полиэлектролитов [27], изменение ионной силы или pH среды приводит к электростатическому отталкиванию между одноименно заряженными звеньями, что вызывает переход от компактной глобулы к развернутой конформации. Именно этот эффект был использован в данном исследовании для оптимизации процесса комплексообразования: путем повышения pH среды с помощью раствора аммиака достигалось раскрытие структуры ПМАК, что сопровождалось увеличением числа доступных карбоксильных групп и, как следствие, повышением эффективности связывания с 5-ФУ (Рисунок 43).

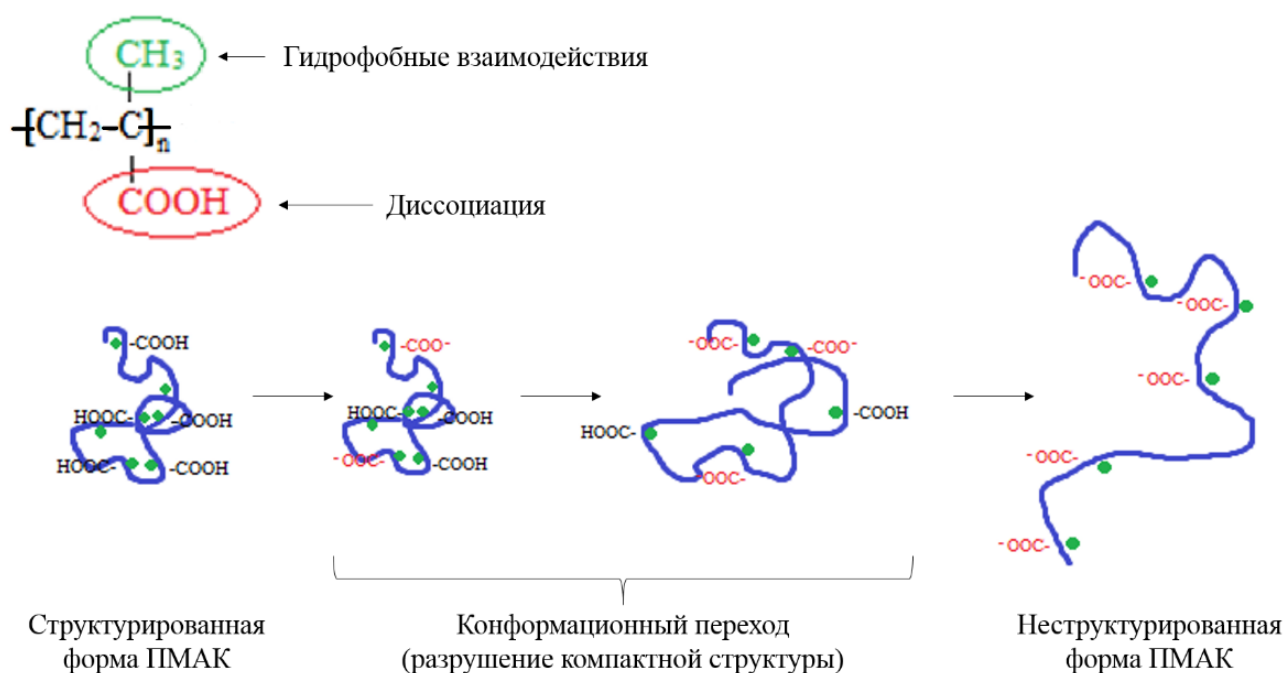


Рисунок 43 – Конформационный переход ПМАК в жидкой среде (в растворе)

Данный подход согласуется с фундаментальными принципами полимерной химии, согласно которым управление конформацией макромолекул является ключевым инструментом для контроля их функциональных свойств [270].

В связи с этим было проведено получение полимерного комплекса 5-ФУ при различных условиях pH среды (Приложение Г).

В качестве реагентов, изменяющих водородный показатель, были выбраны водные растворы аммиака (0,25; 10 %). Раствор аммиака в воде является слабым электролитом, к тому же при высушивании образца в лиофильной сушилке он улетучивается.

В ходе работы было получено 4 образца при разных значениях pH: 2,83 (обр. № 1), 5,50 (обр. № 2), 7,00 (обр. № 3), 8,67 (обр. № 4).

Все полученные образцы содержали 10 мол. % по 5-ФУ.

При получении комплексов при различных условиях pH среды наблюдалось заметное изменение интенсивности полосы поглощения в области 265 нм при одинаковой концентрации в особенности у 3-го и 4-го образцов полимерных комплексов 5-ФУ в водном растворе, наблюдается также и некоторое батохромное смещение полосы поглощения, что свидетельствует об образовании комплексов (Рисунок 44).

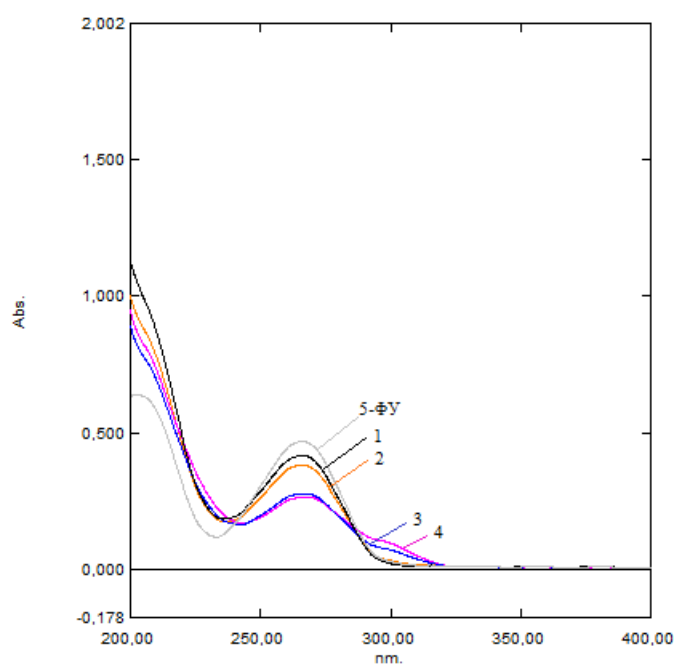


Рисунок 44 – УФ-спектры 5-ФУ (серый) и его полимерных комплексов: обр. № 1 – pH 2,83; обр. № 2 – pH 5,50; обр. № 3 – pH 7,00; обр. № 4 – pH 8,67

Для оценки эффективности включения 5-ФУ в состав полимерных комплексов предварительно была проведена валидация методики его количественного определения методом УФ-спектроскопии (см. раздел 3.2.2). С использованием валидированной методики установлено, что степень включения 5-ФУ составила: обр. № 1 (рН 2,83) – 88 %, обр. № 2 (рН 5,50) – 84,9 %, обр. № 3 (рН 7,00) – 59,9 %, обр. № 4 (рН 8,67) – 58,1 %. При увеличении водородного показателя степень включения 5-ФУ в полимерный комплекс уменьшается (Рисунок 45).

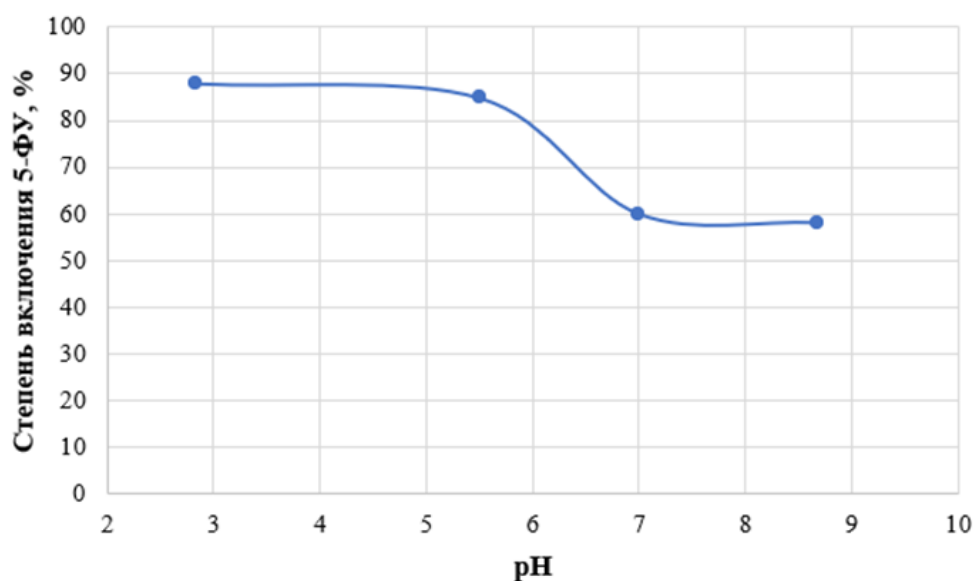


Рисунок 45 – Зависимость степени включения 5-ФУ в полимерный комплекс от значения водородного показателя

Свидетельством образования комплекса являются данные ИК-спектроскопии.

В отличие от комплекса, полученного в среде с ацетонитрилом, при изменении pH среды с помощью раствора аммиака, наблюдалось более сильное смещение полосы поглощения карбонильной группы пиримидинового цикла ($1668\text{--}1722\text{ см}^{-1}$ против $1670\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ – в среде с ацетонитрилом).

На связывание карбонильных групп молекул 5-ФУ с макромолекулами карбоксильных групп ПМАК посредством водородных связей указывает смещение полосы поглощения карбонильных групп 5-ФУ и ПМАК (Рисунок 46).

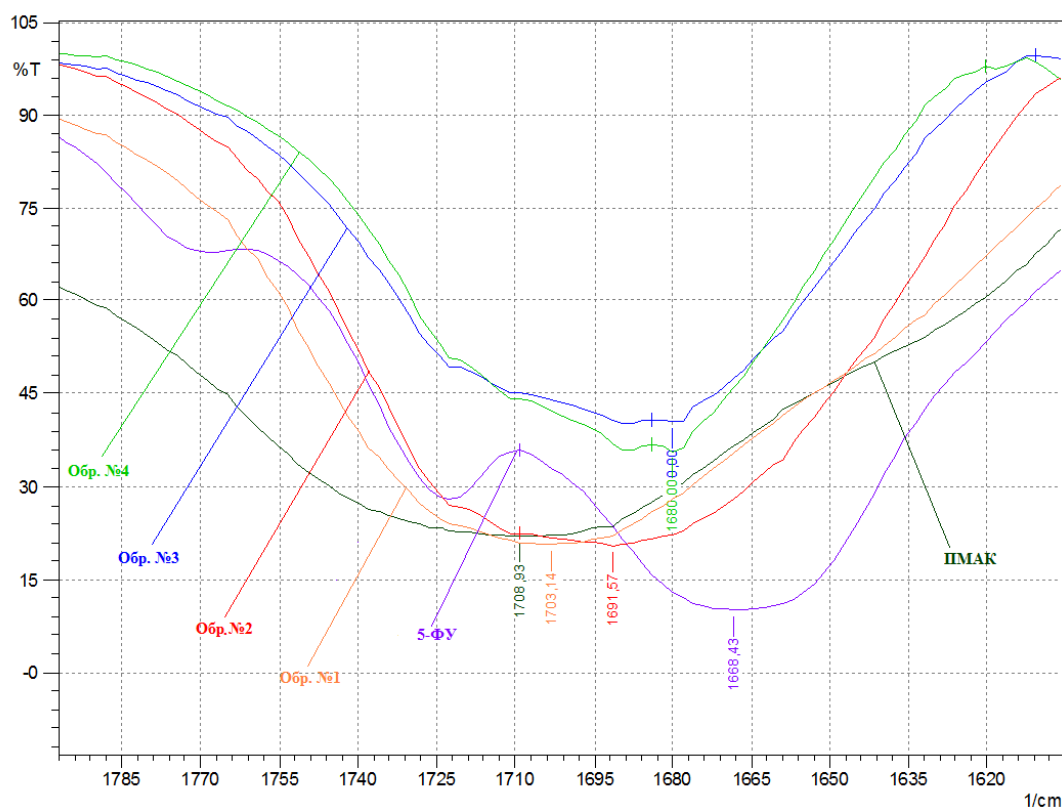


Рисунок 46 – ИК-спектры 5-ФУ, ПМАК и полимерных комплексов 5-ФУ на основе ПМАК: обр. № 1 – рН 2,83; обр. № 2 – рН 5,50; обр. № 3 – рН 7,00; обр. № 4 – рН 8,67

Причем смещение полос отличается в зависимости от рН полимерного комплекса (Таблица 51).

Таблица 51 – Смещение полос поглощения ИК-спектров для полимерных комплексов, полученных при разном показателе рН

Полимерный комплекс 5-ФУ № (рН)	Полосы поглощения ИК-спектра карбонильной группы
1 (рН 2,83)	1703 см^{-1}
2 (рН 5,50)	1691 см^{-1}
3 (рН 7,00)	1680 см^{-1}
4 (рН 8,67)	1680 см^{-1}

При увеличении значения водородного показателя наблюдается большее смещение полосы поглощения карбонильной группы в низкочастотную область (от 1703 до 1680 см^{-1}), что позволяет предположить о произошедшем межмолекулярном взаимодействии и образовании полимерного комплекса.

Данное предположение также подтверждает незначительное смещение полосы поглощения валентных колебаний C–F в полимерных комплексах с 1247 см^{-1} , характерной полосы поглощения для 5-ФУ, до 1249 см^{-1} . Образование комплекса между ПМАК и 5-ФУ подтверждено также данными ^1H ЯМР-спектроскопии (DMSO-d_6). В спектре исходного ПМАК сигнал карбоксильных протонов (–COOH) не регистрируется, что можно объяснить специфическими межмолекулярными взаимодействиями и быстрым обменом протонов с дейтерированным диметилсульфоксидом (Рисунок 47).

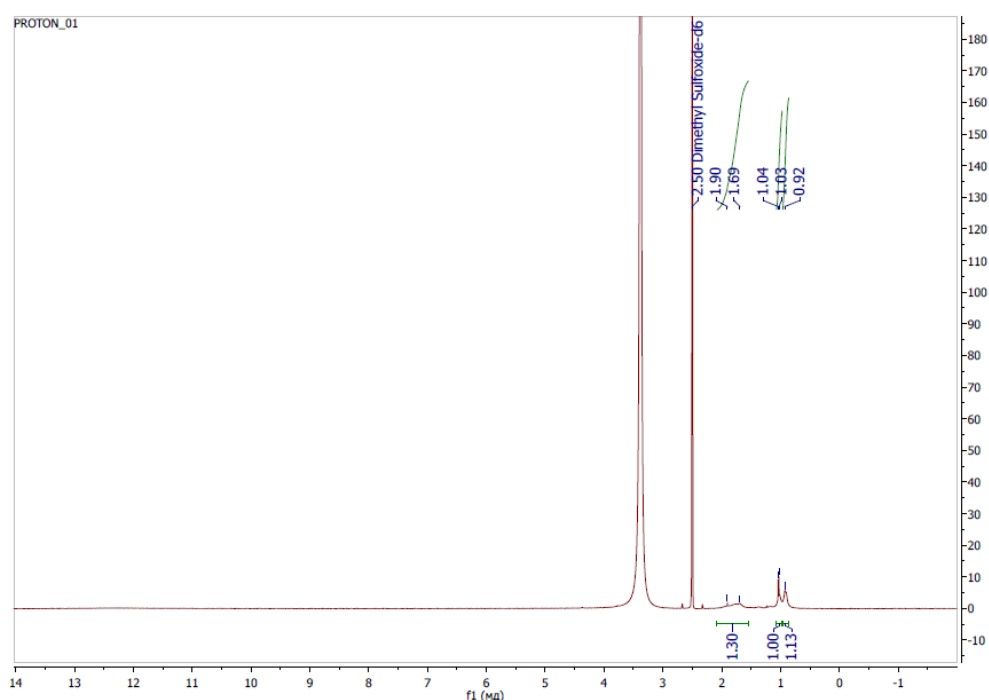


Рисунок 47 – ^1H ЯМР-спектр (DMSO-d_6) ПМАК

Однако в спектре полученного полимерного комплекса появляется новый сигнал при 12,33 м. д. (Рисунок 48, Приложение Д – приближенный вариант), который может быть отнесён к протонам карбоксильных групп полимера. Появление этого сигнала свидетельствует о замедлении обмена карбоксильных протонов с растворителем. Это прямое следствие их вовлечения в образование стабильных межмолекулярных водородных связей с NH-группами пиримидинового кольца молекулы 5-ФУ. В таком связанном состоянии протоны карбоксильных групп перестают быстро обмениваться, что делает их «видимыми» для метода ЯМР.

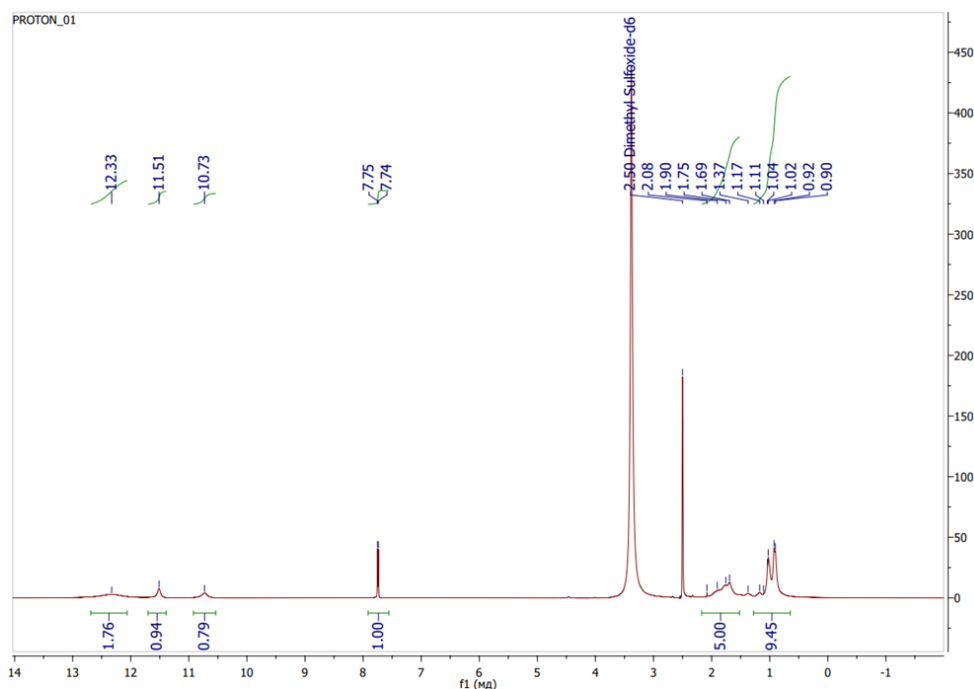


Рисунок 48 – ¹H ЯМР-спектр (DMSO-d₆) полимерного комплекса 5-ФУ с ПМАК

Одновременно в спектре комплекса (Рисунок 48) наблюдаются все характерные сигналы 5-ФУ: 11,51 м. д. (NH), 10,73 м. д. (NH) и 7,75–7,74 м. д. (СН) пиримидинового кольца. Их незначительные сдвиги относительно спектра свободного 5-ФУ ($\Delta\delta < 0,05$ м. д.) подтверждают сохранение химической структуры ЛС при его включении в комплекс (Рисунок 49).

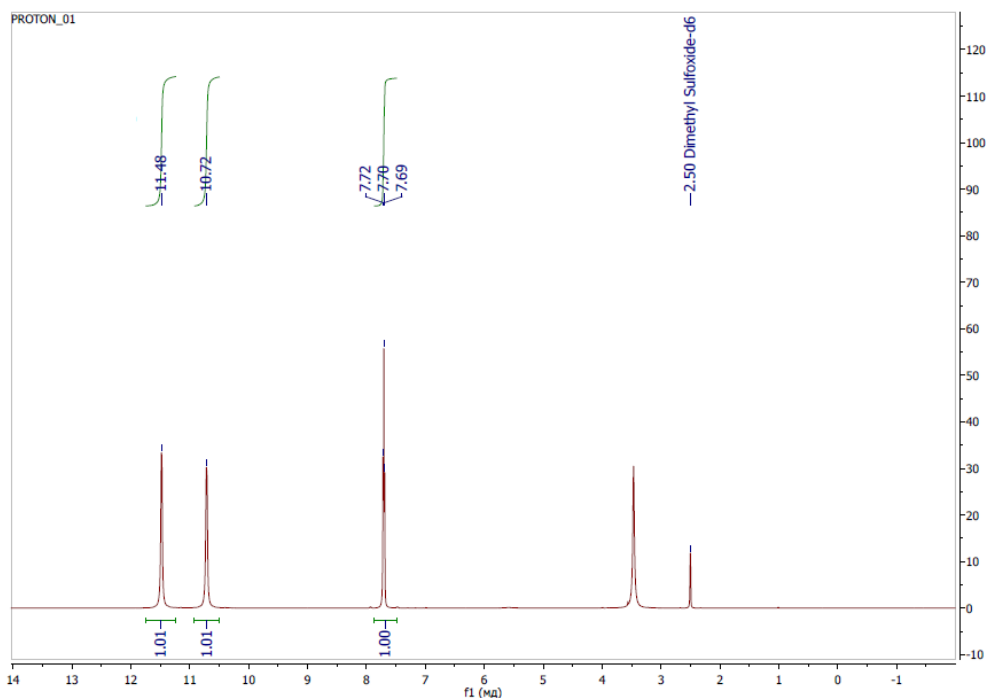


Рисунок 49 – ¹H ЯМР-спектр (DMSO-d₆) 5-ФУ

Совокупность данных – появление нового сигнала COOH -групп полимера и сохранение сигналов 5-ФУ – является спектральным доказательством физического комплексообразования, стабилизированного системой водородных связей.

Такое физико-химическое (межмолекулярное) взаимодействие между 5-ФУ и ПМАК обусловлено образованием водородных связей между атомом водорода в группе -NH- пиримидинового кольца и атомом кислорода в остатке ПМАК, а также между атомом кислорода и атомом водорода в остатке ПМАК. Кроме того, водородная связь образуется между электроотрицательным атомом фтора в 5-ФУ и атомом водорода в карбоксильном остатке ПМАК, имеющем частично положительный заряд и связанным ковалентной связью с электроотрицательным атомом кислорода. Такой механизм свидетельствует о полной комплементарности 5-ФУ остатку ПМАК. Каждая молекула 5-ФУ связывает полностью два остатка МАК и частично третий остаток. Предполагаемая формула комплекса показана на рисунке 50.

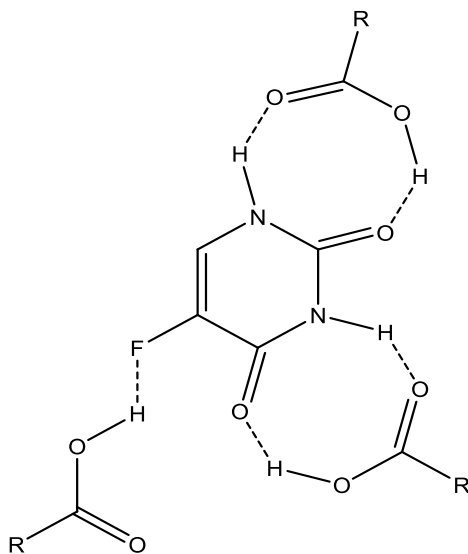


Рисунок 50 – Формула полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК
Примечание: R – остаток ПМАК

Несмотря на более высокую степень включения 5-ФУ при низких значениях pH, спектральные данные (в частности, батохромный сдвиг полосы поглощения в УФ-спектре и низкочастотный сдвиг карбонильной группы в ИК-спектре) свидетельствуют о формировании наиболее стабильного комплекса именно при pH 7,00. Поскольку для систем доставки критически важна стабильность в условиях кровотока (pH 7,4), для дальнейших исследований был выбран образец № 3.

Для оценки возможности использования полимерного комплекса 5-ФУ в качестве системы доставки был проведен анализ высвобождения 5-ФУ в средах, имитирующих биосреды организма.

Особенностью интерполимерных комплексов, конъюгатов противоопухолевых ЛС является их устойчивость в среде, имитирующей среду кровяного русла (рН 7,35–7,45) [202] и распадаемость комплекса, конъюгата с высвобождением противоопухолевого ЛС в среде, имитирующей внутриклеточное пространство (рН 6,8–7,2) [196], в среде, имитирующей опухолевое окружение (рН 6,2–6,8) [37; 141] или в среде, имитирующей рН внутриклеточных лизосом (рН 4,0–5,0) [68].

Кинетика высвобождения 5-ФУ из полимерного комплекса в средах с разным значением водородного потенциала рН была изучена методом диализа через полупроницаемую мембрану с размером пор 3,5 кДа (США, Viscase) (Рисунок 51).

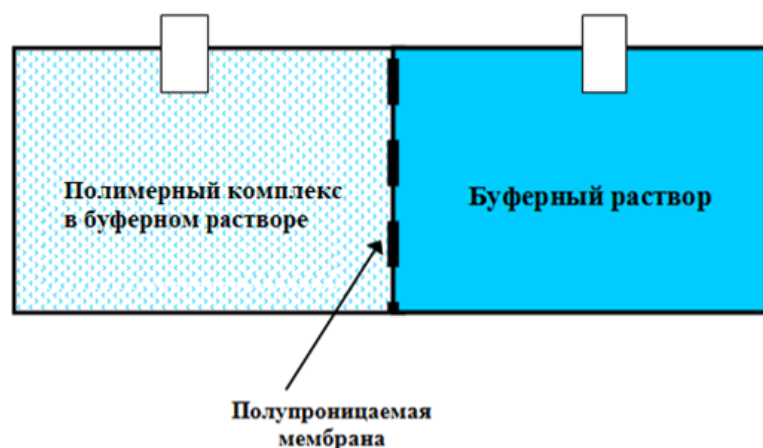


Рисунок 51 – Схема диализной ячейки при проведении исследования кинетики высвобождения 5-ФУ из полимерного комплекса

В качестве сред, имитирующих биосреды, использовалось два буферных раствора: ФБ с рН 7,4 – для имитации кровяного русла и ЦБ с рН 5,1 – для имитации пространства лизосом опухолевых клеток.

Получено, что высвобождение полимерного комплекса с 5-ФУ в кислой среде (при рН 5,1) выше на 15,92 %, чем при рН 7,4 (Рисунок 52).

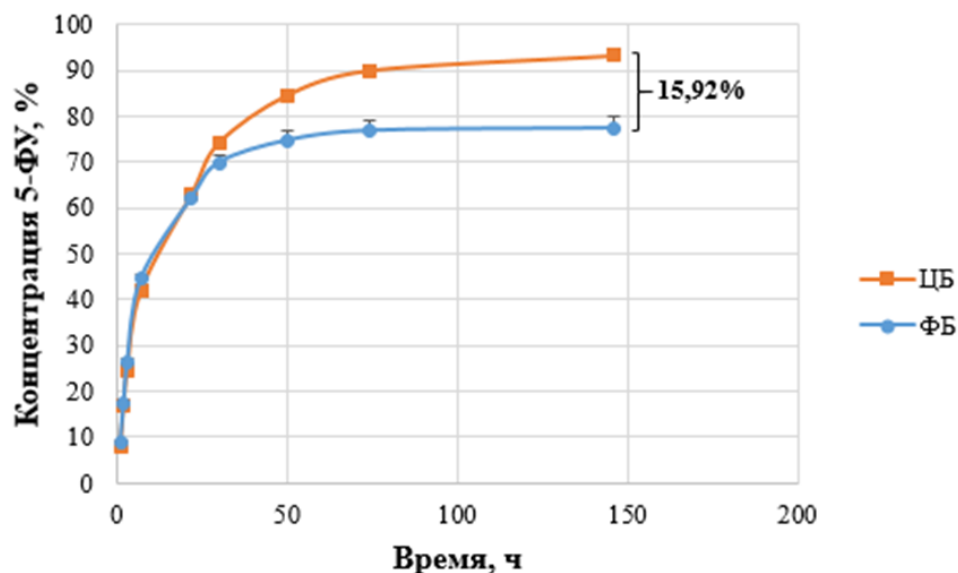


Рисунок 52 – Кинетика высвобождения 5-ФУ из полимерного комплекса в средах с разным значением pH

В начальной фазе (0–22 часа) наблюдается быстрое высвобождение препарата, выраженное как в кислой среде, так и в слабощелочной, что связано с высвобождением поверхностно-адсорбированного 5-ФУ. В последующие 22–74 часа процесс переходит в стадию постепенного высвобождения. В этот период разница между средами становится особенно заметной – высвобождение в кислых условиях более интенсивное. После 74 часов кинетические кривые выходят на плато, при этом общее количество высвободившегося 5-ФУ в кислой среде (pH 5,1) на 15,92 % превышает показатели для слабо щелочной среды (pH 7,4).

Механизм pH-зависимого высвобождения 5-ФУ из комплекса, по-видимому, обусловлен совокупным изменением как свойств полимерной матрицы (степень ионизации карбоксильных групп, конформация цепи), так и свойств самого 5-ФУ (степень ионизации, растворимость) при снижении pH.

Полученные данные имеют важное практическое значение для разработки систем направленной доставки противоопухолевых ЛС. Продемонстрированное pH-зависимое высвобождение 5-ФУ из полимерного комплекса (на 15,92 % выше при pH 5,1, чем при pH 7,4) позволяет преимущественно высвобождать препарат в кислой среде, характерной для опухолевой ткани и внутриклеточных лизосом.

3.2.1. Исследование стабильности полимерного комплекса 5-фторурацила

Важным элементом разработки новых лекарственных препаратов является оценка стабильности, необходимая для установления условий и сроков хранения, поскольку стабильность при хранении выступает одним из ключевых показателей фармацевтического качества.

Образцы полимерного комплекса 5-ФУ были оценены по таким показателям как: описание, растворимость, подлинность, количественное определение.

Вариабельными показателями были влажность и температура. Для анализа использовались следующие режимы: 1) условия с высокой температурой: +70 °С и влажность – 25 % (Приложение Е); 2) условия холодильника: +3,8 °С и влажность – 50 % (Приложение Ж); 3) комнатные условия: +20...+25 °С и влажность – 20–63 % (Приложение И).

Упаковкой служили стеклянные флаконы по 20 мл, закупоренные обжимным колпачком с септой.

Полимерный комплекс 5-ФУ продемонстрировал стабильность при хранении в течение 18 месяцев при комнатной температуре (+20...+25 °С), при высоких значениях температуры (70 °С) и в условиях холодильника (3,8 °С), сохраняя свои физико-химические свойства и содержание 5-ФУ в пределах 98,9–100,68 % (Приложение Е, Ж, И).

Рекомендуемая первичная упаковка: флаконы из бесцветного стекла, закупоренные резиновыми пробками и закрытые алюминиевыми колпачками типа «flip-off».

Полимерный комплекс 5-ФУ целесообразно хранить в защищенном от света месте, поскольку в ПМАК при воздействии солнечного света возможны процессы полимеризации/деполимеризации, а также при температуре от 15 до 25 °С в соответствии с режимами, представленными в ГФ XV [4].

3.2.2. Валидация методики количественного определения 5-фторурацила в составе полимерного комплекса методом УФ-спектроскопии в разных средах

Количественное определение 5-ФУ в составе полимерного комплекса методом УФ-спектроскопии в воде

Оценка показателя «Специфичность»

Специфичность метода определялась путем сравнения УФ-спектров поглощения исследуемых образцов и возможных мешающих компонентов в используемых растворителях.

Для этого были записаны УФ-спектры: воды, 5-ФУ в воде, полимерного комплекса 5-ФУ в воде (Рисунок 53).

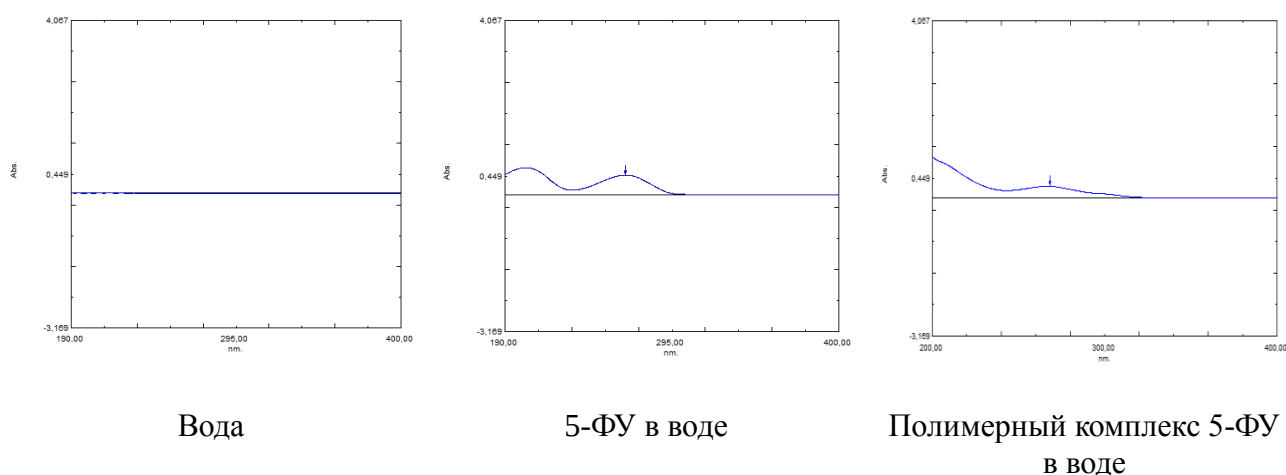


Рисунок 53 – УФ-спектры растворов воды, 5-ФУ в воде (0,0083 мг/мл) и полимерного комплекса 5-ФУ в воде (0,1 мг/мл)

Установлено, что вода очищенная не поглощает свет в области 260–265 нм, что исключает её собственный вклад в аналитический сигнал. УФ-спектр водного раствора стандартного образца 5-ФУ показал четкий максимум поглощения при 265–267 нм (Рисунок 53), подтвердив, что данная полоса поглощения является характерной для 5-ФУ и может служить аналитическим сигналом. Для проверки специфичности метода в отношении разрабатываемого комплекса был записан УФ-спектр водного раствора полимерного комплекса 5-ФУ (Рисунок 53). Спектр комплекса совпал со спектром чистого 5-ФУ, демонстрируя тот же максимум поглощения при 265 нм. Это доказывает, что предложенный спектрофотометрический метод является специфичным для определения 5-ФУ

в составе полимерного комплекса в водной среде, а полимерный носитель не создает помех для измерения на выбранной длине волны.

Оценка показателя «Линейность»

Линейность метода оценивали в рабочем диапазоне концентраций 5-ФУ от 0,0016 до 0,0167 мг/мл.

Перед статистической обработкой данных для построения калибровочной зависимости была проведена проверка однородности измерений для каждой приготовленной концентрации стандартных растворов. Для выявления грубых ошибок в малых выборках использовали Q-критерий (Таблица 52).

Таблица 52 – Однородность выборки при построении калибровочной зависимости

Концентрация, мг/мл	№ опыта					R	R ₁	Q _{min}	R ₂	Q _{max}	Q (P, n) табл.	P, %
	1	2	3	4	5							
0,0167	0,914	0,917	0,950	0,980	1,006	0,092	0,003	0,033	0,026	0,279	0,760	99
0,0125	0,659	0,701	0,712	0,730	0,756	0,097	0,042	0,433	0,026	0,268		
0,0083	0,453	0,467	0,478	0,486	0,524	0,071	0,014	0,197	0,038	0,535		
0,0042	0,234	0,237	0,247	0,252	0,268	0,034	0,003	0,088	0,016	0,471		
0,0031	0,179	0,187	0,196	0,199	0,217	0,038	0,008	0,212	0,018	0,469		
0,0021	0,127	0,128	0,129	0,136	0,157	0,030	0,001	0,033	0,021	0,700		
0,0016	0,078	0,101	0,106	0,107	0,113	0,035	0,023	0,657	0,006	0,171		

При доверительной вероятности 99% все вычисленные значения Q-критерия для экспериментальных данных не превысили критического значения $Q(99\%; 5)_{\text{табл.}}$. Это подтвердило однородность выборки и отсутствие статистических выбросов, что позволило перейти к дальнейшему анализу.

Зависимость максимума поглощения оптической плотности от концентрации имеет вид $y = bx + a$ (Рисунок 54).

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 53).

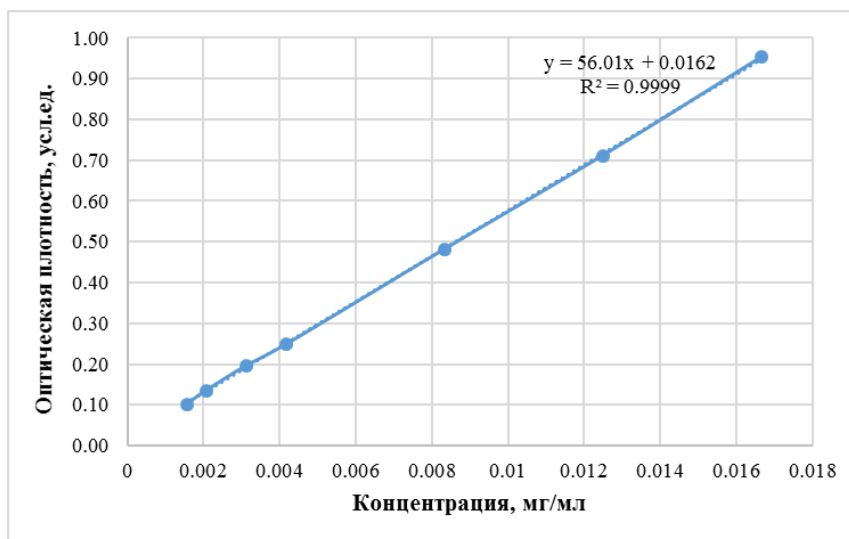


Рисунок 54 – Вид калибровочного графика и уравнение прямой для исследования линейности метода

Таблица 53 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{\text{расч.},b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{\text{расч.},a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t(P, f)_{\text{табл.}}$	$P, \%$	f
206,436	0,2713	6,8043	0,0024	4,03	99	5

Установлено, что коэффициенты a и b являются статистически значимыми. Итоговое уравнение прямой – $y = 56,01x + 0,0162$. Коэффициент детерминации R^2 равен 0,9999.

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости, представлены в таблице 54.

Таблица 54 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости

f	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	b	a	$t(P, f)$	Δb	Δa	S_0^2	r	$P, \%$
5	0,0069	0,4037	56,01	0,0162	4,03	1,093	0,0163	0,000015	0,99995	99

Оценка показателя «Правильность»

Правильность оценивалась для 9 определений 3 концентраций (0,0056 мг/мл; 0,0070 мг/мл; 0,0084 мг/мл). Среднее значение открываемости 5-ФУ по результатам количественного определения вещества составило 98,91 %. Метрологические характеристики представлены в таблице 55.

Таблица 55 – Метрологические характеристики методики количественного определения 5-ФУ методом спектрофотометрии

n	f	μ	$\bar{X}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	ε_{cp} , %	RSD, %
9	8	100	98,91	2,0617	1,4359	99	3,36	4,8245	1,6082	1,6259	1,4518

Оценка показателя «Аналитическая область»

Диапазон применения (аналитическая область) аналитической методики оценивали по результатам оценки показателей «Линейность» и «Правильность». Критерий приемлемости: для количественного определения основного вещества диапазон применения методики должен составлять 80–120 % от номинального содержания.

На основании результатов, полученных при оценке показателей «Линейность» и «Правильность», диапазон применения методики составляет 80–120 %, поскольку показатель «Правильность» определяли при концентрациях 80 % (0,0800 мг/мл полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0056 мг/мл по 5-ФУ), 100 % (0,1000 мг/мл полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0070 мг/мл по 5-ФУ) и 120 % (0,1200 мг/мл полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0084 мг/мл по 5-ФУ) от номинального содержания, показатель «Линейность» определяли в диапазоне 22,33–238,57 % от концентрации стандартного образца, используемой в аналитической методике.

Оценка показателя «Прецизионность»

Прецизионность исследовалась на однородных образцах и оценивалась в двух вариантах: повторяемость (сходимость) (Таблица 56), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Расчеты проводились на основании 6 определений концентрации с известным содержанием 5-ФУ.

Внутрилабораторная прецизионность (Таблица 57) определялась в течение малого промежутка времени в одной и той же лаборатории, на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, с использованием одного и того же прибора, но разными исследователями.

Таблица 56 – Метрологические характеристики определения повторяемости количественного определения 5-ФУ методом спектроскопии

n	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	RSD, %
6	5	99,7611	1,5189	99	4,03	6,1214	2,4991	1,5226

Таблица 57 – Метрологические характеристики определения внутрилабораторной прецизионности при количественном определении 5-ФУ методом спектроскопии

Концентрация, мг/мл	Исследователь	μ	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f) табл.	Δx	ε , %	$t_{расч.}$	F(P,f1,f2) табл.	F _{выч.}
0,0056	1	100	5	98,19	1,5802	99	4,03	6,3683	6,4859	2,8117	10,97	1,0838
	2	100	5	98,35	1,5179	99	4,03	6,1171	6,2200	2,6699	10,97	
0,0070	1	100	5	99,76	1,5189	99	4,03	6,1214	6,1361	0,3853	10,97	0,8159
	2	100	5	98,74	1,6816	99	4,03	6,7767	6,8631	1,8341	10,97	
0,0084	1	100	5	98,89	1,3692	99	4,03	5,5180	5,5795	1,9711	10,97	0,7306
	2	100	5	99,00	1,6019	99	4,03	6,4556	6,5205	1,5224	10,97	

Воспроизводимость оценивалась по критерию Стьюдента. Поскольку $t_{расч.} < t$ (99 %, 5), то результаты двух выборок следует считать свободными от систематической ошибки, а значит воспроизводимыми.

Количественное определение 5-ФУ в составе полимерного комплекса методом УФ-спектроскопии в фосфатном буферном растворе (рН 7,4)

Оценка показателя «Специфичность»

Специфичность метода определялась путем сравнения УФ-спектров поглощения исследуемых образцов и возможных мешающих компонентов в используемых растворителях.

Для этого были записаны УФ-спектры: фосфатного буферного раствора (рН 7,4), 5-ФУ в фосфатном буферном растворе (рН 7,4), полимерного комплекса 5-ФУ в фосфатном буферном растворе (рН 7,4) (Рисунок 55).

Установлено, что фосфатный буферный раствор (рН 7,4) не поглощает свет в области 260–265 нм, что исключает его собственный вклад в аналитический сигнал. УФ-спектр раствора стандартного образца 5-ФУ в данном буфере показал четкий максимум поглощения при 265–267 нм (Рисунок 55), подтвердив, что данная полоса поглощения является характерной для 5-ФУ и может служить аналитическим сигналом в этой среде. Для проверки специфичности метода

в отношении разрабатываемого комплекса был записан УФ-спектр раствора полимерного комплекса 5-ФУ в том же фосфатном буфере (Рисунок 55). Спектр комплекса совпал со спектром чистого 5-ФУ, демонстрируя тот же максимум поглощения при 265–267 нм. Это доказывает, что предложенный спектрофотометрический метод является специфичным для определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса в условиях фосфатного буфера, а полимерный носитель не создает помех для измерения на выбранной длине волны.

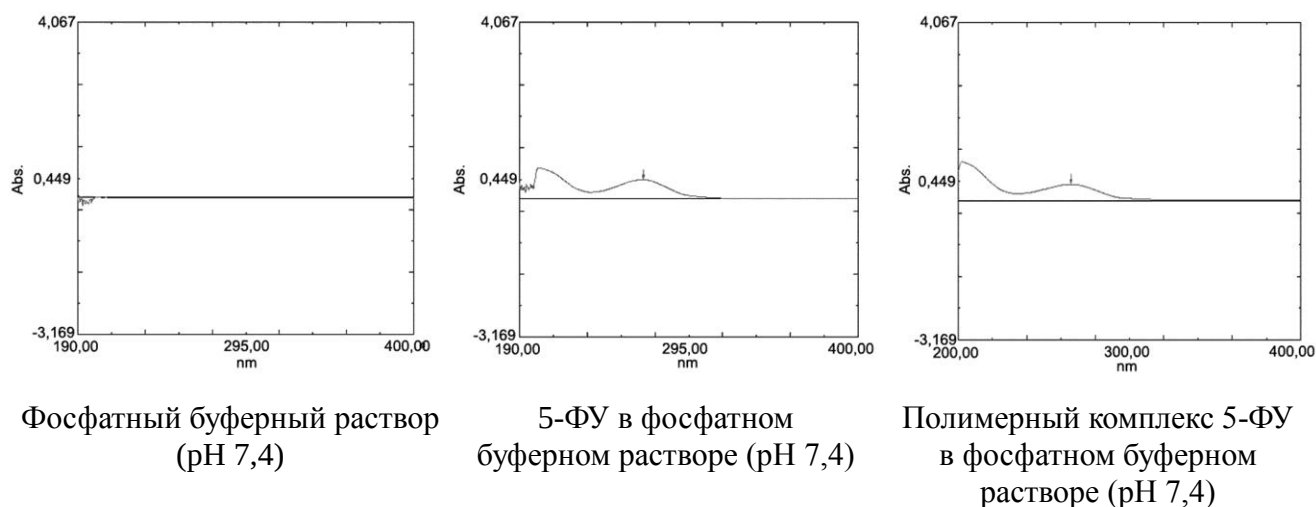


Рисунок 55 – УФ-спектры фосфатного буферного раствора (pH 7,4), 5-ФУ в фосфатном буферном растворе (pH 7,4) (0,0083 мг/мл) и полимерного комплекса 5-ФУ в фосфатном буферном растворе (pH 7,4) (0,1 мг/мл)

Оценка показателя «Линейность»

Линейность метода оценивали в рабочем диапазоне концентраций 5-ФУ от 0,0021 до 0,0167 мг/мл.

Перед статистической обработкой данных для построения калибровочной зависимости была проведена проверка однородности измерений для каждой приготовленной концентрации стандартных растворов. Для выявления грубых ошибок в малых выборках использовали Q-критерий (Таблица 58).

При доверительной вероятности 99% все вычисленные значения Q-критерия для экспериментальных данных не превысили критического значения $Q(99\%; 5)_{\text{табл.}}$. Это подтвердило однородность выборки и отсутствие статистических выбросов, что позволило перейти к дальнейшему анализу.

Таблица 58 – Однородность выборки при построении калибровочной зависимости

Концентрация, мг/мл	№ опыта					R	R ₁	Q _{min}	R ₂	Q _{max}	Q (P, n) табл.	P, %
	1	2	3	4	5							
0,0167	0,817	0,850	0,857	0,868	0,930	0,113	0,033	0,292	0,062	0,549	0,760	99
0,0125	0,643	0,655	0,655	0,670	0,718	0,075	0,012	0,160	0,048	0,640		
0,0083	0,427	0,441	0,442	0,442	0,479	0,052	0,014	0,269	0,037	0,712		
0,0042	0,230	0,232	0,233	0,243	0,254	0,024	0,002	0,083	0,011	0,458		
0,0031	0,182	0,183	0,183	0,190	0,199	0,017	0,001	0,059	0,009	0,529		
0,0021	0,127	0,130	0,130	0,134	0,140	0,013	0,003	0,231	0,006	0,462		

Зависимость максимума поглощения оптической плотности от концентрации имеет вид $y = bx + a$ (Рисунок 56).

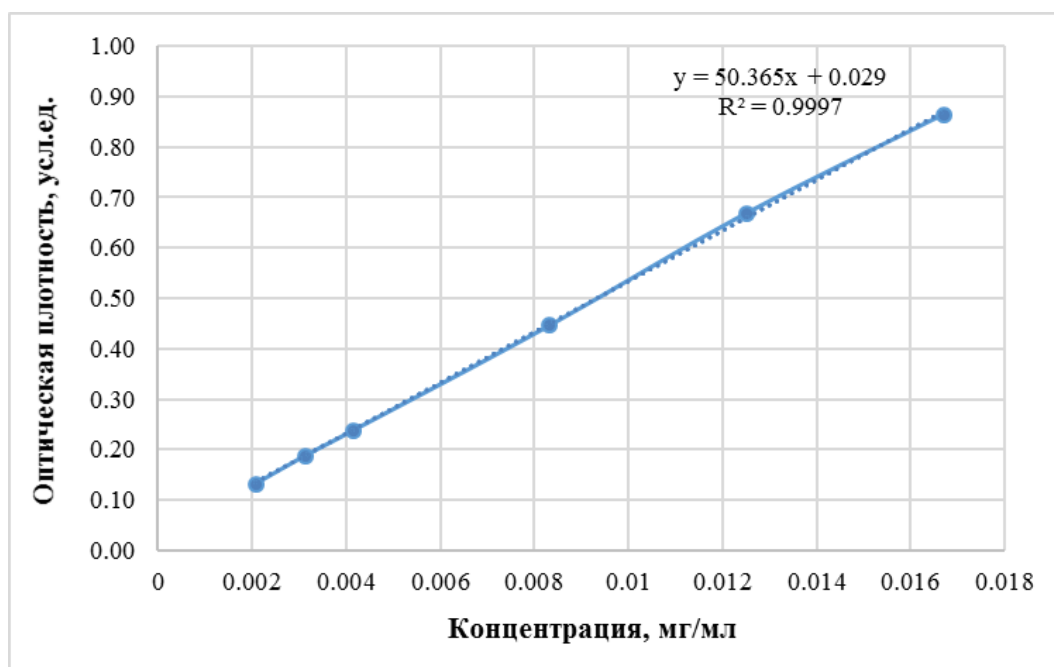


Рисунок 56 – Вид калибровочного графика и уравнение прямой для исследования линейности метода

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 59).

Таблица 59 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{расч.,b}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{расч.,a}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t (P, f)_{табл.}$	P, %	f
112,4741	0,4478	6,6811	0,0042	4,60	99	4

Установлено, что коэффициенты a и b являются статистически значимыми. Итоговое уравнение прямой – $y = 50,365x + 0,029$. Коэффициент детерминации R^2 равен 0,9997.

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости, представлены в таблице 60.

Таблица 60 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости

f	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	b	a	t (P, f)	Δb	Δa	S_0^2	r	P, %
4	0,0078	0,42	50,365	0,029	4,60	2,0598	0,0193	0,000034	0,9998	99

Оценка показателя «Правильность»

Правильность оценивалась для 9 определений 3 концентраций (0,0056 мг/мл; 0,0070 мг/мл; 0,0084 мг/мл). Среднее значение открываемости 5-ФУ по результатам количественного определения вещества составило 99,23 %. Метрологические характеристики представлены в таблице 61.

Таблица 61 – Метрологические характеристики методики количественного определения 5-ФУ методом спектроскопии

n	f	μ	$\bar{X}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	$\varepsilon_{\text{ср.}}$, %	RSD, %
9	8	100	99,23	2,0553	1,4336	99	3,36	4,8169	1,6057	1,6181	1,4447

Оценка показателя «Аналитическая область»

Диапазон применения (аналитическая область) аналитической методики оценивали по результатам оценки показателей «Линейность» и «Правильность». Критерий приемлемости: для количественного определения основного вещества диапазон применения методики должен составлять 80–120 % от номинального содержания.

На основании результатов, полученных при оценке показателей «Линейность» и «Правильность», диапазон применения методики составляет 80–120 %, поскольку показатель «Правильность» определяли при концентрациях 80 % (0,0800 мг/мл полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0056 мг/мл по 5-ФУ), 100 %

(0,1000 мг/мл полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0070 мг/мл по 5-ФУ) и 120 % (0,1200 мг/мл полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0084 мг/мл по 5-ФУ) от номинального содержания, показатель «Линейность» определяли в диапазоне 22,33–238,57 % от концентрации стандартного образца, используемой в аналитической методике.

Оценка показателя «Прецизионность»

Прецизионность исследовалась на однородных образцах и оценивалась в двух вариантах: повторяемость (сходимость) (Таблица 62), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Расчеты проводились на основании 6 определений концентрации с известным содержанием 5-ФУ.

Таблица 62 – Метрологические характеристики определения повторяемости количественного определения 5-ФУ методом спектроскопии

n	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	T (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	RSD, %
6	5	98,19	1,4509	99	4,03	5,8473	2,3871	1,4777

Внутрилабораторная прецизионность (Таблица 63) определялась в течение малого промежутка времени в одной и той же лаборатории, на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, с использованием одного и того же прибора, но разными исследователями.

Таблица 63 – Метрологические характеристики определения внутрилабораторной прецизионности при количественном определении 5-ФУ методом спектроскопии

Концентрация, мг/мл	Исследователь	μ	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f) табл.	Δx	ϵ	$t_{расч.}$	F(P,f1,f2) табл.	F _{выч.}
0,0056	1	100	5	98,27	1,9214	99	4,03	7,7431	7,8794	2,2046	10,97	1,2102
	2	100	5	98,68	1,7466	99	4,03	7,0387	7,1326	1,8451	10,97	
0,0070	1	100	5	99,09	1,3623	99	4,03	5,4899	5,5406	1,6431	10,97	1,1001
	2	100	5	98,38	1,2988	99	4,03	5,2341	5,3205	3,0608	10,97	
0,0084	1	100	5	99,59	1,0952	99	4,03	4,4135	4,4316	0,9160	10,97	1,4505
	2	100	5	99,28	0,9093	99	4,03	3,6646	3,6914	1,9522	10,97	

Воспроизводимость оценивалась по критерию Стьюдента. Поскольку $t_{\text{расч.}} < t$ (99 %, 5), то результаты двух выборок следует считать свободными от систематической ошибки, а значит воспроизводимыми.

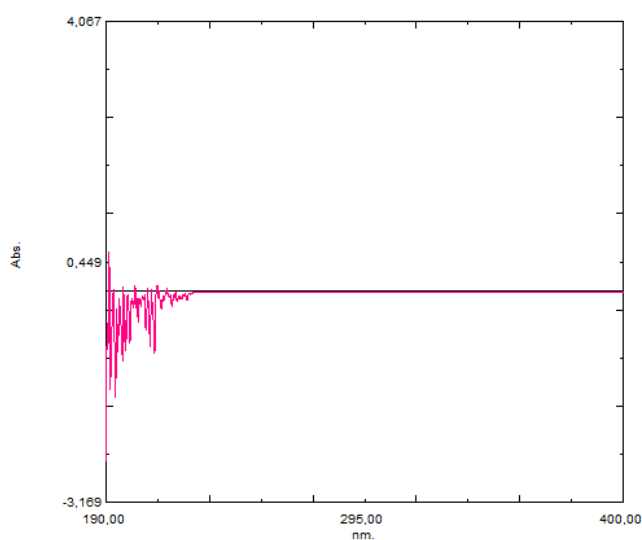
Количественное определение 5-ФУ в составе полимерного комплекса методом УФ-спектроскопии в цитратном буферном растворе (pH 5,1)

Оценка показателя «Специфичность»

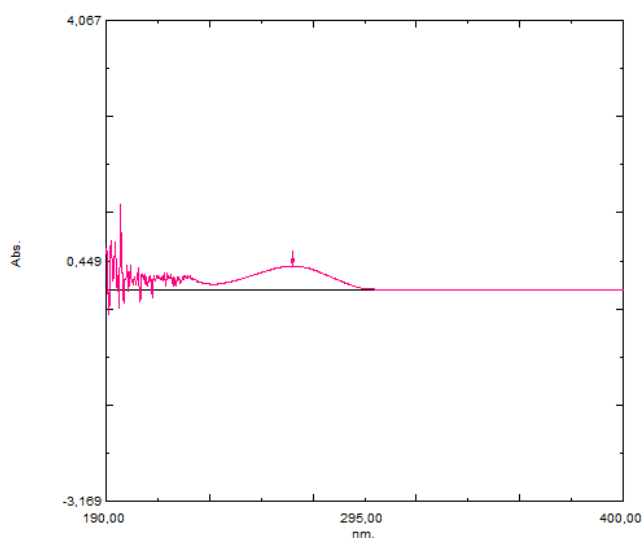
Специфичность метода определялась путем сравнения УФ-спектров поглощения исследуемых образцов и возможных мешающих компонентов в используемых растворителях.

Для этого были записаны УФ-спектры: цитратного буферного раствора (pH 5,1), 5-ФУ в цитратном буферном растворе (pH 5,1), полимерного комплекса 5-ФУ в цитратном буферном растворе (pH 5,1) (Рисунок 57).

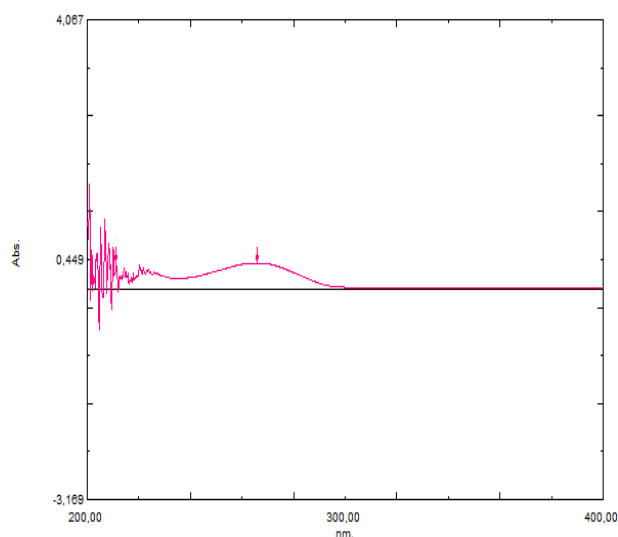
Установлено, что цитратный буферный раствор (pH 5,1) не поглощает свет в области 260–265 нм, что исключает его собственный вклад в аналитический сигнал. УФ-спектр раствора стандартного образца 5-ФУ в данном буфере показал четкий максимум поглощения при 265–267 нм (Рисунок 57), подтвердив, что данная полоса поглощения является характерной для 5-ФУ и может служить аналитическим сигналом в этой среде. Для проверки специфичности метода в отношении разрабатываемого комплекса был записан УФ-спектр раствора полимерного комплекса 5-ФУ в том же цитратном буфере (Рисунок 57). Спектр комплекса полностью совпал со спектром чистого 5-ФУ, демонстрируя тот же максимум поглощения при 265–267 нм. Это доказывает, что предложенный спектрофотометрический метод является специфичным для определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса в условиях цитратного буфера, а полимерный носитель не создает помех для измерения на выбранной длине волны.



Цитратный буферный раствор (рН 5,1)



5-ФУ в цитратном буферном растворе
(рН 5,1)



Полимерный комплекс 5-ФУ в цитратном
буферном растворе (рН 5,1)

Рисунок 57 – УФ-спектры цитратного буферного раствора (рН 5,1), 5-ФУ в цитратном буферном растворе (рН 5,1) (0,0083 мг/мл) и полимерного комплекса 5-ФУ в цитратном буферном растворе (рН 5,1) (0,1 мг/мл)

Оценка показателя «Линейность»

Линейность метода оценивали в рабочем диапазоне концентраций 5-ФУ от 0,0016 до 0,0167 мг/мл.

Перед статистической обработкой данных для построения калибровочной зависимости была проведена проверка однородности измерений для каждой приготовленной концентрации стандартных растворов. Для выявления грубых ошибок в малых выборках использовали Q-критерий (Таблица 64).

Таблица 64 – Однородность выборки при построении калибровочной зависимости

Концентрация, мг/мл	№ опыта					R	R ₁	Q _{min}	R ₂	Q _{max}	Q (P, n) табл.	P, %
	1	2	3	4	5							
0,0167	0,716	0,821	0,892	0,901	0,929	0,213	0,105	0,493	0,028	0,131	0,760	99
0,0125	0,553	0,629	0,678	0,691	0,719	0,166	0,076	0,458	0,028	0,169		
0,0083	0,363	0,415	0,447	0,453	0,475	0,112	0,052	0,464	0,022	0,196		
0,0042	0,186	0,208	0,224	0,227	0,240	0,054	0,022	0,407	0,013	0,241		
0,0031	0,131	0,160	0,170	0,180	0,186	0,055	0,029	0,527	0,006	0,109		
0,0021	0,106	0,117	0,117	0,122	0,128	0,022	0,011	0,500	0,006	0,273		

При доверительной вероятности 99% все вычисленные значения Q-критерия для экспериментальных данных не превысили критического значения $Q(99\%; 5)_{\text{табл.}}$. Это подтвердило однородность выборки и отсутствие статистических выбросов, что позволило перейти к дальнейшему анализу.

Зависимость максимума поглощения оптической плотности от концентрации имеет вид $y = bx + a$ (Рисунок 58).

Проверка значимости коэффициентов была проведена по критерию Стьюдента (Таблица 65).

Таблица 65 – Значимость коэффициентов регрессии a , b

$t_{\text{расч.,b}}$	Стандартная ошибка определения, S_b	$t_{\text{расч.,a}}$	Стандартная ошибка определения, S_a	$t(P, f)_{\text{табл.}}$	P, %	f
109,9668	0,4629	1,9277	0,0044	4,60	99	4

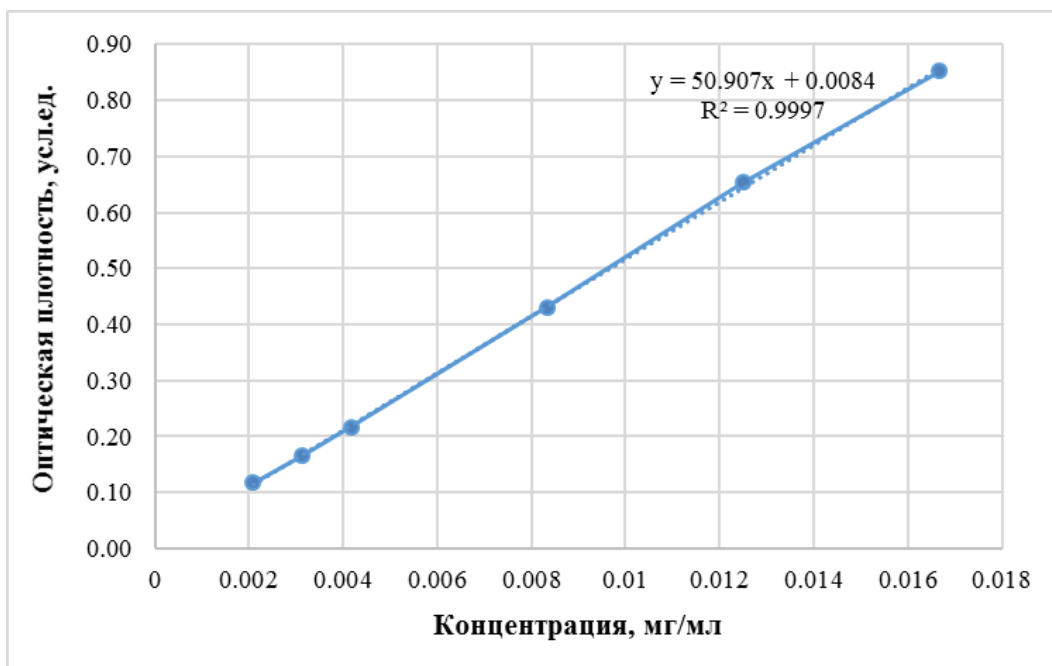


Рисунок 58 – Предварительный вид калибровочного графика и уравнение прямой для исследования линейности метода

Установлено, что коэффициент b является статистически значимым, тогда как коэффициент a статистически незначим. На основании этого калибровочная зависимость была представлена в виде уравнения $y = bx$, проходящего через начало координат (Рисунок 59).

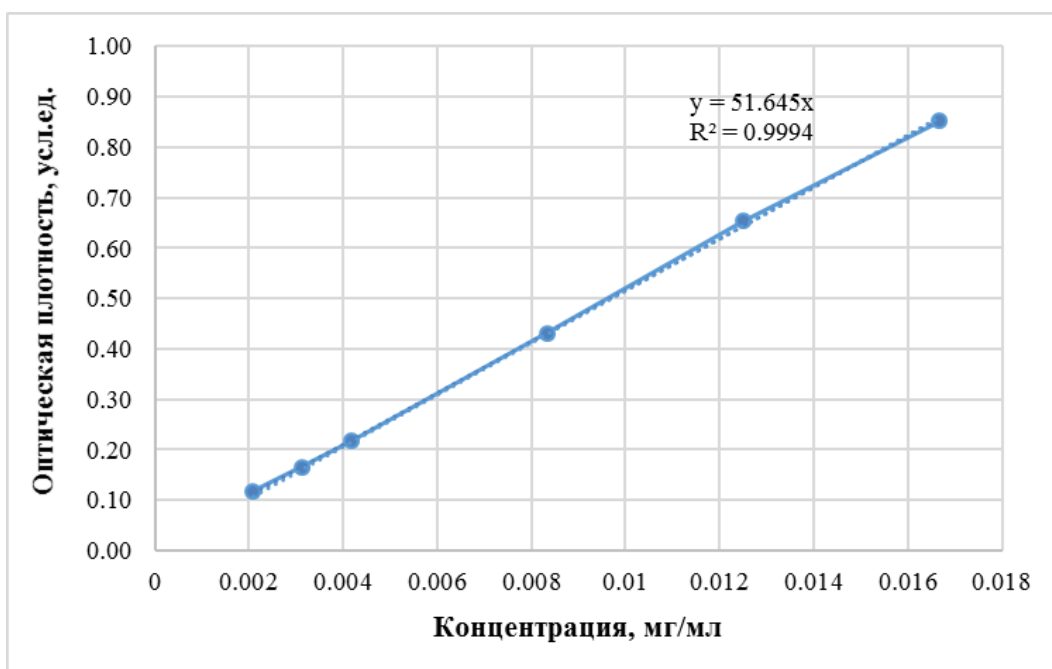


Рисунок 59 – Итоговый калибровочный график и уравнение прямой

Итоговое уравнение прямой – $y = 51,645x$. Коэффициент детерминации R^2 равен 0,9994.

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости представлены в таблице (Таблица 66).

Таблица 66 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости

f	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	b	t (P, f)	Δb	S_0^2	r	P, %
4	0,0078	0,4061	51,645	4,60	2,1293	0,000069	0,9997	99

Оценка показателя «Правильность»

Правильность оценивалась для 9 определений 3 концентраций (0,0056 мг/мл; 0,0070 мг/мл; 0,0084 мг/мл). Среднее значение открываемости 5-ФУ по результатам количественного определения вещества составило 98,48 %. Метрологические характеристики представлены в таблице 67.

Таблица 67 – Метрологические характеристики методики количественного определения 5-ФУ методом спектроскопии

n	f	μ	$\bar{X}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	$\epsilon_{ср.}$, %	RSD, %
9	8	100	98,48	0,5284	0,7269	99	3,36	2,4425	0,8142	0,8267	0,7381

Оценка показателя «Аналитическая область»

Диапазон применения (аналитическая область) аналитической методики оценивали по результатам оценки показателей «Линейность» и «Правильность». Критерий приемлемости: для количественного определения основного вещества диапазон применения методики должен составлять 80–120 % от номинального содержания.

На основании результатов, полученных при оценке показателей «Линейность» и «Правильность», диапазон применения методики составляет 80–120 %, поскольку показатель «Правильность» определяли при концентрациях 80 % (0,0800 мг/мл полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0056 мг/мл по 5-ФУ), 100 % (0,1000 мг/мл

полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0070 мг/мл по 5-ФУ) и 120 % (0,1200 мг/мл полимерного комплекса 5-ФУ и 0,0084 мг/мл по 5-ФУ) от номинального содержания, показатель «Линейность» определяли в диапазоне 22,33–238,57 % от концентрации стандартного образца, используемой в аналитической методике.

Валидируемый показатель соответствует критерию приемлемости.

Оценка показателя «Прецизионность»

Прецизионность исследовалась на однородных образцах и оценивалась в двух вариантах: повторяемость (сходимость) (Таблица 68), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Расчеты проводились на основании 6 определений концентрации с известным содержанием 5-ФУ.

Таблица 68 – Метрологические характеристики определения повторяемости количественного определения 5-ФУ методом спектроскопии

n	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	RSD, %
6	5	97,46	1,0448	99	4,03	4,2106	1,7189	1,0720

Внутрилабораторная прецизионность (Таблица 69) определялась в течение малого промежутка времени в одной и той же лаборатории, на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, с использованием одного и того же прибора, но разными исследователями.

Воспроизводимость оценивалась по критерию Стьюдента. Поскольку $t_{\text{расч.}} < t(99\%, 5)$, то результаты двух выборок следует считать свободными от систематической ошибки, а значит воспроизводимыми.

Таблица 69 – Метрологические характеристики определения внутрилабораторной прецизионности при количественном определении 5-ФУ методом спектроскопии

Концентрация, мг/мл	Исследователь	μ	f	$\bar{X}$, %	S	P, %	t (P, f) табл.	Δx	ε	$t_{\text{расч.}}$	F(P,f1,f2) табл.	F _{выч.}
0,0056	1	100	5	97,85	1,7899	99	4,03	7,2137	7,3720	2,9393	10,97	1,0565
	2	100	5	100,91	1,7415	99	4,03	7,0181	6,9551	1,2749	10,97	
0,0070	1	100	5	98,38	1,7111	99	4,03	6,8959	7,0092	2,3158	10,97	0,9341
	2	100	5	99,90	1,7705	99	4,03	7,1350	7,1419	0,1333	10,97	
0,0084	1	100	5	98,66	1,1843	99	4,03	4,7731	4,8379	2,7736	10,97	0,5126
	2	100	5	97,39	1,6542	99	4,03	6,6665	6,8451	3,8631	10,97	

3.3. Фармакокинетический профиль и биораспределение полимерного комплекса 5-фторурацила

3.3.1. Оценка острой токсичности полимерного комплекса 5-фторурацила

Для определения безопасности полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК при его потенциальном применении в качестве противоопухолевого лекарственного средства перед использованием в экспериментах на лабораторных животных была проведена соответствующая оценка.

Оценка острой токсичности полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК проводилась по методике, аналогичной описанной в разделе 3.1.3 (для ПМАК). Наблюдение за лабораторными животными осуществлялось на протяжении 14 суток. Критерии оценки клинического состояния животных, а также перечень регистрируемых показателей соответствовали использованным при изучении острой токсичности ПМАК.

В ходе 14-суточного эксперимента при введении полимерного комплекса 5-ФУ в дозе, эквивалентной 1500 мг/кг по ПМАК, не было зарегистрировано случаев гибели животных. Отсутствие летальных исходов не позволило определить среднюю летальную дозу (LD_{50}), что свидетельствует о низкой токсичности исследуемого соединения и его широком диапазоне безопасности.

Клинические проявления ограничивались лишь кратковременными (в течение 2–3 часов после введения) и полностью обратимыми изменениями поведения в виде незначительного изменения двигательной активности. В остальные дни наблюдения внешний вид, поведение, реакция на внешние раздражители, состояние шерстного покрова, слизистых оболочек, кожных покровов и мышечный тонус животных опытной группы не отличались от контрольных.

Макроскопическое исследование внутренних органов не выявило существенных патологических изменений. Статистический анализ массовых коэффициентов органов (Таблица 70) показал отсутствие достоверных отличий между группой животных, получавших полимерный комплекс 5-ФУ, и контрольной группой ($p > 0,05$; критерий Манна – Уитни).

Таблица 70 – Влияние полимерного комплекса 5-ФУ на массовые коэффициенты органов лабораторных животных (Me [Q₁; Q₃])

Органы	Контроль	Полимерный комплекс 5-ФУ
Сердце	4,05 [3,95; 4,20]	3,80 [3,50; 4,39]
Легкие	6,63 [6,04; 7,05]	7,49 [5,99; 10,12]
Печень	39,16 [37,61; 43,12]	40,00 [36,75; 40,65]
Почки	7,29 [7,09; 7,56]	6,98 [6,71; 7,23]
Селезенка	2,83 [2,38; 3,17]	2,57 [2,35; 2,67]
Надпочечники	0,30 [0,26; 0,30]	0,29 [0,29; 0,30]
Яичники	0,54 [0,48; 0,59]	0,50 [0,46; 0,58]
Семенники	8,98 [8,77; 9,16]	9,17 [8,96; 9,35]

Результаты оценки острой токсичности полимерного комплекса 5-ФУ на основе ПМАК свидетельствуют о его низкой токсичности, хорошей биосовместимости и отсутствии значимого токсического влияния на внутренние органы, что обосновывает возможность его дальнейшего доклинического изучения в качестве противоопухолевого средства.

Следующим этапом доклинических исследований явилось изучение фармакокинетики и биораспределения разработанного комплекса. Для обеспечения надежности и достоверности получаемых результатов предварительно была проведена валидация ВЭЖХ-методики определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса в плазме крови лабораторных животных.

3.3.2. Валидация ВЭЖХ-определения 5-фторурацила в составе полимерного комплекса в плазме крови лабораторных животных

Оценка показателя «Селективность»

Селективность методики оценивали путем анализа шести индивидуальных образцов плазмы крови крыс (холостые образцы), не содержащих анализируемое соединение и внутренний стандарт (ВС). Образцы подвергали пробоподготовке согласно методике, описанной в главе «Материалы и методы».

Критерий приемлемости: Отсутствие хроматографических пиков на временах удерживания 5-ФУ и ВС. Сигнал в области удерживания аналита

не должен превышать 20 % от сигнала нижнего предела количественного определения (НПКО), сигнал в области удерживания ВС – не более 5 %.

Типичная хроматограмма холостого образца представлена на рисунке 60.

Хроматограмма нулевого образца (плазма крови, содержащая только внутренний стандарт) представлена на рисунке 61.

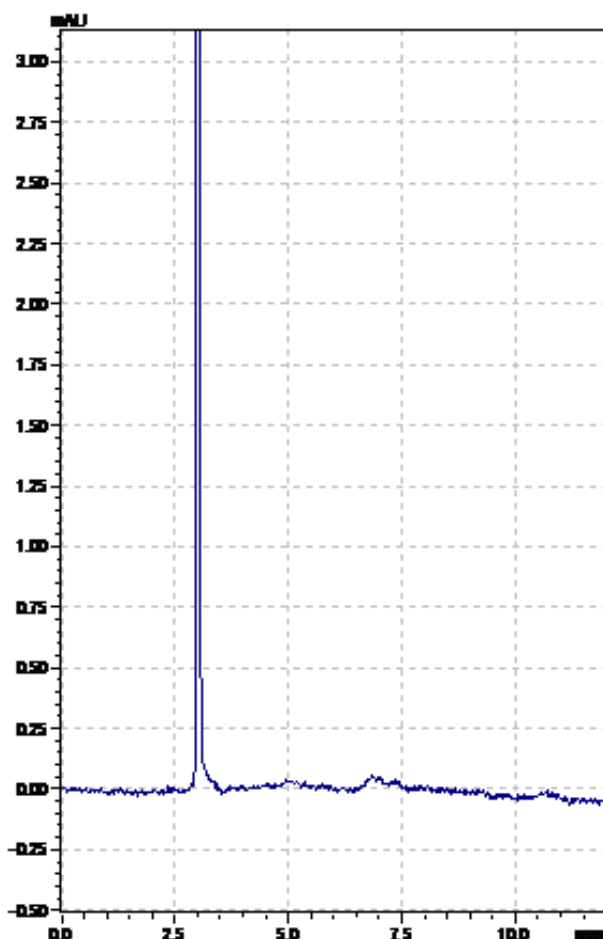


Рисунок 60 – Хроматограмма холостого образца

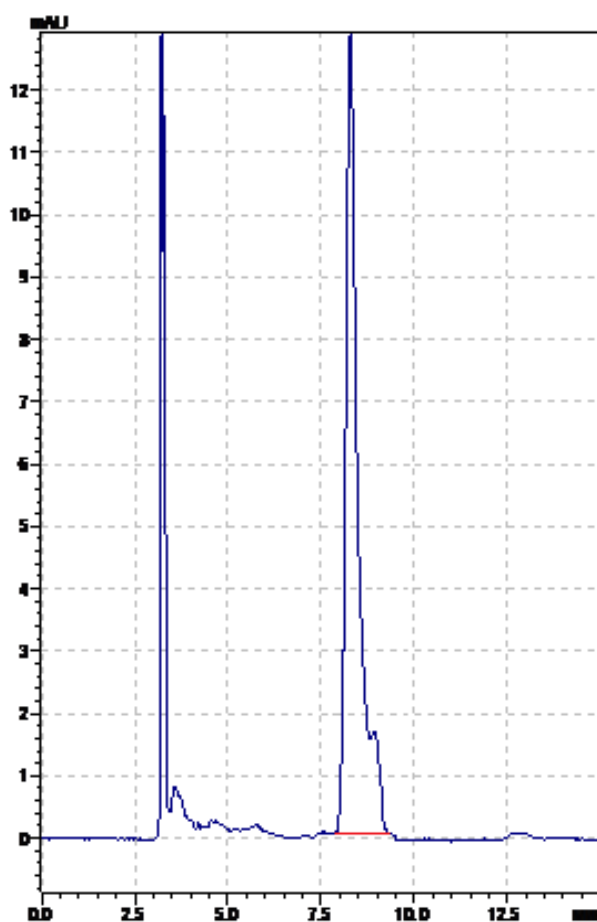
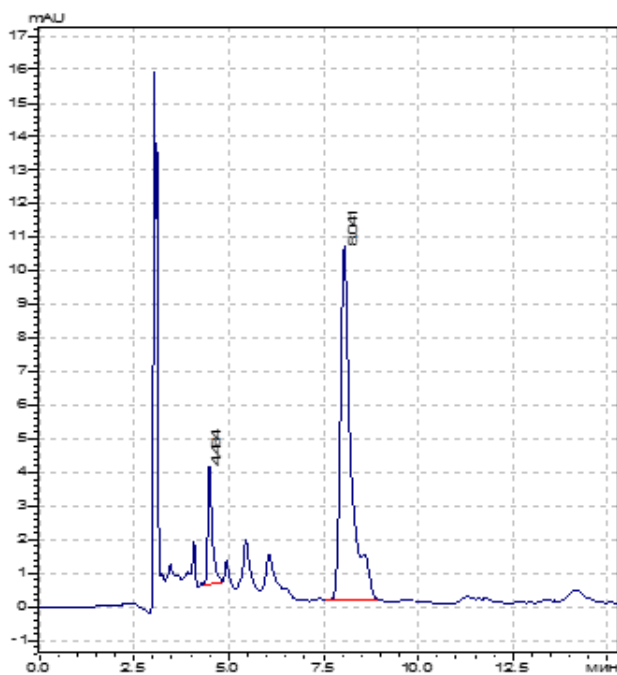


Рисунок 61 – Хроматограмма нулевого образца

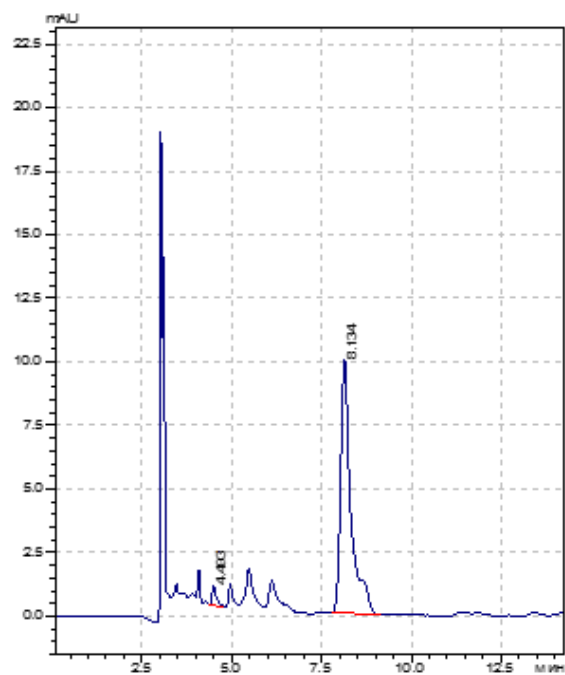
Хроматограмма образца модельной смеси представлена на рисунке 62 (А):

Селективность методики подтверждена отсутствием мешающих пиков на временах удерживания 5-ФУ и внутреннего стандарта на хроматограммах холостых и нулевых образцов. Время удерживания 5-ФУ составило 4,49 мин, время удерживания внутреннего стандарта – 8,1 мин. На хроматограммах холостых образцов отсутствовали пики, соответствующие указанным временам удерживания, что подтверждает селективность методики. Типичная

хроматограмма образца для контроля качества 4 (концентрация 0,0400 мкг/мл) представлена на рисунке 62 (Б). На хроматограмме наблюдается четкое разделение пиков аналита и внутреннего стандарта, что свидетельствует о пригодности выбранных хроматографических условий.



А



Б

Рисунок 62 – Виды хроматограмм: А – модельной смеси, приготовленной из рабочего раствора 6; Б – образца для контроля качества 4

Оценка показателя «Влияние переноса»

Эффект переноса оценивали путем введения холостых образцов после трехкратного введения градуировочного раствора верхнего уровня количественного определения (0,0500 мкг/мл).

Критерий приемлемости: площадь пика на холостой хроматограмме в области удерживания 5-ФУ не должна превышать 20 % от площади пика НПКО; для внутреннего стандарта – не более 5 %.

Установлено, что перенос остаточных количеств анализируемых компонентов не превышает установленных критериев, что свидетельствует об отсутствии значимого влияния переноса на результаты анализа.

Оценка показателя «Нижний предел количественного определения»

Нижний предел количественного определения устанавливали, как наименьшую концентрацию 5-ФУ в образце (0,0030 мкг/мл), которую можно определить с приемлемой точностью и правильностью.

Критерий приемлемости: правильность (отклонение от номинальной концентрации) в пределах ± 20 %; RSD не более 20 %; общая ошибка, представляющая собой сумму абсолютного значения относительной ошибки и RSD, – не более 40 %. Нижний предел количественного определения (0,0030 мкг/мл) был подтвержден экспериментально. Правильность (отклонение от номинала в пределах ± 20 %) и прецизионность ($RSD \leq 20$ %) на уровне НПКО находились в пределах допустимых отклонений. Значения общей ошибки, рассчитанные для каждого аналитического цикла, находились в диапазоне от 22,3 до 25,4 %, что соответствует требованиям ЕАЭС ($TE \leq 40$ %).

Оценка показателя «Линейность»

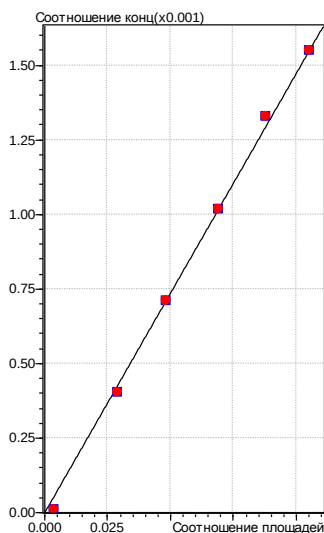
Линейность методики оценивали в диапазоне концентраций 5-ФУ от 0,0030 до 0,0500 мкг/мл. Было проанализировано 6 калибровочных уровней (Таблица 71) в трех повторностях. Калибровочные графики строили в координатах «отношение площадей пиков – концентрация аналита».

Таблица 71 – Концентрации калибровочных растворов в пересчете на 5-ФУ

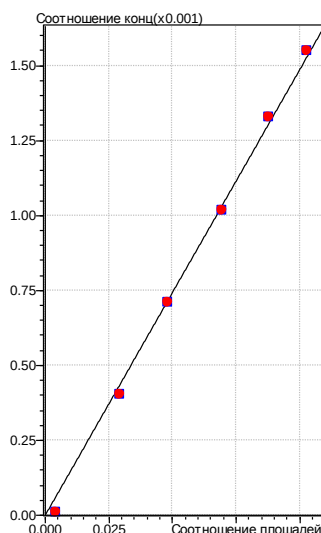
Уровень	Концентрация определяемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл
1	0,0030
2	0,0129
3	0,0229
4	0,0328
5	0,0428
6	0,0500

Критерий приемлемости: коэффициент детерминации R^2 не менее 0,995; относительное отклонение рассчитанных концентраций каждого калибровочного уровня от номинальных значений не более 15 % (для НПКО – не более 20 %).

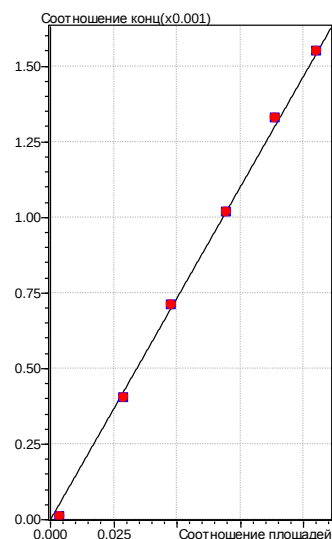
На рисунке 63 представлены градуировочные графики с соответствующими уравнениями регрессии.



Уравнение градуировочного
графика 1:
 $y = bx + a$,
где $b = 1,472408e-002$, $a = 0,0$
 $R^2 = 0,9994459$



Уравнение градуировочного
графика 2:
 $y = bx + a$,
где $b = 1,487353e-002$, $a = 0,0$
 $R^2 = 0,9997368$



Уравнение градуировочного
графика 3:
 $y = bx + a$,
где $b = 1,467098e-002$, $a = 0,0$
 $R^2 = 0,9995754$

Рисунок 63 – Градуировочные графики с уравнениями для установления соответствия критерию линейности

Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных растворов представлены в таблице 72.

Таблица 72 – Экспериментально найденные концентрации градуировочных растворов 5-ФУ

Уровень	Концентрация определяемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл	Найденное значение по градуировочному графику 1, мкг/мл	Доля от номинального значения, %	Найденное значение по градуировочному графику 2, мкг/мл	Доля от номинального значения, %	Найденное значение по градуировочному графику 3, мкг/мл	Доля от номинального значения, %
1	0,0030	0,0030	100,0	0,0030	100,0	0,0030	100,0
2	0,0129	0,0130	100,8	0,0131	101,6	0,0129	100,0
3	0,0229	0,0215	93,9	0,0215	93,9	0,0212	92,6
4	0,0328	0,0306	93,3	0,0311	94,8	0,0308	93,9
5	0,0428	0,0390	91,1	0,0393	91,8	0,0393	91,8
6	0,0500	0,0466	93,2	0,0459	91,8	0,0464	92,8

Полученные значения коэффициентов детерминации ($R^2 > 0,999$) подтверждают линейность методики во всем исследуемом диапазоне концентраций. Относительные отклонения найденных концентраций не превышают 15 %, что соответствует критериям приемлемости.

Оценка показателя «Правильность»

Правильность методики оценивали путем анализа образцов для контроля качества (ОКК) четырех концентрационных уровней (Таблица 73). Каждый образец анализировали в пяти повторностях в трех аналитических циклах с интервалом 3 дня.

Критерий приемлемости: Среднее значение найденной концентрации должно находиться в пределах 100 ± 15 % от номинальной (для НПКО – 100 ± 20 %).

Таблица 73 – Концентрации образцов для контроля качества

ОКК	Концентрация исследуемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл
1	0,0030
2	0,0090
3	0,0250
4	0,0400

Данные, полученные в аналитических циклах, представлены в таблице 74.

Для всех исследуемых концентраций средние значения отклонений не превышают установленных критериев (± 15 %, для НПКО ± 20 %), что подтверждает правильность разработанной методики.

Таблица 74 – Результаты оценки правильности

ОКК	Порядковый номер образца	Цикл 1			Цикл 2			Цикл 3		
		Найденная концентрация определяемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл	Среднее найденное значение концентрации, мкг/мл	Доля от номинального значения, %	Найденная концентрация определяемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл	Среднее найденное значение концентрации, мкг/мл	Доля от номинального значения, %	Найденная концентрация определяемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл	Среднее найденное значение концентрации, мкг/мл	Доля от номинального значения, %
1	1.1	0,00300	0,00268	89,3	0,00270	0,00258	86,0	0,00260	0,00264	88,0
	1.2	0,00230			0,00250			0,00280		
	1.3	0,00250			0,00280			0,00280		
	1.4	0,00300			0,00280			0,00290		
	1.5	0,00260			0,00210			0,00210		
2	2.1	0,00870	0,00848	94,2	0,00850	0,00858	95,3	0,00830	0,00856	95,1
	2.2	0,00830			0,00870			0,00850		
	2.3	0,00810			0,00870			0,00880		
	2.4	0,00900			0,00890			0,00900		
	2.5	0,00830			0,00810			0,00820		
3	3.1	0,02100	0,02440	97,6	0,02300	0,02440	97,6	0,02100	0,02460	98,4
	3.2	0,02600			0,02700			0,02600		
	3.3	0,02700			0,02700			0,02700		
	3.4	0,02400			0,02300			0,02700		
	3.5	0,02400			0,02200			0,02200		
4	4.1	0,03700	0,03860	96,5	0,03600	0,03700	92,5	0,03500	0,03560	89,0
	4.2	0,03700			0,03700			0,03800		
	4.3	0,03800			0,03700			0,03800		
	4.4	0,04100			0,03700			0,03200		
	4.5	0,04000			0,03800			0,03500		

Оценка показателя «Прецизионность»

Прецизионность методики оценивали на тех же образцах и аналитических циклах, что и правильность (Таблица 75). Рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD, %) для внутрисуточной (повторяемость) и междусуточной прецизионности (промежуточная прецизионность).

Критерий приемлемости: значения RSD не должны превышать 15 % (для НПКО – не более 20 %).

Таблица 75 – Результаты оценки прецизионности (RSD, %)

ОКК	Порядковый номер образца	Найденная концентрация определяемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл	RSD, %	Найденная концентрация определяемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл	RSD, %	Найденная концентрация определяемого компонента в пересчете на 5-ФУ, мкг/мл	RSD, %
1	1.1	0,00300	11,62	0,00270	11,43	0,00260	12,16
	1.2	0,00230		0,00250		0,00280	
	1.3	0,00250		0,00280		0,00280	
	1.4	0,00300		0,00280		0,00290	
	1.5	0,00260		0,00210		0,00210	
2	2.1	0,00870	4,28	0,00850	3,54	0,00830	3,93
	2.2	0,00830		0,00870		0,00850	
	2.3	0,00810		0,00870		0,00880	
	2.4	0,00900		0,00890		0,00900	
	2.5	0,00830		0,00810		0,00820	
3	3.1	0,02100	9,44	0,02300	9,87	0,02100	11,71
	3.2	0,02600		0,02700		0,02600	
	3.3	0,02700		0,02700		0,02700	
	3.4	0,02400		0,02300		0,02700	
	3.5	0,02400		0,02200		0,02200	
4	4.1	0,03700	4,71	0,03600	1,91	0,03500	7,05
	4.2	0,03700		0,03700		0,03800	
	4.3	0,03800		0,03700		0,03800	
	4.4	0,04100		0,03700		0,03200	
	4.5	0,04000		0,03800		0,03500	

Полученные значения относительного стандартного отклонения для всех концентрационных уровней не превышают 15 %, что свидетельствует о прецизионности методики как в условиях повторяемости, так и в условиях промежуточной прецизионности.

Разработанная ВЭЖХ-методика количественного определения 5-фторурацила в плазме крови лабораторных животных признана валидной по следующим показателям:

- селективность;
- линейность в диапазоне концентраций 0,0030–0,0500 мкг/мл;
- правильность (отклонение от номинала не более $\pm 15\%$);
- прецизионность (RSD не более 15 %).

Методика может быть применима в фармакокинетических исследованиях и контроле качества.

После успешного подтверждения соответствия методики установленным критериям валидации (селективность, линейность, правильность, прецизионность) она была использована для количественного определения 5-ФУ в образцах плазме крови в рамках фармакокинетического исследования.

В ходе исследования был проведен комплексный сравнительный анализ фармакокинетического поведения и биораспределения коммерческого 5-ФУ («Фторурацил-ЛЭНС», Россия) и его полимерного комплекса после внутривенного введения лабораторным животным в эквивалентной дозе 12 мг/кг по 5-ФУ.

Условия и схема проведения биологического эксперимента представлены в главе 2 «Материалы и методы».

Ключевые количественные параметры фармакокинетики представлены в сводной таблице (Таблица 76).

Таблица 76 – Основные фармакокинетические параметры свободного 5-ФУ и его полимерного комплекса после внутривенного введения

Параметр	Коммерческий 5-ФУ (Фторурацил-ЛЭНС, Россия)	Полимерный комплекс 5-ФУ	Отношение (Комплекс / коммерческий 5-ФУ)
$C_{\max}$, мкг/мл	0,0340 [0,0335; 0,0357]	0,0502 [0,0488; 0,0515]	1,47
$T_{\max}$, ч	0,17	0,17	1
AUC_{0-24} , мкг · ч/мл	0,0497 [0,0238; 0,0545]	0,2545 [0,2424; 0,2768]	5,12
$k_{эл}$, $1/ч$	0,6694	0,1312	0,20 (в 5,10 раза ↓)
$T_{1/2}$, ч	1,0353	5,2820	5,10
CL , л/ч/кг	241,4487	47,1513	0,20 (в 5,12 раза ↓)
V_d , л/кг	360,6942	359,3847	0,99 (почти одинаково)

Схема проведения эксперимента включала несколько критически важных временных точек. Ранние точки забора через 10 и 20 минут после введения были выбраны для оценки пиковой концентрации ($C_{\max}$) препаратов в плазме крови, что подтвердилось полученными данными – максимальная концентрация обеих форм достигалась уже к 10-й минуте (Рисунок 64). Одинаковое время достижения максимальной концентрации ($T_{\max} = 10$ мин) для обеих форм указывает на отсутствие существенного барьера для первоначального выхода ЛС из кровотока. При этом $C_{\max}$ полимерного комплекса оказалась на 47 % выше (Таблица 76). Это может быть связано с временным удержанием молекул комплекса в сосудистом русле на этапе первичного распределения.

Последующие заборы позволяли анализировать фазу распределения 5-ФУ в организме и начало процесса элиминации. Особое значение имели отсроченные точки забора на 3-и сутки эксперимента, которые демонстрировали увеличение времени циркулирования полимерного комплекса 5-ФУ в системном кровотоке.

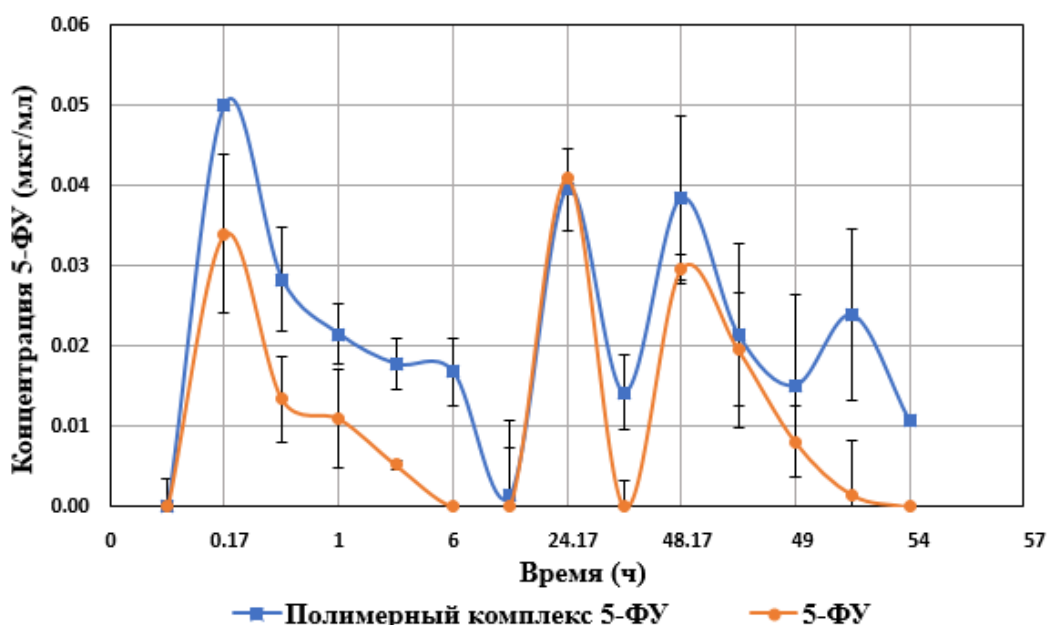


Рисунок 64 – Фармакокинетика 5-ФУ и его полимерного комплекса

Коммерческий 5-ФУ, как типичное низкомолекулярное соединение, стремительно исчезал из кровотока: его концентрация резко падала, и через сутки уже не определялась. В противоположность этому, его полимерный комплекс

демонстрировал увеличение времени циркулирования. После начального пика концентрация полимерного комплекса снижалась медленно, формируя «плато», и даже на третьи сутки оставалась определяемой (0,0107 [0,0096; 0,0264] мкг/мл), тогда как свободный 5-ФУ к этому времени уже не обнаруживался в крови.

Эти различия получили точное числовое выражение в ключевых параметрах (Таблица 76). Общая площадь под кривой AUC у полимерного комплекса оказалась достоверно в $\approx 5,12$ раза больше, для статистического анализа применялся непараметрический критерий – U-критерий Манна – Уитни, который подтвердил, что это различие является статистически значимым ($p < 0,05$). Период полувыведения ($T_{1/2}$) увеличился с примерно 1 часа до ≈ 5 часов, а скорость очищения крови от препарата (CL) снизилась в те же 5,12 раза. V_d остался сопоставимым, что указывает на схожую обширность конечного распределения составов по тканям.

Таким образом, полимерный носитель принципиально изменил не столько маршрут распределения, сколько его временную динамику, обеспечив многократное увеличение времени присутствия ЛС в системном кровотоке.

Исследование биораспределения показало, как эти фармакокинетические преимущества трансформируются в пространственное распределение (Рисунок 65).

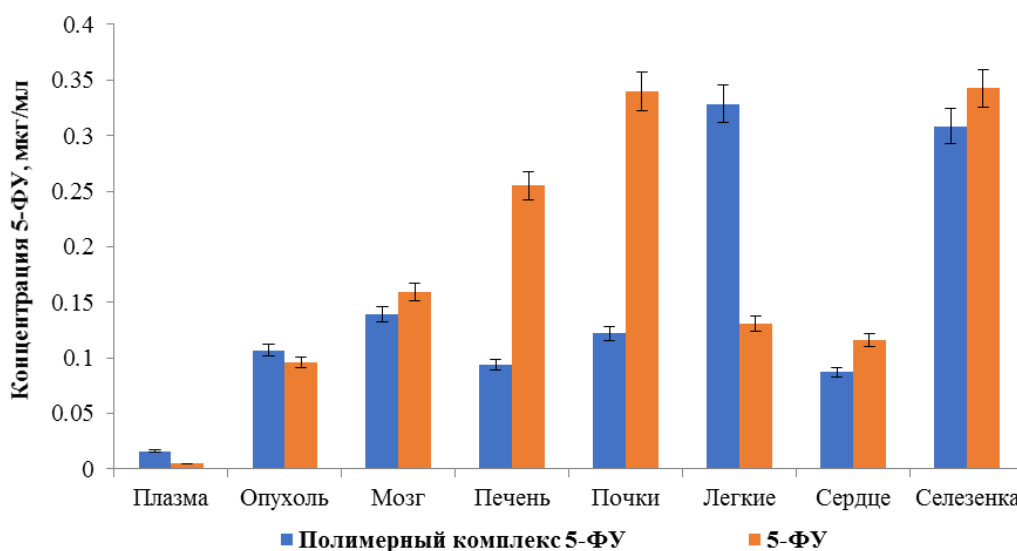


Рисунок 65 – Биораспределение 5-ФУ и его полимерного комплекса в органах и тканях лабораторных животных

Свободный 5-ФУ быстро проникал в хорошо кровоснабжаемые органы (печень, почки, селезенку). Отмечено значительное накопление 5-ФУ в опухолевой ткани (соотношение опухоль/плазма: 0,1090 [0,0420; 0,1400] к 0,0000 [0,0000; 0,0093] – рисунок 66).

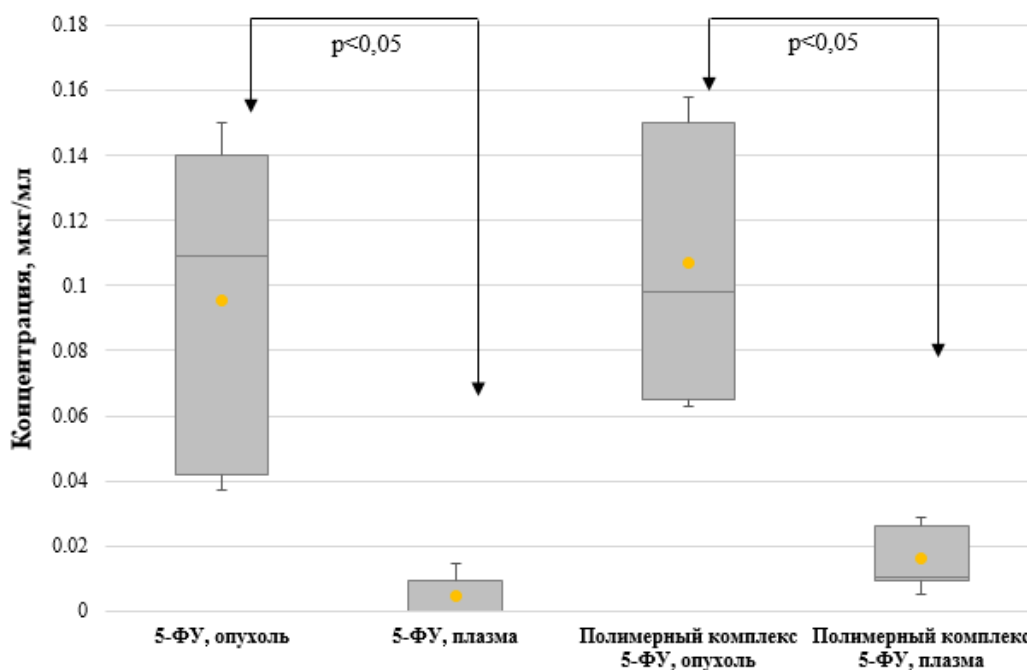


Рисунок 66 – Соотношение концентрации 5-ФУ и его полимерного комплекса в опухоли/плазме. $p < 0,05$ – достоверные отличия от группы 5-ФУ, плазма; полимерный комплекс 5-ФУ, плазма (критерий Манна – Уитни)

Полимерный комплекс активно захватывался клетками ретикулоэндотелиальной системы (в основном в селезенке и легких). В опухолевой ткани полимерный комплекс демонстрирует отличную от 5-ФУ динамику накопления. Соотношение опухоль/плазма для комплекса составило 0,0980 [0,0650; 0,1500] мкг/мл к 0,0107 [0,0096; 0,0264] мкг/мл (Рисунок 66).

3.4. Анализ эффективности и иммуностимулирующего действия полимерного комплекса 5-фторурацила в противоопухолевой терапии

В рамках данного раздела была проведена сравнительная оценка противоопухолевой эффективности синтезированного полимерного комплекса 5-ФУ и коммерческого низкомолекулярного препарата «Фторурацил-ЛЭНС» (Россия).

В качестве ключевого маркера иммуностимулирующего действия был выбран IFN- γ . На основании проведённого анализа динамики концентрации IFN- γ у лабораторных животных были получены следующие результаты.

В контрольной группе (животные с перевитой опухолью без терапии) наблюдался закономерный пик концентрации IFN- γ на 14-е сутки после перевивки (Рисунок 67).

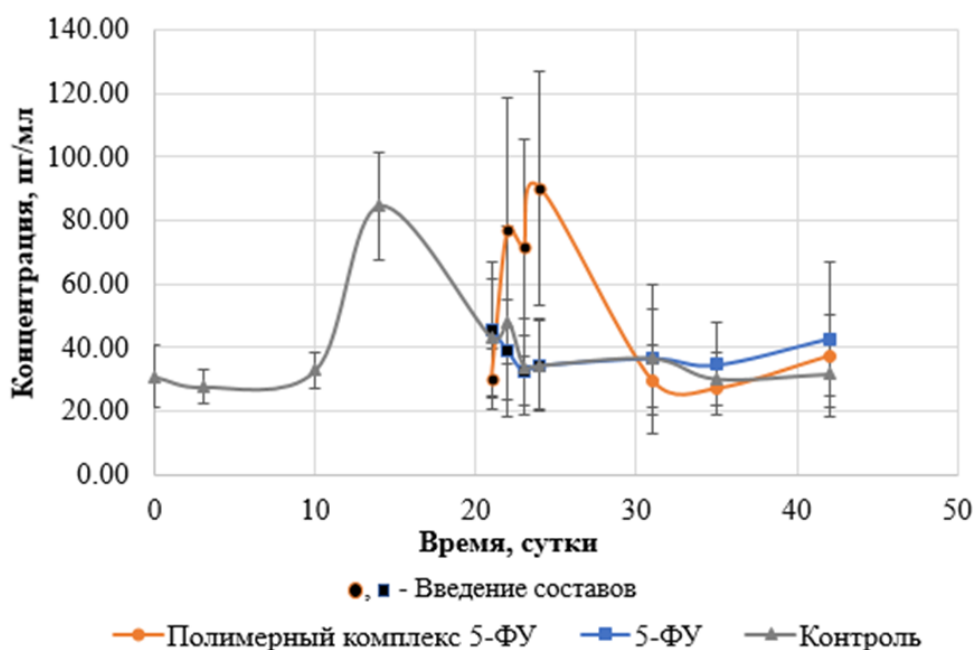


Рисунок 67 – Изменение концентрации IFN- γ у животных во время проведения эксперимента

Кроме того, было отмечено небольшое повышение концентрации IFN- γ к 22-м суткам после перевивки. Однако данное увеличение не было статистически значимым как по сравнению с базовым уровнем в группе контроля, так и относительно группы, получавшей в качестве монотерапии 5-ФУ (Рисунок 68).

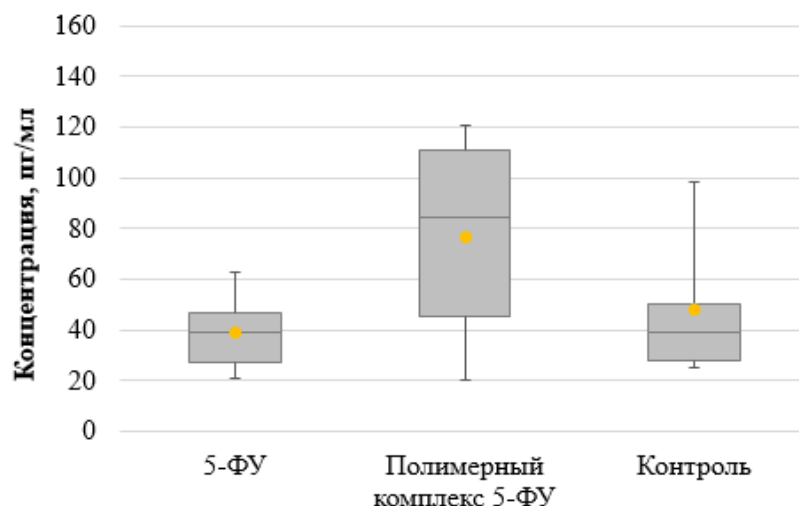


Рисунок 68 – Концентрация IFN-γ на 22-е сутки

В группе свободного 5-ФУ введение препарата, начиная с 21-х суток, не вызвало значимого повышения концентрации IFN-γ. Уровень цитокина оставался на стабильно низком уровне в течение всего периода наблюдения после начала терапии (Рисунок 67). Это указывает на то, что низкомолекулярный 5-ФУ не обладает выраженным иммуностимулирующим действием в рамках использованной модели и схемы введения.

В группе полимерного комплекса 5-ФУ введение по той же схеме (с 21-х суток) привело к быстрому и значительному росту концентрации IFN-γ, который достиг пика к 24-м суткам (Рисунок 67). Это демонстрирует, что иммуностимулирующий эффект обусловлен не самим 5-ФУ, а полимерным носителем (ПМАК), входящим в состав комплекса.

Полученные данные указывают на формирование двухфазного изменения концентрации IFN-γ при применении полимерного комплекса: первая фаза (14-е сутки) и вторая фаза (21–24 сутки) (Рисунок 69).

При применении свободного 5-ФУ наблюдается тенденция к уменьшению объема опухоли, однако эти изменения не достигают статистической значимости по сравнению с контролем. В отличие от него, полимерный комплекс 5-ФУ продемонстрировал выраженное ингибирующее действие: средний объем опухолевых образований в опытной группе составил 22 000 [9 000; 24 000] мм³, что на 35,3 % ниже показателя контрольной группы (34 000 [27 750; 48 359] мм³).

Статистический анализ подтвердил, что различия между группой комплекса и контролем являются значимыми ($p < 0,05$; критерий Манна – Уитни).

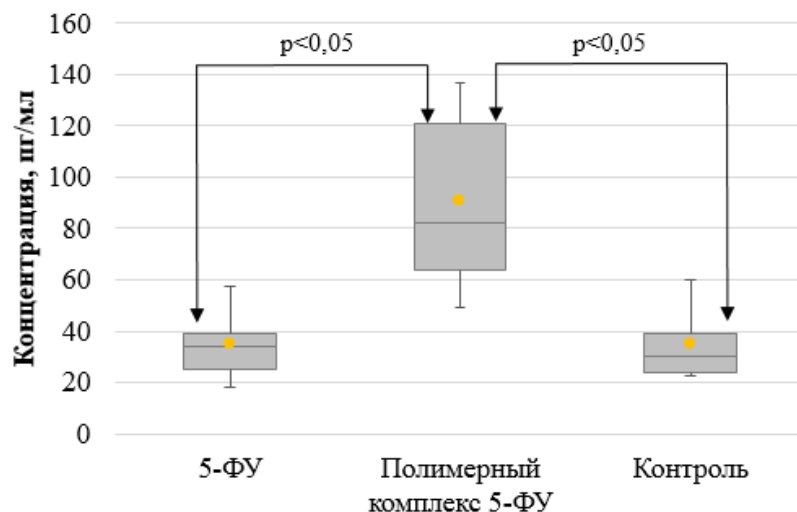


Рисунок 69 – Концентрация IFN-γ на 24 сутки. $p < 0,05$ – достоверные отличия от группы животных, которым вводился полимерный комплекс (критерий Манна – Уитни)

Аналогичная тенденция наблюдалась при анализе массовых коэффициентов опухоли. В группе, получавшей свободный 5-ФУ, массовые коэффициенты были в 1,3 раза ниже, чем в контрольной группе. В группе, получавшей полимерный комплекс 5-ФУ, массовые коэффициенты оказались в 2,4 раза ниже, чем в контрольной группе (Рисунок 70).

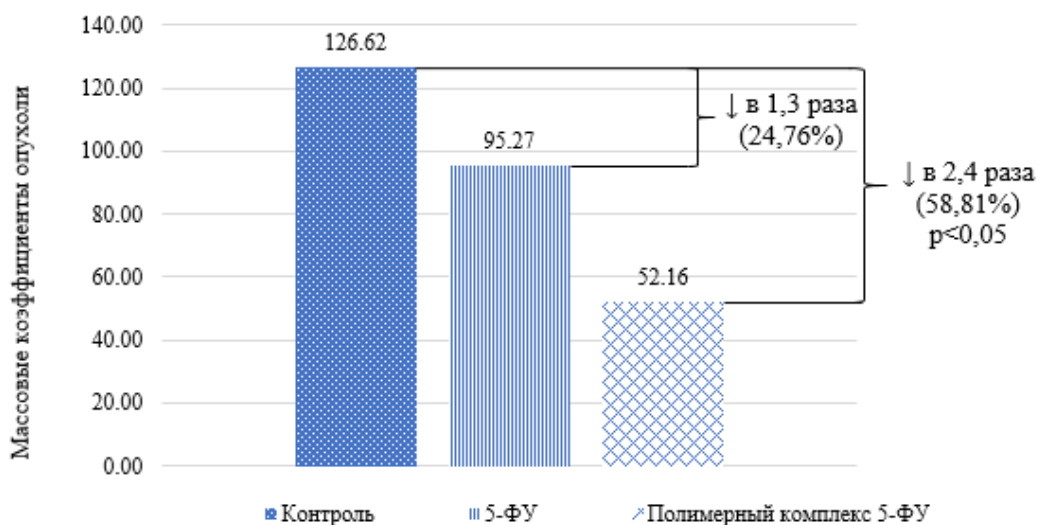


Рисунок 70 – Кратность снижения массовых коэффициентов опухоли в опытных группах и группе контроля

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное комплексное исследование было направлено на разработку и доклиническую оценку новой полимерной системы доставки 5-ФУ на основе ПМАК. В ходе работы были изучены свойства самого полимерного носителя, создан и охарактеризован полимерный комплекс 5-ФУ, проведен сравнительный анализ его фармакокинетики, биораспределения и терапевтической эффективности в экспериментах *in vivo*. Полученные результаты позволяют всесторонне обсудить потенциал разработанной системы.

4.1. Полиметакриловая кислота как биосовместимый носитель с собственной иммуностимулирующей активностью

Первостепенное значение для разработки имел выбор полимерного носителя. Полиметакрилаты, к которым относится ПМАК, известны с 60-х годов прошлого столетия и широко применяются в фармацевтической технологии, например, в составе покрытий Eudragit® для пероральных систем доставки [18; 72]. Однако в данном исследовании ПМАК рассматривалась не просто как инертная матрица, а как функциональный компонент, способный оказывать собственное фармакологическое действие.

Прежде чем перейти к изучению биологических свойств ПМАК, на первом этапе была проведена оценка её острой токсичности, которая показала, что ПМАК в дозе 1 500 мг/кг не вызывает гибели лабораторных животных, что характеризует ее как малотоксичное соединение и согласуется с общими представлениями о биосовместимости данного класса полимеров. Отсутствие летальности не позволило рассчитать LD₅₀, что само по себе является положительным результатом, свидетельствующим о широком диапазоне безопасности.

Анализ динамики массы тела подопытных животных выявил, что в первые 7 дней после введения раствора ПМАК темп прироста массы тела в опытной

группе был статистически значимо ниже, чем в контроле, несмотря на то, что в обеих группах масса тела животных увеличивалась. Данный эффект, вероятно, связан с адаптационным периодом и реакцией организма на введение полимерного соединения.

При этом влияние ПМАК на организм животных проявилось также в избирательном увеличении массовых коэффициентов ряда внутренних органов, что указывает на ее биораспределение и характер взаимодействия с физиологическими системами.

Выраженный прирост отмечен для органов иммунной защиты и детоксикации. Печень показала достоверное увеличение коэффициента у самцов на 11,09 ед. (примерно на 20 %) и на 7,63 ед. у самок (примерно на 13 %). Это соответствует её основной роли в метаболизме и удалении чужеродных соединений. ПМАК, как синтетический полимер, распознается клетками ретикулоэндотелиальной системы печени (купферовскими клетками) в качестве инородного материала, что приводит к его временному захвату [57]. Этот процесс сопровождается увеличением массового коэффициента органа и может вызывать адаптационную гипертрофию. Одновременно активируются процессы биотрансформации полимера, создавая дополнительную функциональную нагрузку на печень.

Селезенка, как центральный иммунный орган, также отреагировала увеличением на 1,52 ед. (около 34 %) у самок и на 1,21 ед. у самцов (около 30 %), подтверждая вовлечение ретикулоэндотелиальной системы в ответ на введение ПМАК.

Значительный прирост коэффициента легких у самцов на 3,71 ед. (около 35 %) может быть следствием возможной активации иммунных клеток (альвеолярных макрофагов).

Заметное влияние было зафиксировано и на органы выделительной системы. Увеличение массовых коэффициентов почек у самцов на 1,16 ед. (примерно 13 %) свидетельствует о возросшей нагрузке. Это связано с механизмами почечной элиминации низкомолекулярных фракций полимера [163].

Однако скорость и эффективность их выведения критически зависят от электростатических свойств макромолекул. Отрицательно заряженный гломерулярный барьер почек избирательно замедляет фильтрацию анионных соединений (таких как ПМАК) благодаря электростатическому взаимодействию [95]. Такая избирательная задержка анионных полимеров в клубочках создаёт повышенную метаболическую нагрузку на нефроны, что может приводить к компенсаторному увеличению массы почек.

Прирост массы надпочечников у самцов на 0,04 ед. (около 18 %) косвенно указывает на активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в ответ на введение полимерного соединения. Важно отметить, что ПМАК не оказал статистически значимого влияния на массовые коэффициенты сердца и половых желез (семенников/яичников). Это свидетельствует об отсутствии у исследуемого полимера острой кардиотоксичности и выраженного негативного воздействия на репродуктивную систему в рамках проведенного эксперимента.

Таким образом, несмотря на статистически значимое увеличение массовых коэффициентов органов-мишеней, гистологическое исследование не выявило признаков некротического или необратимого повреждения тканей. Это позволяет интерпретировать наблюдаемые изменения как адаптивную реакцию, связанную с метаболизмом и клиренсом полимера, а не как проявление органотоксичности. Следовательно, ПМАК демонстрирует профиль, характерный для биосовместимых, но небиodeградируемых полимеров.

Дополнительными факторами, способствующими наблюдаемым изменениям, являются гидрофильные свойства ПМАК, способствующие связыванию воды в тканях, а также его потенциальная способность активировать систему мононуклеарных фагоцитов [240]. Эти процессы носят обратимый характер и отражают физиологические механизмы адаптации организма к введению полимерного соединения, что согласуется с отсутствием признаков некротического повреждения органов и тенденцией к восстановлению исходных параметров.

Ключевым стало выявление выраженной иммуностимулирующей активности ПМАК. Полученные данные демонстрируют, что полимер способен

модулировать уровни ключевых цитокинов, играющих важную роль в противоопухолевом иммунитете.

IL-6 является многофункциональным цитокином, который играет ключевую роль в связывании хронического воспаления с онкогенезом. В основном он секретируется в организме человека Т-клетками и макрофагами [265]. Многочисленные исследования демонстрируют, что IL-6 является не только биомаркером агрессивности опухолей, но и активным участником их развития, метастазирования и устойчивости к терапии. Его гиперэкспрессия была зарегистрирована почти при всех типах опухолей [169]. Повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови и опухолевой ткани ассоциированы с неблагоприятным прогнозом при различных типах рака, включая ЖКТ и молочную железу [245; 294].

Механизм противоопухолевого действия IL-6 обусловлен несколькими механизмами. IL-6 связывается с рецепторами на поверхности опухолевых клеток, запуская каскад сигналов через JAK/STAT3. Это приводит к экспрессии генов, ответственных за выживание клеток, подавление апоптоза и усиление пролиферации [85]. IL-6 защищает опухолевые клетки от химио- и лучевой терапии, активируя антиоксидантные и антиапоптотические пути. Это снижает эффективность лечения, особенно на поздних стадиях онкологии [169]. Цитокин стимулирует ангиогенез, ремоделирование внеклеточного матрикса и привлечение иммунных клеток, создавая условия для метастазирования [49].

IL-6 служит связующим звеном между воспалением и опухолью, влияя на все этапы опухолевой прогрессии. Его ингибирование может стать перспективным направлением в преодолении резистентности к терапии и улучшении исходов лечения [265].

Введение ПМАК привело к статистически значимому снижению провоспалительного цитокина IL-6, что свидетельствует о снижении воспалительной нагрузки, ассоциированной с опухолевым ростом.

Наряду с провоспалительным IL-6, в ходе исследования был оценен уровень противовоспалительного цитокина IL-10.

IL-10 – противовоспалительный цитокин, вырабатываемый регуляторными Т-клетками (Treg), макрофагами M2 (альтернативно-активированные) и некоторыми опухолевыми клетками. Его роль в онкологии противоречива [200; 249]. В зависимости от микроокружения опухоли IL-10 может проявлять как про-, так и противоопухолевую активность, что делает его важным объектом исследований в онкоиммунологии.

IL-10 ингибирует активность Т-хелперных клеток типа 1 (Th1), необходимых для эффективного иммунного ответа против опухолей, а также снижает экспрессию молекул МНС класса I, что ослабляет распознавание опухолевых клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. Повышенные уровни IL-10 в сыворотке крови ассоциированы с плохим прогнозом и устойчивостью к терапии при различных формах рака, включая меланому, рак легких и Т/НК-клеточные лимфомы [69; 70; 79; 176; 200; 218; 250]. Несмотря на иммуносупрессивное действие, в некоторых случаях IL-10 может ограничивать прогрессию опухоли. Как противовоспалительный цитокин, IL-10 снижает повреждение ДНК, связанное с воспалением, тем самым потенциально препятствуя инициации опухоли [124].

Тенденция к снижению IL-10, наряду с достоверными изменениями других цитокинов, также может вносить вклад в общую картину модуляции иммунного ответа.

Еще одним цитокином, привлечшим внимание в рамках данного исследования, стал IL-17.

IL-17 является цитокином, продуцируемым клетками Th17 и играет сложную неоднозначную роль в онкогенезе. Его влияние на опухолевый процесс варьируется в зависимости от типа опухоли, стадии заболевания и особенностей микроокружения [11; 222].

IL-17 способствует противоопухолевому цитотоксическому Т-клеточному ответу, приводящему к регрессии опухоли. С другой стороны, способствуя ангиогенезу и выходу опухолевых клеток из первичного очага, IL-17 способствует распространению опухоли [170].

Так, данный цитокин стимулирует ангиогенез при колоректальном раке, гепатоцеллюлярной карциноме [86; 187; 287; 303], содействует привлечению нейтрофилов, способствующих метастазированию при раке молочной железы [87].

Однако он также может проявлять и противоопухолевое действие, которое коррелирует с лучшей выживаемостью пациентов, например, при плоскоклеточном раке пищевода [193], а, также аденокарциноме желудка [76]. При карциноме яичников IL-17 ассоциирован с благоприятным прогнозом [191]. В эксперименте на мышах показано, что IL-17 способствует росту опухоли у иммунодефицитных животных, но способствует отторжению опухоли у иммунокомпетентных [110].

Поскольку наше исследование проводилось на иммунокомпетентных крысах Wistar, оценка уровня IL-17 представляет особый интерес: в данном контексте его изменение может отражать именно противоопухолевый аспект действия.

Проведенный анализ подтвердил это предположение: наблюдалось статистически значимое повышение уровня IL-17, что указывает на вовлечение Th17-клеточного ответа.

Для подтверждения того, что описанные иммуномодулирующие эффекты ПМАК проявляются в реальном противоопухолевом ответе, был проведен эксперимент по оценке влияния полимера на развитие опухолевого процесса на ранних стадиях онкогенеза (модель РС-1). ПМАК вводили по двум различным схемам: режим А (за 24 часа до перевивки опухолевых клеток, что моделирует предварительную активацию иммунитета) и режим Б (через 3 часа после перевивки, что имитирует терапию только что инициированного процесса).

Результаты эксперимента показали, что в обоих режимах введения ПМАК способна запускать эффективный не прямой противоопухолевый ответ, приводящий к значимому подавлению развития опухолевого процесса. Показатель ТРО составил 79,05 % при введении до перевивки (режим А) и 77,82 % – при введении после перевивки (режим Б). Способность полимера ингибировать рост опухоли на 77–79 % подтверждает его высокую эффективность в активации

естественных механизмов противоопухолевой защиты. Согласно критериям оценки противоопухолевой активности, показатель ТРО в диапазоне 51–80 % соответствует умеренному или положительному эффекту, что позволяет рассматривать ПМАК как перспективный агент для иммунотерапии онкологических заболеваний [162].

Помимо оценки противоопухолевой активности, было проведено гистологическое исследование органов, потенциально подверженных токсическому воздействию: печени (основной орган детоксикации), почек (путь элиминации), селезенки (центральный орган иммунной системы) и легких (иммунокомпетентный орган, содержащий значительную популяцию макрофагов).

Гистологический анализ печени выявил, что у животных контрольной группы наблюдались выраженные дистрофические изменения клеток печени, что, вероятно, связано с системным токсическим воздействием развивающейся опухоли РС-1 и продуктов ее метаболизма. В группе животных, получавших раствор ПМАК, были зафиксированы лишь минимальные и очаговые дистрофические изменения. Это указывает на протекторное или модулирующее действие полимера, которое могло смягчить повреждающее влияние опухолевой интоксикации на печень. Данный эффект может быть связан с иммуномодулирующими свойствами ПМАК, которые, активируя систему мононуклеарных фагоцитов (включая купферовские клетки печени), способствуют более эффективной детоксикации и ограничивают повреждающее действие токсинов.

Полученные результаты согласуются с известными литературными данными об иммуномодулирующих свойствах синтетических полиэлектролитов. Подобные полимеры, включая ПМАК и ПАК, давно известны своей способностью выступать в роли неспецифических иммуностимуляторов и адъювантов. Их механизм действия связан, прежде всего, с активацией врожденного иммунитета. Было показано, что многие полианионы способны индуцировать выработку ключевых цитокинов, в частности интерферонов, которые, в свою очередь, «переключают» макрофаги в

активированное состояние (так называемый M1-фенотип) [251]. Такие макрофаги приобретают способность избирательно уничтожать опухолевые клетки [310]. Способность синтетических полиэлектролитов подавлять рост опухолей была отмечена ещё в 1960-х годах [256], а впоследствии была установлена прямая корреляция между их способностью активировать макрофаги *in vitro* и противоопухолевой активностью *in vivo* [251].

Таким образом, полученные нами данные о значимом подавлении опухолевого роста при введении ПМАК хорошо согласуются с установленным в литературе механизмом действия этого класса соединений. Противоопухолевый эффект, по всей видимости, является непрямым и опосредован активацией иммунной системы, включая усиление функций НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, поляризацию макрофагов в противоопухолевый фенотип и индукцию выработки провоспалительных цитокинов [310]. Комплексная активация этих звеньев иммунитета в конечном итоге и приводит к эффективному сдерживанию развития опухолевого образования, что и наблюдалось в нашем эксперименте.

По завершении этапа исследований, посвященного характеристике полимерного носителя, был составлен проект спецификации на ПМАК (Приложение К), включающий основные показатели качества и методы их контроля. Таким образом, ПМАК в данном исследовании проявила себя не только как потенциальный носитель, но и как активный иммуноадьювант.

4.2. Физико-химические основы синтеза полимерного комплекса 5-фторурацила

Следующим этапом стала разработка комплекса ПМАК с 5-ФУ. В ходе исследования была установлена зависимость степени включения и прочности комплекса от pH среды, что подтверждает ключевую роль электростатических и водородных взаимодействий в его формировании. Максимальная степень включения 5-ФУ (88 %) наблюдалась при pH 2,83, тогда как при pH 7,00 этот

показатель составил 59,9 %. Однако оценка «прочности» комплекса в данном контексте основывалась не на количестве связанного 5-ФУ, а на данных спектрального анализа: батохромном смещении полосы поглощения в УФ-спектре и величине сдвига карбонильной группы в низкочастотную область в ИК-спектре. Эти параметры отражают стабильность межмолекулярных водородных связей между полимером и действующим веществом. Максимальные спектральные сдвиги, зафиксированные при pH 7,00, свидетельствуют о формировании наиболее стабильного комплекса, несмотря на более низкую степень включения (59,9 % против 88 % при pH 2,83). Это согласуется с данными литературы об образовании комплексов на основе метакриловой кислоты [72].

Именно это соображение – приоритет стабильности в физиологических условиях над максимальной нагрузкой – определило выбор образца для дальнейших исследований. Комплекс, полученный при pH 7,00, демонстрирует оптимальный баланс: он достаточно прочен, чтобы сохранять целостность в системном кровотоке (pH 7,4), предотвращая преждевременное высвобождение 5-ФУ и связанные с ним системные токсические эффекты, но при этом способен к контролируемому высвобождению в кислой среде опухоли и внутриклеточных компартментов.

pH-зависимый профиль высвобождения 5-ФУ из комплекса имеет принципиальное значение для его терапевтического применения. Более быстрое высвобождение в кислой среде, моделирующей внутриклеточное микроокружение опухоли [274], создает предпосылки для преимущественной активации препарата в опухолевой ткани. Тот факт, что различия в высвобождении начинали проявляться лишь после 22 часов, указывает на сложный, многостадийный механизм диссоциации комплекса. Это позволяет предположить, что комплекс может выступать в роли депо, обеспечивая более длительную циркуляцию и высвобождение активного вещества. Высокая стабильность комплекса при различных условиях хранения подтверждает его пригодность для дальнейшей разработки лекарственной формы.

По окончании данного этапа исследований был составлен проект спецификации на полимерный комплекс 5-ФУ (Приложение Л), регламентирующий его основные характеристики.

4.3. Острая токсичность полимерного комплекса 5-фторурацила

Важным подтверждением безопасности разработанной системы стали результаты оценки острой токсичности полимерного комплекса 5-ФУ. При введении комплекса в дозе, эквивалентной 1500 мг/кг по ПМАК, не было зарегистрировано летальных исходов. С учетом содержания 5-ФУ в комплексе (10 мол.%, что соответствует 13,13 масс.%) доза собственно 5-ФУ составила 196,8 мг/кг. Прогнозируемая LD_{50} свободного 5-ФУ для внутривенного пути введения у крыс составляет 273,1 мг/кг (класс 4 «Токсичный» по классификации OECD). Таким образом, введенная доза 5-ФУ в составе комплекса достигала 72 % от летальной дозы свободного препарата. Несмотря на это, в течение 14-суточного наблюдения не было зарегистрировано ни одного летального исхода, а клинические проявления токсичности были минимальными и полностью обратимыми. Это убедительно свидетельствует о том, что полимерный носитель существенно снижает острую токсичность 5-ФУ, что является одним из ключевых преимуществ разработанной системы доставки.

4.4. Влияние полимерного комплекса на фармакокинетику и биораспределение 5-фторурацила

Сравнительное фармакокинетическое исследование доказало, что включение 5-ФУ в состав полимерного комплекса кардинально меняет его поведение в организме. Сохранение времени достижения максимальной концентрации ($T_{max} = 10$ мин) при одновременном повышении C_{max} на 47 % указывает на то, что полимер не замедляет первоначальное распределение, но защищает ЛС от быстрого метаболизма и выведения. Ключевым результатом

является многократное увеличение времени циркуляции, количественно выраженное в росте $T_{1/2}$ с 1 до 5 часов и 5,12-кратном снижении системного клиренса. Это закономерно привело к увеличению площади (в 5,12 раза) под фармакокинетической кривой (AUC). Данные изменения указывают на увеличение продолжительности циркуляции препарата в кровяном русле, что достигается за счет использования полимерной системы доставки [97; 279].

Особый интерес представляет модифицированное биораспределение. Выраженный тропизм комплекса к органам ретикулоэндотелиальной системы (селезенка, печень, легкие) объясняется активным захватом макрофагами, что является естественным путем клиренса для коллоидных частиц и полимеров [182]. В контексте онкологии это свойство может быть использовано для иммуномодуляции.

Наряду с накоплением в органах РЭС, важным аспектом биораспределения является поведение комплекса в опухолевой ткани и в системном кровотоке. Свободный 5-ФУ, благодаря малому размеру, быстро проникал в хорошо кровоснабжаемые органы (печень, почки, селезенку). Важно отметить значительное накопление 5-ФУ в опухолевой ткани, что объясняется особенностями строения опухолевых сосудов (повышенная проницаемость) [83; 225] и эффектом EPR [144]. Однако быстрое выведение 5-ФУ из организма ограничивает продолжительность его терапевтического воздействия.

Полимерный комплекс, будучи макромолекулой, демонстрировал иной профиль: он активно захватывался клетками ретикулоэндотелиальной системы (в основном в селезенке и легких). В опухолевой ткани полимерный комплекс демонстрирует отличную от 5-ФУ динамику накопления. Хотя абсолютное соотношение опухоль/плазма (0,0980 [0,0650; 0,1500] мкг/мл к 0,0107 [0,0096; 0,0264] мкг/мл) уступает низкомолекулярному препарату, это компенсируется значительно более высокими концентрациями в системном кровотоке, увеличением времени циркулирования полимерного комплекса 5-ФУ в сравнении с низкомолекулярным 5-ФУ [144], что подтверждается данными фармакокинетики,

а также возможностью кумулятивного эффекта при повторных введениях, что обеспечивается выходом концентрации полимерного комплекса 5-ФУ на плато.

Абсолютная концентрация 5-ФУ в опухоли при введении комплекса (0,0980 [0,0650; 0,1500] мкг/мл) сопоставима с таковой для свободного препарата (0,1090 [0,0420; 0,1400] мкг/мл).

4.5. Синергизм прямого цитотоксического и иммуномодулирующего действия полимерного комплекса 5-фторурацила

5-ФУ является одним из наиболее широко применяемых химиотерапевтических агентов при лечении злокачественных новообразований ЖКТ, включая колоректальный рак и рак поджелудочной железы. Однако при холангиоцеллюлярной карциноме (ХЦК) – одной из наиболее агрессивных и прогностически неблагоприятных опухолей гепатобилиарной системы, характеризующейся высокой резистентностью к стандартной химиотерапии – эффективность 5-ФУ как монотерапии остается ограниченной. Именно поэтому в настоящем исследовании в качестве экспериментальной модели была выбрана перевиваемая холангиоцеллюлярная карцинома крысы РС-1, что позволило оценить терапевтический потенциал разработанного полимерного комплекса в условиях, максимально приближенных к клинически сложной ситуации.

Ключевым преимуществом разработанного полимерного комплекса является возможность синергизма его компонентов: 5-ФУ оказывает прямое цитотоксическое влияние на опухолевые клетки, а ПМАК – иммуномодулирующее.

Как было показано в предыдущих разделах, полимерный комплекс 5-ФУ демонстрирует увеличение времени циркулирования в кровяном русле и измененный профиль биораспределения, что теоретически может усиливать его цитотоксическое действие на опухоль. Кроме того, ПМАК, выступающий в роли носителя, обладает собственной иммуностимулирующей активностью.

Выбор в качестве ключевого маркера IFN- γ был обусловлен его центральной ролью IFN- γ в противоопухолевом иммунитете. В отличие от двойственной роли большинства цитокинов, IFN- γ традиционно рассматривается как цитокин с выраженной противоопухолевой активностью, которая реализуется через несколько ключевых механизмов. Он играет важную роль в координации как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, обладая противовирусными, противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами [154]. Он значительно усиливает презентацию опухолевых антигенов, повышая экспрессию молекул МНС I и II классов на антиген-презентирующих клетках, что улучшает распознавание злокачественных клеток иммунной системой [123]. IFN- γ активирует цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты и NK-клетки, стимулируя выработку перфоринов и гранзимов – ключевых эффекторных молекул, непосредственно уничтожающих опухолевые клетки [154]. Он также способен подавлять активность регуляторных Т-клеток, тем самым уменьшая иммуносупрессивное микроокружение опухоли [75]. Прямое воздействие IFN- γ на опухолевые клетки включает индукцию апоптоза через активацию STAT1-зависимых сигнальных путей и каспазного каскада, а также ингибирование ангиогенеза за счет подавления фактора роста эндотелия сосудов (VEGF или Vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов) [271; 276]. Кроме того, в предшествующих исследованиях было продемонстрировано, что введение раствора полимерного носителя (ПМАК) приводит к достоверному увеличению концентрации IFN- γ [7], что подтверждает его иммуномодулирующий потенциал и обосновывает оценку данного цитокина в контексте действия полимерного комплекса 5-ФУ.

В рамках настоящего исследования была проведена сравнительная оценка противоопухолевой эффективности синтезированного полимерного комплекса 5-ФУ и коммерческого низкомолекулярного препарата «Фторурацил-ЛЭНС» (Россия) у лабораторных животных с перевитой опухолью РС-1. Оценка включала два компонента: анализ динамики IFN- γ в сыворотке крови, а также измерение объема и массовых коэффициентов опухоли.

Первым этапом анализа явилось изучение динамики IFN- γ в контрольной группе животных, не получавших лечения. В контрольной группе наблюдался пик концентрации IFN- γ на 14-е сутки после перевивки. Данный феномен соответствует физиологическому иммунному ответу на развивающуюся опухоль, а именно – активации адаптивного Th1/CTL-ответа, сопровождающегося инфильтрацией опухоли цитотоксическими лимфоцитами и NK-клетками, которые активно секретируют IFN- γ [66; 154]. Этот пик свидетельствует о развернутом клеточно-опосредованном иммунном ответе типа Th1 против опухоли [66], который у грызунов играет решающую роль в ограничении роста новообразования [114].

Незначительность позднего подъема IFN- γ (к 22-м суткам) может свидетельствовать о кратковременности и недостаточной интенсивности естественного противоопухолевого иммунного ответа, который не способен сдерживать прогрессирование опухоли в долгосрочной перспективе.

Прямое сравнение при едином времени начала терапии демонстрирует отсутствие индуцирующего влияния на продукцию IFN- γ у коммерческого низкомолекулярного 5-ФУ и наличие выраженного, быстро развивающегося иммуностимулирующего действия у полимерного комплекса, которое проявляется уже в первые 3–4 дня после начала введений.

Это подтверждается данными по IFN- γ : в группе, получавшей комплекс (введение с 21-х суток), концентрация этого цитокина быстро возрастала, тогда как свободный 5-ФУ не вызывал подобного эффекта.

Полученные данные подтверждают, что ПМАК придает системе доставки новое, дополнительное фармакологическое свойство – способность активировать ключевое звено клеточного противоопухолевого иммунитета (синтез IFN- γ), отсутствующее у исходного химиотерапевтического агента. Это указывает на формирование двухфазного иммунного ответа при применении полимерного комплекса: первая фаза (14-е сутки) обусловлена естественной реакцией на опухоль и не связана с терапевтическим вмешательством, вторая фаза (21–24 сутки) представляет собой индуцированную иммуностимуляцию, непосредственно связанную с введением полимерного комплекса 5-ФУ.

Предположительно, именно индукция синтеза IFN- γ , обладающего прямым антипролиферативным действием на опухолевые клетки и способностью активировать эффекторные механизмы врождённого и адаптивного иммунитета, вносит существенный вклад в реализацию противоопухолевого эффекта разработанного полимерного комплекса.

Наряду с описанным иммуноопосредованным действием, вклад в общий терапевтический эффект вносит и прямое цитотоксическое влияние, обусловленное наличием в составе комплекса 5-ФУ.

Сохранение прямого цитотоксического эффекта подтверждается статистически значимым ($p < 0,05$; критерий Манна – Уитни) уменьшением объема опухоли на 35,3 % по сравнению с контролем и снижением массовых коэффициентов опухоли в 2,4 раза.

Таким образом, полимерный комплекс не только индуцирует специфический иммунный ответ, но и обеспечивает значимое прямое подавление роста опухоли (по объему и массе), что в совокупности формирует его комплексный терапевтический эффект.

4.6. Общая концепция и перспективы разработки

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что созданная полимерная система доставки 5-ФУ на основе ПМАК обладает улучшенным профилем по сравнению со свободным ЛС. Комплекс демонстрирует увеличение времени циркулирования в кровяном русле, модифицированное биораспределение, способность модулировать противоопухолевый иммунный ответ и реализовывать синергичный терапевтический эффект. Особую значимость этим данным придает тот факт, что эффективность комплекса была доказана на модели химиорезистентной холангиоцеллюлярной карциномы: зафиксировано статистически значимое уменьшение объема опухоли на 35,3 % ($p < 0,05$; критерий Манна – Уитни) и снижение массовых коэффициентов в 2,4 раза.

По итогам всей работы были составлены проекты спецификаций как на исходный полимерный носитель (ПМАК), так и на разработанный полимерный комплекс 5-ФУ, что является важным шагом на пути к стандартизации и дальнейшей разработке лекарственной формы.

Таким образом, в результате проведенного исследования разработана и охарактеризована новая полимерная система доставки 5-ФУ на основе полиметакриловой кислоты. Показано, что ПМАК является не просто инертным носителем, а активным иммуномодулирующим компонентом. Разработанный полимерный комплекс 5-ФУ демонстрирует значительные фармакокинетические преимущества и синергичный механизм действия, сочетая прямую цитотоксичность с активацией противоопухолевого иммунитета, что открывает перспективы для его применения при агрессивных формах рака ЖКТ. Полученные данные формируют научную основу для дальнейшего доклинического изучения разработанного комплекса и позволяют рассматривать его как перспективную платформу для комбинированной химио-иммунотерапии онкологических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей диссертационной работе представлено комплексное исследование, направленное на разработку и доклиническую оценку новой полимерной системы доставки противоопухолевого препарата 5-ФУ на основе ПМАК, обладающей собственной иммуностимулирующей активностью. В основе реализованного подхода лежит принцип, согласно которому полимерный носитель выступает не просто инертным транспортом, а активным терапевтическим компонентом, способным модулировать противоопухолевый иммунный ответ.

В ходе выполнения работы достигнуты все поставленные цели и задачи. Полученные результаты позволяют сделать следующие обобщающие выводы, являющиеся логическим завершением проведённых экспериментов.

ВЫВОДЫ

1. Собственная иммуностимулирующая активность, обусловленная непрямым противоопухолевым действием, полимера метакриловой кислоты (малотоксичный, $LD_{50} > 1500$ мг/кг) показана в эксперименте развития опухолевого процесса при перевивке опухолевых клеток на ранней стадии онкогенеза (до формирования опухолевого узла). Торможение роста опухоли составило 79,05 % введении за 24 часа до перевивки и 77,82 % при введении через 3 часа после перевивки.

2. Получен стабильный полимерный комплекс 5-ФУ на основе ПМАК (степень включения 5-ФУ – 59,90 %), который характеризуется pH-зависимым высвобождением 5-ФУ: в среде цитратного буферного раствора (pH 5,1) высвобождение на 15,92 % выше, чем в фосфатном буферном растворе (pH 7,4).

3. Разработана и валидирована методика количественного определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса в водной среде (диапазон линейности 0,0016–0,0167 мг/мл, $R^2 = 0,9999$, правильность 98,91 %, RSD = 1,45 %).

4. В ходе фармакокинетического исследования продемонстрировано, что полимерный комплекс 5-ФУ принципиально изменяет фармакокинетику 5-ФУ: период полувыведения увеличивается в 5,10 раза, клиренс снижается в 5,12 раза, AUC возрастает в 5,12 раза по сравнению со свободным 5-ФУ. При оценке биораспределения в единственной временной точке (на момент окончания эксперимента) установлено, что абсолютные концентрации 5-ФУ в составе комплекса в плазме (0,0107 [0,0096; 0,0264] мкг/мл) превышают таковые для свободного препарата (0,0000 [0,0000; 0,0093] мкг/мл), что свидетельствует о пролонгации действия комплекса.

5. Показана противоопухолевая эффективность полимерного комплекса 5-ФУ на стадии сформировавшейся опухоли на модели РС-1 *in vivo*, что проявлялось статистически значимым уменьшением объёма опухоли: 22 000,00 [9 000,00; 24 000,00] мм³ в группе полимерного комплекса против 34 000,00 [27 750,00; 48 359,38] мм³ в контрольной группе ($p < 0,05$; критерий

Манна – Уитни). Кроме того, отмечено снижение массовых коэффициентов опухоли в 2,4 раза относительно контрольных значений, что превосходило эффект в группе сравнения с применением 5-ФУ, где данный показатель уменьшился лишь в 1,3 раза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При разработке полимерных систем доставки рекомендуется использовать ПМАК с молекулярно-массовыми характеристиками $M_n \cdot 10^3 = 31,8$ кДа; $M_w \cdot 10^3 = 37,3$ кДа; $D = 1,17$; $n \sim 365$ в качестве универсального полимерного носителя для получения комплексов с другими низкомолекулярными противоопухолевыми лекарственными средствами. При синтезе комплексов рекомендовано: проводить синтез в нейтральной среде (рН 7,00) для достижения оптимальной прочности комплекса; осуществлять очистку методом лиофильной сушки, обеспечивающим полное удаление остаточных органических растворителей (тетрагидрофурана, диэтилового эфира, этилового спирта).

2. Специалистам в области контроля качества ЛС рекомендуется применять валидированную методику УФ-спектроскопии для количественного определения 5-ФУ в составе полимерного комплекса. Условия применения методики: длина волны измерения – 265–267 нм (с учетом рН среды); растворители – вода очищенная, фосфатный буферный раствор (рН 7,4), цитратный буферный раствор (рН 5,1); диапазон линейности – 0,0016–0,0167 мг/мл ($R^2 \geq 0,9997$). Методика рекомендована для количественного определения 5-ФУ в составе комплекса при исследовании стабильности и изучении кинетики высвобождения.

3. В области биоаналитических исследований рекомендовано использовать валидированную ВЭЖХ-методику для количественного определения 5-ФУ в плазме крови и органах лабораторных животных. Условия хроматографирования: колонка Hawach® XChromat M HPLC Column C18-Low PH ($5 \mu m$, $120 \text{ \AA}$, $25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$), подвижная фаза – 100%-й раствор трихлоруксусной кислоты (рН 3,1), скорость потока 1 мл/мин, детектирование при 265 нм, температура 40 °С. Методика применима в диапазоне концентраций 0,0030–0,0500 мкг/мл ($R^2 > 0,999$) и соответствует критериям ICH M10 по селективности, линейности, правильности и прецизионности.

4. В области разработки лекарственных форм 5-ФУ рекомендовано учитывать pH-зависимый профиль высвобождения препарата из полимерного комплекса на основе ПМАК. Высвобождение в кислой среде (pH 5,1) на 15,92 % выше, чем в слабощелочной (pH 7,4), что создает предпосылки для селективного высвобождения 5-ФУ в кислом микроокружении опухолевой ткани и внутриклеточных лизосомах. Рекомендовано использовать фосфатный буферный раствор (pH 7,4) для моделирования системного кровотока и цитратный буферный раствор (pH 5,1) для моделирования опухолевого микроокружения при исследовании кинетики высвобождения методом диализа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-ФУ	– 5-фторурацил
ВППС	– взаимопроникающие полимерные сети
ВС	– внутренний стандарт
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГПХ	– гель-проникающая хроматография
ГФ	– Государственная фармакопея
ГХ	– газовая хроматография
ДК	– дендритные клетки
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЭ	– диэтиловый эфир
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ЖФС	– жидкофазный синтез
ИК	– инфракрасная спектроскопия
ИФА	– иммуноферментный анализ
ЛП	– лекарственный препарат
ЛС	– лекарственное средство/средства
МАК	– метакриловая кислота
НПКО	– нижний предел количественного определения
ОКК	– образец для контроля качества
ОМ	– остаточный мономер
ОР	– остаточные органические растворители
ПАК	– полиакриловая кислота
ПВД	– пламенно-ионизационный детектор
ПКО	– предел количественного определения
ПМАК	– полиметакриловая кислота
ПО	– предел обнаружения
РМК-1	– карцинома молочной железы крысы
РНК	– рибонуклеиновая кислота

РС-1	– холангиоцеллюлярная карцинома крысы
СПЭ	– синтетические полиэлектролиты
ТГФ	– тетрагидрофуран
ТРО	– торможение роста опухоли
УФ	– ультрафиолетовая спектроскопия
ФБ	– фосфатный буферный раствор
ЦБ	– цитратный буферный раствор
ЭС	– этиловый спирт (этанол)
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
AUC	– Area Under the Curve (площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время»)
CL	– клиренс
$C_{\max}$	– максимальная концентрация
Đ	– индекс полидисперсности
ЕМА	– European Medicines Agency (Европейское агентство лекарственных средств)
EPR	– Enhanced Permeability and Retention (эффект повышенной проницаемости и удерживания)
F	– критерий Фишера
f	– число степеней свободы
FDA	– Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США)
ICH	– International Council for Harmonisation (Международный совет по гармонизации)
IFN- γ	– интерферон-гамма
IL	– интерлейкин (IL-6, IL-10, IL-17 и др.)
$k_{\text{эл}}$	– константа элиминации
LD ₅₀	– средняя летальная доза
Me	– медиана
МНС	– Main Histocompatibility Complex (главный комплекс гистосовместимости)

n	– объём выборки
NK-клетки	– естественные киллеры (Natural killer cells)
OECD	– Organisation for Economic Co-operation and Development (Организация экономического сотрудничества и развития)
P	– доверительная вероятность
p	– достигнутый уровень значимости
PCL	– поли-ε-капролактон
PEG	– полиэтиленгликоль
PLGA	– поли(D,L-лактид-ко-гликолид)
$Q_{\min}$	– критерий для проверки грубых ошибок (для минимального значения выборки)
$Q_{\max}$	– критерий для проверки грубых ошибок (для максимального значения выборки)
$Q_1; Q_3$	– первый и третий квартили
r	– коэффициент корреляции
R^2	– коэффициент детерминации
RSD	– относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации)
S	– стандартное отклонение
S^2	– дисперсия
t	– критерий Стьюдента
$T_{1/2}$	– период полувыведения
TE	– общая ошибка
$T_{\max}$	– время достижения максимальной концентрации
U	– критерий Манна – Уитни
V_d	– объём распределения
VEGF	– Vascular Endothelial Growth Factor (фактор роста эндотелия сосудов)
ΔX	– полуширина доверительного интервала для отдельного результата
$\Delta \bar{X}$	– полуширина доверительного интервала для среднего значения
ε	– относительная ошибка среднего результата

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аладышева, Ж. И. Доклиническое изучение лекарственных средств (промышленная фармация) : учебник для студентов высших учебных заведений / Ж. И. Аладышева, В. В. Береговых, Н. Н. Вольхин [и др.] ; под ред. А. Л. Хохлова, Н. В. Пятигорской ; Российская академия наук. – Москва : Группа Ремедиум, 2021. – 395 с. : ил. – ISBN 978-5-906499-72-1. – Текст : непосредственный.
2. Барышев, А. Н. Сравнительная характеристика доброкачественных и злокачественных новообразований в коже / А. Н. Барышев, А. Л. Киноян, И. В. Рева. – Текст : электронный // Материалы XI Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум». – 2019. – URL: <https://scienceforum.ru/2019/article/2018015740> (дата обращения: 05.07.2025).
3. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц ; пер. с англ. Ю. А. Данилова. – Москва : Практика, 1998. – 459 с. – Текст : непосредственный.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. – Москва, 2023. – Текст : электронный. – URL: <https://pharmascopoeia.regmed.ru/pharmascopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 05.03.2025).
5. Гривцова, Л. Ю. Возможности иммунокорригирующего лечения в профилактике гематологических и инфекционных осложнений химиотерапии у онкологических больных / Л. Ю. Гривцова, В. Б. Ларионова, Н. А. Фалалеева. – Текст : непосредственный // Онкогематология. – 2021. – Т. 16, № 4. – С. 23–30. – DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-4-23-30.
6. Дмитриева, М. В. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов / М. В. Дмитриева, Н. А. Оборотова, Е. В. Санарова [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – № 4. – С. 11–17.
7. Жукова, О. В. Высокомолекулярное соединение, стимулирующее выработку собственного интерферона – γ : пат. 2801097 Рос. Федерация : МПК C08G 61/12, A61P 37/02 / О. В. Жукова [и др.] ; заявитель и патентообладатель

ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. – № 2022128050 ; заявл. 28.10.2022 ; опубли. 01.08.2023. – Текст : непосредственный.

8. Кабанов, В. А. От синтетических полиэлектролитов к полимер-субъединичным вакцинам / В. А. Кабанов. – Текст : непосредственный.// Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2004. – Т. 46, № 5. – С. 759–782.

9. Кабанов, В. А. Успехи использования полимеров в иммунологии / В. А. Кабанов, Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – Москва : Знание, 1986. – 45 с. – (Новое в жизни, науке, технике. Химия). – Текст : непосредственный.

10. Комарова, Л. Е. Влияние иммуномодулятора полиоксидоний на качество жизни больных раком молочной железы, получающих адъювантную химиотерапию / Л. Е. Комарова, Л. В. Манзюк, Е. В. Артамонова [и др.]. – Текст : электронный // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – № 3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-immunomodulyatora-polioksidoniy-na-kachestvo-zhizni-bolnyh-rakom-molochnoy-zhelezy-poluchayuschih-adyuvantnuyu> (дата обращения: 01.12.2025).

11. Куклина, Е. М. IL-17-продуцирующие регуляторные т-лимфоциты – супрессоры или эффекторы? / Е. М. Куклина, Н. С. Глебездина. – Текст : электронный // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2023. – Т. 165, № 3. – С. 5–24. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/il-17-produtsiruyuschie-regulyatornye-t-limfotsity-supressory-ili-effektory> (дата обращения: 07.07.2025).

12. Кушлинский, Н. Е. Молекулярно-биологические характеристики злокачественных новообразований / Н. Е. Кушлинский, М. В. Немцова. – Текст : электронный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – № 1-2. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/molekulyarno-biologicheskie-harakteristiki-zlokachestvennyh-novoobrazovaniy> (дата обращения: 05.07.2025).

13. Лагунин, А. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction / А. Лагунин, А. Захаров, Д. Филимонов, В. Поройков [и др.]. – Текст : электронный // Molecular Informatics. – 2011. – Т. 30, № 2-3. – С. 241–250. – DOI: 10.1002/minf.201000151.

14. Малюгина, Л. Л. Перевиваемый альвеолярный слизистый рак печени крысы – РС-1 / Л. Л. Малюгина. – Текст : непосредственный // Вопросы онкологии. – 1958. – Т. 4, № 5. – С. 600–604.

15. Марусова, Т. А. Метаболизм глюкозы раковых клеток как мишень в противоопухолевой терапии / Т. А. Марусова, М. В. Иготти. – Текст : непосредственный // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 11. – С. 773–781.

16. Мелехин, В. В. Патофизиология клетки злокачественного новообразования : учебное пособие / В. В. Мелехин, О. Г. Макеев ; Министерство науки и высшего образования РФ, Уральский федеральный университет. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2023. – 88 с. : ил. – ISBN 978-5-7996-3645-6. – Текст : непосредственный.

17. Минеро, А. С. Вспомогательные вещества в составе биологических лекарственных препаратов: функциональная классификация, проблемы стабильности, аналитические подходы к определению / А. С. Минеро, О. Б. Рунова, И. М. Щербаченко, О. Б. Устинникова. – Текст : непосредственный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2025. – Т. 25, № 3. – С. 307–320. – DOI: 10.30895/2221-996X-2025-25-3-307-320.

18. Мустафин Р. И. Межмакромолекулярные взаимодействия с участием сополимеров Eudragit® как новый принцип создания микропартикулярных пероральных систем доставки лекарств / Р. И. Мустафин. – Текст : электронный // Казанский медицинский журнал. – 2016. – Т. 97, № 1. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mezhmakromolekulyarnye-vzaimodeystviya-s-uchastiem-sopolimerov-eudragit-kak-novyy-printsip-sozdaniya-mikropartikulyarnyh-peroralnyh> (дата обращения: 11.12.2025).

19. Олтаржевская, Н. Д. Методы доставки лекарств при лечении онкологических заболеваний / Н. Д. Олтаржевская, Г. Е. Кричевский, М. А. Коровина [и др.]. – Текст : непосредственный // Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2019. – Т. 2, № 1. – Ст. e00089. – DOI: 10.18097/bmcrm00089.

20. Петров, Р. В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 608 с. – ISBN 978-5-9704-1948-5. – Текст : непосредственный.

21. Петров, Р. В. Искусственные антигены и вакцины / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – Москва : Медицина, 1988. – 287 с. : ил. – (Фундаментальные науки – медицине). – ISBN 5-225-00120-3. – Текст : непосредственный.

22. Петров, Р. В. Полиоксидоний: механизм действия и клиническое применение / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, А. В. Некрасов [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 272–278.

23. Пинегин, Б. В. Полиоксидоний: механизм действия и клиническое применение / Б. В. Пинегин, А. В. Некрасов, Р. М. Хаитов. – Текст : непосредственный // Фарматека. – 2004. – № 7. – С. 16–21.

24. Платэ, Н. А. Физиологически активные полимеры / Н. А. Платэ, А. Е. Васильев. – Москва : Химия, 1986. – 320 с. – Текст : непосредственный.

25. Плотников, М. Б. Особенности гемореологического статуса у крыс с наследственным гипоталамическим несахарным диабетом (линия Brattleboro) / М. Б. Плотников, А. С. Васильев, О. И. Алиев. – Текст : непосредственный // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 57–62.

26. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 19 февраля 2021 г. № 116н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи взрослому населению при онкологических заболеваниях» (с изменениями и дополнениями). – Текст : электронный // Официальный интернет-портал правовой информации. – URL: <http://publication.pravo.gov.ru/> (дата обращения: 22.02.2026).

27. Пышкина, О. А. Полиэлектролиты: свойства и применение : методическое пособие для студентов и аспирантов химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова / О. А. Пышкина, О. А. Новоскольцева, А. А. Ярославов. – Москва, 2024. – 139 с. – Текст : непосредственный.

28. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» (в ред.

от 12.04.2024). – Текст : электронный // Официальный сайт Евразийского экономического союза. – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/306/2592/> (дата обращения: 22.01.2026).

29. Ротин, Д. Л. Холангиоцеллюлярная карцинома сегодня. Литературный аналитический обзор / Д. Л. Ротин. – Текст : электронный // Злокачественные опухоли. – 2015. – № 3. – С. 10–26. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/holangiotsellyulyarnaya-kartsinoma-segodnya-literaturnyy-analiticheskiy-obzor/viewer> (дата обращения: 28.07.2025).

30. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с. – Текст : непосредственный.

31. Сакаева, И. В. Определение требований, предъявляемых к ряду стерильных лекарственных форм / И. В. Сакаева, К. А. Биченова, Р. А. Лавренчук, Е. И. Саканян – Текст : электронный // Актуальные проблемы медицины. – 2012. – № 10 (129). – С. 105–110. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-trebovaniy-predyavlyaemyh-k-ryadu-sterilnyh-lekarstvennyh-form/viewer> (дата обращения: 05.03.2025).

32. Состояние онкологической помощи населению России в 2024 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. – 275 с. – Текст : непосредственный.

33. Тикунова, И. В. Справочник молодого лаборанта-химика / И. В. Тикунова, А. И. Артеменко, В. А. Малеванный. – Москва : Высшая школа, 1985. – 247 с. : ил. – Текст : непосредственный.

34. Филиппенко, А. В. Основные группы адъювантов и перспективы их использования для специфической профилактики особо опасных и других инфекционных болезней / А. В. Филиппенко, А. А. Труфанова, И. А. Иванова, Н. Д. Омельченко [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2023. – Т. 100, № 3. – С. 237–246. – DOI: 10.36233/0372-9311-339.

35. Фторурацил-Лэнс : ЛП-№(009716). – Текст : электронный // Государственный реестр лекарственных средств. – 2023. – URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=135822fd-4ff1-45ff-b399-685be1926655 (дата обращения: 18.09.2025).

36. Хаитов, Р. М. Разработка вакцин нового поколения на основе структурного объединения антигенов и синтетических полимерных иммуномодуляторов / Р. М. Хаитов. – Текст : электронный // Вопросы медицинской химии. – 1997. – Т. 43, № 5. – С. 390–401.

37. Ширманова, М. В. Способ регистрации внутриклеточного pH опухолевых клеток : пат. 2565377 Рос. Федерация : МПК А61В 5/05 / М. В. Ширманова, И. Н. Дружкова, М. М. Лукина [и др.]; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России. – № 2014142436/14 ; заявл. 21.10.2014 ; опубл. 20.10.2015. – Текст : непосредственный.

38. Юдина, А. Ю. Магнитно-резонансная томография в изучении ангиогенеза и его молекулярных маркеров / А. Ю. Юдина, А. А. Богданов мл., Ю. А. Пирогов; под ред. Ю. А. Пирогова. – Москва : Физический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, 2008. – 144 с. – ISBN 978-5-8279-0079-5. – Текст : непосредственный.

39. Якубджонов, Д. Interpolymer complexes – carriers nanoparticles in medicinal preparations / Д. Якубджонов, С. Я. Инагамов. – Текст : электронный // Материалы XI Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум». – 2019. – URL: <https://scienceforum.ru/2019/article/2018013093> (дата обращения: 05.07.2025).

40. Abbas, Z. An Overview of Cancer Treatment Modalities / Z. Abbas, S. Rehman. – Text : unmediated // Neoplasms. – 2018. – DOI: 10.5772/intechopen.76558.

41. Adikwu, E. 5-Fluorouracil-Induced Hepatic Perturbation: Protective Potential of Selenium / E. Adikwu, N. C. Ebinyo, A. F. Odira. – Text : unmediated // Journal of Integrated Health Sciences. – 2020. – Vol. 8, No. 1. – P. 3–8.

42. Adu, E. Polymeric Nanoparticles (PNPs) as drug delivery systems for SARS-CoV-2 / E. Adu, S. A. Patel, A. J. Catino [et al.]. – Text : unmediated // Characterization

and Application of Nanomaterials. – 2024. – Vol. 7, № 1. – Art. 4959. – DOI: 10.24294/can.v7i1.4959.

43. Ajith, S. Nanoparticle-based materials in anticancer drug delivery: Current and future prospects / S. Ajith, F. Almomani, A. Elhissi, G. A. Hussein. – Text : unmediated // Heliyon. – 2023. – Vol. 9, № 11. – Art. e21227. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e21227.

44. Alex, J. Recent developments in synthetic approaches for macromolecular prodrugs / J. Alex, Ch. Weber, C. Guerrero-Sanchez, U. S. Schubert. – Text : unmediated // Progress in Polymer Science. – 2024. – Vol. 155. – Art. 101855. – DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2024.101855.

45. Alexia, C. Polyoxidonium® Activates Cytotoxic Lymphocyte Responses Through Dendritic Cell Maturation: Clinical Effects in Breast Cancer / C. Alexia, M. Cren, P. Louis-Plence [et al.]. – Text : unmediated // Front Immunol. – 2019. – Vol. 10. – Art. 2693. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.02693.

46. Ambreen, A. 5-Fluorouracil-Induced Acute Toxic Leukoencephalopathy: A Rare Adverse Effect and Its Early Detection on MRI / A. Ambreen, M. A. Naveed, K. Javed [et al.]. – Text : unmediated // Cureus. – 2025. – Vol. 17, No. 11. – Article e98058. – DOI 10.7759/cureus.98058.

47. Amila, J. H. M. Systems for the delivery of chemotherapeutic drugs, new approaches and perspective / J. H. M. Amila. – Text : electronic // Romanian Medical Journal. – 2017. – № 3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/systems-for-the-delivery-of-chemotherapeutic-drugs-new-approaches-and-perspective> (accessed: 05.07.2025).

48. Amraotkar, A. R. Rapid Extracorporeal Membrane Oxygenation Overcomes Fulminant Myocarditis Induced by 5 Fluorouracil / A. R. Amraotkar, A. Pachika, K. J. Grubb, A. P. DeFilippis. – Text : unmediated // Texas Heart Institute Journal. – 2016. – Vol. 43, No. 2. – P. 178–182. – DOI: 10.14503/THIJ-14-4978.

49. Ara, T. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression / T. Ara, Y. A. Declerck. – Text : unmediated // European Journal of Cancer. – 2010. – Vol. 46, № 7. – P. 1223–1231.

50. Arafah, A. Myricetin (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavone) Prevents 5-Fluorouracil-Induced Cardiotoxicity / A. Arafah, M. U. Rehman, A. Ahmad [et al.]. – Text : unmediated // ACS Omega. – 2022. – Vol. 7, № 5. – P. 4514–4524.

51. Areepium, N. The Impact of Omitting 5-FU Bolus From mFOLFOX6 Chemotherapy Regimen on Hematological Adverse Events Among Patients With Metastatic Colorectal Cancer / N. Areepium, B. Sapapsap. – Text : unmediated // World Journal of Oncology. – 2023. – Vol. 14, No. 5. – P. 392–400. – DOI: 10.14740/wjon1690.

52. Asad, U. Allergic contact dermatitis of adjacent normal skin from 5-fluorouracil for the treatment of flat facial warts / U. Asad, J. Nguyen, A. Sturgeon. – Text : unmediated // Proceedings (Baylor University. Medical Center). – 2019. – Vol. 33, No. 1. – P. 117–118. – DOI: 10.1080/08998280.2019.1678337.

53. Aswathy, R. Devan. Hyaluronic acid-based drug delivery systems for targeted cancer therapy / R. Devan Aswathy, Sunil Kumar Sah, Bhagyalakshmi Nair [et al.]. – Text : unmediated // Natural Biopolymers in Drug Delivery and Tissue Engineering. – Woodhead Publishing, 2023. – P. 257–300. – ISBN 9780323988278. – DOI: 10.1016/B978-0-323-98827-8.00017-5.

54. Avramović, N. Polymeric Nanocarriers of Drug Delivery Systems in Cancer Therapy / N. Avramović, B. Mandić, A. Savic-Radojevic [et al.]. – Text : unmediated // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – Art. 298. – DOI: 10.3390/pharmaceutics12040298.

55. Awais, H. 5-Fluorouracil-Associated Cardiovascular events: An Overview / H. Awais. – Text : unmediated // International Journal of Clinical Case Reports and Reviews. – 2025. – Vol. 29, No. 2. – DOI: 10.31579/2690-4861/909.

56. Axler, E. N. Nail toxicity associated with anticancer agents / E. N. Axler, M. Iorizzo, B. Mclellan, Sh. R. Lipner. – Text : unmediated // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2025. – Vol. 92, No. 6. – P. 1327–1336. – DOI: 10.1016/j.jaad.2025.01.069.

57. Baas, J. Das retikuloendotheliale System. Eine Übersicht über Funktion, Pathologie und neuere Messmethoden [The reticuloendothelial system. An overview of function, pathology and recent methods of measurement] / J. Baas, N. Senninger,

H. Elser. – Text : unmediated // Zeitschrift für Gastroenterologie. – 1994. – Vol. 32, № 2. – P. 117–123.

58. Barbosa, S. J. A. Protective Effects of Spondias mombin L. Juice Alone or in Combination With Lactobacillus acidophilus in 5-Fluorouracil-Induced Experimental Intestinal Mucositis / S. J. A. Barbosa, M. Oliveira, S. Ribeiro [et al.]. – Text : unmediated // Neurogastroenterology & Motility. – 2024. – [Epub ahead of print]. – Article e14970. – DOI: 10.1111/nmo.14970.

59. Basilio, A. J. Impact of Empirically Eliminating 5-Fluorouracil Bolus and Leucovorin in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Receiving First-Line Treatment with mFOLFOX6 / A. J. Basilio, A. B. Shah, K. R. Sommerer [et al.]. – Text : unmediated // British Journal of Cancer Research. – 2021. – Vol. 4, No. 1. – P. 1–6.

60. Batrakova, E. V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers / E. V. Batrakova, A. V. Kabanov. – Text : unmediated // Journal of Controlled Release. – 2008. – Vol. 130, № 2. – P. 98–106.

61. Baylie, T. The role of telomere and telomerase in cancer and novel therapeutic target: narrative review / T. Baylie, M. Jemal, G. Baye [et al.]. – Text : unmediated // Frontiers in Oncology. – 2025. – Vol. 15. – Article 1542930. – DOI: 10.3389/fonc.2025.1542930.

62. Benzebda, H. Overall breast cancer survival and prognostic factors / H. Benzebda, S. Ghomari-Bezzar. – Text : unmediated // Journal of Clinical Oncology. – 2023. – Vol. 41, № 16_suppl. – P. e12525.

63. Beretta, G. L. Unravelling «off-target» effects of redox-active polymers and polymer multilayered capsules in prostate cancer cells / G. L. Beretta, M. Folini, F. Cavalieri [et al.]. – Text : unmediated // Nanoscale. – 2015. – Vol. 7, № 14. – P. 6261–6270. – DOI: 10.1039/c4nr07240e.

64. Bertrand, N. Pharmacokinetics and biodistribution of N-isopropylacrylamide copolymers for the design of pH-sensitive liposomes / N. Bertrand. – Text : unmediated // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30, № 13. – P. 2598–2605. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.082.

65. Bhardwaj, H. Recent Advances in Water-Soluble Polymer and Polymeric Nanoparticles for Pharmaceutical Application / H. Bhardwaj, S. Khute, R. Kumar Sahu, R. Jangde. – Text : unmediated // Current Nanoscience. – 2025. – Vol. 21, № 4. – DOI: 10.2174/0115734137294889240314032718.

66. Bhat, P. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity / P. Bhat, G. Leggatt, N. Waterhouse, I. H. Frazer [et al.]. – Text : unmediated // Cell Death & Disease. – 2017. – Vol. 8, № 5. – Art. e2836.

67. Biswas, R. Pharmaceutical Polymers in Drug Delivery: An Overview / R. Biswas, P. Kapat, A. Ghosh [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2025. – Vol. 17, № 7. – P. 1–8. – DOI: 10.22159/ijpps.2025v17i7.54498.

68. Bouhamdani, N. A Compendium of Information on the Lysosome / N. Bouhamdani, D. Comeau, S. Turcotte. – Text : unmediated // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – Vol. 9. – Art. 798262.

69. Boulland, M. L. Human interleukin-10 expression in T/natural killer-cell lymphomas: association with anaplastic large cell lymphomas and nasal natural killer-cell lymphomas / M. L. Boulland, V. Meignin, K. Leroy-Viard [et al.]. – Text : unmediated // The American Journal of Pathology. – 1998. – Vol. 153, № 4. – P. 1229–1237.

70. Boyano, M. D. Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma / M. D. Boyano, M. D. Garcia-Vázquez, T. López-Michelena [et al.]. – Text : unmediated // British Journal of Cancer. – 2000. – Vol. 83, № 7. – P. 847–852.

71. Brown, J. S. Updating the Definition of Cancer / J. S. Brown, S.R. Amend, R.H. Austin [et al.]. – Text : unmediated // Molecular Cancer Research. – 2023. – Vol. 21, № 11. – P. 1142–1147.

72. Bukhovets A. V., Interpolymer Complexes of Eudragit® Copolymers as Novel Carriers for Colon-Specific Drug Delivery / A. V. Bukhovets, V. V. Khutoryanskiy, R. I. Moustafine, N. Fotaki. – Text : unmediated // Polymers. – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 1459. – DOI: 10.3390/polym12071459.

73. Cabral, H. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size / H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno [et al.]. – Text : unmediated // *Nature Nanotechnology*. – 2011. – Vol. 6, № 12. – P. 815–823.

74. Casale, J. Fluorouracil / J. Casale, P. Patel. – Text : electronic // *StatPearls*. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025 Jan. – [Updated 2024 Feb 16]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549808/> (accessed: 25.01.2026).

75. Castro, F. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion / F. Castro, A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves [et al.]. – Text : unmediated // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – Art. 847.

76. Chen, J. G. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients / J. G. Chen, J-c. Xia, X-t. Liang [et al.]. – Text : unmediated // *International Journal of Biological Sciences*. – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 53–60.

77. Chen, J. K. An RNA damage response network mediates the lethality of 5-FU in colorectal cancer / J. K. Chen, K.A. Merrick, YI.W. Kong [et al.]. – Text : unmediated // *Cell Reports Medicine*. – 2024. – Vol. 5, No. 10. – Article 101778. – DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101778.

78. Chen, J. Recent advances in understanding the immune microenvironment in ovarian cancer / J. Chen, L.U. Yang, Y. Ma, Y.E. Zhang. – Text : unmediated // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – Art. 1412328. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1412328.

79. Chen, Q. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma / Q. Chen, V. Daniel, D. W. Maher, P. Hersey. – Text : unmediated // *International Journal of Cancer*. – 1994. – Vol. 56, № 5. – P. 755–760.

80. Cheng, X. Advances in nanomaterial-based targeted drug delivery systems / X. Cheng, Q. Xie, Y. Sun. – Text : unmediated // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2023. – Vol. 11. – Art. 1177151. – DOI: 10.3389/fbioe.2023.1177151.

81. Cheralayikkal, S. Formulation and evaluation of a smart drug delivery system of 5-fluorouracil for pH-sensitive chemotherapy / S. Cheralayikkal, K. Manoj, K. P. Safna Hussan. – Text : unmediated // *Heliyon*. – 2022. – Vol. 8, № 7. – Art. e09926. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09926.

82. Chhatwal, J. The impact of multicancer early detection tests on cancer stage shift: A 10-year microsimulation model / J. Chhatwal, J. A. Xiao, A. K. Elhabr [et al.]. – Text : unmediated // Cancer. – 2025. – Vol. 131, No. 22. – Article e70075. – DOI: 10.1002/cncr.70075.

83. Chilkoti, A. Tumor Vascular Permeability, Accumulation, and Penetration of Macromolecular Drug Carriers / A. Chilkoti. – Text : unmediated // JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 2006. – Vol. 98, № 5. – P. 335–344.

84. Chis, A. A. Antibody-Drug Conjugates–Evolution and Perspectives / A. A. Chis, C.M. Dobrea, A.M. Arseniu [et al.]. – Text : unmediated // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – Vol. 25. – Art. 6969. – DOI: 10.3390/ijms25136969.

85. Chonov, D. C. IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1 / D. C. Chonov, M. M. Krasimirova-Ignatova, J. Ananie [et al.]. – Text : unmediated // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. – 2019. – Vol. 7, № 14. – P. 2391–2398.

86. Chung, A. S. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy / A. S. Chung, X. Wu, G. Zhuang [et al.]. – Text : unmediated // Nature Medicine. – 2013. – Vol. 19, № 9. – P. 1114–1123.

87. Coffelt, S. B. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis / S. B. Coffelt, K. Kersten, C. W. Doornebal [et al.]. – Text : unmediated // Nature. – 2015. – Vol. 522, № 7556. – P. 345–348.

88. Crosby, D. Early detection of cancer / D. Crosby, S. Bhatia, K. M. Brindle [et al.]. – Text : unmediated // Science. – 2022. – Vol. 375, No. 6586. – Article eaay9040. – DOI: 10.1126/science.aay9040.

89. De Clercq, E. Effect of interferon, polyacrylic acid, and polymethacrylic acid on tail lesions on mice infected with vaccinia virus / E. De Clercq, P. De Somer. – Text : unmediated // Applied Microbiology. – 1968. – Vol. 16, № 9. – P. 1314–1319.

90. De Clercq, E. Sixty Years at the Rega Institute / E. De Clercq. – Text : unmediated // Viruses. – 2025. – Vol. 17, № 2. – Art. 222. – DOI: 10.3390/v17020222.

91. De Somer, P. Antiviral activity of polyacrylic and polymethacrylic acids. I. Mode of action in vitro / P. De Somer, E. De Clercq, A. Billiau [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Virology. – 1968. – Vol. 2, № 9. – P. 878–885.

92. De Somer, P. Antiviral activity of polyacrylic and polymethacrylic acids. II. Mode of action in vivo / P. De Somer, E. De Clercq, A. Billiau [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Virology. – 1968. – Vol. 2, № 9. – P. 886–893.

93. Ding, L. Polymer-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapeutics / L. Ding, P. Agrawal, S. K. Singh [et al.]. – Text : unmediated // Polymers. – 2024. – Vol. 16. – P. 843. – DOI: 10.3390/polym16060843.

94. Dlott, A. H. Calcipotriol and 5-Fluorouracil Combination Therapy for the Treatment of Actinic Keratosis in the Clinic: A Review Article / A. H. Dlott, S. A. Spencer, A.J. Di Pasqua. – Text : unmediated // Clinical Drug Investigation. – 2024. – Vol. 44, No. 10. – P. 733–737. – DOI: 10.1007/s40261-024-01392-w.

95. Du, B. Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys / B. Du, M. Yu, J. Zheng. – Text : unmediated // Nature Reviews Materials. – 2018. – Vol. 3. – P. 358–374.

96. Duncan, R. Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer / R. Duncan, M. J. Vicent, F. Greco, R. I. Nicholson. – Text : unmediated // Endocrine-Related Cancer. – 2005. – Vol. 12, suppl. 1. – P. S189–S199.

97. Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics / R. Duncan. – Text : unmediated // Nature Reviews Drug Discovery. – 2003. – Vol. 2, № 5. – P. 347–360.

98. Duschinsky, R. The synthesis of 5-fluoropyrimidines / R. Duschinsky, E. Plevin, C. Heidelberger. – Text : unmediated // Journal of the American Chemical Society. – 1957. – Vol. 79, № 16. – P. 4559–4560.

99. Dutta, G. Biogenic synthesized CuO nanoparticles and 5-fluorouracil loaded anticancer gel for HeLa cervical cancer cells / G. Dutta, S. K. Chinnaiyan, T. Palaniyandi [et al.]. – Text : unmediated // Discov Nano. – 2024. – Vol. 19, № 1. – Art. 217. – DOI: 10.1186/s11671-024-04166-7.

100. Dutta, G. pH-responsive nanocapsules loaded with 5-fluorouracil-coated green-synthesized CuO-ZnO NPs for enhanced anticancer activity against HeLa cells / G. Dutta, A. Sugumaran, D. Narayanasamy. – Text : unmediated // Med Oncol. – 2025. – Vol. 42, № 8. – Art. 300. – DOI: 10.1007/s12032-025-02847-6.

101. El Sayed, N. F. Exploring novel protective role of semaglutide in 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity: Insights into phosphorylated CREB, PINK1/Parkin-mediated mitophagy, and NF- κ B/NLRP3 pathways / N. F. El Sayed, S. A. Baraka, B. M. El-Mokadem [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2025. – Vol. 392, No. 8. – P. 103629. – DOI: 10.1016/j.jpet.2025.103629.

102. Eltaib, L. Polymeric Nanoparticles in Targeted Drug Delivery: Unveiling the Impact of Polymer Characterization and Fabrication / L. Eltaib. – Text : unmediated // Polymers. – 2025. – Vol. 17. – P. 833. – DOI: 10.3390/polym17070833.

103. Elvira, C. Covalent polymer-drug conjugates / C. Elvira, A. Gallardo, J. Roman, A. Cifuentes. – Text : unmediated // Molecules. – 2005. – Vol. 10, № 1. – P. 114–125.

104. Ezike, T. C. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions / T. C. Ezike, U. S. Okpala, U. L. Onoja [et al.]. – Text : unmediated // Heliyon. – 2023. – Vol. 9, № 6. – Art. e17488. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e17488.

105. Fabin, N. The Role of Vasospasm and Microcirculatory Dysfunction in Fluoropyrimidine-Induced Ischemic Heart Disease / N. Fabin, M. Bergami, E. Cenko [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Medicine. – 2022. – Vol. 11, No. 5. – Article 1244. – DOI: 10.3390/jcm11051244.

106. Fay, J. M. Interpolyelectrolyte Complexes as an Emerging Technology for Pharmaceutical Delivery of Polypeptides / J. M. Fay, A. V. Kabanov. – Text : unmediated // Rev. and Adv. in Chem. – 2022. – Vol. 12, № 3. – P. 137–162. – DOI: 10.1134/S2634827622600177.

107. Feng, C. Unveiling polymerization degree dependent pharmacokinetics and dual metabolic pathways of polypropylene glycol oligomers in rats via UPLC-MS/MS / C. Feng, Yu. Deng, Yu. Sheng [et al.]. – Text : unmediated // Microchemical Journal. – 2025. – Art. 115451. – DOI: 10.1016/j.microc.2025.115451.

108. Fiallo, P. Yellow nails as an adverse reaction to the topical use of 5-fluorouracil for the treatment of nail psoriasis / P. Fiallo. – Text : unmediated // Journal

of Dermatological Treatment. – 2009. – Vol. 20, No. 5. – P. 299–301. – DOI: 10.1080/09546630802614656.

109. Fora, A. A case of 5-fluorouracil-induced acute psychosis / A. Fora, E. Alabsi, M. Fakih. – Text : unmediated // Clinical Colorectal Cancer. – 2009. – Vol. 8, No. 3. – P. 166–168. – DOI: 10.3816/CCC.2009.n.028.

110. Fridman, W. H. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome / W. H. Fridman, F. Pagès, C. Sautès-Fridman [et al.]. – Text : unmediated // Nature Reviews Cancer. – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 298–306.

111. Gagliardi, A. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors / A. Gagliardi, E. Giuliano, M. Fresta [et al.]. – Text : unmediated // Front Pharmacol. – 2021. – Vol. 12. – Art. 601626. – DOI: 10.3389/fphar.2021.601626.

112. Gaikwad, D. Polymer-drug conjugates: Recent achievements / D. Gaikwad, S. Dhawale, J. Khandare [et al.]. – Text : unmediated // Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences. – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 200–208.

113. Gao, F. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: Molecular Mechanisms, Clinical Management and Innovative Treatment / F. Gao, T. Xu, F. Zang [et al.]. – Text : unmediated // Drug Design, Development and Therapy. – 2024. – Vol. 18. – P. 4089–4116. – DOI: 10.2147/DDDT.S469331.

114. Gao, Y. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity / Y. Gao, W. Yang, M. Pan [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Experimental Medicine. – 2003. – Vol. 198, № 3. – P. 433–442.

115. Garcia-Cardenas, M. Unmasking 5-fluorouracil cardiotoxicity: The clinical utility of dynamic myocardial CT perfusion: A case report / M. Garcia-Cardenas, G. H. Acosta-Gutiérrez, N. Rivera-Treviño [et al.]. – Text : unmediated // Radiology Case Reports. – 2026. – Vol. 21, No. 1. – P. 14–20. – DOI: 10.1016/j.radcr.2025.09.051.

116. Garg, S. 5-Fluorouracil and its derivatives: Synthesis, health effects and chemotherapy / S. Garg, N. Gupta, N. Shakya [et al.]. – Text : unmediated // Fluorouracil: Synthesis, Health Effects and Role in Chemotherapy. – 2012. – P. 39–64.

117. Gieszke-Moritz, M. Biodegradable Polymeric Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems: Comprehensive Overview, Perspectives and Challenges / M. Gieszke-

Moritz, M. Moritz. – Text : unmediated // Polymers (Basel). – 2024. – Vol. 16, № 17. – Art. 2536. – DOI: 10.3390/polym16172536.

118. Ghadrdoost Nakhchi, B. Towards Targeting Endothelial Rap1B to Overcome Vascular Immunosuppression in Cancer / B. Ghadrdoost Nakhchi, R. Kosuru, M. Chrzanowska. – Text : unmediated // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – Vol. 25, № 18. – Art. 9853. – DOI: 10.3390/ijms25189853.

119. Ghafouri-Fard, S. 5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent / S. Ghafouri-Fard, A. Abak, F. Tondro Anamag [et al.]. – Text : unmediated // Frontiers in Oncology. – 2021. – Vol. 11. – Art. 658636.

120. Ghalehkhondabi, V. Folic acid-conjugated pH-responsive poly(methacrylic acid) nanospheres for targeted delivery of anticancer drugs to breast cancer cells / V. Ghalehkhondabi, A. Fazlali, M. Soleymani. – Text : unmediated // Journal of Molecular Liquids. – 2021. – Vol. 337. – Art. 118028.

121. Ghalehkhondabi, V. Folic acid-conjugated pH-responsive poly(methacrylic acid) nanospheres for targeted delivery of anticancer drugs to breast cancer cells / V. Ghalehkhondabi, A. Fazlali, M. Soleymani. – Text : unmediated // Journal of Molecular Liquids. – 2022. – Vol. 348. – Art. 118028. – ISSN 0167-7322. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118028>.

122. Ghazali, F. DFT and Molecular Simulation Study of Gold Clusters as Effective Drug Delivery Systems for 5-Fluorouracil Anticancer Drug / F. Ghazali, S. Hosseini, S. Ketabi. – Text : unmediated // J Clust Sci. – 2023. – Vol. 34. – P. 1499–1509. – DOI: 10.1007/s10876-022-02329-z.

123. Gómez-Herranz, M. Interferon Gamma, MHC Class I Regulation and Immunotherapy / M. Gómez-Herranz, M. Pilch., T. Hupp, S. Kote. – Text : unmediated // Journal of Cell Signaling. – 2022. – Vol. 3, № 1. – P. 28–39.

124. Gonzalez-Garza, M. T. IL10 as Cancer Biomarker / M. T. Gonzalez-Garza, D. E. Cruz-Vega, C. Maldonado-Bernal. – Text : unmediated // Translational Research in Cancer. – IntechOpen, 2021. – DOI: 10.5772/intechopen.96635.

125. Gosecka, M. Construction of Dynamic Hydrogel Inducing Effective and Selective 5-Fluorouracil Monotherapy against Cervical Cancer Cells / M. Gosecka, D. Jaworska-Krych, M. Gosecki [et al.]. – Text : unmediated // ACS Appl Mater Interfaces. – 2025. – Vol. 17, № 9. – P. 13427–13444. – DOI: 10.1021/acsami.4c20276.

126. Groves, T. The Effects of 5-Fluorouracil/Leucovorin Chemotherapy on Cognitive Function in Male Mice / T. Groves, C. Corley, A. R. Allen, S. D. Byrum. – Text : unmediated // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2021. – Vol. 8. – Article 762116. – DOI: 10.3389/fmolb.2021.762116.

127. Guilloton, L. Ataxie et confusion après traitement par 5-fluorouracile / L. Guilloton, A. Michaud, V. Potier [et al.]. – Text : unmediated // La Revue de Médecine Interne. – 2005. – Vol. 26, No. 12. – P. 986–987.

128. Gutierrez, C. C. Synthetic, Natural, and Semisynthetic Polymer Carriers for Controlled Nitric Oxide Release in Dermal Applications: A Review / C. Gutierrez Cisneros, V. Bloemen, A. Mignon. – Text : unmediated // Polymers. – 2021. – Vol. 13. – P. 760. – DOI: 10.3390/polym13050760.

129. Ha, J. H. Onset of Manic Episode during Chemotherapy with 5-Fluorouracil / J. H. Ha, D.-Y. Hwang, J. Yu [et al.]. – Text : unmediated // Psychiatry Investigation. – 2011. – Vol. 8, No. 1. – P. 71–73. – DOI: 10.4306/pi.2011.8.1.71.

130. Hameed, H. A Comprehensive Review of Hydrogel-Based Drug Delivery Systems: Classification, Properties, Recent Trends, and Applications / H. Hameed, S. Faheem, A. C. Paiva-Santos [et al.]. – Text : unmediated // AAPS PharmSciTech. – 2024. – Vol. 25. – Art. 64. – DOI: 10.1208/s12249-024-02786-x.

131. Han, X. J. Preparation, release and antitumor properties of sodium alginate/layered double hydroxides-5- fluorouracil delivery system / X. J. Han, H. Yang, X.-yu Sun [et al.]. – Text : unmediated // Chinese Journal of Tissue Engineering Research. – 2018. – Vol. 22, № 26. – P. 4168–4173.

132. Han, Y. Regulation of 5-fluorouracil-induced intestinal damage by the interleukin-23/interleukin-22 axis in chemotherapy / Y. Han, J. Xu, Yu. Zhang [et al.]. – Text : unmediated // International Immunopharmacology. – 2025. – Vol. 147. – Article 114044. – DOI: 10.1016/j.intimp.2025.114044.

133. Hani, U. Enhanced colon-targeted drug delivery through development of 5-fluorouracil-loaded cross-linked mastic gum nanoparticles / U. Hani, N. Mahammed, T. Reshma [et al.]. – Text : unmediated // Scientific Reports. – 2025. – Vol. 15, No. 1. – Article 18355. – DOI: 10.1038/s41598-025-03533-3.

134. Hao, X. Organ distribution of 5-fluorouracil loaded gelatine microspheres in mice / X. Hao, G. Cheng, M. Zou [et al.]. – Text : unmediated // Pharmazie. – 2004. – Vol. 59, № 9. – P. 709–712.

135. Hariharan, M. S. 5-Fluorouracil-loaded β -cyclodextrin-carrying polymeric poly(methylmethacrylate)-coated samarium ferrite nanoparticles and their anti-cancer activity / M. S. Hariharan, R. Sivaraj, S. Ponsubha [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Materials Science. – 2018. – Vol. 53. – P. 4942–4951.

136. Hashemi, P. A multi-epitope protein vaccine encapsulated in alginate nanoparticles as a candidate vaccine against *Shigella sonnei* / P. Hashemi, M. Osanloo, A. Farjadfar [et al.]. – Text : unmediated // Sci Rep. – 2024. – Vol. 14, № 1. – Art. 22484. – DOI: 10.1038/s41598-024-73105-4.

137. Hegde, V. S. Leucovorin / V. S. Hegde, S. Nagalli. – Text : electronic // StatPearls. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025 Jan. – [Updated 2023 Jul 3]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553114/> (accessed: 25.01.2026).

138. Heidelberger, C. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds / C. Heidelberger, N. K. Chaudhuri, P. Danneberg [et al.]. – Text : unmediated // Nature. – 1957. – Vol. 179, № 4561. – P. 663–666.

139. Heppt, M. V. Association Between Local Skin Reactions and Efficacy with 5-Fluorouracil 4% Cream in Actinic Keratosis: A Post-Hoc Analysis of Two Randomised Clinical Trials / M. V. Heppt, K. Trin, A. C. Mille [et al.]. – Text : unmediated // Dermatology and Therapy. – 2025. – Vol. 15, No. 2. – P. 307–321. – DOI: 10.1007/s13555-024-01336-4.

140. Hong, M. Ex vivo and in vivo chemoprotective activity and potential mechanism of Martynoside against 5-fluorouracil-induced bone marrow cytotoxicity / M. Hong, D. Chen, Zh. Hong [et al.]. – Text : unmediated // Biomedicine &

Pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 138. – Article 111501. – DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111501.

141. Hosonuma, M. Association between pH regulation of the tumor microenvironment and immunological state / M. Hosonuma, K. Yoshimura. – Text : unmediated // *Frontiers in Oncology*. – 2023. – Vol. 13. – Art. 1175563.

142. Hoste, K. Polymeric prodrugs / K. Hoste, K. De Winne, E. Schacht. – Text : unmediated // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2004. – Vol. 277, № 1-2. – P. 119–131.

143. Hu, Q. Recent advances in dextran-based drug delivery systems: From fabrication strategies to applications / Q. Hu, Y. Lu, Y. Luo. – Text : unmediated // *Carbohydr Polym*. – 2021. – Vol. 264. – Art. 117999. – DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.117999.

144. Huang, D. Nanodrug Delivery Systems Modulate Tumor Vessels to Increase the Enhanced Permeability and Retention Effect / D. Huang, L. Sun, L. Huang, Y. Chen. – Text : unmediated // *Journal of Personalized Medicine*. – 2021. – Vol. 11, № 2. – Art. 124.

145. Huinen, Z. R. Anti-angiogenic agents – overcoming tumour endothelial cell anergy and improving immunotherapy outcomes / Z. R. Huinen, E. J. M. Huijbers, J. R. Van Beijnum [et al.]. – Text : unmediated // *Nat Rev Clin Oncol*. – 2021. – Vol. 18. – P. 527–540. – DOI: 10.1038/s41571-021-00496-y.

146. Hussain, F. Chemotherapy-related striate melanonychia: a case report / F. Hussain, D. Gnanappiragasam, F. Shaffrali. – Text : unmediated // *Journal of Medical Case Reports*. – 2021. – Vol. 15, No. 1. – Article 27. – DOI: 10.1186/s13256-020-02612-5.

147. Iacob, A. T. Recent Biomedical Approaches for Chitosan Based Materials as Drug Delivery Nanocarriers / A. T. Iacob, F. G. Lupascu, M. Apotrosoaei [et al.]. – Text : unmediated // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, № 4. – Art. 587. – DOI: 10.3390/pharmaceutics13040587.

148. Ilhan, Y. Efficacy and safety of omitting 5-fluorouracil bolus in combination chemotherapy regimens for gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis / Y. Ilhan, O. Ya. Balcık, E. Sahın [et al.]. – Text : unmediated // *Expert Opinion*

on Drug Safety. – 2026. – Vol. 25, No. 6. – P. 1047–1056. – DOI: 10.1080/14740338.2025.2527962.

149. Ilie, C. I. Antioxidant, Antitumoral, Antimicrobial, and Prebiotic Activity of Magnetite Nanoparticles Loaded with Bee Pollen/Bee Bread Extracts and 5-Fluorouracil / C. I. Ilie, A. Spoiala, C. Chircov [et al.]. – Text : unmediated // Antioxidants (Basel). – 2024. – Vol. 13, № 8. – Art. 895. – DOI: 10.3390/antiox13080895.

150. Imtiaz, S. Mechanistic study of cancer drug delivery: Current techniques, limitations, and future prospects / S. Imtiaz, U. T. Ferdous, A. Nizela [et al.]. – Text : unmediated // Eur J Med Chem. – 2025. – Vol. 290. – Art. 117535. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2025.117535.

151. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised guideline: bioanalytical method validation and study sample analysis. M10 / ICH. – Geneva, 2022. – URL: <https://www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines> (accessed: 22.01.2026). – Text : electronic.

152. Jain, A. Recent advances in nanomedicine preparative methods and their therapeutic potential for colorectal cancer: a critical review / A. Jain, S. Bhattacharya. – Text : unmediated // Front. Oncol. – 2023. – Vol. 13. – Art. 1211603. – DOI: 10.3389/fonc.2023.1211603.

153. Ji, G. 5-Fluorouracil induces ferroptosis in breast cancer cells via targeting SLC7A11 / G. Ji, W. Yuan, X. Wang [et al.]. – Text : unmediated // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2025. – Vol. 770. – Article 151972. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2025.151972.

154. Jorgovanovic, D. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review / D. Jorgovanovic, M. Song, L. Wang, Yi. Zhang. – Text : unmediated // Biomarker Research. – 2020. – Vol. 8. – Art. 49.

155. Junyaprasert, V. B. Innovative Design of Targeted Nanoparticles: Polymer–Drug Conjugates for Enhanced Cancer Therapy / V. B. Junyaprasert, P. Thummarati. –

Text : unmediated // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – P. 2216. – DOI: 10.3390/pharmaceutics15092216.

156. Kabanov, A. V. Biomedical applications of nano-sized polymeric micelles and polyion complexes / A. V. Kabanov. – Text : unmediated // *Журнал СФУ. Биология*. – 2018. – Т. 11, № 2. – С. 110–118. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/biomedical-applications-of-nano-sized-polymeric-micelles-and-polyion-complexes> (accessed: 06.07.2025).

157. Kabanov, A. V. Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier / A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, D. W. Miller. – Text : unmediated // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2003. – Vol. 55, № 1. – P. 151–164.

158. Kaplan, M. Immunoadjuvant, Antiviral, and Antitumor Activity of Synthetic Polyanions / M. Kaplan, R. M. Ottenbrite, W. Regelson [et al.] – Text : unmediated // *Handbook of Cancer and Immunology*. – Vol. 5. – New York : Garland Publishing Co., 1978. – P. 135.

159. Khan, M. The Incidence of Hematological Toxicities in Colorectal Cancer Patients Treated With Fluoropyrimidine-Based Regimens at Princess Noorah Oncology Center / M. Khan, S. Alharbi, Sh. Aljuhani [et al.]. – Text : unmediated // *Cureus*. – 2023. – Vol. 15, No. 8. – Article e44267. – DOI: 10.7759/cureus.44267.

160. Ki, M.-R. Cancer and Aging Biomarkers: Classification, Early Detection Technologies and Emerging Research Trends / M.-R. Ki, D. H. Kim, M. A. A. Abdelhamid, S. P. Pack. – Text : unmediated // *Biosensors*. – 2025. – Vol. 15, No. 11. – Article 737. – DOI: 10.3390/bios15110737.

161. Kim, J. Perspectives for Improving the Tumor Targeting of Nanomedicine via the EPR Effect in Clinical Tumors / J. Kim, H. Cho, D. K. Lim [et al.]. – Text : unmediated // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – Art. 10082. – DOI: 10.3390/ijms241210082.

162. Kniazeva, V. Adjuvant composite cold atmospheric plasma therapy increases antitumoral effect of doxorubicin hydrochloride / V. Kniazeva, D. Tzerkovsky,

Ö. Baysal [et al.]. – Text : unmediated // Front. Oncol. – 2023. – DOI: 10.3389/fonc.2023.1171042.

163. Kok, R. J. Drug delivery to the kidneys and the bladder with the low molecular weight protein lysozyme / R. J. Kok, M. Haas, F. Moolenaar [et al.]. – Text : unmediated // Renal Failure. – 1998. – Vol. 20, № 2. – P. 211–217.

164. Konoplev, V. P. Characteristics of the rat breast cancer to be transferred / V. P. Konoplev, N. D. Lagova. – Text : unmediated // Bull. Exp. Biol. Med. – 1960. – Vol. 50, № 7. – P. 79–81.

165. Kotenkova, E. Polysaccharide-Based Nanocarriers for Natural Antimicrobials: A Review / E. Kotenkova, A. Kotov, M. Nikitin. – Text : unmediated // Polymers. – 2025. – Vol. 17. – P. 1750. – DOI: 10.3390/polym17131750.

166. Kovaleva, O. V. M1 macrophages – unexpected contribution to tumor progression / O. V. Kovaleva, M. A. Rashidova, V. V. Sinyov [et al.]. – Text : unmediated // Frontiers in Immunology. – 2025. – Vol. 16. – Art. 1638102. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1638102.

167. Koya, A. I. Carcinogenesis / A. I. Koya, S. A. Ibrahim. – Text : electronic // StatPearls. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025 Jan. – [Updated 2024 Oct 2]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604463/> accessed: 25.01.2026).

168. Krasnopeeva, E. L. Poly(methacrylic Acid)-Cellulose Brushes as Anticancer Porphyrine Carrier / E. L. Krasnopeeva, E. Y. Melenevskaya, N. N. Smirnov [et al.]. – Text : unmediated // Nanomaterials. – 2021. – Vol. 11, № 8. – Art. 1997.

169. Kumari, N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance / N. Kumari, B. S. Dwarakanath, A. Das, A. N. Bhatt. – Text : unmediated // Tumour Biology. – 2016. – Vol. 37, № 9. – P. 11553–11572.

170. Kwiecien, I. Elevated regulatory T cells, surface and intracellular CTLA-4 expression and interleukin-17 in the lung cancer microenvironment in humans / I. Kwiecien, A. Stelmaszczyk-Emmel, M. Polubiec-Kownacka [et al.]. – Text : unmediated // Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2017. – Vol. 66, № 1. – P. 161–170.

171. Lai, J. Alginate-Based Encapsulation Fabrication Technique for Drug Delivery: An Updated Review of Particle Type, Formulation Technique, Pharmaceutical Ingredient, and Targeted Delivery System / J. Lai, A. K. Azad, W. M. A. W. Sulaiman [et al.]. – Text : unmediated // *Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 16, № 3. – Art. 370. – DOI: 10.3390/pharmaceutics16030370.

172. Lammers, T. Improving the efficacy of combined modality anticancer therapy using HPMA copolymer-based nanomedicine formulations / T. Lammers. – Text : unmediated // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – Vol. 62, № 2. – P. 203–230.

173. Larson, N. Polymeric conjugates for drug delivery / N. Larson, H. Ghandehari. – Text : unmediated // *Chemistry of Materials*. – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 840–853.

174. Laufman, L. R. Leucovorin plus 5-fluorouracil: an effective treatment for metastatic colon cancer / L. R. Laufman, K. A. Krzeczowski, R. Roach [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Oncology*. – 1987. – Vol. 5, No. 9. – P. 1394–1400. – DOI: 10.1200/JCO.1987.5.9.1394.

175. Leone, P. Endothelial cells in tumor microenvironment: insights and perspectives / P. Leone, E. Malerba, N. Susca [et al.]. – Text : unmediated // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – Art. 1367875. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1367875.

176. Li, C. TLR4 signaling pathway in mouse Lewis lung cancer cells promotes the expression of TGF- β 1 and IL-10 and tumor cells migration / C. Li, H. Li, K. Jiang [et al.]. – Text : unmediated // *Bio-Medical Materials and Engineering*. – 2014. – Vol. 24, № 1. – P. 869–875.

177. Li, D. Research Progress and Prospects for Polymeric Nanovesicles in Anticancer Drug Delivery / D. Li, Xi. Zhang, X. Chen, W. Li. – Text : unmediated // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2022. – Vol. 10. – Art. 850366. – DOI: 10.3389/fbioe.2022.850366.

178. Li, J. Recent Advances in Targeted Drug Delivery Strategy for Enhancing Oncotherapy / J. Li, Q. Wang, G. Xia [et al.]. – Text : unmediated // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – Art. 2233. – DOI: 10.3390/pharmaceutics15092233.

179. Li, M. A Polymeric Prodrug of 5-Fluorouracil-1-Acetic Acid Using a Multi-Hydroxyl Polyethylene Glycol Derivative as the Drug Carrier / M. Li, Z. Liang, X. Sun [et al.]. – Text : unmediated // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 11. – Art. e112888.

180. Li, Q. Strategies to Obtain Encapsulation and Controlled Release of Small Hydrophilic Molecules / Q. Li, X. Li, C. Zhao. – Text : unmediated // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. 8. – Art. 437.

181. Li, S. J. Leveraging macrophage plasticity for precision-targeted tumor immunotherapy / S. J. Li, X. He. Wang, L. R. Li [et al.]. – Text : unmediated // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. – 2026. – Vol. 1872, № 4. – Art. 168176. – DOI: 10.1016/j.bbadis.2026.168176. – PMID: 41620190.

182. Li Z. Mechano-boosting nanomedicine antitumour efficacy by blocking the reticuloendothelial system with stiff nanogels / Z. Li, Ya. Zhu, H. Zeng [et al.]. – Text : unmediated // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14, № 1. – P. 1437. – DOI: 10.1038/s41467-023-37150-3.

183. Liechty, W. B. Polymers for drug delivery systems / W. B. Liechty, D. R. Kryscio1, B. V. Slaughter [et al.]. – Text : unmediated // Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering. – 2010. – Vol. 1. – P. 149–173.

184. Lin, Q. Visualizing vasculature and its response to therapy in the tumor microenvironment / Q. Lin, P. L. Choyke, N. Sato. – Text : unmediated // Theranostics. – 2023. – Vol. 13, № 15. – P. 5223–5246. – DOI: 10.7150/thno.84947.

185. Lin, W. R. Magrolimab (Hu5F9-G4) promotes macrophage M1 polarization and is associated with enhanced autophagy in colorectal cancer / W. R. Lin, W. Q. Liu, T. A. H. Alburiahi [et al.]. – Text : unmediated // Translational Oncology. – 2026. – Vol. 63. – Art. 101875. – DOI: 10.1016/j.tranon.2025.102598.

186. Liu, C. A Nanotheranostic Agent for Synergistic Antitumor Chemo/Phototherapy Prepared by Paclitaxel-Induced Self-Assembly of PEGylated Human Serum Albumin with Prolonged Circulation / C. Liu, W. Xu, X. Song [et al.]. – Text : unmediated // ACS Omega. – 2024. – Vol. 9, № 52. – P. 51062–51072. – DOI: 10.1021/acsomega.4c05986.

187. Liu, J. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma / J. Liu, Y. Duan, X. Cheng [et al.]. – Text : unmediated // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2011. – Vol. 407, № 2. – P. 348–354.

188. Liu, M. Peptide-Enabled Targeted Delivery Systems for Therapeutic Applications / M. Liu, X. Fang, Y. Yang, C. Wang. – Text : unmediated // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – Vol. 9. – Art. 701504.

189. Liu, W. Covalent Organic Frameworks as Nanocarriers for Improved Delivery of Chemotherapeutic Agents / W. Liu, X. Ma, Sh. M. Kheyr [et al.]. – Text : unmediated // Materials (Basel). – 2022. – Vol. 15, № 20. – Art. 7215. – DOI: 10.3390/ma15207215.

190. Liu, Z. Multi-stage mechanisms of tumor metastasis and therapeutic strategies / Z. Liu, J. Chen, Yu. Ren [et al.]. – Text : unmediated // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2024. – Vol. 9, No. 1. – Article 270. – DOI: 10.1038/s41392-024-01955-5.

191. Llosa, N. Interleukin-17 and type 17 helper T cells in cancer management and research / N. Llosa, A. L. Geis, E. Thiele Orberg, F. Housseau. – Text : unmediated // ImmunoTargets and Therapy. – 2014. – Vol. 3. – P. 39–54.

192. López, S. Synthesis and Operating Optimization of the PEG Conjugate via CuAAC in scCO₂ / S. López, I. Gracia, M. T. García [et al.]. – Text : unmediated // ACS Omega. – 2021. – Vol. 6, № 9. – P. 6163–6171. – DOI: 10.1021/acsomega.0c05466.

193. Lv, L. The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma / L. Lv, K. Pan, X.-D. Li [et al.]. – Text : unmediated // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 3. – Art. e18219.

194. Macdonald, J. S. Toxicity of 5-fluorouracil / J. S. Macdonald. – Text : unmediated // Oncology (Williston Park). – 1999. – Vol. 13, № 7, suppl. 3. – P. 33–34.

195. Madkhali, O. A. Drug Delivery of Gelatin Nanoparticles as a Biodegradable Polymer for the Treatment of Infectious Diseases: Perspectives and Challenges / O. A. Madkhali. – Text : unmediated // Polymers. – 2023. – Vol. 15. – P. 4327. – DOI: 10.3390/polym15214327.

196. Magder, S. A «Post-copernican» Analysis of Intracellular pH / S. Magder. – Text : unmediated // Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency Medicine – A.P.I.C.E. – Milano : Springer, 2002. – P. 379–386. – ISBN 978-88-470-2099-3.

197. Majidpoor, J. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors – clinical perspectives / J. Majidpoor, K. Mortezaee. – Text : unmediated // Cell Oncol. – 2021. – Vol. 44. – P. 715–737. – DOI: 10.1007/s13402-021-00602-3.

198. Majumder, N. Polymeric micelles for anticancer drug delivery / N. Majumder, N. G Das, S. K. Das. – Text : unmediated // Therapeutic Delivery. – 2020. – Vol. 11, № 10. – P. 613–635.

199. Mandal, A. Hydrogels in the clinic / A. Mandal, J. R. Clegg, A. C. Anselmo, S. Mitragotri. – Text : unmediated // Bioeng Transl Med. – 2020. – Vol. 5, № 2. – Art. e10158. – DOI: 10.1002/btm2.10158.

200. Mannino, M. H. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer / M. H. Mannino, Z. Zhu, H. Xiao [et al.]. – Text : unmediated // Cancer Letters. – 2015. – Vol. 367, № 2. – P. 103–107.

201. Martínez, E. 5-Fluorouracil drug delivery system based on bacterial nanocellulose for colorectal cancer treatment: Mathematical and in vitro evaluation / E. Martínez, M. Osorio, C. Finkielstein [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – Vol. 220. – P. 802–815. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.102.

202. Marunaka, Y. Roles of interstitial fluid pH and weak organic acids in development and amelioration of insulin resistance / Y. Marunaka. – Text : unmediated // Biochemical Society Transactions. – 2021. – Vol. 49, № 2. – P. 715–726.

203. McQuade, R. M. Chemotherapy-Induced Constipation and Diarrhea: Pathophysiology, Current and Emerging Treatments / R. M. McQuade, V. Stojanovska, R. Abalo [et al.]. – Text : unmediated // Frontiers in Pharmacology. – 2016. – Vol. 7. – Article 414. – DOI: 10.3389/fphar.2016.00414.

204. Zhou, M. Preparation of polyacrylic acid and its activation on macrophages / M. Zhou, X. Li, Zh. Wang [et al.]. – Text : unmediated // IOP Conference Series:

Materials Science and Engineering. – Sanya, China, 2020. – Vol. 772. – Art. 012082. – DOI: 10.1088/1757-899X/772/1/012082.

205. Mielańczyk, A. In Vitro Evaluation of Doxorubicin Conjugates Based on Sugar Core Nonlinear Polymethacrylates toward Anticancer Drug Delivery / A. Mielańczyk, D. Neugebauer, M. Skonieczna, Ł. Mielańczyk. – Text : unmediated // Bioconjugate Chemistry. – 2016. – Vol. 27, № 4. – P. 893–904.

206. Mielke, H. 5-Fluorouracil Toxicity: Revisiting the Relevance of Pharmacokinetic Parameters / H. Mielke, E. A. E. Algharably, U. Gundert-Remy. – Text : unmediated // Pharmaceuticals. – 2025. – Vol. 18, No. 5. – Article 653. – DOI: 10.3390/ph18050653.

207. Milano, F. Current Trends in Gelatin-Based Drug Delivery Systems / F. Milano, A. Masi, M. Madaghiele [et al.]. – Text : unmediated // Pharmaceuticals. – 2023. – Vol. 15, № 5. – Art. 1499. – DOI: 10.3390/pharmaceutics15051499.

208. Minhas, M. U. Synthesis of novel combinatorial drug delivery system (nCDDS) for co-delivery of 5-fluorouracil and leucovorin calcium for colon targeting and controlled drug release / M. U. Minhas, O. Abdullah, M. Sohail [et al.]. – Text : unmediated // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 2021. – Vol. 47, № 12. – P. 1952–1965. – DOI: 10.1080/03639045.2022.2072514.

209. Mishra, R. K. pH dependent poly[2-(methacryloyloxyethyl)trimethylammonium chloride-co-methacrylic acid] hydrogels for enhanced targeted delivery of 5-fluorouracil in colon cancer cells / R. K. Mishra, K. Ramasamy, N. A. Ahmad [et al.]. – Text : unmediated // J Mater Sci Mater Med. – 2014. – Vol. 25. – P. 999–1012. – DOI: 10.1007/s10856-013-5132-x.

210. Mittal, S. Nail Changes With Chemotherapeutic Agents and Targeted Therapies / S. Mittal, N. Khunger, S. P. Kataria. – Text : unmediated // Indian Dermatology Online Journal. – 2022. – Vol. 13, No. 1. – P. 13–22. – DOI: 10.4103/idoj.IDOJ_801_20.

211. Moghadamnia, A. 5-Fluorouracil (5-FU)-induced organ toxicities: mechanisms, management, and prevention strategies / A. Moghadamnia, B. Karim,

P. Ebrahimi [et al.]. – Text : unmediated // *Toxicology Mechanisms and Methods*. – 2025. – [Epub ahead of print]. – P. 1–28. – DOI: 10.1080/15376516.2025.2559286.

212. Mohammed, R. A. Butein mitigates 5-FU-triggered hepatotoxicity via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic pathways / R. A. Mohammed, N. N. Al-Shawi. – Text : unmediated // *Toxicology Reports*. – 2025. – Vol. 15. – P. 102120. – DOI: 10.1016/j.toxrep.2025.102120.

213. Mollaei, M. Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? / M. Mollaei, Z. M. Hassan, F. Khorshidi, L. Langroudi. – Text : unmediated // *Translational Oncology*. – 2021. – Vol. 14, № 5. – Art. 101056.

214. Moriyama, S. Atrial fibrillation observed in a patient with esophageal cancer treated with fluorouracil / S. Moriyama, T. Yokoyama, K. Irie [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Cardiology Cases*. – 2019. – Vol. 20, No. 5. – P. 183–186. – DOI: 10.1016/j.jccase.2019.07.008.

215. Munde, P. Pericytes in Health and Disease / P. Munde. – Text : unmediated // *International Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. 2–7.

216. Naomi, R. Natural-Based Biomaterial for Skin Wound Healing (Gelatin vs. Collagen): Expert Review / R. Naomi, H. Bahari, P. M. Ridzuan, F. Othman. – Text : unmediated // *Polymers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, № 14. – Art. 2319. – DOI: 10.3390/polym13142319.

217. Naren, G. Reproductive and developmental toxicities of 5-fluorouracil in model organisms and humans / G. Naren, J. Guo, Q. Bai [et al.]. – Text : unmediated // *Expert Reviews in Molecular Medicine*. – 2022. – Vol. 24. – Art. e9.

218. Nemunaitis, J. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma / J. Nemunaitis, T. Fong, P. Shabe [et al.]. – Text : unmediated // *Cancer Investigation*. – 2001. – Vol. 19, № 3. – P. 239–247.

219. Oerlemans, C. Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release / C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos [et al.]. – Text : unmediated // *Pharmaceutical Research*. – 2010. – Vol. 27, № 10. – P. 2569–2589.

220. Olusanya, T. O. B. Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs / T. O. B. Olusanya, R. R. H. Ahmad, A. A. Elkordy [et al.]. – Text : unmediated // Molecules. – 2018. – Vol. 23, № 4. – Art. 907.

221. Ottenbrite, R. M. Antitumor Activity of Polycarboxylic Acid Polymers / R. M. Ottenbrite. – Text : unmediated // Journal of Macromolecular Science: Part A – Chemistry. – 1985. – Vol. 22, № 5–7. – P. 819–832. – DOI: 10.1080/00222338508056638.

222. Parajuli, P. Role of IL-17 in Glioma Progression / P. Parajuli, S. Mittal. – Text : unmediated // Journal of Spine & Neurosurgery. – 2013. – Vol. Suppl 1. – Art. S1-004.

223. Pardeshi, S. Recent advances in PLGA based nanocarriers for drug delivery system: a state of the art review / S. Pardeshi, J. B. Naik, A. Nikam [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. – 2021. – DOI: 10.1080/00914037.2021.1985495.

224. Parker, W. B. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil / W. B. Parker, Y. C. Cheng. – Text : unmediated // Pharmacology & Therapeutics. – 1990. – Vol. 48, № 3. – P. 381–395.

225. Parveen, S. Clinical developments of antitumor polymer therapeutics / S. Parveen, F. Arjmand, S. Tabassum. – Text : unmediated // RSC Advances. – 2019. – Vol. 9, № 43. – P. 24699–24721.

226. Pashkina, E. Hyaluronic Acid-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy / E. Pashkina, M. Bykova, M. Berishvili [et al.]. – Text : unmediated // Cells. – 2025. – Vol. 14, № 2. – P. 61. – DOI: 10.3390/cells14020061.

227. Patil, J. P. A Review on Polymer Drug Conjugate - What, Why and How? / J. P. Patil, H. S. Mahajan. – Text : unmediated // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2015. – Vol. 6, № 11. – P. 4611–4621.

228. Peng, S. Anaphylaxis induced by intra-articular injection of chitosan: A case report and literature review / S. Peng, Yu. Liang, W. Xiao [et al.]. – Text : unmediated // Clin Case Rep. – 2022. – Vol. 10, № 12. – Art. e6596. – DOI: 10.1002/ccr3.6596.

229. Possidónio, C. Exploring Supply-Side Barriers for Commercialization of New Biopolymer Production Technologies: A Systematic Review / C. Possidónio,

A. R. Farias, S. Domingos [et al.]. – Text : unmediated // Sustainability. – 2025. – Vol. 17. – P. 820. – DOI: 10.3390/su17030820.

230. Powell, B. S. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes / B. S. Powell, A. K. Andrianov, P. C. Fusco. – Text : unmediated // Clin Exp Vaccine Res. – 2015. – Vol. 4, № 1. – P. 23–45. – DOI: 10.7774/cevr.2015.4.1.23.

231. Radley, J. M. Platelet production after administration of antiplatelet serum and 5-fluorouracil / J. M. Radley, G. S. Hodgson, J. Levin. – Text : unmediated // Blood. – 1980. – Vol. 55, No. 1. – P. 164–166.

232. Rana, A. «Smart» drug delivery: A window to future of translational medicine / A. Rana, M. Adhikary, P. K. Singh [et al.]. – Text : unmediated // Front Chem. – 2023. – Vol. 10. – Art. 1095598. – DOI: 10.3389/fchem.2022.1095598.

233. Reay, S. L. Effective Endotoxin Removal from Chitosan That Preserves Chemical Structure and Improves Compatibility with Immune Cells / S. L. Reay, E. L. Jackson, D. Salthouse [et al.]. – Text : unmediated // Polymers. – 2023. – Vol. 15. – P. 1592. – DOI: 10.3390/polym15071592.

234. Reay, S. L. The Paradoxical Immunomodulatory Effects of Chitosan in Biomedicine / S. L. Reay, A. Marina Ferreira, C. M. U. Hilken, K. Novakovic. – Text : unmediated // Polymers. – 2025. – Vol. 17. – P. 19. – DOI: 10.3390/polym17010019.

235. Refaie, M. M. M. Molecular mechanism of empagliflozin cardioprotection in 5-fluorouracil (5-FU)-induced cardiotoxicity via modulation of SGLT2 and TNF α /TLR/NF- κ B signaling pathway in rats / M. M. M. Refaie, S. Shehata, El-M. Hussieny [et al.]. – Text : unmediated // Toxicology Research. – 2023. – Vol. 40, No. 1. – P. 139–151. – DOI: 10.1093/toxres/tfad012.

236. Rich, I. N. The effect of 5-fluorouracil on erythropoiesis / I. N. Rich. – Text : unmediated // Blood. – 1991. – Vol. 77, No. 6. – P. 1164–1170.

237. Ringsdorf, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers / H. Ringsdorf. – Text : unmediated // Journal of Polymer Science: Polymer Symposia. – 1975. – Vol. 51, № 1. – P. 135–153.

238. Robin, C. Unexpected Slow Kinetics of Poly(Methacrylic Acid) Phase Separation in the Semi-Dilute Regime / C. Robin, C. Lorthioir, A. Fall [et al.]. – Text : unmediated // Polymers. – 2022. – Vol. 14. – Art. 4708. – DOI: 10.3390/polym14214708.

239. Rodrigues, D. New insights into the mechanisms underlying 5-fluorouracil-induced intestinal toxicity based on transcriptomic and metabolomic responses in human intestinal organoids / D. Rodrigues, T. De Souza, L. Coyle [et al.]. – Text : unmediated // Archives of Toxicology. – 2021. – Vol. 95, No. 8. – P. 2691–2718. – DOI: 10.1007/s00204-021-03050-y.

240. Rolland, A. Blood clearance and organ distribution of intravenously administered polymethacrylic nanoparticles in mice / A. Rolland, R. L. Verge, B. Collet, L. Toujas. – Text : unmediated // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1989. – Vol. 78, № 6. – P. 481–484.

241. Safiul, I. Advances in nanoparticles in targeted drug delivery – A review / Islam Safiul, Md Mir Shakib Ahmed, Mohammad Aminul Islam [et al.]. – Text : unmediated // Results in Surfaces and Interfaces. – 2025. – Vol. 19. – Art. 100529. – DOI: 10.1016/j.rsurfi.2025.100529.

242. Sakai, H. 5-Fluorouracil Induces Diarrhea with Changes in the Expression of Inflammatory Cytokines and Aquaporins in Mouse Intestines / H. Sakai, A. Sagara, K. Matsumoto [et al.]. – Text : unmediated // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, No. 1. – Article e54788. – DOI: 10.1371/journal.pone.0054788.

243. Sakai, H. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon / H. Sakai, A. Sagara, K. Matsumoto [et al.]. – Text : unmediated // Pharmacological Research. – 2014. – Vol. 87. – P. 71–79. – DOI: 10.1016/j.phrs.2014.06.005.

244. Salari, N. Polymer-based drug delivery systems for anticancer drugs: A systematic review / N. Salari, F. Faraji, F. M. Torghabeh [et al.]. – Text : unmediated // Cancer Treat Res Commun. – 2022. – Vol. 32. – Art. 100605. – DOI: 10.1016/j.ctarc.2022.100605.

245. Sanguinetti, A. Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment / A. Sanguinetti, N. Avenia, D. Santin [et al.]. – Text : unmediated // World Journal of Surgical Oncology. – 2015. – Vol. 13. – Art. 129.

246. Sankalia, M. G. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization / M. G. Sankalia, R. C. Mashru, J. M. Sankalia, V. B. Sutariya. – Text : unmediated // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2007. – Vol. 65, № 2. – P. 215–232.

247. Sapapsap, B. The Prevalence of 5-Fluorouracil and Capecitabine Cardiotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis / B. Sapapsap, P. Thongnoi, A. Pongpun [et al.]. – Text : unmediated // World Journal of Oncology. – 2024. – Vol. 15, No. 6. – P. 902–921. – DOI: 10.14740/wjon1920.

248. Sara, J. D. 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review / J. D. Sara, J. Kaur, R. Khodadadi [et al.]. – Text : unmediated // Therapeutic Advances in Medical Oncology. – 2018. – Vol. 10. – P. 1758835918780140.

249. Sato, T. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy / T. Sato, M. Terai, Yu. Tamura [et al.]. – Text : unmediated // Immunologic Research. – 2011. – Vol. 51, № 2-3. – P. 170–182.

250. Sato, T. Interleukin 10 production by human melanoma / T. Sato, P. McCue M.D, K. Masuoka [et al.]. – Text : unmediated // Clinical Cancer Research. – 1996. – Vol. 2, № 8. – P. 1383–1390.

251. Schultz, R. M. Interferon: an inducer of macrophage activation by polyanions / R. M. Schultz, J. D. Papamatheakis, M. A. Chirigos. – Text : unmediated // Science. – 1977. – Vol. 197, № 4304. – P. 674–676.

252. Seidi, F. Chitosan-based blends for biomedical applications / F. Seidi, M. Khodadadi Yazdi, M. Jouyandeh [et al.]. – Text : unmediated // Int J Biol Macromol. – 2021. – Vol. 183. – P. 1818–1850. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.003.

253. Seminara, P. Discoloration of the nails and early anemia after mitoxantrone, folinic acid and 5-fluorouracil / P. Seminara, F. Franchi, G. Codacci-Pisanelli [et al.]. –

Text : unmediated // Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy. – 1990. – Vol. 7, No. 4. – P. 291–292.

254. Sengul, E. Investigation of Effects of Silymarin in 5-Fluorouracil Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Mice / E. Sengul, V. Gelen, S. yıldırım [et al.]. – Text : unmediated // Research Square. – 2021. – Preprint. – DOI: 10.21203/rs.3.rs-448267/v1.

255. Sethy, C. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition / C. Sethy, C. N. Kundu. – Text : unmediated // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 137. – Article 111285. – DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111285.

256. Seymour, L. Review : Synthetic Polymers with Intrinsic Anticancer Activity / L. Seymour. – Text : unmediated // Journal of Bioactive and Compatible Polymers. – 1991. – Vol. 6, № 2. – P. 178–216.

257. Seynhaeve, A. L. B. Hyperthermia and smart drug delivery systems for solid tumor therapy / A. L. B. Seynhaeve, M. Amin, T. L. M. Ten Hagen [et al.]. – Text : unmediated // Adv Drug Deliv Rev. – 2020. – Vol. 163–164. – P. 125–144. – DOI: 10.1016/j.addr.2020.02.004.

258. Shao, L. Recent advances in PLGA micro/nanoparticle delivery systems as novel therapeutic approach for drug-resistant tuberculosis / L. Shao, S. Shen, H. Liu. – Text : unmediated // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2022. – Vol. 10. – Art. 941077. – DOI: 10.3389/fbioe.2022.941077.

259. Sharma, A. 5-Fluorouracil-Induced Vasospasm Presenting as Cardiac Arrest / A. Sharma, A. Sawhney, G. Pal Shergill, A. U. Khan]. – Text : unmediated // Chest. – 2023. – Vol. 164, No. 4, Supplement. – P. A291. – DOI: 10.1016/j.chest.2023.07.244.

260. Sheyi, R. Linkers: An Assurance for Controlled Delivery of Antibody-Drug Conjugate / R. Sheyi, B. G. de la Torre, F. Albericio. – Text : unmediated // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14, № 2. – Art. 396.

261. Shiga, T. Cardiotoxicities of 5-Fluorouracil and Other Fluoropyrimidines / T. Shiga, M. Hiraide. – Text : unmediated // Curr Treat Options Oncol. – 2020. – Vol. 21, № 4. – P. 27.

262. Simeonov, M. Interpenetrating Polymer Networks of Polyacrylamide with Polyacrylic and Polymethacrylic Acids and Their Application for Modified Drug Delivery – a Flash Review / M. Simeonov, B. Kostova, E. Vassileva. – Text : unmediated // Pharmaceutical Nanotechnology. – 2023. – Vol. 11, № 1. – DOI: 10.2174/2211738510666220919103514.

263. Simeonov, M. Stimuli-Responsive Hydrogels of Poly(Methacrylic Acid)/Poly(N,N-dimethylacrylamide) Interpenetrating Polymer Networks as Drug Delivery Systems for Promethazine Hydrochloride / M. Simeonov, I. Yildirim, Ch. T. Tzachev, E. Vassileva. – Text : unmediated // Gels. – 2025. – Vol. 11, № 4. – Art. 240. – DOI: 10.3390/gels11040240.

264. Soerjomataram, I. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer / I. Soerjomataram, J. W. W. Coebergh, M. W. J. Louwman [et al.]. – Text : unmediated // Breast Cancer Research and Treatment. – 2008. – Vol. 107, № 3. – P. 309–330.

265. Song, Z. Molecular cross-talk of IL-6 in tumors and new progress in combined therapy / Z. Song, D. Ren, X. Xu, Y. Wang [et al.]. – Text : unmediated // Thoracic Cancer. – 2018. – Vol. 9, № 6. – P. 669–675.

266. Srivastava, A. Polymers in Drug Delivery / A. Srivastava, T. Yadav, S. Sharma [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Biosciences and Medicines. – 2016. – Vol. 4, № 4. – P. 69–84.

267. Stein, B. N. Age and sex are independent predictors of 5-fluorouracil toxicity. Analysis of a large scale phase III trial / B. N. Stein, N. J. Petrelli, H. O. Douglass [et al.]. – Text : unmediated // Cancer. – 1995. – Vol. 75, No. 1. – P. 11–17. – DOI: 10.1002/1097-0142(19950101)75:1<11::aid-cnrcr2820750104>3.0.co;2-n.

268. Stenton, B. J. A thioether-directed palladium-cleavable linker for targeted bioorthogonal drug decaging / B. J. Stenton, B. L. Oliveira, M. J. Matos [et al.]. – Text : unmediated // Chemical Science. – 2018. – Vol. 9, № 17. – P. 4185–4189.

269. Stoyanova, N. Nanoparticles based on complex of berberine chloride and polymethacrylic or polyacrylic acid with antioxidant and in vitro antitumor activities /

N. Stoyanova, M. Ignatova, N. Manolova [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 584. – Art. 119426.

270. Stuart, M. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials / M. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer [et al.]. – Text : unmediated // Nature Materials. – 2010. – Vol. 9, № 2. – P. 101–113.

271. Sun, T. Inhibition of tumor angiogenesis by interferon- γ by suppression of tumor-associated macrophage differentiation / T. Sun, Y. Yang, X. Luo [et al.]. – Text : unmediated // Oncology Research. – 2014. – Vol. 21, № 5. – P. 227–235.

272. Tahiya, E. C. 5-Fluorouracil for colorectal cancer: mechanism of action and metabolism / E. C. Tahiya, A. A. Islam, M. Hatta [et al.]. – Text : unmediated // Gazzetta Medica Italiana – Archivio per le Scienze Mediche. – 2024. – Vol. 183, No. 7–8. – P. 340–350. – DOI: 10.23736/S0393-3660.23.05249-X.

273. Talayev, V. Low-dose influenza vaccine Grippol Quadrivalent with adjuvant Polyoxidonium induces a T helper-2 mediated humoral immune response and increases NK cell activity / V. Talayev, I. Zaichenko, M. Svetlova [et al.]. – Text : unmediated // Vaccine. – 2020. – Vol. 38, № 42. – P. 6645–6655. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.07.053.

274. Tannock I. F. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation / I. F. Tannock, D. Rotin. – Text : unmediated // Cancer Research. – 1989. – Vol. 49, № 16. – P. 4373–4384.

275. Tao, F. Chitosan-based drug delivery systems: From synthesis strategy to osteomyelitis treatment – A review / F. Tao, S. Ma, H. Tao [et al.]. – Text : unmediated // Carbohydr Polym. – 2021. – Vol. 251. – Art. 117063. – DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117063.

276. Tecalco-Cruz, A. C. Deregulation of interferon-gamma receptor 1 expression and its implications for lung adenocarcinoma progression / A. C. Tecalco-Cruz, K. H. Medina-Abreu, E. Oropeza-Martínez [et al.]. – Text : unmediated // World Journal of Clinical Oncology. – 2024. – Vol. 15, № 2. – P. 195–207.

277. Thirumalai, A. Natural polymer derivative-based pH-responsive nanoformulations with entrapped diketo-tautomers of 5-fluorouracil for enhanced

cancer therapy / A. Thirumalai, K. Girigoswami, K. Harini [et al.]. – Text : unmediated // ADMET DMPK. – 2025. – Vol. 13, № 1. – Art. 2554. – DOI: 10.5599/admet.2554.

278. Tian, H. Targeted drug delivery systems for elemene in cancer therapy: The story thus far / H. Tian, F. Zhao, Q. R. Qi [et al.]. – Text : unmediated // Biomed Pharmacother. – 2023. – Vol. 166. – Art. 115331. – DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115331.

279. Torchilin V. P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery / V. P. Torchilin. – Text : unmediated // Nature Reviews Drug Discovery. – 2014. – Vol. 13, № 11. – P. 813–827. – DOI: 10.1038/nrd4333.

280. Ugorji, O. L. The effect of noisome preparation methods in encapsulating 5-fluorouracil and real time cell assay against HCT-116 colon cancer cell line / O. L. Ugorji, O. N. Ch. Umeh, Ch. O. Agubata [et al.]. – Text : unmediated // Heliyon. – 2022. – Vol. 8, № 12. – Art. e12369. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12369.

281. Umar, Y. Polymeric Materials as Potential Inhibitors Against SARS-CoV-2 / Y. Umar, S. Al-Batty, O. Ashwaq [et al.]. – Text : unmediated // J Polym Environ. – 2022. – Vol. 30. – P. 1244–1263. – DOI: 10.1007/s10924-021-02272-6.

282. Vagena, I.-A. Enhancement of EPR Effect for Passive Tumor Targeting: Current Status and Future Perspectives / I.-A. Vagena, Ch. Malapani, M. A. Gatou [et al.]. – Text : unmediated // Appl. Sci. – 2025. – Vol. 15. – P. 3189. – DOI: 10.3390/app15063189.

283. Valencia-Lazcano, A. A. 5-Fluorouracil nano-delivery systems as a cutting-edge for cancer therapy / A. A. Valencia-Lazcano, D. Hassan, M. Pourmadadi [et al.]. – Text : unmediated // Eur J Med Chem. – 2023. – Vol. 246. – Art. 114995. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114995.

284. Valet, M. Formation of benign tumors by stem cell deregulation / M. Valet, P. Narbonne. – Text : unmediated // PLoS Genetics. – 2022. – Vol. 18, No. 10. – Article e1010434. – DOI: 10.1371/journal.pgen.1010434.

285. Vanoverbeke, L. Cardiogenic shock after 5-fluorouracil administration: a case report and literature review / L. Vanoverbeke, H. Wouter, D. François, E. Iva. – Text : unmediated // European Heart Journal – Case Reports. – 2023. – Vol. 7, No. 12. – Article ytad596. – DOI: 10.1093/ehjcr/ytad596.

286. Verma, A. Polyelectrolyte Complex- An Overview / A. Verma, A. Verma. – Text : unmediated // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2013. – Vol. 4, № 5. – P. 1684–1691.

287. Wang, K. Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis / K. Wang, M. K. Kim, G. Di Caro [et al.]. – Text : unmediated // Immunity. – 2014. – Vol. 41, № 6. – P. 1052–1063.

288. Wang, S. Acetalated dextran based nano- and microparticles: synthesis, fabrication, and therapeutic applications / S. Wang, F. Fontana, M. A. Shahbazi, H. A. Santos. – Text : unmediated // Chem Commun (Camb). – 2021. – Vol. 57, № 35. – P. 4212–4229. – DOI: 10.1039/d1cc00811k.

289. Wang, W. Cationic Polymethacrylate-Modified Liposomes Significantly Enhanced Doxorubicin Delivery and Antitumor Activity / W. Wang, A. Shao, N. Zhang [et al.]. – Text : unmediated // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – Art. 43036.

290. Wang, W. Liposomal 5-Fluorouracil Polymer Complexes Facilitate Tumor-Specific Delivery: Pharmacokinetics Using Microdialysis / W. Wang, P. Joyce, K. Bremmell [et al.]. – Text : unmediated // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14, № 2. – P. 1–16. – DOI: 10.3390/pharmaceutics14020221.

291. Werner, H. Hallmarks of cancer: The insulin-like growth factors perspective / H. Werner, D. LeRoith. – Text : unmediated // Frontiers in Oncology. – 2022. – Vol. 12. – Article 1055589. – DOI: 10.3389/fonc.2022.1055589.

292. Wiraszka, R. 5-Fluorouracil Neurotoxicity – Diagnostic and Clinical Implications / R. Wiraszka. – Text : unmediated // Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. – 2023. – Vol. 52, No. 5. – P. 44398–44402. – DOI: 10.26717/BJSTR.2023.52.008307.

293. Wu, Y. Risk factors for fluorouracil-induced cardiotoxicity in patients with gastrointestinal tumor / Y. Wu, Ch. Lv, J. Li [et al.]. – Text : unmediated // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2025. – Vol. 12. – Article 1515509. – DOI: 10.3389/fcvm.2025.1515509.

294. Xie, H. Interleukin-6 as a Pan-Cancer Prognostic Inflammatory Biomarker: A Population-Based Study and Comprehensive Bioinformatics Analysis / H. Xie,

L. Wei, G. Ruan [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Inflammation Research. – 2025. – Vol. 18. – P. 573–587.

295. Yang, P. Stimuli-responsive biodegradable poly(methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system / P. Yang, D. Li, S. Jin [et al.]. – Text : unmediated // Biomaterials. – 2014. – Vol. 35, № 6. – P. 2079–2088.

296. Yang, Y. Tumor-associated macrophages remodel the suppressive tumor immune microenvironment and targeted therapy for immunotherapy / Y. Yang, S. Li, K. K. W. To [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2025. – Vol. 44. – Art. 145. – DOI: 10.1186/s13046-025-03377-9.

297. Yi, X. Drug delivery systems for overcoming physical barriers in cancer therapy / X. Yi, X. Jin, Y. Hu [et al.]. – Text : unmediated // Mol Pharmaceutics. – 2025. – DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5c00474.

298. Yin, B. Research progress on the effect of gut and tumor microbiota on antitumor efficacy and adverse effects of chemotherapy drugs / B. Yin, X. Wang, F. Yuan [et al.]. – Text : unmediated // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – Article 899111. – DOI: 10.3389/fmicb.2022.899111.

299. Yuan, W. The male reproductive toxicity after 5-Fluorouracil exposure: DNA damage, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction in vitro and in vivo / W. Yuan, G. Ji, X. Shi [et al.]. – Text : unmediated // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2024. – Vol. 278. – Article 116465. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116465.

300. Yue, X. Three important short-chain fatty acids (SCFAs) attenuate the inflammatory response induced by 5-FU and maintain the integrity of intestinal mucosal tight junction / X. Yue, S. Wen, D. Long-Kun [et al.]. – Text : unmediated // BMC Immunology. – 2022. – Vol. 23, No. 1. – Article 19. – DOI: 10.1186/s12865-022-00495-3.

301. Yuwono, K. A. Recurrent Reversible Stroke-Like Encephalopathy After 5-Fluorouracil (5-FU) Chemotherapy: A Case Report and Literature Review / K. A. Yuwono, S. H. Hutajulu, A. Gofir, D. B. Nugroho. – Text : unmediated // The American Journal of Case Reports. – 2023. – Vol. 24. – Article e938437. – DOI: 10.12659/AJCR.938437.

302. Zafar, A. The Incidence, Risk Factors, and Outcomes With 5-Fluorouracil-Associated Coronary Vasospasm / A. Zafar, Z. D. Drobni, R. Mosarla [et al.]. – Text : unmediated // JACC: CardioOncology. – 2021. – Vol. 3, No. 1. – P. 101–109. – DOI: 10.1016/j.jaccao.2020.12.005.

303. Zhang, J. P. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients / J. P. Zhang, J. Yan, J. Xu [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Hepatology. – 2009. – Vol. 50, № 5. – P. 980–989.

304. Zheng, J. Targeted polymeric drug delivery systems with stimuli-responsive release capabilities: status and future perspectives / J. Zheng, Z. Yang, Ju. Shi [et al.]. – Text : unmediated // Nanomedicine. – 2025. – Vol. 20, № 21. – P. 2609–2612. – DOI: 10.1080/17435889.2025.2541570.

305. Zheng, X. F. Surface Molecularly Imprinted Polymer of Chitosan Grafted Poly(methyl methacrylate) for 5-Fluorouracil and Controlled Release / X. F. Zheng, Q. Lian, H. Yang [et al.]. – Text : unmediated // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – Art. 21409. – DOI: 10.1038/srep21409.

306. Zhong, C. Chemoresistance mechanisms to 5-Fluorouracil and reversal strategies in lung and breast cancer / C. Zhong, Sh. Wang, W. J. Jiang [et al.]. – Text : unmediated // Scientific Reports. – 2025. – Vol. 15, No. 1. – Article 6074. – DOI: 10.1038/s41598-025-90532-z.

307. Zhou, Z. Microenvironmental regulation and remodeling of breast cancer angiogenesis: from basic mechanisms to clinical therapeutic implications / Z. Zhou, H. Zhong, H. Wang [et al.]. – Text : unmediated // Discov Oncol. – 2025. – Vol. 16, № 1. – Art. 1973. – DOI: 10.1007/s12672-025-03797-1.

308. Zhu, X. Sample size calculation for Mann-Whitney U test with five methods / X. Zhu. – Text : unmediated // International Journal of Clinical Trials. – 2021. – Vol. 8, No. 3. – P. 184–195. – DOI: 10.18203/2349-3259.ijct20212232.

309. Zhukova, O. V. Effect of Poly(Methacrylic Acid) on Production of Interferon- γ in Modeling the Tumor Process in vivo / O. V. Zhukova, D. A. Zykova, N. A. Dubovskaya, E. V. Arkhipova. – Text : unmediated // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2024. – Vol. 58, № 12. – P. 1254–1258.

310. Zhukova, O. V. Immunopharmacological Properties of Methacrylic Acid Polymers as Potential Polymeric Carrier Constituents of Anticancer Drugs / O. V. Zhukova, E. V. Arkhipova, T. F. Kovaleva [et al.]. – Text : unmediated // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 16. – Art. 4855.

311. Ziani, H. 5-Fluorouracil-induced acute leukoencephalopathy: Case report and literature review / H. Ziani, S. Nasri, I. Kamaoui, I. Skiker. – Text : unmediated // *Radiology Case Reports*. – 2024. – Vol. 19, No. 7. – P. 2801–2803. – DOI: 10.1016/j.radcr.2024.03.064.

312. Ziegler, E. Lehrbuch der allgemeinen pathologischen Anatomie und Pathogenese / E. Ziegler. – Jena : Verlag von Gustav Fischer, 1898. – 658 p. – Text : unmediated.

313. Żywno, M. Longitudinal melanonychia and distal onycholysis associated with 5 fluorouracil/adriamycin/cyclophosphamide chemotherapy for breast cancer / M. Żywno, A. Terlikowska-Brzóska, W. Owczarek [et al.]. – Text : unmediated // *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. – 2021. – Vol. 108, No. 4. – P. 305–310. – DOI: 10.5114/dr.2021.110763.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Акты внедрения результатов диссертационной работы



АКТ

о внедрении результатов кандидатской диссертации Дубовской Натальи Александровны на тему:

«Разработка полимерного производного 5-фторурацила на основе полианиона с собственной иммуностимулирующей активностью»
на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Учреждение, в котором внедрена работа: кафедра высокомолекулярных соединений и коллоидной химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского".

Кем предложено: ассистентом кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Дубовской Натальей Александровной.

Объект внедрения: методика синтеза и анализа полимерных комплексов на основе полиметакриловой кислоты с противоопухолевыми лекарственными средствами, изложенная в результатах диссертационной работы Н.А. Дубовской «Разработка полимерного производного 5-фторурацила на основе полианиона с собственной иммуностимулирующей активностью».

Сроки внедрения: 2026 год.

Эффективность внедрения: методика синтеза и анализа полимерных комплексов на основе полиметакриловой кислоты с противоопухолевыми лекарственными средствами внедрена в учебный процесс на кафедре высокомолекулярных соединений и коллоидной химии ННГУ им. Н.И. Лобачевского и используется при проведении практических занятий со студентами химического факультета.

Заведующий кафедрой высокомолекулярных соединений и коллоидной химии ННГУ им. Н.И. Лобачевского, д.х.н., профессор

С.Д. Зайцев

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
Е.С. Богомолова

« 4 » апреля 2026 г.

АКТ

о внедрении результатов кандидатской диссертации Дубовской Натальи Александровны на тему:
«Разработка полимерного производного 5-фторурацила на основе полианиона с собственной иммуностимулирующей активностью»
на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Учреждение, в котором внедрена работа: кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кем предложено: ассистентом кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Дубовской Натальей Александровной.

Форма внедрения: результаты диссертационной работы Н.А. Дубовской «Разработка полимерного производного 5-фторурацила на основе полианиона с собственной иммуностимулирующей активностью» используются в научно-исследовательской и учебной работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии.

Сроки внедрения: 2026 год.

Эффективность внедрения: результаты диссертационной работы Н.А. Дубовской «Разработка полимерного производного 5-фторурацила на основе полианиона с собственной иммуностимулирующей активностью» активно применяются в учебном процессе при подготовке студентов III-IV курсов фармацевтического факультета на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

Зав. кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, д.фарм.н., доцент

Жукова

О.В. Жукова

Приложение Б

Скан выписки из протокола № 06 Заседания Комитета по Этике ФГБОУ ВО
«ПИМУ» Минздрава России

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Приволжский исследовательский медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 603155, г. Нижний Новгород, Верхневолжская набережная, 18/1

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА № 06

Заседания Комитета по Этике ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
от 14.04.2023 года

Присутствовали:

Заместитель Председателя ЛЭК: д.м.н. В.И. Загреков

Секретарь: к.м.н. Г.Е. Шейко

Члены комитета по этике: к.м.н. доц. В.А. Балчугов, к.м.н. О.А. Шапкина, Е.В. Донченко

Присутствовали: к.м.н. Е.А. Галова, А.Э. Антонян, проф., д.м.н. О.С. Стрельцова, А.Г. Наумов, А.Н. Поздеева, Н.А. Дубовская, П.С. Ермакова

Повестка

К рассмотрению документы по диссертационному исследованию «Разработка состава и технологии системы доставки противоопухолевых лекарственных средств на основе полианионов с собственной иммуностимулирующей активностью» по специальности «Промышленная фармация и технология получения лекарств» 3.4.1.

Исполнитель диссертационного исследования: аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Дубовская Наталья Александровна.

Научный руководитель: д.ф.н., доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Жукова Ольга Вячеславовна.

Сроки выполнения: работа запланирована в 2022 г. и выполнена на 25%.

Представленные документы:

1. Протокол исследования.
2. Аннотация диссертационной/научной работы.
3. Краткая аннотация на используемые в исследовании лекарственные препараты.
4. Профессиональная автобиография исследователя.
5. Профессиональные автобиографии научного руководителя.
6. Копия приказа об утверждении тем диссертационных работ.
7. Выписка из протокола заседания проблемной комиссии.
8. Заключение независимого эксперта: к.ф.н., доцента кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Малыгиной Дарины Сергеевны.
9. Соглашение о конфиденциальности эксперта.

СЛУШАЛИ: аспиранта кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Дубовскую Наталью Александровну, которая проинформировала членов комитета о диссертационном исследовании.

Цель исследования: разработать систему доставки противоопухолевых лекарственных средств на основе полианионов с собственной иммуностимулирующей активностью, а также состав и технологию получения лекарственного препарата.

Задачи исследования:

1. Оценить собственную иммуностимулирующую активность полимеров метакриловой кислоты как потенциальных носителей противоопухолевых лекарственных средств.
2. Провести сравнение анализ эффективности различных режимов противоопухолевой терапии полимерных производных лекарственных средств в сравнении с самостоятельными лекарственными препаратами.
3. Оценить интерферогенез при различных режимах противоопухолевой терапии

полимерных производных лекарственных средств.

4. Сравнить фармакокинетический профиль и биораспределение полимерных производных лекарственных средств и самостоятельных лекарственных препаратов

Исследование экспериментальное. Эксперименты запланированы на аутбредных лабораторных крысах Wistar. Животные содержатся в виварии ЦНИЛ ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России согласно требованиям санитарно-эпидемиологических правил СП 2.2.1.3218-14. Эксперименты выполняются согласно международным правилам «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011), отвечая требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006).

Экспериментальная модель неоплазии создается путем перевивки опухолевого штамма РМК1 (рак молочной железы), приобретенного в онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина.

Взвесь опухолевых клеток крысам вводится подкожно в область подмышечной впадины. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считается нулевым днем развития опухоли.

Полимерные составы вводятся в хвостовую вену лабораторных животных. На исследовании у животных забирается кровь и после эвтаназии внутренние органы (мозг, печень, лёгкие, почки, опухоль, сердце, селезенка).

Критерии включения в исследование: здоровые животные крысы линии Wistar массой 180 - 220 г. Критерии исключения из исследования: больные животные, животные с поврежденным кожным покровом, животные весом более 220 гр. и менее 180 г.

Диссертационное исследование аспиранта кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Дубовской Натальи Александровны на тему «Разработка состава и технологии системы доставки противоопухолевых лекарственных средств на основе полианионов с собственной иммуностимулирующей активностью» одобрено на заседании подкомиссии по рассмотрению диссертационных работ Комитета по Этике ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, выписка из протокола заседания 5/Д-2023 от 29.03.2023 года.

ПОСТАНОВИЛИ: одобрить диссертационное исследование «Разработка состава и технологии системы доставки противоопухолевых лекарственных средств на основе полианионов с собственной иммуностимулирующей активностью» аспиранта кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Дубовской Натальи Александровны.

Заместитель Председателя ЛЭК

Секретарь ЛЭК

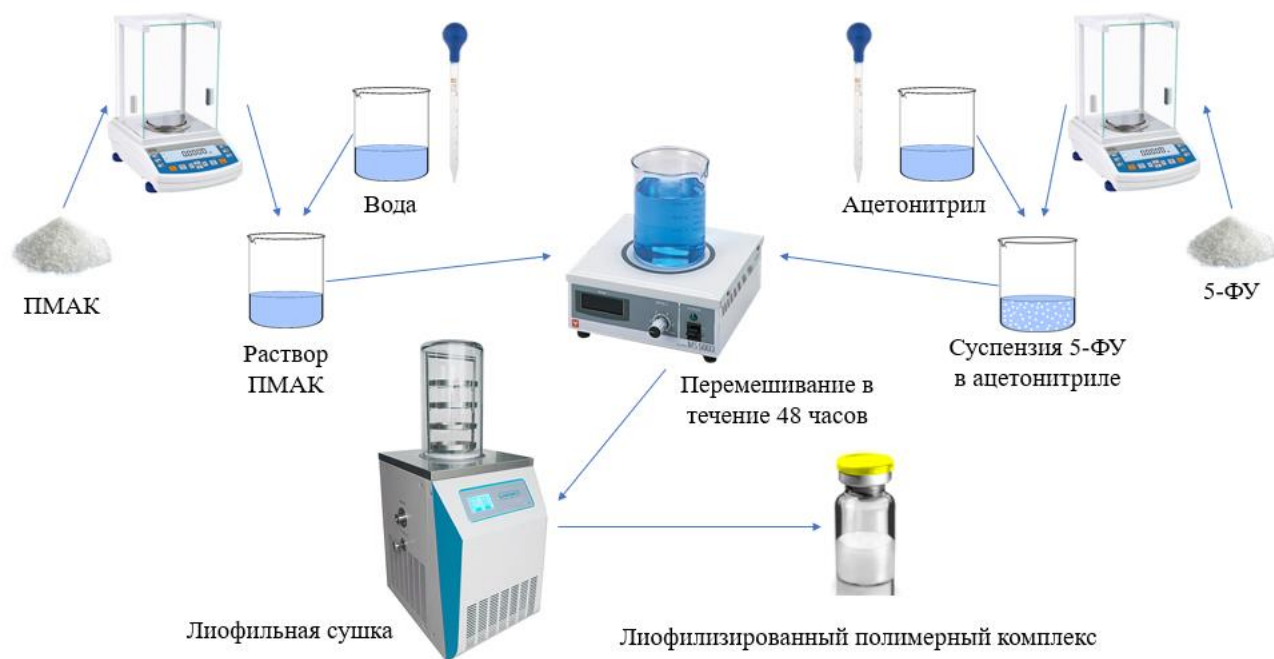


В.И. Загреков

Г.Е. Шейко

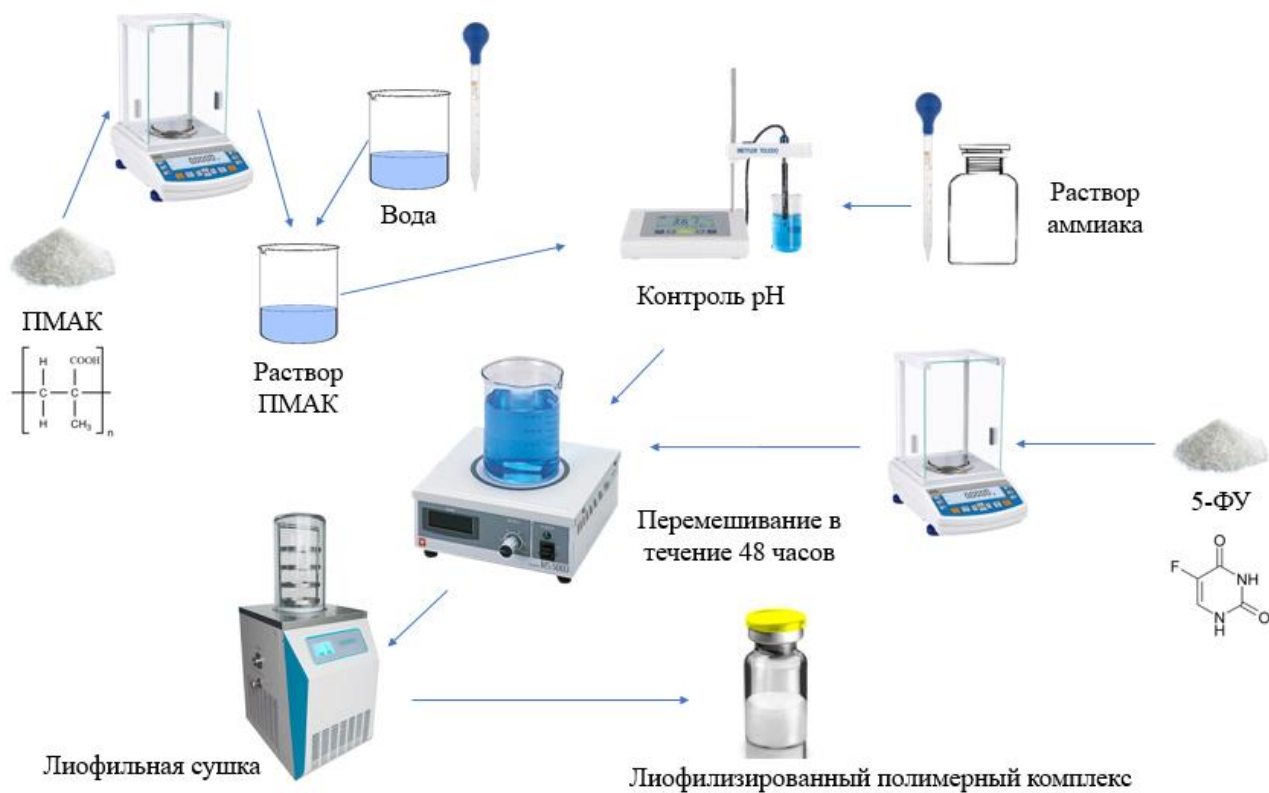
Приложение В

Схема получения полимерного комплекса 5-ФУ в среде с ацетонитрилом
(AcN*H₂O) методом ЖФС



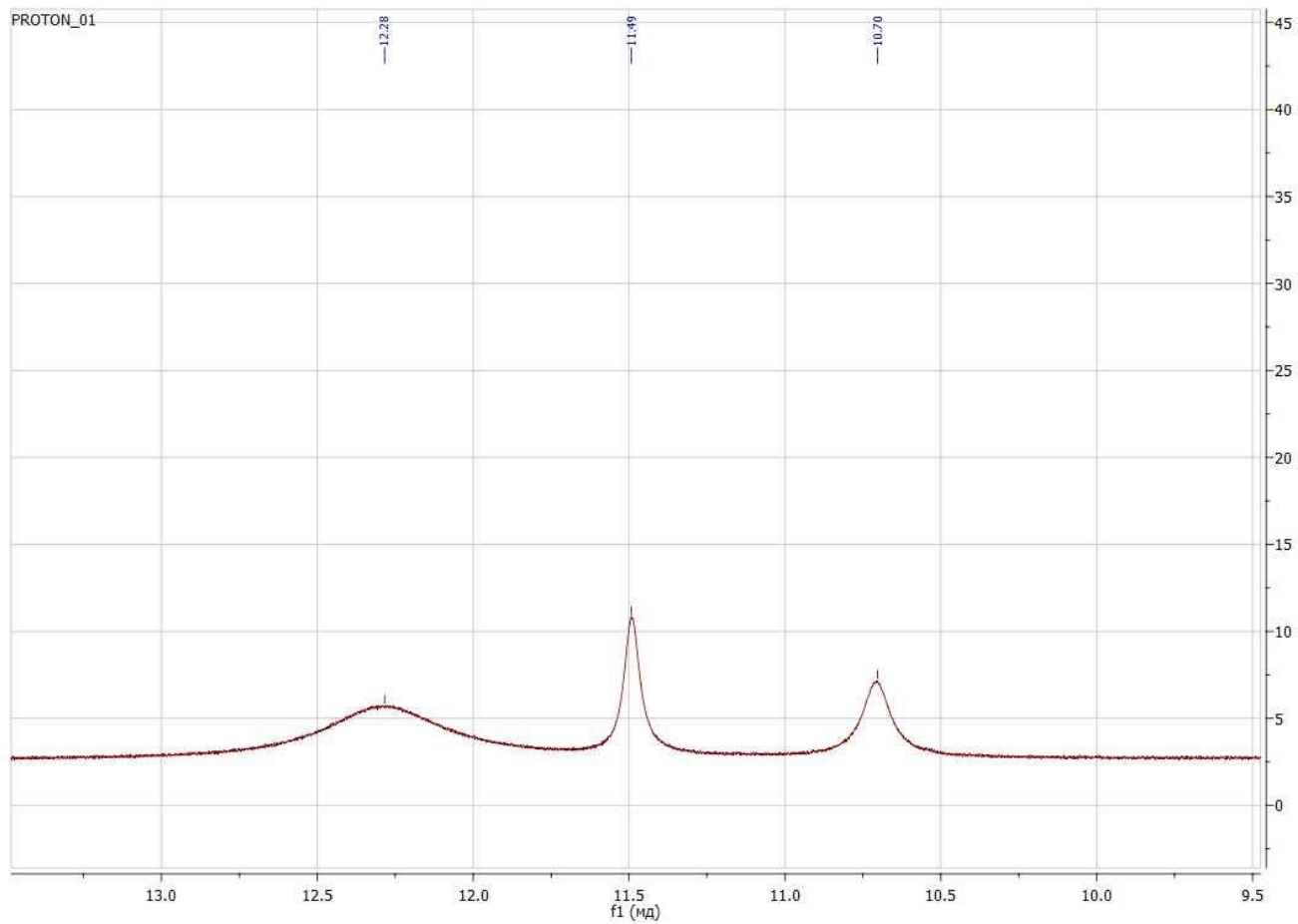
Приложение Г

**Схема получения полимерного комплекса 5-ФУ в водной среде
с доведением раствором аммиака до разных значений
водородного показателя pH методом ЖФС**



Приложение Д

**^1H ЯМР-спектр (DMSO- d_6) полимерного комплекса 5-ФУ с ПМАК,
приблизенный сигнал при 12,33 м. д.**



Приложение Е

Исследование стабильности полимерного комплекса 5-ФУ при нахождении в условиях с высокой температурой

Показатели	Метод	Характеристика	0 мес.	1 мес.
Описание	Визуальный	Сухая пористая масса, в виде таблетки, цельная или раскрошенная масса белого или почти белого цвета	Соотв.	Соотв.
Растворимость	В соответствии с ГФ XV	Растворим в воде, практически нерастворим в спирте этиловом 95 %, хлороформе	Соотв.	Соотв.
Подлинность	УФ-спектроскопия	Ультрафиолетовый спектр испытуемого раствора в области длин волн от 220 до 350 нм имеет максимум поглощения при (266 ± 1) нм	Соотв.	Соотв.
	ИК-спектроскопия	Инфракрасный спектр полимерного комплекса после нахождения в неблагоприятных условиях в области от 4 000 до 400 см^{-1} по положению полос поглощения должен соответствовать изначальному спектру полимерного комплекса	Соотв.	Соотв.
Количественное определение	УФ-спектроскопия, в соответствии с ГФ XV	Содержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % 5-ФУ	Соотв.	100,68 %, соотв.

Приложение Ж

Исследование стабильности полимерного комплекса 5-ФУ при нахождении в холодильных условиях

Показатели	Метод	Характеристика	0 мес.	2 мес.
Описание	Визуальный	Сухая пористая масса, в виде таблетки, цельная или раскрошенная масса белого или почти белого цвета	Соотв.	Соотв.
Растворимость	В соответствии с ГФ XV	Растворим в воде, практически нерастворим в спирте этиловом 95 %, хлороформе	Соотв.	Соотв.
Подлинность	УФ-спектроскопия	Ультрафиолетовый спектр испытуемого раствора в области длин волн от 220 до 350 нм имеет максимум поглощения при (266 ± 1) нм	Соотв.	Соотв.
Подлинность	ИК-спектроскопия	Инфракрасный спектр полимерного комплекса после нахождения в неблагоприятных условиях в области от 4000 до 400 см^{-1} по положению полос поглощения должен соответствовать изначальному спектру полимерного комплекса	Соотв.	Соотв.
Количественное определение	УФ-спектроскопия, в соответствии с ГФ XV	Содержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % 5-ФУ	Соотв.	99,20 %, соотв.

Приложение И

Исследование стабильности полимерного комплекса 5-ФУ при нахождении в комнатных условиях

Показатели	Метод	Характеристика	0 мес.	18 мес.
Описание	Визуальный	Сухая пористая масса, в виде таблетки, цельная или раскрошенная масса белого или почти белого цвета	Соотв.	Соотв.
Растворимость	В соответствии с ГФ XV	Растворим в воде, практически нерастворим в спирте этиловом 95 %, хлороформе	Соотв.	Соотв.
Подлинность	УФ-спектроскопия	Ультрафиолетовый спектр испытуемого раствора в области длин волн от 220 до 350 нм имеет максимум поглощения при (266 ± 1) нм	Соотв.	Соотв.
	ИК-спектроскопия	Инфракрасный спектр полимерного комплекса после нахождения в неблагоприятных условиях в области от 4000 до 400 см^{-1} по положению полос поглощения должен соответствовать изначальному спектру полимерного комплекса	Соотв.	Соотв.
Количественное определение	УФ-спектроскопия, в соответствии с ГФ XV	Содержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % 5-ФУ	Соотв.	98,90 %, соотв.

Приложение К

Спецификация полимерного носителя – полиметакриловой кислоты

Общие сведения:

Наименование: полиметакриловая кислота (ПМАК);

Назначение: носитель для таргетной доставки 5-ФУ в опухолевую ткань.

Физико-химические характеристики перечислены в таблице.

Параметр	Значение	Метод контроля
Описание	Бесцветное стеклообразное хрупкое вещество	Визуальный
Растворимость	Растворима в воде, метаноле, диметилсульфоксиде, диметилформамиде. Плохо растворима в ацетоне. Не растворима в хлороформе, гексане, диэтиловом эфире	В соответствии с требованиями ГФ XV издания (ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость»)
Молекулярная масса (M_n)	Не более 40 кДа	Гель-проникающая хроматография (ГПХ)
Молекулярно-массовое распределение	$\bar{M} < 1,2$	Гель-проникающая хроматография
Чистота	Отсутствие мономера и остаточных органических растворителей	Газовая хроматография
Водородный показатель	pH 2%-го водного раствора $\leq 3,0$	Потенциометрическое определение pH
ИК-спектроскопия	Широкая полоса валентных колебаний O–H в области $3400\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, валентные колебания CH: 2997 см^{-1} , валентные колебания карбоксильной группы C=O: 1712 см^{-1} , 1695 см^{-1}	ИК-спектроскопия
Удаление концевой группы агента	Отсутствие сигнала в области 2,0–1,5 м. д.	ЯМР-спектроскопия
Микробиологическая чистота	Должна быть стерильна	В соответствии с требованиями ГФ XV издания (ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота»)

Функциональные свойства:

ПМАК обладает выраженной иммуностимулирующей активностью, что проявляется в модуляции уровней ключевых цитокинов, таких как IL-6 (снижение в 1,35 раза) и IL-17 (увеличение в 2,24 раза). Кроме того, в эксперименте на

ранней стадии онкогенеза введение ПМАК приводило к торможению роста опухоли на 77–79 %, что подтверждает её противоопухолевый потенциал, опосредованный активацией иммунных механизмов.

Безопасность:

Острая токсичность (LD_{50} , крысы): >1500 мг/кг (внутрибрюшинно).

Гистология: Отсутствие значимых изменений в печени, почках, селезенке

Требования к производству:

Мономер: метакриловая кислота (степень чистоты $\geq 99,9$ %).

Растворитель: диметилформамид.

Инициатор: динитрил азобисизомасляной кислоты.

Условия синтеза: радикальная полимеризация в растворе, 70 °С; очистка: переосаждение, лиофилизация; контроль молекулярно-массовых характеристик: ГПХ; удаление группы агента: метод ^1H ЯМР-спектроскопии.

Условия хранения и стабильность:

Форма выпуска: Лيوфилизированный порошок в пенициллиновых флаконах.

Хранение: в защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С.

Приложение Л

Спецификация полимерного комплекса 5-фторурацила на основе полиметакриловой кислоты

Общие сведения:

Наименование: Полимерный комплекс 5-фторурацила с полиметакриловой кислотой.

Назначение: Противоопухолевая система доставки для внутривенного введения.

Форма выпуска: Лиофилизированный порошок для приготовления раствора.

Состав:

Активное вещество: 5-фторурацил.

Полимерный носитель: Полиметакриловая кислота.

Физико-химические характеристики перечислены в таблице.

Параметр	Значение	Метод контроля
Описание	Сухая пористая масса, в виде таблетки, цельная или раскрошенная масса белого или почти белого цвета	Визуальный
Растворимость	Растворим в воде, практически нерастворим в спирте этиловом 95 %, хлороформе	В соответствии с требованиями ГФ XV издания (ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость»)
Молекулярная масса (M_n)	Не более 40 кДа	Гель-проникающая хроматография
Молекулярно-массовое распределение	$\bar{D} < 1,2$	Гель-проникающая хроматография
Чистота	Отсутствие мономера и остаточных органических растворителей	Газовая хроматография
Водородный показатель	pH 0,5 % водного раствора $\leq 6,0$	Потенциометрическое определение pH
Степень включения	≥ 50 %	УФ-спектроскопия
ИК-спектроскопия	Валентные колебания – C=O группы пиримидинового цикла в области $1668-1722 \text{ см}^{-1}$, валентные колебания – C=O карбонильная группа алифатической карбоновой кислоты: 1708 см^{-1} , валентные колебания C–F: 1247 см^{-1} , деформационные колебания C–H пиримидинового кольца 814 см^{-1}	ИК-спектроскопия
Кинетика высвобождения	В кислой среде (при pH 5,1) выше ≥ 15 %	Диализ, УФ-спектроскопия
Микробиологическая чистота	Должна быть стерильна	В соответствии с требованиями ГФ XV изд. (ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота»)

Фармакологические свойства:

Полимерный комплекс 5-ФУ после введения вызывает значительное повышение концентрации IFN- γ , а также обеспечивает статистически значимое уменьшение объёма опухоли на 35,3 %.

Безопасность:

Острая токсичность (LD_{50} , крысы): >1500 мг/кг (внутрибрюшинно).

Гистология: Отсутствие значимых изменений в печени, почках, селезенке

Условия хранения и стабильность:

Первичная упаковка: Стеклянные флаконы 10 мл, герметично укупоренные.

Условия хранения: в защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С.

Срок годности: 24 месяца.

Рекомендации по применению:

Способ введения: Внутривенная инфузия.

Стандартная доза: 12 мг/кг (по 5-ФУ) 1 раз в 3 дня.