

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НЕФТЕХИМИИ

На правах рукописи

ГРИГОРЬЕВА Майя Владимировна

ПРОЛОНГИРОВАННАЯ ФОРМА ЦИТОЗАРА НА ОСНОВЕ
БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОЛИУРЕТАНОВ

02.00.10 - биоорганическая химия, химия природных
и физиологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев - 1993



№ 27.02.02

Работа выполнена в отделе биосовместимых полимеров
Института химии высокомолекулярных соединений Академии
наук Украины

Научный руководитель - доктор биологических наук,
профессор Г. А. Пхакадзе

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Н. П. Дмитренко

доктор химических наук В. В. Шевченко

Ведущее учреждение :

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН Украины

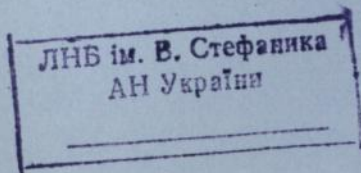
Защита состоится "23" "апреля" 1993 г. в 10 часов
на заседании специализированного ученого совета
Д 016.65.01 в Институте биоорганической химии и нефтехимии
АН Украины (253660, Киев, ул. Мурманская, 1)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института биоорганической химии и нефтехимии АН Украины

Автореферат разослан "22" "марта" 1993 г.

Ученый секретарь

специализированного ученого совета *Д. М. Федоряк* Д. М. Федоряк



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема предупреждения, распознавания и лечения злокачественных опухолей - одна из самых сложных в современной науке. Известно достаточно много различий в характеристиках нормальных и опухолевых клеток (высокая скорость митоза, повышенный эндоцитоз, суммарный поверхностный заряд, опухоль-специфические антигены и т.д.), однако, формы злокачественного роста весьма разнообразны, а указанные отличия непостоянны. В то же время применяемые в медицине противоопухолевые (ПО) препараты, уничтожая опухолевые клетки, почти столь же разрушительно воздействуют и на нормальные. В настоящее время, множество усилий направлены на то, чтобы повысить селективность ПО препаратов и снизить их токсичность. В связи с этим применение полимерных систем в качестве носителей ПО лекарств представляется перспективным, так как варьирование структуры полимерного носителя допускает благоприятные изменения фармакологических свойств, таких как биораспределение, проницаемость мембран, биотрансформация или фармакодинамика. Экспериментальные результаты и представления, сформулированные в ряде работ, свидетельствуют о перспективности применения биодеструктурируемых в организме полиуретанов для создания пролонгированных лекарственных форм.

Поэтому задача получения новых полимерных ПО препаратов, а также их конструирование на основе известных низкомолекулярных лекарств, оказывающих при выраженном терапевтическом эффекте минимальное повреждающее действие, является актуальной.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было изыскание возможности создания пролонгированной формы антилейкозного препарата - цитозара (Ага-С), имеющего небольшой период полураспада, что существенно затрудняет его применение в клинике. Для этого необходимо было решить следующие задачи: 1. Изучить кинетические закономерности реакции взаимодействия Ага-С с фенилизоцианатом в качестве модели формирования конъюгата пенополиуретана с Ага-С. 2. Определить активность кислой фосфатазы и щелочной фосфатазы в организме животных при имплантации биодеструктурируемых полиуретанов - потенциальных полимерных матриц для иммобилизации ПО лекарств. 3. Иммобилизовать Ага-С на биодеструктурируемой полиуретановой матрице. 4. Изучить выход Ага-С из полимерной матрицы в гидролизующую среду в опытах *in vitro*. 5. Исследовать активность иммобилизованного Ага-С по отношению к ферменту-мишени

- обратной транскриптазе HIV-1. 6. Изучить ПО действие иммобилизованного Ага-С на мышцах с перевитым лейкозом L 1210.

Научная новизна работы. Показана принципиальная возможность получения изоцианатсодержащего конъюгата пенополиуретана с Ага-С, способного снижать общую токсичность Ага-С и увеличивать его терапевтическую эффективность. Установлено, что по активности ферментов кислой и щелочной фосфатаз можно оценивать биосовместимость полимерных имплантатов и интенсивность биодеструкции. Впервые проведена иммобилизация цитозара на биосовместимых биодеструктируемых носителях. Показано, что количество химически связанного препарата можно варьировать путем изменения соотношения между активными изоцианатными группами полиуретановой матрицы и водой. Исследованы кинетика выхода Ага-С из полимерной матрицы в гидролизующую среду и влияние иммобилизованного цитозара на активность обратной транскриптазы HIV-1 в опытах *in vitro*. Установлено, что в ходе иммобилизации цитозара его ингибирующая активность по отношению к ферменту-мишени не снижается и сопоставима с нативным препаратом. Показано, что при снижении общей токсичности препарата в пролонгированной форме, он эффективно препятствует развитию лейкоза, значительно увеличивая продолжительность жизни животных.

Практическая значимость работы. Проведенные исследования позволяют рекомендовать для применения в клинике в качестве депо-форм противоопухолевых лекарств препараты, полученные на основе биодеструктируемых биосовместимых полиуретанов.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы докладывались на сессии Совета по проблеме "Высокомолекулярные соединения" при АН Украины (Киев, 1980 г.), VI Всесоюзном симпозиуме "Синтетические полимеры медицинского назначения" (Алма-Ата, 1983 г.), VIII Республиканской конференции по высокомолекулярным соединениям (Рубежное, 1990 г.), IX Всесоюзном симпозиуме "Синтетические полимеры медицинского назначения" (Звенигород, 1991 г.), VI Украинском биохимическом съезде (Киев, 1992 г.), 3-й Европейской конференции Восток-Запад по материалам и процессам (Страсбург, 1992 г.).

Публикации. Результаты выполненных исследований изложены в 12 научных публикациях.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 133 наименований. Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 20 рисунков и 7 таблиц.

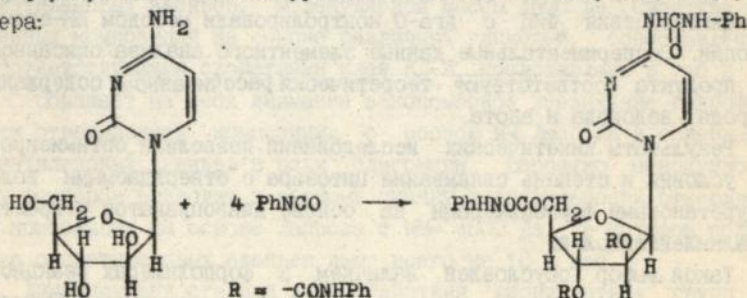
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Во введении обоснована актуальность и определена цель работы, указаны ее научная новизна и практическая значимость, обобщены основные научные результаты.

Первая глава является обзором литературы, в котором отражены сведения о полимерах-носителях ПО лекарственных препаратов. Большое внимание уделено ПО лекарственным формам пролонгированного действия на основе биодеструктурируемых полимерных носителей, в которых лекарство не связано химически с полимером ("наполненные" полимеры) или же иммобилизовано на полимерной матрице (полимеры "прививочного" типа). Рассмотрены критерии биосовместимости полимерных носителей, имплантированных в организм экспериментальных животных. Отмечен недостаток информации о возможном использовании биодеструктурируемых полиуретанов в качестве носителей ПО лекарств.

Во второй главе описаны объекты исследований, методика кинетических исследований, синтез изоцианатсодержащих носителей, методики определения активности ферментов - кислой и щелочной фосфатаз, обратной транскриптазы HIV-1. В работе были использованы методы ИК- и УФ-спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), потенциметрического титрования и элементного анализа.

В третьей главе изложены экспериментальные данные и проведено их обсуждение. Поскольку как иммобилизация Ага-С, так и формирование полиуретановой матрицы связаны с реакциями изоцианатных групп, то были исследованы закономерности этих реакций в системах реагентов с монофункциональным изоцианатом. Были изучены кинетические закономерности некаталитического и катализируемого $\text{Fe}(\text{acac})_3$ взаимодействия Ага-С с фенилизотиоцианатом (ФИЦ) в сопоставлении с кинетическими параметрами взаимодействия ФИЦ с водой - модели формирования пенополиуретана из изоцианатсодержащего форполимера:



Выбор катализатора был обусловлен особенностями тонкого механизма каталитического действия $\text{Fe}(\text{acac})_3$, заключающегося в предварительном алкоголизе этого хелата с образованием координационно-ненасыщенного $\text{Fe}(\text{acac})_2\text{OR}$, который в дальнейшем выполняет роль активного каталитического центра и позволяет избежать протекания вторичных реакций, требующих дополнительного расхода изоцианатных групп, а, следовательно, введения больших избытков токсичного изоцианата.

Сопоставление анаморфоз, построенных в кинетических координатах простой реакции второго порядка со стехиометрическим соотношением реагентов, показало, что анаморфоза кинетической кривой некаталитической реакции ФИЦ с водой строго линейна до высоких степеней превращения изоцианата, тогда как аналогичная анаморфоза взаимодействия ФИЦ с Ага-С имеет точку перегиба, соответствующую 50 %-яому превращению изоцианата. Подобное отклонение от линейности, по-видимому, обусловлено различной реакционной способностью двух пар функциональных групп цитозара во взаимодействии с ФИЦ. Совпадение величины k_1 и константы скорости взаимодействия ФИЦ с водой подтверждает различие в реакционной способности ОН-групп цитозара, поскольку согласно ранее опубликованным данным скорости взаимодействия изоцианата с водой и первичными спиртами имеют близкие значения.

Введение в реакцию катализатора, вероятно, приводит к нивелированию реакционной способности всех ОН-групп цитозара, тогда как скорость взаимодействия ФИЦ с NH_2 -группой пиримидинового кольца остается практически неизменной, о чем свидетельствует участок анаморфозы после 75-78 %-ного превращения ФИЦ. Наблюдаемый каталитический эффект представляется закономерным, поскольку $\text{Fe}(\text{acac})_3$ селективно активирует исключительно ОН-группы гидроксилсодержащего реагента (табл. 1).

Полноту протекания реакции и идентификацию конечного продукта взаимодействия ФИЦ с Ага-С контролировали методом ИК-спектроскопии. Экспериментальные данные элементного анализа описанного выше продукта соответствуют теоретически рассчитанному содержанию углерода, водорода и азота.

Результаты кинетических исследований позволили оптимизировать условия и степень связывания цитозара с отверждаемыми водой полиуретановыми форполимерами на основе диизоцианатов и простых оксиалкиленгликолей.

Такой выбор обусловлен наличием в форполимерах реакционноспособных групп, позволяющих осуществить ковалентную иммобилизацию препарата; возможностью регулирования гидрофильно-гидрофоб-

ного баланса полимерной матрицы; возможностью управления процессом связывания цитозара с носителем и скоростью высвобождения препарата.

Таблица 1
Кинетические параметры взаимодействия фенилизотиоцианата с цитозаром и водой

Реакция	Цитозар		Вода
	$k_1 \cdot 10^3$, л/(моль·с)	$k_2 \cdot 10^3$, л/(моль·с)	$k \cdot 10^3$, л/(моль·с)
Некаталитическая	4,2±0,2	3,2±0,1	4,7±0,2
Каталитическая	30,0±1,3	4,2±0,2	7,8±0,4

Природа гликоля оказывает значительное влияние на прочностные, эластичные и сорбционные свойства полиуретанов и их совместимость с живыми тканями.

Выпускаемая в настоящее время полиуретановая композиция медицинского назначения (клей КЛ-3) представляет собой макродиизоцианат на основе полиоксипропиленгликоля ММ-1500 Да и ТДИ. Выбор такого гликоля определяется хорошими эластичными и прочностными свойствами отвержденной композиции, однако недостаточная гидрофильность матрицы (см. табл. 2) создает сложности при использовании этой композиции в качестве носителя лекарственных препаратов.

Поэтому в качестве гликолевой компоненты при синтезе макродиизоцианата нами использованы блск-сополимеры полиоксиэтилен- и полиоксипропиленгликолей с различным соотношением звеньев и разной молекулярной массы (фирменное название "Лапрол"). Так, например, Лапрол 4502-2-80 обозначает гликоль с содержанием 80 % полиоксиэтиленовых звеньев, молекулярной массы 4500 Да. Свойства полученных композиций на основе различных гликолей, сопоставленные с соответствующими свойствами клея КЛ-3, представлены в таб. 2

Обращает на себя внимание закономерное увеличение гидрофильности отвержденной композиции с ростом ММ Лапрола и содержания оксиэтиленовых звеньев в цепи олигомера. Вероятно совокупность этих факторов приводит к резкому скачку гидрофильности отвержденной композиции на основе Лапрола с ММ- 4500 Да, в котором содержание оксиэтиленовых звеньев выше всего на 10 % мас.

Лимитирующей стадией взаимодействия изоцианатных групп с водой является образование неустойчивой карбаминовой кислоты.

Введение $\text{Fe}(\text{асас})_3$ позволяет регулировать скорость этой стадии. Установлено, что наиболее оптимальной следует считать концентрацию катализатора - 0,02 % мас., поскольку параметры пенообразования в этом случае являются удовлетворительными (время старта пены - 130 с; время потери липкости - 3 ч; соотношение $\text{H}_2\text{O} / \text{NCO}$ (моль) = 5,0) и обеспечивают получение стабильной пены, в которой полимерные стенки пузырьков выделяющегося газа обладают достаточной прочностью и не разрушаются под давлением CO_2 .

Таблица 2

Свойства отвержденных водой ПУ-композиций на основе различных гликолей. Время отверждения 24 ч при температуре 40 °С.

Полимерная основа	Концентрация катализатора, % мас.	Степень набухания в воде, % мас.
КЛ-3	1,8 (УП 606/2)	2,1
Лапрол 1502	0,02	3,0
Лапрол 1602-2-70	0,02	13,7
Лапрол 2502-2-70	0,02	17,0
Лапрол 4502-2-80	0,02	30,4

Установлено, что при имплантации полимерный материал подвержен деструкции под влиянием жидких сред организма. Для характеристики взаимодействия полимер-ткань важные сведения дает определение активности кислой и щелочной фосфатаз. Кислая фосфатаза (КФ) является маркером лизосом, а величина ее активности может отражать как гистотоксичность полимера, так и интенсивность биодеструкции. Щелочная фосфатаза (ЩФ) отражает транспортные процессы в клетках и, следовательно, их функциональную активность.

Для биохимического определения активности КФ проводили имплантацию под капсулу почек кроликов полимерных пленок следующего состава: 1) пленки-матрицы на основе олигогликоля (ММ 4500) и толуиленидиизоцианата; 2) пленки А-10 на основе гексаметилендиизоцианата и полидиэтиленгликольадипината (ММ 1500) с удлинителем цепи этиленгликолем; 3) пленки Д-1 на основе гексаметилендиизоцианата и окситетраметиленгликоля (ММ 1000), содержащие в составе основной цепи полимера природный фрагмент - L-фенилаланил-L-серин. Материалы 2) и 3) были исследованы в качестве контроля, поскольку их биосовместимость была установлена ранее иными методами. Как видно из результатов приведенных в таблице 3 на 7-е и 14-е сутки после имплантации пленки-матрицы происходит достоверное, по срав-

Таблица 3

Активность кислой фосфатазы в гомогенатах почек кроликов
(в нмоль P_i на 1 мг белка за 1 мин ; $M \pm m$; $n= 5-6$)

Почка	Сроки после имплантации				
	7 суток	14 суток	30 суток	90 суток	1 год
	Полимер - матрица				
Оперированная	35,1± 3,1*	30,2± 3,5	27,2± 2,6	25,3± 3,3	25,4± 4,4
Противоположная	36,0± 2,9*	35,8± 4,0*	27,2± 2,9	27,7± 4,1	25,2± 4,2
	Полимерная пленка А-10				
Оперированная	38,2± 4,5*	36,1± 4,6*	27,0± 1,9	25,6± 2,5	25,1± 4,2
Противоположная	38,7± 2,7*	40,2± 3,1*	28,4± 2,0	25,5± 3,2	28,1± 4,5
	Полимерная пленка Д-1				
Оперированная	40,5± 1,1*	44,2± 6,2*	38,5± 1,8*	32,2± 1,2	25± 2,0
Противоположная	41,6± 0,9*	44,4± 2,1*	41,7± 3,7*	34,5± 2,5	27,0± 1,8

Примечание: активность в интактной почке - 29,0± 2,2,

в ложнооперированной - 27,3± 1,8;

* - означает, что различия с контролем достоверны

($p < 0,05$)

нению с нормой, увеличение активности фермента в подлежащих имплантату участках почечной паренхимы. В дальнейшем в течение одного года после операции изменение активности КФ не отмечалось. В то же время методом культуры тканей было установлено, что данные образцы нетоксичны. Следовательно, изменение уровня КФ является показателем отражающим биодеструкцию полимера.

Гистохимически установлено следующее распределение КФ и ШФ в клетках, принимающих непосредственное участие в биодеструкции полимерных имплантатов: в макрофагах, фагоцитирующих полимер, наблюдался высокий уровень ШФ (указание на активацию транспортных процессов в этих клетках); в гигантских клетках инородных тел, лизирующей полимер, КФ (указание на активность лизосом).

Следующим этапом была иммобилизация цитозара на полимерах-матрицах и исследование кинетики выхода цитозара из них.

В качестве стартовой концентрации препарата была выбрана величина 70 мг/г отвержденной композиции. Такой выбор был обусловлен тем, что при этой концентрации все реакционноспособные группы цитозара должны прореагировать с NCO-группами полимерной композиции (при их общем содержании 10% мас.). При этом остается достаточное количество изоцианатных групп для последующего отверждения форполимера водой. Опыты показали, что уменьшение или значительное увеличение указанной концентрации приводит к неудовлетворительным результатам. Для первого случая - это невозможность регулирования скорости и величины выхода препарата из матрицы, во втором - неудовлетворительные свойства формирующегося пенополиуретана (появление трещин, неравномерность распределения пор, излишняя жесткость и пр.).

Как видно из рис. 1 максимальный выход препарата достигается при пятикратном (по сравнению со стехиометрическим) избытке воды. При этом сохраняется приемлемая структура полимерной губки. Увеличение количества отвердителя не дает устойчивой пены. Такое соотношение воды и активных изоцианатных групп удается поддерживать при проведении процесса связывания цитозара в климокамере в условиях 100%-ной влажности.

Изучение выхода цитозара из полимерной матрицы в опытах *in vitro* показало, что количество цитостатика в экстракте и скорость процесса его выделения в гидролизующую среду определяются количеством иммобилизованного вещества, а также гидрофильностью и ММ полимера.

В эксперименте исследовали полимерные матрицы с ММ 1600, 2500, 4500 Да, содержащие 70 мг препарата на 1 г полимера.

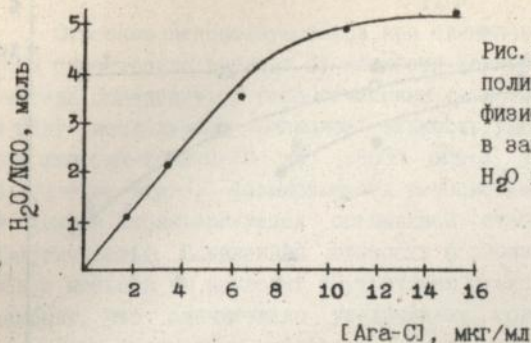


Рис. 1. Выход цитозара из полимерной матрицы в физиологический раствор в зависимости от соотношения H₂O и полимера (Ларол-1600).

В зависимости от ММ форполимера выход препарата из полимерной матрицы достигается спустя 4-8 часов (рис. 2.). Причем количество выделяющегося Ага-С закономерно выше для полимеров с низкой ММ.

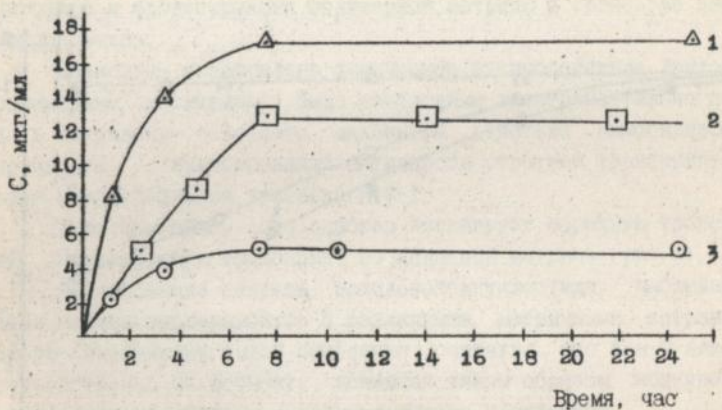


Рис. 2. Выход цитозара из полимерной матрицы в физиологический раствор. 1 - Л-1600, 2 - Л-2500, 3 - 4500

При одинаковых стартовых условиях иммобилизации цитозара и химической природе реагирующих групп, следует отметить упомянутое ранее увеличение гидрофильности при переходе от полимера с ММ 1600 Да к полимеру с ММ 4500 Да. Следствием этого является более полное ковалентное связывание гидрофильного Ага-С и уменьшение доли физически сорбированного препарата. Однако, по-видимому, кинетика выхода Ага-С в большей степени определяется структурными особенностями полиуретановых матриц и прежде всего соотношением открытых и закрытых пор.

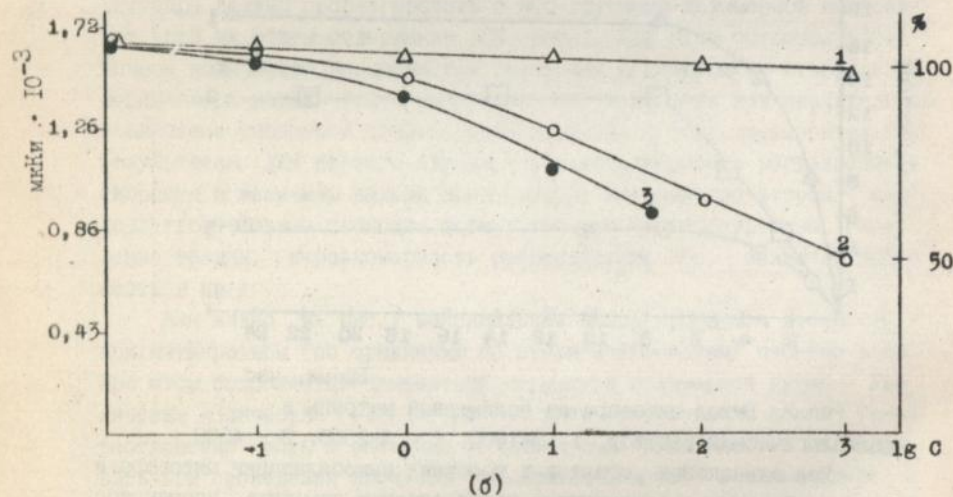
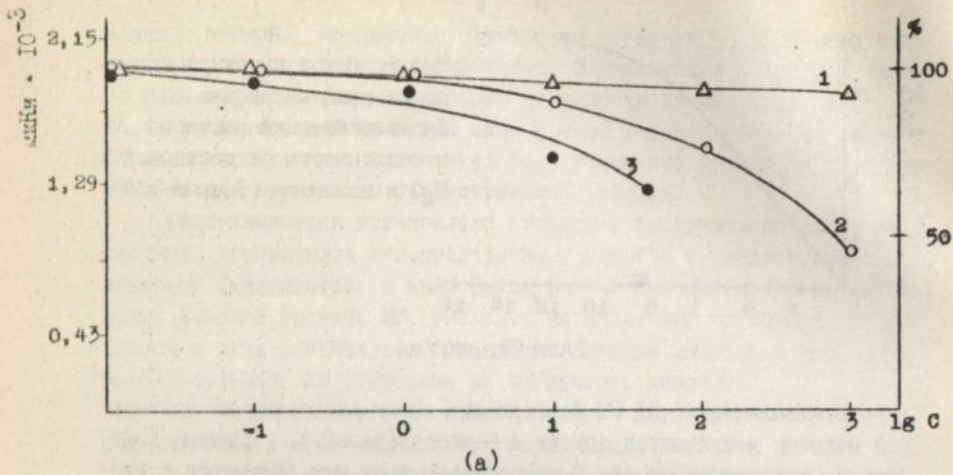


Рис. 3. Ингибирование обратной транскриптазы HIV-1
иммобилизованным Ara-C
1 - полимер; 2 - Ara-C; 3 - полимер + Ara-C
(a) - poli A, oligo dT, ^3H -dTTP
(б) - poli rмC, oligo dT, ^3H -dGTP

Строение пенополиуретанов при одинаковой скорости выделения газа существенно зависит от вязкости форполимера, которая в свою очередь определяется реологическими свойствами исходного гликоля. В ряду исследуемых Лапролов вязкость увеличивается от 6000 мПа·с для Лапрола-1602-2-70 до 18000 мПа·с у Лапрола-1502-2-80. Вследствие этого, формирующаяся реносистема на основе этого олигогликоля характеризуется повышенной стабильностью и высокой эластичностью. Пониженная вязкость форполимеров на основе Лапролов с меньшей ММ приводит к утончению стенок ячеек с газом и их разрыву, что значительно увеличивает содержание открытых пор с физически включенным цитозаром, выход которого в этих условиях определяется скоростью диффузии в гидrolитическую среду.

Очевидно, что основываясь на этих данных, нельзя однозначно судить о выходе цитозара из полимерной матрицы в организм. Учитывая, что биодеструкция наполненного полиуретана начинается с первых дней воздействия организма, можно предположить, что диффузия цитозара и биодеструкция полимерной матрицы в организме протекают одновременно.

Поскольку установлено химическое взаимодействие цитозара с полимерным носителем, было необходимо экспериментально подтвердить сохранение основного механизма действия иммобилизованного препарата - ингибирования активности обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека HIV-1.

Было показано, что цитозар ингибирует обратную транскриптазу, синтезирующую транскрипт по заданной матрице (рис. 3).

Блокирование синтеза полидезоксинуклеотида, наблюдаемое в двух сериях экспериментов с различными матричными затравками и предшественниками, дало основание считать, что Aga-C влияет непосредственно на фермент, исключая таким образом конкуренцию с нуклеозидтрифосфатами и взаимодействие с матрицей.

Экстракт из контрольных полимерных образцов (без Aga-C) не меняет активности обратной транскриптазы, как в случае с полирибонуклеотином, так и с полирибозиметилцитозиним в качестве матрицы, следовательно, не содержит ингибиторов.

Экстракт, полученный из полимерной матрицы с иммобилизованным Aga-C (70 мг/г полимера), обладает ингибирующей способностью, практически такой же как раствор нативного препарата сопоставимой концентрации.

Завершающей стадией исследования было изучение противоопухо-

левого действия иммобилизованного цитозара в опытах на экспериментальных животных с перевитым лейкозом L 1210.

Исследовали токсичность цитозара, иммобилизованного на полимерной матрице, и свободного цитозара, введенного одно- и многократно в одной и той же суммарной дозе мышам BDF₁. При этом токсический эффект был максимальным при введении в брюшную полость свободного препарата в дозе 30-35 мг/кг 5 раз ежедневно (масса животных снижалась более чем на 15 %, погибло 30 % животных), средним - при введении свободного препарата в дозе 160 мг/кг - однократно и минимальным - при введении препарата, иммобилизованного в полимерной матрице, в той же дозе.

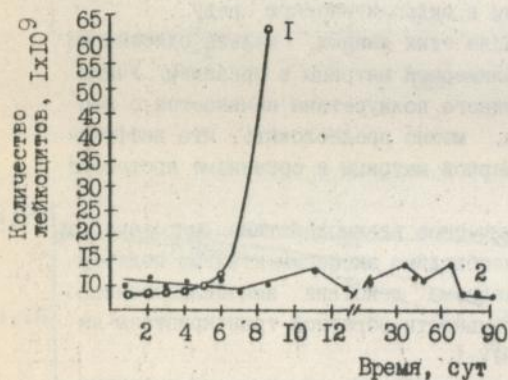


Рис. 4. Изменение количества лейкоцитов у мышей с лейкозом L 1210 с имплантатом Л-4500 (70 мг Ага-С на 1 г полимера).

I - контроль; 2 - опыт

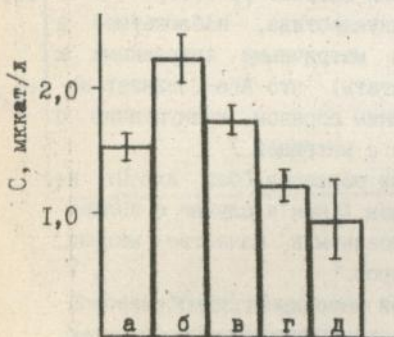


Рис. 5. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови мышей DVA₂. а - Интактные животные; б - животные с перевитым лейкозом L 1210; в - лейкозные животные с имплантатом; г - лейкозные животные + дробные инъекции; д - лейкозные животные + одноразовые инъекции

При действии цитозара, иммобилизованного в полимерную матрицу ММ 1600 и 2500 Да (концентрация 70-200 мг/г, доза - 80, 200, 300, 500 и 1000 мг/кг), не получено положительных результатов. При введении цитозара в полимерную матрицу ММ 4500 Да, концентрации 70 мг/г и доза 160 мг/кг отмечено излечение 14-50 % животных. Мыши жили в течение 90 суток, после чего их забивали под эфирным наркозом. Масса животных была в пределах нормы. В течение 90 суток отмечено 3 пика повышения количества лейкоцитов в периферической крови приблизительно в 2 раза на 11, 32 и 66-е сутки (рис. 4). К концу опыта содержание лейкоцитов в крови было в пределах физиологической нормы. В остальные сроки исследования увеличение продолжительности жизни животных было равным 53-72 %.

Одновременно с вышеописанными исследованиями мы проводили анализ сывороточной щелочной фосфатазы в крови экспериментальных животных в качестве промежуточного контрольного показателя, так как ранее было установлено, что развитие некоторых злокачественных опухолей коррелирует с увеличением синтеза ЩФ и повышением уровня ее активности.

На рис. 5 представлены результаты, полученные при определении активности ЩФ у пяти групп мышей DBA₁. Уровень активности фермента у интактных животных в среднем составлял 1,5 мккат/л (группа а). В группе (б) определяли активность ЩФ спустя сутки после перевивки лейкоза L 1210. Активность ЩФ у животных этой группы была увеличена на 46 % по отношению к норме. Группе (в) одновременно с перевивкой лейкоза была имплантирована полимерная матрица с иммобилизованным цитозаром (1000 мг/кг). Установлено, что на 5-7 сутки активность ЩФ у животных этой группы практически приближается к норме. Животным двух оставшихся групп внутрибрюшинно вводили цитозар в той же дозе, что и при имплантации. Однако в группе (г) это были дробные инъекции: 2х100мг/кг в день в течение 5 дней, а в группе (д) - одноразовая инъекция - 1000 мг/кг. В результате активность ЩФ снижалась на 20 % и 40 % соответственно.

Результаты проведенных экспериментов позволяют сделать заключение о возможности создания на основе биодеструктурируемых биосовместимых полиуретанов депо-форм антилейкозных препаратов со стойким сохранением цитостатического действия.

ВЫВОДЫ

1. Установлены кинетические закономерности некаталитических и катализируемых трис(ацетилацетонатом) железа реакций цитозара и воды с фенилизотианатом, позволившие оптимизировать условия связывания препарата с изоцианатсодержащими полиуретановыми матрицами.

2. Разработана рецептура водоотверждаемых изоцианатсодержащих композиций и исследованы свойства полиуретанов на основе оксиалкиленгликолей различного состава и молекулярной массы.

3. Разработан метод оценки биосовместимости полимеров, основанный на определении активности фермента кислой фосфатазы в тканях экспериментальных животных. Установлено, что синтезированные полимерные матрицы обладают хорошей биосовместимостью.

4. Проведена иммобилизация цитозара на синтезированных полиуретановых носителях. Показано, что количество химически связанного препарата можно варьировать путем изменения соотношения между активными изоцианатными группами полимерной матрицы и водой.

5. Исследованы кинетика выхода цитозара из полимерной матрицы в физиологический раствор и влияние иммобилизованного цитозара на активность обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека HIV-1 в опытах *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе иммобилизации цитозара его ингибирующая активность по отношению к ферменту-мишени не снижается и сопоставима с нативным препаратом.

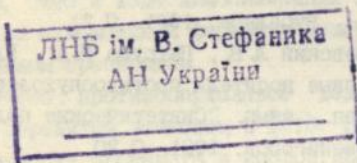
6. Изучено противоопухолевое действие иммобилизованного цитозара с перевитым лейкозом L 1210. Показано, что при снижении общей токсичности препарата в пролонгированной форме, он эффективно препятствует развитию лейкоза, увеличивая продолжительность жизни животных по сравнению с контрольной группой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шукина Л. В., Довгопол Н. И., Григорьева М. В. Активность кислой фосфатазы почек кроликов при субкапсулярной имплантации полиуретана // В кн. Биодеструктурирующие полимерные материалы, Киев: Наукова думка. - 1982. - С. 61-64.
2. Пхакадзе Г. А., Яценко В. П., Коломийцев А. К., Григорьева М. В., Коноплицкая К. Л., Неумержицкий А. Л. Сравнительная оценка активности фосфомоноэстераз в качестве теста для определения биосовместимости полимерных аллоимплантатов // Докл. АН УССР, сер. Е. - 1982. - № 6. - С. 69-71.
3. Липатова Т. Э., Коноплицкая К. Л., Шукина Л. В., Григорьева М. В. Активность кислой фосфатазы в почках кроликов при имплантации различных полиуретанов // Укр. биохим. журн. - 1982. - Т. 54, № 3. - С. 284-286.
4. Познякова Т. Н., Григорьева М. В., Довгопол Н. И. Изменение ферментативной активности тканей как отражение биодеструкции полимерных имплантатов // Материалы 6 всесоюз. симп. "Синтетические полимеры медицинского назначения", Алма-Ата, 1983. - С. 149-150.
5. Рахлевский Л. В., Григорьева М. В., Пхакадзе Г. А. Имобилизация трипсина на полиуретановых носителях // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 63, № 3. - С. 94-97.
6. Рахлевский Л. В., Григорьева М. В., Гладырь И. И. Модификация полиуретанов диизоцианатами // Матер. Республ. конфер. по высокомолекулярным соединениям. - Рубежное, 1991. С. 21.
7. Григорьева М. В., Рахлевский Л. В., Петруша Н. А., Гладырь И. И., Пхакадзе Г. А. Полиуретановые носители противоопухолевых препаратов // Материалы IX Всесоюз. симп. "Синтетические полимеры медицинского назначения". - Звенигород, 1991. С. 20.
8. Григорьева М. В., Рахлевский Л. В., Пхакадзе Г. О. Влияние иммобилизованного цитозинарабинозиду на лужну фосфатазу лейкозных мишей // Материалы VI Укр. биохим. з'їзду. - Київ, 1992. - С. 116.
9. Григорьева М. В., Рахлевский Л. В., Петруша Н. А., Пхакадзе Г. А. Кинетические закономерности реакции цитозинарабинозиду с фенилвоцианатом // Укр. хим. журн. 1993. - № 4 - С. 321-325.
10. Петруша Н. А., Григорьева М. В., Рахлевский Л. В., Кулик Г. И., Пхакадзе Г. А., Моргарт Н. В. Исследование противоопухолевого действия препаратов, иммобилизованных на полимерной матрице, у животных с опухолью // Экспериментальная онкология. - 1993. № 3. - С. 81-83.

11. Григор'єва М. В., Пхакадзе Г. О., Гладир І. І., Рахлевський Л. В. Інгібування зворотної транскриптази HIV-I імобілізованим цитозаром. - Доповіді АН України. - 1993. - № 3. - С. 139-141.
12. Pkhakadze G., Rahlevsky L., Grigoieva M., Gladyr I. New one part polyurethane adhesives for medical application and antitumor drug release systems on it // The 3rd Eur. East-West Confer. on Materials and Processes. - Strasburg, France. - Nov. 3-6, 1992. - P. 129-130.

Соискатель



Подп. к печ. 9.03.93.

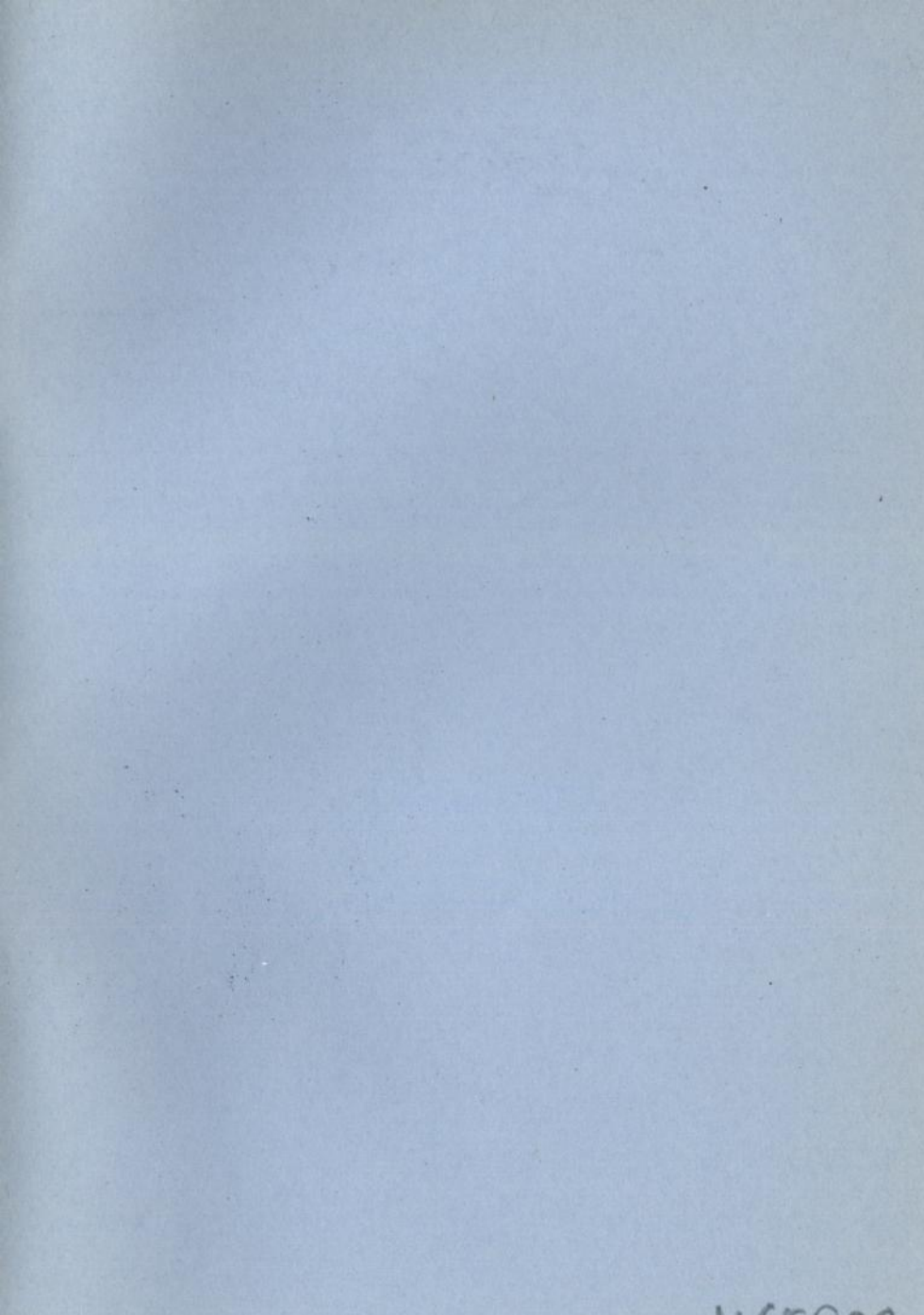
Формат 10¹/₁₆ Бумага Тин 62.

Печ. офс. Усл. печ. л. 0,93.

Уч.-изд. л. 0,66. Тираж 100.

Зак. 3-3343

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Репина, 4.



AV 27.022