

Е. Ф. Панарин¹, Н. А. Нестерова¹, И. И. Гаврилова¹, Н. П. Иванова¹,
А. Т. Белохвостова², Л. С. Потапенкова²

СИНТЕЗ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПОЛИ-N-ВИНИЛФОРМАМИДА

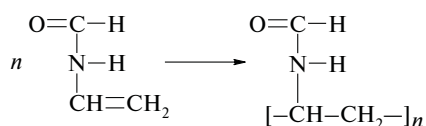
¹ Учреждение Российской Академии Наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Научно-исследовательский институт онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Росздрава, Санкт-Петербург, Россия

Синтезирована серия образцов поли-N-винилформамида в широком диапазоне молекулярных масс от $8,7 \cdot 10^3$ до $280 \cdot 10^3$. Установлено влияние величины молекулярной массы на уровень иммуностимулирующего действия. Максимальная активность обнаружена для полимеров с молекулярной массой $55 - 85 \cdot 10^3$.

Ключевые слова: поли-N-винилформамид, иммуностимулирующая активность

Поли-N-виниламиды — поли-N-винилпирролидон, поли-N-винилацетамид, поли-N-винилформамид и другие — являются водорастворимыми нетоксичными полимерами и представляют интерес в качестве полимеров-носителей и модификаторов биологически активных веществ [1]. Ранее нами были выявлены иммуностимулирующие свойства у поли-N-винилформамида (ПВФА) и сополимеров N-винилформамида с метакрилоиламиноглюкозой [2]. Данная работа посвящена синтезу образцов ПВФА с различной молекулярной массой и изучению влияния его молекулярной массы на уровень иммуностимулирующей активности.



Для решения поставленной задачи был осуществлен синтез образцов ПВФА разной молекулярной массы в диапазоне $8,7 - 280 \times 10^3$. Синтез гомополимеров проводили путем радикальной полимеризации в воде или спиртах — этиловом или изопропиловом в присутствии инициаторов — динитрила азобисизомаляной кислоты (ДАК) и смеси пероксида водорода с гидроокисью аммония. Путем изменения концентрации инициатора, мономера и подбора растворителей, с от-

личающимися константами переноса цепи на растворитель были получены образцы ПВФА, характеризующиеся различной молекулярной массой. Условия синтеза и характеристики полученных полимеров представлены в табл. 1.

Установлено существенное влияние молекулярной массы ПВФА на уровень иммуностимулирующей активности (табл. 2). Оптимальная активность наблюдается в диапазоне молекулярных масс 55000 – 85000. Наиболее выраженное иммуностимулирующее действие оказывает полимер с молекулярной массой 55000.

Экспериментальная химическая часть

Инициатор ДАК дважды перекристаллизовывали из этанола. Концентрацию H_2O_2 определяли методом перманганатометрии. N-винилформамид фирмы “Aldrich” очищали вакуумной перегонкой, $T_{\text{кип.}} 65^\circ\text{C}$ (4 мм рт. ст.). Полимеризацию вели в запаянных ампулах в атмосфере аргона. Полимеры ПВФА выделяли из реакционной среды осаждением в ацетон. Очищали повторным переосаждением в ацетон. Характеристическую вязкость ПВФА определяли в вискозиметре Уббелюде в 0,2 М водном растворе хлорида натрия при 20°C . Молекулярную массу полимеров рассчитывали с использованием уравнения Марка-Куна-Хаувинка: $[\eta] = 10,74 \times 10^{-3} \cdot M^{0,76}$ [3].

Таблица 1

Условия синтеза и характеристики ПВФА

№ п/п	Условия синтеза ПВФА					Характеристики ПВФА		
	Инициатор	Концентрация инициатора, масс. %	Растворитель	Концентрация мономера, масс. %	Время, ч	Температура, °C	Выход, масс. %	$M_n \times 10^{-3}$
1	ДАК	1	Этанол	30	4	65	99	280
2	ДАК	1	Пропанол-2	20	6	65	99	85
3	ДАК	1	Пропанол-2	20	4	65	80	55
4	$\text{H}_2\text{O}_2, \text{NH}_4\text{OH}$	2, 2,8	Вода	30	4	60	80	15
5	ДАК	6	Пропанол-2	2	6	65	90	8,7

Влияние молекулярной массы ПВФА на антителогенез

Молекулярная масса полимера	Доза, мг/кг, внутрибрюшинно	Масса селезенки, мг	Число АОК × 10 ⁶ ядерных клеток селезенки	Клеточность селезенки × 10 ²	Число АОК на селезенку × 10 ²	Коэффициент иммунного ответа (КИО)
2800	25	234,4 ± 9,3	157,0 ± 16,8	29,7 ± 1,9	465,7 ± 71,0	0,9
	10	221,2 ± 10,5	227,9 ± 20,6 *	27,1 ± 1,9 *	605,6 ± 81,7 *	1,4
	Контроль	200,0 ± 9,4	164,6 ± 10,9	37,0 ± 4,6	595,8 ± 71,8	
85000	25	238,7 ± 12,4	437,0 ± 16,7 *	32,1 ± 2,8 *	1366,6 ± 89,5 *	1,4
	10	227,5 ± 6,2	337,5 ± 11,2	35,3 ± 2,5	1170,1 ± 58,8	1,1
	Контроль	210,0 ± 22,4	308,3 ± 25,2	34,9 ± 4,4	1053,9 ± 171,3	
55000	25	196,0 ± 21,1	172,1 ± 35,3	15,2 ± 1,1	262,8 ± 102,2	2,5
	Контроль	161,2 ± 9,9	68,4 ± 11,0	18,8 ± 2,3	133,7 ± 32,8	
	10	188,7 ± 6,2	106,1 ± 9,8 *	16,0 ± 1,1 *	160,0 ± 22,1 *	1,4
	5	181,4 ± 14,7	115,9 ± 9,6	14,1 ± 2,0	175,6 ± 46,3	1,5
	Контроль	174,4 ± 26,0	76,7 ± 9,9	14,5 ± 1,8	100,6 ± 15,0	
15000	25	207,5 ± 7,4	303,7 ± 30,1	20,1 ± 1,6	619,0 ± 103,4	1,06
	10	185,6 ± 11,8	246,1 ± 24,8	17,3 ± 1,5	455,6 ± 87,3	0,86
	Контроль	200,6 ± 4,3	285,0 ± 14,5	15,6 ± 1,3	431,0 ± 25,3	
8700	25	191,2 ± 9,3	237,6 ± 22,2	23,2 ± 2,7	510,4 ± 58,7	1,2
	10	222,5 ± 16,1	253,1 ± 21,1	20,8 ± 3,1	516,4 ± 85,6	1,3
	Контроль	210,0 ± 12,9	199,5 ± 21,2	20,2 ± 1,4	394,0 ± 87,7	

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Экспериментальная биологическая часть

Опыты проводили на мышах линии BALB/C разведения питомника Рапполово.

Подопытным животным (по 8 в каждой группе) вводили исследуемые полимеры в дозах 5, 10 и 25 мг/кг внутрибрюшинно и эритроциты барана (ЭБ) в количестве 5×10^8 в 0,5 мл физиологического раствора, контрольной группе — только ЭБ. На 5 сут после иммунизации мышей забивали, извлекали селезенку, ее взвешивали и гомогенизировали в среде 199.

Гомогенат пропускали через капроновое сито и помещали в холодильник на 30 мин. В пробирку, подогретую на водяной бане до 50 °С с агарозной средой (1,5 мл агарозы 14 % и 15 мл среды 199), быстро добавляли по 0,05 мл 10 % взвеси ЭБ и 0,05 мл взвеси клеток селезенки и полученной смесью заливали чашки Петри. Чашки инкубировали в течение 90 мин в термостате при температуре 37 °С. После инкубации в каждую чашку добавляли комплемент сухой (для диагностики *in vitro* фирмы ФГУП НПО “Микроген”) в разведении 1:4 и чашки снова инкубировали в термостате в течение 1ч. В каждой чашке подсчитывали

зоны гемолиза с последующим пересчетом количества антителообразующих клеток (АОК) на 10⁶ ядерных клеток селезенки, а также на селезенку. Подсчитывали также клеточность селезенки и коэффициент иммунного ответа (КИО) как отношение числа АОК на 10⁶ клеток селезенки в опыте к числу АОК на 10⁶ клеток селезенки в контрольной группе животных. Влияние полимеров на образование АОК оценивали при введении ЭБ с использованием метода локального гемолиза в геле, для подсчета клеток индуцирующих антитела [4].

Статистическая обработка результатов исследований проводилась при помощи t-критерия Стьюдента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Э. Кирш, *Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды*, Наука, Москва (1998), сс. 144 – 200.
2. Е. Ф. Панарин, Н. П. Иванова, А. Т. Белохвостова и др., *Хим.-фарм.журн.*, **40**(3), 24 – 26 (2006).
3. Г. М. Павлов, Е. В. Корнеева, С. Ebel и др., *Высокомолек. соед. А*, **46**(10), 1732 – 1737 (2004).
4. *Иммунологические методы*, Медицина, Москва (1987), сс. 57 – 72.

Поступила 18.03.09

SYNTHESIS AND IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF POLY(N-VINYLFORAMIDE)

E. F. Panarin¹, N. A. Nesterova¹, I. I. Gavrilo¹, N. P. Ivanova¹, A. T. Belokhvostova², and L. S. Potapenkova²¹ Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;² Petrov Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

A series of poly(N-vinylformamide) (PNVF) samples with molecular masses in the range of $(8.7 - 280) \times 10^3$ were synthesized and the effect of the polymer molecular mass of on the PNVF-stimulated antibody response was investigated using BALB/C mice (Rappolovo nursery). The immunostimulating activity of the polymer was estimated by its influence on the appearance of the antibody-forming cells to sheep red blood cells by the method of local hemolysis in gel. A strong dependence of the antibody response on the polymer molecular mass was observed, the maximum activity being manifested for PNVF with molecular masses in the range of $(55 - 85) \times 10^3$.

Key words: poly(N-vinylformamide), immunostimulating activity