

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический
университет имени Д.И. Менделеева»**

На правах рукописи



Нечаева Анна Михайловна

**Электростатическое связывание доксорубицина и
бычьего сывороточного альбумина
самоорганизующимися в водных средах сополимерами N-
винил-2-пирролидона с акриловой кислотой**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» на кафедре биоматериалов

Научный руководитель: **Межуев Ярослав Олегович**, доцент, доктор химических наук, заведующий кафедрой биоматериалов ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Официальные оппоненты: **Капустин Дмитрий Валерьевич**, доктор химических наук, старший научный сотрудник лаборатории полимеров для биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Сыбачин Андрей Владимирович, кандидат химических наук, доцент кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

Защита состоится 26 декабря 2024 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета РХТУ.2.6.05 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева». (125047, г. Москва, Миусская пл., 9, конференц-зал, ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте https://www.muotr.ru/university/departments/ods/inhouse/inhouse_announcements/ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева».

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь
диссертационного совета РХТУ.2.6.05

кандидат химических наук, доцент



Биличенко Юлия Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Установление свойств нетоксичных амфифильных макромолекул, способных к самосборке в водных средах, представляет одну из фундаментальных задач на пути разработки носителей противоопухолевых препаратов и диагностикумов. Полимер-носитель способствует регулированию концентрации лекарства у фармакологической мишени, снижает побочные токсические эффекты, пролонгирует действие препарата, а также в ряде случаев может обеспечить эффект таргетирования. Для достижения перечисленных целей традиционно используются пегилированные блок-сополимеры, однако результаты последних исследований показали, что носители, содержащие гидрофильные фрагменты полиэтиленгликоля, способны активировать систему комплемента и индуцировать продукцию антител. Поэтому необходим поиск альтернативных макромолекулярных носителей лекарств и диагностических агентов, не содержащих гидрофильных оксиэтиленовых последовательностей. В этом отношении значительный интерес представляют сополимеры, гидрофильная часть которых построена остатками N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, а гидрофобная – концевыми тиоалкильными группами (амфифильные сополимеры N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой), одностадийный синтез которых отличается технологичностью и был описан ранее в патентах Кускова А.Н., Куликова П.П., Штильмана М.И. и соавторов (патенты RU2599579C2, RU2580649C1). Данная диссертация, являющаяся продолжением многолетних работ, выполняемых в Учебно-научном центре «Биоматериалы», а затем на Кафедре биоматериалов РХТУ им. Д.И. Менделеева при участии М.И. Штильмана, А.Н. Кускова, П.П. Куликова, А.Л. Лусс, Я.О. Межуева, направлена на установление закономерностей электростатического связывания доксорубина и бычьего сывороточного альбумина самоорганизующимися в водных средах сополимерами N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой. Агрегаты цепей сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, образующиеся в водных средах, способны к солубилизации гидрофобных нерастворимых в воде противоопухолевых препаратов, а также к электростатическому связыванию посредством межмолекулярных взаимодействий фармакологически активных веществ, содержащих аминогруппы, подверженные протонированию в кислой среде. К числу

таких лекарств относится доксорубин, обладающий широким спектром противоопухолевой активности. В то же время, выраженная кардиотоксичность и значительная растворимость в кислых водных средах осложняет его применение в терапии рака. Таким образом, использование сополимеров N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты может способствовать уменьшению побочных токсических эффектов доксорубина, а также его применению в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами, включенными в агрегаты, что соответствует приоритетам, обозначенным в «Национальной онкологической программе 2030». Также разработаны новые подходы к получению ультразвуковых контрастных агентов (микропузырьков) на основе комплексов бычьего сывороточного альбумина и амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой. Все перечисленное свидетельствует об актуальности темы диссертационной работы.

Цель работы состоит в установлении закономерностей электростатического связывания модельного противоопухолевого препарата доксорубина и бычьего сывороточного альбумина самоорганизующимися в водных средах сополимерами N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой для возможного применения в терапии онкологических заболеваний и получения контрастных агентов, востребованных в ультразвуковой диагностике.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи:**

– тензиометрическим методом установить закономерности самоорганизации (самосборки) цепей бифильных макромолекул на основе сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой различного состава и среднечисловых молекулярных масс в водных средах;

– разработать кинетическую модель процесса высвобождения доксорубина, электростатически иммобилизованного агрегатами цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой;

– оценить цитотоксичность агрегатов цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, содержащих электростатически иммобилизованный доксорубин;

– определить константы скорости процессов связывания и высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубина при варьировании концентрации и состава цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона

с акриловой кислотой, а также рН среды и температуры, вычислить стандартные термодинамические функции для высвобождения доксорубицина в нейтральной среде;

– получить комплексы бычьего сывороточного альбумина и амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой и разработать подход к формированию ультразвуковых контрастных агентов (микропузырьков) на их основе.

Научная новизна диссертационной работы состоит в следующем:

– установлено, что высвобождение электростатически иммобилизованного доксорубицина подчиняется кинетическому уравнению для обратимых реакций первого порядка, рассчитаны константы скорости высвобождения и связывания доксорубицина при различных концентрациях и составах амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, а также оценены значения стандартных термодинамических параметров для процесса высвобождения доксорубицина в нейтральной среде, причем равновесная конверсия высвобождения лекарства значительно возрастает в кислой среде, что может служить фактором таргетирования доставки доксорубицина в раковые клетки;

– установлено, что в нейтральной среде высвобождение электростатически иммобилизованного доксорубицина происходит со значительной энергией активации 40,7 кДж/моль, тогда как связывание доксорубицина реализуется с низкой энергией активации около 5,6 кДж/моль;

– показано образование комплексов бычьего сывороточного альбумина и амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, а также формирование на их основе наполненных воздухом микросфер (микропузырьков), которые могут быть использованы как контрастные агенты для ультразвуковой диагностики.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые установлены кинетические закономерности и рассчитаны стандартные термодинамические функции для высвобождения в нейтральной среде электростатически иммобилизованного доксорубицина агрегатами цепей амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой гидрофобной *n*-октадецилтиогруппой. Экспериментально получены и объяснены зависимости

скорости и равновесной конверсии высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубицина от концентрации и состава амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, а также температуры и pH среды. Показано образование интерполимерных комплексов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой при взаимодействии с бычьим сывороточным альбумином.

Практическая значимость диссертации состоит в обнаружении зависимости скорости и равновесной конверсии высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубицина от pH среды, что может представлять интерес для таргетной терапии опухолевых заболеваний. Также разработаны подходы к созданию микропузырьков на основе комплексов бычьего сывороточного альбумина с амфифильными сополимерами N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, представляющих интерес для ультразвуковой диагностики.

Методология и методы исследования. При выполнении диссертационной работы использованы современные физико-химические методы исследования, такие как ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия, УФ-спектроскопия, MALDI-TOF масс-спектрометрия, тензиометрия, динамическое лазерное светорассеяние, МТТ-тест, атомно-силовая микроскопия и просвечивающая электронная микроскопия.

Положения, выносимые на защиту:

1. Закономерности изменения критических концентраций агрегации, определенные тензиометрическим методом, при варьировании состава цепи, а также длины гидрофильного и гидрофобного фрагментов синтезированных амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой;
2. Закономерности изменения распределения агрегатов по диаметрам при варьировании концентрации, среднечисловой молекулярной массы и состава амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой;
3. Определение цитотоксичности наносомальных форм электростатически иммобилизованного доксорубицина короной агрегатов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в экспериментах *in vitro* на клеточных линиях С6 (глиома крысы) и U87 (глиобластома человека);
4. Кинетические закономерности высвобождения доксорубицина, иммобилизованного агрегатами цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-

пирролидона с акриловой кислотой посредством электростатических межмолекулярных взаимодействий с гидрофильной короной;

5. Получение комплексов бычьего сывороточного альбумина с амфифильными сополимерами N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой и их использование для создания ультразвуковых контрастных агентов (газонаполненных микропузырьков).

Степень достоверности результатов. Результаты, представленные в диссертации, получены с использованием комплекса современных методов исследования, адекватных поставленным научным задачам, а также взаимно согласованы, непротиворечивы и являются достоверными.

Апробация работы. Основные результаты, приведенные в диссертационной работе, были представлены на следующих международных конференциях: XV Международная научно-практическая конференция «Образование и наука для устойчивого развития» (Москва, 2023); XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021» (Санкт-Петербург, 2021); XII International Conference «Biomaterials and Nano-biomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues» (Ираклион, Греция, 2021), X Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2021» (Москва, 2021).

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в десяти печатных работах: из них четыре статьи в изданиях, индексируемых международными базами данных Web of Science и Scopus, а также шесть тезисов докладов на международных конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит 71 рисунок и 10 таблиц, построена традиционно и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение, заключение, список процитированной литературы, содержащий 252 источника.

Личный вклад автора. Личный вклад автора был основополагающим на всех этапах выполнения работы, включая выбор темы исследования, постановку цели и задач, выполнение экспериментальных исследований, написание публикаций и текста диссертации, формулирование выводов.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, заведующему кафедрой биоматериалов РХТУ им. Д.И. Менделеева, д.х.н. Я.О. Межуеву, а также д.х.н. М.И. Штильману, д.х.н. А.Н. Кускову, д.х.н. А.А. Артюхову, к.х.н. П.Г. Рудаковской и сотрудникам лаборатории Биофотоники Сколковского Института Науки и Технологий, к.х.н. А.Л. Лусс, П.П. Куликову, к.ф.-м.н. Д.В. Багрову, а также сотрудникам лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» НИТУ МИСИС.

Финансирование. Данная диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению № 075-15-2020-792 (уникальный идентификатор контракта RF ---- 190220X0031).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** охарактеризована актуальность темы диссертационной работы, ее научная новизна, теоретическая и практическая значимость, приведены сведения о положениях, выносимых на защиту, методологии исследования, личном вкладе автора, апробации основных результатов, публикациях по теме диссертации, отмечены благодарности и источник финансирования.

В **обзоре литературы** дана актуальная информация о подходах к синтезу амфифильных полимеров, их фазовом поведении в водных растворах и использовании в медико-биологических областях, с фокусом на применении в качестве платформ для доставки лекарственных средств, что позволило подчеркнуть актуальность темы диссертации и способствовало формулировке цели и постановке задач работы.

В **экспериментальной части** описаны свойства исходных веществ, использованные методы исследования, а также приведены методики проведения экспериментов.

Глава **результаты и обсуждение** является основной и суммирует полученные данные и их интерпретацию. Синтез амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона (ВП) с акриловой кислотой (АК) проводили радикальной сополимеризацией в растворе в 1,4-диоксане, инициируемой 2,2'-азо-бис-изобутиронитрилом (ДАК) в присутствии *n*-октантиола или *n*-октадекантиола (рисунок 1).

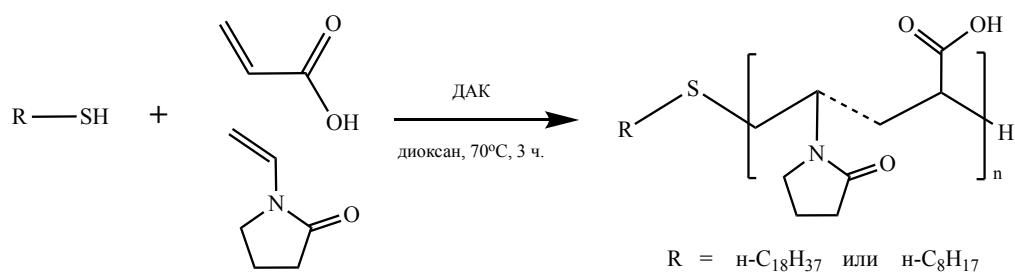


Рисунок 1 – Синтез амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

Строение полученных сополимеров было подтверждено методами ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР, HSQC спектроскопии (рисунок 2), MALDI-TOF масс-спектрометрии (рисунок 3) и ИК спектроскопии.

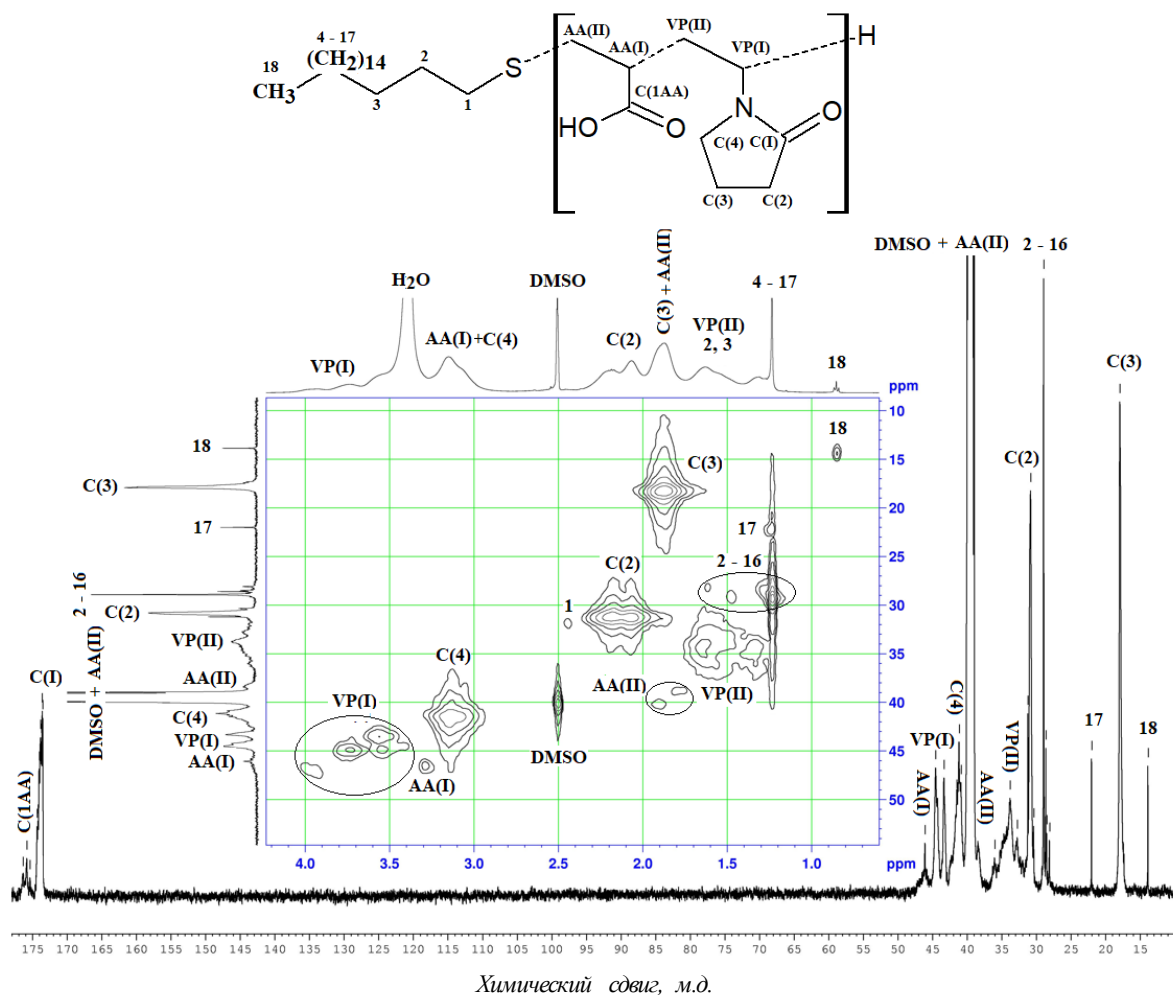


Рисунок 2 – ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР, HSQC спектры амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой

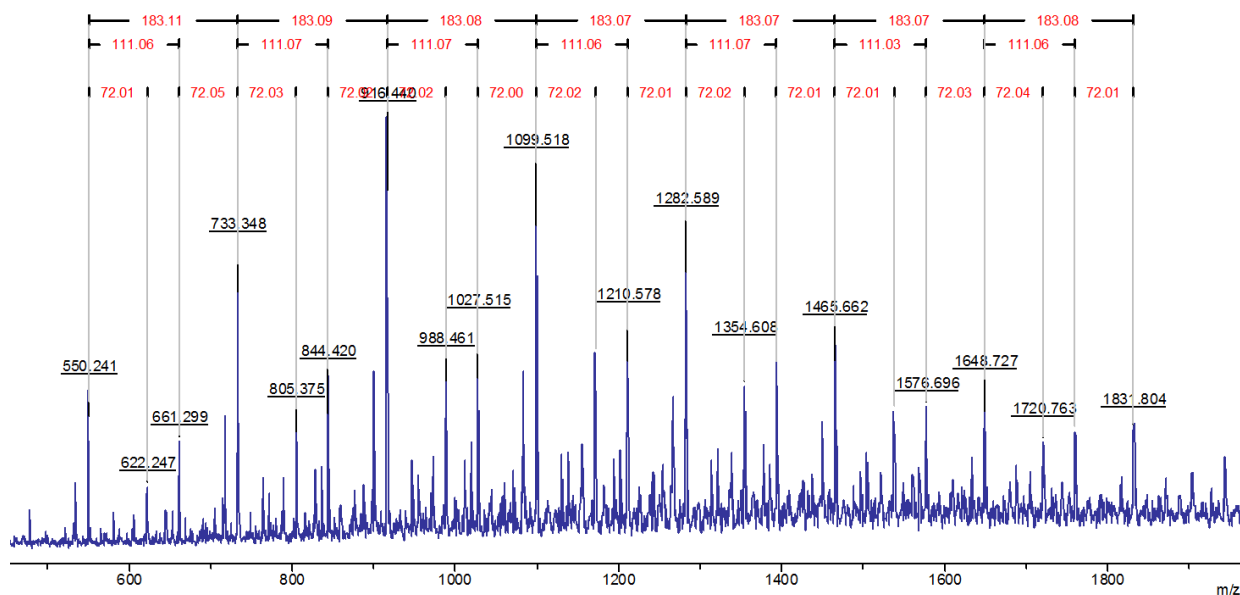


Рисунок 3 – MALDI-TOF масс-спектр амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой

Регулирование состава цепи достигалось варьированием соотношения концентраций сомономеров в реакционной смеси, тогда как природа концевых гидрофобных групп определялась строением используемого алкилтиола, а среднечисловая молекулярная масса концентрацией алкилтиола. При этом вычисленные значения относительных констант передачи цепи на *n*-октантиол и *n*-октадекантиол практически не отличаются и составляют 0,0155 и 0,0152 соответственно, что является проявлением принципа равной реакционной способности Флори и открывает возможность получения серий сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с различной длиной гидрофобных фрагментов и близкой среднечисловой молекулярной массой.

Для синтезированных амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой различного состава, строения концевой алкилтиогруппы и среднечисловых молекулярных масс методом тензиометрии (отрыва кольца) были определены критические концентрации агрегации (мицеллообразования). Показано, что с уменьшением длины гидрофобного фрагмента, увеличением длины гидрофильного фрагмента (среднечисловой молекулярной массы) и мольной доли остатков акриловой кислоты в цепи, наблюдается увеличение критической концентрации агрегации (рисунок 4).

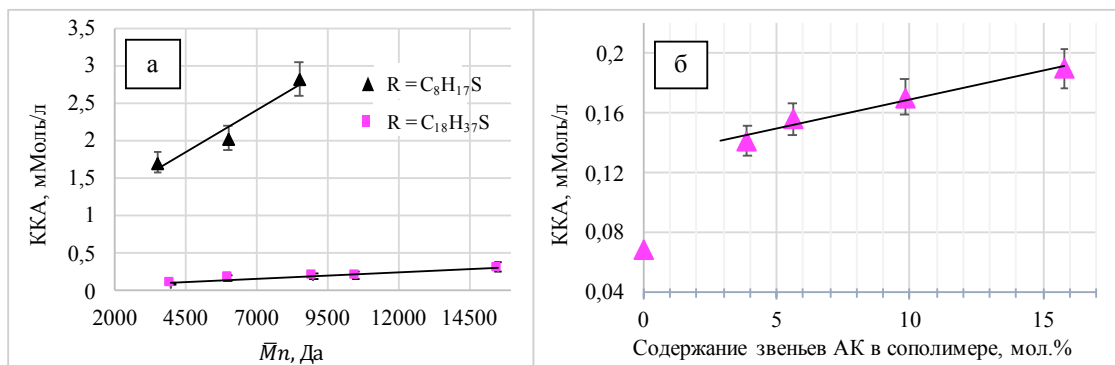


Рисунок 4 – Зависимости критических концентраций агрегации (ККА) от: а – среднечисловой молекулярной массы и б – мольной доли остатков акриловой кислоты для амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой ($pH = 4,6 \pm 0,1$)

Диаметр агрегатов, усредненный по их числу и интенсивности сигнала, убывает с уменьшением концентрации амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой (таблица 1).

Таблица 1 – Зависимости диаметров агрегатов, усредненных по числу (d_N) и интенсивности сигнала (d_I), а также индекса полидисперсности агрегатов (PDI) от концентрации (C) амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона (95 мол.%) с акриловой кислотой (5 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой со среднечисловой молекулярной массой 4000 Да ($pH = 4,2 \pm 0,2$)

C, г/л (M, мМоль/л)	d_I , нм	d_N , нм	PDI
40 (10)	$502,3 \pm 21,5$	$319,7 \pm 15,5$	$0,230 \pm 0,06$
20 (5)	$335,8 \pm 16,3$	$187,6 \pm 9,7$	$0,243 \pm 0,07$
10 (2,5)	$320,4 \pm 15,8$	$128,6 \pm 10,4$	$0,233 \pm 0,04$
5 (1,125)	$262,2 \pm 11,7$	$70,3 \pm 9,6$	$0,199 \pm 0,05$

Увеличение длины гидрофильного фрагмента (среднечисловой молекулярной массы) амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой *n*-октадецилтиогруппой также приводит к уменьшению диаметров, усредненных по числу и интенсивности сигнала при увеличении индекса полидисперсности агрегатов (таблица 2).

Таблица 2 – Зависимости диаметров агрегатов, усредненных интенсивности сигнала (d_I) и по числу (d_N), а также индекса полидисперсности агрегатов (PDI) от среднечисловой молекулярной массы сополимеров N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой (концентрация 20 г/л, pH = 4,3 ± 0,1)

\bar{M}_n , Да	d_I , нм	d_N , нм	PDI
15500 ± 500	137,1 ± 11,9	9,7 ± 0,4	0,703 ± 0,13
10500 ± 500	247,9 ± 9,6	10,6 ± 0,3	0,364 ± 0,06
9000 ± 500	305,0 ± 8,8	150,9 ± 6,4	0,369 ± 0,07
6000 ± 500	365,7 ± 13,6	215,7 ± 5,7	0,267 ± 0,04
4000 ± 500	424,8 ± 16,9	277,1 ± 7,2	0,153 ± 0,03

Увеличение мольной доли остатков акриловой кислоты способствует формированию фракции агрегатов небольших размеров вследствие увеличения вклада электростатической стабилизации, связанной с уменьшением электрокинетического потенциала, что проявляется в значительной убыли среднечислового диаметра агрегатов с ростом концентрации ионогенных карбоксильных групп (рисунок 5).

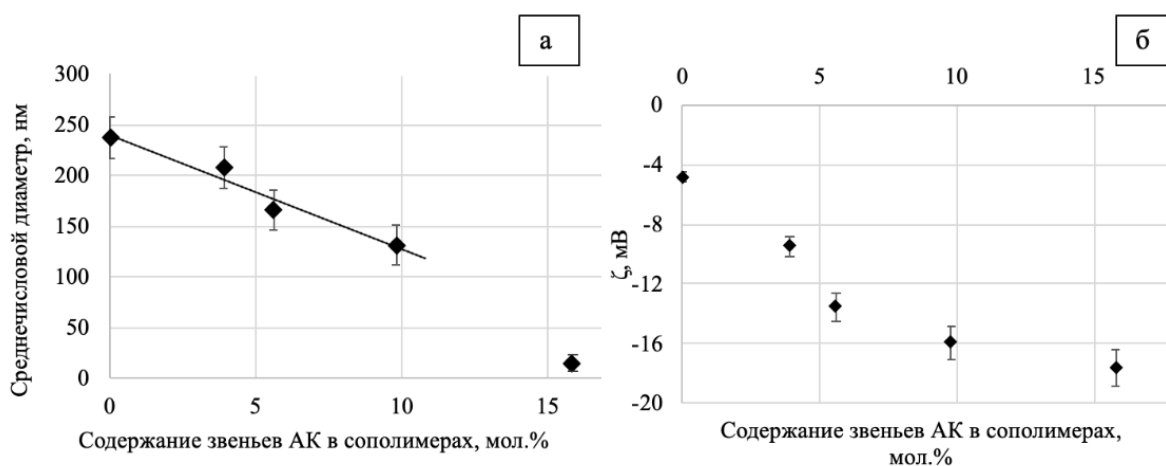


Рисунок 5 – Зависимости диаметра агрегатов (а) и электрокинетического потенциала (б) от мольной доли остатков акриловой кислоты в амфифильном сополимере N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой *n*-октадецилтиогруппой (pH = 4,3 ± 0,1, концентрация 10 г/л)

Значительное увеличение доли ионизированных карбоксильных групп даже при увеличении рН с 6,82 до 9,07 и содержании остатков АК всего 5 мол.%, приводит к уменьшению среднечислового диаметра частиц с 298 нм до 10 нм, что связано с электростатическим отталкиванием цепей, формирующих агрегаты, причем в сильнощелочной среде образование мицелл (агрегатов) становится невозможным.

Полученные агрегаты на основе амфифильных сополимеров ВП с АК могут быть использованы в качестве носителей для соиммобилизации паклитаксела и доксорубицина. По всей видимости, гидрофобный противоопухолевый препарат паклитаксел непосредственно не проникает в ядро агрегатов амфифильных сополимеров ВП с АК в условиях его иммобилизации, а является центром самосборки гидрофобного ядра новых агрегатов, о чем свидетельствует уменьшение их среднего диаметра с 300 – 320 нм до 200 – 220 нм. После образования агрегатов, содержащих включенный паклитаксел, их диаметр почти не изменяется при последующей электростатической иммобилизации доксорубицина.

Электростатическая иммобилизация протонированного доксорубицина осуществляется посредством межионных взаимодействий с карбоксильными группами, входящими в состав гидрофильной короны агрегатов. Кинетика высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубицина подчиняется кинетическому уравнению (1) для обратимых реакций первого порядка с константой равновесия K (2).

$$\ln(\xi_{\infty} - \xi) = \ln \xi_{\infty} - (k_1 + k_{-1})t \quad (1)$$

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{\xi_{\infty}}{1 - \xi_{\infty}} \quad (2)$$

где: ξ , ξ_{∞} – текущая и равновесная конверсии для высвобождения доксорубицина; k_1 , $k_{-1} = k'_{-1}C_{COOH}$ – константа скорости высвобождения и эффективная константа скорости связывания лекарства; k'_{-1} – истинная константа скорости связывания лекарства; C_{COOH} – концентрация карбоксильных групп; K – константа равновесия для процесса высвобождения доксорубицина; t – время.

При вычислении ξ , доксорубицин в воде за пределами диализной мембраны считался высвободившимся, причем объем раствора за пределами диализной мембраны значительно превышал объем раствора в диализном мешке, а перенос лекарства сквозь мембрану принимали быстрым процессом.

Решение системы уравнений (1) и (2) позволяет определить константы скоростей k_1 и k_{-1} , при этом величина $k_1 + k_{-1}$ является тангенсом угла наклона прямой “ $\ln(\xi_\infty - \xi) - t$ ”, а значение K рассчитывается исходя из ξ_∞ . Показано, что скорость высвобождения доксорубина зависит от концентрации карбоксильных групп, которая может быть изменена как вследствие увеличения концентрации амфифильного сополимера ВП с АК с заданным количеством остатков АК (таблица 3), так и в результате увеличения мольной доли остатков АК в сополимере при постоянной концентрации сополимера (таблица 4).

Таблица 3 – Значения k_1 и k_{-1} для высвобождения доксорубина в присутствии амфифильных сополимеров ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) различной концентрации в водном растворе (температура 37°C, pH = 7)

Концентрация сополимера, г/л	2,5	5	10	15
$k_1, \text{ч}^{-1}$	0,0256	0,0216	0,0165	0,0088
$k_{-1}, \text{ч}^{-1}$	0,113	0,133	0,153	0,186

Таблица 4 – Значения k_1 и k_{-1} для высвобождения доксорубина в присутствии амфифильных сополимеров ВП с АК различного состава (концентрация амфифильного сополимера 10 г/л, 37°C, pH = 7)

Мольная доля остатков акриловой кислоты	3,9 мол.%	5,6 мол.%	9,8 мол.%	15,8 мол.%
$k_1, \text{ч}^{-1}$	0,0165	0,0103	0,00758	0,0028
$k_{-1}, \text{ч}^{-1}$	0,153	0,118	0,101	0,053

Энергии активации процессов связывания и высвобождения доксорубина, а также стандартные термодинамические параметры высвобождения противоопухолевого препарата могут быть оценены из кинетических кривых, полученных при различных температурах в нейтральном буферном растворе (рисунок 6). Энергия активации процесса высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубина значительна и составляет приблизительно 40,7 кДж/моль, в то время как связывание доксорубина происходит с небольшой энергией активации приблизительно 5,6 кДж/моль. Оценочные значения стандартной энтальпии и энтропии для высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубина составляют 35 кДж/моль и 98 Дж/(моль×К)

соответственно. Эндотермичность с приростом энтропии характерна для диссоциации солей первичных аминов, поэтому можно предполагать, что высвобождение доксорубина в нейтральной среде происходит вследствие переноса протона от солевой формы доксорубина к карбоксилат-анионам остатков акриловой кислоты.

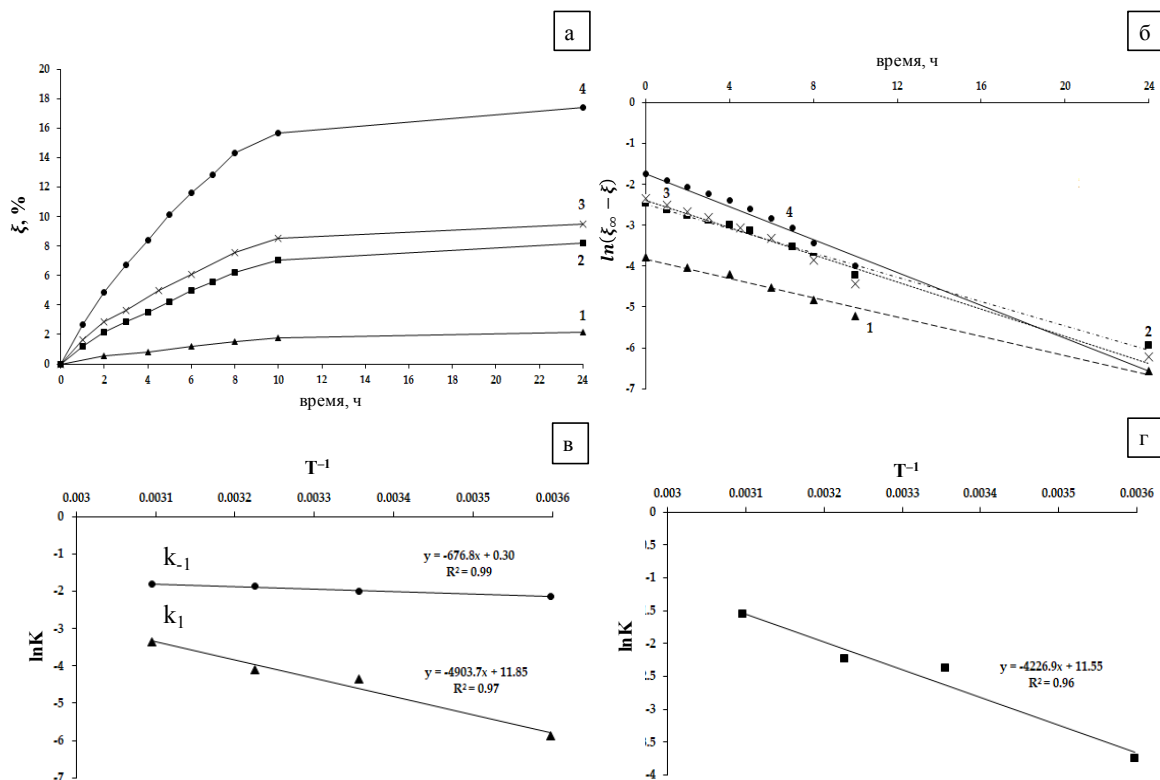


Рисунок 6 – Зависимости “ ξ vs. t ” – (а); “ $\ln(\xi_{\infty} - \xi)$ vs. t ” – (б); “ $\ln k_1$ и $\ln k_{-1}$ vs. $1/T$ ” – (в) и “ $\ln K$ vs. $1/T$ ” – (г) для высвобождения доксорубина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой с концентрацией в водном растворе 10 г/л при температурах: 1 – 5 °C; 2 – 25 °C; 3 – 37 °C; 4 – 50 °C (pH = 7)

Переход как в кислую, так и в основную среду приводит к увеличению равновесной конверсии высвобождения доксорубина (рисунок 7). С учетом кислой среды в микроокружении раковых клеток и повышенной эндоцитозной активности, последнее обстоятельство может способствовать таргетированию доставки доксорубина при использовании амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в качестве носителей.

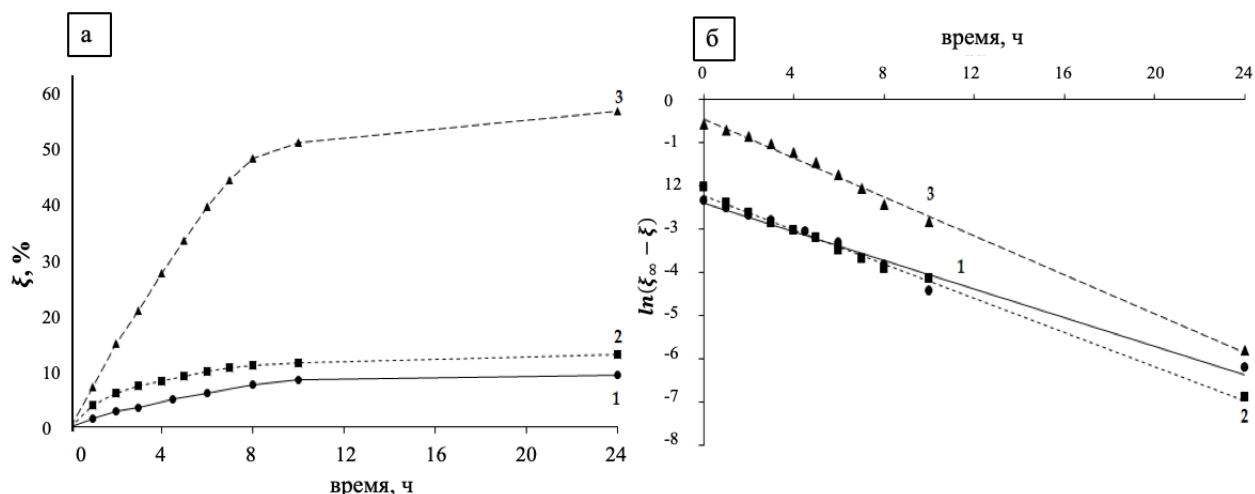


Рисунок 7 – Зависимости “ ξ vs. t ” – (А) и “ $\ln(\xi_{\infty} - \xi)$ vs. t ” – (Б) для высвобождения доксорубина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концевой n -октадецилтиогруппой с концентрацией 10 г/л в водных буферных растворах с рН: 1 – рН = 7; 2 – рН = 9; 3 – рН = 4 ($t = 37^{\circ}\text{C}$)

Предполагаемая схема высвобождения иммобилизованного доксорубина при различных рН среды представлена на рисунке 8.

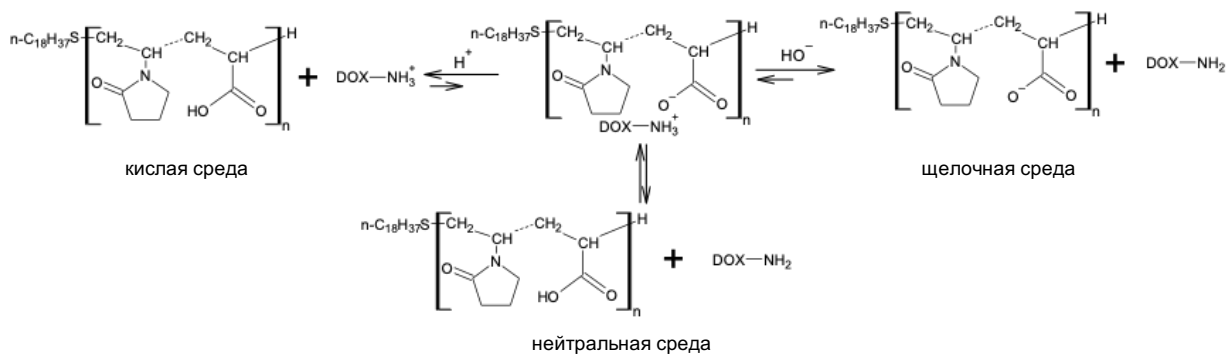


Рисунок 8 – Высвобождение электростатически иммобилизованного доксорубина в различных средах

Цитотоксичность наноагрегатов исследовали на клеточных линиях глиомы крысы (С6) и глиобластомы человека (U87) *in vitro* с помощью МТТ-теста (рисунок 9). Положительным контролем служили лунки с клетками без исследуемых препаратов.

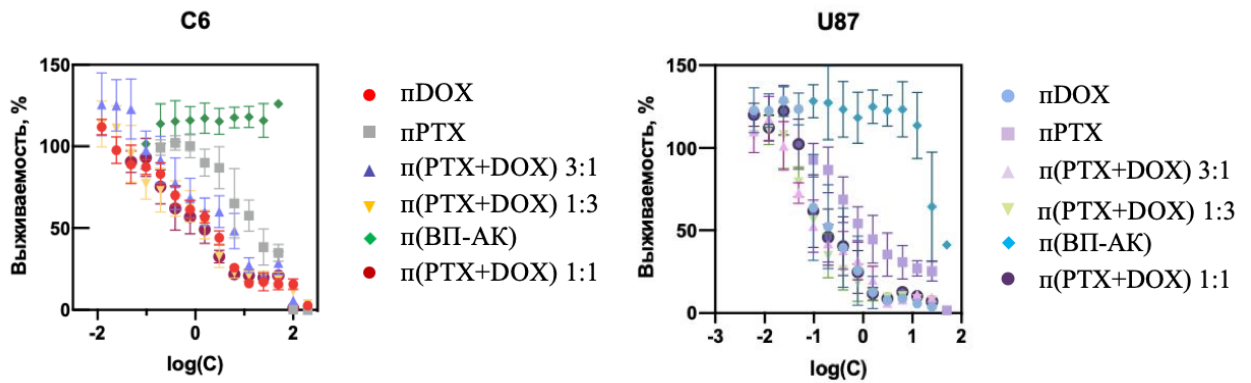


Рисунок 9 – Зависимости доли выживших клеток после обработки агрегатами амфифильных сополимеров ВА с АК (п(ВП-АК)), содержащих включенные лекарства (С – суммарная молярность паклитаксела (РТХ) и доксорубицина (DOX) в исходном растворе, в подписях приведены исходные молярные соотношения противоопухолевых препаратов)

Как видно, клетки линии С6 проявляют большую устойчивость к воздействию противоопухолевых препаратов, чем клетки линии U87. Амфифильный сополимер ВП с АК не оказывает токсического действия при концентрации 10 мкмоль/мл для клеток линии U87 и 50 мкмоль/мл для клеток линии С6. При этом диапазон терапевтических концентраций паклитаксела и доксорубицина на порядок меньше.

Полученные амфифильные сополимеры N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в отличие от амфифильного гомополимера N-винил-2-пирролидона способны к образованию интерполимерных комплексов с бычьим сывороточным альбумином (БСА), что подтверждается данными ИК спектроскопии и конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентно меченных макромолекул. Эти результаты подробно рассмотрены в диссертации. Полученные интерполимерные комплексы, по всей видимости, стабилизированы образованием ионных связей карбоксилат-анионов остатков акриловой кислоты с протонированными формами остатков основных аминокислот БСА. Комплексы БСА с сополимерами ВП и АК использованы для формирования оболочки газонаполненных микропузырьков (МП), которые могут служить контрастными агентами для ультразвуковой диагностики. Образование микропузырьков наблюдалось при избытке бычьего сывороточного альбумина при варьировании массовых соотношений с амфифильным сополимером ВП с АК от 3:1 до 10:1 и

суммарной массовой доле макромолекул в растворе 5%. Показано, что частичная концентрация микропузырьков тем выше, чем меньше поверхностное натяжение исходного раствора и достигает $(1,0 \pm 0,35) \times 10^{10}$ МП/мл при массовом соотношении макромолекулярных компонентов 10:1. При этом, чем больше микропузырьков образуется, тем меньше их диаметр и толщина оболочки. Так, увеличение массовой доли бычьего сывороточного альбумина от 3:1 до 10:1 приводит к уменьшению диаметра микропузырьков с 5 мкм до 3 мкм и уменьшению толщины оболочки от 50 нм до 35 нм.

Эффективность микропузырьков как контрастных агентов заключается в том, что они обладают характерным акустическим откликом, улучшающим визуализацию исследуемой области. Результаты ультразвуковой визуализации полученных микропузырьков в проточной камере фантома, имитирующего мягкую ткань, представлены на рисунке 10. В качестве контроля использовали дистиллированную воду и альбуминовые микропузырьки.

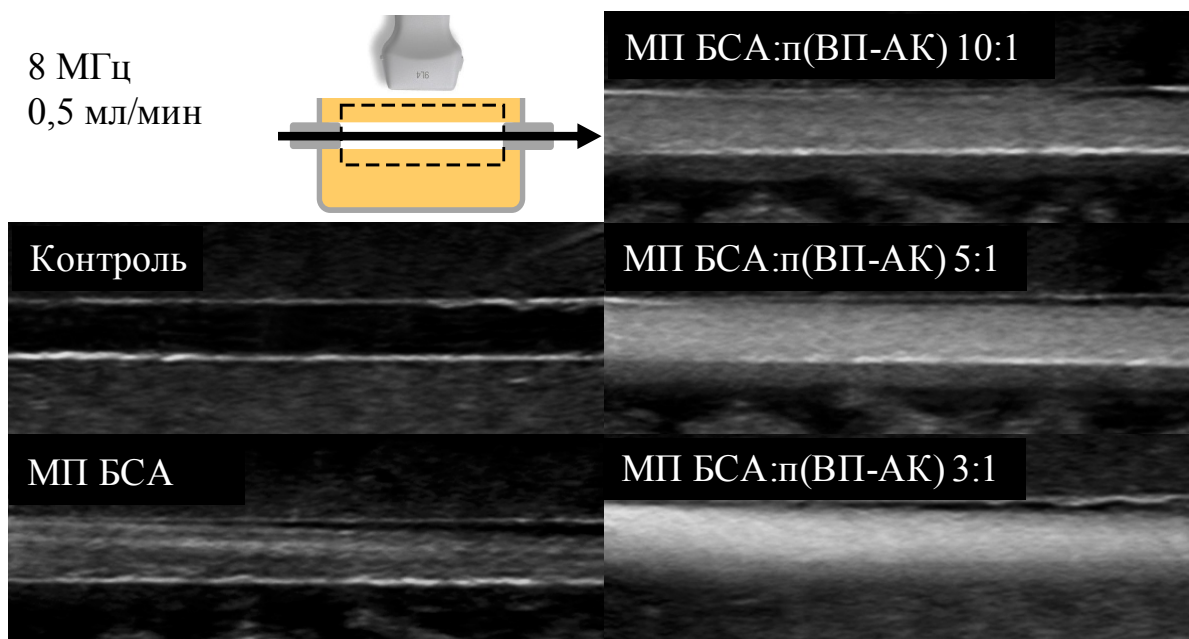


Рисунок 10 – Результаты ультразвуковой визуализации микропузырьков, полученных на основе интерполимерных комплексов БСА с амфифильными сополимерами ВП и АК в проточной камере фантома, имитирующего мягкую ткань

На изображениях отчетливо видно, что в отличие от дистиллированной воды, используемой в качестве контроля, все растворы, содержащие микропузырьки, проявляли акустический отклик. Также видно, что микропузырьки с оболочкой на основе интерполимерных комплексов БСА с амфифильными сополимерами ВП с АК демонстрировали более высокую контрастность по сравнению с микропузырьками на основе чистого БСА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных в работе исследований можно сформулировать следующие **выводы**:

1. Установлено, что диаметр агрегатов цепей уменьшается при уменьшении концентрации и увеличении мольной доли остатков акриловой кислоты, а также увеличении среднечисловой молекулярной массы амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой.
2. Тензиометрическим методом (отрыва кольца) показано уменьшение критической концентрации агрегации (мицеллообразования) при увеличении длины гидрофобного фрагмента, а также уменьшении среднечисловой молекулярной массы и мольной доли остатков акриловой кислоты в цепи амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой.
3. Показана возможность иммобилизации гидрохлорида доксорубина гидрофильной короной агрегатов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, причем скорость высвобождения противоопухолевого препарата подчиняется кинетическому уравнению для обратимых реакций первого порядка и значительно увеличивается при переходе из нейтральной среды в кислую среду, что может способствовать таргетированию доставки лекарства.
4. Оценены значения изменения стандартной энтальпии и энтропии для процесса высвобождения доксорубина электростатически иммобилизованного агрегатами амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, которые составили 35 кДж/моль и 98 Дж/(моль×К), а также показано, что энергия активации высвобождения лекарства равна 40,7 кДж/моль и значительно

превышает энергию активации его связывания, которая составляет около 5,6 кДж/моль.

5. Установлено образование интерполимерных комплексов при взаимодействии амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты с бычьим сывороточным альбумином, которые могут быть использованы для формирования ультразвуковых контрастных агентов (микропузырьков).

Перспективы дальнейшей разработки темы связаны с проведением биологических исследований *in vivo* полученных наноразмерных форм доксорубина и интерполимерных комплексов сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с бычьим сывороточным альбумином, показавших перспективы использования для получения контрастных агентов для ультразвуковой диагностики.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ:

1. **Nechaeva A.M.** The Synthesis and Properties of a New Carrier for Paclitaxel and Doxorubicin Based on the Amphiphilic Copolymer of N-vinyl-2-pyrrolidone and Acrylic Acid / **A.M. Nechaeva**, A.A. Artyukhov, A.L. Luss, M.I. Shtilman, A.Y. Svistunova, M.V. Motyakin, I.I. Levina, E.G. Krivoborodov, I.Y. Toropygin, E.M. Chistyakov, A.M. Tsatsakis, L. Gurevich, Y.O. Mezhuev // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2022. – V. 223. – № 17. – P. 2200081. DOI: 10.1002/macp.202200081 (*Scopus, Web of Science*)
2. Artyukhov A.A. Nanoaggregates of Biphilic Carboxyl-Containing Copolymers as Carriers for Ionically Bound Doxorubicin / A.A. Artyukhov, **A.M. Nechaeva**, M.I. Shtilman, E.M. Chistyakov, A.Y. Svistunova, D.V. Bagrov, A.N. Kuskov, A.O. Docea, A.M. Tsatsakis, L. Gurevich, Y.O. Mezhuev // *Materials*. – 2022. – V. 15. – № 20. – P. 7136. DOI: 10.3390/ma15207136 (*Scopus, Web of Science*)
3. Estifeeva T.M. Hybrid (bovine serum albumin)/poly (N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid)-shelled microbubbles as advanced ultrasound contrast agents / T.M. Estifeeva, R.A. Barmin, P.G. Rudakovskaya, **A.M. Nechaeva**, A.L. Luss, Y.O. Mezhuev, V.S. Chernyshev, E.G. Krivoborodov, O.A. Klimenko, O.A. Sindeeva, P.A. Demina, K.S. Petrov, R.N. Chuprov-Netochin, E.P. Fedotkina, O.E. Korotchenko, E.A. Sencha, A.N. Sencha, M.I. Shtilman, D.A. Gorin // *ACS Applied Bio Materials*. – 2022. – V. 5. – № 7. – P. 3338-3348. DOI: 10.1021/acsabm.2c00331 (*Scopus, Web of Science*)
4. Kuskov A.N. Kinetics and mechanism of synthesis of carboxyl-containing N-vinyl-2-pyrrolidone telechelics for pharmacological use / A.N. Kuskov, A.L. Luss, I.A. Gritskova, M.I. Shtilman, M.V. Motyakin, I.I. Levina, **A.M. Nechaeva**, O.Y. Sizova, A.M. Tsatsakis, Y.O. Mezhuev // *Polymers*. – 2021. – V. 13. – № 15. – P. 2569. DOI: 10.3390/polym13152569 (*Scopus, Web of Science*)
5. Кичатова А.А. Молекулярная архитектура амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты для стабилизации оболочки белковых микропузырьков / А.А. Кичатова, **А.М. Нечаева**, Т.М. Естифеева // XV Международная научно-практическая конференция: Образование и наука для устойчивого развития. 18 – 21 апреля 2023 г. – Россия, г. Москва. – Ч. 2. – С. 69 - 71.
6. Садкова П.С. Наноразмерные частицы бифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона для доставки комбинаций лекарственных средств / П.С. Садкова, **А.М. Нечаева**, Ф.У. Азимкулов, А.А. Жукова, Н.С. Чмелюк // XV Международная

научно-практическая конференция: Образование и наука для устойчивого развития. 18 – 21 апреля 2023 г. – Россия, г. Москва. – Ч. 2. – С. 112 - 114.

7. **Nechaeva A.M.** Preparation of functionalized amphiphilic copolymers of poly-N-vinylpyrrolidone and acrylic acid for drug delivery systems / **A.M. Nechaeva**, A.A. Zhukova, M.A. Maslak, T.M. Shashkova, A.L. Luss, A.N.Kuskov // XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021». 6 – 10 сентября 2021 г. – Россия, г. Санкт-Петербург. – С. 450.

8. Luss A.L. Micellar nanosystems based on functionalized amphiphilic copolymers of N-vinylpyrrolidone for creating theranostic platforms / A.L. Luss, **A.M. Nechaeva**, P.P. Kulikov, L. Gurevich, C.P. Pennisi, M.A. Maslak, A.A. Zhukova, A.N. Kuskov, M.I. Shtilman // 12th International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues». 27 сентября – 4 октября 2021 г. – Греция, г. Ираклион. – С. 20 - 21.

9. Shashkova T.M. Amphiphilic carboxyl containing copolymers of N-vinylpyrrolidone / T.M. Shashkova, **A.M. Nechaeva**, A.L. Luss, Y.O. Mezhev // 12th International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues». 27 сентября – 4 октября 2021 г. – Греция, г. Ираклион. – С. 23.

10. **Нечаева А.М.** Мицеллярные наносистемы на основе амфифильных сополимеров акриловой кислоты и N-винилпирролидона для создания тераностических платформ / **А.М. Нечаева**, А.Л. Лусс, П.П. Куликов, L. Gurevich, C.P. Pennisi, А.А. Жукова, М.А. Маслак, М.И. Штильман // X Юбилейная международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика». 9-11 ноября 2021 г. – Россия, г. Москва. – С. 159.