

УДК 547.458:546.92:615.277.3

НАНОЧАСТИЦЫ ПЛАТИНЫ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ СОПОЛИМЕРА ХИТОЗАН-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2024 г. Д. Н. Зуев¹*, Е. И. Черкасова¹, К. В. Апрятина¹, С. Д. Зайцев¹, Л. А. Смирнова¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603022 Россия

*e-mail: z_u_e_v2020@mail.ru

Поступила в редакцию 30.01.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Получены привитые сополимеры хитозан-винилпирролидона водорастворимые при рН среды 6.8–7.5. Разработана методика получения агрегативно устойчивой системы наночастиц платины в растворах сополимера со средними размерами ~ 4 нм. Исследованы теплофизические, структурные характеристики порошкообразной композиции наночастицы платины-сополимер. Выполнено сопоставление *in vitro* противоопухолевой активности растворов разработанной композиции и цисплатина при одинаковой концентрации платины. Выявлено, что в отношении культуры раковых клеток HeLa Куото и A431 композиция по эффективности уступает цисплатину в пять и два раза соответственно. Наряду с этим эффект подавления роста клеток фибробластов линии hTERT VJ-5TA композиции в 17 раз меньше, чем у цисплатина, что допускает использование ее при повышенной концентрации и разработку противоопухолевого средства с наночастицами платины соизмеримого по результативности с цисплатином.

Ключевые слова: хитозан-прив-поливинилпирролидон, наночастицы платины, водорастворимая композиция, противоопухолевые свойства, биосовместимость

DOI: 10.31857/S0555109924040049 EDN: SBIMRS

Нанотехнологии за последние два десятилетия стремительно развиваются во всех направлениях вследствие существенного изменения свойств материалов при введении в них наночастиц (НЧ). В области биомедицины НЧ металлов, в частности благородных – серебра, золота и платины, исследуются в лечении и диагностике различных заболеваний, в том числе при терапии рака, вируса иммунодефицита человека, туберкулеза, болезни Паркинсона и перспективны для доставки лекарственных средств [1, 2]. В связи с этим большое внимание уделяется токсикологическому и терапевтическому эффектам НЧ, которые зависят от их концентрации, размера, формы [3]. Форму и размер металлических НЧ можно контролировать, используя стабилизаторы различной природы [4, 5]. В качестве стабилизаторов перспективны биополимеры, которые обладают собственной биологической активностью и в комплексе с НЧ могут проявляться синергетические свойства и усиление терапевтического эффекта последних [6].

Особенно востребованной областью исследований НЧ платины является синтез противоопухолевых лекарств [7–12]. Препаратов для лечения

онкологических патологий существует много, но еще больше находится на стадии разработки. Несмотря на то, что среди этого большого количества получаемых препаратов есть очень перспективные, они часто не могут пройти клинические испытания ввиду их токсичности или по причине трудности растворения в физиологических условиях.

Платиносодержащие химиотерапевтические препараты эффективны, но их применение связано с серьезными дозозависимыми побочными эффектами и повышением лекарственной резистентности, которая может еще больше увеличиться после воздействия химиотерапевтических препаратов [13–17].

Препараты платины до сих пор остаются базовыми при химиотерапии видов рака, в основном в качестве координационных комплексов Pt^{II} таких, как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, надаплатин, лобоплатин и гептаплатин. Препараты на основе платины являются наиболее эффективными химиопрепаратами при лечении немелкоклеточного рака легкого и рекомендованы в качестве препаратов I линии при его лечении. В исследовании [18] показано, что схемы лечения, не включающие платиновые препараты,

сопровождается снижением эффективности лечения, медианы выживаемости до 1-летней. Самым распространённым и эффективным препаратом на данный момент является цисплатин. Он представляет собой кристаллический порошок, который растворяется в воде и используется в виде инъекций. Структурно цисплатин состоит из центрального атома платины, который связан с двумя хлоридными и двумя аммиачными группами. Он применяется для лечения различных видов рака, таких как рак легких, яичников, мочевого пузыря, а также некоторых других.

Цисплатин может взаимодействовать с ДНК клеток. Он предпочтительно связывается с нуклеотидами, прежде всего с аденином и гуанином, вызывая различные изменения в структуре ДНК, такие как: деформации двойной спирали, скрещивания, сшивки и разрывы цепей [19]. Взаимодействие цисплатина с ДНК, приводит к нарушению ее структуры и блокированию процесса деления клеток. Цисплатин вызывает остановку клеточного цикла в G1- S- или G2-фазе. Вероятно, остановка в фазе G2 является необходимой для запуска индуцированной цисплатином гибели клеток.

Однако цисплатин может вызывать различные побочные эффекты: тошнота, рвота, диарея, потеря волос и др. Также может наблюдаться нарушение функции почек и нервной системы [20].

Платиновые наночастицы широко используются для биомедицинских приложений, в том числе в составе имплантатов, при фототермической терапии и доставке лекарств. С целью снижения токсичности и увеличения биосовместимости противоопухолевых лекарств, актуальной является разработка новых модифицированных комплексов на основе НЧ платины. Повышенная высокая реакционная способность НЧ в биологической среде могут привести к гибели опухолевых клеток. Платина может быть цитотоксичной при окислении до платины (II), в такой форме она встречается в обычных химиотерапевтических средствах [21]. Например, многие НЧ взаимодействуют с клетками с образованием активных форм кислорода, которые могут привести к преждевременной гибели опухолевых клеток. Это свойство может быть использовано для их подавления [22].

По сравнению с традиционными клиническими препаратами платины, препараты на основе НЧ платины продемонстрировали высокую стабильность и растворимость *in vitro*, а также низкую системную токсичность и биосовместимость *in vivo*. Исследования эффективности НЧ платины показывают, что они сами по себе нетоксичны для здоровых клеток человека в терапевтических концентрациях и могут быть использованы в более высоких концентрациях для лечения опухоли [23]. НЧ платины обладают внутренними противомикробными, антиоксидантными и противораковыми свойствами. Таким образом, НЧ платины являются весьма перспективными для исследований и использования в наномедицине и в биомедицинской инженерии [24].

Одной из проблем, связанной с успешным применением противоопухолевых лекарств, является то, что активный агент имеет небольшую молекулярную массу, поэтому не проникает к целевому органу и не достигает тканей опухоли или не может проникнуть в них. С помощью заключения лекарственного агента в “капсулу” можно решить эту проблему. НЧ, стабилизированные полимерной матрицей-носителем, будут адсорбироваться на опухолевых тканях и попадать внутрь. Одним из таких перспективных полимеров для создания систем доставки лекарств является хитозан – деацетилированное производное природного полисахарида хитина. Хитозан является универсальным сорбентом, способным связывать огромный спектр веществ органической и неорганической природы [25]. Он также является биоразлагаемым, биосовместимым и нетоксичным. Хитозан имеет реакционноспособные группы (гидроксильную и аминогруппу) в каждом звене, что позволяет осуществлять химическое присоединение нескольких молекул, необходимых для функционализации частиц. Такая структура хитозана позволяет получать производные с разным зарядом и гидрофобностью [26]. В работе [27] были описаны исследования, проведенные с использованием НЧ на основе хитозана для доставки химиопрепаратов. Такая система доставки повышала растворимость и биодоступность исследуемых препаратов. Например, цисплатин был заключен в НЧ из магнетита, модифицированные хитозаном. Такие НЧ оказывали цитотоксическое действие на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-231, причем она была выше, чем у цисплатина не заключенного в НЧ.

Недостатком хитозана, как матрицы-носителя, является его растворимость при pH меньше 5, а значение pH крови и лимфы 7. Одним из вариантов решения является модификация хитозана водорастворимым и биосовместимым полимером, такими как поливинилпирролидон (ПВП). ПВП также часто используется как носитель НЧ, он препятствует их неконтролируемому росту и агрегации. Применение различных НЧ, стабилизированных ПВП, может быть перспективно в биомедицине. Например, в работе [28] были синтезированы НЧ золота при использовании ПВП в качестве стабилизатора. Такие НЧ проявляли токсичность в отношении клеток HeLa. Недостатком этого полимера является возможность его гидролиза. В работах [29, 30] показано, что в кислых средах винилпирролидон (ВП) может гидролизироваться с образованием α -оксиэтилпирролидона. Решением данной проблемы является оптимизация условий синтеза сополимера до минимальной концентрации продукта гидролиза или использование апротонного растворителя, полностью исключающего гидролиз.

Цель работы – получение водорастворимой композиции хитозан-прив-ПВП с НЧ платины и исследование свойств системы.

МЕТОДИКА

В исследовании был использован хитозан, полученный из крабового хитина (ОАО “Биопрогресс”, Россия) с молекулярной массой (ММ) 2.20×10^5 и степенью деацетилирования 0.82. Массовая доля минералов в хитозане не превышала 0.1%, влагосодержание – 6%, нерастворимых соединений – 0.1%.

Для приготовления растворов хитозана использовали ледяную уксусную кислоту марки “хч” ГОСТ 61–75. Модификацию хитозана проводили привитой полимеризацией с N-винил-2-пирролидоном (“Acros Organics”, Бельгия), предварительного очищенного вакуумной перегонкой.

Диметилсульфоксид (ДМСО) – марки “хч” СТП ТУ КОМП 2–451–11 (ООО “Компонент-Реактив”, Россия). Салициловая кислота – марки “хч” (ООО “Векослаб”, Россия).

НЧ платины получали из прекурсора хлороплатиновой кислоты 6-водной ($H_2PtCl_6 \times 6 H_2O$) марки “ч” (ОАО “Аурат”, Россия), массовая доля платины не менее 37.5%. В качестве восстановителя ионов платины использовали боргидрид натрия $NaBH_4$.

Привитую сополимеризацию ВП на хитозан проводили в трехгорлой круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, помещенной в термостат с регулируемой температурой, при непрерывном перемешивании. Концентрация хитозана в растворе уксусной кислоты во всех опытах составляла 3 мас. %, уксусной кислоты 1.2 мас. %, температура реакции 70°C. Концентрация хитозана в диметилсульфоксиде во всех опытах составляла 1.5 мас. %, 1.5% салициловой кислоты, температура реакции 70°C. ВП вводили в систему после установления температуры в реакторе на уровне 70°C и барботирования аргоном в течение 15 мин. Соотношение (мономер)/(хитозан) по массе составляло 4. В качестве иницирующей системы и в водном растворе и в растворе диметилсульфоксида использовали персульфат аммония и церий нитрат аммония. Систему выдерживали 15 мин для установления необходимой температуры раствора и вносили навеску инициатора. Концентрация инициаторов составляла 10^{-3} моль/л. Синтез проводили в течение 3 ч до полного завершения процесса полимеризации ВП.

Глубину превращения ВП определяли по результатам анализа остаточного мономера методом газовой хроматографии.

Определение концентрации остаточного мономера проводили на газовом хроматографе GCMS-QP2010, “Shimadzu” (Япония) с детектором по теплопроводности и системой компьютерной регистрации. Колонка: Equity-1 (30 м, 0.25 мм, 0.25 мкм), газ-носитель: гелий, скорость потока газа-носителя в колонке – 1 мл/мин, температура колонки для определения содержания ВП – 230°C. Из реакционной системы каждые 30 мин отбирали пробу и осаждали находящиеся в ней полимеры тетрагидрофураном. Соотношение пробы и осадителя составляло 100 мг на 1 мл. Далее надосадочную

жидкость фильтровали через мембранный фильтр PTFE (Merck, Millipore), 0.45 мкм, и методом газовой хроматографии определяли в ней содержание ВП.

Молекулярно-массовое распределение образцов полимеров проводили методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Prominence UFLC Fast LC-20AD (“Shimadzu”, Япония). Условия анализа: элюент 0.5 н раствор уксусной кислоты, скорость потока 0.8 мл/мин, $T = 30^\circ C$, детектор ELSD (низкотемпературный испарительный детектор светорассеяния). Колонка: TSK-GEL G3000SWXL, 7.8 мм ID \times 30.0 см L, 5 мкм. Калибровку выполняли, используя узкодисперсные образцы декстрана в диапазоне ММ от 1000 до 410000 Да.

НЧ платины получали в растворах водноуксуснокислого хитозана (3 мас. %) и в водных растворах хитозан-прив-ПВП путем восстановления ионов Pt^{4+} из допанта H_2PtCl_6 с помощью восстановителя боргидрида натрия $NaBH_4$ (0.5M). К 0.5 мас. % водного раствора сополимера при постоянном перемешивании добавляли H_2PtCl_6 так чтобы концентрация НЧ составляла 2% Pt от сополимера и термостатировали при температуре 70°C в течение 30 мин. Спектр абсорбции снимали относительно разбавленного 19 частями воды 0.5%-ного водного раствора сополимера в УФ-спектрометре Shimadzu UV-1650PC. В процессе восстановления Pt^{4+} наблюдали возникновение и нарастание полосы плазмонного поглощения, характерной для НЧ платины в области длин волн 210–230 нм [31].

Рентгенофазовый анализ (РФА) образцов выполняли на рентгеновском дифрактометре “Bruker D8 Discover” (Германия), с использованием $CuK\alpha$ излучения. Регистрацию дифрактограмм проводили для углового диапазона 10°–60° по углу дифракции 2 θ в симметричной геометрии со щелью 0.6 мм на первичном пучке и линейным позиционно-чувствительным детектором LynxEye (“Bruker”, Германия).

Теплофизические свойства образцов изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе ДСК 500 (Лаборатория аналитического приборостроения СамГТУ, Россия). Измерения образцов проводили в атмосфере азота при скорости нагрева 10°C/мин. Перед анализом образцы прогревали до 105°C в атмосфере азота для удаления следов воды.

Размер и кристаллическую структуру НЧ платины изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) в ультратонких полисахаридных пленках с помощью полевого эмиссионного микроскопа LIBRA 200 MC (“Carl Zeiss SMT”, Германия). Для подготовки образца каплю раствора наносили на тонкую (30 нм) мембрану Si_3N_4 с центрифугированием при ~2000 об/мин. После этого полимерные пленки обрабатывались в мягкой кислородной плазме с использованием системы очистки RF-плазмой De-Contamination RF Evactron 25/45 (США). Эту обработку использовали для удаления органической матрицы из образцов. Изображения ПЭМ были получены и обработаны с помощью

программного обеспечения Digital Micrograph (“Gatan, Inc.”, Плезантон, Калифорния, США).

Дополнительно размер и морфологию НЧ платины на поверхности полимерных композитных пленок охарактеризовали сканирующей электронной микроскопией (СЭМ) на приборе JEOL JSM–IT300LV (США), оснащенного элементными анализаторами энергии и волновой дисперсии.

Цитотоксичность препаратов, содержащих НЧ платины, в отношении опухолевых клеток определяли при помощи метилтетразолиевого теста (МТТ-тест). МТТ-тест основан на способности НАДФ-Н-зависимых оксиредуктазных дегидрогеназ жизнеспособных клеток конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид в кристаллы формазана. Клетки А431, HeLa Kyoto высевали в 96-луночные планшеты в количестве 3×10^3 кл./луночка. После 2 сут культивирования исходную среду заменяли свежей средой, содержащей препараты в различных концентрациях. Инкубацию с препаратом проводили в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе (37.0°C, 5% CO₂), затем клетки промывали раствором натрий-фосфатным буфером и в каждую лунку вносили по 200 мкл среды, содержащей 0.5 мг/мл МТТ. Клетки снова помещали в CO₂-инкубатор на 4 ч, после чего среду с МТТ отбирали. Образовавшийся формазан лизировали добавленным по 100 мкл в лунку раствором ДМСО. Оптическую плотность полученного раствора формазана в ДМСО измеряли на

планшетном спектрофотометре Synergy MX (“BioTek”, США) при длине волны 570 нм.

Исследовали рост и адгезию клеток фибробластов человека клеточной линии hTERT VJ-5ta (предоставлены Институтом биоорганической химии им. академик М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Россия) на поверхности пленок композиций хитозана с НЧ платины. Пленки предварительно получали методом полива на лавсановую подложку исходных растворов в условиях равномерного испарения растворителя до постоянной массы при 25°C. Пленки композиций, после стерилизации автоклавированием при температуре 110°C, помещали в лунки планшета для культивирования клеток и добавляли 500 мкл среды DMEM. Клетки высевали на поверхность пленки с плотностью 1.6×10^5 кл./см² и культивировали в течение 24 ч. Визуализацию клеток и оценку их жизнеспособности оценивали методом люминесцентной микроскопии. В качестве красителя для окрашивания фибробластов использовали 2×10^{-4} %-ный раствор акридина оранжевого в фосфатном буфере. Этот краситель путем интеркаляции или электростатического притяжения избирательно взаимодействует с ДНК и РНК, находящимися в ядре и митохондриях клетки соответственно. Это позволяет оценить общее состояние клеток – активность, пролиферацию и апоптоз. Исследование пленок проводили на инвертном микроскопе Olympus IX71 (Япония) с использованием “зеленого” фильтра (эмиссия 510–555 нм, возбуждение 460–495 нм), что позволяло визуализировать зеленый цвет ядра живых клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью получения биосовместимого и водорастворимого хитозана была проведена его модификация ВП методом привитой полимеризации. Привитую полимеризацию ВП на хитозан проводили в водно-кислотных растворах и ДМСО (рис. 1). Известно, что в воднокислотных растворах ВП гидролизуется с образованием пирролидона по схеме, приведенном на рис. 2.

Действительно, результаты хроматографического анализа продуктов синтеза свидетельствовали о том, что в процессе полимеризации гидролизуется до 6% ВП с образованием пирролидона (рис. 3) – так пик с временем выхода 9.89 мин соответствовал мономеру, а пик, соответствующий 9.28 мин, соответствовал продукту гидролиза – пирролидону.

Привитая полимеризация в воде при 70°C с использованием таких инициаторов как персульфат аммония и церий нитрат аммония достигалась уже за

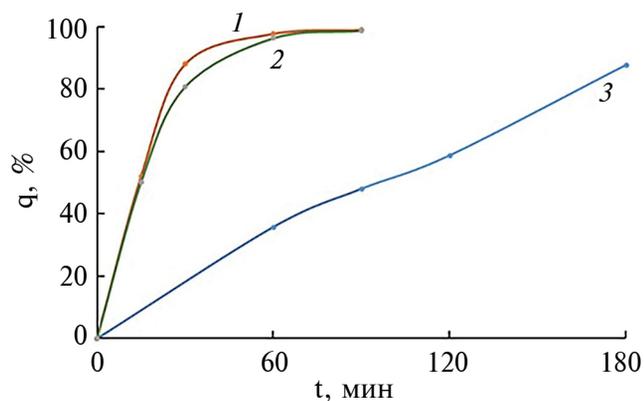


Рис. 1. Конверсия ВП в процессе привитой полимеризации: в водном растворе при 70°C, инициатор – церий нитрат аммония (1); в водном растворе при 70°C, инициатор – персульфат аммония (2) и в растворе ДМСО при 70°C, инициатор – церий нитрат аммония (3).

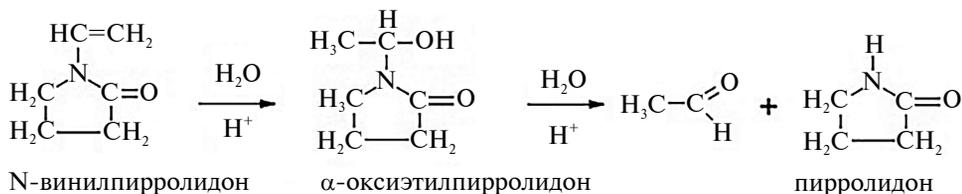


Рис. 2. Реакции кислотного гидролиза ВП.

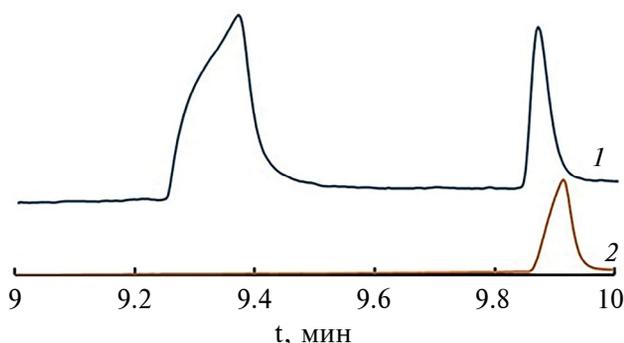


Рис. 3. Хроматограммы – пробы, после проведения синтеза отделения полимера (1) и – ВП (2).

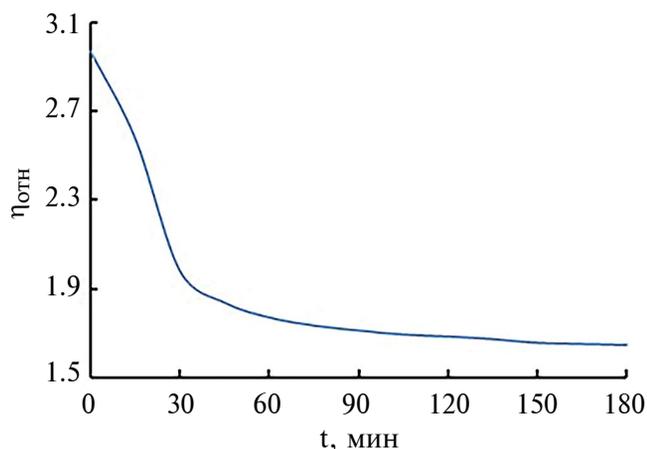


Рис. 4. Снижение относительной вязкости раствора хитозана под действием персульфата аммония при 70°C и концентрации инициатора 5×10^{-3} моль/л.

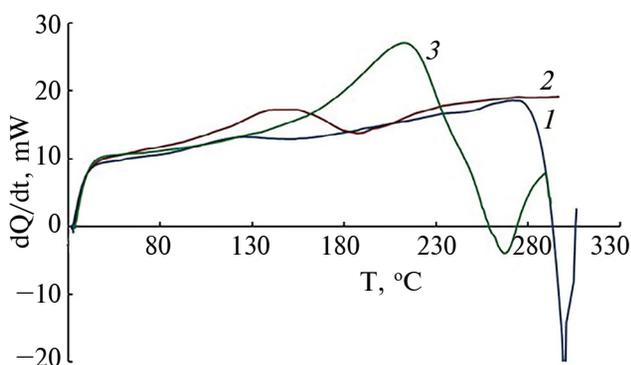


Рис. 5. Кривые, полученные методом ДСК: 1 – хитозан; 2 – ПВП; 3 – хитозан-прив-ПВП.

1.5 ч при конверсии 99%, однако в реакционной смеси также появлялся продукт гидролиза ВП.

Были исследованы молекулярно-массовые характеристики полученного сополимера хитозан-прив-ПВП и привитых цепей ВП методом ГПХ. Для определения ММ привитых цепей ВП в сополимере проводили ферментативное разложение цепей хитозана хитозаназой (“Weifang Yuxiang Chemical Co”, Китай). В раствор сополимера вносили хитозаназу в соотношении хитозан-хитозаназа 2 : 1 (по массе). Хитозаназа – фермент,

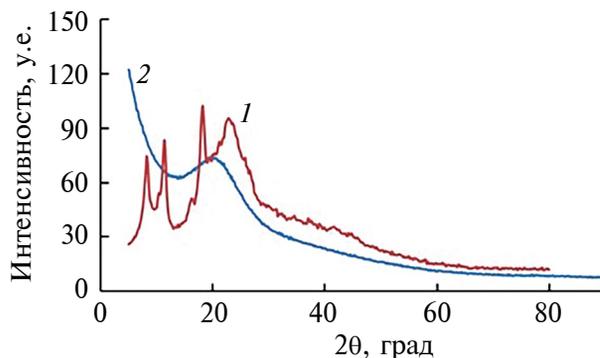


Рис. 6. РФА-спектр хитозана (1) и хитозан-прив-ПВП (2).

специфически расщепляющий β -1.4-гликозидные связи между остатками D-глюкозамина, а также между остатками D-глюкозамина и N-ацетилглюкозамина в молекуле хитозана с последующим образованием олигомеров. Полученную реакционную смесь выдерживали при 50°C и оставляли на 6 ч для полного расщепления полисахарида. Для прекращения действия фермента раствор прогревали при температуре 75°C в течение 3 ч. Методом ГПХ определили ММ оставшихся в растворе блоков ПВП. Были выделены две фракции, ММ привитых цепей ВП составила 1.16×10^4 и 2.55×10^4 .

Известно, что при действии инициаторов, таких как персульфат аммония и церий нитрат аммония происходит разрушение полисахаридной цепи хитозана, и в процессе полимеризации может получиться блок-сополимер (рис. 4) [32, 33].

Для доказательства строения сополимера были исследованы теплофизические свойства сополимера и исходных гомополимеров (рис. 5). Известно, что у блок-сополимеров наблюдались две температуры стеклования, а в привитом сополимере только одна [34].

Следует отметить, что образец сополимера имел температуру стеклования 180°C. Снижение температуры стеклования сополимера ($T_g = 180^\circ\text{C}$) по отношению к исходному хитозану (200°C) могла быть связана с уменьшением кристалличности сополимера.

Чтобы показать уменьшение степени кристалличности была исследована структура сополимера методом РФА. Из рис. 6 видно, что в сополимере пропадают пики кристалличности, характерные для хитозана, и наблюдается аморфное гало. Степень кристалличности исходного хитозана рассчитывается, как отношение площади пиков кристалличности к общей площади кривой рассеяния: она составила 50.5%. Это говорит о том, что привитая полимеризация прошла успешно и сополимер более аморфный, чем исходный хитозан.

В водорастворимом сополимере были получены НЧ платины. Определены размерные характеристики НЧ в растворе сополимера по сравнению с НЧ, полученными в растворе исходного хитозана. По данным

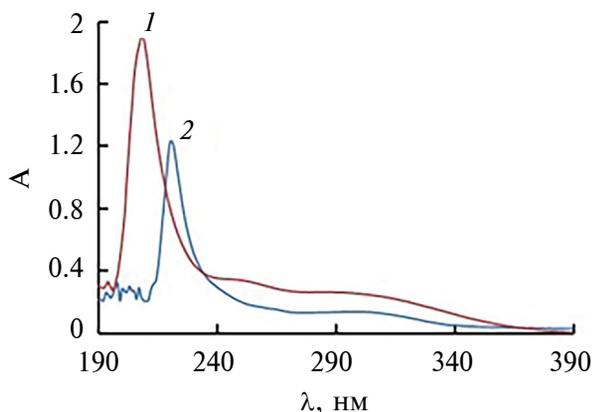


Рис. 7. УФ-спектры поглощения НЧ платины в водно-кислотных растворах хитозана (1) и в водных растворах сополимера (2).

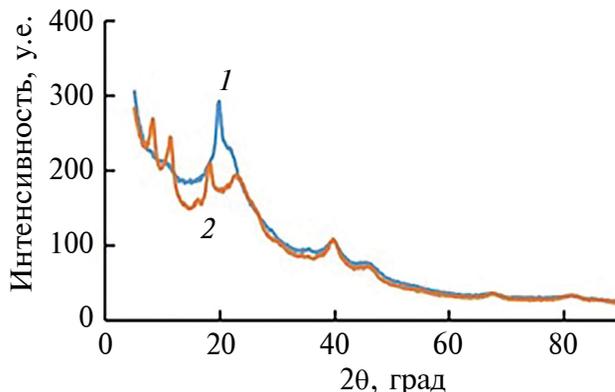


Рис. 8. РФА-спектр НЧ платины в сополимере (1) и в хитозане (2).

ультрафиолетовой спектроскопии (рис. 7) в растворах хитозана в процессе облучения наблюдалось закономерно стабильное нарастание максимума полосы при $\lambda = 215$ нм, соответствующей поверхностному плазмонному резонансу НЧ платины, достигающей постоянного значения через 30 мин. В водном же растворе сополимера максимум полосы поверхностного плазмонного резонанса при $\lambda = 219$ нм. Известно, что чем больше максимум поверхностного плазмонного резонанса смещается в длинноволновую область полос, тем больше размер НЧ. Таким образом, в сополимере формировались НЧ платины, характеризующиеся большими размерами, чем в хитозане.

Средние размеры НЧ платины в растворах хитозана и сополимера были определены методом РФА. На дифрактограммах РФА образцов появляются характерные пики платины (рис. 8). Ширина пиков платины для хитозана 2.7° , для сополимера 2.2° . Максимумы поглощения платины у обоих сополимеров наблюдались на 39.72° . Оценка размеров областей когерентного рассеяния по ширине пиков позволяла рассчитать размеры НЧ платины в композициях по формуле Шеррера:

$$D = \frac{K\lambda}{FWHM \times \cos \theta},$$

где D – размер кристаллита (Å), K – так называемая “постоянная Шеррера” (в данном исследовании $k = 0.94$), λ – длина волны излучения (0.15418 нм для $\text{CuK}\alpha$), а θ – угол дифракции вершины пика. Основной “вкладом” в формулу является значение FWHM (FWHM = Полная ширина на полувывсоте максимума) пиков.

Средние размеры НЧ Pt составили 4 нм в сополимере и 3 нм в исходном хитозане. Видно, что данные УФ-спектроскопии согласовались с данными РФА, а размер НЧ платины в сополимере больше, чем в исходном хитозане.

На микрофотографиях ПЭМ отчетливо видно, что большинство НЧ платины образуют агломераты, состоящие из нескольких десятков НЧ (рис. 9б). При этом отдельные НЧ платины характеризуются

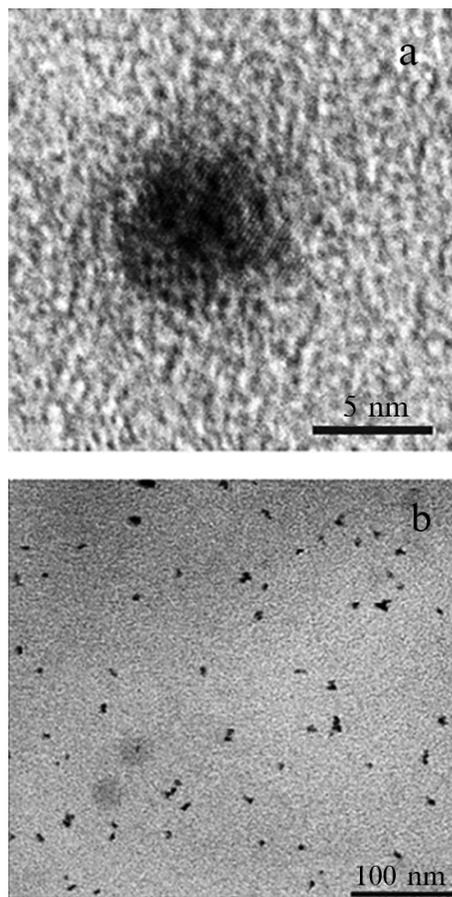


Рис. 9. ПЭМ-микрофотографии композита с НЧ платины.

кристаллической структурой и средним диаметром около 1.6–5.0 нм НЧ (рис. 9а).

НЧ платины так же определены в тонких пленках композиций методом СЭМ и регистрируются на изображениях как световые точки (рис. 10). Показано, что они формируют крупные агломераты, состоящие из множества мелких НЧ, однако их распределение

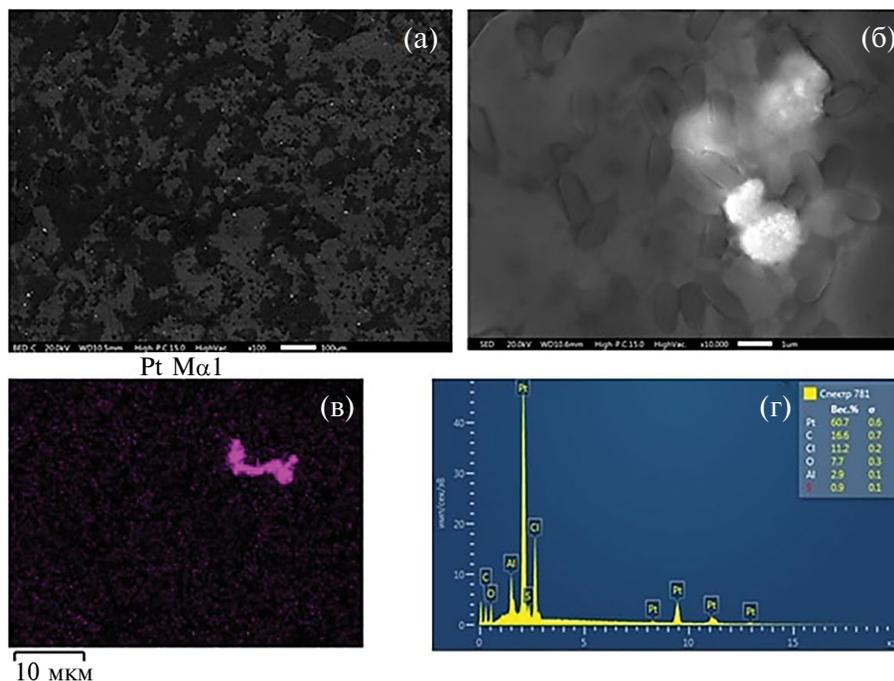


Рис. 10. Изображения поверхности композита, полученные методом СЭМ. Световые точки (а, б, в) относятся к НЧ платины, на диаграмме (г) продемонстрировано распределение элементов в точке изображения (в), относящейся к агломератам НЧ.

на поверхности равномерно. Образование агломератов обусловлено подготовкой и высушиванием тонких пленок.

Было исследовано влияние композиции с НЧ платины, стабилизированными хитозан-прив-ПВП, на жизнеспособность раковых клеток линии HeLa Kyoto и A431 и проведено сравнение с цисплатином (рис. 11а-11г). Критерием эффективности служила концентрация ингибирования ($C_{инг}$), при которой погибала половина клеток. В испытаниях на раковых клетках, чем ниже получалось $C_{инг}$, тем эффективнее вещество борется с раковыми клетками. Результаты представлены в табл. 1. При испытаниях на культуре клеток HeLa Kyoto $C_{инг}$ составила для цисплатина – 5×10^{-5} моль/л, для композита – 10^{-4} моль/л. На раковых клетках линии A431 $C_{инг}$ равна 10^{-5} моль/л, для композита 5×10^{-5} моль/л. В обоих случаях концентрация необходимая для ингибирования роста раковых клеток для композита больше, чем у цисплатина.

Таблица 1. Значения концентраций ингибирования (моль/л) препаратов платины в отношении исследуемых клеток

Тип клеток	$C_{инг}$ (цисплатин), моль/л	$C_{инг}$ (композит), моль/л
HeLa Kyoto	5×10^{-5}	10^{-4}
A431	10^{-5}	5×10^{-5}
hTERT VJ-5TA	6×10^{-6}	10^{-4}

То есть эффективность композиции меньше в пять и два раза, по сравнению с цисплатином, для раковых клеток культурных линий HeLa Kyoto и A431 соответственно. Однако за счет биосовместимой полимерной матрицы и меньшей токсичности платины было выдвинуто предположение, что композит будет более биосовместимым по сравнению с цисплатином.

Оценивали жизнеспособность клеток фибробластов линии hTERT VJ-5TA по их адгезии и росту на поверхности пленок композита и цисплатина (рис. 11д–11е). Концентрация, при которой происходило ингибирование роста клеток фибробластов, составила 10^{-4} моль/л при использовании композита, а цисплатина – 6×10^{-6} . Возможно, это указывает на то, что НЧ Pt, стабилизированные сополимером, менее токсичны, чем препарат сравнения, что делает перспективным разработку препарата НЧ платины в водорастворимой полимерной матрице хитозан-прив-ПВП при использовании увеличенной концентрации активного агента.

Исследован процесс привитой полимеризации ВП на хитозан в водно-кислотных растворах и ДМСО. Отработаны оптимальные условия получения водорастворимого привитого сополимера хитозан-ВП при содержании ВП 80%. Синтезированы НЧ платины в растворе хитозан-прив-ПВП при рН среды 7.0, средний размер которых – 4 нм. Противоопухолевые свойства НЧ Pt в растворе хитозан-прив-ПВП в 2–5 раз уступали по эффективности цисплатину при испытаниях *in vitro* на культуре раковых клеток HeLa

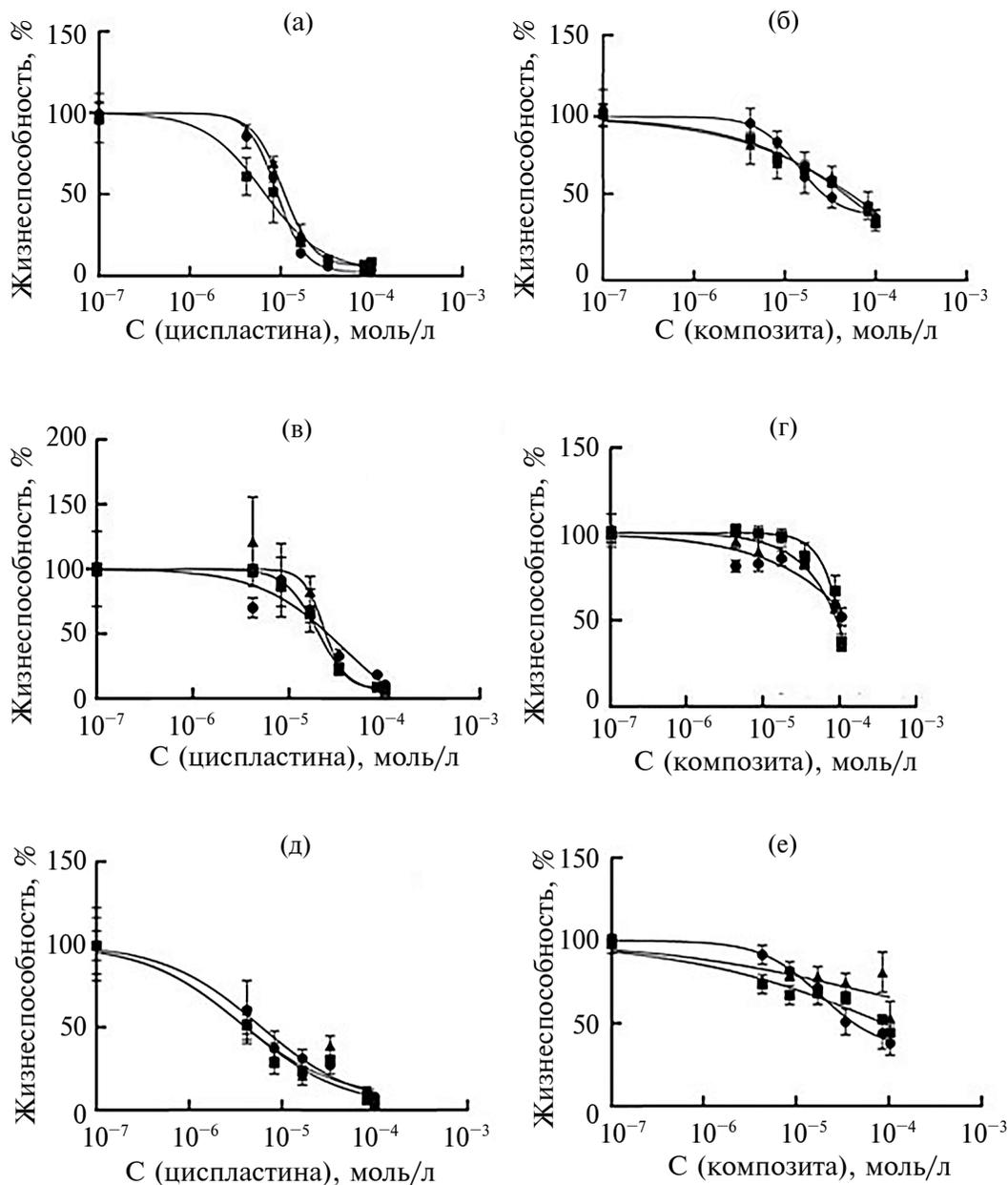


Рис. 11. Жизнеспособность (%) раковых клеток линии HeLa Kyoto (а, б), клеток линии А431 (в, г) и клеток фибробластов линии hTERT VJ-5TA (д, е) при воздействии – цисплатина (а, в, д), композита НЧ Pt с сополимером (б, г, е).

Kyoto и А431 и одинаковой концентрации платины. На культуре фибробластов клеточной линии hTERT VJ-5TA показано, что композит с НЧ платины, стабилизированный хитозан-прив-ПВП, обладал в 17 раз меньшим подавляющим действием в отношении роста клеток фибробластов hTERT VJ-5TA по сравнению с цисплатином. Перспективно исследование композиции на основе НЧ платины, стабилизированных хитозаном-прив-ПВП, при увеличении концентрации активного агента по сравнению с цисплатином.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-13-00342, <https://rscf.ru/project/23-13-00342/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yamada M., Foote M., Prow T.W.* // WIREs Nanomed. Nanobiotechnol. 2015. V. 7. P. 428–445. <https://doi.org/10.1002/wnan.1322>
2. *Rai M., Ingle A.P., Birla S., Yadav A., Santos C.A.D.* // Crit. Rev. Microbiol. 2016. V. 42. P. 696–719. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1018131>
3. *Arvizo R.R., Bhattacharyya S., Kudgus R.A., Giri K., Bhattacharya R., Mukherjee P.* // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 2943–2970. <https://doi.org/10.1039/c2cs15355f>
4. *Huang H., Yuan Q., Yang X.* // Colloids Surf. B. 2004. V. 39. P. 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.08.014>
5. *Du Y.K., Yang P., Mou Z.G., Hua N.P., Jiang L.* // J. Appl. Polym. Sci. 2006. V. 99. P. 23–26. <https://doi.org/10.1002/app.21886>
6. *Rai M., Ingle A.P., Gupta I., Brandelli A.* // Int. J. Pharm. 2015. V. 496. P. 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.059>
7. *Yerpude S.T. et al.* // Environmental Research. 2023. V. 231 (2). 116148. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116148>
8. *Khan M.A.R., Al Mamun M.S., Ara M.H.* // Microchemical Journal. 2021. V. 171. C. 106840. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106840>
9. *Gutiérrez de la Rosa S.Y. et al.* // International Journal of Molecular Sciences. 2022. V. 23. № . 16. C. 9404. <https://doi.org/10.3390/ijms23169404>
10. *Malode U. et al.* // Bulletin of the National Research Centre. 2023. V. 47. № . 1. C. 130. <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01104-y>
11. *Kumar A., Das N., Rayavarapu R.G.* // Journal of Nanotheranostics. 2023. V. 4. № . 3. C. 384–407. <https://doi.org/10.3390/jnt4030017>
12. *Jan H. et al.* // Journal of Saudi Chemical Society. 2021. T. 25. № . 8. C. 101297. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101297>
13. *Jeyaraj M., Gurunathan S., Qasim M., Kang M., Kim J.* // Nanomaterials. 2019. V. 9. № 12. P. 1719. <https://doi.org/10.3390/nano9121719>
14. *Wang W., Liang G., Zhang W.* // Chem Mater. 2018. V. 30. № 10. P. 3486–3498. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09566-3>
15. *Kutwin M.* // Arch. Med. Sci. 2017. V. 201. № 13. P. 1322–1334. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58925>
16. *Аранцева Д.А., Водовозова Е.Л.* // Биоорганическая химия. 2018. Т. 44. № 6. С. 620–632. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265>
17. *Моисеенко В.М.* // Практическая онкология. 2006. Т. 7. № 3. С. 170–178.
18. *Вартанян А.А., Огородникова М.В.* // Российский биотерапевтический журнал. 2004. Т. 1. № 3. С. 14–18.
19. *Ахтямов А.Э.* // Международный студенческий научный вестник. 2018. № 4 (часть 3). С. 436–439.
20. *Johnstone T.C., Suntharalingam K., Lippard S.J.* // Prodrugs. Chem. Rev. 2016. V. 116. № 5. P. 3436–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>
21. *Panikkanvalappil S.R., Mahmoud M.A., Mackey M.A., El-Sayed M.A.* // ACS Nano. 2013, V. 7. № 9. P. 7524–7533. <https://doi.org/10.1021/nn403722x>
22. *Zhang C., Xu C., Gao X., Yao Q.* // Theranostics. 2022. V. 12. № 25. P. 2115–2132. <https://doi.org/10.7150/thno.69424>
23. *Wennemers H., Shoshan M.S., Vonderach T.* // Angewandte Chemie International Edition. 2018. V. 58. № 15. P. 4901–4905. <https://doi.org/10.1002/anie.201813149>
24. *Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С.* // Успехи биологической химии. Т. 60. 2020. С. 317–368.
25. *Свирицкая Е.В., Гриневич Р.С., Решетов П.Д., Зубов В.П., Зубарева А.А., Ильина А.В., Варламов В.П.* // Бионанотехнологии и нанобиоматериаловедение. 2012. Т. 1. № 19. С. 13–19.
26. *Sartaj A., Qamar Z., Qizilbash F.F., Annu K., Md S., Alhakamy N., Baboota S., Ali J.* // Polymers (Basel). 2021. V. 13. № 24. P. 4400. <https://doi.org/10.3390/polym13244400>
27. *Панфилова Е.В., Буров А.М., Хлебцов Б.Н.* // Коллоидный журнал. 2020. Т. 82. № 1. С. 37–46. <https://doi.org/10.31857/S0023291220010097>
28. *Nie Z., Petukhova A., Kutacheva E.* // Nat. Nanotechnol. 2010. V. 5. № 1. P. 15–25. <https://doi.org/10.1388/nano.2009.453>
29. *Куликов С.Н., Хайруллин Р.З.* // Вестник Казанского технологического университета. 2015. Т. 18. № 18. С. 265–267.
30. *Литманович О.Е.* // Высокомолекулярные соединения, Серия С. 2008. Т. 50. № 7. С. 1370–1396.
31. *Pourjavadi A., Mahdavinia G.R., Zohuriaan-Mehr M.J., Omidian H.* // Journal of Applied Polymer Science. 2003. V. 88. № 8. P. 2048–2054. <https://doi.org/10.1002/app.11820>
32. *Solomko N.Yu., Dron I.A., Budishevskaya O.G., Voronov S.A.* // Procedia Chemistry. 2009. V. 1. № . 2. P. 1567–1575. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.11.005>
33. *Hsu S.-C., Don T.-M., Chiu W.-Y.* // J. Appl. Polym. Sci. 2002. V. 86. № 12. P. 3047–3056. <https://doi.org/10.1002/app.11333>
34. *Аржаков М.С.* Термомеханика полимеров. Montreal: Accent Graphics Communications, 2019. 150 с.

Platinum Nanoparticles in Aqueous Solutions of Chitosan-Vinylpyrrolidone Copolymer: Synthesis and Biological Activity

D. N. Zuev^{a, *}, E. I. Cherkasova^a, K. V. Apryatina^a, S. D. Zaitsev^a, L. A. Smirnova^a

^a*National Research Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky,
Nizhny Novgorod, 603022 Russia*

**e-mail: z_u_e_v2020@mail.ru*

Grafted copolymers of chitosan-vinylpyrrolidone, water-soluble at a pH of 6.8–7.5, were obtained. A technique has been developed for obtaining an aggregatively stable system of platinum nanoparticles in copolymer solutions with an average size of ~ 4 nm. The thermophysical and structural characteristics of the powdered composition of a platinum nanoparticle-copolymer are investigated. An *in vitro* comparison of the antitumor activity of solutions of the developed composition and cisplatin at the same platinum concentration was performed. It was found that with respect to the culture of HeLa Kyoto and A431 cancer cells, the composition is five and two times less effective than cisplatin, respectively. Along with this, the biocompatibility of the composition is 17 times higher than that of cisplatin, which allows its use at elevated concentrations and the development of an antitumor agent with platinum nanoparticles commensurate in effectiveness with cisplatin.

Keywords: chitosan-graft-polyvinylpyrrolidone, platinum nanoparticles, water-soluble composition, anti-tumor properties, biocompatibility