

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ПОЛИМЕРИ**

Мирослава Ангелова Вълчанова

**ПОЛИМЕРИ И ПОЛИМЕРНИ СИСТЕМИ ЗА ПРЕНОС И
ДОСТАВЯНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ
(МАКРО)МОЛЕКУЛИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд, представен за присъждане
на образователна и научна степен „доктор”**

Научни ръководители:

проф. дхн Станислав Рангелов

проф. д-р Севдалина Турманова

София, 2022 г.

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ПОЛИМЕРИ**

Мирослава Ангелова Вълчанова

**ПОЛИМЕРИ И ПОЛИМЕРНИ СИСТЕМИ ЗА ПРЕНОС И
ДОСТАВЯНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ
(МАКРО)МОЛЕКУЛИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд, представен за присъждане
на образователна и научна степен „доктор”**

Научна специалност: Полимери и полимерни материали

Научни ръководители:

**проф. дхн Станислав Рангелов
проф. д-р Севдалина Турманова**

Научно жури:

- 1. проф. д-р Даринка Христова**
- 2. проф. дхн Станислав Рангелов**
- 3. проф. д-р Деница Момекова**
- 4. проф. д-р Красимир Василев**
- 5. доц. д-р Райна Бряскова**

София, 2022 г.

Дисертационният труд е изложен на 103 стандартни страници, включва 30 фигури, 16 схеми 9 таблици и 158 цитирани литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и допуснат до защита на заседание на Колоквиума на Института по полимери-БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2022 г. от.....ч. в заседателната зала на Института по полимери - БАН, на заседание на научното жури.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на Институт по полимери-БАН; София, ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 103В.

Автор: Мирослава Ангелова Вълчанова

Заглавие: ПОЛИМЕРИ И ПОЛИМЕРНИ СИСТЕМИ ЗА ПРЕНОС И ДОСТАВЯНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ (МАКРО)МОЛЕКУЛИ

Изказвам искрена благодарност на научните си ръководители проф. д-ри Станислав Рангелов и проф. д-р Севдалина Турманова за консултациите, напътствията и подкрепата, която ми оказаха.

Благодаря на гл.ас.д-р Емилия Иванова от Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ и на целия колектив от лаборатория “Полимеризационни процеси” при ИП-БАН за помощта и за съветите по време на моята докторантура.

Благодаря на колектива от Института по молекулярна биология-БАН, Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология и Катедра по фармацевтична технология и биофармацевтика, Фармацевтичен факултет, Медицински университет-София при провеждане и обсъждане на биологичните и токсикологични изследвания.

Изследванията в настоящата дисертационна работа са проведени с финансовата подкрепа на Фонд научни изследвания (Договор DN09/1, 2016 г., КП-06-Н 23/7, 2018 г. -СУ), (Договор BG05M2OP001-1.002-0012 - ЕС) и сектор „Научни изследвания“ на У-т „Проф. д-р Асен Златаров“, Бургас (Проект НИН-405/2017), (Проект НИН-425/2019) ,за което изказвам своята благодарност.

В тези изследвания е използвано оборудване на Разпределената научна инфраструктура ИНФРАМАТ, част от Националната пътна карта на България за научна инфраструктура, подкрепена финансово от Министерство на образованието и науката.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

| | |
|-------------------|---|
| AGE | – Алилглицидилов етер |
| AFM | – Атомно силова микроскопия |
| AIBN | – Азо–бис–изобутиронитрил |
| AET.HCL | – α -аминоетантиол хидрохлорид |
| GPC | – Геловопроникваща хроматография |
| DLS | – Динамично разсейване на светлината |
| DMF | – <i>N,N</i> -диметилформамид |
| DP | – Степен на полимеризация |
| DMSO | – Диметилсулфоксид |
| DNA | – Дезоксирибонуклеинова киселина |
| EEGE | – Етоксietetил глицидилов етер |
| EE | – Ефективност на капсулиране |
| I_{90} | – Интензитет на разсеяна светлина |
| IC_{50} | – Концентрацията, при която преживяемостта на клетките намалява на половина |
| CAC | – Критична концентрация на асоцииране |
| CAPE | – Фенетилов естер на кафеената киселина |
| MMR | – Молекулно – масово разпределение |
| MTT | –3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5дифенилтетразолиев бромид |
| PEEGE | – Полиетоксietetил глицидилов етер |
| PAGE | – Поли(алилглицидилов етер) |
| PG | – Полиглицидол |
| PdI | – Индекс на полидисперсност |
| C_{12} -PAGE-PG | – Поли(алилглицидилов етер) полиглицидол диблоков съполимер |
| C_{12} -PN-PG25 | –Модифициран съполимер, съдържащ 25% полиглицидол |
| C_{12} -PN-PG60 | –Модифициран съполимер, съдържащ 60% полиглицидол |
| R_h | – Хидродинамичен радиус |
| R_g | – Инерционен радиус |
| SLS | – Статично разсейване на светлината |
| TEM | – Трансмисионна електронна микроскопия |
| THF | – Тетрахидрофуран |
| 1H ЯМР | – Ядрено–магнитен резонанс |

УВОД

Наноразмерните материали и нанотехнологиите притежават голям потенциал за развитие и навлизат интензивно в редица области, включително и в медицината. Сред наноматериалите особено място заемат полимерните наночастици, поради ниската си токсичност, възможностите за функционализиране, придаване на биоразградимост и контролиране на размерите и морфологията. Получаването на строго дефинирани полимерни наночастици обаче е немислимо без отличното познаване на методите за контролиран синтез на полимери.

През последните години блоковете съполимери се наложиха като интересен клас полимери, важна алтернатива за синтез на нови наноматериали и получаване на интересни наноструктури. Те притежават ценен комплекс от свойства в разтвор и твърдо състояние, включващи възможности за получаване на разнообразни структури и образуване на подредени наноразмерни агрегати. Контролирането на състава и структурата на отделните блокове е предпоставка за получаване на разнообразие от наноморфологии с потенциални приложения в биомедицината, генното инженерство, електрониката, оптичните технологии и др.

Добре известно е, че амфифилните блокови съполимери притежават способност за самоасоцииране в разреждени разтвори. Амфифилни блокови съполимери с предварително зададен дизайн (природа, състав, архитектура) могат да бъдат проектирани да образуват нано – или микроразмерни структури като мицели, везикули, влакна, нанотръби и т.н., информация за които се получава чрез комбиниране на различни експериментални техники. Полимерните наночастици, получени чрез самоасоцииране и/или съасоцииране, намират важни приложения в различни области, например като носители на лекарства, биологично активни (макро)молекули, гени или като диагностични и терапевтични агенти.

В настоящия дисертационен труд усилията са насочени към изследвания върху възможностите за контролиране на различни макромолекулни характеристики на полиетери като поли(етоксипетил глицидилов етер), поли(алилглицидилов етер) и полиглицидол. За целта са приложени разнообразни синтетични подходи, позволяващи контролиране на състава, промяна на природата и свойствата на отделните блокове и на съполимерите, въздействие върху способността им да образуват наноразмерни структури. Редица от свойствата на получените съполимери са изследвани, а за обещаващите структури е представено и тяхното потенциално приложение като носители на биологично активни (макро)молекули.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА

Целта на дисертационната работа е да демонстрира потенциала на серия полиетери, които чрез различни химически модификации рязко променят състава и свойствата си, като системи за пренос и доставяне на биологично активни (макро)молекули.

За постигането на тази цел изследванията са насочени към решаването на следните задачи:

1. Синтез и охарактеризиране на серия поли(алилглицидилов етер)–поли(етоксиетилглицидилов етер) диблокови съполимери.

2. Въвеждане на хидроксилна функционалност в съполимерите от т.1 и превръщане в амфифилни поли(алилглицидилов етер)–полиглицидол диблокови съполимери.

3. Изследване на поведението във вода на съполимерите от т. 2 и на потенциала им като системи за пренос на фенетилов естер на кафеенета киселина.

4. Модифициране на съполимерите от т. 2 чрез въвеждане на странични аминогрупи.

5. Изследване на поведението във вода на съполимерите от т. 4 и на потенциала им като системи за доставяне на DNA.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За постигане на целта на дисертационната работа са синтезирани полиетери с латентна химическа функционалност, т.е., функционалност, която се проявява след определено химическо въздействие върху съполимерите, в резултат на което те променят състава и свойствата си. Полиетерите са с диблокова архитектура на веригата, като от съществено значение е включването на висш (додещилов) въглеродороден остатък в полимерната верига. Въвеждането на додещилов остатък има синтетични предимства, защото позволява полимеризациите да бъдат извършени в маса, т.е. в отсъствие на органичен разтворител и при високи температури. Това способства за съкращаване на реакционното време и повишава както ефективността на реакцията, така и добивите на съполимер. Освен чисто синтетичните съображения, додещиловият остатък в съполимерната верига допринася за нарастване на хидрофобността на съполимерите. Последното би се отразило в получаване на стабилни и добре дефинирани самоасоциирани структури, с което отпада необходимостта от увеличаване на дължината (молната маса, степента на полимеризация) на хидрофобния блок. Не на последно място е възможността съполимерите да бъдат интеркалирани чрез додещиловия остатък в бислоини структури като липозоми и ниозоми, или да

участват в липофилни взаимодействия с фосфолипидната клетъчна мембрана, с което да индуцират и/или улеснят неспецифично клетъчно интернализация. Чрез последователни ортогонални модификации в полиестерните блокове са въведени хидроксилни или аминогрупи, с което свойствата на съполимерите драстично се променят.

1. Получаване на амфибилни поли(алилглицидилов естер)–полиглицидол (C₁₂–PAGE–PG) диблокови съполимери

Съполимерите са получени чрез анионна полимеризация с отваряне на пръстена последователно на AGE и EEAGE. Полимеризацията е иницирана от частично депротониран додеканол, с което се въвежда додецилов остатък в края на съполимерната верига, и се извършва в маса при температура 90°C. Хидроксилната функционалност и получаване на блокове от линейен полиглицидол се въвежда на последния етап чрез хидролиза и отстраняване на защитните етоксигетилни групи. Последователността на реакциите за получаване на C₁₂–PAGE–PG диблокови съполимери е показана на Схема 1.

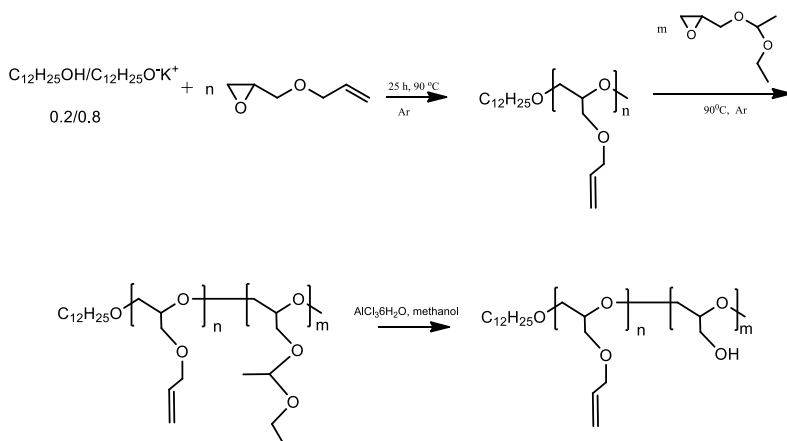
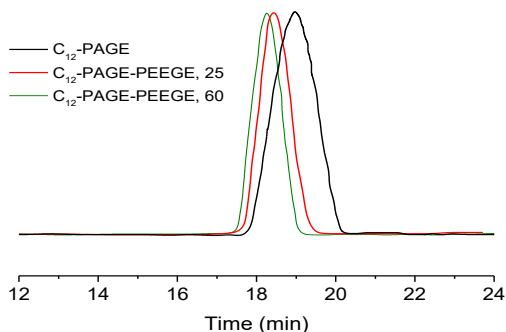


Схема 1. Реакционна последователност за получаване на C₁₂–PAGE и диблокови съполимери C₁₂–PAGE–PEEGE и C₁₂–PAGE–PG.

Блоквата структура на съполимерите C₁₂–PAGE–PEEGE е доказана чрез GPC. На Фигура 1 са представени елуограми на C₁₂–PAGE и два съполимера с различни степени на полимеризация на блоковете PEEGE. Фигурата показва ясно и отчетливо отместване на кривите към по–малки времена на елуиране с формирането на блока от PEEGE и с увеличаване на молната маса на последния. Всички проби показват тесни, мономодални молекулно–масови разпределения в диапазона на M_w/M_n от 1.06 до 1.14

(Таблица 1). Стойностите на молекулните маси от GPC са пресметнати по отношение на полистиренови стандарти, поради което се различават от тези, определени чрез ^1H ЯМР (Таблица 1). Средните бройни молни маси и степените на полимеризация на блоковете PAGE и PEEGE са изчислени от ^1H ЯМР спектрите, показани на Фигури 2 и 3, и са обобщени в Таблица 1. Видно от Таблица 1 е, че двата съполимера с еднакви степени на полимеризация на блока PAGE (44) и нарастващи от 16 на 66 степени на полимеризация на блока PEEGE.



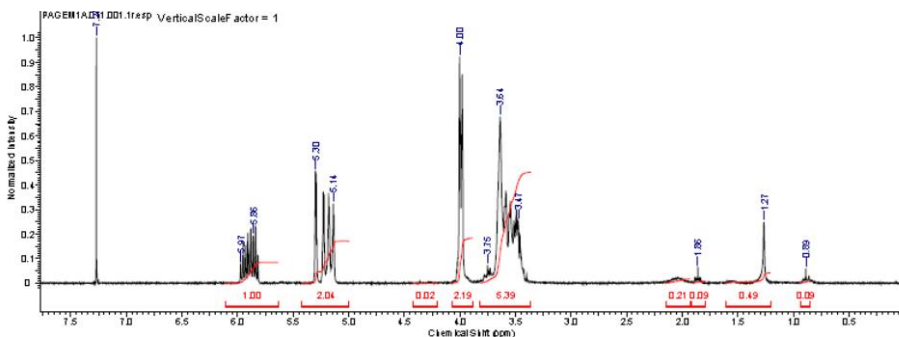
Фигура 1. GPC елюограми на C₁₂-PAGE (–) и два C₁₂-PAGE-PEEGE съполимера: C₁₂-PAGE-PEEGE, 25 (–) и C₁₂-PAGE-PEEGE, 60 (–). 25 и 60 съответстват на целевите съдържания на полиглицидол.

Таблица 1. Молекулно-масови характеристики и степени на полимеризация на C₁₂-PAGE и двата C₁₂-PAGE-PEEGE съполимера

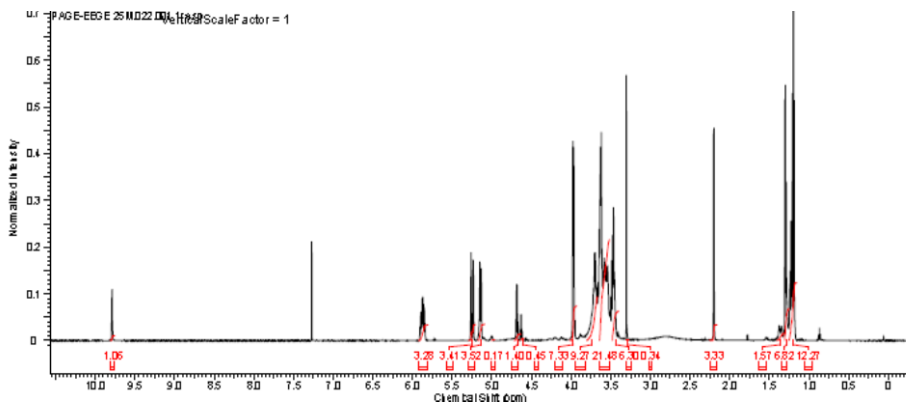
| Проба | M _w ^a (g mol ⁻¹) | M _n ^a (g mol ⁻¹) | M _w /M _n ^a | M _n ^b (g mol ⁻¹) | Степен на полимеризация ^b | |
|------------------------------------|---|---|---|---|--------------------------------------|-------|
| | | | | | PAGE | PEEGE |
| C ₁₂ -PAGE | 7530 | 6630 | 1.14 | 5150 | 44 | – |
| C ₁₂ -PAGE- PEEGE 25 | 11020 | 10240 | 1.08 | 7540 | 44 | 16 |
| C ₁₂ -PAGE- PEEGE 60 | 12880 | 12120 | 1.06 | 13900 | 44 | 66 |

* Определени от GPC по отношение на полистиренови стандарти (^a) и чрез ^1H ЯМР (^b). 25 и 60 съответстват на целевите съдържания на полиглицидол

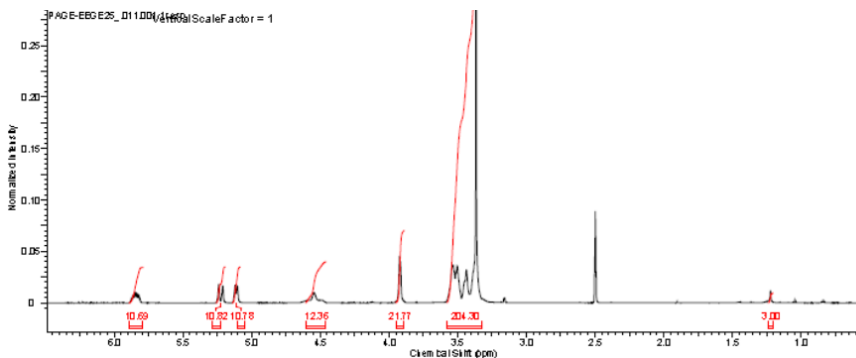
Отстраняването на защитните етоксигетилни групи представлява последния етап от синтеза на съполимерите C₁₂-PAGE-PG (Схема 1). То се извършва чрез хидролиза при меки условия, при които не се очаква и никога не е било наблюдавано късане на основната полиестерна верига. Реакцията протича количествено, както се вижда от изчезването на сигналите за метиновия протон при 4.6–4.7 ppm и на метиловите протони при 1.1–1.2 и 1.3 ppm, характерни за ацеталната група (Фигури 3 и 4). Молните съдържания на полиглицидол са определени от ¹H ЯМР спектрите на съполимерите. Те, заедно със степените на полимеризация на съставните блокове и използваните по-нататък в дисертацията съкращения, са представени в Таблица 2.



Фигура 2. ¹H ЯМР спектър на C₁₂-PAGE в CDCl₃.



Фигура 3. ¹H ЯМР спектър на C₁₂-PAGE-PEEGE25 в CDCl₃.



Фигура 4. ^1H ЯМР спектър на C_{12} -PAGE-PG25 в DMSO-d_6 .

Таблица 2. Съдържание на полиглицидол, състав и използвани наименования на амфифилни поли(алилглицидилов етер)–полиглицидол (C_{12} -PAGE-PG) диблокови съполимери

| Наименование | Съдържание на полиглицидол (mol %) | Състав |
|----------------------------|------------------------------------|--|
| C_{12} -PAGE-PG25 | 25 | $\text{C}_{12}\text{H}_{25}-(\text{AGE})_{44}-(\text{G})_{16}$ |
| C_{12} -PAGE-PG60 | 60 | $\text{C}_{12}\text{H}_{25}-(\text{AGE})_{44}-(\text{G})_{66}$ |

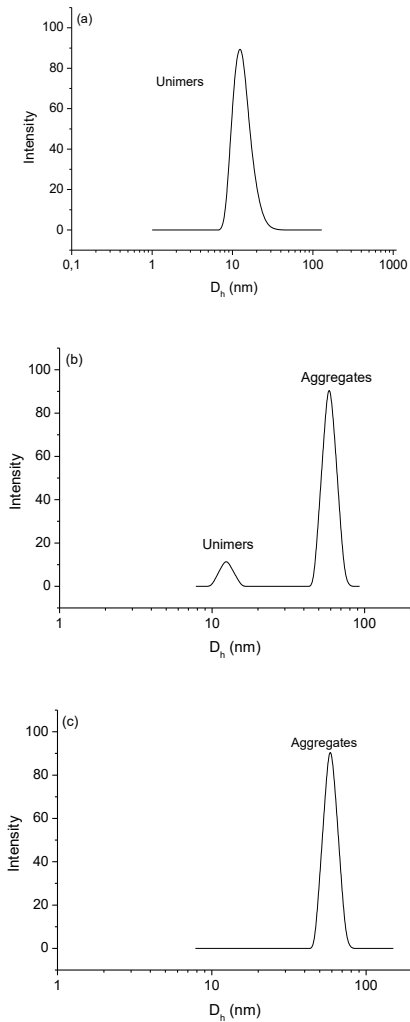
2. Изследване на поведението във вода на амфифилни поли(алилглицидилов етер)–полиглицидол (C_{12} -PAGE-PG) диблокови съполимери

Амфифилните блокови съполимери притежават различна разтворимост на отделните блокове и в селективни разтворители могат да самоасоциират, като образуват агрегати с различна морфология (мицели, весикули, цилиндрични и комплексни структури). Това тяхно свойство е в основата на дизайна на нови материали и структури, обединяващи различни характеристики. Освен додециловия остатък, блокът от PAGE също е изцяло хидрофобен. Блокът от полиглицидол, който е хидрофилен, допринася за амфифилния характер на изследваните съполимери, за които водата е селективен разтворител. При директно разтваряне във вода очаквано се оказва, че съполимерът с по-ниско съдържание на полиглицидол C_{12} -PAGE-PG25 се разтваря по-бавно и разтворимостта му е ограничена, тъй като при концентрации по-високи от 8 mg/ml се получават дисперсии с млечно-бяла опалесценция. Съполимерът с по-високо съдържание, респективно степен на полимеризация на полиглицидол C_{12} -PAGE-PG60, се разтваря при директен

контакт с вода бързо и спонтанно в широк концентрационен интервал. Свойствата във водна среда на двата съполимера са изследвани чрез динамично и статично разсейване на светлината.

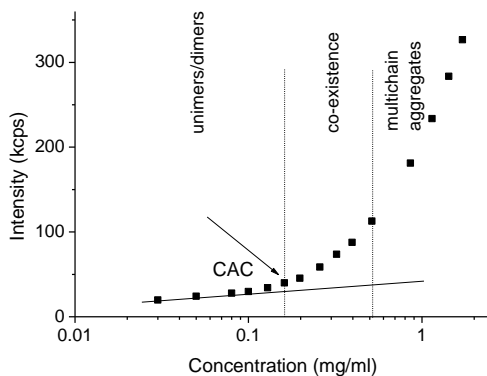
На първия етап от изследването са определени критичните концентрации на асоцииране (CAC), като са проследени промените в разпределението по размери на частиците с промяна на концентрацията на съполимерите. На Фигура 5 са показани представителни спектри на разпределения по размери, получени от DLS, за съполимера C₁₂-PAGE-PG60 при различни концентрационни интервали. При най-ниските изследвани концентрации са наблюдавани мономодални разпределения по размери, които съответстват на частици с хидродинамичен радиус от около 5 nm. Тези частици са идентифицирани като унимери (неасоциирали макромолекули) или агрегати с много ниско (2–3) агрегационно число – димери, тримери (Фигура 5a). С нарастване на концентрацията на съполимера устойчиво се появява и става доминиращ втори пик, който съответства на популация от частици със значително по-големи размери, най-вероятно мултимолекулни агрегати (Фигура 5b). При по-нататъшно нарастване на концентрацията, пикът, който се свързва с унимерите, постепенно изчезва и разпределенията се превръщат отново в мономодални, съответстващи на единствена популация от мултимолекулни агрегати (Фигура 5c). Трите концентрационни интервала, в които се наблюдава съществуване само на унимери, само на агрегати и съвместно съществуване на унимери и агрегати са изобразени на Фигура 6. Тя показва зависимостта на интензитета на разсеяната светлина от концентрацията на съполимера. CAC е определена като стойността на най-ниската концентрация, която се отклонява от линейния участък на зависимостта, както е показано на Фигура 6. Така определената стойност на CAC много добре корелира с появата на “агрегационен“ пик (Фигура 5b). По аналогичен начин е определена CAC на съполимера C₁₂-PAGE-PG25. Двете критични концентрации на асоцииране са представени в Таблица 3. Те са разположени в микромолярната област, като CAC на по-хидрофобния съполимер C₁₂-PAGE-PG25 е значително по-ниска.

Параметрите на агрегатите, образувани от C₁₂-PAGE-PG във вода – хидродинамичен размер, средна масова молна маса (M_w), инерционен радиус (R_g), втори вириален коефициент (A_2) – са определени чрез динамично и статично разсейване на светлината. Измерванията са проведени в концентрационни интервали над критичните концентрации на асоцииране на съполимерите, в които разпределението по размери е мономодално (Фигура 5c). В тези концентрационни интервали дисперсиите представляват слабо (C₁₂-PAGE-PG60) до умерено (C₁₂-PAGE-PG25) опалесциращи прозрачни течности. За определяне на горесцитираните параметри, измерванията са извършени при много (9 при DLS и 11 при SLS) ъгли и различни концентрации (4 – 6).



Фигура 5. Спектри на разпределение по размер на частиците от DLS за C_{12} -PAGE-PG60 при различни канцентрации: 0.080 mg/ml (a); 0.198 mg/ml (b) и 0.396 mg/ml (c).

*Измерванията са направени при ъгъл на наблюдение 90° и температура 25°C .



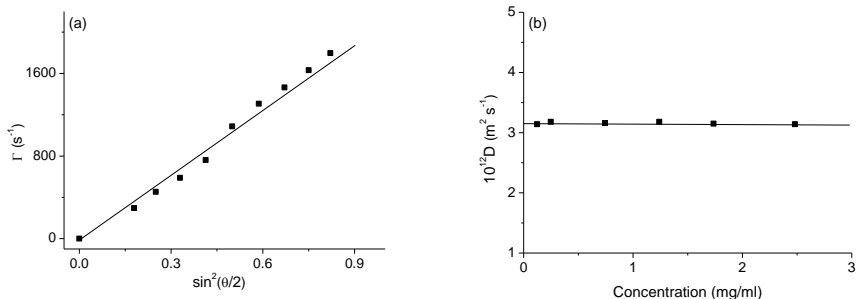
Фигура 6. Зависимост на интензитета на разсеяната светлина от концентрацията на съполимера C₁₂-PAGE-PG60 и определяне на CAC.

* Измерванията са направени при ъгъл на наблюдение 90° и температура 25°C.

Таблица 3. Стойности на CAC в mg/ml и μmol/l за C₁₂-PAGE-PG съполимери във вода, определени чрез светлоразсейване при 25°C

| Съполимер | CAC | |
|----------------------------|-------|--------|
| | mg/ml | μmol/l |
| C ₁₂ -PAGE-PG25 | 0.006 | 1.05 |
| C ₁₂ -PAGE-PG60 | 0.161 | 16.26 |

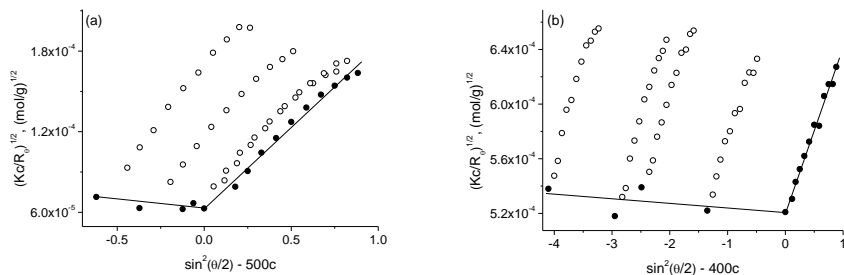
Дифузионните коефициенти, D , са определени от наклоните на линейните зависимости на времето на релаксация от $\sin^2(\theta/2)$, както е показано на Фигура 7a. От концентрационната зависимост на D при екстраполиране към нулева концентрация са определени дифузионните коефициенти при безкрайно разреждане, D_0 (Фигура 7b). Последните са използвани за изчисляване на хидродинамичния радиус R_h , по уравнението на Стокс-Айнщайн, приемайки сферична морфология на частиците. Стойностите на R_h са обобщени в Таблица 4.



Фигура 7. Скорост на релаксация като функция от $\sin^2(\theta/2)$ за водна дисперсия на C₁₂-PAGE-PG25 при концентрация 2.48 mg/ml (a). Концентрационна зависимост на дифузионния коефициент за C₁₂-PAGE-PG25 агрегати (b).

*Измерванията са направени при температура 25°C.

Данните от статичното светлоразсейване са обработени по метода на Бери. От представени на Фигура 8 диаграми на Бери са определени стойностите на M_w , R_g и A_2 за агрегатите, които двата съполимера образуват. Всички параметри са обобщени в Таблица 4. Резултатите показват, че образуваните в резултат на самоасоцииране агрегати са наноразмерни. По-хидрофобният съполимер, C₁₂-PAGE-PG25, образува агрегати, които са значително по-големи по размер и с много по-висока молна маса от тези на C₁₂-PAGE-PG60. Вторият вириален коефициент е малък по стойност (от порядъка на 10⁻⁷ ml mol/g²), което е в съответствие с големите молни маси на агрегатите. Положителната му стойност показва благоприятни взаимодействия между частиците и разтворителя, дори и за по-хидрофобния съполимер C₁₂-PAGE-PG25, който се характеризира с къса хидрофилна верига спрямо дължината на хидрофобния PAGE блок. Стойностите на R_g са консистентни с хидродинамичните радиуси, а отношението R_g/R_h е в интервала 1.5–1.6, което е съотносимо с морфология на сферични частици с външен слой (корона) от хидрофилни гъвкави вериги [1, 2]. Чрез електрофоретично светлоразсейване е определен и повърхностният потенциал на агрегатите (Таблица 4). Агрегатите се характеризират с ниски, близки до неутрални стойности на ζ потенциала, което е в съответствие с нейонната природа на съполимерите.



Фигура 8. Диаграми на Бери за C_{12} -PAGE-PG25 (a) и C_{12} -PAGE-PG60 (b). Измерванията са направени при температура 25°C .

Таблица 4. Динамични и статични параметри и ζ потенциал на агрегати, получени при самоасоцииране на C_{12} -PAGE-PG съполимери във воден разтвор

| Съполимер | $10^{-6} \times M_w$ (g mol^{-1}) | $10^7 \times A_2$ (ml mol/g^2) | R_g (nm) | R_h (nm) | R_g/R_h | ζ (mV) |
|---------------------|---|--|---------------|---------------|-----------|-----------------|
| C_{12} -PAGE-PG25 | 253.0 | 3.2 | 128.6 | 78.6 | 1.64 | -5.0 |
| C_{12} -PAGE-PG60 | 3.7 | 8.0 | 44.6 | 29.1 | 1.53 | 0.1 |

* Измерванията са направени при температура 25°C

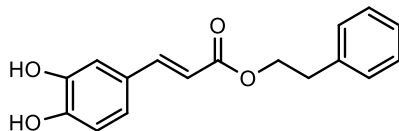
Извършени са измервания и при физиологична температура 37°C . Не са наблюдавани обаче съществени разлики в стойностите на получените параметри, които остават в рамките на статистическата грешка на методите. Това наблюдение не е изненадващо, като се има предвид, че нито един от съставните блокове и компоненти на изследваните съполимери не проявява термична чувствителност.

Анализът на експерименталните резултати показва, че двата съполимера образуват сравнително големи по отношение на размерите на уномерите агрегати, като това е много по-силно проявено при по-хидрофобния съполимер. Наистина, агрегатите на C_{12} -PAGE-PG25 са с радиуси много по-големи от дължината на напълно изпънатата верига на съполимера. Това означава, че структурата на агрегатите на C_{12} -PAGE-PG25 се различава от познатата структура *ядро-корона* на полимерните мицели и по-скоро е подобна на тази, описана за други съполимери на полиглицидола

[3, 4]. В съответствие и по аналогия на структурата на тези частици, може да се предположи образуване на мултимицеларни агрегати, състоящи се от множество хидрофобни домени. Тези домени вероятно са образувани от хидрофобните компоненти на съполимерите – додециловите остатъци и PAGE веригите, – които са свързани помежду си чрез многобройни водородни връзки, осъществявани чрез полиглицидоловите вериги. Може да се предположи, че хидрофобните взаимодействия и взаимодействията чрез водородни връзки са еднакво отговорни за образуването на тези частици. Вероятно, по периферията на частиците съществува фракция от PG вериги, които не участват в междувременно свързване чрез водородни връзки и по този начин допринасят за възникването на отблъскващи взаимодействия с PG вериги от съседни частици. По този начин те изпълняват ролята на стерично активен компонент, който придава колоидна стабилност и предотвратява макроагрегирането.

3. Изследване на потенциала амфифилни поли(алилглицидилов етер)–полиглицидол (C₁₂–PAGE–PG) диблокови съполимери като системи за пренос на фенетилов естер на кафеената киселина

Фенетиловият естер на кафеената киселина (CAPE) е основният компонент на пчелния прополис. Той е природно съединение, представляващ хидрофобен полифенол (Фигура 9) и, освен от пчелния прополис, може да бъде изолиран от различни растения. CAPE притежава широка биологична активност в това число противовъзпалителни, антиоксидантни, антибактериални, противоракови и др. свойства [5, 6, 7, 8, 9]. Едно от най-важните предимства на CAPE е това, че токсичността му е селективна – той не е токсичен за здравите, не-раковите клетки [10, 11, 12]. Неговата ниска водоразтворимост, както и нестабилността му във физиологична среда обаче представляват фундаментални ограничения за приложението му. Възможно решение за преодоляване на тези ограничения е инкорпорирането/натоварването му в подходящи системи за доставяне на лекарства [13, 14]. Например, *Wadhwa et al.* [15] докладват, че комплексообразването на CAPE с γ -циклодекстрини силно повишава стабилността му в културални среди и антитуморната му активност.

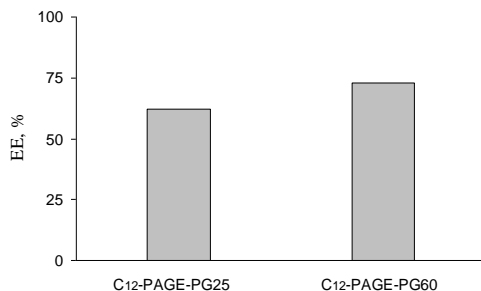


Фигура 9. Химична структура на фенетиловия естер на кафеената киселина (CAPE).

Използването на полимерни наноносители може да се счита за друга алтернатива, която обаче все още не се развива интензивно. В литературата има съобщения за натоварени с CAPE поли(лактид-съ-гликолид) (PLGA) наночастици. Наблюдавано е освобождаване в зависимост от състава на наночастиците в интервала 33–67%, приписвано на адсорбцията на CAPE върху повърхността на частиците. В друго изследване се съобщава за висока противоракова активност на CAPE, натоварен в мицели на поли(етиленоксид)-блок-поли(ε-капролактон) [16]. Авторите на [17] докладват за натоварване на смесени мицели, съдържащи поли(акрилова киселина) PAA и сегменти с две противотуморни субстанции - CAPE и доксорубин хидрохлорид (DOX). Включени са две биоактивни вещества – едното с хидрофилни (DOX), а другото (CAPE) с хидрофобни свойства. Тези изследвания показват, че капсулирането на CAPE в полимерни наноносители може да подобри неговите биофармацевтични свойства и противоракова активност.

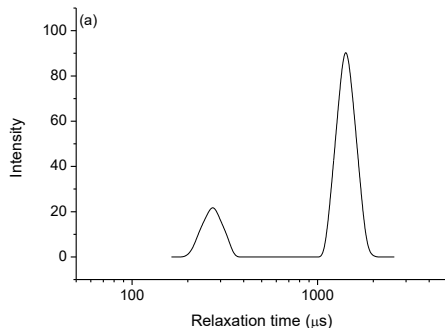
В тази част от дисертационната работа е изследван потенциалът на наночастиците, образувани от C₁₂-PAGE-PG диблокови съполимери като платформа за солубилизиране на CAPE. Повишената хидрофобност, резултат от въвеждането на додецилов остатък, както и множеството двойни връзки се очаква да създадат благоприятно обкръжение за CAPE и да подобрят съвместимостта му в хидрофобните домени на агрегатите. От друга страна, многобройните хидроксилни групи от полиглицидоловите вериги могат да допринесат за подобряване на биосъвместимостта както на съполимерите, така и на агрегатите, получени от тях.

Натоварването на агрегатите с CAPE се извършва чрез изпаряване на разтворител, следвайки един и същ протокол за двата съполимера: към воден разтвор на съполимера с концентрация 1.25 mg/ml и обем 8 ml при интензивно разбъркване се прибавят 2 ml етанолов разтвор на CAPE с концентрация 2 mg/ml. След изпаряване на етанола, получените дисперсии се филтрират, с което се отстранява ненатоварения CAPE, от чието количество се определя ефективността на натоварване по уравнение $EE = \frac{\text{Общо количество на лекарството} - \text{Ненатоварено лекарство}}{\text{Общо количество на лекарството}} \times 100$. Определената ефективност на натоварване достига до над 60 % и е малко по-висока за агрегатите на C₁₂-PAGE-PG60 (Фигура 10).



Фигура 10. Ефективност на натоварване на CAPE в двата агрегата на C₁₂-PAGE-PG25 и C₁₂-PAGE-PG60.

При натоварването обаче настъпват промени в разпределенията по времена на релаксация, респективно, разпределения по размери от DLS, които вече по-рядко са мономодални. Примерно разпределение по времена на релаксация е показано на Фигура 11, от която е видна появата на „бърз“ пик. Това предполага образуване на фракция от малки частици, чийто принос към общия интензитет на разсеяната светлина типично е около 10–15%. Трябва да се отбележи обаче, че тези „бързи“ пикове се появяват несистематично както като позиция, така и като интензитет, което попречи на анализирането им отделно от доминантните пикове.



Фигура 11. Разпределение по време на релаксация от водни дисперсии на натоварени с CAPE агрегати от C₁₂-PAGE-PG25 при температура 37°C и ъгъл 90°.

Доминантните пикове са анализирани отделно, като хидродинамичните радиуси са определени от ъгловите зависимости на скоростите на релаксация. Стойностите на R_h на натоварените с CAPE

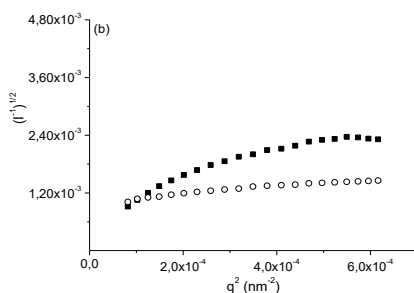
съполимерни агрегати са обобщени в Таблица 5. Видно е, че натоварването с CAPE се отразява в нарастване на хидродинамичните размери на частиците с 35 – 55% (Таблицы 4 и 5).

Таблица 5. Динамични и статични параметри и ζ потенциал на натоварени с CAPE агрегати на C₁₂-PAGE-PG съполимери.

| Съполимер | R _h ^a (nm) | R _g ^b (nm) | R _g /R _h | R ^c (nm) | ζ (mV) |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------|
| C ₁₂ -PAGE-PG25 | 105.9 | 124.1 | 1.17 | 86±20 | -15.4 |
| C ₁₂ -PAGE-PG60 | 45.1 | 67.0 | 1.49 | 36±9 | -8.9 |

* Измерванията са направени при температура 25°C. а – изчислен от ъгловата зависимост на скоростта на релаксация; b – определен от парциални диаграми на Бери; c – определен за доминантните частици от AFM.

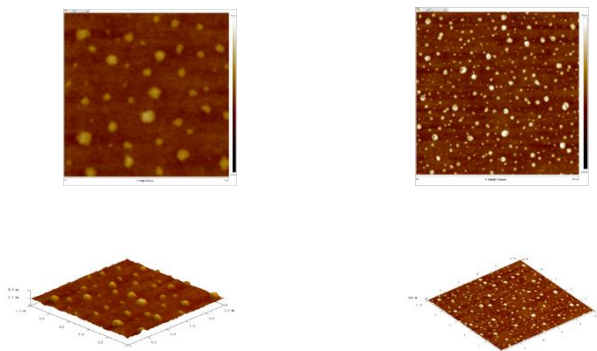
Инерционните радиуси са определени от парциалните диаграми на Бери (Фигура 12) и също са показани в Таблица 5. Стойностите на R_g са напълно консистентни с тези на R_h, а промените в следствие на натоварването с CAPE, са по-слабо изразени отколкото при R_h (Таблицы 4 и 5). Стойностите на R_g/R_h на натоварените с CAPE агрегати са по-ниски от тези на ненаварените (Таблицы 4 и 5), но са съвместими със сферична морфология на частиците. По-ниските стойности могат да означават образуване на по-плътни и компактни частици с известен принос от подценяване на R_g, поради определянето му при бимодално разпределение.



Фигура 12. Парциални диаграми на Бери за определяне на R_g на натоварени с CAPE агрегати на C₁₂-PAGE-PG съполимери. C₁₂-PAGE-PG60 (○), C₁₂-PAGE-PG25 (■)

*Измерванията са направени при температура 25°C.

Натоварените агрегати са визуализирани чрез AFM, от която са получени преки доказателства и информация за морфологията, размера и разпределението по размери на натоварените агрегати. Представителни микрографии са показани на Фигура 13. На микрографиите се наблюдават частици със сферична морфология, които обаче не са униформени, т.е., с еднакви размери, а по-скоро са с разпределение, което предполага съществуване на две популации агрегати. Размерите им в сухо състояние са в добра корелация с „бързия“ и доминантния пикове от DLS (Таблица 5).



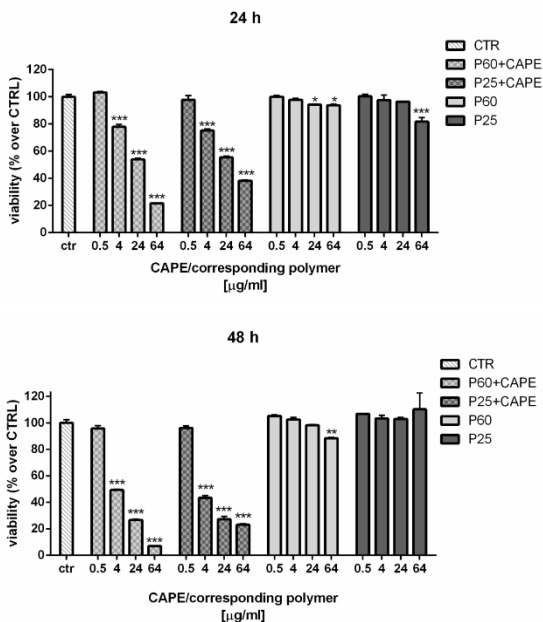
Фигура 13. AFM изображения на натоварени с CAPE агрегати на C₁₂-PAGE-PG25 (в ляво) и C₁₂-PAGE-PG60 (в дясно). Наблюдаваните сегменти са с размери 1×1 μm (в ляво) и 5×5 μm (в дясно).

Натоварването на частиците води до отместване на ζ потенциала към по-отрицателни стойности (Таблица 5), докато повишаването на температурата до 37°C не оказва влияние на нито един от определените параметри. Трябва да се отбележи, че като цяло размерите на натоварените с CAPE частици са подходящи за интравенозно администриране.

4. Ефекти на ненатоварени и натоварени с CAPE агрегати на C₁₂-PAGE-PG диблокови съполимери върху клетъчната преживяемост на миши фибробласти L929

L929 миши фибробластни клетки са използвани като *in vitro* система за оценка на биосъвместимостта на ненатоварени и натоварени с CAPE агрегати на C₁₂-PAGE-PG съполимери. Дисперсиите на ненатоварените агрегати не повлияват в значима степен жизнеността на клетките, като тяхната преживяемост е над 80% (Фигура 14). Резултатите недвусмислено показват отсъствието на цитотоксичност на съполимерите в изследвания

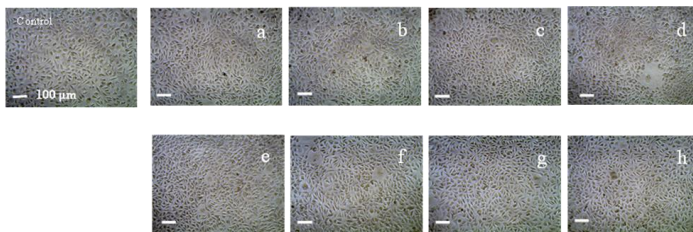
концентрационен интервал. Натоварените с CAPE агрегати обаче показват силно изразен дозозависим цитотоксичен ефект, който се наблюдава при концентрации на CAPE по-високи от 4 $\mu\text{g/ml}$. Цитотоксичните ефекти се променят от нисък през умерен до силен с увеличаване на концентрацията на CAPE (от 0.5 до 64 $\mu\text{g/ml}$) и времето на инкубиране (24 и 48 h).



Фигура 14. Преживяемост на L929 миши фибробластни клетки третирани за 24 (горе) и 48 (долу) h с ненаатоварени и натоварени с CAPE агрегати на C₁₂-PAGE-PG съполимери.

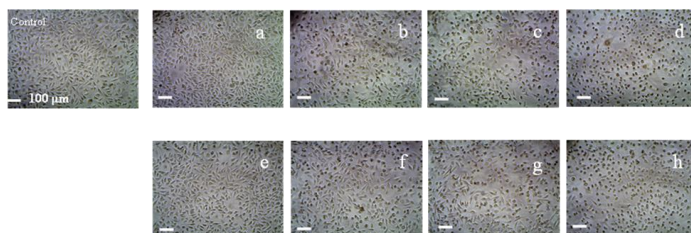
*Данните са представени като процент спрямо контролна група.

Изследването бе допълнено и разширено с резултати от оптична микроскопия (Фигури 15 и 16). Фотографските снимки показват, че интегритетът на монослой от адхезирални L929 клетки, третирани с ненаатоварени агрегати, е плътен и непокътнат и в голямо мнозинство клетките запазват типичната за фибробласти морфология (Фигура 15).



Фигура 15. Фотомикрографии на L929 клетки, третирани за 24 h с натоварени C_{12} -PAGE-PG60 (a–d) и C_{12} -PAGE-PG25 (e–h) агрегати с концентрации (a) и (e) 3.45 $\mu\text{g/ml}$; (b) и (f) 27.5 $\mu\text{g/ml}$; (c) и (g) 165.0 $\mu\text{g/ml}$; (d) и (h) 440.0 $\mu\text{g/ml}$. Мерителна отсечка = 100 μm .

Натоварените с CAPE агрегати обаче предизвикват драматично намаляване на броя на преживяеми клетки, поява на неадхезирани и окръглени клетки, което е типично при апоптоза, и нарушаване на интегритета на монослоя, видно от появата на незаети от клетки пространства, поради загуба на адхезивните им свойства (Фигура 16). Тези признаци са слабо забележими при микрографиите на клетките, третирани с 4.0 $\mu\text{g/ml}$ CAPE, натоварен в агрегатите на двата съполимера (Фигура 16 b и f). Нарушаването на интегритета на монослоя е силно изразено при третиране с 24.0 $\mu\text{g/ml}$ CAPE (Фигура 16 c и g), а след третиране с 64.0 $\mu\text{g/ml}$ CAPE почти всички клетки са отделени и неадхезирани, а монослоят е напълно дезинтегриран (Фигура 16 d и h). Резултатите от това изследване показват, че цитотоксичната активност на CAPE се запазва при натоварването му в агрегатите на C_{12} -PAGE-PG съполимерите.



Фигура 16. Фотомикрографии на L929 клетки, третирани за 24 h с натоварени с CAPE C_{12} -PAGE-PG60 (a–d) и C_{12} -PAGE-PG25 (e–h) агрегати със концентрации на CAPE: (a) и (e) 0.5 $\mu\text{g/ml}$; (b) и (f) 4.0 $\mu\text{g/ml}$; (c) и (g) 24.0 $\mu\text{g/ml}$; (d) и (h) 64.0 $\mu\text{g/ml}$. Мерителна отсечка = 100 μm .

5. Получаване и охарактеризиране на аминок-функционализирани блокови съполиетери

Алиловата функционалност на поли(алилглицидилетер)ните блокове на съполимерите C₁₂-PAGE-PG бе използвана за ортогонална модификация за въвеждане на странични първични аминок-хидрохлоридни групи. Синтетичната процедура за функционализиране на блока PAGE е представена в Схема 2.

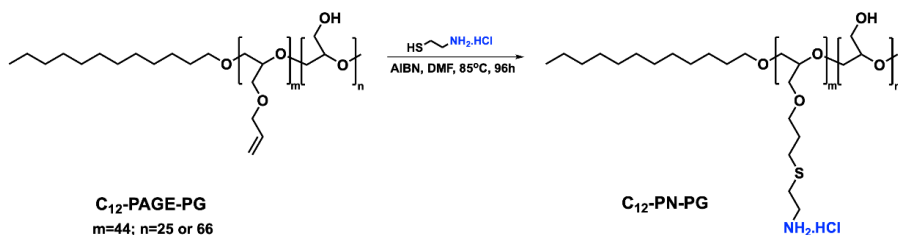
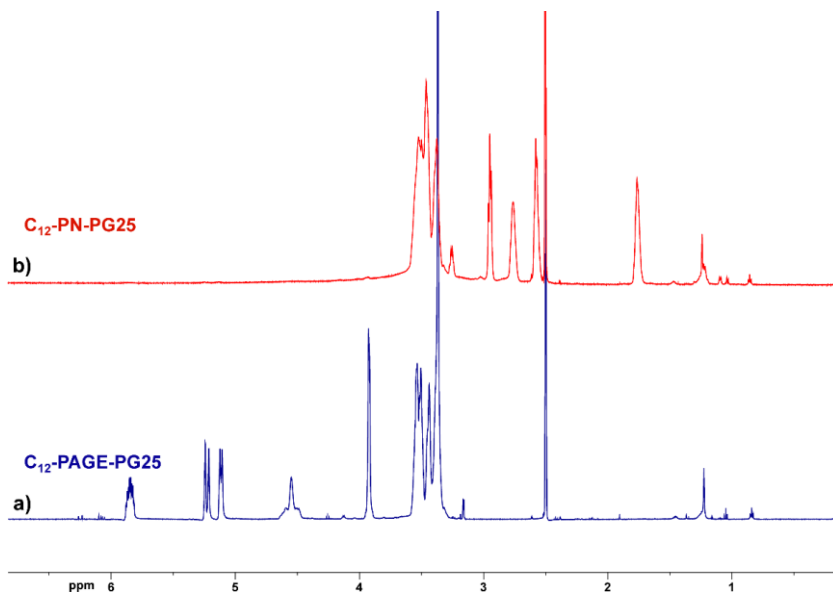


Схема 2. Реакционна схема за получаване на съполимери със странични първични аминок-хидрохлоридни групи.

Реакцията на радикалово добавяне на 2-аминоетантиол хидрохлорид (АЕТ.НСl) към алиловите двойни връзки бе проведена в DMF в присъствието на AIBN. За пълно извършване на реакцията на модификация е използван 5-кратен моларен излишък на аминок-функционалния тиол хидрохлорид при температура 85°C за 96 h. Количественото превръщане на страничните алилови групи от PAGE блока е потвърдено чрез ¹H ЯМР (Фигура 17). Сигналите при 5.84, 5.24 и 5.12 ppm, характерни за трите протона на алиловата двойна връзка, както и тези при 3.93 ppm, съответстващи на метиленовите протони до двойната връзка, напълно изчезват от ¹H ЯМР спектъра в DMSO-d₆ на пречистения продукт (Фигура 17b). Освен това се появяват нови резонанси при 1.76, 2.58, 2.76 и 2.95 ppm, съотносими към метиленовите протони на страничните аминок-групи. Интересно е, че резонансът за протоните на хидроксилните групи от полиглицидоловия блок на изходния съполимер, който е ясно видим при 4.55 ppm (Фигура 17a), също напълно изчезва в спектъра на аминок-модифицирания съполимер. Хидроксилните групи не би трябвало да реагират по време на етапа на модификация, а освен това в ¹H ЯМР спектрите на крайните продукти не се появяват допълнителни сигнали, показващи участието им в други странични реакции. Всъщност, образуваните аминок-функционализирани съполимери са изключително хигроскопични, поради наличието на странични аминок-хидрохлоридни групи на всяко звено от модифицираните PAGE блокове. Това води до поглъщане на влага и, респективно, повишено

съдържание на вода в пробите, подготвени за ^1H ЯМР анализи. Така, в резултат на бързия обмен между водата в пробите и протоните на хидроксилните групи от полиглицидоловия блок, последните остават „невидими“ в ^1H ЯМР спектрите. Подобни наблюдения са докладвани в ^1H ЯМР изследвания на системи от поли(винилов алкохол)/DMSO-d₆/H₂O [18].



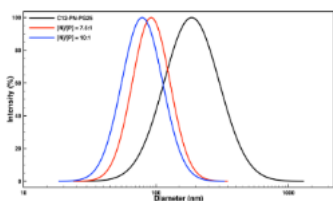
Фигура 17. ^1H ЯМР спектри в DMSO-d₆ на (a) изходния C₁₂-PAGE-PG25 и (b) amino-функционализиран блок съполиестер C₁₂-PN-PG25.

За съответстващите на C₁₂-PAGE-PG25 и C₁₂-PAGE-PG60 amino-функционализиран блокови съполиестери са приети означенията C₁₂-PN-PG25 и C₁₂-PN-PG60, които са използвани по-нататък в дисертационната работа.

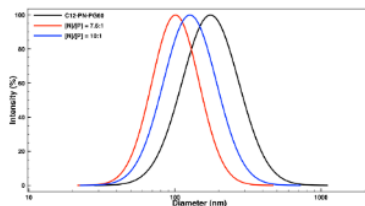
6. Изследване на поведението във вода на amino-функционализираните блокови съполиестери и на комплексобразуването им с DNA

Въвеждането на аминна функционалност в съполимерите C₁₂-PAGE-PG създава реакционни места в полимерната верига за електростатични взаимодействия с нуклеинови киселини. Тези взаимодействия представляват движещата сила на комплексобразуването между модифицираните C₁₂-PN-

PG съполимери и DNA. В резултат на това, обемистата структура на DNA се редуцира до размери, подходящи за интернализиране в клетките, неутрализират се нейните отрицателни товари и се увеличава нуклеазната ѝ стабилност. След модификацията умерено хидрофобният PAGE блок на изходните съполимери се превръща в силно хидрофилен. Въпреки въвеждането на голям брой силно хидрофилни аминокислотни странични групи, амфифилността на C_{12} -PN-PG съполимерите не се губи. Установено бе, че във воден разтвор те образуват сравнително големи (175–185 nm) агрегати (Фигура 18, Таблица 6). Последните са сравними и, типично, по-големи от частиците, образувани от изходните C_{12} -PAGE-PG съполимери, но са със значително по-широко разпределение по размери (Таблица 6). Освен това, чрез TEM не бяха наблюдавани добре дефинирани, индивидуални обекти с високи контраст и електронна плътност. Тези експериментални находки показват образуване на очевидно непътни мултиверижни агрегати, чийто интегритет се дължи на различни видове взаимодействия на привличане. От една страна, хидрофобни взаимодействия между додециловите остатъци, макар и отслабени от въвеждането на множество хидрофилни аминокислотни странични групи, и от друга, образуване на водородни връзки чрез хидроксилните групи от PG блокове. Идентичните стойности на ζ потенциалите на агрегатите на двата съполимера (Таблица 6) показват, че поликатионни сегменти се смесват с полиглицидоловите вериги, като по този начин се губи ефектът на по-високото съдържание на PG (респ., по-дългите PG вериги) на C_{12} -PN-PG60. Предполагамата структура на агрегатите на C_{12} -PN-PG съполимерите е изобразена на Схема 3.



(a)



(b)

Фигура 18. Криви на разпределение по размери на водни дисперсии на блокови съполимери C_{12} -PN-PG25 (a) и C_{12} -PN-PG60 (b) и техните полиплекси с DNA при съотношение $[N]/[P] = 7.5:1$ и $[N]/[P] = 10:1$.

Таблица 6. Стойности на хидродинамичния диаметър, индекса на полидисперсност и ζ потенциала на агрегати на аминокфункционализирани блокови съполимери C_{12} -PN-PG.

| Съполимер | d_h (nm) | PdI | ζ (mV) |
|-------------------|------------|-------|--------------|
| C_{12} -PN-PG25 | 184.2 | 0.293 | 41.1 |
| C_{12} -PN-PG60 | 173.9 | 0.232 | 40.7 |

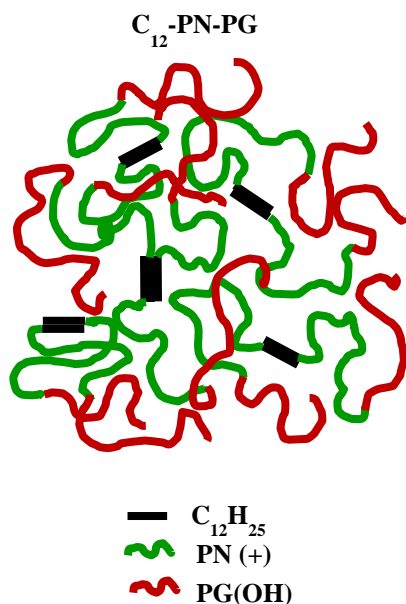


Схема 3. Схематично изображение на предполагаемата структура на агрегатите на C_{12} -PN-PG блокови съполимери.

Силно положителният ζ потенциал на агрегатите (Таблица 6) се счита за предимство при процеса на комплексообразуване с противоположно натоварените нуклеинови киселини. Комплексообразуването се извършва чрез бавно прибавяне на воден разтвор на DNA (100 $\mu\text{g/ml}$) към равен обем дисперсии на двата C_{12} -PN-PG блокови съполимера с различни

концентрации за постигане на желаното молно съотношение между аминокрупите на C₁₂-PN-PG съполимери и фосфатните групи на DNA, [N]/[P]. Образуването на полиплекси, както и промените в размера и ζ потенциала на полиплексните частици са проследени чрез динамично и електрофоретично разсейване на светлината (Фигура 18, Таблица 7). За определяне на статичните параметри – интензитет на разсеяна светлина (I₉₀) и инерционен радиус (R_g) е използвано статично разсейване на светлината (Фигури 19 и 20, Таблица 8).

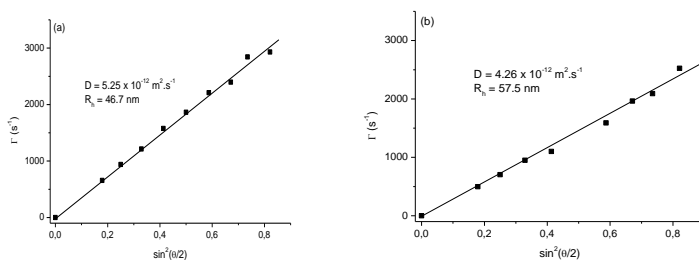
Таблица 7. Стойности на хидродинамичния диаметър, индекса на полидисперсност и ζ на полиплексни частици от C₁₂-PN-PG съполимери и DNA при различни [N]/[P] съотношения.

| [N]/[P] | d _h (nm) | PdI | ζ потенциал (mV) |
|---|---------------------|-------|------------------------|
| Полиплекси на C₁₂-PN-PG25 и DNA | | | |
| 1:1 | 127.6 | 0.108 | -25.7 |
| 2.5:1 | 112.8 | 0.153 | 37.4 |
| 5:1 | 95.4 | 0.073 | 35.3 |
| 7.5:1 | 92.0 | 0.113 | 34.2 |
| 10:1 | 78.7 | 0.135 | 35.7 |
| Полиплекси на C₁₂-PN-PG60 и DNA | | | |
| 1:1 | 181.1 | 0.090 | -27.9 |
| 2.5:1 | 131.2 | 0.090 | 36.8 |
| 5:1 | 119.5 | 0.187 | 40.7 |
| 7.5:1 | 100.8 | 0.148 | 38.9 |
| 10:1 | 126.6 | 0.191 | 41.8 |

* Стойностите на хидродинамичния диаметър са определени при ъгъл на наблюдение 90°

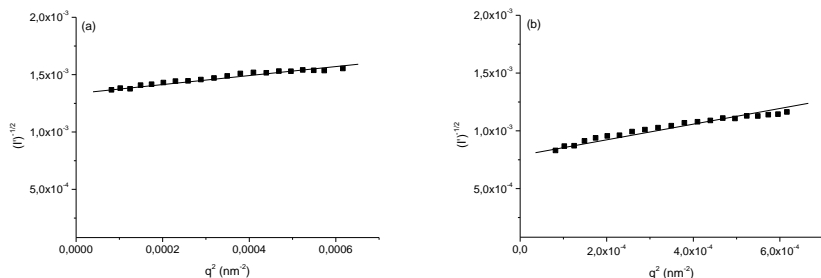
За C₁₂-PN-PG25 още при [N]/[P] = 1:1 се наблюдава значително намаляване както на размера на частиците, така и на разпределението по размери в сравнение с изходните агрегати на съполимера (Таблицы 6 и 7).

Това предполага образуване на по-добре дефинирани и по-компактни и плътни частици. При по-нататъшното увеличаване на $[N]/[P]$ се наблюдава допълнително намаляване на размера на частиците, които достигат среден хидродинамичен диаметър от около 80 nm при най-високото изследвано съотношение $[N]/[P] = 10:1$ (Фигура 18а, Таблица 7). Други индикации за образуване на по-компактни и плътни частици при комплексобразуването са промените в интензитета на разсеяната светлина (I_{90}) и на отношението R_g/R_h в сравнение с тези на изходните съполимерни агрегати (Фигури 21а и 22а). Наистина, при приблизително еднакви общи концентрации, интензитетът на разсеяната светлина на полиплексите е с около един порядък по-висок (Фигура 21а). Този резултат означава увеличаване на молната маса, което пък е придружено с намаляване на размера на частиците, както е отбелязано по-горе. Така, едновременното увеличаване на I_{90} (следователно, на молната маса) и намаляване на размера показва увеличаване на плътността на материала в частицата. Освен това е установено, че след комплексобразуване инерционният радиус R_g намалява по-бързо и по-силно от хидродинамичния радиус R_h (Таблица 8), което генерира вариации в стойностите на отношението R_g/R_h (Фигура 22а). Тук R_g се определя от парциалните диаграми на Бери, докато R_h се изчислява от зависимостта на скоростта на релаксация като функция на $\sin^2(\theta/2)$. Представителните графики са показани на Фигури 19 и 20, а резултатите са обобщени в Таблица 8. Както се вижда от Фигура 22а, R_g/R_h на изследваните системи се понижава от около 1.2 за изходните съполимерни агрегати до стойности за комплексите в диапазона 0.91–1.04, които са типични за по-компактни структури [19, 20].



Фигура 19. Скорост на релаксация (Γ) като функция от $\sin^2(\theta/2)$ за водни дисперсии на полиплексни частици, приготвени от (а) C_{12} -PN-PG25 и DNA при $[N]/[P] = 5.0:1$ и (б) C_{12} -PN-PG60 и DNA при $[N]/[P] = 7.5:1$.

* Ъгловите зависимости са използвани за определяне на дифузионните коефициенти и хидродинамичните радиуси.



Фигура 20. Парциални диаграми на Бери за определяне на R_g на полиплексни частици, получени от (a) C_{12} -PN-PG25 и DNA при $[N]/[P] = 10.0:1$ и (b) C_{12} -PN-PG60 и DNA при $[N]/[P] = 5.0:1$.

Измененията на ζ потенциала показват много рязък преход от силно отрицателни към силно положителни стойности в тесен интервал от $[N]/[P]$ съотношения без значителни промени при по-нататъшно увеличаване на $[N]/[P]$ (Таблица 7). Силно положителният ζ потенциал при $[N]/[P] \geq 2.5$, сравним с този на изходните съполимерни агрегати (Таблицы 6 и 7), не предполага образуване на строго сегрегирани частици. Последните се състоят от водонеразтворимо ядро, изградено от противоположно натоварените сегменти от PN и DNA, и обвивка от PG вериги. Най-вероятно, поликатионни сегменти, които не участват в комплексообразуването с DNA, са смесени с PG вериги в периферните области на частиците, с което допринасят за високите положителни стойности на ζ потенциала. Подобна структура на полиплексните частици задоволително би обяснила получените експериментални резултати.

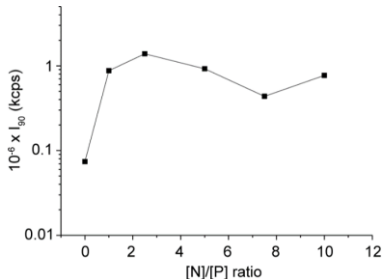
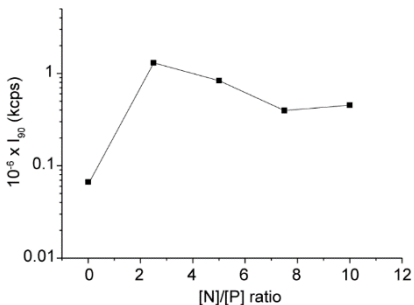
Поведението на съполимера с по-високо съдържание на PG, C_{12} -PN-PG60, в много отношения е подобно на това на C_{12} -PN-PG25. Това означава, че образуването на полиплекси с DNA протича по аналогичен и много сходен начин. Някои от наблюдаваните близки и подобни ефекти са: рязък преход от силно отрицателни към силно положителни стойности на ζ потенциала (Таблица 7); сравними стойности на ζ потенциала на полиплексите при по-високите съотношения $[N]/[P]$ с тези на изходните агрегати C_{12} -PN-PG60 (Таблицы 6 и 7); едновременно увеличаване на интензитета на разсеяната светлина почти с порядък (Фигура 21b), намаляване на размера (Таблицы 7 и 8) и на стойността на отношението R_g/R_h (Фигура 22b). Някои от ефектите, по-специално, промените в размера на полиплексните частици (Фигура 18b и Таблицы 7 и 8) и разпределението на частиците по размер (Таблица 7) са по-слабо изразени за разлика от други, например, намаляването на R_g/R_h (Фигура

22b). Това може да се дължи на по-дългите PG вериги, което вероятно компенсира свиването на частиците при комплексообразуване с DNA.

Таблица 8. Стойности на дифузионните коефициенти (D), хидродинамичните радиуси (R_h) и инерционните радиуси (R_g) на изходните C_{12} -PN-PG агрегати и на полиплексни частици от C_{12} -PN-PG съполимери и DNA при различни $[N]/[P]$ съотношения.

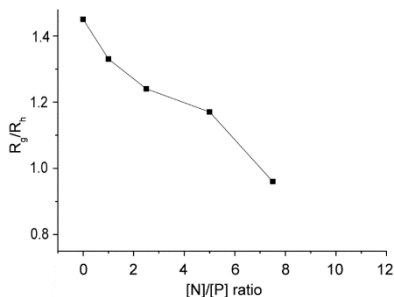
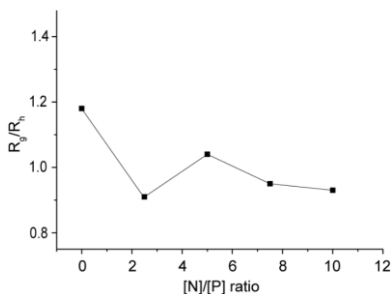
| $[N]/[P]$ | $10^{12} \times D$ ($m^2 s^{-1}$) | R_h (nm) | R_g (nm) |
|--|-------------------------------------|------------|------------|
| Полиплекси на C_{12}-PN-PG25 и DNA | | | |
| <i>изходни C_{12}-PN-PG25 агрегати</i> | 3.38 | 72.5 | 85.4 |
| 1.0:1 | – | – | – |
| 2.5:1 | 3.82 | 64.2 | 58.7 |
| 5.0:1 | 5.25 | 46.7 | 48.8 |
| 7.5:1 | 5.04 | 48.6 | 46.0 |
| 10:1 | 5.76 | 42.6 | 39.7 |
| Полиплекси на C_{12}-PN-PG60 и DNA | | | |
| <i>изходни C_{12}-PN-PG60 агрегати</i> | 3.28 | 74.7 | 108.0 |
| 1.0:1 | 3.04 | 80.6 | 107.5 |
| 2.5:1 | 4.38 | 56.0 | 69.2 |
| 5.0:1 | 4.44 | 55.2 | 64.6 |
| 7.5:1 | 4.26 | 57.5 | 55.4 |
| 10:1 | – | – | – |

* Стойностите на дифузионните коефициенти и хидродинамичните радиуси са определени от ъгловите зависимости на скоростите на релаксация, а тези на R_g от парциалните диаграми на Бери.



(a)

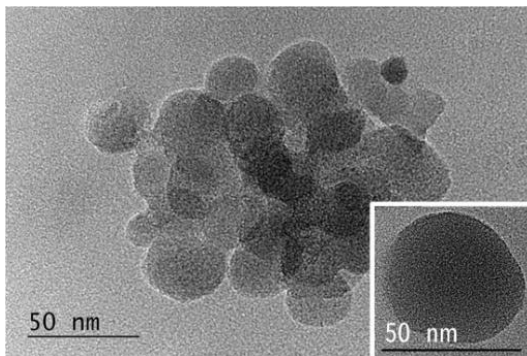
Фигура 21. Зависимост на интензитета на разсеяната светлина, измерен при ъгъл 90° (I_{90}), от съотношението $[N]/[P]$ на дисперсиите на полиплекси от C_{12} -PN-PG25 (a) и C_{12} -PN-PG60 (b).



(b)

Фигура 22. Зависимост на величината R_g/R_h на полиплексни частици на C_{12} -PN-PG25 (a) и C_{12} -PN-PG60 (b) и DNA от съотношението $[N]/[P]$.

Полиплексните частици са визуализирани чрез ТЕМ. Изображенията показват клъстери от агрегирани сферични наночастици с размери, които са малко по-малки от тези, определени от DLS (Фигура 23). По-малките размери най-вероятно се дължат на свиване на частиците в резултат на дехидратирането им при препариране на пробите за ТЕМ. Сферичната морфология на полиплексните частици обаче е ясно видима от изображението на отделна частица (Фигура 23).



Фигура 23. ТЕМ изображения на C_{12} -PN-PG25 полиплекс с DNA при $[N]/[P] = 10:1$.

Получените данни и резултати в тази секция показват, че електростатичните взаимодействия между противоположно натоварените групи на DNA и C_{12} -PN-PG съполимери са достатъчно силни, за да разрушат изходните неплътни полимерни агрегати и да ги превърнат в по-компактни, по-плътни и по-добре дефинирани полиплексни частици.

7. Оценка на цитотоксичността на съполимерите и на полиплексите

Цитотоксичните профили на amino-функционализираните блокови съполимери C_{12} -PN-PG25 и C_{12} -PN-PG60 и съответните полиплекси при различни съотношения $[N]/[P]$ са определени с цел оценка на потенциалните нежелани ефекти. Този тест е много важен, тъй като полимерите, използвани като невирусни вектори за генна терапия, типично се характеризират с висока токсичност, което е един от основните им недостатъци. Цитотоксичността на невирусните вектори зависи от редица физико-химични параметри като размер на частиците, морфология и ζ потенциал, които също могат да повлияят на процеса на доставяне на гени [21].

Експериментите са проведени с три човешки клетъчни линии A549 (белодробен аденокарцином), MCF-7 (рак на гърдата) и HeLa (рак на шийката на матката), които са третирани с дисперсии на двата съполимера с различни концентрации, както и със съответните им полиплекси с DNA за 72 h. Преживяемостта на клетките е оценена чрез МТТ тест. Определените стойности на IC_{50} (концентрацията, при която преживяемост на клетките намалява на половина) за C_{12} -PN-PG25, C_{12} -PN-PG60 и съответните полиплекси при различни $[N]/[P]$ са представени в Таблица 9. В допълнение на това и за по-прецизно охарактеризиране на цитотоксичността, клетъчната линия HeLa е анализирана чрез друг подход – тест на изключване на трипаново синьо. Съполимерите са тествани в широк интервал от

концентрации – от 12.5 до 200 $\mu\text{g/ml}$. Резултатите са представени на Фигура 24а. Както се вижда, те са близки до тези, получени чрез МТТ анализа.

При пряко сравнение на стойностите на IC_{50} на двата съполимера се забелязва малко по-висока цитотоксичност на $\text{C}_{12}\text{-PN-PG60}$ за две от клетъчните линии (Таблица 9). Това е донякъде изненадващ резултат, тъй като е очаквана по-ниска токсичност и по-висока биосъвместимост на този съполимер поради по-дългите му полиглицидолови вериги и по-високото съдържание на полиглицидол. Резултатите могат да бъдат обяснени с това, че въпреки разликата в състава (дължината на полиглицидоловите вериги/съдържанието на полиглицидол), двата съполимера образуват доста еднакви по структура и размери агрегати с много близки физико-химични параметри – относително големи, непълтни частици със силно положителен ζ потенциал и размери, различаващи се помежду си с по-малко от 6% (Таблица 6).

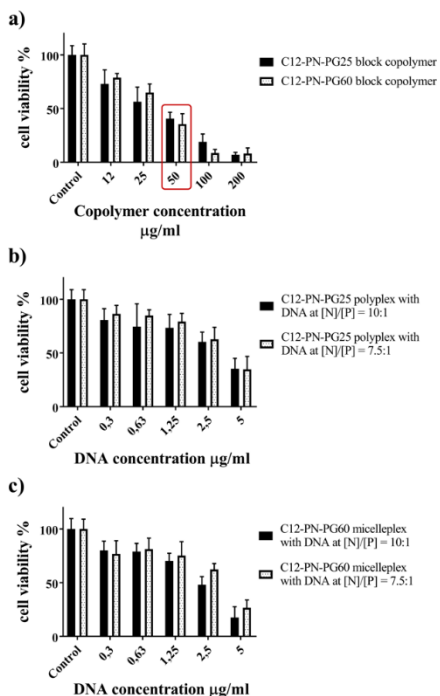
При полиплексите е наблюдавана тенденция на увеличаване на стойностите на IC_{50} с увеличаване на $[\text{N}]/[\text{P}]$ (Таблица 9). Тази тенденция може да бъде свързана с посоката, в която полиплексните частици променят размерите, структурата и физико-химичните си параметри. Както е показано по-горе в секция 6, при по-високи $[\text{N}]/[\text{P}]$ съотношения се образуват по-плътни, компактни и по-малки по размер структури, което очевидно е благоприятно за намаляване на цитотоксичността и подобряване на биосъвместимостта.

Като се имат предвид благоприятните цитотоксични характеристики на полиплексните частици при високи $[\text{N}]/[\text{P}]$ съотношения, чрез тест на изключване на трипаново синьо допълнително бяха оценени полиплекси, приготвени при съотношения $[\text{N}]/[\text{P}]$ 7.5:1 и 10:1 (Фигура 24б и с). За тези експерименти бе избран интервал от концентрации на DNA, сравним с тези, обичайно използвани в експериментите за трансфекция, а именно от 0.5 до 2.5 $\mu\text{g/ml}$ [22, 23].

Таблица 9. Стойности на IC₅₀ в µg/ml на C₁₂-PN-PG25 и C₁₂-PN-PG60 съполимери и съответните полиплекси при различни съотношения [N]/[P].

| [N]/[P] | A549 | MCF-7 | HeLa |
|--|-----------|-----------|----------|
| Съполимерни агрегати и полиплекси от C₁₂-PN-PG25 и DNA | | | |
| C ₁₂ -PN-PG25 агрегати | 32.2±5.1 | 29.8±3.5 | 27.7±2.8 |
| 1:1 | 20.7±1.8 | 26.2±3.1 | 31.5±3.6 |
| 2.5:1 | 24.7±2.2 | 28.8±2.6 | 24.6±5.1 |
| 5:1 | 37.2±3.4 | 47.2±3.3 | 53.7±4.7 |
| 7.5:1 | 46.5±2.8 | 39.8±4.1 | 52.8±3.4 |
| 10:1 | 49.8±3.1 | 48.2±2.5 | 43.7±2.9 |
| Съполимерни агрегати и полиплекси от C₁₂-PN-PG60 и DNA | | | |
| C ₁₂ -PN-PG60 агрегати | 22.0±4.4* | 24.6±4.2* | 28.7±3.2 |
| 1:1 | 35.5±2.7 | 19.8±4.6* | 32.6±3.5 |
| 2.5:1 | 40.3±1.9 | 25.6±2.8 | 39.5±4.8 |
| 5:1 | 44.2±2.6 | 49.5±3.5 | 56.6±3.7 |
| 7.5:1 | 50.1±3.3 | 46.7±3.7 | 48.7±4.2 |
| 10:1 | 48.8±4.1 | 42.2±3.9 | 43.8±2.9 |

* Данните представляват средни аритметични стойности ± SD от 3 независими експеримента, проведени в серии от по 8 отделни измервания. Статистическата значимост е определена чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) с пост-тест на Tukey. * стойности ≤0.05 се считат за статистически значими, тъй като не са установени значителни разлики между групите.



Фигура 24. Ефекти на концентрацията на блокови съполимери C₁₂-PN-PG25 и C₁₂-PN-PG60 (a) и на DNA в полиплекси на C₁₂-PN-PG25 (b) и C₁₂-PN-PG60 (c) при [N]/[P] съотношения 7.5:1 и 10:1 върху преживяемостта на HeLa клетки, изразена като процент спрямо контрола (нетретирани клетки).

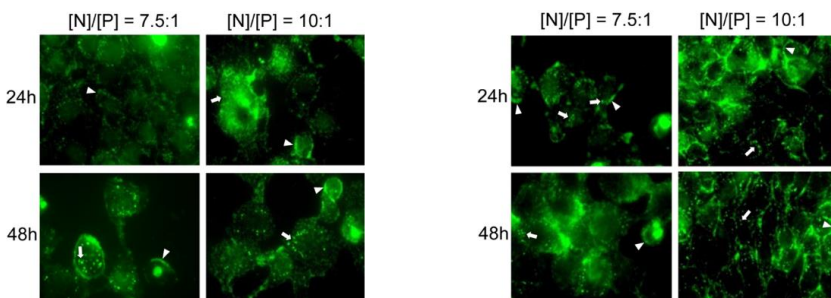
* Червеният правоъгълник в (a) показва концентрацията на съполимерите в най-високото съдържание на DNA (µg/ml), използвано в съответните полиплекси в (b) и (c). Всеки стълб представлява средна аритметична стойност ± SD на процента преживяеми клетки от 3 отделни експеримента.

Резултатите, представени на Фигура 24b и c, показват от ниска до умерена токсичност на полиплексите. Едва при концентрация на DNA от 5 µg/ml, която е по-висока от концентрациите, при които DNA обикновено се използва в експерименти за трансфекция, преживяемостта на клетките е по-ниска от IC₅₀ (Фигура 24b и c).

8. Клетъчна интернализация на полиплекси

Маркирана със SYBR Green DNA е използвана за получаване на полиплекси при изследване на клетъчната интернализация. SYBR Green е често използвано флуоресцентно багрило, което се интеркалира неспецифично в двойно-верижна DNA. При това неспецифично взаимодействие, яркостта на багрилото многократно (>1000 пъти) се увеличава. За да се избегне оцветяването на клетъчната DNA от SYBR Green, преди провеждането на експериментите маркираните DNA молекули са утаени в етанол и повторно разтворени, с което свободното, неинтеркалирано багрило е отстранено. Експериментите са проведени с полиплекси и на двата съполимера при $[N]/[P]$ съотношения 7.5:1 и 10:1, които, както е показано и обсъдено по-горе, се отличават с благоприятни физико-химични и токсикологични характеристики. Резултатите от микроскопските наблюдения, представени на Фигура 25, убедително показват, че и двата съполимера могат да въведат DNA в клетките. Интернализирани полиплексни частици, означени със стрелки на Фигура 25, се виждат на много места в голям брой микроскопски снимки. Видими също са структури, разположени около клетките и, вероятно, свързани с клетъчната мембрана, които са отбелязани с триъгълни стрелки на Фигура 25. Допуснато е и вторично стейнване на клетъчната DNA от освободено след интернализирането багрило.

Успешното интернализиране на полиплексните частици е желан и очакван ефект, за който благоприятстват редица фактори и физико-химични характеристики на полиплексните частици като силно положителният им ζ потенциал, както и техните относително малки размери и компактна структура (Таблицы 7 и 8, Фигура 21).



Фигура 25. Флуоресцентна микроскопия на HeLa клетки, инкубирани за 24 или 48 h с полиплекси C₁₂-PN-PG25 и DNA (a) и C₁₂-PN-PG60 и DNA (b) при $[N]/[P]$ съотношения 7.5:1 и 10:1.

Наблюдавано е повишено проникване на полиплексите и на двата съполимера 48 h след инкубирането. Това означава, че полиплексите са стабилни при физиологични условия в продължение на най-малко 48 h и че е необходимо по-дълго време за интернализация. При C_{12} -PN-PG25 няма видима разлика в степента на проникване на полиплексите при двете различни [N]/[P] съотношения (Фигура 30a, долен ред). Обратно, степента на проникване на полиплексите на C_{12} -PN-PG60 при съотношението [N]/[P] 7.5:1 е забележимо по-висока (Фигура 25b, долен ред, ляво изображение), отколкото тази при 10:1. Последното предполага, че над определена критична дължина и/или съдържание полиглицидолът може да има ефект на затрудняване и възпрепятстване на клетъчната интернализация.

ИЗВОДИ

1. Синтезирани са серия добре дефинирани диблокови съполиетери чрез анионна полимеризация последователно на алилглицидилов етер и етоксипетилглицидилов етер, използвайки частично депротониран додеканол като инициатор и в отсъствие на органичен разтворител.
2. Чрез ортогонални модификации на полиетерите поотделно са отстранени защитните етоксипетилови групи и са формирани блокове от линеен полиглицидол (C_{12} -PAGE-PG съполимери). Въведени са странични първични аминогрупи в блоковете PAGE (C_{12} -PN-PG съполимери).
3. Изследвано е поведението на съполимерите C_{12} -PAGE-PG във вода и е доказано образуването на добре обособени агрегати над определена критична концентрация. Чрез статично, динамично и електрофоретично светлоразсейване са определени редица характеризиращи параметри на агрегатите – Mw, Rg, A2, Rh, Rg/Rh, ζ потенциал.
4. Резултатите от проведените *in vitro* изследвания свидетелстват, че съполимерите C_{12} -PAGE-PG не проявяват признаци на токсичност като преживяемостта на клетките е над 80 %. Агрегатите показват висока ефективност на натоварване на CAPE при запазване на цитотоксичната му активност.
5. Благоприятните характеристики на системите на основата на агрегати на съполимерите C_{12} -PAGE-PG ги очертават като подходящи за включване и доставяне на хидрофобни биологично активни молекули.
6. При въвеждане на странични първични аминогрупи хидрофобните PAGE блокове се превръщат в подчертано хидрофилни PN блокове, но получените в резултат на модификацията C_{12} -PN-PG съполимери не губят амфифилните си свойства.
7. Агрегатите на съполимерите C_{12} -PN-PG взаимодействат електростатично с противоположно натоварени DNA молекули в широк интервал от [N]/[P] съотношения и образуват относително малки, компактни, плътни и добре дефинирани полиплексни частици. Полиплексните частици са стабилни при физиологични условия за поне 48 часа.
8. Получените резултати разкриват потенциала и предимствата на съполимери C_{12} -PN-PG като невирусни вектори за доставяне на DNA.

ПРИНОСИ

1. Разработени са полиетери с оригинален дизайн, структура и състав, които чрез последователни ортогонални модификации драстично променят свойствата си, и са изследвани като платформи за пренос и доставяне на свършено различни по природа биологично активни (макро)молекули.
2. Специфичната функционалност на C₁₂-PAGE-PG съполимерите и структурата на техните агрегати осигуряват висока степен на натоварване на фенетилов естер на кафеенета киселина без компрометиране на неговата биологична активност.
3. За първи път е демонстриран потенциалът на подходящо модифицирани съполиетери на основата на линеен полиглицидол като невирусни вектори за доставяне на DNA.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. Valchanova M., Rangelov S., Turmanova S., Ivanova E., Synthesis of diblock copolymers of poli(allyl glycidyl ether) and polyglycidol, Annual Assen Zlatarov University, Burgas, Bulgaria, 2017 v. XLVI (1) , pages 60-64.
2. Valchanova M., Rangelov S., Turmanova S., Ivanova E. „Aqueous solution properties of diblock copolymers of poly(allyl glycidyl ether) and polyglycidol „Proceedings of University of Ruse - 2017, volume 56, book 10.1, pages 31-35.
3. Miroslava Valchanova, Yordan Yordanov, Virginia Tzankova, Krassimira Yoncheva, Sevdalina Turmanova, Stanislav Rangelov Functional amphiphilic block copolyethers as carriers of caffeic acid phenethyl ester , Polymer International, 2019, Volume 68, pages 1881-1890.
4. Radostina Kalinova, Miroslava Valchanova, Ivaylo Dimitrov, Sevdalina Turmanova, Iva Ugrinova, Maria Petrova, Zlatina Vlahova, and Stanislav Rangelov, Functional Polyglycidol-Based Block Copolymers for DNA Complexation, Int J Mol Sci. 2021 Sep; 22(17), 9606.

УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Устни съобщения

1. Мирослава Вълчанова, Севдалина Турманова, Станислав Рангелов, Диблокови съполимери на поли(алилглицидилов етер) и полиглицидол – синтез и охарактеризиране, Научна сесия за студенти, докторанти и млади научни работници „Природни и технически науки” Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ - Бургас, февруари 2017 г.
2. Мирослава Вълчанова, Станислав Рангелов, Емилия Иванова, Севдалина Турманова, Самоасоцииране на диблокови съполимери на поли (алиглицидилов етер) и полиглицидол във водни разтвори, Научна сесия за студенти, докторанти и млади научни работници „Природни и технически науки” Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ - Бургас, март 2018 г.
3. Мирослава Вълчанова, Севдалина Турманова, Станислав Рангелов, Емилия Иванова, Функционални амфифилни блокови съполимери като носители на фенитилов естер на кафеената киселина, Научна сесия за студенти, докторанти и млади научни работници „Природни и технически науки” Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ - Бургас, април 2021 г.

Постерни съобщения

1. M. Valchanova, B. Stoyanova, S. Turmanova, S. Rangelov, Diblock copolymers of poly(allyl glycidyl ether) and polyglycidol bearing a hydrophobic residue. Synthesis and aqueous solution properties, Ninth National Conference on Chemistry, Science and Technology for Better Life, 18th National Symposium on Polymers, 29 September – 1 October 2016, Sofia, Bulgaria.
2. Мирослава Вълчанова, Станислав Рангелов, Севдалина Турманова, Хидрофобно модифицирани съполиестери с латентна химическа функционалност, 8ма Научна сесия" Младите учени в света на полимерите", София 01.06.2017г.
3. Мирослава Вълчанова, Станислав Рангелов, Емилия Иванова, Севдалина Турманова, Aqueous solution properties of diblock copolymers of poly(allyl glycidyl ether) and polyglycidol, Научна конференция с международно участие на Русенски Университет „Ангел Кънчев“, Разград, ноември 2017 г.
4. М. Вълчанова, С. Рангелов, С.Турманова, Наноразмерни полимерни структури, образувани от диблокови съполимери на основата на поли(алилглицидилов етер) и полиглицидол във вода, 9та Научна сесия" Младите учени в света на полимерите", София 07.06.2018г.
5. Valchanova M., Rangelov S., Turmanova S., Ivanova E., Nanosized polymer structures formed from diblock copolymers based on poly(allylglycidyl ether) and polyglycidol in water, 25th Congress of the Society Chemists and Technologists of Macedonia, 19-22.09.2018г.
6. Мирослава Вълчанова, Станислав Рангелов,Севдалина Турманова, Йордан Йорданов , Вирджиния Цанкова , Красимира Йончева, Емилия Иванова Функционални амфибилни блокови съполимери: свойства на водни разтвори и оценка на потенциала им като носители на фенетилов естер на кафеена киселина, 10та Научна сесия "Младите учени в света на полимерите", София 06.06.2019 г.
7. Miroslava Valchanova, Stanislav Rangelov , Sevdalina Turmanova, Yordan Yordanov, Virginia Tzankova, Krassimira Yoncheva, Emilia Ivanova Synthesis, characterization and potential biomedical applications of functional amphiphilic copolymers based on poly(allylglycidyl ether) 19-ти Национален симпозиум с международно участие Полимери 2019, Поморие 09-12.09.2019 г.

ЗАБЕЛЯЗНИ ЦИТАТИ НА ПУБЛИКАЦИИ ОТ ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Miroslava Valchanova, Yordan Yordanov, Virginia Tzankova, Krassimira Yoncheva, Sevdalina Turmanova, Stanislav Rangelov Functional amphiphilic block copolyethers as carriers of caffeic acid phenethyl ester , Polymer International, **2019**, Volume 68, pages 1881-1890. Impact factor:2.990
 - Baek J.; Kim M.;Park Y.;Kim B. Acetal-Based Functional Epoxide Monomers: Polymerizations and Applications, Journal Macromolecular Bioscience **2021**, (11) , 21, 2100251

НАГРАДИ:

1. Първо място за участие в Научна сесия за студенти, докторанти и млади научни работници „Природни и технически науки” Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ - Бургас, февруари 2017 г. Диблокови съполимери на поли(алилглицидилов етер) и полиглицидол – синтез и охарактеризиране

ПРОЕКТИ:

➤ Участник в научен проект:

1. НИХ - 405/2017-2018г.- „Диблокови съполимери на поли (алилглицидилов етер) и полиглицидол - синтез и охарактеризиране“
2. НИХ - 425/2019-2020г.- „Модифициране на функционални амфифилни блокови съполимери и изследването им като носители на биологично активни вещества“

ЛИТЕРАТУРА:

- [1] Burchard W. *Adv. Polym. Sci.* **1983**, 48, 1–124.
- [2] Burchard W. *Principles and Development*, **1996**, 439–476.
- [3] Rangelov S.; Almgren M.; Halacheva S.; Tsvetanov Ch. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111 (35), 13185–13191.
- [4] Halacheva S.; Rangelov S.; Garamus V. *Macromolecules* **2007**, 40 (22), 8015–8021.
- [5] Akyol S.; Ozturk G.; Ginis Z.; Armutcu F.; Yiqitoqlu R.; Akyol O. *Nutr Cancer* **2013**, 65, 515–526.
- [6] Murtaza G.; Karim S.; Akram R.; Khan A.; Azhar S.; Mumtaz A. *Biomed Res Int.* **2014**, 1–9.
- [7] Zhang P.; Tang Y.; Li G.; Zhu Y.; Duan A. *Molecules* **2014**, 19, 16458–16476.
- [8] Tolba F.; Omar A.; Azab S.; Khalifa E.; Abdel-Naim B.; Abdel-Rahman Z. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2016**, 56, 2183–2190.
- [9] Watanabe E.; Sforcin M. *Curr Pharmacogenomics Pers Med.* **2018**, 16, 88–93.
- [10] Grunberger D.; Banerjee R.; Eisinger K.; Oltz M.; Efros L.; Caldwell M. *Experientia* **1988**, 44, 230–232.
- [11] Chiao.; Carothers M.; Grunberger D.; Solomon G.; Preston A.; Barrett C.; *Cancer Res.* **1995**, 55, 3576–3583.
- [12] Chen F.; Lu S.; Chen T.; Chen C.; Lin Y.; Lee D, *J Mol Med.* **2012**, 90, 89–100.
- [13] Garrido J.; Cerqueira S.; Chavarria D.; Silva T.; Borges F.; JMPJ G. *Food Chem.* **2018**, 254, 260–265.
- [14] Tambuwala M.; Khan N.; Thompson P.; PA C. *Drug Deliv Transl Res.* **2019**, 9, 14–24.
- [15] Wadhwa R.; Nigam N.; Bhargava P.; Dhanjal K.; Goyal S.; Grover A. *J Cancer.* **2016**, 7, 1755–1771.

-
- [16] Jiang B.; Quan D.; Liao K.; Wang H. *Molecular Pharmaceutics* **2006**, 3, 152–160.
- [17] Kamenova K.; G Grancharov G.; Tzankov B.; Aluani D.; Tzankova V.; Tzankov S.; Yoncheva K.; Petrov P. *Polymer Journal* . **2021**, 53, 471–479.
- [18] Astafieva I.; Zhong F.; Eisenberg A. *Macromolecules* **1993**, 26 (26), 7339–7352.
- [19] Burchard W. *Light Scatt. Polym.* **2007**, 48, 1–124.
- [20] Thurn A.; Burchard W.; Niki R. *Colloid Polym. Sci.* **1987**, 265, 653–666.
- [21] Agirre M.; Zarate J.; Puras G.; Ojeda E.; Pedraz L. *Drug. Deliv.* **2015**, 22, 100–110.
- [22] Strober W. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, 111, A3.B.1–A3.B.3.
- [23] Kumar P.; Nagarajan A.; Uchil, .D. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2019** (3), 215–223.