

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

Золотова Алёна Сергеевна

**Биосовместимые носители для транспортировки радионуклидов меди и  
антиопухолевых агентов**

Специальность 1.4.13 Радиохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук Орлова Марина Алексеевна

Москва – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	Введение.....	6
2.	Обзор литературы.....	12
	2.1. Роль меди в организме.....	12
	2.2. Лекарственные препараты на основе меди.....	16
	2.3. Изотопы и радионуклиды меди. Перспективы комплексного применения радионуклидов в медицине.....	19
	2.4. Биосовместимые носители препаратов на основе гидроксиапатита.....	27
	2.5. Полимеры и их конъюгаты в качестве носителей препаратов.....	29
	2.6. Роль эффекторов NO-синтазы в канцерогенезе и в антиопухолековой терапии.....	34
3.	Экспериментальная часть.....	40
	3.1. Синтез, модификация и исследование свойств ГАП и ГАП–Cu.....	40
	3.1.1. Синтез разных модификаций ГАП.....	40
	3.1.2. Сорбция и десорбция ионов меди на ГАП.....	41
	3.1.3. Сорбция лигандов и комплексов на ГАП.....	44
	3.1.4. Изучение влияния БСА на процессы сорбции.....	47
	3.2. Синтез и исследование лигандов и их комплексов с $\text{Cu}^{2+}$ и $^{67}\text{Cu}^{2+}$ .....	48
	3.2.1. Синтез комплексов.....	48
	3.2.2. Выделение радионуклидов меди. Синтез меченых комплексов меди.....	49
	3.3. Методы исследования.....	51
	3.3.1. Потенциометрическое титрование.....	51
	3.3.2. Метод масс-спектрометрии LETDI (Laser Induced Electron Transfer Desorption/Ionization).....	52
	3.3.3. Флуориметрическое определение констант связывания.....	53
	3.3.4. Рентгеноструктурный анализ.....	53
	3.3.5. Радиационная устойчивость.....	54
	3.4. Методы исследования клеточного материала.....	55
	3.4.1. Проточная цитофлуориметрия.....	55
	3.4.2. МТТ-тест.....	56
	3.5. Получение и исследование двойных и тройных микрогелей на основе КМЦ.....	58
	3.5.1. Двойные микрогели.....	59

3.5.2.	Тройные микрогели.....	60
3.5.3.	Микрогели, меченные тритием.....	61
3.6.	Работа с животными <i>in vivo</i> .....	62
4.	Результаты и их обсуждение.....	65
4.1.	Сорбция ионов меди на наноГАП и ферментативном ГАП при адсорбционном и сокристаллизационном методе введения и сравнение с поведением в этих условиях ионов цинка.....	65
4.2.	Синтез комплексов меди и исследование их структур.....	76
4.2.1.	Лиганды и комплексы <i>N</i> -(5,6-дигидро-4 <i>H</i> -1,3-тиазин-2-ил)бензамида ( $L^1$ ) и 2-аминопиримидина (AP) с $Cu^{2+}$ и $^{67}Cu$ .....	76
4.2.2.	Сравнение цитотоксичности полученных комплексов меди <i>in vitro</i> на клеточных линиях.....	84
4.2.3.	Распределение комплексов меди, меченных $^{67}Cu$ , <i>in vivo</i> в органах на мышинной модели.....	87
4.3.	Карбоксиметилцеллюлоза и бинарные и тройные микрогели на её основе, содержащие ионы меди, $^{67}Cu$ , $L^1$ и $L^2$ .....	89
4.3.1.	Сравнение цитотоксичности полученных микрогелей <i>in vitro</i> на клеточных линиях.....	99
4.3.2.	Распределение полученных микрогелей, меченных $^{67}Cu$ и <i>in vivo</i> на мышинной модели.....	104
4.3.3.	Определение устойчивости микрогелей при радиационном воздействии.....	109
5.	Заключение.....	113
6.	Выводы.....	115
7.	Список литературы.....	116
8.	Приложения 1-4.....	130
9.	Публикации.....	145
10.	Благодарности.....	146

## Список сокращений

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГАП – гидроксиапатит

ДСР – динамическое светорассеяние

ЭФП – электрофоретическая подвижность

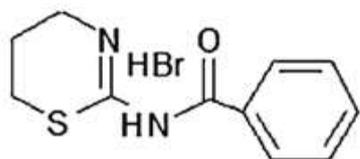
КМЦ - карбоксиметилцеллюлоза

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид

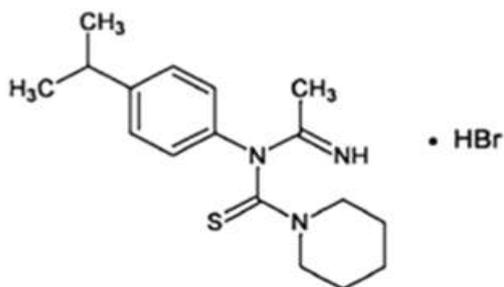
ПМГ – полимерные микрогели

(АР) – 2-аминопиримидин

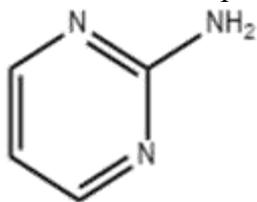
**L<sup>1</sup>** – *N*-(5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин-2-ил)бензамид



**L<sup>2</sup>** – *N*-(4-изопропил-фенил)-*N*-(1-имминоэтил)пиперидин-1-карботиоамид гидробромид



**АР** – 2-аминопиримидин



**L<sup>1</sup>** и **L<sup>2</sup>** предоставлены к. х. н. с. н. с. Т. П. Трофимовой

**ГАП<sub>0</sub>** – гидроксиапатит, полученный методом осаждения.

**ГАП<sub>Е</sub>** – гидроксиапатит, полученный ферментативным методом с использованием щелочной фосфатазы (ЩФ) – предоставлен к. х. н. А. В. Гопиным.

**Нумерация комплексов:**

$\text{Cu}(\text{AP})_2\text{Cl}_4$  – **1** желтый (предоставлен кхн Т. П. Трофимовой)

$\text{CuL}^1_2$  – **2** фиолетовый

$\text{Cu}_2\text{L}^1_2\text{Cl}_3$  – **3** зеленый

$\text{CuL}^1_2\text{Cl}_2$  – **4** ярко-зеленый

$\text{CuL}^1\text{Cl}_2$  - **5** ярко-зеленый

Комплексы **2-5** синтезированы автором по методикам, разработанным в лаборатории радиофармацевтической химии к. х. н. Трофимовой Т. П.

## 1. Введение

### Актуальность исследования

Лечение онкологических заболеваний является одной из приоритетных областей медицины. Для этого привлекаются самые разные отрасли науки с целью разработки противоопухолевых препаратов и новых методов лечения. В настоящее время существуют различные способы медицинского применения радиации, в том числе, создание и совершенствование радиофармпрепаратов: диагностических, терапевтических и наиболее перспективных – тераностических, а также развивается иммунная радиотерапия с использованием моноклональных антител в качестве векторов доставки [1]. Последнее десятилетие характеризуется увеличением интереса к этой области медицины. Недостатками этого метода являются необходимость получать короткоживущие радионуклиды непосредственно в месте их применения, т. к. доставка от места получения к пациенту, как и само приготовление препарата, должны занимать минимум времени; кроме того, существует большая вероятность разной степени повреждения организма облучением. Поэтому помимо разработки новых методов получения и использования короткоживущих радионуклидов с целью более свободного выбора препаратов, необходимы новые подходы к созданию методов доставки и введения в организм систем, в которых два воздействия (радиационное и химиотерапевтическое) можно совместить на одной платформе. Большое преимущество, безусловно, имеют генераторы, которые можно использовать в течение длительного времени, именно поэтому широкое применение имеет генераторный изотоп  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99}\text{Mo}$  ( $t_{1/2} = 66 \text{ ч}$ )  $\rightarrow$   $^{99m}\text{Tc}$ ) с  $t_{1/2} = 6 \text{ ч}$ , хотя на сегодня известно значительное количество генераторных радионуклидов.

В настоящее время получено большое количество циклотронных и реакторных радионуклидов, часть из которых применяется или рассматриваются как перспективные для применения в медицине. Однако структура радиофармпрепаратов достаточно традиционна: носитель (который может быть одновременно вектором, имеющим свою биологическую мишень или способность накапливаться в определенной части организма) и радионуклид, соединенный напрямую или через спейсер с хелатором. Для диагностических исследований эта схема работает достаточно хорошо. Однако для использования в терапевтических и тераностических целях её можно и нужно усиливать. SPECT (фотонно-эмиссионная компьютерная томография) и PET (позитронно-эмиссионная томография) являются диагностическими методами, и соответствующие радионуклиды регистрируются в конечном этапе по гамма-излучению. Для этих методов разработана аппаратура и подбираются подходящие радионуклиды ( $\gamma$ - и  $\beta^+$ -эмиттеры). Короткоживущие бета-эмиттеры с невысокой энергией излучения считаются возможными

терапевтическими радионуклидами (например,  $^{67}\text{Cu}$ ). В настоящее время для использования в терапии широко изучаются и начали применяться  $\alpha$ -излучатели (например,  $^{213}\text{Bi}$ ). Развивается аппаратура и синтезируются препараты для протонной и бор-нейтронной терапии. Однако проблемы таргетной доставки, растворимости препаратов и возможных потерь радионуклида в процессе доставки в органы и ткани по-прежнему чрезвычайно актуальны.

### **Степень разработанности темы исследования**

На момент, предшествующий выполнению данной работы, описано большое количество хелаторов для радионуклидов и разработаны способы доставки с помощью биологического сродства вектора к некоторым рецепторам и другим белкам раковых клеток (в частности, клеток крови). Особенно перспективным считается использование в качестве вектора моноклональных антител. Появились первые тераностики и попытки совмещения двух разных типов медицинских воздействий на раковую опухоль. Среди платформ, переносящих лекарственные препараты и радионуклиды, получили широкое распространение полимерные материалы [2,3]. Произошло развитие концепции Рингсдорфа [4] на новом уровне [5], что привело к увеличению возможных наноносителей и наномедицинских препаратов, в том числе, и в ядерной медицине. Получили распространение радионуклиды меди [6-9], описаны способы их получения. Наиболее перспективным является использование радионуклида совместно с химиопрепаратом при одновременной доставке одним и тем же носителем (и/или вектором), однако этот подход недостаточно изучен. В такой дизайн можно включать и лиганды, которые являются, наоборот (или одновременно) радиопротекторами для здоровых тканей, защищая их от воздействия радионуклида, при условии отсутствия с их стороны помехи антиопухолевому воздействию. Примером может служить один из самых известных радиопротекторов – гаммофос, который лучше себя проявляет в качестве антиопухолевого агента. При таком подходе плохая растворимость комплекса перестает являться препятствием для использования лекарства, если платформа-носитель обладает достаточной растворимостью. В последние годы сочетание ядерной и наномедицины произвело революцию в медицинских технологиях лечения рака, хотя применение ядерных технологий в наномедицине в настоящее время находится еще на ранней стадии развития. Однако ожидается, что они окажут существенное влияние на диагностику и лечение, и количество радиоактивных нанопродуктов (в том числе, принятых FDA) с каждым годом растет.

Таким образом, развитие радиомедицинских технологий движется в сторону сочетанного воздействия фармакологического и радиационного воздействия и создания комбинированных технологий.

### Цель и задачи работы

**Цель** данной работы: на основе наноплатформ разного состава разработать и испытать *in vitro* и *in vivo* двойные и мультифункциональные (тройные) композиции, содержащие медицинские радионуклиды меди и ингибитор/активатор NO-синтазы в качестве антиопухолевого препарата. Для этого рассматриваются следующие **задачи** исследования:

1. Получение среди эффекторов NO-синтаз соединений с наибольшей цитотоксичностью по отношению к лейкемическим линиям клеток, синтез на их основе комплексов (в том числе с радионуклидами меди) и их физико-химическое описание.
2. Изучение физико-химических параметров связывания эффекторов NO-синтаз и ионов металлов с полимерным (карбоксиметилцеллюлоза) и неорганическим (гидроксиапатит) носителями.
3. *In vitro* на клеточных моделях изучение цитотоксичности и величины терапевтического окна полученных стабильных препаратов.
4. Исследование *in vivo* накопления в целевых органах и выведения препаратов, содержащих  $^{67}\text{Cu}$  и  $^3\text{H}$ , из организма.

### Научная новизна

В работе **впервые**:

1. Показана возможность использования ГАП различного строения и размерности в качестве носителя ионов меди ( $^{67}\text{Cu}$ ) для медицинских целей с учетом кинетики сорбции, десорбции в разных средах и в присутствии альбумина (BSA) как транспортной молекулы крови.
2. Получены двойные (КМЦ–Cu) и тройные (КМЦ–Cu–эффектор NO-синтазы) микрогели на основе карбоксиметилцеллюлозы и показана *in vitro* их цитотоксичность и терапевтический индекс по отношению к линиям лейкемических клеток.
3. Получены двойные микрогели, меченные  $^{67}\text{Cu}$ , и показано их распределение/накопление в организме мышей *in vivo* и их радиационная стабильность.
4. Исследованы кристаллические структуры меди с ингибитором NO-синтазы ( $\text{L}^1$ ).
5. Методом двойного мечения ( $^{67}\text{Cu}$  и  $^3\text{H}$ ) показано, что бинарные микрогели размером до 200 нм способны выводиться из организма, в том числе через почки.

### **Практическая и теоретическая значимость работы**

Полученные данные являются основой для использования ГАП и КМЦ в качестве моно- и мультиплатформ-носителей радиофармацевтических препаратов. Впервые получены данные по получению и физико-химическим параметрам комплексов меди с эффекторами NO-синтазы, а также двойных и тройных микрогелей на основе КМЦ, что дает основу для получения РФП нового поколения.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. ГАП является перспективным носителем для радионуклидов меди благодаря его высокой адсорбционной способности по отношению к ионам меди, при этом наблюдается замещение ионов кальция из ГАП на ионы меди и не наблюдается процесса десорбции.
2. Медь в комплексах с  $L^1$  имеет валентность (II) или смешанную (II и I) в зависимости от способа получения, что соответствует различной кристаллической структуре. Эти комплексы, меченные  $^{67}\text{Cu}$  с носителем и без носителя, показали недостаточную устойчивость в биологической среде организма (мышей), что требует использования наноплатформы-носителя.
3. Механизм образования двух- и трехкомпонентных медьсодержащих микрогелей на основе КМЦ включает образование электростатических контактов ионов меди и электростатического связывания пиримидинового/тиазинового фрагмента лиганда с карбоксильными группами полимера.
4. Цитотоксичность трехкомпонентных микрогелей (наноносителей для  $^{67}\text{Cu}$ ) на основе КМЦ сильно зависит от содержания меди и строения лигандов в их составе и может достигаться значительная величина терапевтического окна (ТИ) между здоровыми и лейкоцитарными клетками под их воздействием. Такие носители перспективны для одновременной доставки радионуклидов  $^{67}\text{Cu}$  и эффекторов NO-синтазы (лигандов).
5. Микрогели КМЦ– $\text{Cu}^{2+}$  показали высокую радиационную стабильность, практически без потери ионов меди. Кроме того, микрогели способны выводиться из организма (мышей), в том числе через почки, что показано методом двойного мечения ( $^{67}\text{Cu}$ –КМЦ и  $^3\text{H}$ –КМЦ).

#### **Методология и методы исследования**

В работе использовались современные инструментальные методы анализа: потенциометрическое титрование, спектрофотометрия, гамма- и жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия, цифровая автордиография, тонкослойная хроматография, УФ, флуориметрия, РСА, ИК, электронная микроскопия, методы работы с клеточным материалом и животными (мышьями). Эксперименты *in vivo* были одобрены

Комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, заседание № 126-д, 28.01.2021, протокол № 124-а.

### **Соответствие паспорту научной специальности**

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.13 Радиохимия по области исследований: методы выделения, разделения и очистки радиоактивных элементов и изотопов; получение и идентификация меченых соединений; методы радиохимического анализа; автордиография; химические аспекты использования радионуклидов в биологии и медицине.

### **Степень достоверности**

Достоверность определяется использованием современных расчетных и инструментальных методов исследования, сходимостью результатов измерений и воспроизводимостью полученных результатов.

### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в критическом обзоре литературных данных, в получении всех экспериментально полученных данных (потенциметрическое и флуоресцентное титрование, спектрофотометрия, ТСХ, автордиография, гамма- и жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия, проточная цитометрия, МТТ-тесты, кинетические исследования с ГАП, получение микрогелей, работа с радиоактивными препаратами проделаны лично, остальные данные получены в соавторстве, указанном в работе), а также в обсуждении результатов и написании статей. Личный вклад автора в совместные публикации основополагающий.

### **Апробация результатов**

Основные результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: 5-ая Российской конференции «МедХим-Россия 2021», г. Волгоград, 2022, (doi: 10.19163/MedChemRussia2021-2021-119); Российская конференция «Хроническое радиационное воздействие: отдаленные медико-биологические эффекты», 6-7 декабря 2022 г., г. Челябинск, Россия; 13-я Международная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (Биокатализ - 2023), г. Суздаль, Россия, 25-29 июня, 2023; I Всероссийская научно-практическая конференция «Достижения и перспективы экспериментальной фармакологии в онкологии и радиационной медицине, г. Обнинск: МРНЦ им. А.Ф. Цыба Минздрава России, 1 марта 2024 г.

## **Публикации**

Основные результаты, положения и выводы диссертации опубликованы в 7 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в МГУ имени М. В. Ломоносова по специальности и отрасли наук.

## **Структура и объем работы**

Диссертационная работа изложена на 147 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Список цитируемой литературы содержит 224 наименования. Работа содержит 30 таблиц, 78 рисунков и 4 приложения.

## 2. Обзор литературы

### 2.1. Роль меди в организме

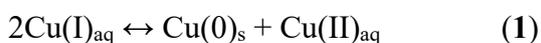
Металлсодержащие фармацевтические агенты считаются перспективными препаратами для лечения онкологических заболеваний, т. к. они способны усиливать антиопухолевые эффекты и способствуют биодоступности лекарства, изменяя фармакокинетические и фармакодинамические свойства образованного комплекса по отношению к биологическим мишеням (рецепторам), благодаря наличию иона металла. Активному использованию ионов переходных металлов и, в частности, меди, положило начало появление сильного и широко сегодня применяемого антиопухолевого препарата цисплатина [2], который, однако, имеет сильные побочные эффекты, избежать которые пытаются заменой платины ионами других металлов.

Среди неплатиновых металлов наиболее широко используются соединения меди [3]. Медь является в организме одним из ключевых микроэлементов, включенным в качестве кофактора в важнейшие ферменты метаболических процессов. При этом медь проявляет избирательную цитотоксичность по отношению к злокачественным клеткам. Считается [4], что эта селективность частично связана с гипоксической средой раковых клеток, которая способствует восстановлению  $\text{Cu(II)}$  до  $\text{Cu(I)}$ , что приводит к проапоптотической активизации активных форм кислорода (АФК). Кроме того, медь имеет независимую систему входа в клетку, что дает возможность биологически активным соединениям, содержащим ионы меди, проникать через клеточную поверхность без связывания с другими проводящими агентами. Это является отличительной чертой медных соединений в сравнении с координационными соединениями других металлов [5]. В сыворотке человека медь образует комплекс с гистидином, который считается основным медно-аминокислотным комплексом сыворотки. Помимо этого, с медь-гистидином может образовываться тройной комплекс человеческий альбумин (HSA) [6,7], который легко переносит ионы меди и его комплексы к органам. Считается, что альбумин, как главный транспортер в кровеносной системе организма, имеет персональный сайт связывания меди (ATCUN) [8], однако более пристальные исследования показали, что цинк может в ряде случаев использовать тот же сайт. Свободная медь индуцирует агрегацию белков в сыворотке крови, и к этому процессу особенно чувствительны гамма-глобулины. Было показано, что свободная медь в крови может способствовать образованию агрегатов циркулирующих белков с ядром IgG [9]

Основным переносчиком меди является церуллоплазмин ( $\alpha_2$ -глобулин), где медь может находиться в состоянии  $\text{Cu}^{\text{I}}$  и  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Такая медь считается необменной. В цитоплазме концентрация свободной меди низка, и ключевым органом её метаболизма можно считать

печень, где и происходит включение элемента в медьсодержащие ферменты и другие белки. В периферические ткани 90% меди транспортируется в комплексе с церулоплазмином, который окисляет ионы  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$  без образования гидроксил-радикала и обеспечивает равновесие между депонированием и использованием железа.

Аноксическая природа раковых клеток способствует восстановлению  $Cu^{II}$  в  $Cu^I$  [10-12]. Ионы меди в состоянии  $Cu^I$  катализируют образование гидроксильных радикалов [4], чем усиливают цитотоксичность медных соединений, связанную с оксидативным стрессом. Баланс между двумя этими валентными состояниями меди вместе с балансом диспропорционирования (1) [13,14] имеет столь важное значение в организме, что его сдвиг в ту или иную сторону приводит к ярко выраженным заболеваниям, связанным с нарушением регуляции передачи сигналов [15].



Помимо этого, комплексы меди(I) проявляют нуклеазную активность и селективность при введении в клетки, связанную со специфическими переносчиками ионов меди hCtr [8].

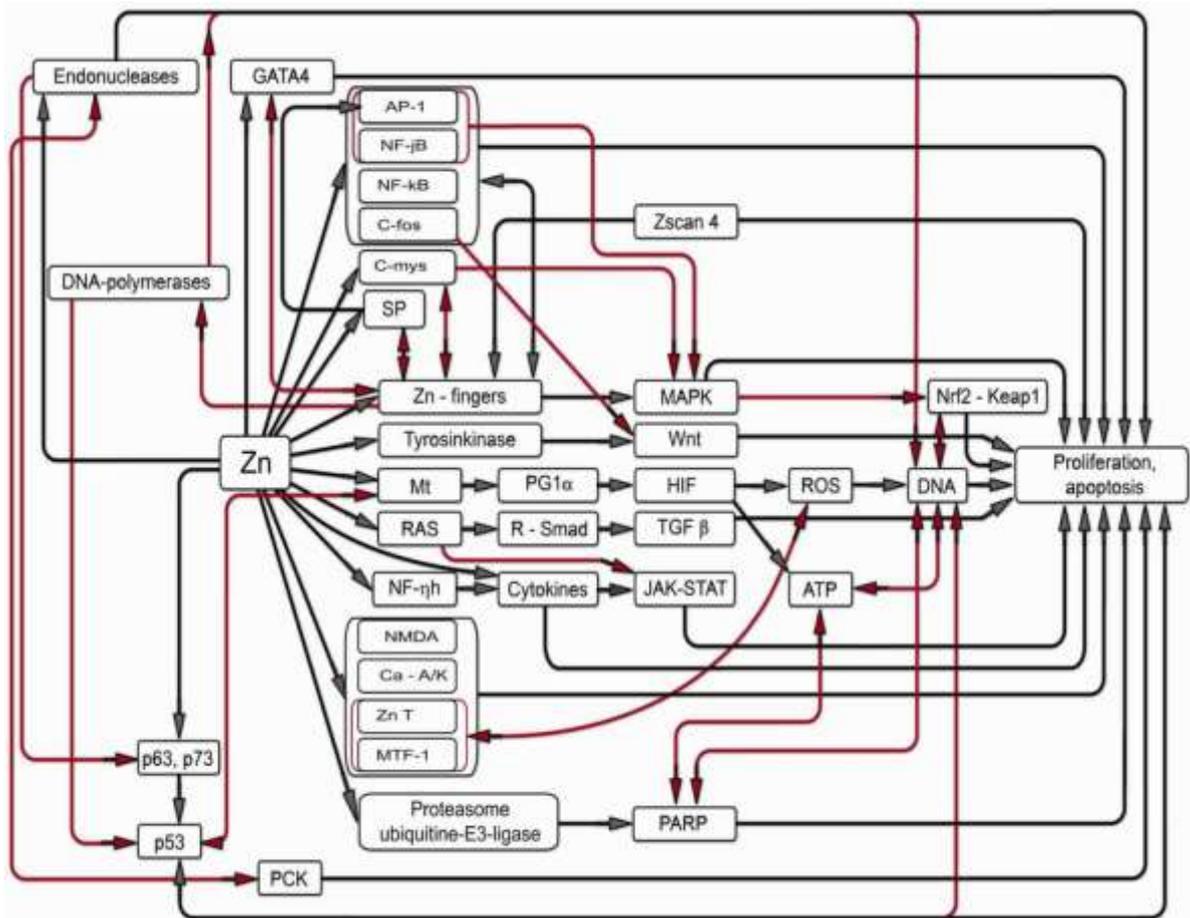
Медь входит в состав наиболее жизненно важных ферментов, среди которых следует выделить: цитохромоксидазу, Cu,Zn-супероксиддисмутазу (SOD1), тирозиназу, дофамин-β-гидроксилазу, лизиноксидазу и ЛХАТ (лецитин-холестерол-ацил-трансферазу). Они затрагивают критически важные метаболические процессы, в частности, окислительное фосфорилирование, катаболизм нуклеотидов и антиоксидантную систему организма. Известно более 25 медьсодержащих ферментов, многие из них участвуют в окислительном катализе, при этом различают несколько типов координации меди в ферментах, что соответствует функции последних. На основе таких координационных конструкций синтезируются медьсвязывающие миметики различного, в том числе, и медицинского, применения [16,17].

Транспортеры меди АТР7А (медь альфа) и АТР7В (медь бета) играют критическую роль в транспорте меди между внутриклеточными компартментами и необходимы для нормальной функции центральной нервной системы млекопитающих. Они многочисленны в печени, но нарушения их транспортных функций влияют на центральную нервную систему [18]. Таким образом, гомеостаз меди в печени необходим и для нормальной работы мозга [19,20].

Возможную цитотоксичность меди используют в медицинских целях, вводя в организм медные комплексы с органическими лигандами, обладающими соответствующими свойствами. При использовании комплексов меди в качестве

лекарственных средств особенно востребованным является их цитотоксическое действие по отношению к раковым клеткам и патогенам. Это, безусловно, связано с дополнительным восстановлением меди  $\text{Cu}^{\text{II}}$  в  $\text{Cu}^{\text{I}}$  при введении комплексов в организм и проникновении в раковые клетки.

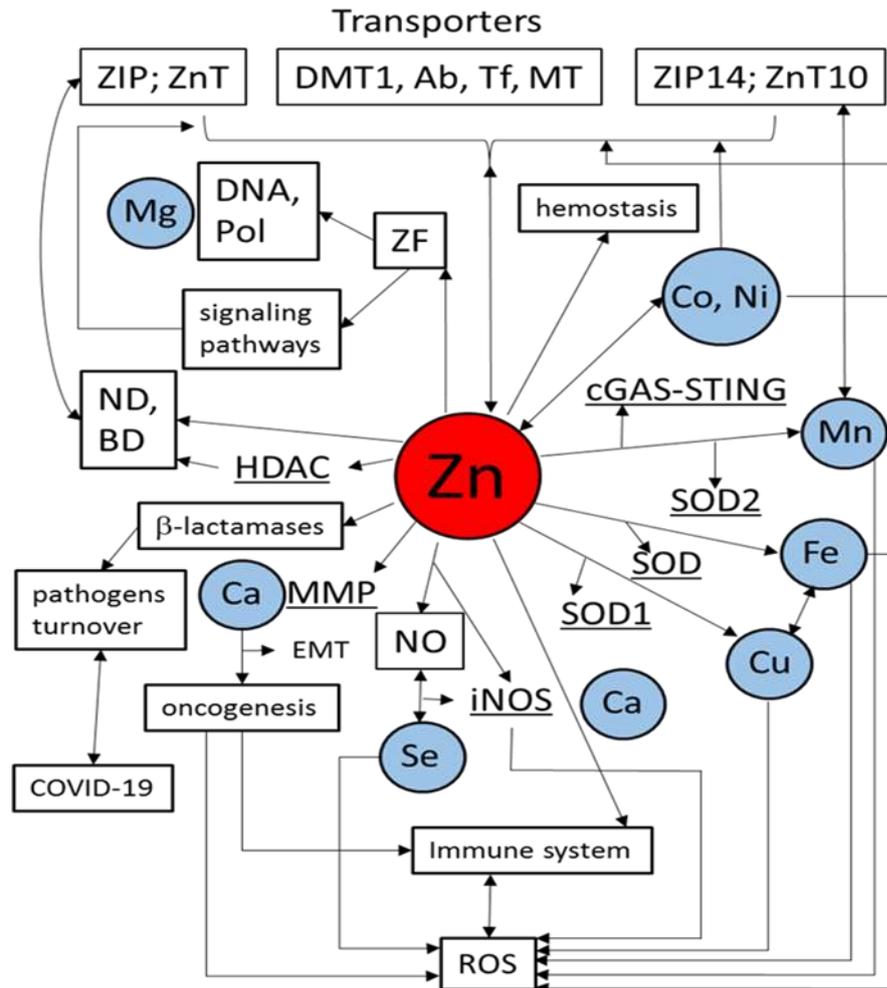
Следует обратить особое внимание на взаимосвязь гомеостаза меди и железа в связи с ферроптозом, в регуляции которого участвует церулоплазмин [21]. В физиологических концентрациях  $\text{Cu}$  играет важную роль в регуляции метаболизма железа и окислительно-восстановительного гомеостаза. Последнее обусловлено также участием ионов меди в катализе реакции Фентона [22] (наряду с  $\text{Fe}$ ), и в возникновении митохондриальной дисфункции через изменение активности комплексов цепи переноса электронов [23,24]. Ионы меди способны также истощать клеточный пул глутатиона, катализируя превращение  $\text{GSH}$  в  $\text{GSSG}$  [25], а связывание  $\text{Cu}^{2+}$  с фосфатидилэтаноламином увеличивает перекисное окисление липидов мембран [26]. Было показано, что при изменении геометрической координации комплексов  $\text{Cu}^{\text{I}}$  отмечаются вариации антираковой активности [27], однако следует учитывать, что комплексы меди(I), как правило, имеют меньшую стабильность.



**Рис. 1.** Взаимосвязь цинка с некоторыми сигнальными путями и транскрипционными факторами (из [28])

Таким образом, воздействие ионов меди, как и влияние ионов цинка [28,29] является абсолютно необходимым и благоприятным для организма только в физиологических концентрациях и становится двойственным (с увеличением цитотоксичности) при гипо- или гиперконцентрациях.

Поскольку очевидна связь гомеостаза меди и цинка, необходимо кратко обозначить значение и свойства цинка в организме.



**Рис. 2.** Взаимосвязи между влиянием гомеостаза цинка и некоторых других микроэлементов на процессы в организме (ND – neurodegenerative diseases, BD – brain diseases, Tf – transferrin, DMT1 – divalent metal transporter 1, EMT – epithelial-mesenchymal transition, ZF – zinc fingers, IMD – ischemic heart disease, MT – metallothionein, COPD – chronic obstructive pulmonary disease, Ab – albumin, Pol – polymerases, HDAC - histone deacetylases)[30]

**Роль цинка в организме.** Роль редокс-неактивного цинка в организме огромна и связана с гомеостазом как меди, так и других микроэлементов. Цинк выполняет как каталитическую, так и структурную функции и является компонентом транскрипционных факторов. Помимо этого, он взаимосвязан как с сигнальными путями, так и влияет на функционирование других эссенциальных микроэлементов, в том числе и меди. Хотя цинк является редокс-

инертным металлом, он может действовать, как антиоксидант, благодаря участию в медь/цинк-супероксиддисмутазе (SOD1), в стабилизации структуры мембран, защите сульфгидрильных групп белков и усилении экспрессии металлотионеина, который обладает металлосвязывающей способностью и выполняет антиоксидантные функции [31]. Кроме того, цинк подавляет противовоспалительные реакции, которые в противном случае усилили бы окислительный стресс.

Было показано, что дефицит цинка и избыток цинка вызывает клеточный окислительный стресс. При длительном приеме высоких доз цинка многие токсические эффекты, связанные с цинком, являются результатом дефицита меди [32]. Однако пока не существует четко определенного механизма, посредством которого точно определяется внутриклеточный или внеклеточный уровень  $Zn^{2+}$ .

На **рис. 1** и **2** показаны наиболее важные связи цинка с жизненно необходимыми для организма процессами и взаимосвязь цинка с другими микроэлементами, включая медь. Cu-Zn-супероксиддисмутаза (SOD1) является примером сочетания окислительных возможностей меди и структурных способностей цинка, являясь главным защитником тканей от оксидативного стресса.

## 2.2. Лекарственные препараты на основе меди

В литературе описано большое количество органокомплексов меди, как потенциальных лекарственных средств [5,10,33-36]. Широко исследованы производные Cu-тиосемикарбазонов, которые ингибируют репликацию ДНК и способствуют генотоксическим эффектам [37,38]. Тиосемикарбазоны (TSC) специфически хелатируют медь из N-концевого Cu-связывающего сайта HSA (сывороточный альбумин человека). Кроме того, было показано, что комплексы Cu(II)-TSC образуют тройные конъюгаты HAS, скорее всего, через гистидин. Следовательно, лабильный пул Cu-HSA является потенциальным источником образования комплекса Cu-TSC и, следовательно, заметно влияет на противораковую активность и фармакологическое поведение TSC [39]. Соединения меди с тиопуринами ингибируют синтез ДНК и РНК и используются при лечении острых лейкозов [7], а соединения с ципрофлоксацианом и с основаниями Шиффа проявляют антибактериальную активность [40]. Известны многочисленные комплексы меди с разнообразными производными пиридина, аминопиримидина, тиазина, тиазолов и тиомочевины с различной биологической активностью [41,42-45], в том числе и антиопухолевой. Некоторые биядерные комплексы Cu(I) демонстрируют способность ингибировать активность протеасом, индуцируя апоптоз в различных типах раковых клеток человека [46,47]. Производное триапина, хелатора железа, предложено в качестве

медьзависимого противоопухолевого средства, которое можно применять для лечения гематопозитического рака [48].

Хелатирующие агенты меди являются одними из наиболее многообещающих средств для поддержания концентрации меди на физиологическом уровне, чтобы избежать заболеваний, связанных с избыточным накоплением меди (в частности, болезни Вильсона) [49]. Известно образование комплексами меди сетчатых и лестничных структур [50], что увеличивает цитотоксичность (к сожалению, не только к раковым, но часто и к здоровым тканям), но уменьшает растворимость.

Представлена [51] серия новых многофункциональных металлхелатирующих соединений на основе бензотиазола с заметным сродством к амилоидным агрегатам, образующимся при болезни Альцгеймера (рис. 3). HYR-16 оказался способен перенаправить токсичную Cu-опосредованную олигомеризацию Ab на образование менее токсичных амилоидных фибрилл. Кроме того, это соединение способствует образованию активных форм кислорода (АФК), производимых ионами меди через реакции Фентона. 73 медных комплекса различной геометрии, содержащих  $\text{Cu}^{+2}$  и  $\text{Cu}^{+1}$ , синтезированы и охарактеризованы в рамках окислительно-восстановительной и биологической активности с целью установления зависимости от потенциалов окислительно-восстановительных пар  $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+1}$ , способности генерировать АФК, и внутриклеточного накопления [52]. Взаимосвязь строения и биологической активности координационных соединений меди разобраны также в обзоре [53]. Последние направления в поиске хелаторов меди связаны с разработками прохелаторов, т. е. неактивных версий хелаторов, которые предназначены для активации непосредственно в опухоли [54].

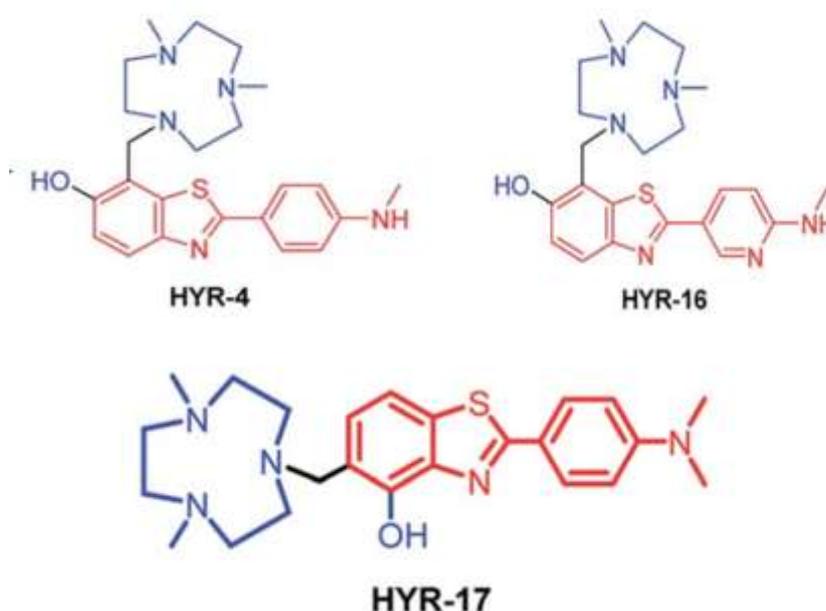
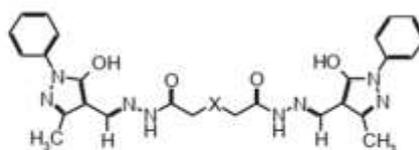


Рис. 3. Мультифункциональные соединения на основе бензотиазола (из [51])

В работе [55] удалось получить группу биядерных координационных соединений меди с гибким алифатическим спейсером (т. н. спейсированных димеров (**рис. 4**)). Интересной особенностью димеров данного типа является наличие слабых обменных взаимодействий между парамагнитными центрами, разделенными расстояниями порядка 6–10 Å.

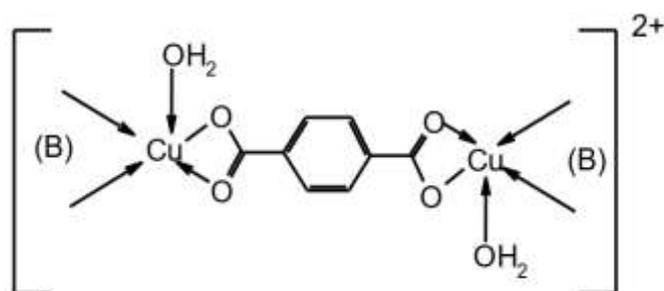
В комплексе меди(II) на основе бис(салицилиден)гидразона иминодиуксусной кислоты удалось зафиксировать, что алифатический спейсер, содержащий гетероатом (в данном случае атом азота), тоже способен проводить слабые обменные взаимодействия между катионами меди(II) [55]. Это является шагом к созданию новых лекарственных комплексов на основе меди.

Описаны [56] биядерные комплексы меди(II) общей формулы  $[(B)Cu(H_2O)(\mu\text{-tr})(H_2O)Cu(B)](ClO_4)_2$  (**рис. 4Б**), где  $\mu\text{-tr}$  = терефталат-дианион, выполняющий мостиковую функцию, связывая два атома металла бидентатными карбоксильными группами,  $B = \alpha, \alpha'$ -дипиридил или 1,4,7-триметил-1,4,7-триазиоциклононан, являющиеся в обоих случаях бидентатными лигандами и способные имитировать активные центры некоторых ферментов.



Ацилгидразоны 3-метил-1-фенил-4-формилпиразол-5-она и имидо-, оксо- и тиодиуксусной кислот ( $H_4L25^X$  X = NH, O, S)

А



Б

**Рис. 4.** Спейсированные димеры

Однако следует учитывать, что дефицит меди в организме приводит к снижению гуморальной и клеточной иммунной функции. Нарушается индуцированная митогеном пролиферация Т-клеток, а также функция В- и НК-клеток [57]. Следовательно, повышение уровня Cu в плазме может усиливать как врожденный, так и адаптивный иммунитет у людей. В то же время повышенные уровни меди в сыворотке и тканях онкологических

больных предполагают участие меди в росте некоторых опухолей [58] за счет нарушения её гомеостаза.

### 2.3. Изотопы и радионуклиды меди. Перспективы комплексного применения радионуклидов в медицине

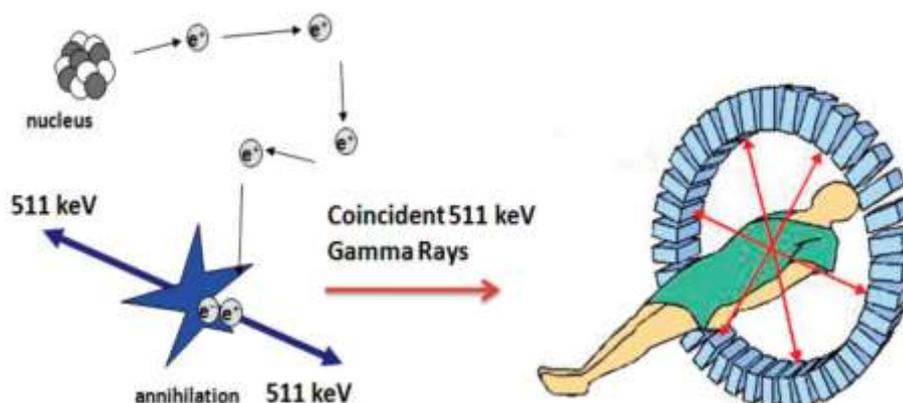
Природная медь содержит два стабильных изотопа  $^{65}\text{Cu}$  (30.85%) и  $^{63}\text{Cu}$  (69.15%). Оба изотопа имеют ядерный спин  $s = 3/2^-$ . Считается [59], что распределение природных стабильных изотопов того или иного элемента среди сосуществующих видов молекул в организме варьируются в зависимости от силы связи, ионного заряда и координации, и оно также меняется в зависимости от кинетики. В частности, сульфаты, нитраты, лактаты, фосфаты и азотсодержащие фрагменты предпочитают тяжелые изотопы, в то время как связи с серой выбирают более легкие изотопы. Более того, соотношение изотопов может меняться при возникновении и во время течения заболеваний. Так, соотношение  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  в сыворотке крови у пациентов с раком толстой кишки, молочной железы и печени заметно ниже по сравнению со здоровыми людьми. Характерное время, в течение которого изотопы Cu могут изменяться по мере прогрессирования заболевания, согласуется как со временем оборота элемента, так и с периодом полураспада альбумина, как его носителя (и, вероятно, зависит от специфических транспортеров меди). Наоборот, медь в опухолевой ткани печени является изотопно тяжелой. Роль изотопного эффекта пока не слишком понятна, но она существует. Кроме того, если медь, которая играет принципиальную роль в редокс-реакциях организма человека, 100%-но «магнитная» (имеет ядерный спин  $3/2^-$ ), то у цинка только один из стабильных изотопов  $^{67}\text{Zn}$ , которого в природной смеси всего 4.1%, имеет спин  $s = 5/2^-$ . Причина и результат таких различий в выборе эссенциальных атомов металлов в качестве кофакторов пока не ясны.

Радионуклиды  $^{64}\text{Cu}$  и  $^{67}\text{Cu}$  широко применяются в составе радиофармпрепаратов (РФП), как диагностических, так и терапевтических [60-63].  $^{64}\text{Cu}$  с параметрами:  $t_{1/2} = 12.7$  ч,  $s = 1+$  используется как  $\beta^+$ -излучатель в позитронно-эмиссионной томографии (PET-диагностика, **рис. 5**) [64] и  $^{67}\text{Cu}$ , являющийся  $\beta^-$ -излучателем с параметрами  $t_{1/2} = 61.83$  ч,  $s = 3/2^-$ ,  $E_{\text{max}} = 562$  кэВ ( $E_{\gamma} = 93$  и  $185$  кэВ), может применяться для лечения и в качестве тераностика [65], т.е. он пригоден для радиотерапии и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ). Принципиально пригодные для медицинского применения радионуклиды меди приведены в **табл. 1**.

Известны радионуклидные комплексы меди с 2-нитроимидазолом, метронидазолом, диацетил-бис( $\text{N}^4$ -метилсемикарбазоном) ( $^{64}\text{Cu-ATSM}$ ) [66]. Комплексы с макроциклическими хелаторами на базе циклама и циклена [67-69] обладают кинетической стабильностью, что делает их привлекательными для использования. Созданы конъюгаты

макроциклов с моноклональными антителами, например  $^{64}\text{Cu}$ -SurAr-mAb (1-N-(4-аминобензил)-3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло[6.6.6]эйкозан-1,8-диамин) — анти-GD2 моноклональное антитело.

HYR-4 и HYR-17 (рис. 3), предварительно хелатированные с  $^{64}\text{Cu}$  показали хорошее флуоресцентное окрашивание и радиоактивное мечение амилоидных бляшек как *in vitro*, так и *ex vivo* при ПЕТ-визуализации. Важно, что  $^{64}\text{Cu}$ -HYR-17 [51] значительно поглощается мозгом, что делает его особо перспективным агентом ПЕТ-визуализации опухолей мозга и амилоидных бляшек (рис. 6).



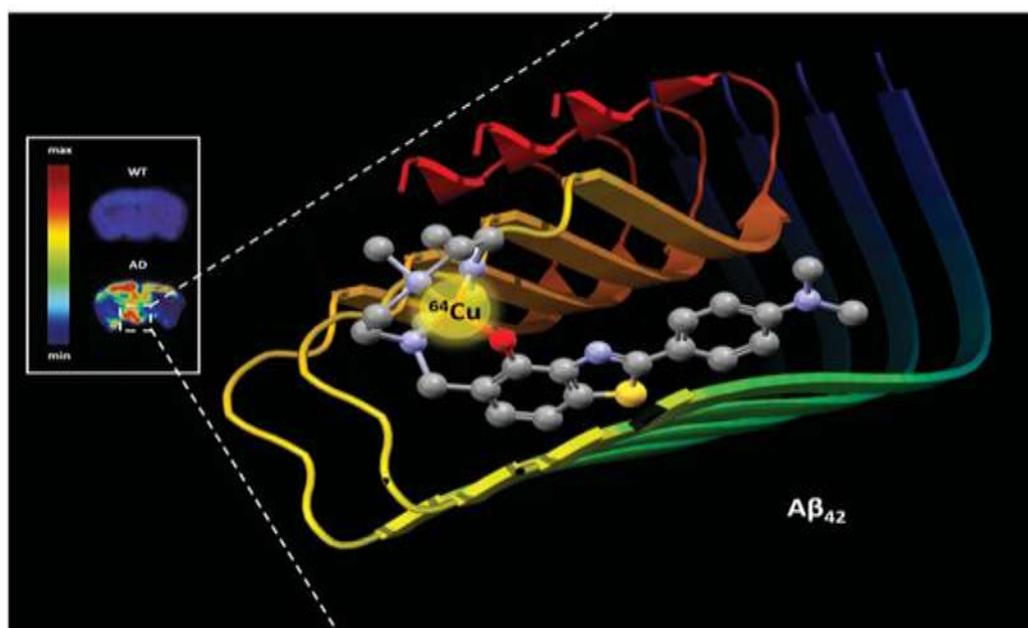
**Рис. 5.** Схема визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЕТ), основанной на аннигиляции позитрон-электрон (в ткани) с выбросом двух фотонов с равной энергией 511 кэВ, расположенных на  $180^\circ$  друг от друга. Эти фотоны обнаруживаются ПЕТ-сканером (из [73])

**Таблица 1.** Медицинские радионуклиды меди.

Радионуклид	$T_{1/2}$	Тип распада	$E(\beta^+)$ MeV (%)	$E(\beta^-)$ MeV (%)	$\gamma$ -кванты keV (%)
$^{60}\text{Cu}$	23.7 мин	$\epsilon + \beta^+$	3.92 (6) 3.0 (18) 2.0 (69)	-	1791.6 (45.4) 826.06 (21.7) 1861.6 (4.8) 1035.2 (3.7)
$^{61}\text{Cu}$	3.3 ч	$\epsilon + \beta^+$	1.22 (60)	-	373.05 (2.15) 67.412 (4.23) 1185.234 (3.75)
$^{62}\text{Cu}$	9.7 мин	$\epsilon + \beta^+$	2.91 (97)	-	1172.9 (0.34)
$^{64}\text{Cu}$	12.7 ч	$\epsilon + \beta^+, \beta^-$	0.653 (17.4)	0.578 (39)	1345.84 (0.473), 7.478 (9.6)
$^{67}\text{Cu}$	61.8 ч	$\beta^-$	-	0.577 (20) 0.484 (35) 0.395 (45)	184.577 (48.7), 93.311 (16.1), 91.266 (7.0)

Изотоп  $^{67}\text{Cu}$  используют в лечении нейробластомы, применяя в качестве хелатора антитела ChCE7 с бифункциональным лигандом — тетрагидрохлоридом 4-(1,4,8,11-тетраазациклотетрадец-1-ил)метилбензойной кислоты [70]. Используются комплексы как с  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , так и с  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , и их структура имеет огромное разнообразие вплоть до сетчатых (с аминопиримидинами [71]) и ступенчатых структур, как, например, в случае комплексов  $\text{Cu}^{\text{I}}$  с тиомочевинами [50]. В работе [72] рассмотрены многочисленные хелаторы для меди-64 и их свойства и недостатки.

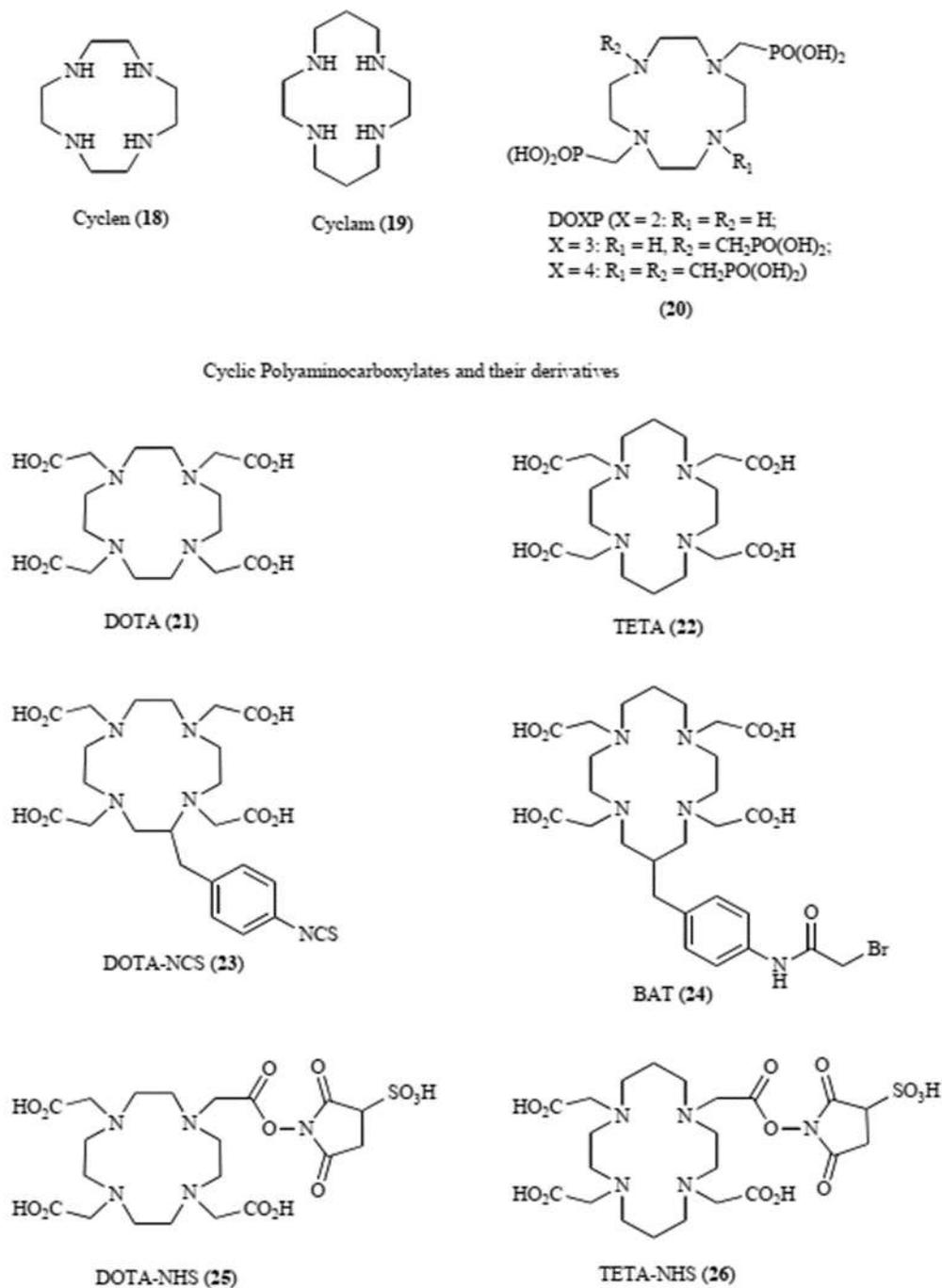
На мышинной модели анапластической карциномы щитовидной железы была показана эффективность комбинированной лучевой и фототермической терапии с использованием меченых наночастиц (НЧ)  $\text{CuS}$  - ПЭГ[ $^{64}\text{Cu}$ ]НЧ $\text{CuS}$ , в котором радиотерапевтические свойства радионуклида меди сочетались с плазмонными свойствами НЧ  $\text{CuS}$  [74]. Комбинация полимера, содержащего пиридин-2-тиол и медь-67, может эффективно убивать широкий спектр раковых клеток, включая лекарственно устойчивые [75].



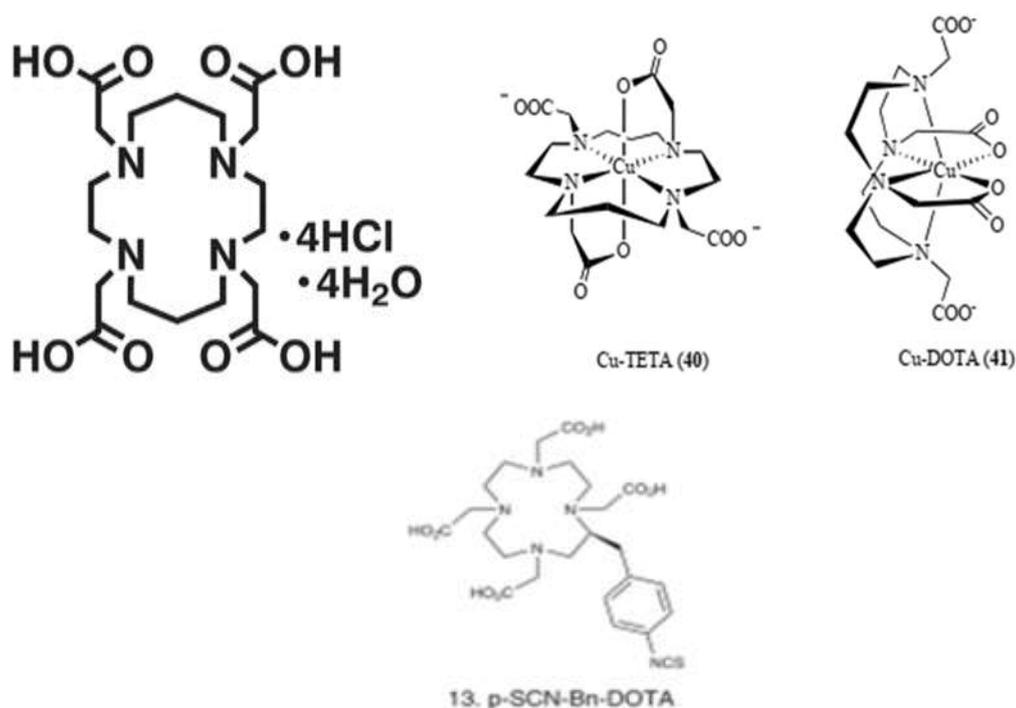
**Рис. 6.**  $^{64}\text{Cu}$ -ПЭТ визуализация Aβ агрегатов с применением HYR-17 (из [51])

HER-рецептор является высокоспецифичной мишенью для лечения рака молочной железы. Рекомбинантное моноклональное антитело к HER2 трастузумаб используется в виде конъюгата  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-трастузумаб (DOTA=1,4,7,10-тетрауксусная кислота (рис. 7)) для визуализации первичных и метастатических HER2-положительных опухолей [76,77]. Этот конъюгат быстро накапливается в опухолях (в течение 1 ч после инъекции) и обладает высокой чувствительностью обнаружения.

Наиболее привлекательным оказался тетраазамакроциклический лиганд ТЕТА (рис. 8) (1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота), который широко используется в качестве радиолиганда (хелатора) для  $^{64}\text{Cu}$ , и его удалось конъюгировать с антителами, белками и пептидами [78,79]. Однако еще более устойчивыми показали себя макроциклические хелаторы с поперечными мостиками с включением 1,8-этилена (рис. 9), однако, и они имеют свои недостатки [80].



В качестве хелаторов в разное время использовали разнообразные бифункциональные лиганды: ациклические полиаминкарбоксилатные лиганды, которые включают ЭДТА, ДТРА (диэтилентриаминпентауксусная кислота) и их производные [78]. Несмотря на высокую термодинамическую стабильность оказалось, что такие комплексы  $^{67}\text{Cu}$  не стабильны в сыворотке человека в течение длительного периода времени. Другие ациклические лиганды, которые продемонстрировали умеренный успех в качестве хелаторов  $^{64}\text{Cu}$ , включают доноры NO, лиганды на основе Шиффа, дитиокарбаматы, дифосфиновые лиганды и бис-лиганды-тиосемикарбазоны, среди которых  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM поглощается преимущественно гипоксическими опухолевыми клетками и потенциально может быть эффективным радиотерапевтическим средством при терапии рака [81].



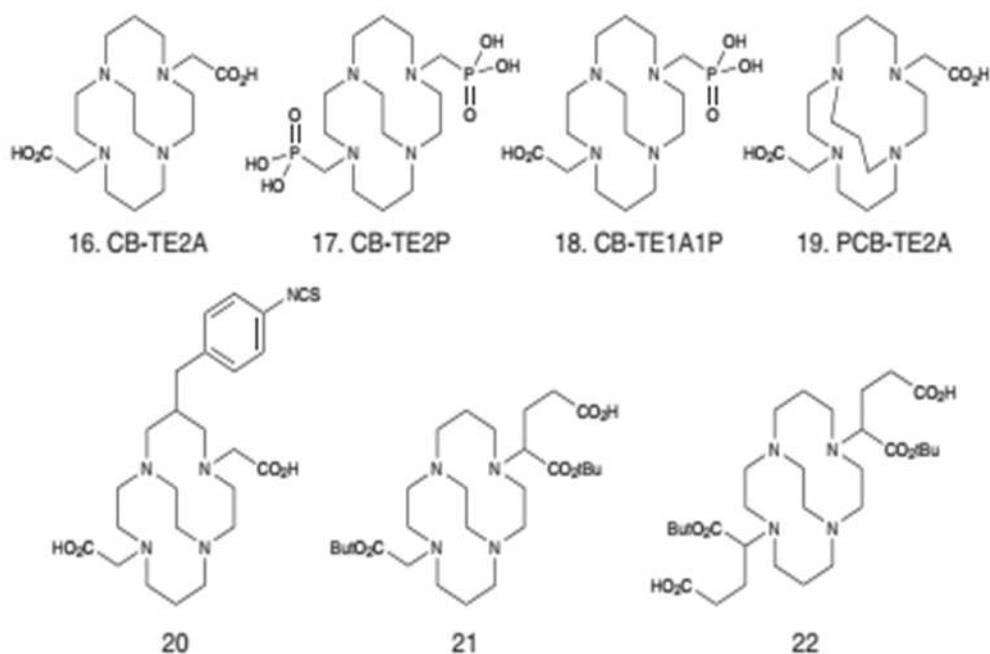
**Рис. 8.** Формулы TETA, Cu-TETA, Cu-DOTA и DOTA, модифицированная для лучшего связывания (примеры немостиковых макроциклических хелаторов)

**Способы получения радионуклидов меди и их применения.** Реакторный метод на быстрых нейтронах большой интенсивности  $^{67}\text{Zn}(n,p)^{67}\text{Cu}$  - наиболее применяемый для получения радионуклида  $^{67}\text{Cu}$  [82,83]. Более доступным является циклотронный метод получения с использованием 79 МэВ протонов по реакции  $^{68}\text{Zn}(p,2p)^{67}\text{Cu}$  и 20 МэВ протонов по реакции  $^{70}\text{Zn}(p,\alpha)^{67}\text{Cu}$  [83-85]. В последнем случае наблюдается, к сожалению, небольшой выход и значительное содержание  $^{65}\text{Zn}$  и  $^{67}\text{Ga}$ .

Перспективным можно считать получение меди-64 на циклотроне по реакциям  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  (с энергией протонов 16-20 МэВ и автоматизированной системой элюации [86,87]) и  $^{64}\text{Zn}(d,2p)^{64}\text{Cu}$  (с энергией частиц 19.5 МэВ) [88]. Здесь возможно получение

продукта с большим выходом и высокой радиохимической чистотой [89]. Схемы распада радионуклидов представлены на **рис. 10**.

Чтобы получить  $^{64}\text{Cu}$  с высокой удельной активностью, для бомбардировки мишени в (n,p)-реакции ( $^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$ ) используются быстрые нейтроны. В отличие от реакции на тепловых нейтронах, быстрый (высокоэнергетический) нейтрон обладает достаточной энергией, чтобы выбросить частицу из ядра-мишени [90]. Однако образуется много высокорadioактивных побочных продуктов, которые необходимо удалять.



**Рис. 9.** Примеры макроциклических хелаторов с поперечными мостиками (из [80])

Для радионуклидов в онкологии имеется традиционная схема их применения (ядерная медицина) [1], однако постепенно наблюдается внедрение в ядерную медицину нанотехнологий, так как разумное использование наноматериалов в составе радиофармацевтических препаратов могут привести к улучшению их характеристик.

На **рис. 11** показано сравнение действия обычного и нанорадиофармпрепаратов. Для доставки в традиционной ядерной медицине наиболее перспективным следует считать использование таргетных молекул, связывающихся с мембранными рецепторами раковой клетки, как показано на примере рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), соматостатина (SSR) и интегрин [73] (**рис. 12**).

В настоящее время изучаются возможности применения многочисленных бифункциональных лигандов, однако наибольшее распространение получили в ядерной медицине DOTA и ДТРА (**рис.7**) с некоторыми заместителями, улучшающими

стабильность и связывание их с радионуклидами и векторными молекулами по схеме (рис. 13) [63].

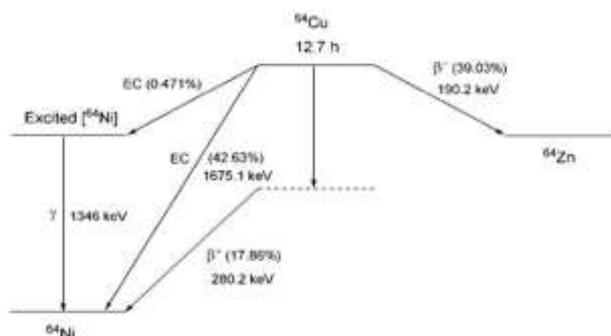


Схема распада  $^{64}\text{Cu}$

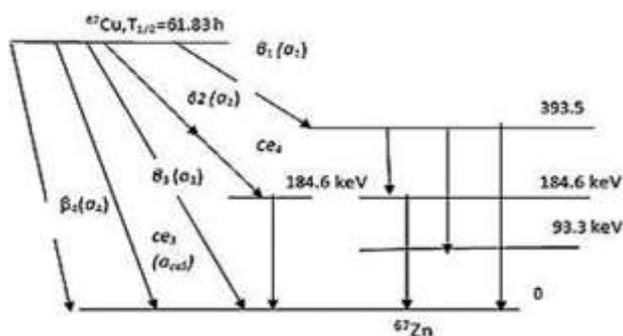


Схема распада  $^{67}\text{Cu}$

Рис. 10. Схемы распада радионуклидов меди

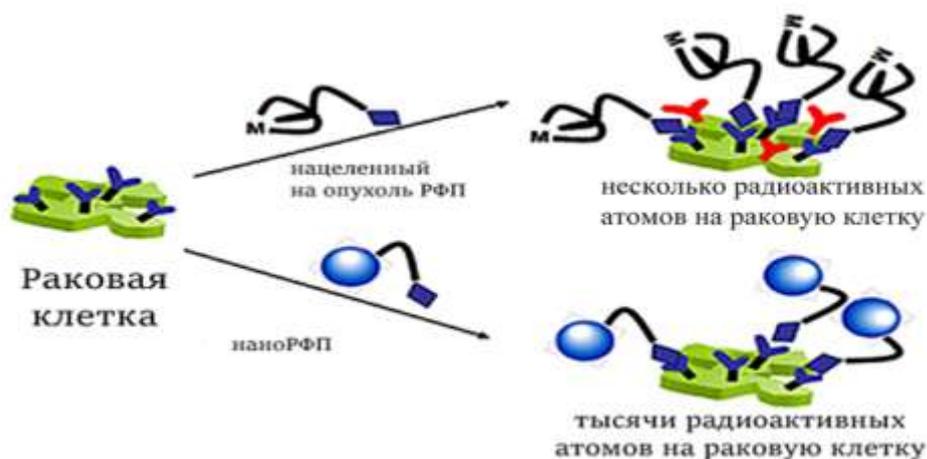
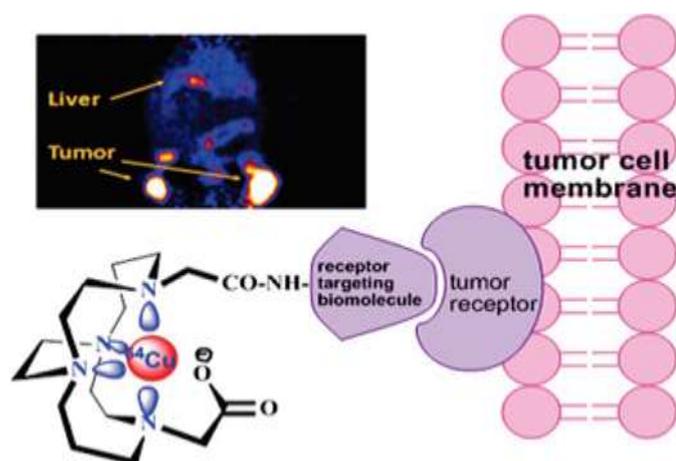


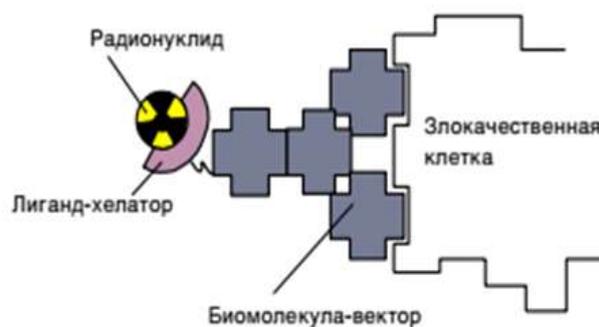
Рис. 11. Традиционная радиофармацевтическая терапия в сравнении с нанорадиофармацевтической терапией (переведено из [91])

Благодаря сильному гидрофобному взаимодействию между биотином и стрептавидином (StAv, 52 кДа) [92] биотинилированные радиоизотопные индикаторы часто используются в тандеме с антителами, конъюгированными со стрептавидином. В области диагностики пара mAb-стрептавидин NR-LU10-SA (MAb)/ $^{64}\text{Cu}$ DOTA-биотин (эффектор) оказался очень эффективным для обнаружения карциномы человека у голых мышей [93].



**Рис. 12.** Схема действия таргетной молекулы с  $^{64}\text{Cu}$ , взаимодействующей с мембранным рецептором (из [73])

Однако было продемонстрировано, что DOTA и DOTA-подобные агенты не являются лучшими хелаторами для  $^{64}\text{Cu}$ , поскольку наблюдаются реакции трансхелатирования, приводящие к накоплению  $^{64}\text{Cu}$  в печени и почках. Высокоорганизованный хелатный центр производных биспидина (3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан) придает хорошие хелатирующие свойства с точки зрения стабильности, селективности и кинетики комплексообразования [94]. Анализ некоторых хелаторов  $^{64}\text{Cu}$ , в сравнении с другими радионуклидами, приведено в работах [95,96].



**Рис. 13.** Схема таргетной молекулы в составе радиофармацевтического препарата с бифункциональным агентом (из [63])

Сравнительно недавно получены два новых метилтиазолил-1,4,7-триазабициклононанных лиганда [97], которые затем конъюгировали с пептидом-антагонистом бомбезина для воздействия на рецептор высвобождающего гастрин пептида (GRPr). Полученный конъюгат связывали с  $^{64}\text{Cu}$  и характеристики такого РФП показали его перспективность. Хорошие результаты по стабильности в сыворотке (>95%, 48 ч) показал легкосинтезируемый меченый комплекс  $[^{64}\text{Cu}]\text{-5-(4-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирин}$  [98].

Важным показателем любого хелатора является поглощение получаемого с ним конъюгата опухолями. С этой точки зрения конъюгаты, содержащие хелаторы с поперечными мостиками пропилена, показали более высокое поглощение опухолью, в то время как близкородственный аналог с поперечными мостиками этилена демонстрировал быстрое выведение из организма. Было показано, что высокая стабильность комплекса медь-хелатор *in vivo* тесно коррелировала с высоким поглощением опухолью, тогда как общая липофильность биоконъюгата влияла как на поглощение опухолью, так и на клиренс из организма [99].

В последние годы сочетание ядерной и наномедицины развивается, и количество радиоактивных нанопродуктов, в том числе и одобренных FDA (Food and Drug Administration), с каждым годом растет [100]. Ожидается, что они окажут существенное влияние на диагностику и лечение рака. Наноматериалы, как правило, способны накапливаться в эндотелиальных клетках опухоли неспецифическим путем через увеличенную щель соединения, с помощью механизма, известного как **усиленный эффект проницаемости и удержания (EPR)**. Открытие эффекта EPR на примере конъюгата неокарциностатина и поли(стирол-комалеиновой кислоты) [101] стало одним из принципиальных достижений, ведущих к разработке таргетных противоопухолевых средств терапии.

В связи с этим возникает вопрос о составе и роли наноносителей, которые в первую очередь должны быть биосовместимыми и биodeградируемыми и/или достаточно легко выводимыми из организма.

#### **2.4. Биосовместимые носители препаратов на основе гидроксипатита**

Носители для медицинских препаратов можно разделить на природные (моноклональные антитела, витамины, белки и пептиды, пептидомиметики и т. д.) и наночастицы различного строения (наноалмазы, фуллерены, графен, углеродные трубки, SiO<sub>2</sub> и т.д.) [102].

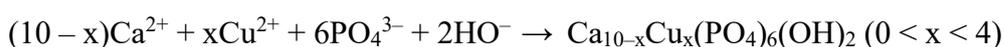
Классификация наноматериалов, помимо наномасштабного указания (менее 100 нм), включает нульмерные (0D), одномерные (1D), двухмерные (2D) и трехмерные (3D) частицы [100]. В нульмерных наноматериалах (наночастицы, квантовые точки, нанокластеры) [103] все три измерения находятся в пределах 50-100 нм. Как наиболее распространенная, форма 0D-наноструктур является менее цитотоксичной по сравнению с 1D-, 2D- и 3D-формами по отношению к здоровой ткани.

**Гидроксипатит (ГАП).** ГАП наиболее соответствует природным биodeградируемым и биосовместимым материалам, так как он представляет минеральную основу эндоскелета. При этом он может относиться как к 0D- форме, так и к 1D-форме наночастиц, что

определяется способом его получения. Также ГАП может отличаться по соотношению Ca/P, которое может соответствовать стехиометрическому, составляющему 5/3, но может и отклоняться от него в процессе синтеза, уменьшаясь вплоть до 1.5 [104]. При этом ГАП обладает биорезорбируемостью и биоактивностью [105].

Существует большое количество способов синтеза ГАП, среди которых простое осаждение [106,107], метод золь-гель [108], твердофазный [109,110], гидротермальный [111], эмульсионный [112] и даже разрабатывается ферментативный метод [113,114]. Получающийся продукт может отличаться первичными размерами и морфологическими особенностями. Для изменения свойств наночастиц ГАП практикуется введение добавок, например, наноразмерного кремния [115] и ионов металлов. Способы синтеза ГАП подробно описаны в работах [116-118].

Ионы металлов можно вводить сокристаллизационным методом, т. е. в процессе синтеза ГАП и адсорбционным методом. Известны работы по введению катионов меди в солевой синтез ГАП [119] в виде растворов хлоридов, нитратов или сульфатов по уравнению



Можно с той же целью использовать фосфорную кислоту и гидроксид кальция [120,121].

Известно также введение ионов меди в кристаллическую структуру ГАП при повышенной температуре после синтеза при комнатной температуре или в условиях кипения водного раствора. При этом ионы меди могут занимать места ионов кальция (наиболее подвижных) или создавать хромогенные центры [121]. При использовании ферментативного метода ионы меди также можно вводить как сорбционно, так и сокристаллизацией, но данных по такому синтезу пока не было.

Для адсорбции были предложены механизмы образования комплекса на поверхности с отрывом протонов (а) и путем реакции ионного обмена (б) [122,123]



В обоих случаях получается  $Cu_xCa_{10-x}(PO_4)_6(OH)_2$ .

В случае получения ГАП ферментативным способом частицы имеют бóльшие размеры, что может применяться в методе радиоэмболизации, который заключается во введении крупных частиц твердого носителя с радионуклидом в кровеносный сосуд опухоли [124,125]. Это является привлекательной технологией применения таких нанорадиофармацевтических агентов.

Существуют различные методики для модификации ГАП при создании нанокompозитных, нановолоконных и наноструктурных кластеров для доставки лекарственных средств [126]. Хотя синтетический ГАП не обладает локальной или системной токсичностью [127], размер и форма ГАП-наночастиц и его производных представляют собой существенный фактор, который может влиять на пролиферацию и цитотоксичность [128,129]. Известно [130], что наноГАП может даже ингибировать рост некоторых видов раковых клеток при минимальном влиянии на здоровые моноциты. Очевидно, что биологические функции синтетического ГАП определяются размером его частиц, морфологией, кристалличностью и составом, а, следовательно, использованными предшественниками и выбранным процессом синтеза.

Наночастицы гидроксиапатита (ГАП) перспективны в первую очередь в качестве биологических агентов для лечения и диагностики заболеваний костей благодаря их высокому сродству к костным тканям [131]. Это сродство до сих пор используется для разработки специфических систем доставки радиоизотопов при остеосаркоме, костных метастазах и других заболеваниях костей, и позволяет применять ГАП в тераностических целях [132]. Однако необходима химическая модификация поверхности этих наночастиц для обеспечения активного нацеливания на костные опухоли или костные нарушения. Кроме того, модификация предотвращает агрегацию частиц [133]. Бисфосфонаты, и, в частности, медроновая кислота (МК), являются активными молекулами для нацеливания при заболевании костей [134,135], и МК используется для скинтиграфии в виде конъюгата с  $^{99m}\text{Tc}$ . Модификация с фолиевой кислотой интересна в связи с существованием сверхэкспрессированных рецепторов фолиевой кислоты в мембранах остеосаркомы и других опухолевых клеток [136], что делает фолат потенциальным таргетным агентом. Был получен и опробован конъюгат ГАП-фолат- $^{64}\text{Cu}$  с высокой радиохимической чистотой, однако система имела низкую удельную активность [134].

## **2.5. Полимеры и их конъюгаты в качестве носителей препаратов**

Исследования доставки лекарств в последние десятилетия привели к развитию синтеза и применения конъюгатов представляющих полимер-лекарственные средства. Хорошо известны неразлагаемые полимерные носители на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ) и N-сополимера (2-гидроксипропил)метакриламида (ГПМА) [137], однако прилагаются усилия для получения биоразлагаемых, чувствительных к определенным стимулам и таргетных систем чтобы улучшить локализованную доставку лекарств, и облегчить их выведение. Для усиления воздействия таких конъюгатов применяется принцип мультифункциональности, т.е. использование тераностиков или нескольких препаратов в сочетанном действии [138]. Концепция ковалентно-связанных конъюгатов

полимер-лекарство была предложена впервые Рингсдорфом [139] и состоит в связи полимерной основной цепи с тремя составляющими: солюбилизатором для придания растворимости (гидрофильности), если это необходимо, лекарственным средством и вектором доставки (рис. 14).

Такие конъюгаты способны изменять фармакокинетику и биораспределение лекарств, что особенно важно для тех препаратов, которые имеют короткий период полувыведения из плазмы крови из-за быстрого метаболизма (клиренса) и которые имеют нецелевую токсичность. Кроме того, они способны увеличивать терапевтический индекс лекарств за счет эффекта EPR [101], который заключается в увеличении поглощения макромолекул опухолями в результате сочетания плохого лимфатического дренажа и повышенной проницаемости сосудов в микроокружении опухоли. Путем манипулирования размером, формой, зарядом и типом системы доставки наночастиц можно получить разнообразные профили распределения [140].

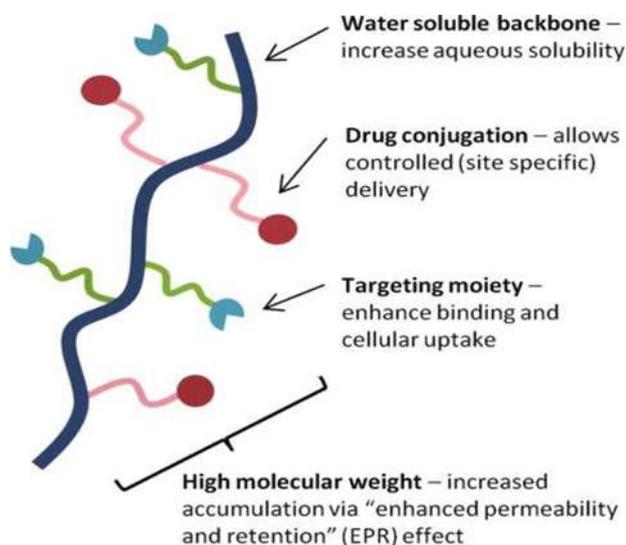


Рис. 14. Модель Рингсдорфа (из [138])

Для производства наночастиц **кремнезема** контролируемого размера, формы и функциональности  $\text{SiO}_2$  - наночастицы модифицируются с использованием  $-\text{SH}$  группы и ПЭГ с последующей конъюгацией с НОТА и с дальнейшей реакцией с агентом TRC105-SH. После этого выполняется мечение  $^{64}\text{Cu}$ . НОТА используется из-за недостаточно хорошего связывания меди с  $\text{SiO}_2$  [141]. Такие наночастицы обладают высокой стабильностью [142]. **Коллаген** широко экспрессируется в тканях и органах и во внеклеточном матриксе опухолей. Опухолевый коллаген преимущественно накапливается в строме опухоли или под эндотелием кровеносных сосудов опухоли и обнажается за счет фрагментарной структуры кровеносных сосудов опухоли. Через кровеносные сосуды с эффектом EPR макромолекулы, связывающие коллаген, легко связываются с опухолевым коллагеном и накапливаются внутри опухоли, делая опухолевый коллаген потенциальной

опухолеспецифической мишенью [143]. Многочисленные исследования подтвердили, что нацеливание на коллаген во внеклеточный матрикс опухоли будет способствовать накоплению и удержанию там иммунотерапевтических препаратов, значительно улучшая их противоопухолевую эффективность и позволяя избежать серьезных побочных эффектов [144,145].

**Липосомы** представляют собой носители для доставки лекарств, состоящие из липидного бислоя таким образом, чтобы они содержали гидрофильную внутреннюю часть, которая может включать радиофармацевтический агент. В сосудистой сети опухолей плотные соединения эндотелиальных клеток больше по сравнению с нормальной сосудистой сетью, что способствует большему накоплению частиц-носителей, таких как липосомы, именно в опухолях. Для мечения липосом радиоактивной меткой используются хелаторы, такие как DOTA, или липофильные хелаторы, такие как 2-гидроксихинолин. Активное нацеливание за счет функционализации липосом моноклональными антителами также используется для дальнейшего увеличения накопления в тканях-мишенях [140,146]. Липосомы, нагруженные  $\text{Cu-64}$  и гадолинием, производят, как парамагнитные системы доставки, которые позволяют одновременно получать изображения с помощью МРТ и ПЕТ-сканирования. Важным свойством липосом является то, что они могут инкапсулировать металлы и другие радиоактивные индикаторы без каких-либо отклонений в липосомном биораспределении.

**Полимерные наночастицы** представляют собой ковалентно-сшитые цепи полиэлектролитов разного состава. Полилактидные и полилактидгликолидные наночастицы считаются перспективными для направленной доставки препаратов в ЦНС через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Их транспорт проходит путем эндоцитоза [147]. Поли(L-молочная кислота)-блокполи(саркозин) полимерная мицелла, называемая «лактосомой», меченная  $^{18}\text{F}$ , используется в ПЕТ-визуализации [148]. С аналогичной целью и с высокой эффективностью удалось пометить гликоль-хитозановые наночастицы, используя радионуклид  $^{64}\text{Cu}$  [149].

Наночастицы 2-гидроксипропилметакриламида (HPMA) способны содержать и химиотерапевтические и агенты визуализации в одной комбинации, и сополимеры HPMA показали хороший потенциал для доставки химиотерапевтических препаратов. Высокой биосовместимостью обладают липидные наночастицы 1-пальмитоил-2-олеоилглицеро-3-фосфохолина (POPC) и сополимера стирола и малеиновой кислоты (SMA) с липосомами [150].

Чтобы объединить антиангиогенез и иммунную активацию для лечения рака молочной железы был получен медь-хелатирующий спирально-ребенчатый блок-

сополимер RGD-PEG-b-PGA- $\gamma$ -(TETA-DTC-PHis) (RPTDH) и использован для загрузки резикимода, который является агонистом TLR7 и TLR8 – рецепторов [151]. RPTDH обладает сильной способностью хелатировать медь и может самоорганизовываться с образованием сферических наночастиц со значительной чувствительностью к pH [152].

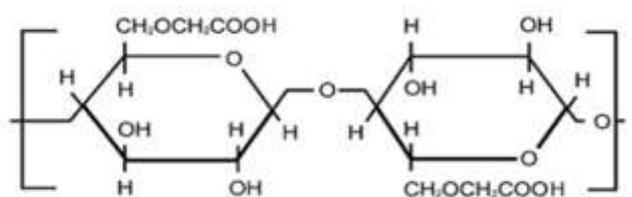
Для распознавания интегрина были разработаны меченные  $^{64}\text{Cu}$  наночастицы оксида железа, покрытые поли(аспарагиновой кислотой), конъюгированные с RGD-пептидом [153]. Широко разрабатываются дендримеры или «каскадные» полимеры, т. е. сильно разветвленные молекулы в виде шара. Центральная часть таких дендримеров, являющихся наноконтейнерами, содержит лекарственное средство и окружена оболочкой, предотвращающей утечку лекарства, а на внешней поверхности можно прикреплять антитела-векторы. Известные дендримеры: полиаминоамидный с этилендиаминовым ядром, «дендритный полифенилазаметин», pH-зависимые сополимеры метакриловой кислоты и этилакрилата [147].

**Углеродные наночастицы.** Многочисленные виды наночастиц предоставляет углерод: графен, нанотрубки, нановолокна, фуллерены, наноалмазы [154-156]. Способы модификации поверхности всех этих наночастиц являются ключевым моментом в процессе создания новых биомедицинских материалов доставки. В частности, для этого используют ПАВ, адсорбцию амфифильных молекул белков и полимеров и сшивку с фуллеренами сложных функциональных групп [157]. Углеродные нанотрубки способны проникать через мембраны, но имеют достаточно высокую токсичность. Фуллерены, особенно модифицированные, выполняют функцию наноконтейнеров-доставщиков, и в ряде случаев также способны проникать через мембраны клеток при меньшей собственной токсичности. Наноалмаз является наиболее устойчивой углеродной структурой, имеет размер ~5 нм и высокую удельную площадь поверхности, что позволило рекомендовать его в качестве носителя белков. На поверхности наноалмаза адсорбировали доксорубин, что привело к улучшению характеристик лекарства [158].

Среди наноносителей следует особо выделить магнитные наночастицы, квантовые точки, нанопористый кремний и порфирифиллерены, которые доказали свою применимость в медицине [147].

**Полимерные углеводы.** Сахара имеют изначальное преимущество, являясь природными полимерами, что не вызывает токсичности при их использовании. Кроме того, могут быть выбраны условия, когда они растворимы в воде и могут увеличивать растворимость лекарств – комплексов переходных металлов, которые, как правило, нерастворимы в водных растворах. Водорастворимые полимерные микрогели представляют собой стабильные по составу трехмерные сетки из физически или химически

сшитых макромолекул и способны удерживать в своем объеме значительное количество растворителя. По отношению к отдельным лекарствам емкость микрогелей превосходит емкость липосом и полимерных мицелл [159,160]. Такие микрогели могут быть получены на основе анионных полисахаридов: карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ, **рис. 15**), альгинатов натрия, гиалуроновой кислоты и др. Их привлекательными свойствами для медицинского применения являются гидрофильность, высокая степень набухаемости в физиологических условиях, нетоксичность, биосовместимость и биоразлагаемость. При добавлении к таким микрогелям при формировании их в водных растворах ионов металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$ ) образуются мостиковые структуры типа  $\text{Me}-(\text{COO}-)_2$ , включающие атомы металлов. При этом гидроксильные группы увеличивают стабилизацию композиций. Микрогели используются в тканевой инженерии, бионанотехнологиях и в биомедицинских имплантатах [161]. Полимерные микрогели имеют размеры от 10 до 1000 нм, могут разбухать и сжиматься обратно в ответ на внешнее воздействие. Состав таких частиц остаётся постоянным из-за ковалентных связей (сшивок) и сильных многоточечных взаимодействий внутри полимерной сети. Микрогели способны поглощать и удерживать большое количество воды.



**Рис. 15.** Фрагмент карбоксиметилцеллюлозы или целлюлозогликолевой кислоты, общая формула  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2(\text{OH})_{3-x}(\text{OCH}_2\text{COOH})_x]_n$ , где  $x = 0.08-1.5$

Альгинат натрия и карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) давно рассматриваются в качестве перспективных носителей лекарственных средств. Сравнение КМЦ с гиалуроновой кислотой при использовании их в качестве носителей в офтальмологии показало примерно одинаковую безопасность их введения [162]. Микрогели на основе карбоксиметилцеллюлозы представляют собой удачный носитель, являясь пищевым продуктом, нетоксичным для человека и воднорастворимым препаратом, который способен связывать многие плохо растворимые вещества и ионы металлов, что перспективно для их совместного или синергического воздействия. Инкапсулирование лекарственного вещества или радионуклида в наноразмерном носителе позволяет решить несколько принципиальных вопросов, связанных с судьбой лекарства в биологическом окружении, хотя имеются вопросы по выведению КМЦ из организма в связи с тем, что в организме человека нет ферментов, способных катализировать его деградацию, однако имеется биота, способная к воздействию и частичному разрушению КМЦ.

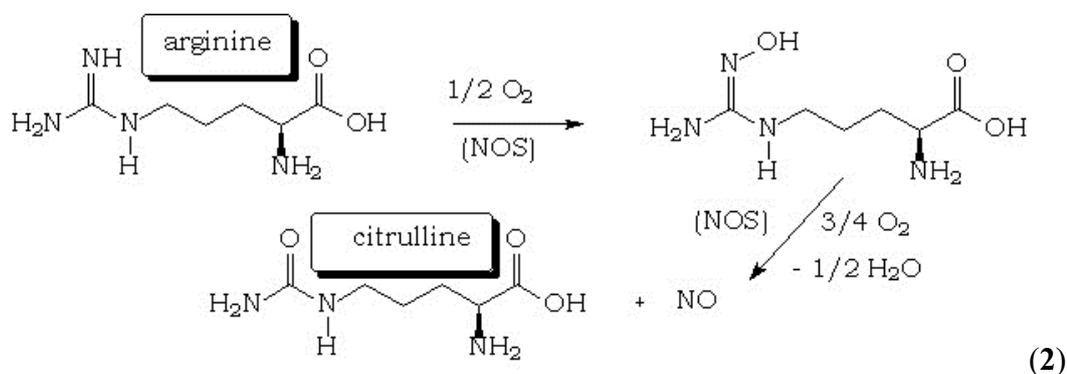
Декстрины, способные образовывать внутренние полости для введения туда лекарств, также рассматриваются в качестве носителей. Производное 1,2,4-триадиола, показавшее перспективность по отношению к болезни Альцгеймера, связывали с  $\beta$ -циклодекстрином и гидроксипролил- $\beta$ -циклодекстрином, что повышало растворимость лекарственного средства при высокой устойчивости комплексообразования и увеличивало эффект воздействия [163].

В настоящее время водные нано/микрогели на основе углеводов активно исследуются на предмет возможности их применения в различных областях человеческой деятельности [164]. Инкапсулирование медицинских препаратов в микро/наногелевые частицы позволяет увеличить время их циркуляции в кровотоке [165], обеспечить доставку препарата к клеткам и органам-мишеням [166] и контролируемое высвобождение препарата [167], предотвратить преждевременную деградацию препарата ферментами [168], повышая этим биодоступность малорастворимых биоактивных соединений. В качестве носителей были предложены многие полимерные гидрогели и мицеллы [169].

При использовании полимерных материалов в радиофармацевтических процессах встает вопрос о радиационной устойчивости таких контейнеров/доставщиков лекарств. Исследования показали [170-173], что в основе радиолитического распада целлюлозы лежат процессы ионизации, нейтрализации ион-электронных пар и гибели возбужденных состояний, которые и приводят преимущественно к распаду гликозидных связей в молекуле. А при гамма-облучении целлюлозных молекул происходит разрушение глюкопиранозных циклов [170], которое является, по мнению авторов, следствием жесткоцепного характера макромолекул целлюлозы.

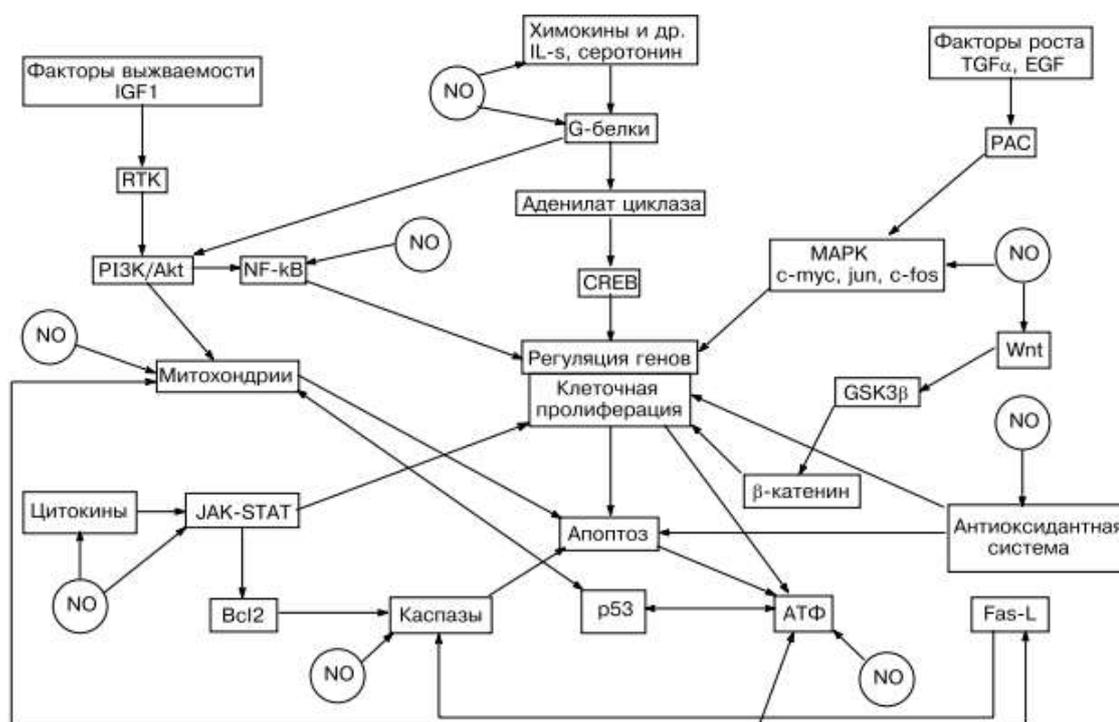
## 2.6. Роль эффекторов NO-синтазы в канцерогенезе и в антиопухолевой терапии

Оксид азота NO играет огромную роль в организме, выполняя как физиологическую, так и сигнальную функции, что схематично показано на рис. 16 [174]. Реакция его образования в организме происходит в 2 стадии из аргинина и приведена ниже (2):



При этом используется фермент NO-синтаза, и коферментом выступает NADPH. NO-синтаза имеет три изоформы, две из которых являются конститутивными:

эндотелиальная (eNOS) и нейрональная (nNOS). Третья форма – индуцибельная (iNOS), имея базовый фон в организме, экспрессируется в ответ на провоспалительные стимулы [175].



**Рис. 16.** Сигнальные пути, на которые имеет влияние NO. Bcl-2 — регулятор апоптоза. CD95/FasL — кластер дифференциации 95. EGF — эпидермальный фактор роста. Fas-L — фактор смерти. GSK3β — гликоген синтаз-киназа 3β. TGF-α — фактор роста опухоли α. IGF1 — инсулин-подобный фактор роста 1. JAK-STAT — киназа JAK — преобразователи и активаторы транскрипции. MAPK — митоген-активируемые протеинкиназы. NF-κB — ядерный фактор κB. PI3K/Akt — фосфатидилинозитол-3-киназы/протеинкиназа B. RTK — рецепторы фактора роста с тирозинкиназной активностью. Wnt — сигнальный путь (из [174])

Таким образом, iNOS играет огромную роль в развитии патологий, поскольку NO относится к активным формам как кислорода, так и азота и способен стимулировать образование реакционного пероксинитрита. В связи с этим экспрессия iNOS и концентрация eNOS, которые, в основном, и определяют количество эндогенного и экзогенного NO, могут служить и необходимой защитой организма, и стимулом образования опухолей и ангиогенеза, в том числе лейкемии [176]. Роль эндогенного и экзогенного NO в развитии патологий описана в монографии [177]. Именно поэтому в организме существует строгий контроль NO за счет ингибирования NOS субстратом, т. е. L-аргинином, а также его производными - N,N-диметил-L-аргинином, N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинином, N<sup>ω</sup>-метил-L-аргинином и др., избытком NO, а также цитруллином и замещенными гуанидинами [178]. Среди оксидиазолов с аминокислотными заместителями, а также среди производных аминокислот, тиазолинов, тиазинов и тио- и изотиомочевины

имеются как селективные, так и общие ингибиторы NOS [179,180]. Производные аминотриазола, являясь эффекторами NOS, способны помимо этого ингибировать производные пиридина, ингибирующие одновременно PI3K [181], т. е. могут атаковать сразу несколько мишеней в организме, увеличивая антиопухолевую активность. Ингибиторами выработки эндогенного NO являются флавопиридол, флавоны, природные полифенолы и синтетические диаминометоксифлавоны [182]. Подробная классификация NOS-ингибиторов дана в обзоре [183]. При этом известно, что цитокины и особенно IFN- $\gamma$  могут повышать экспрессию iNOS, что в норме необходимо для активации каспаз и апоптоза. На примере S-метилизотиомочевины (SMT), которая является ингибитором iNOS, была показана ее способность блокировать цитокин-опосредованную генерацию NO, что уменьшает апоптоз [184]. На этом примере видна двойственность влияния на метаболизм как NO, так и его ингибиторов, что требует строгого баланса выработки NO, любое нарушение которого может служить фактором канцерогенеза и, в частности, развития лейкозов. Сложность использования ингибиторов NOS в качестве медикаментозных средств заключается в жизненной необходимости NO, как части оксидантной и антиоксидантной системы и регулятора ряда сигнальных путей. Существует круговорот NO в организме [185] через его превращение в нитрат, нитрит и взаимодействие с ионом железа в гемсодержащих белках, т. е. с гемоглобином (Fe(II)-Hb) и с оксигемоглобином (HbFe(II)O) с превращением в метHb, а также с гемом растворимой гуанилат циклазы (ГЦ), что стимулирует синтез цГМФ с последующим расслаблением гладкой мускулатуры. Таким образом, NO является регулятором сердечно-сосудистой системы. Столь же важным является NO-опосредованное действие эндотелина-1, ингибирование которого ингибиторами NOS может приводить к резкому повышению давления [186].

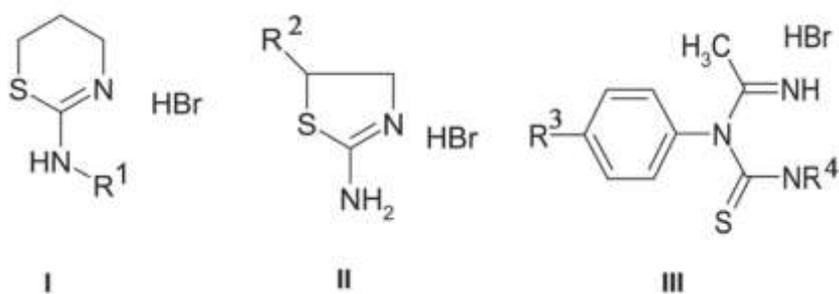
Уровень экспрессии NOS связан с сигнальными путями, опосредованными G-белками (рис.16). CREB (транскрипционный фактор типа лейциновая молния, который регулирует гены, ответственные за пролиферацию и дифференциацию) [187], являясь существенным компонентом этого пути, гиперэкспрессируется у онкопациентов, в частности, с острым миелоидным лейкозом, и это связывают с нарушением баланса NO из-за гиперфункции iNOS [188].

В литературе обсуждается не только применение ингибиторов NOS, но и возможности доноров NO (или, как вариант, активаторов NOS) в качестве цитотоксических агентов таргетного поражения раковых клеток [189]. Однако в этом случае на первый план выходит значение величины терапевтического индекса, который для ингибиторов NOS, как правило, сравнительно невысок, а активаторы NOS имеют высокую токсичность. Поэтому

они могут рассматриваться в качестве одного из компонентов комбинированной терапии. Следует учитывать, что многие ингибиторы iNOS являются радиопротекторами, поскольку часто выступают, как антиоксиданты [190]. С другой стороны, NO легко взаимодействует с SH-содержащими белками и ферментами, понижая уровень эндогенного сульфгидрила, способного бороться с АФК. Такое разнообразие и двойственность свойств NOS-ингибиторов дает возможность для создания большого разнообразия комбинированных препаратов.

В работе [191] рассмотрены характеристики исследования *in vitro* на лейкемических клеточных линиях ряда ингибиторов и активаторов NOS, относящихся к производным гидробромидов 2-амино-тиазина (I), 2-амино-2-тиазолина (II) и тиомочевины (III). Характеристики некоторых вызывающих интерес веществ из этих рядов приведены в табл. 2. Исследования показали, что ингибиторы iNOS особенно успешны против острого В-лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), а некоторые из них показали достаточно хороший терапевтический индекс против острого Т-лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ, клеточные линии MOLT-4 и *Jurkat*). При этом сила ингибиторов NOS практически не оказывает влияния на клеточную линию HL-60 (за исключением активатора NOS).

2-Амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин является родоначальником целого ряда современных ингибиторов NOS. Он в 1.5 раза менее токсичен, чем его родственник — 2-амино-2-тиазолин [190].



При переходе соединений от активаторной NOS-активности к ингибиторной в стороны увеличения последней наблюдался барьер (в районе 85-89% ингибирования) изменения в величине выживаемости (LC<sub>50</sub>), где происходит резкая триггерная смена механизма воздействия вещества как на здоровые, так и на лейкемические (В-ОЛЛ) клетки. Однако если для здоровых клеток при дальнейшем увеличении ингибирования изменений величины выживания не происходит (на новом более высоком уровне), то в случае лейкемических клеток величина LC<sub>50</sub> практически сразу (в районе ~ 90% ингибирования) возвращается на добарьерный уровень [191]. Именно в этом районе терапевтический индекс максимален.

Следует отметить интересный факт, что в случае радиосенсибилизаторов — ингибиторов NOS, в отличие от радиопротекторов-ингибиторов, этой закономерности не наблюдалось. Таким образом, имеется зависимость выживаемости не только от NOS-ингибиторной активности, но и от того, является ли использованный ингибитор радиопротектором, т. е. от его антиоксидантной активности, хотя этот вывод требует подтверждения на более широкой выборке соединений с известными значениями ФИД.

**Таблица 2.** Зависимость выживания клеток ( $LC_{50}$ ) в зависимости от ингибиторной активности вводимых соединений по отношению к NOS (*in vitro* и *in vivo*).

№	Соединение	Ингибиторная активность, % [164]		$LC_{50}$ , мкмоль/мл [191] для линий клеток				ФИД**
		<i>In vitro</i> (iNOS)	<i>In vivo</i> (остаточный NO, все изоформы)	ЗД*	В-ОЛЛ	K-562	MOLT-4	
1	III ( $R^3 = iC_3H_7$ , $R^4 = C_5H_{10}$ )	слабый активатор	активатор, $170 \pm 10$	$0.5 \pm 0.2$	$0.05 \pm 0.02$	$0.14 \pm 0.05$	$0.10 \pm 0.03$	-
2	I ( $R^1 = H$ )	$66 \pm 6$	$3 \pm 1$	$13 \pm 3$	$4.3 \pm 0.5$	$15.5 \pm 5.5$	$2.8 \pm 0.2$	1.3 [192]
3	I ( $R^1 = COC_6H_5$ )	$92 \pm 9$	$3 \pm 1$	$10.6 \pm 2.3$	$0.9 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.4$	1.5 [191]
4	II ( $R^2 = CH_3$ )	$90 \pm 5$	$5 \pm 2$	$15 \pm 3$	$1.9 \pm 0.5$	$2.2 \pm 0.7$	$2.0 \pm 0.5$	1.3 [192]

\* ЗД – лимфоциты здоровых доноров, \*\* ФИД – фактор изменения дозы.

### Выводы из литературного обзора

1. Из представленной литературы следует, что ингибиторы и активаторы NO-синтазы, особенно, iNOS, представляют интересный материал для исследования антиопухолевого активности и создания препаратов на их основе. Представители этого класса соединений имеют не самые высокие значения терапевтического индекса и могут быть ограничены в применении из-за жизненно важного значения в организме NO, однако они представляют безусловный интерес в качестве дополнительного фактора в комбинированных препаратах.
2. Радионуклиды меди представляют большой интерес не только для диагностики, но и для терапевтического воздействия на раковые клетки, при этом важное значение могут приобретать препараты с носителем из-за значительного влияния самой меди на метаболизм.
3. Современный тренд в использовании радиофармпрепаратов заключается в попытке сочетания нескольких факторов воздействия на раковые клетки, что, в частности, предполагает одновременное воздействие радионуклида и антиопухолевого препарата.
4. Гидроксипатит и карбоксиметилцеллюлоза представляют биосовместимые, легкодоступные, дешевые и удобные для использования носители медицинских препаратов и могут служить носителями для сочетанного воздействия биологически-активных препаратов и радионуклидов на раковые клетки.

### 3. Экспериментальная часть

#### 3.1. Синтез, модификация и исследование свойств ГАП и ГАП-Сu

##### 3.1.1. Синтез разных модификаций ГАП

Синтез осуществили с помощью двух методик: а) методом осаждения [116] и б) ферментативным методом с использованием щелочной фосфатазы (активность 23 ед. · мг<sup>-1</sup>, «Sigma», США) [114].

##### 3.1.1.1 ГАП для адсорбционных экспериментов

а) **Получение ГАП<sub>0</sub>**. Карбонат кальция («ч», «Лабтех», Россия) прокалили в муфельной печи (МИМП, Россия) при температуре 1100 °С в течение 3 ч до постоянной массы

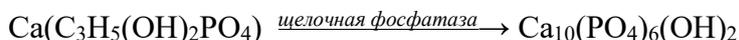


Полноту протекания реакции разложения контролировали гравиметрически на весах (Shimadzu AX200, Япония), итоговый выход оксида кальция составил 98.5%. Полученный сухой порошок вносили в реактор с дистиллированной водой, где при непрерывном интенсивном перемешивании нейтрализовали 30%-м раствором ортофосфорной кислоты («х.ч.», «Лабтех», Россия). Количество реагентов рассчитывали таким образом, чтобы мольное соотношение Са/Р было равно 1.67, то есть соответствовало стехиометрии целевого соединения:



Полученное вещество представляет собой суспензию молочно-белого цвета, где массовая доля сухого компонента составляет 5.2–5.7%.

б) **Получение ГАП<sub>Е</sub>**. ГАП<sub>Е</sub> был получен в лаборатории гетерогенных процессов кафедры радиохимии с участием с. н. с. Голина А. В. и доц. Северина А. В. Для этого исходный реагент – глицерофосфат кальция – подвергался действию фермента щелочной фосфатазы (ЩФ) (удельная активность 23 ед. · мг<sup>-1</sup>) в течение 1-7 суток. При этом происходила реакция с изменением рН:



Полноту протекания синтеза контролировали спектрофотометрически на приборе (SHIMADZU UV-1280, Япония) по изменению концентрации свободных ионов кальция, предварительно связывая их с *o*-крезолфталеинкомплексом («АГАТ-МЕД», Россия) для получения ярко-красного комплекса (пик поглощения при  $\lambda = 720$  нм). Удельную поверхность образцов определяли методом тепловой сорбции-десорбции азота на порометре («Micrometrics», США). При  $c(\text{ЩФ}) = 0.1$  мкг/мл она составляла 300 м<sup>2</sup>/г [114]) ГАП<sub>Е</sub> выпадал в форме белого осадка, который промывали и высушивали.

##### 3.1.1.2. ГАП для сокристаллизационного введения ионов металлов (по методу [193]).

а) Введение ионов меди проводили на разных стадиях кристаллизации ГАП.

ГАП-Cu<sub>1</sub>, ГАП-Cu<sub>2</sub> и ГАП-Cu<sub>3</sub> получены сокристаллизационным методом на различных этапах формирования ГАП<sub>0</sub>, с содержанием меди 4.36; 5.15 и 4.6 масс.% и с соотношением Cu/Ca = 1 : 10.

### 3.1.1.3. Термическая обработка сокристаллизационно полученных образцов

Часть полученных методом 2 порошков подвергали термической обработке в течение 3 ч при 900 °С с образованием образцов ГАП-Cu<sub>T</sub>.

### 3.1.2. Сорбция и десорбция ионов меди на ГАП

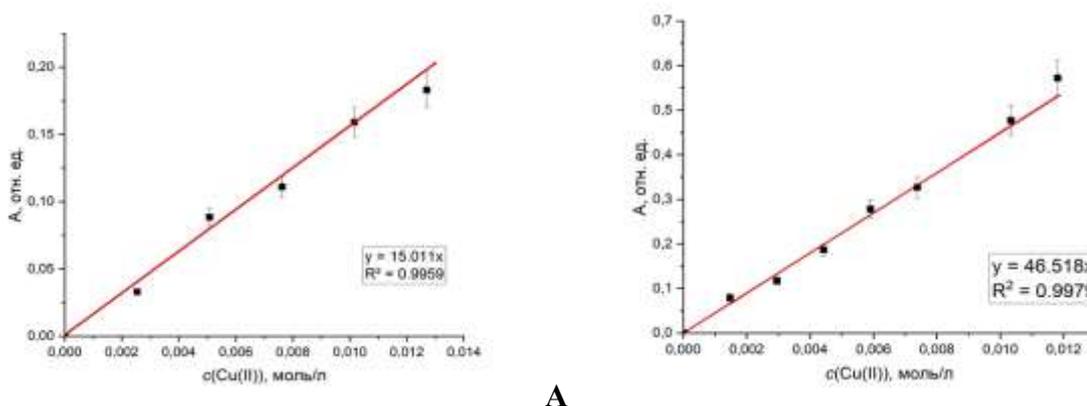
#### 3.1.2.1. Определение концентрации меди

Определение меди проводили спектрофотометрически. Для этого в пять мерных колб объёмом 50 мл добавили соответственно по 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 мл раствора хлорида меди(II) с концентрацией 0.034 моль·л и избыток аммиака. Доводили дистиллированной водой до метки и тщательно перемешали. В результате получили ряд ярко-синих растворов, цвет которых обусловлен протеканием реакции



Пик поглощения этого комплекса наблюдается при  $\lambda = 590$  нм. Калибровочная кривая с высокой степенью корреляции приведена на **рис. 17**.

Для измерений оптического поглощения использовали спектрофотометр SHIMADZU UV-1280 (Япония) в диапазоне длин волн 190-650 нм. Базовую линию измеряли в той среде, в которой находилось анализируемое вещество.



**Рис. 17.** Калибровочная прямая для определения концентрации ионов меди(II) в диапазоне 40-200 мкг мл<sup>-1</sup> ( $1.58 \cdot 10^{-6} - 7.93 \cdot 10^{-6}$  моль·л<sup>-1</sup>, (А) и  $5.9 \cdot 10^{-4} - 1.2 \cdot 10^{-2}$  моль·л<sup>-1</sup> (В))

#### 3.1.2.2. Кинетика сорбции на ГАП<sub>0</sub>

В 10 флаконов объёмом 10 мл внесли по 7 мл раствора Cu(II) концентрацией 0.034 моль·л<sup>-1</sup> и 3 мл водной суспензии ГАП<sub>0</sub>. Полученную смесь отправили перемешиваться на шейкере («Elmi» Sky Line, Латвия) в течение 1; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 240; 600; 1200 мин. По

истечению этого времени каждый флакон снимали с шейкера, центрифугировали при 6000g на центрифуге («MLW» Т 51.1, Германия), добиваясь разделения фаз. Маточный раствор отбирали, добавляли избыток аммиака для получения ярко окрашенного комплекса и определяли концентрацию меди.

### **3.1.2.3. Кинетика сорбции на ГАП<sub>E</sub>**

Эксперимент проводили аналогично сорбции на ГАП<sub>0</sub>. Использовали 10 флаконов объемом 1.5 мл, в которые добавляли 15 мг сухого ГАП<sub>E</sub> и 1 мл Cu(II) концентрацией 0.034 моль·л<sup>-1</sup>. Далее по методике 3.1.2.2.

### **3.1.2.4. Изотерма сорбции на ГАП<sub>0</sub>**

В 13 пробирок объемом 10 мл добавили 1; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5; 5; 6; 7 мл раствора меди(II) концентрацией 0.034 моль·л<sup>-1</sup> и 5; 6; 7 мл раствора меди(II) с концентрацией 0.072 моль·л<sup>-1</sup>, по 3 мл водной суспензии ГАП<sub>0</sub>. Все смеси довели до 30 мл и перемешивали в течение 24 ч. После этого концентрацию меди в маточном растворе определяли по методике, описанной в 3.1.2.1.

### **3.1.2.5. Изотерма сорбции на ГАП<sub>E</sub>**

В 11 пробирок добавили по 15 мг сухого ГАП<sub>E</sub>, разные объемы раствора меди с концентрацией 0.034 моль·л<sup>-1</sup> – 0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000 мкл – довели все растворы дистиллированной водой до одинакового объема 1 мл и оставили встряхиваться на шейкере в течение 24 часов. После этого определяли концентрацию меди в маточном растворе.

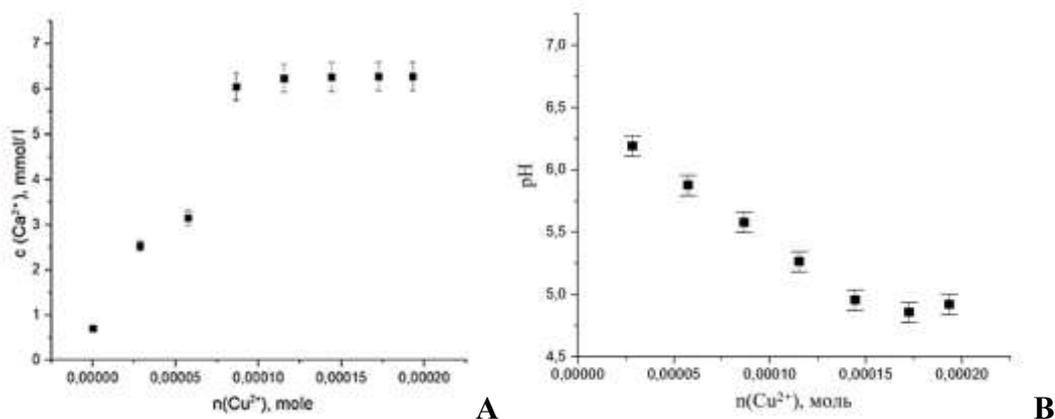
### **3.1.2.6. Десорбция меди на ГАП<sub>0</sub>**

В пробирку объемом 1.5 мл добавили 30 мл суспензии ГАП<sub>0</sub> и 970 мл водного раствора, содержащего 12.3 кБк изотопа <sup>67</sup>Cu. Смесь встряхивали на шейкере в течение часа до полной адсорбции ионов меди. Затем пробирку отцентрифугировали при 15000g и разделили фазы, слив маточный раствор. К осадку ГАП<sub>0</sub> добавили 1 мл изотонического раствора и оставили встряхиваться шейкере. После прохождения определенного времени – 1.5, 24 ч – пробирку центрифугировали, отбирали водную фазу, а к осадку добавляли 1 мл изотонического раствора и оставляли встряхиваться. У отобранного водного раствора определяли оставшуюся радиоактивность с помощью гамма-спектрометра («Canberra» GC 3020, США).

### **3.1.2.7. Определение выхода ионов кальция в процессе сорбции меди на ГАП<sub>0</sub>**

В 8 флаконов объемом 10 мл добавили по 3 мл суспензии ГАП<sub>0</sub> и разные объемы раствора меди с концентрацией 0.034 моль·л<sup>-1</sup> – 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 мл. Довели дистиллированной водой объемы до 10 мл. После этого их поставили встряхиваться в течение 24 часов на шейкере («Elmi» Sky Line, Латвия) до полной адсорбции меди. Затем

флаконы центрифугировали при 6000g и отобрали жидкую фазу для дальнейших исследований. У полученных образцов измерили pH и добавили *o*-крезолфталеинкомплексон для получения ярко-красного комплекса. Концентрация кальция в растворе была определена спектрофотометрически в соответствии с референтными данными, предоставленными производителем комплексона.



**Рис. 18.** Зависимость концентрации ионов кальция в надосадочном растворе (А) и уменьшение pH среды (В) в зависимости от количества вещества меди, осажденной на ГАП<sub>0</sub> [194]

По мере сорбции на поверхности ГАП<sub>0</sub> ионов меди в растворе наблюдалось увеличение концентрации ионов кальция, выходящее на плато одновременно с максимальным наполнением носителя (**рис. 18А**) и уменьшением pH среды (**рис. 18В**)

### 3.1.2.8. Характеристика физико-химических свойств образцов

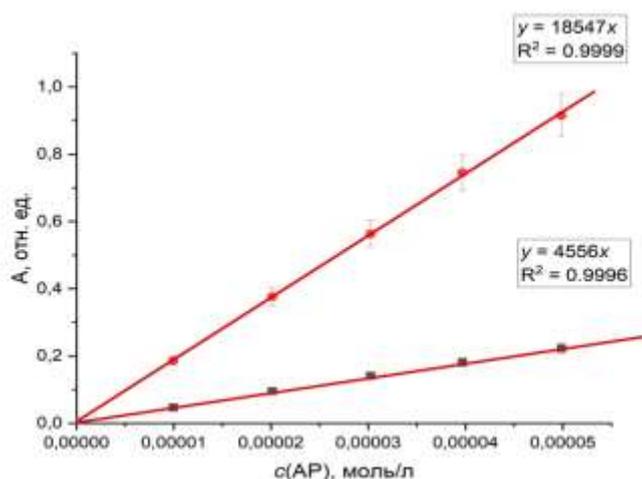
На образцы ГАП<sub>0</sub> и ГАП<sub>Е</sub> предварительно осадил ионы меди до максимальной адсорбции монослоя по методике, описанной выше. Описали их морфологию и текстуру высушенных и осажденных на подложку образцов с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ, «JEM-1011В», Япония; разрешение 0.3 нм) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, «CamScan», США). Часть образцов исследовали методом трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения на микроскопе Jeol JEM2100F с возможностью локального рентгенодисперсного анализа. Фазовый состав анализировали методом рентгенофазового анализа (РФА) на автоматизированном рентгеновском дифрактометре («ДРОН-3», Россия; сфокусирован по Брэггу—Бретано, с графитовым монохроматором на дифрагированном пучке, управляется с помощью компьютерной программы EXPRESS). Определяли удельную поверхность методом тепловой сорбции-десорбции азота на порометре («Micrometrics», США). Функцию распределения кристаллов по размерам получали с помощью компьютерной программы ImagePro Plus.

Содержание ионов  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  определяли методом ICP-AES (атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой) на приборе Optima 2100DV, Perkin Elmer, США.

### 3.1.3. Сорбция лигандов и комплексов на ГАП

#### 3.1.3.1. Калибровочные графики для определения концентрации 2-аминопиримидина (AP)

Перед построением калибровочного графика сняли оптический спектр водного раствора вещества концентрацией  $3 \cdot 10^{-6}$  моль·л<sup>-1</sup> в диапазоне 190-450 нм для определения расположения пиков и рабочей концентрации. Определили, что максимумы оптического поглощения соединения приходятся на пики 225 и 290 нм. После этого во флаконы объемом 10 мл добавили 1; 2; 3; 4; 5 мл водного раствора AP с концентрацией  $1 \cdot 10^{-5}$  моль·л<sup>-1</sup> и довели объем дистиллированной водой до одинакового значения 10 мл. У полученных смесей измерили оптическое поглощение при  $\lambda = 225$  и 290 нм, получив два калибровочных графика (рис. 19).



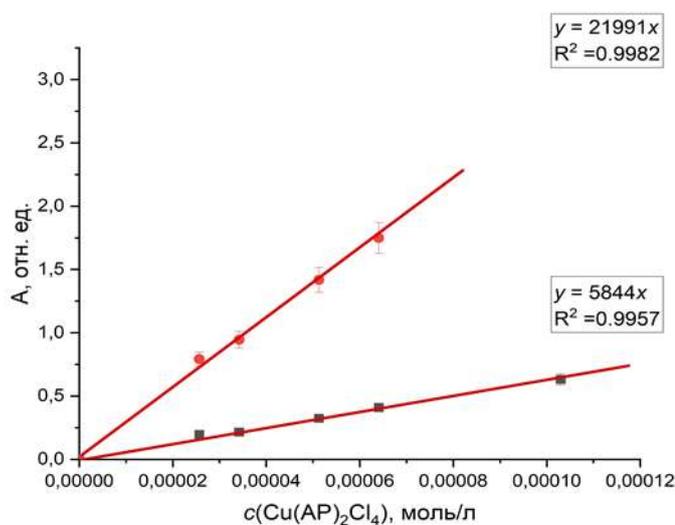
**Рис. 19.** Калибровочные графики для определения концентрации AP в водной среде при  $\lambda = 225$  нм (красный) и 290 нм (черный) в диапазоне концентраций  $1,0 \cdot 10^{-5} - 5,0 \cdot 10^{-6}$  моль·л<sup>-1</sup>

#### 3.1.3.2. Калибровочные графики для определения концентрации $Cu(AP)_2Cl_4$

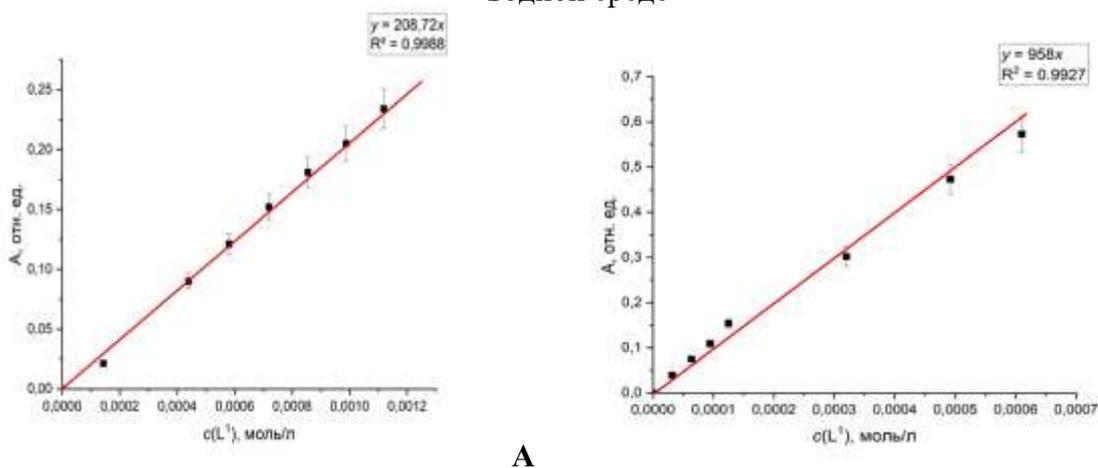
В 5 пробирок добавили в него 0,4; 0,6; 1; 1,6; 2 мл раствора комплекса с концентрацией  $1,0 \cdot 10^{-4}$  моль·л<sup>-1</sup> и разбавили дистиллированной водой до одинакового объема 2 мл. Оптический спектр вещества в диапазоне 190-400 нм практически совпал со спектром водного раствора L<sup>1</sup>. Для пиков 225 и 290 нм получены калибровочные графики (рис. 20).

### 3.1.3.3. Калибровочные графики для определения концентрации $L^1$

(Лиганд предоставлен к. х. н. Трофимовой Т. П.). Сначала сняли оптический спектр раствора в диапазоне 190-340 нм. Поскольку это вещество ограничено растворимо в воде, спектры для растворов одинаковой концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  моль·л<sup>-1</sup> получили так же в водно-этанольной смеси (1 : 1) и в 96% этаноле. Поскольку оптический спектр, а также растворимость соединения в водно-этанольной (1 : 1) среде практически не отличалась от этих характеристик в 96% этаноле, все дальнейшие эксперименты проводились только в водной либо водно-этанольной средах.



**Рис. 20.** Калибровочные графики для определения концентрации комплекса  $\text{Cu}(\text{AP})_2\text{Cl}_4$  в водной среде



**Рис. 21.** Калибровочные графики для определения концентрации  $L^1$  в водной (А) и водно-этанольной (1 : 1) средах в диапазоне концентраций 0,5 – 5 мкг/мл ( $1 \cdot 10^{-5}$  –  $5 \cdot 10^{-6}$  моль·л<sup>-1</sup>)

Для пика 280 нм были получены калибровочные графики для этих двух сред. В 7 пробирок добавили 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 мкл раствора  $L^1$  с концентрацией 0,5 мг·мл<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> и довели дистиллированной водой либо водно-этанольной (1 : 1) смесью до объема 2 мл и провели ялектрофотометрию. Графики представлены на **рис. 21 (А и В)**, соответственно.

#### **3.1.3.4. Изучение сорбции AP на ГАП<sub>0</sub>**

В 3 пробирки добавили по 220 мкл суспензии ГАП<sub>0</sub> и 0; 1; 1 мл раствора AP с концентрацией  $1 \cdot 10^{-5}$  моль·л<sup>-1</sup> и поставили встряхиваться на шейкере («Heidolph» REAX top, Германия) в течение 15 и 60 мин (добавив образец, не содержащий вещество), затем отцентрифугировали при 12000 g, разделив фазы. Маточный раствор разбавили в 40 раз дистиллированной водой, чтобы попасть в диапазон концентраций, определяемых по калибровочному графику.

#### **3.1.3.5. Кинетика сорбции Cu(AP)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> (1) на ГАП<sub>0</sub>**

В 7 пробирок добавили по 77 мкл суспензии ГАП<sub>0</sub> и 1 мл раствора комплекса концентрацией  $1 \cdot 10^{-4}$  моль·л<sup>-1</sup>. Пробирки встряхивали на шейкере в течение заданного интервала времени: 5; 15; 30; 60 и 120 мин. Дальнейшее определение концентрации было аналогично методике, описанной в предыдущем абзаце. Далее, в 2 пробирки добавили по 3 мл ГАП<sub>0</sub> и по 7 мл раствора комплекса концентрацией  $1 \cdot 10^{-4}$  моль·л<sup>-1</sup>. Пробирки встряхивали на шейкере в течение часа, потом центрифугировали при 6000g. Отделившуюся водную фазу смешали с избытком аммиака для определения концентрации меди по методике, описанной выше.

#### **3.1.3.6. Сокристаллизационное введение L<sup>1</sup> в ГАП<sub>0</sub>**

Синтез ГАП<sub>0</sub> производили по методике, описанной выше, с тем отличием, что в реакционную смесь, помимо ортофосфорной кислоты и сухого порошка CaO, добавили лиганд в концентрации  $10^{-4}$  моль·л<sup>-1</sup>. Изменение концентрации L<sup>1</sup> при добавлении и в конце синтеза контролировали спектрофотометрически, при этом разбавляя образец в 10 раз. Отбиралось 2 мл реакционной смеси, которую центрифугировали при 12000g для отделения образующейся взвеси.

#### **3.1.3.7. Сокристаллизационное введение AP в ГАП<sub>0</sub>**

Синтез ГАП<sub>0</sub> производили по методике, описанной в [116], с тем отличием, что в реакционную смесь, помимо ортофосфорной кислоты и сухого порошка CaO, добавили лиганд в концентрации  $10^{-4}$  моль·л<sup>-1</sup>. Изменение концентрации AP при добавлении и в конце синтеза контролировали спектрофотометрически, разбавляя анализируемый образец в 10 раз. При этом отбиралось 2 мл реакционной смеси, которую центрифугировали («Elmi» SN 50N, Латвия) при 12000g для отделения образующейся взвеси ГАП<sub>0</sub>.

#### **3.1.3.8. Изучение сорбции L<sup>1</sup> на ГАП<sub>0</sub>**

Приготовили водно-этанольные (1 : 1) растворы ГАП<sub>0</sub> с массовой долей сухого вещества 2.25% и L<sup>1</sup> с концентрацией  $6.4 \cdot 10^{-3}$  моль·л<sup>-1</sup>. В 7 пробирок добавили по 144 мкл

суспензии ГАП<sub>0</sub> и по 0; 7.5; 15; 37; 73; 146; 730 мкл раствора L<sup>1</sup>. Растворы доводили до объема 1 мл и держали в течение суток на шейкере, центрифугировали при 12000g, и в надосадочной жидкости определили по методике, описанной выше.

### **3.1.3.9. Изучение сорбции CuL<sup>1</sup>Cl<sub>2</sub> (5) на ГАП<sub>0</sub>**

Приготовили водно-этанольные (1 : 1) растворы ГАП<sub>0</sub> с массовой долей сухого вещества 2.25% и комплекс 5 с концентрацией  $8.6 \cdot 10^{-4}$  моль·л<sup>-1</sup>. В 7 пробирок добавили по 144 мкл суспензии ГАП<sub>0</sub> и по 0; 7.5; 15; 37; 73; 146; 730 мкл раствора L<sup>1</sup>. В остальном методика была аналогична предыдущей.

### **3.1.4. Изучение влияния БСА на процессы сорбции**

#### **3.1.4.1. Совместная одновременная сорбция ионов меди(II) и БСА на ГАП<sub>0</sub>. Изотерма сорбции**

В 12 пробирок добавили по 1 мл ГАП<sub>0</sub> с массовой долей сухого вещества 5.5%; затем в 6 из них добавили по 0.5 мл раствора БСА с концентрацией 3 мг·мл<sup>-1</sup>, затем – разные объемы раствора CuCl<sub>2</sub> с концентрацией ионов меди(II) 0.12 моль·л<sup>-1</sup>, 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 мл. Объем растворов довели дистиллированной водой до 2 мл. В другие 6 пробирок добавили по 0.5 мл раствора CuCl<sub>2</sub> с той же концентрацией и разные объемы раствора БСА (3 мг·мл<sup>-1</sup>) – 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 мл – и воду до объема 2 мл. Все 12 пробирок оставили встряхиваться на шейкере в течение 24 часов. Далее фазы разделяли центрифугированием, отбирали 1 мл надосадочной жидкости, разбавляли ее в 5 раз концентрированным раствором аммиака и измерили оптическое поглощение при  $\lambda = 590$  нм.

#### **3.1.4.2. Совместная последовательная сорбция ионов меди(II) и БСА на ГАП<sub>0</sub>. Изотерма сорбции**

В 6 пробирок добавили по 1 мл ГАП<sub>0</sub>; затем по 1 мл раствору БСА концентрацией 3 мг·мл<sup>-1</sup>. Их перемешивали на шейкере в течение 24 часов до полной адсорбции вещества. Затем взвеси центрифугировали при 12000g, добавили по 1.5 мл дистиллированной воды для промывания, ресуспендировали и снова оставили на шейкере в течение часа. Далее фазы разделяли центрифугированием. К пробиркам, где был адсорбирован БСА, добавили растворы меди(II) с концентрацией 0.12 моль л<sup>-1</sup> объемом 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1 мл. Все пробирки еще раз встряхивали 24 часа, затем отделяли жидкую фазу, разбавляли ее в 5 раз концентрированным раствором аммиака и измерили оптическое поглощение при  $\lambda = 590$  нм.

#### **3.1.4.3. Совместная одновременная сорбция L<sup>1</sup> и БСА на ГАП<sub>0</sub>**

Приготовили водную смесь объёмом 5 мл, содержащую 3 мг·мл<sup>-1</sup> БСА и 0.01 моль·л<sup>-1</sup> L<sup>1</sup>, и выдержали ее в течение трех суток при 4 °С для установления равновесия. Далее проводили спектрофотометрический контроль. Затем в 6 пробирок добавили по 1 мл ГАП<sub>0</sub>

и по 0; 0.05; 0.1; 0.3; 0.5 мл полученного раствора и довели дистиллированной водой до объема 2 мл. Пробирки оставили встряхиваться в течение 1 часа, затем фазы разделили центрифугированием и отобрали по 1 мл маточного раствора, который разбавили вдвое и определили оптическое поглощение в области  $\lambda = 190\text{-}340$  нм.

#### 3.1.4.4. Совместная последовательная сорбция $L^1$ и БСА на ГАП<sub>0</sub>

В 8.5 мл суспензии ГАП<sub>0</sub> растворили 2.1 мг БСА, после чего оставляли раствор встряхиваться в течение 1 часа до полной адсорбции белка и фазы разделили центрифугированием. Жидкость удалили, добавляли 10 мл дистиллированной воды для промывания и повторяли действия. После удаления жидкости объем суспензии вновь довели до 8.5 мл для сохранения величины массовой доли сухого вещества. В 5 пробирок добавили по 750 мкл полученной суспензии и по 750 мкл раствора  $L^1$  разной концентрации: 0.05; 0.5; 5; 50 мкг мл<sup>-1</sup>. Их встряхивали в течение 24 ч, центрифугировали для отделения осадка и определяли содержание  $L^1$  и БСА спектрофотометрически.

#### 3.1.4.5. Изучение морфологии кристаллов

Морфологию образующихся нанокристаллов изучали методом ПЭМ (электронный микроскоп «Jeol JEM\_1011B», Япония, разрешение 0.3 нм). Образцы готовили путем нанесения на специальную медную сетку с формваровой пленкой капли суспензии изучаемых кристаллов, разбавленной водой в соотношении 30 : 1.

### 3.2. Синтез и исследование лигандов и их комплексов с $Cu^{2+}$ и с $^{67}Cu^{2+}$

#### 3.2.1. Синтез комплексов

Комплекс **1** –  $Cu(AP)_2Cl_4$  синтезирован по методу [195] к. х. н. Трофимовой Т. П. и был любезно предоставлен нам для работы. Результаты элементного анализа и спектры ЯМР  $^1H$  согласуются с данными литературы. Остальные комплексы получены по методикам, ранее разработанным к. х. н., с. н. с. Трофимовой Т. П. РСА выполнен в НИЛ структурной химии на Химическом факультете МГУ имени М.В.Ломоносова (с участием в. н. с., к. х. н. Тафеенко В. А.), элементный анализ выполнен в институте элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН. ЯМР  $^1H$  выполнен в ИФАВ РАН (с участием д. х. н., зав. лаб. Прошина А. Н.).

Для синтеза комплекса **2** –  $CuL^1_2$  – лиганд  $L^1H$  (0.24 г, 1.1 ммоль) растворили в смеси EtOH/PrOH (2.0 : 1.24 мл) и добавили при перемешивании порошкообразный  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.09 г, 0.5 ммоль, Sigma, США). Образовавшийся осадок отфильтровали, получив фиолетовое вещество (0.09 г, 34%). Элементный анализ: найдено (%): С, 53.02; Н, 4.63; N, 11.28. Вычислено для  $C_{22}H_{22}CuN_4O_2S_2$  (%): С, 52.62; Н, 4.42; N, 11.16. Получен кристалл и выполнен РСА (см. Приложение).

Комплекс **3** –  $\text{Cu}_2\text{L}^1_2\text{Cl}_3$ . Для его получения прозрачный фильтрат от предыдущего синтеза оставили при комнатной температуре для медленной кристаллизации. Примерно через неделю из раствора выпали хорошо ограненные темно-зеленые кристаллы. Кристаллы отфильтровали, выход 0.06 г (52%). Элементный анализ: найдено (%): С, 39.24; Н, 3.64; N, 8.29. Вычислено для  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{Cl}_3\text{Cu}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$  (%): С, 39.20; Н, 3.59; N, 8.31. Выполнен РСА (см. Приложение).

Комплекс состава **4** –  $\text{CuL}^1_2\text{Cl}_2$  – получили при добавлении раствора 0.9 г (0.5 ммоль)  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  в 1 мл 95%-го этилового спирта к раствору 0.24 г (1.1 ммоль) лиганда  $\text{L}^1$  в 20 мл 95%-го этилового спирта. Выделили 0.06 г (21%) кристаллического продукта ярко-зеленого цвета. Элементный анализ: найдено (%): С, 45.85; Н, 4.91; N, 9.70.  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{CuN}_4\text{O}_2\text{S}_2$ . Вычислено (%): С, 45.95; Н, 4.21; N, 9.74. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (200 МГц, ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м. д.): 1.9—2.3 (м, 2 Н,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.2—3.5 (м, 2 Н,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.7—4.0 (м, 2 Н,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 7.4—7.7 (м, 3 Н,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ); 7.9—8.2 (м, 2 Н,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ); 10.3—11.3 (уш. с., 1 Н, NH). Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  показывают, что лиганд в процессе синтеза и выделения комплексов не разлагается.

Комплекс состава **5** –  $\text{CuL}^1\text{Cl}_2$  – получили следующим образом: 0.14 г (0.6 ммоль) лиганда  $\text{L}^1$  растворили в 0.12 мл смеси этилового (96%) и изопропилового спиртов (2 : 1) и при перемешивании добавили 0.9 г (0.5 ммоль)  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Выпавший осадок отфильтровали. Выделили 0.12 г (67%) вещества ярко-зеленого цвета. Элементный анализ: найдено (%): С, 37.50; Н, 3.58; N, 7.89. Для  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{CuN}_2\text{OS}$  вычислено (%): С, 37.24; Н, 3.41; N, 7.90. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ : (200 МГц, ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.): 1.7—2.6 (м, 2 Н,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.2—3.6 (м, 2 Н,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.7—4.1 (м, 2 Н,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 7.3—7.6 (м, 3 Н,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ); 7.8—8.3 (м, 2 Н,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ); 10.8—11.2 (уш. с., 1 Н, NH).

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  регистрировали на приборе «Bruker CXP-200» (Германия), химические сдвиги приведены в  $\delta$ -шкале относительно  $\text{Me}_4\text{Si}$ .

### 3.2.2. Выделение радионуклидов меди. Синтез меченых комплексов меди

Цинковую мишень облучали на разрезном микротроне тормозными фотонами с  $E = 55$  МэВ (НИИЯФ им. Д. В. Скобельцына МГУ имени М. В. Ломоносова с участием Приселковой А. Б. и Бельшева С. С.), выдерживали в течение 12 ч, растворяли её в 36%-й  $\text{HCl}$  и проводили разделение методом ионообменной хроматографии на колонке с сорбентом  $\text{Cu-resin}$  (3 мл, Triskem, Франция), где при  $\text{pH} = 2.4$  происходила сорбция меди, а цинк смывался с колонки. После вымывания цинка десорбцию меди осуществляли 5 М  $\text{HCl}$ . При вымывании проводился контроль элюата с помощью гамма-спектрометрии («Canberra GC 3020, США). В качестве характеристической линии использовали  $\gamma = 185$

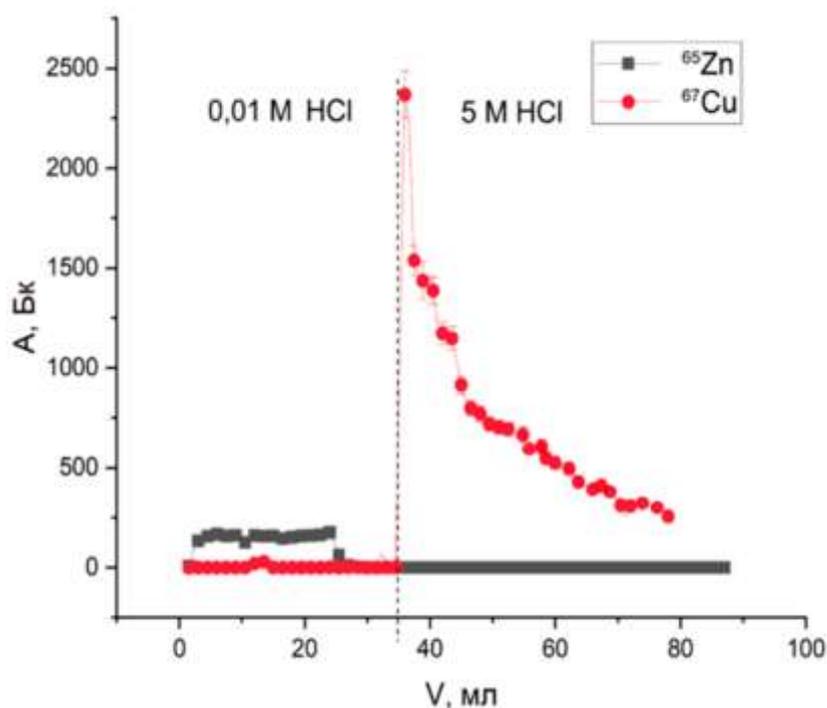
кэВ,  $\rho = 0.487$ . Кривые элюирования представлены на **рис. 22**. В **табл. 3** приведены характеристики радионуклидов, полученных при облучении.

### 3.2.2.1. Получение $^{67}\text{CuCl}_2$

После разделения изотопов элюат выпарили и вновь растворили в рассчитанном количестве разбавленной HCl.

**Таблица 3.** Характеристики радионуклидов меди.

Радионуклид	$t_{1/2}$	Основные пути образования	Порог реакции, МэВ	Выход на ЕОВ, Бк/мкА ч/(г/см <sup>2</sup> )
$^{64}\text{Cu}$	12.7 ч	$^{66}\text{Zn}(\gamma, pn)^{64}\text{Cu}$ $^{67}\text{Zn}(\gamma, p2n)^{64}\text{Cu}$ $^{68}\text{Zn}(\gamma, p3n)^{64}\text{Cu}$	16.61 17.41 27.60	$1.86 \cdot 10^6$
$^{67}\text{Cu}$	61.83 ч	$^{68}\text{Zn}(\gamma, pn)^{67}\text{Cu}$ $^{70}\text{Zn}(\gamma, p3n)^{67}\text{Cu}$	9.98 17.20	$5.26 \cdot 10^6$



**Рис. 22.** Кривые элюирования радионуклидов цинка и меди [196]

### 3.2.2.2. Синтез меченых комплексов

$^{67}\text{Cu}(\text{AP})_2\text{Cl}_4$  (**1**) синтезировали двумя методами.

а) **Синтез без носителя.** Использовали методику, описанную в [195] с применением раствора  $^{67}\text{CuCl}_2$ .

б) **Путем изотопного обмена.** Нерадиоактивный комплекс-носитель добавили в солянокислый раствор с  $^{67}\text{CuCl}_2$  и оставили перемешиваться при комнатной температуре в течение 30 и 60 мин.

$[^{67}\text{Cu}]\text{CuL}^1\text{Cl}_2$  (**5**) получали аналогично предыдущему.

Все процедуры получения комплексов контролировались ТСХ на пластинах «Silufol» (Чехия) с проявлением парами иода (в случае нерадиоактивных образцов) и измерением радиоактивности после разрезания хроматограмм – в случае радиоактивных образцов. Кроме того, использовали цифровую автордиографию с запасающими пластинами «Storage Phospor System», покрытые  $\text{BaFBr:Eu}$  (“Perkin-Elmer”) и прибор для сканирования «Cyclon Plus» (“Perkin-Elmer”).

### 3.3. Методы исследования

#### 3.3.1. Потенциометрическое титрование

Константы протонирования лигандов и константы связывания в комплексах определяли потенциометрически с помощью «Metrohm 848 Titrino Plus» (Швейцария), который оснащен 20 мл автобюреткой и комбинированным стеклянным электродом («Cole-Palmer, 60061, США»). При определении константы протонирования лиганда в качестве фонового электролита использовали раствор нитрата калия ( $1 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$  в случае водного раствора) и физиологический раствор. Для нахождения константы устойчивости комплекса **1** титрование проводили на автотитраторе со стеклянным индикаторным электродом. Для расчета использовали программу Hyperquad2013.

Рабочий объем автотитратора поддерживали при постоянной температуре  $25 \pm 0.1$  °C при помощи термостата («Cole-Palmer», Polystat Temperature Controller, США). Опыты проводили в стеклянной ячейке объемом 16 мл. Перед началом работы электрод калибровали путем титрования стандартного  $1 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$  раствора  $\text{HClO}_4$  раствором свежеприготовленного  $\text{NaOH}$  известной концентрации. Интервал pH в рабочей ячейке составил 2.5 – 10.5, и значение э. д. с. измеряли после добавления порций  $\text{NaOH}$  объемом 0.3 мл. Уточнение концентрации  $\text{NaOH}$  через определение точки эквивалентности происходило по методу Грина, т. е. через расчет значения стандартного потенциала электрода и крутихну электродной функции, для вычислений применяли программное обеспечение GLEE. Равновесие считали достигнутым, если колебания потенциала были меньше  $0.2 \text{ мВ мин}^{-1}$ . Для поддержания ионного произведения воды равным  $\text{p}K_w = 13.78$  во все калибровочные и анализируемые растворы добавляли  $\text{KNO}_3$  до концентрации  $0.1 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ .

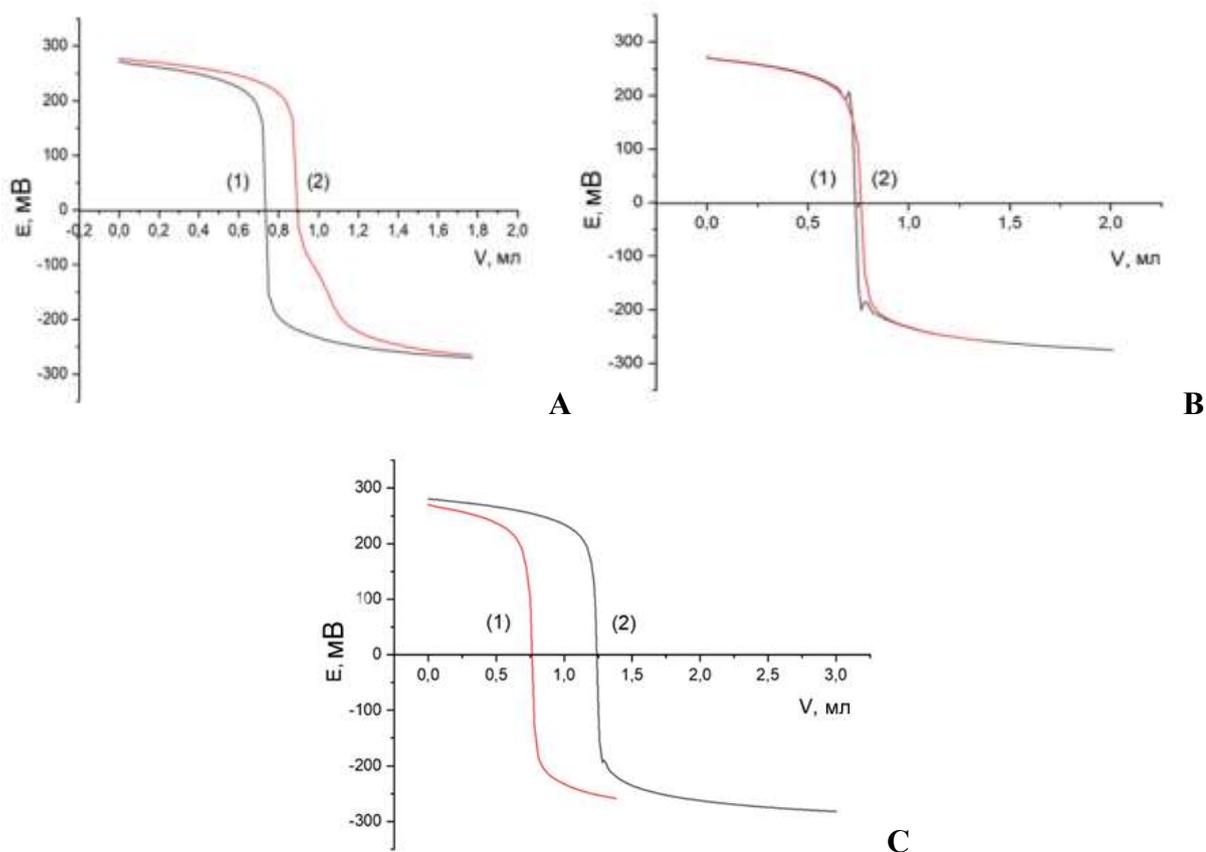
Константы протонирования определяли для  $\text{L}^2$  ( $c = 0.100 \text{ моль л}^{-1}$ ) (**рис. 23А**),  $\text{L}^1$  ( $0.1004 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ ) (**рис. 23В**) и  $\text{AP}$  ( $0.1007 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ ) (**рис. 23С**) в присутствии хлорной

кислоты с  $c = 0.625$  моль·л<sup>-1</sup>. Для титрования использовали NaOH с предварительно определенной концентрацией. Расчет константы протонирования проводили, используя э. д. с. ячейки, которая, в свою очередь, рассчитывали по формуле:

$$E = E_0 + Q \lg[H] + E_j,$$

где  $E_0$  и  $Q$  определяются по калибровочным данным для расчета с точно известным содержанием протонов и ионной силы.

Константы протонирования составляют  $\lg\beta_H = 3.4 \pm 0.3$  для AP;  $5.0 \pm 0.5$  для L<sup>1</sup>. Для L<sup>2</sup> найдена многоступенчатая константа протонирования, составляющая  $\lg\beta^1_H = 15.6 \pm 0.5$ ;  $\lg\beta^2_H = 20 \pm 1$ ;  $\lg\beta^3_H = 31 \pm 2$ .



**Рис. 23.** Потенциометрические кривые: А - HClO<sub>4</sub> (1) и L<sup>2</sup> (2); В - HClO<sub>4</sub> (1) и L<sup>1</sup> (2); С - HClO<sub>4</sub> (1) и AP (2)

Поскольку комплексы нерастворимы в воде, этот метод определения константы связывания для них не подходит.

### 3.3.2. Метод масс-спектрометрии LETDI (Laser Induced Electron Transfer Desorption/Ionization)

Выполнен в ГЕОХИ РАН (с участием к. х. н. Бородкова А. С.). Схема масс-спектрометрической установки детально описана в работах [197,198]. Времяпролетный масс-спектрометр собран по линейной схеме с длиной свободного пролета 0.65 м и ускоряющим промежутком 14 мм. В качестве источника излучения использовали лазерную

систему на основе Nd:YAG-лазера с диодной накачкой (РЛ-02.355 производства ЭЛС-94, Москва), работающего с частотой повторения 300 Гц при длительности импульса 0.37 нс и максимальной энергией в импульсе 30 мкДж. В качестве подложек эмиттеров ионов применяли кремниевые пластины, которые предварительно обрабатывали 5%-м раствором HF с последующей промывкой дистиллированной водой, после чего помещали в ионный источник.

### 3.3.3. Флуориметрическое определение констант связывания

Определение константы связывания между белком БСА и ионами меди(II), комплексом  $L^1_2CuCl_2$ ,  $L^1$  проводили на флуориметре («FluoroMax-4, HORIBA Jobin Yvon SAS, Франция) по единообразной методике.

В 7 флаконов, содержащих 3 мл  $17 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$  раствора БСА, добавили последовательно 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 мл раствора исследуемого соединения, после чего смесь доводили соответствующим растворителем до объема 10 мл, и в кювету отбирали 2 мл полученного раствора для дальнейшего флуориметрического анализа. Длина волны возбуждения флуоресценции для БСА составляет 280 нм.

Были исследованы системы: БСА– $Cu^{2+}$  (водная среда), БСА– $L^1$  (водная среда), БСА– $L^1_2CuCl_2$  (водно-этаноловая среда 1 : 1).

### 3.3.4. Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ полученных образцов проводили на автоматическом рентгеновском дифрактометре DR-01 RADIANT (излучение  $CuK\alpha$ ,  $\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$ ). Использовали детектор дифрактометра STOE Pilatus100K. Измерения проводили при комнатной температуре в угловом диапазоне  $140 < 2\theta < 800$  с разрешением 0.0220. Программное обеспечение STOE X-AREA использовалось для уточнения ячеек и обработки данных. Сбор данных и обработка изображений выполнялись с помощью X-Area 1.67 [199]. Данные интенсивности были масштабированы с помощью LANA (часть X-Area) для минимизации различий интенсивностей эквивалентных по симметрии отражений (метод мультисканирования). Неводородные атомы были уточнены с помощью анизотропной полной матричной процедуры наименьших квадратов. Молекулярные геометрические расчеты выполнялись с помощью программы SHELX [200], а молекулярная графика была подготовлена с использованием программного обеспечения DIAMOND [201]. Структуры зарегистрированы в базе данных Кембриджского центра кристаллографических данных по адресу [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif.](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif), как CCDC-2027415 - комплекс  $CuL^1_2$  и CCDC-2050373 (комплекс  $Cu_2L^1_2Cl_3$ ), и представлены в Приложении.

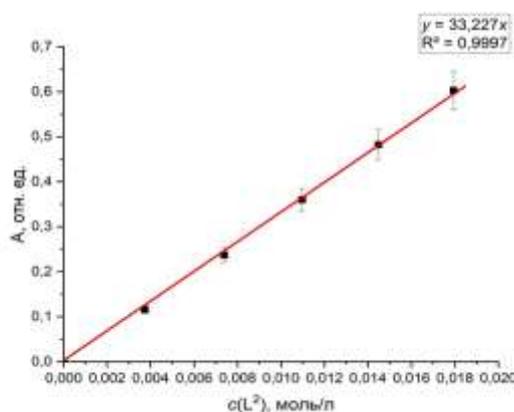
### 3.3.5. Радиационная устойчивость

Использовали  $\gamma$ -облучение на стационарной установке  $\gamma$ -400 с  $P_{\gamma} \sim 2 \text{ Гр} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Установка представляет систему из 15 источников  $^{137}\text{Cs}$  (ТУ И-150-71) в свинцовом контейнере и имеет защитный шибер с пространством для размещения образцов. Точная поглощенная доза рассчитывается по следующей формуле:

$$D = \frac{228000 \frac{\text{мРад}}{\text{мин}}}{60 \text{ с}} \cdot e^{\left( -\frac{\ln 2}{30 \text{ лет} \cdot 365,25 \text{ дн}} \cdot (t - t_0) \right)} \cdot t_{\text{облуч.}} (\text{мРад}),$$

где 228000 мРад/мин – дозиметрически измеренная мощность поглощенной дозы источника на 15.01.2012; 30 лет – округлённый период полураспада  $^{137}\text{Cs}$ ;  $(t - t_0)$  – время, прошедшее с момента калибровки источника 15.01.2012;  $t_{\text{облуч.}}$  – время, на которое образец помещается в установку.

Для определения  $L^2$  после радиолиза сначала строили калибровочный график. Для этого предварительно подготовили 50 мл физиологического раствора, в который добавили навеску  $L^2$  таким образом, чтобы концентрация лиганда составила  $0.001 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ . В 5 флаконов добавили 20; 40; 60; 80; 100 мкл полученного раствора и разбавили его физиологическим раствором до объёма 2 мл. Контроль проводили спектрофотометрически при  $\lambda = 290 \text{ нм}$ . (рис. 24).



**Рис. 24.** Калибровочная прямая для  $L^2$  в физиологическом растворе (диапазон концентраций  $0.01 - 0.05 \text{ мг мл}^{-1}$ )

Далее проводили облучение на  $\gamma$ -400. По 2 мл  $L^2$  в физиологическом растворе с  $c = 0.001 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$  поместили в 7 пробирок и поставили в источник на время 1; 5; 24 ч, 3; 4; 7 сут. После облучения содержимое пробирок разбавляли физиологическим раствором в 10 раз и осуществляли спектрофотометрический контроль. Степень разрушения определяли, как отношение концентрации вещества, не подвергавшегося облучению, по отношению к концентрации веществ из облученных растворов.

### 3.4. Методы исследования клеточного материала

(Часть работ проведена в МНИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева с участием зав. отделом д. б. н. Осиповой Е. Ю., другая часть проведена в лаборатории клеточной биологии НИИ Биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича с участием в. н. с., к. б. н. Лупатова А. Ю.)

#### 3.4.1. Проточная цитофлуориметрия

Метод основан на облучении очень узкого потока клеток лучом лазера, и дальнейшей регистрации флуоресценции и рассеянного света каждой клетки. Перед экспериментом клетки дважды промывали холодным фосфатно-солевым буфером (PBS) и доводили их концентрацию до  $1 \cdot 10^6$  клеток·мл<sup>-1</sup> в связующем буфере. Далее использовали стандартный набор: FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I («Becton Dickinson», США) и цитофлуориметр «FACScan» («Becton Dickinson», США) [202] с возбуждением флуоресценции аргоновым лазером ( $\lambda = 488$  нм). Эксперименты выполняли на нормальных лимфоцитах и клетках лейкоцитарной линии *Jurkat*. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы Statistica 5.11. Клетки предварительно обрабатываются белком Аннексином V, меченым флуоресцентным веществом флуоросцеин-5-изотиоцианатом (FITC). Этот белок имеет высокое аффинное сродство к фосфатидилсерину (фосфолипид клеточной мембраны), который находится на внутренней стороне мембраны нормальных клеток, но уже на ранних стадиях апоптоза перемещается на внешнюю сторону и оказывается доступен для Аннексина V из раствора. По флуоресцентному сигналу, который оказываются способны давать только апоптотические клетки, начиная с ранней стадии апоптоза, можно оценить количество нормальных и апоптотических клеток в образце. Пропидий иодид (PI) способен проникать только сквозь поврежденную мембрану находящихся на поздних стадиях апоптоза или мертвых клеток. Следовательно, сочетание двух флуоресцентных красителей позволяет оценить соотношение клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза. В качестве стандарта в ряде экспериментов использовали стауроспорин (позитивный контроль).

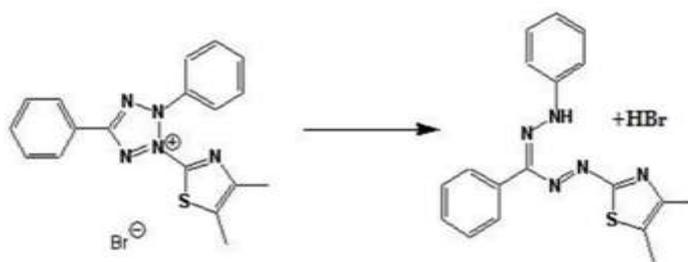
Таким образом, окрашивание клеток Аннексином-V (An-FITC), конъюгированным с флуорохромом флуоросцеином и пропидий иодидом является оптимальным методом документирования апоптоза, т.к. живые клетки не связывают An-FITC и непроницаемы для катионных красителей [203].

Гранулоциты из крови здоровых доноров получали с помощью градиентного центрифугирования на фиколе плотностью  $1.050$  г·мл<sup>-1</sup>, затем раствор, содержащий  $10$  млн клеток, доводили средой до  $1$  мл. В пробирки для цитометрии помещали по  $200$  мкл полученной суспензии гранулоцитов, добавляли  $2$  мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и клетки осаждали на центрифуге  $5$  мин при  $1000$  об·мин<sup>-1</sup> при  $18$  °C. Осадок

ресуспендировали в 200 мкл PBS и суспензию переносили поровну в 2 пробирки. В одну из них добавляли 5 мкл An-FITC и 10 мкл PI. Другая пробирка содержала неокрашенные клетки и служила в качестве негативного контроля и для выбора параметров усиления. Образцы встряхивали на вортексе и инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. После этого к пробам добавляли 400 мкл PBS и проводили анализ на цитофлуориметре с возбуждением флуоресценции при  $\lambda = 488$  нм и регистрацией эмиссии зеленого диапазона по каналу FL1 (525 нм), а красного диапазона – по каналу FL2 (585 нм). Остальную часть суспензии переносили порциями по 100 мкл в лунки 24-луночного планшета, добавляли по 100 мкл растворов препаратов и доводили стандартной средой до общего объема 1 мл. Контрольная лунка содержала 100 мкл суспензии клеток и 900 мкл среды. Планшеты инкубировали 24 ч при 37 °С во влажном инкубаторе с 5%-м содержанием CO<sub>2</sub>, клетки отмывали PBS и проводили оценку спонтанного апоптоза. Для оценки результатов использовали программу CELLQuest, оценивая следующие параметры: живые (интактные) клетки не связывают ни An-FITC, ни PI; ранние апоптотические клетки окрашивают только An-FITC, поздние апоптотические клетки окрашивают An-FITC и PI, некротические клетки окрашивают только PI.

### 3.4.2. МТТ-тест

Метод основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2H-тетразолия (МТТ) в нерастворимые кристаллы формазана пурпурно-синего цвета:



Интенсивность превращения МТТ в формазан характеризует общий уровень дегидрогеназной активности клеток, т. е. конечный эффект цитотоксичности вводимого препарата и, следовательно, может теоретически предсказывать клинический ответ [204]. Количество образующегося формазана после экстракции изопропиловым спиртом определяли спектрофотометрически с помощью прибора «Microplate Reader 550» («Bio Rad») при  $\lambda = 550$  нм. Метод подробно описан в [205,206]. Использовали нормальные лимфоциты (моноклеары) и клеточные лейкемические линии. Количество экспериментов для каждой линии составляло 4-5. Результаты обрабатывали с применением U-критерия Манна—Уитни ( $p < 0.05$ ).

### 3.4.2.1. Выделение мононуклеарных клеток

Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови выполняли со строгим соблюдением правил стерильности в стерильной камере с ламинарным потоком воздуха «Clean Air» («Flow Lab», Нидерланды). Кровь разводили стандартной средой RPMI («Roswell Park Memorial Institute medium»), содержащей PSF (пенициллин, стрептомицин, фунгизон) в соотношении 1 : 1, наслаивали на фиколл (Lymphocyte separation medium,  $\rho = 1.077 \text{ г}\cdot\text{мл}^{-1}$ ) и центрифугировали при  $1800 \text{ об}\cdot\text{мин}^{-1}$  при  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ . Полученное интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, собирали в стерильную пробирку.

Собранную суспензию разбавляли той же стандартной средой до объема 10 мл и однократно отмывали с повторным центрифугированием. Полученный осадок клеток ресуспендировали средой и количество клеток подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике.

Мононуклеарные клетки разбавляли до концентрации  $2 \cdot 10^6 \text{ клеток}\cdot\text{мл}^{-1}$  стандартной средой и суспензию клеток порциями по 80 мкл равномерно распределяли по лункам 96-луночного планшета, которые содержали по 20 мкл тестируемого препарата (с дублированием), а также по ряду лунок, которые содержали по 20 мкл среды (контроль жизнеспособности). Концентрации препаратов подбирали варьированием в нескольких экспериментах, начиная с 100, 20, 4, 0.8, 0.16 и  $0.032 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ .

### 3.4.2.2. Используемые в работе типы лейкоцитарных клеток

Клетки В-ОЛЛ (острый В-лимфобластный лейкоз), Т-ОЛЛ (острый Т-лимфобластный лейкоз) и ОМЛ (острый миелобластный лейкоз) были любезно предоставлены для работы МНИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Работы с этими клетками, а также с клеточными линиями *MOLT-4* и *HL-60* были выполнены там же. Кроме того, в работе использовались клеточные линии *Jurkat* и *K-562*, работы с которыми проводили в НИИ Биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича. Эксперименты с каждой клеточной линией проводили 4-5 раз. Клетки *Jurkat* и *K-562* культивировали в среде RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Gibco (Thermo Scientific)», США) и L-глутамин («БиоЛот», Россия) до концентрации  $0.3 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Культуральные флаконы содержали в инкубаторе при постоянной температуре  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . Разбавление клеток производили каждые 3-4 дня.

Планшеты инкубировали 4 суток при  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  во влажном инкубаторе с 5%-м содержанием  $\text{CO}_2$ . После этого в каждую лунку добавляли по 10 мкл МТТ, разведенного 0.9%-м раствором NaCl до концентрации  $5 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , после чего инкубировали повторно 6 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли при тщательном перемешивании в 100

мкл изопропилового спирта, содержащего 2 моль-л<sup>-1</sup> HCl и измеряли оптическое поглощение при  $\lambda = 550$  нм. Выживаемость клеток (ВК) определяли по формуле:

$$BK = (A_{\text{exp}} - A_{bc}) / (A_{\text{contr}} - A_{bc}),$$

где  $A_{\text{exp}}$ ,  $A_{\text{contr}}$  и  $A_{bc}$  – поглощение в экспериментальных контрольных (только среда и клетки) и бланк-контрольных (только среда) лунках, соответственно. Результаты обрабатывали с применением U-критерия Манна—Уитни ( $p < 0.05$ ). Вычисления LD<sub>50</sub> проводили по медиане и t-критерию Стьюдента.

### 3.5. Получение и исследование двойных и тройных микрогелей на основе карбоксиметилцеллюлозы

(Работы с исследованием микрогелей проводили на кафедре высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ с участием к. х. н. Спиридонова В. В.)

В табл. 4. приведены составы полученных микрогелей и их обозначение.

**Таблица 4.** Нумерация образцов полимерных микро/гидрогелей на основе КМЦ.

Обозначение соединения	Включенные компоненты	Мольное соотношение компонентов*
<b>I</b>	Cu	[Cu] : [КМЦ] = 1 : 15
<b>II</b>	Cu	[Cu] : [КМЦ] = 1 : 10
<b>III</b>	Cu	[Cu] : [КМЦ] = 1 : 7.5
<b>IV</b>	Cu, AP	[Cu] : [AP] : [КМЦ] = 1 : 7.5 : 15
<b>V</b>	Cu, AP	[Cu] : [AP] : [КМЦ] = 1 : 5 : 10
<b>VI</b>	Cu, AP	[Cu] : [AP] : [КМЦ] = 1 : 3.5 : 7.5
<b>VII</b>	Cu, L <sup>1</sup>	[Cu] : [L <sup>1</sup> ] : [КМЦ] = 1 : 7.5 : 15
<b>VIII</b>	Cu, L <sup>1</sup>	[Cu] : [L <sup>1</sup> ] : [КМЦ] = 1 : 5 : 10
<b>IX</b>	Cu, L <sup>1</sup>	[Cu] : [L <sup>1</sup> ] : [КМЦ] = 1 : 3.5 : 7.5
<b>X</b>	L <sup>2</sup>	[L <sup>2</sup> ] : [КМЦ] = 1 : 4
<b>XI</b>	Cu, L <sup>2</sup>	[Cu] : [L <sup>2</sup> ] : [КМЦ] = 1 : 4 : 15
<b>XII</b>	AP	[AP] : [КМЦ] = 1 : 2
<b>XIII</b>	L <sup>1</sup>	[L <sup>1</sup> ] : [КМЦ] = 1 : 2

\* под [КМЦ] имеется ввиду мономерное звено микрогеля

### 3.5.1. Двойные микрогели

#### 3.5.1.1. Получение двойных микрогелей КМЦ–Cu<sup>2+</sup> (I–III)

К 5 мл водного раствора, содержащего от 3.7 до 7.4 мг CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (“Sigma-Aldrich”, США), добавляли 50 мл 0.1% водного раствора КМЦ с молекулярной массой 90 кДа и степенью замещения 0.7 (Sigma-Aldrich, США) при интенсивном перемешивании. Молярное соотношение [единица мономера КМЦ]/[Cu<sup>2+</sup>] составляло 15 : 1 (I), 10 : 1 (II) и 7.5 : 1 (III). Полученные смеси перемешивали 20 мин и лиофилизовали.

#### 3.5.1.2. Определение содержания меди в микрогелях

Содержание меди в полученных комплексах определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Shimadzu UV-1280. Для этого лиофилизированный образец растворяли в воде, затем добавляли избыток аммиака и измеряли оптическую плотность окрашенного раствора комплекса [Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> при λ = 590 нм. Затем результат пересчитывали на весовое содержание меди. В ряде случаев для определения меди и цинка использовали метод АСР–AES (Optima 2100 DV, PerkinElmer, США или «Thermo Electron», IRIS Intrepid II DUO ICP–AES spectrometer, США; полупроводниковый CID-детектор), λ = 325 нм.

#### 3.5.1.3. Гидродинамические и электрокинетические характеристики двойных и тройных комплексов

Лиофилизированные комплексы помещали в воду и оставляли для набухания в течение 12 ч. Гидродинамический диаметр частиц микрогеля измеряли методом динамического рассеяния света (ДРС) с использованием фотометра ALV 5 (ALV, Германия), оснащенного He–Ne-лазером мощностью 25 мВт, при λ = 632.8 нм и угле рассеяния 90 °. Автокорреляционные функции флуктуаций интенсивности рассеянного света определяли с помощью 280-канального логического коррелометра “ФотоКорр-М”. Математическую обработку производили методом регуляризации по Тихонову. Гидродинамические радиусы рассчитывали по уравнению Стокса:

$$R = kT/6\pi\eta D,$$

где R – Стоксов радиус частицы, k – константа Больцмана, T – температура смеси, η – вязкость среды, D – коэффициент диффузии в данной среде. Измерение повторялось от 10 раз. Для опыта брали навески в 0.5; 1; 2; 3 мг каждого образца I–VI, XII; 0.05; 0.1; 0.5 мг VII–IX; 1 мг X–XI и растворяли в 1 мл бидистиллированной воды.

Электрофоретическую подвижность (ЭФП) частиц микрогеля, параметр, связанный с поверхностным зарядом частиц, измеряли методом микроэлектрофореза с использованием анализатора ZetaPlus (Brookhaven Instruments, США). Для этого каждый из образцов I–XIII массой 2 г растворяли в 1.7 мл Трис-буферного раствора с pH, равным 7.2. Смеси дали простоять сутки для установления равновесия.

Для трансмиссионного электронного-микроскопического исследования (ТЭМ) готовили разбавленный 0.05 мас.% водный раствор микрогеля, 5 мкл исследуемого раствора помещали на медную сетку и высушивали.

#### 3.5.1.4. Определение содержания AP, L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>

Содержание лигандов в микрогелях определяли спектрофотометрически (см. выше), используя калибровочные графики (диапазон 190-340 нм). При этом учитывали, что присутствие КМЦ образует подложку в спектре, значение поглощения которой необходимо вычесть при расчетах.

### 3.5.2. Тройные микрогели

#### 3.5.2.1. Синтез тройных микрогелей КМЦ–Cu–AP микрогелей (IV-VI)

Для синтеза тройных комплексов КМЦ–Cu<sup>2+</sup>–AP 50 мг лиофилизированного бинарного комплекса КМЦ–Cu<sup>2+</sup> растворяли в 50 мл дистиллированной воды, а затем по каплям добавляли 5 мл водного раствора с 11 мг AP (Sigma, США) при интенсивном перемешивании. Молярное соотношение [мономерное звено КМЦ] / [AP] составляло 1 / 2 для всех трех образцов КМЦ–Cu<sup>2+</sup>. Полученные смеси перемешивали в течение 24 ч, затем диализовали и лиофилизировали. В результате получили три тройных комплекса с молярным соотношением [мономерное звено КМЦ]/[Cu<sup>2+</sup>] / [AP] = 15 / 1 / 7.5 (IV), 10 / 1 / 5 (V) и 7 / 1 / 2 (VI).

#### 3.5.2.2. Синтез тройных микрогелей КМЦ–Cu–L<sup>1</sup> (VII-IX, XIII) и КМЦ–Cu–L<sup>2</sup> (XI)

В 50 мл раствора, содержащий 0.1% масс КМЦ маленькими порциями добавили 1 мл раствора, содержащего CuSO<sub>4</sub>, затем – 5 мл раствора лиганда L<sup>1</sup> или L<sup>2</sup>. Количество лиганда и ионов меди подбиралось таким образом, чтобы выполнялось заданное молярное соотношение. Полученную смесь оставили интенсивно перемешиваться в течение суток, затем переносили в диализные мешки и выдерживали в течение суток против бидистиллированной воды в условиях проточного диализа. После диализа полученные растворы высушивали лиофилизацией. В результате получали сухие аморфные вещества белого или голубоватого (при добавлении меди) оттенков.

#### 3.5.2.3. Синтез двойных и тройных микрогелей КМЦ–<sup>67</sup>Cu и КМЦ–<sup>67</sup>Cu–L (AP, L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>)

Меченые радионуклидом <sup>67</sup>Cu микрогели получали аналогично 3.5.1.1. и 3.5.2.1., используя раствор <sup>67</sup>CuCl<sub>2</sub> для получения двойных комплексов и КМЦ–<sup>67</sup>Cu – для получения тройных комплексов.

#### 3.5.2.4. Радиационная устойчивость микрогеля II

Образцы II растворяли в дистиллированной воде в концентрации 1 мг·мл<sup>-1</sup> и оставляли на сутки для установления равновесия в системе. После этого по 1 мл раствора в полиэтиленовой пробирке размещали в установке γ-400 (см. раздел 3.3.4.) на заданное

время: 2; 5; 24 ч. По завершению облучения проводили диализ облученных растворов в мешках в течение 24 ч против 300 мл дистиллированной воды и в течение 48 ч против 50 мл дистиллированной воды. Затем определяли количество ионов меди методом ICP-AES и исследовали методом ДСР (см. 3.5.1.3.)

### 3.5.3. Микрогели, меченные тритием

#### 3.5.3.1. Получение [ $^3\text{H}$ ]КМЦ и [ $^3\text{H}$ ]КМЦ–Cu ([ $^3\text{H}$ ]-II)

(Эксперимент проводили совместно с лабораторией меченых соединений кафедры радиохимии Химического факультета МГУ: с участием доц., к. х. н. Г. А. Бадуна и проф., д. х. н. М. Г. Чернышовой)

Кристаллы исходных образцов предварительно растворили для получения  $c = 1$  мг·мл<sup>-1</sup> и лиофилизовали для образования пленки на стенках сосуда. Сосуд с пленкой присоединили к вакуумной установке для термической активации трития, и, создав необходимый вакуум, заполнили газообразным тритием до давления 0.5 Па. Реакцию активировали нагреванием вольфрамовой проволоки при 1600 °С в течение 10 с. Стенки сосуда охлаждали жидким азотом. Меченые препараты растворяли в дистиллированной воде и перемещали в стеклянную колбу на роторный испаритель для упаривания. Полученный раствор очищали от низкомолекулярных примесей с помощью диализа («Sigma», MWCO ~2000 Да, США) (рис. 25) в соотношении 50 мл раствора против 1 л дистиллированной воды в течение 5 суток. Внешний раствор периодически меняли, контролируя радиоактивность на жидко-сцинтиляционном бета-спектрометре («Perkin Elmer», TriCarb 2810 TR, США), смешивая аликвоту в 0.01 мл раствора со сцинтилятором («Sigma-Aldrich», Ultima Gold, США).

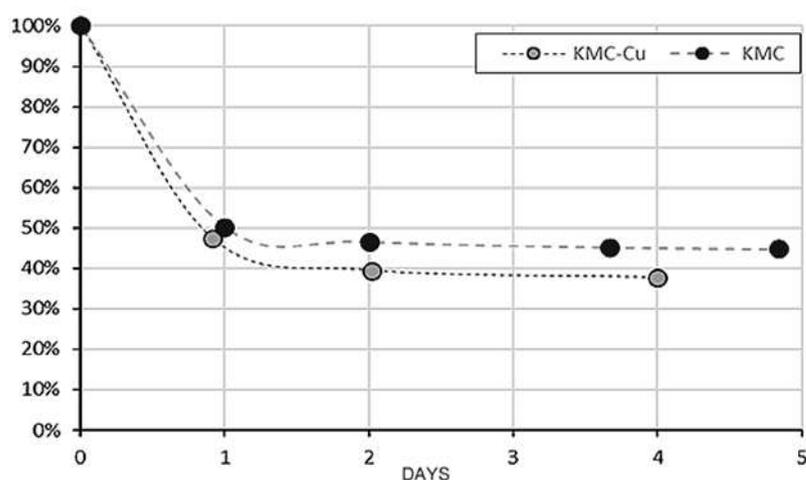


Рис. 25. Изменение активности препаратов при диализной очистке [214]

### **3.6. Работа с животными *in vivo***

Эксперименты *in vivo* были одобрены Комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, заседание № 126-д, 28.01.2021, протокол № 124-а. Все эксперименты с животными и их содержание соответствовали правилам лабораторной практики, изложенным в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (Серия Европейских договоров № 123, Страсбург, 1986), Приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики (GLP)» и в соответствии с международными рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях (1997).

#### **3.6.1. Содержание и подготовка животных**

Эксперимент проводили на самцах белых лабораторных мышей линии ICR массой 28-33 г. Мышей выдерживали в стандартных условиях 12-часового цикла в инкубаторе. Перед введением препараты доводили до физиологического рН и осмотического давления и вводили по 100 мкл внутривенно. Умерщвление мышей проводилось через цервикальную дислокацию, затем их препарировали. Извлеченные органы отмывали от крови и других жидкостей физиологическим раствором и взвешивали. Введенные активности различных препаратов и их экспозиция представлены в **табл. 5**.

##### **3.6.1.1. Пробоподготовка органов**

Активность органов с меткой  $^{67}\text{Cu}$ , измеряли на гамма спектрометре («Canberra» GC 3020, США) без предварительной пробоподготовки материала. В случае органов, меченных тритием, все органы (за исключением крови, мочи и печени) предварительно помещали в щелочной растворитель (Sigma-Aldrich, SOLVABLE, США) объемом 5-10 мл и термостатировали в ультразвуковой ванне (ГРАД, Россия) при 60 °С до образования однородной мутной жидкости. Мочу измеряли без пробоподготовки; в кровь добавляли пероксид водорода в соотношении 1 мл к 5 мл материала для уменьшения цветового гашения; печень замораживали и измельчали в фарфоровой ступке перед тем, как растворить в сольвенте. Удельную активность материалов рассчитывали с учетом распада радионуклида во время проведения эксперимента

##### **3.6.1.2. Калибровка эффективности на жидкостно-сцинтиляционном бета-спектрометре**

Аликвота для измерения активности составляла 0.02 мл для мочи и по 0.2 мл для всех остальных гомогенизированных растворов. Аликвоты смешивали со сцинтилятором

(«Sigma-Aldrich», Ultima Gold, США), тщательно встряхивали и измеряли активность на жидкостно-сцинтиляционном бета-спектрометре («Perkin Elmer», TriCarb 2810 TR, США). Для оценки эффективности измерения с учетом гашения предварительно сделали калибровку по методу внутреннего стандарта. Для этого в некоторые образцы добавили внутренний стандарт с известной активностью. Эффективность рассчитывалась по формуле

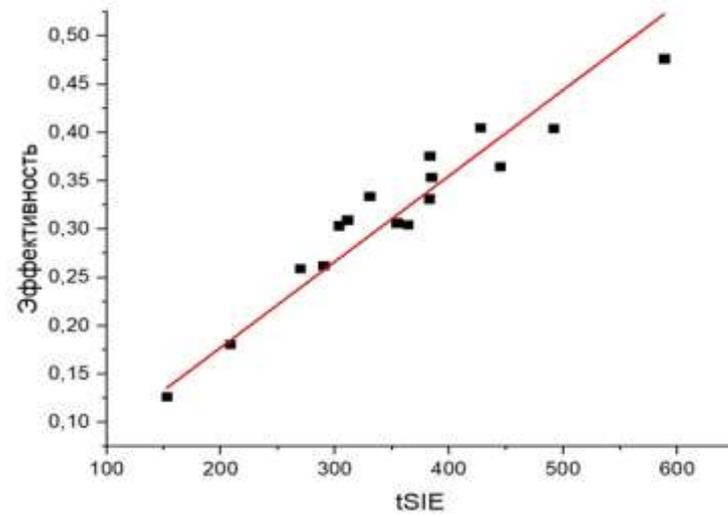
$$\varepsilon = (c_{s+1} - c_s) / A,$$

где  $\varepsilon$  – эффективность,  $c_{s+1}$  – скорость счета образца с добавлением стандарта,  $c_s$  – скорость счета образца без стандарта,  $A$  – активность стандарта.

Для оценки эффективности регистрации применили трансформированный спектральный индекс внешнего стандарта (tSIE), численный параметр, учитывающий гашение для данной системы в конкретном приборе, но не зависящий от скорости счета. Калибровочный график представлен на **рис. 26**.

**Таблица 5.** Активности, введенные мышам в экспериментах *in vivo*

Радионуклид	Препарат	Введенная радиоактивность, Бк	Экспозиция мышей после введения препарата, мин
	без носителя		
$^{67}\text{Cu}$	$\text{CuCl}_2$	260	30
$^{67}\text{Cu}$	$\text{CuCl}_2$	260	60
$^{67}\text{Cu}$	<b>III</b>	1560	90
$^{67}\text{Cu}$	<b>III</b>	2220	180
$^{67}\text{Cu}$	<b>III</b>	2220	1440
$^{67}\text{Cu}$	<b>I</b>	1120	30
$^{67}\text{Cu}$	<b>I</b>	1120	90
$^{67}\text{Cu}$	<b>I</b>	2130	180
$^{67}\text{Cu}$	<b>I</b>	2130	1440
$^3\text{H}$	<b>II</b>	$2886 \cdot 10^5$	60
$^3\text{H}$	<b>II</b>	$2886 \cdot 10^5$	300
$^3\text{H}$	<b>II</b>	$2886 \cdot 10^5$	1440
$^3\text{H}$	КМЦ	$3589 \cdot 10^5$	60
$^3\text{H}$	КМЦ	$3589 \cdot 10^5$	300
$^3\text{H}$	КМЦ	$3589 \cdot 10^5$	1440



**Рис. 26.** Калибровка эффективности по параметру tSIE [214]

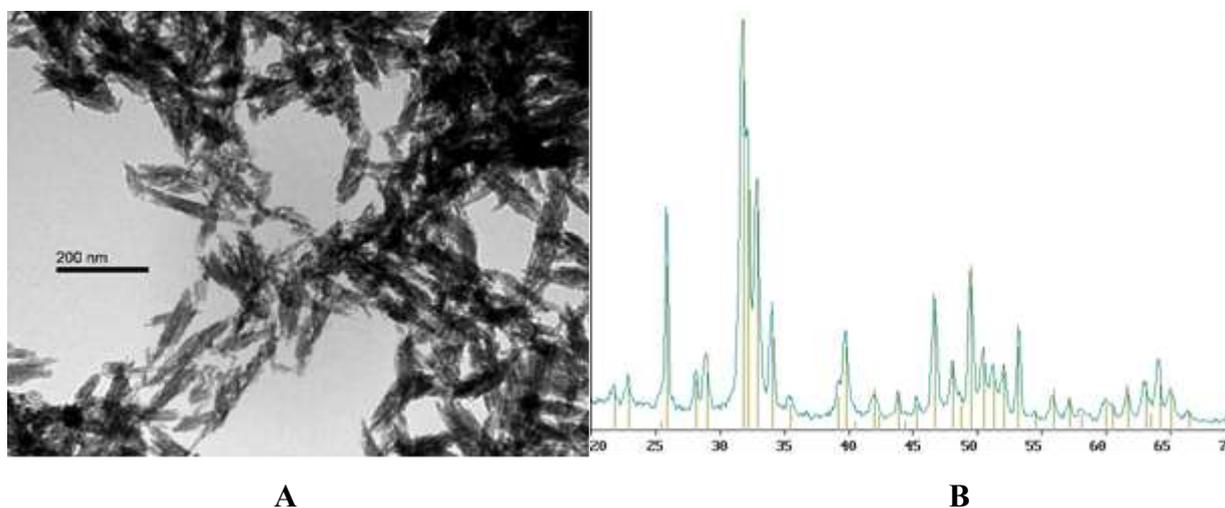
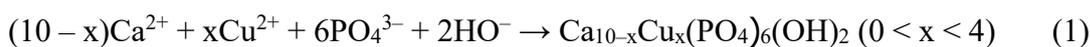
## 4. Результаты и их обсуждение

### 4.1. Сорбция ионов меди на наноГАП и ферментативном ГАП при адсорбционном и сокристаллизационном методе введения и сравнение с поведением в этих условиях ионов цинка [публикации автора 194,196,206]

Для проведения эксперимента использовали: ГАП<sub>0</sub> – суспензия наноГАП с содержанием твердой фазы 5.2 масс.%, полученная методом осаждения по методике [116] и ГАП<sub>Е</sub>, синтезированный с использованием щелочной фосфатазы (ЩФ) [114] с  $c = 80$  мг/л и глицерофосфата кальция с  $c = 2 \cdot 10^{-2}$  моль/л.

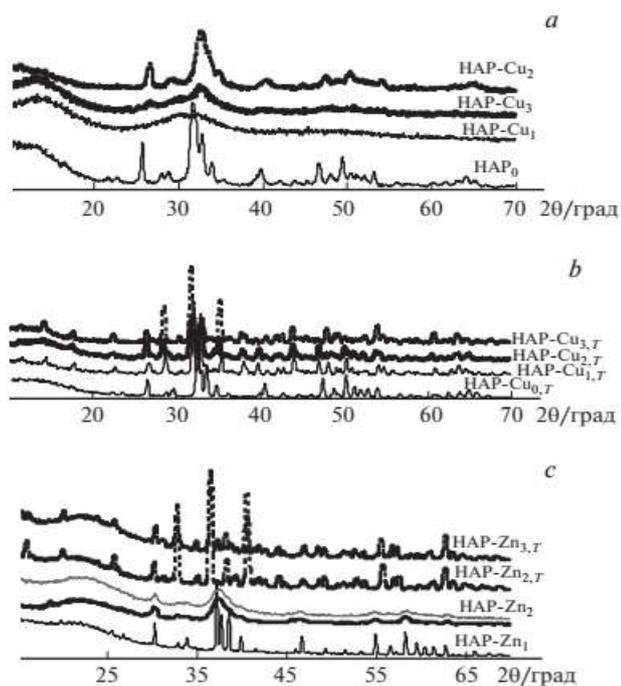
ГАП-Cu<sub>1</sub>, ГАП-Cu<sub>2</sub> и ГАП-Cu<sub>3</sub> получены сокристаллизационным методом на различных этапах формирования ГАП, с содержанием меди 4.36; 5.15 и 4.6 масс.% и с соотношением Cu / Ca = 1 : 10. Из полученных образцов получали порошки, часть которых обрабатывали термически 3 ч при 900 °С (ГАП-Cu<sub>T</sub>).

В маточном растворе после синтеза ГАП<sub>0</sub> по данным химического анализа осталось ~4% меди (от введенной). Если протекающая реакция соответствует (1), то  $x = 0.5$  и реакция образования ГАП<sub>0</sub> соответствует уравнению (2).

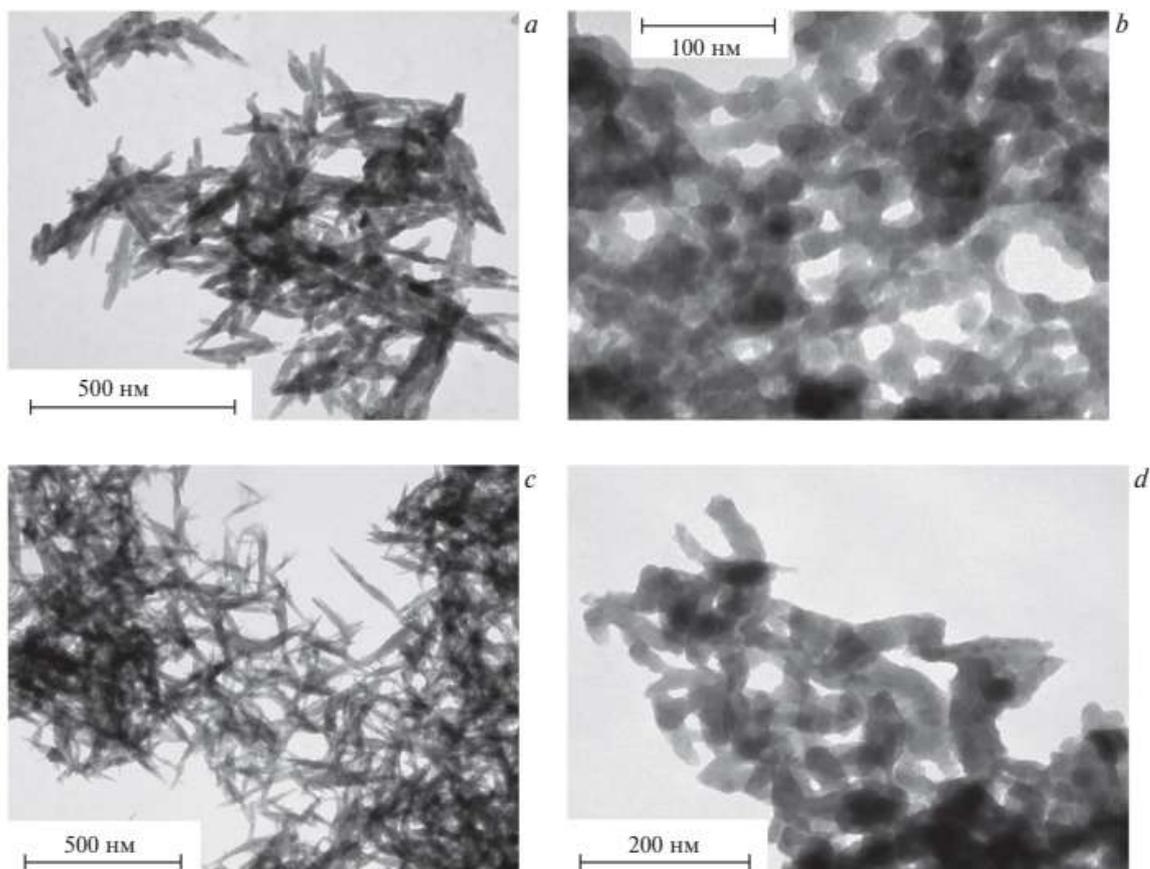


**Рис. 27.** ПЭМ (А) и РФА (В) образца НАР<sub>0</sub>, синтезированного из суспензии оксида кальция и фосфорной кислоты

На **рис. 27** представлены характеристики образца, не содержащего ионы металлов ГАП<sub>0</sub>. Однако при введении ионов меди, как видно из дифрактограмм (**рис. 28**), образцы ГАП-Cu<sub>1</sub> и ГАП-Cu<sub>3</sub> являются аморфизированными. Этот результат подтверждается данными ПЭМ (**рис. 29**).



**Рис. 28.** Дифрактограммы образцов  $\text{ГАП}_0$ ,  $\text{ГАП-Cu}_{1-3}$  (а),  $\text{ГАП-Cu}_{1-3(T)}$  (б, термически обработанных) в сравнении с полученными ранее дифрактограммами для  $\text{ГАП-Zn}$  (с) [206]



**Рис. 29.** Результаты, полученные методом ПЭМ для образцов  $\text{ГАП}_0$  (а),  $\text{ГАП-Cu}_1$  (б),  $\text{ГАП-Cu}_2$  (с),  $\text{ГАП-Cu}_3$  (d) [206]

Только ГАП–Cu<sub>2</sub> с наибольшим содержанием меди показал кристаллическую форму и наименьшее влияние на исходную морфологию наноГАП. При этом результаты обоих методов (и РФА, и ПЭМ) свидетельствуют об отсутствии собственной микрофазы меди во всех трех образцах, что аналогично поведению в этих условиях ионов цинка. При этом известно [120,207-209], что ионы переходных металлов, включая цинк и медь, ингибируют кристаллизацию ГАП. То, что при больших концентрациях меди наблюдалась лучшая кристаллизация говорит о **дополнительных факторах влияния на этот процесс, связанных со стадией введения ионов металла** (при сокристаллизационном методе), т. е. о возможной перекристаллизации при введении ионов меди на определенной стадии реакции.

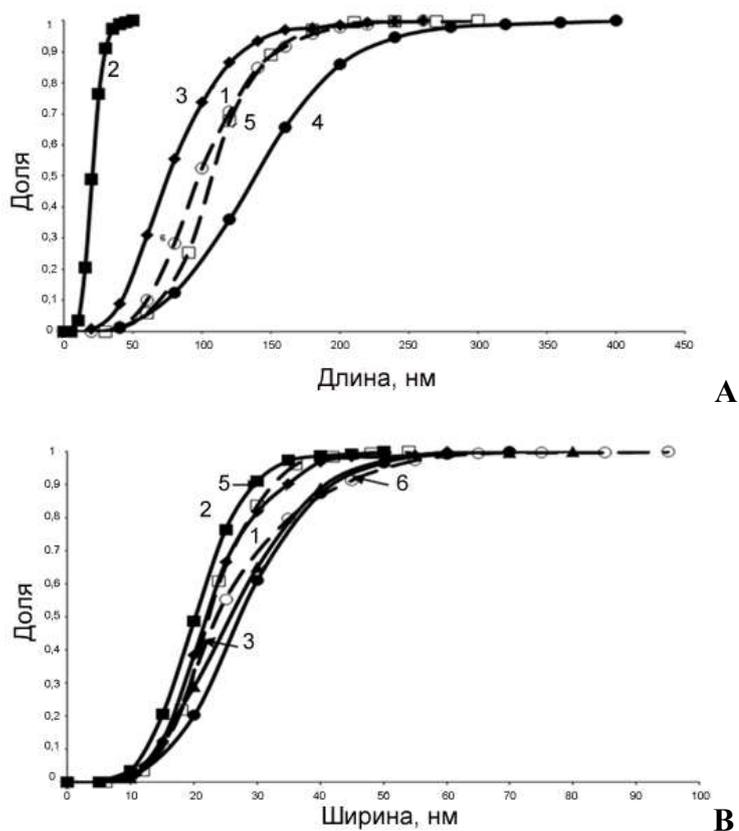
Известно [210,211], что высокотемпературная обработка ГАП приводит к перестройке его структуры и морфологии. В нашем случае обработка при 900 °С полученных медьсодержащих образцов привела к перестройке структуры ГАП с получением кристаллов смешанных фосфатов кальция и меди состава: Ca<sub>19</sub>Cu<sub>2</sub>H<sub>1.42</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>14</sub>, соответствующего номеру по каталогу JCPDS [00-089-4439]. При этом апатитоподобная структура фосфатов может перестраиваться в структуру α-трикальцийфосфата (α-ТКФ). Аналогичная картина наблюдалась и для цинка. **Это говорит о малом влиянии на такую перестройку фактора, связанного с тем, какой ион металла воздействует.** Однако анализ морфологии и функции распределения наночастиц НАР–Cu по размерам показывают **значительно большее влияние ионов меди на формирование наночастиц ГАП по сравнению с ГАП–Zn (рис. 30).** Средние размеры наночастиц НАР<sub>0</sub> и НАР, допированного цинком, представлены в табл. 6.

Совершенно иная морфология наблюдается для ферментативного образца ГАП<sub>Е</sub>, где образуются сферические микрочастицы с высокой пористостью (рис. 31). Такая морфология ГАП<sub>Е</sub> приводит к резкому увеличению сорбционной емкости, но и к некоторому увеличению размеров частиц и изменению их доступной поверхности. В этом случае средний размер частиц зависит от концентрации фермента и от продолжительности синтеза и меняется в пределах от 1.7 (1 сутки) до 3.1 (7 суток) мкм [114]. Морфология образующихся в эксперименте частиц представлена на рис. 32.

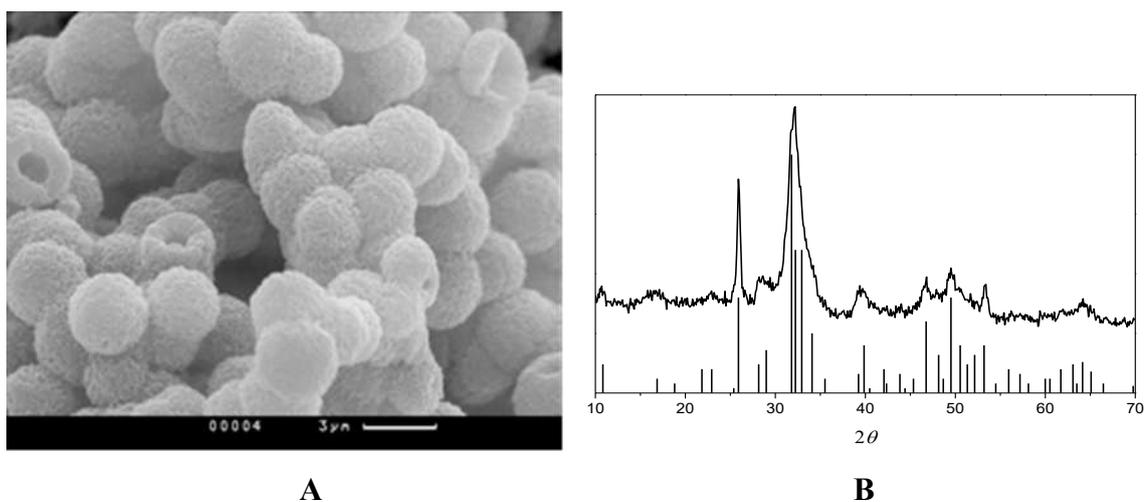
При увеличении концентрации ЩФ до 0.1 мкг/мл удельная поверхность образца, определенная по адсорбции азота, составляла 300 м<sup>2</sup>/г. При этом наблюдалось широкое распределение пор по размерам (2-300 нм). Размеры кристаллитов в образцах, имеющих кристаллическую структуру, оценивались по формуле Шеррера:

$$D_{HKL} = \frac{\lambda}{\beta \cos \theta}$$

где  $\lambda$  – длина волны,  $\beta$  – интегральная полуширина линии, равная площади пика, деленной на интенсивность в максимуме.



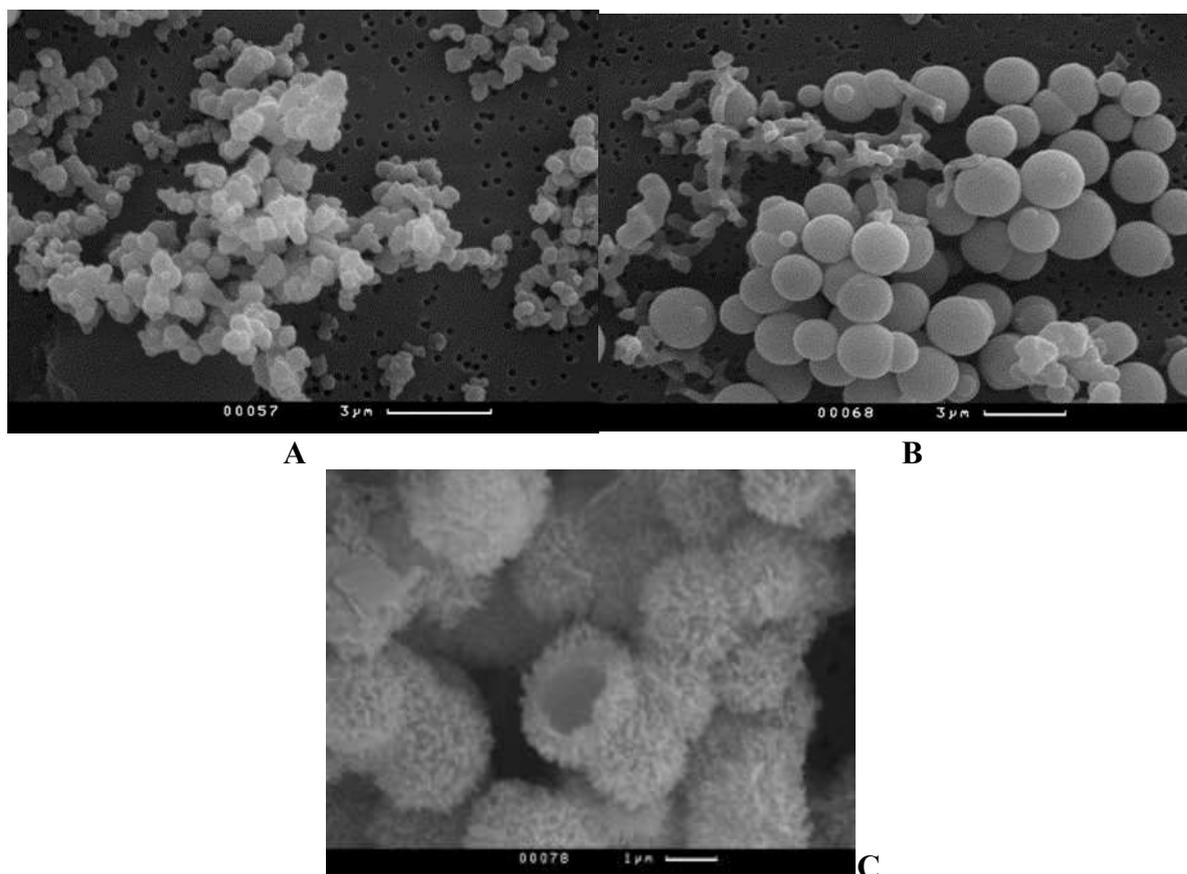
**Рис. 30.** Сравнение функции распределения наночастиц ГАП–Cu по длине (А) и по ширине (В) в сравнении с ГАП–Zn: ГАП<sub>0</sub> (1); ГАП–Cu<sub>1</sub> (2); ГАП–Cu<sub>2</sub> (3); ГАП–Cu<sub>3</sub> (4); ГАП–Zn<sub>1</sub> (5); ГАП–Zn<sub>2</sub> (6); N — число частиц [206]



**Рис. 31.** Данные сканирующей электронной микроскопии (А) и РФА (В) для образца НАР<sub>Е</sub> [206]

**Таблица 6.** Средние размеры наночастиц  $\text{HAP}_0$  и  $\text{HAP}$ , допированного цинком.

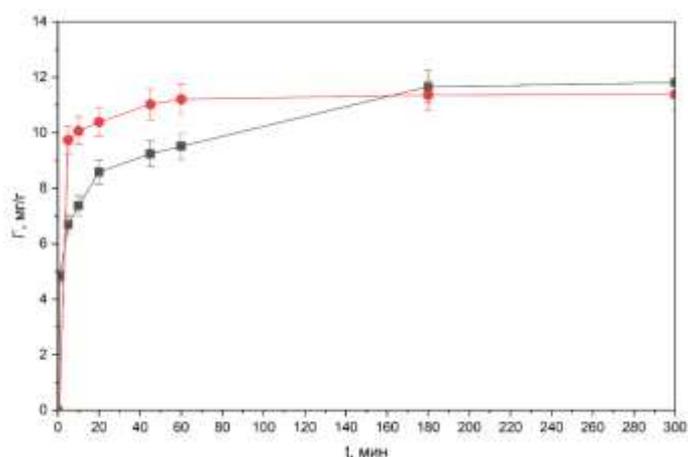
Параметр	$\text{HAP}_0$	$\text{HAP}_{\text{Zn1}}$	$\text{HAP}_{\text{Zn2}}$
Длина, нм	$120 \pm 5$	$110 \pm 5$	$98 \pm 4$
Ширина, нм	$36 \pm 3$	$23 \pm 2$	$26 \pm 2$



**Рис. 32.** Данные электронной микроскопии образцов  $\text{ГАП}_E$ , полученных при ферментативном синтезе через 1 ч (А), 1 сут (В) и 7 сут (С) после начала реакции.  $c_{\text{ЩФ}} = 30 \text{ мг/л}$  [114]

Размер кристаллитов составлял 12-14 нм. Нанометровый размер указывает на то, что крупные сферические образования представляют собой сложную иерархическую структуру, организованную множеством мелких кристаллов, что увеличивает гетерогенность процесса сорбции на них. При синтезе в водной среде происходит снижение значения рН, при этом падает активность фермента, а при рН 6-7 реакция останавливается. **Кинетика сорбции меди** на  $\text{ГАП}_0$  и  $\text{ГАП}_E$  представлена на **рис. 33**. Если для  $\text{ГАП}_0$  сорбционный максимум достигается за 2 ч и достигает 80-100 мг/г, то для  $\text{ГАП}_E$  требуется 24 ч и максимальная величина сорбции составляла 220 мг/г. При этом удельная поверхность, измеренная по сорбции азота в случае  $c_{\text{ЩФ}} = 0.02 \text{ мкг/мл}$ , составляла  $\sim 200 \text{ м}^2/\text{г}$

[114]. Сорбция меди в обоих случаях является необратимым процессом, десорбции не наблюдалось. В случае цинка кинетическое равновесие достигалось ~ за 3 ч.

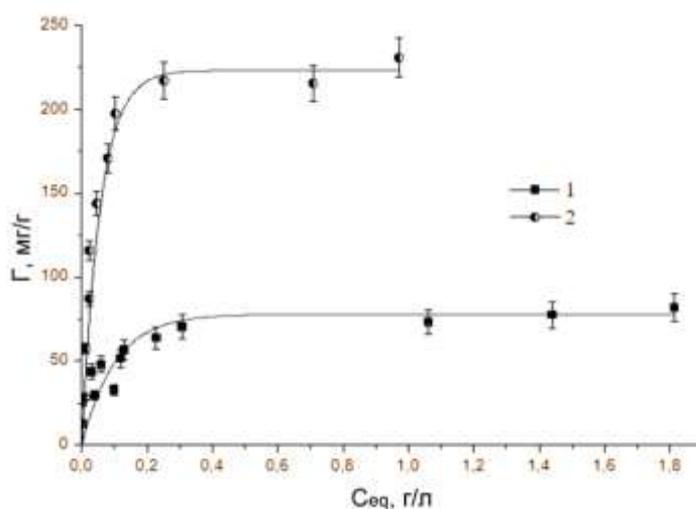


**Рис. 33.** Кинетика сорбции ионов меди из раствора хлорида меди на наноГАП (НАР<sub>0</sub>) (1) и на ГАП<sub>Е</sub> (2) [206]

**Таблица 7.** Параметры изотермы сорбции ионов меди на ГАП<sub>0</sub> и ГАП<sub>Е</sub>, рассчитанные по моделям Ленгмюра и Фрейндлиха.

параметр	q <sub>max</sub> , мг/г	K <sub>L</sub> , л/г	R <sup>2</sup> , изотерма Ленгмюра	K <sub>f</sub> , мг/г	1/n	R <sup>2</sup> , изотерма Фрейндлиха
ГАП <sub>0</sub>	81.6	15.6	0.9202	118.3	0.196	0.7750
ГАП <sub>Е</sub>	253.2	26.6	0.9667	280.4	0.271	0.7852

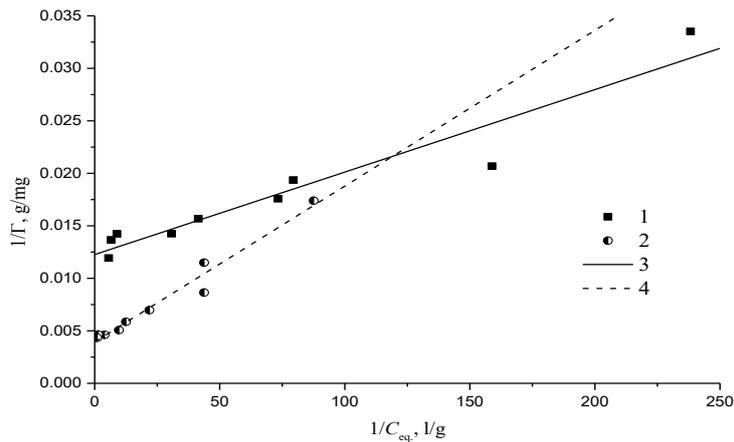
q<sub>max</sub> – максимальная адсорбция монослоя; K<sub>L</sub> – константа Ленгмюра (средство адсорбата и адсорбента); K<sub>f</sub> и n – константы адсорбции Фрейндлиха (характеризуют насыщаемость и интенсивность адсорбции)



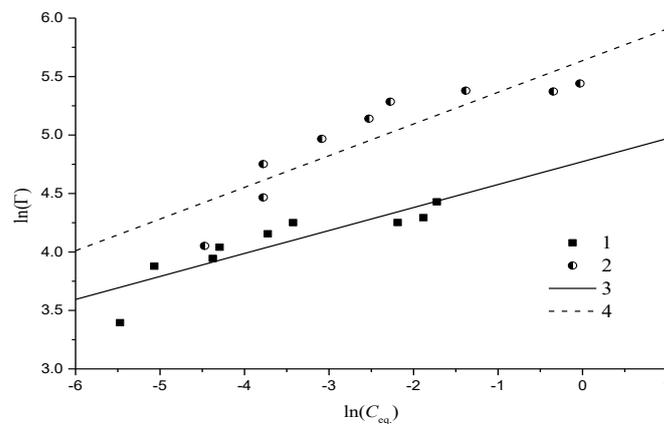
\*

**Рис. 34.** Изотерма сорбции ионов меди из раствора хлорида меди на ГАП<sub>0</sub> (1) и ГАП<sub>Е</sub> (2) [206]

Для ГАП<sub>0</sub> и ГАП<sub>Е</sub> были получены изотермы сорбции меди (рис. 34), для описания которых использовали модель Лангмюра, т. е. описание процесса через изменение эффективной поверхности сорбции, и эмпирическую модель Фрейндлиха. Результаты приведены на рис. 35. Очевидно, что процесс сорбции недостаточно соответствует как модели Лангмюра, так и эмпирической модели Фрейндлиха (табл. 7). Очевидно, это связано с замещением ионов кальция в ГАП на ионы меди (рис. 18), что не позволяет установиться равновесному процессу.



А



В

**Рис. 35.** Обработка данных по сорбции меди на ГАП<sub>0</sub> (1,3) и ГАП<sub>Е</sub> (2,4) по модели Лангмюра (А) и Фрейндлиха (В). Уравнения прямых: (А) 4 –  $1/\Gamma = 0.01226 + 7.85724 \cdot 10^{-5} / C_{eq}$  ( $R^2 = 0.9202$ ), 3 –  $1/\Gamma = 0.00395 + 1.48363 \cdot 10^{-4} / C_{eq}$  ( $R^2 = 0.9667$ ); (В) 4 –  $\ln(\Gamma) = 4.77308 + 0.19647 \cdot \ln(C_{eq})$  ( $R^2 = 0.7750$ ), 3 –  $\ln(\Gamma) = 5.63623 + 0.27092 \cdot \ln(C_{eq})$  ( $R^2 = 0.7852$ ) [206]

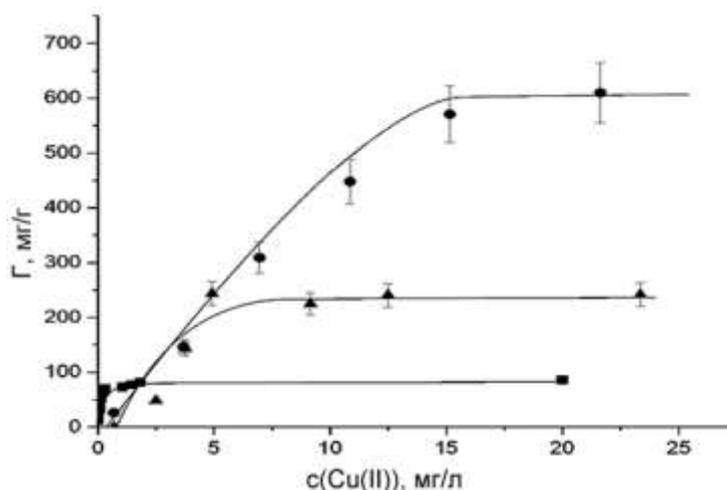
Был проведен анализ кинетической кривой для НАР<sub>0</sub>–Cu на основе кинетических моделей псевдопервого  $\log(q_e - q_t) = \log q_e - k_{ad}t/2,303$  и псевдвторого  $(dq_t/dt) = k_1(q_e - q_t)^2$  порядка [210,211] (здесь:  $k_{ad}$ ,  $k_1$  – константы скорости сорбции, мин<sup>-1</sup>;  $q_e$  – равновесное количество сорбированного иона меди, мг/г;  $q_t$  – количество ионов меди, сорбированных в момент  $t$ , мг/г; ). Оказалось, что кинетика сорбции катионов меди(II) на нанокристаллах

НАР<sub>0</sub> в водной среде лучше всего описывается уравнением псевдвторого порядка с константой  $k_1 = (9.9 \pm 0.7) \cdot 10^{-3} \text{ г мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

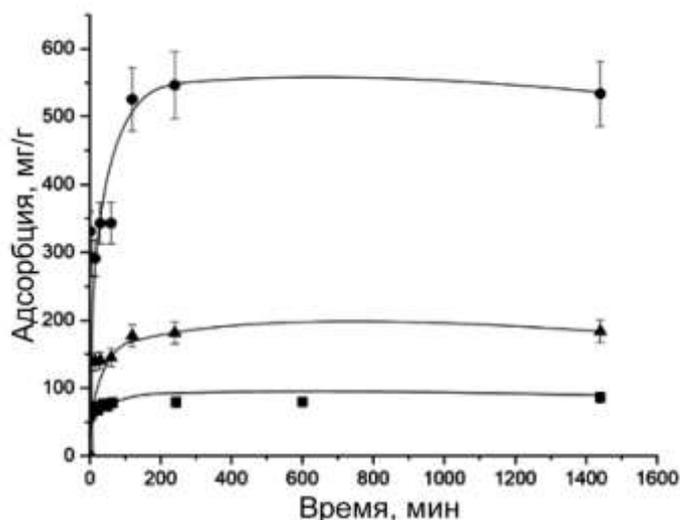
Было также изучено влияние на сорбцию меди(II) присутствия в растворе молекул БСА в качестве примера транспортных белковых молекул крови. Сравнительная характеристика параметров сорбции, рассчитанные в этом случае также по моделям Лангмюра и Фрейндлиха, приведены в **табл. 8**. Они также не соответствуют параметрам равновесного процесса (**рис. 36**). Однако в случае совместной сорбции значительно повышается максимальная сорбция. В случае последовательной сорбции, когда предварительно происходит заполнение носителя БСА, и лишь потом сорбируется медь, величина максимальной адсорбции увеличивается на порядок. В целом, процесс сорбции в данном случае явно представляет более сложный процесс, чем равновесная адсорбция, и включает процесс замещения. Кинетика этих процессов также сопоставлена на **рис. 37**.

**Таблица 8.** Параметры изотермы сорбции ионов меди на ГАП<sub>0</sub> в присутствии БСА, рассчитанные по моделям Лангмюра и Фрейндлиха.

Параметр	$q_{\max}$ , мг/г	$K_L$ , л/г	$R^2$ , изотерма Лангмюра	$K_f$ , мг/г	$1/n$	$R^2$ , изотерма Фрейндлиха
НАР <sub>0</sub>	81.6	15.6	0.9202	118.3	0.196	0.7755
НАР <sub>0</sub> -БСА (предварительно осажженный)	240.2	111	0.9277	5.0111	0.9531	0.9854
НАР <sub>0</sub> -БСА (совместная сорбция)	609	2.3	0.908	4.7626	0.848	0.6441



**Рис. 36.** Изотермы сорбции для следующих систем: 1 – НАР<sub>0</sub> и Cu(II); 2 – НАР<sub>0</sub>, БСА и Cu(II) (совместная адсорбция), 3 – НАР<sub>0</sub>, БСА и Cu(II) (последовательное осаждение)  
[194]



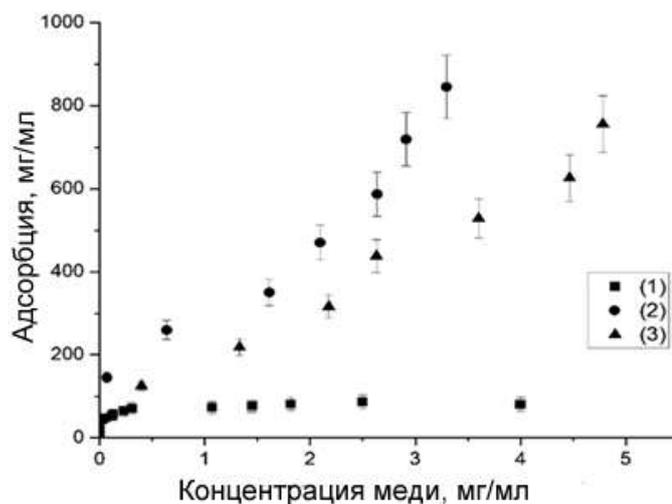
**Рис. 37.** Кинетические кривые для следующих систем: 1 – НАР<sub>0</sub> и Cu(II); 2 – НАР<sub>0</sub>, БСА и Cu(II) (совместная адсорбция), 3 – НАР<sub>0</sub>, БСА и Cu(II) (последовательное осаждение) [194]

**Таблица 9.** Кинетические параметры адсорбции ионов меди в присутствии БСА на НАР<sub>0</sub>, рассчитанные по моделям псевдопервого и псевдвторого порядка.

величина	q <sub>e</sub> , мг/г	k <sub>ад</sub> , мин <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup> , псевдопервый пор.	k <sub>1</sub> , г/мг/мин	R <sup>2</sup> , псевдвторой пор.
НАР <sub>0</sub>	11.8	4.4 · 10 <sup>-3</sup>	0,969 (нач. участок) <0,650 (все данные)	9.9 · 10 <sup>-3</sup>	0.999
НАР–БСА (совместная сорбция)	180.8	1.9 · 10 <sup>-3</sup>	0.8229	6.58 · 10 <sup>-5</sup>	0.9788
НАР–БСА (последовательная сорбция)	535.2	1.9 · 10 <sup>-3</sup>	0.933	8.65 · 10 <sup>-4</sup>	0.9965

Все три процесса наилучшим образом соответствуют кинетике псевдвторого порядка (табл. 9). В присутствии БСА константы скорости реакций уменьшаются, что говорит о замедлении процесса сорбции в этом случае.

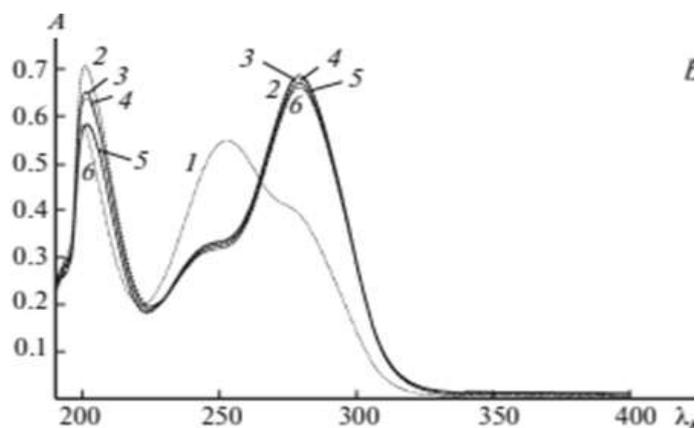
Параметры сорбции по указанным выше моделям были рассчитаны также для образцов, полученных методом сокристаллизации: НАР–Cu<sub>1</sub> и НАР–Cu<sub>2</sub>. Полученные изотермы сорбции приведены на рис. 38. Видно, что для ранее допированных медью образцов ГАП емкость увеличивается на порядок.



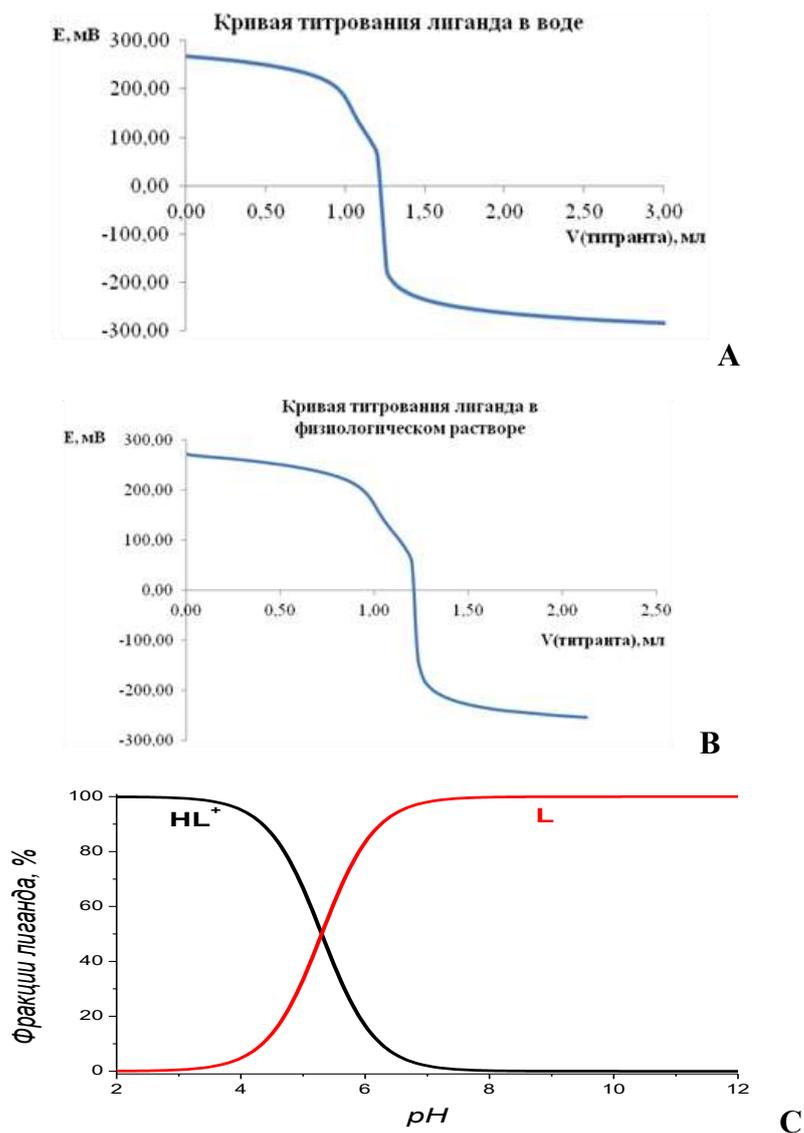
**Рис. 38.** Изотермы сорбции для следующих систем: 1 –  $\text{HAP}_0$  и  $\text{Cu(II)}$ ; 2 –  $\text{HAP-Cu}_1$ , 3 –  $\text{HAP-Cu}_2$  (последовательное осаждение) [194]

Для того, чтобы оценить возможность сорбции на ГАП лигандов – ингибиторов NO-синтазы, предварительно была получена кинетика изменения спектра для гидробромида лиганда  $L^1$  при контакте с  $\text{ГАП}_0$ . Как видно из **рис. 39**, происходит изменение спектра, но сорбции не наблюдалось.

Кроме того, были определены константы протонирования лиганда в водном и физиологическом растворах методом потенциометрии (**рис. 40**), которые оказались равными  $\log K = 5.1 \pm 0.1$  и  $\log K = 5.3 \pm 0.2$ , соответственно, что косвенно может характеризовать возможные константы связывания лиганда с ионами металлов.



**Рис. 39.** Спектры, полученные для раствора  $L^1 \cdot \text{HBr}$  ( $10^{-2}$  мг·мл $^{-1}$ ), находящегося в контакте с  $\text{ГАП}_0$  в течение 0 (1), 5 (2), 10 (3), 15 (4), 30 (5), 60 мин (6)



**Рис. 40.** Кривые титрования лиганда  $L^1 \cdot HBr$  в водном растворе (А) и в физиологическом растворе (В) и распределение форм лиганда в зависимости от рН по данным расчета в программе Hyperquad2013 (С) [ $c(L^1) = 1 \cdot 10^{-3}$  моль  $\cdot$  л $^{-1}$ ,  $I = 0.15$  моль  $\cdot$  л $^{-1}$  NaCl (0.1 моль  $\cdot$  л $^{-1}$  KNO $_3$ )]

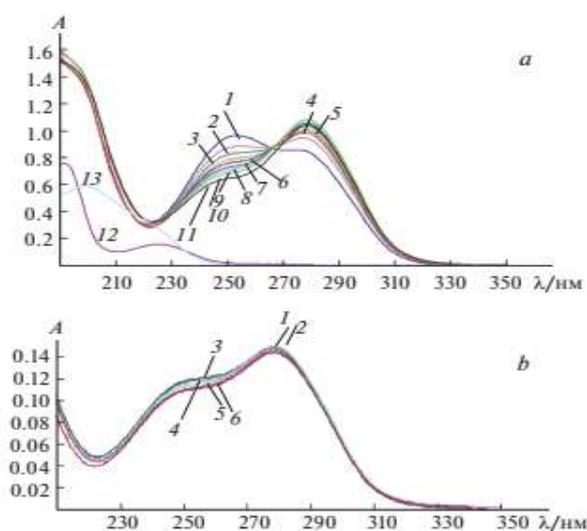
**Краткий вывод.** Сравнение параметров кристаллической структуры, сорбционной емкости, морфологии и распределения по размерам частиц ГАП, полученных методом сокристаллизации и ферментативным методом, показали существенные различия параметров в зависимости от способа и условий получения, что связано с изменением размеров, морфологии и доступной поверхности сорбции. Положительным фактором этих различий является возможность использовать их для строгого контроля характеристик частиц, получаемых с целью доставки препаратов. Изотермы сорбции полученных НАР-наночастиц лучше описываются моделью Лангмюра. Сорбция меди на ранее допированной ионами меди поверхности, наоборот, плохо соответствует модели Лангмюра, хотя величина сорбции увеличивается, зато этот процесс лучше описывается моделью Фрейндлиха, что

говорит об увеличении центров гетерогенности. При использовании БСА в случае ГАП<sub>E</sub> процесс кристаллизации является более сложным и недостаточно хорошо описывается не только по Фрейндлиху, но и моделью Лангмюра. Механизм процесса сорбции также модифицируется при совместной и последовательной сорбции меди и БСА. Медь имеет высокое сродство к ГАП, и может обменивать ионы кальция, входящие в состав ГАП. Сорбции лигандов на ГАП не наблюдалось.

#### 4.2. Синтез комплексов меди и исследование их структур [публикации автора 194,196, 212]

Синтез комплексов меди проводили по новым методикам, разработанным в нашей лаборатории к. х. н. Трофимовой Т. П. (см. Экспериментальную часть)

##### 4.2.1. Лиганды и комплексы N-(5,6-дигидро-4Н-1,3-тиазин-2-ил)бензамида (L<sup>1</sup>) и АР с медью



**Рис. 41.** Устойчивость L<sup>1</sup> в водном растворе при больших (>6 мкг·мл<sup>-1</sup>, а) и малых концентрациях (2-6 мкг·мл<sup>-1</sup>, б); (а): исходный раствор (1), раствор выдержан 1 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5), 5 (6), 7 (7), 8 (8), 9 (9), 10 (10), 11 суток (11), бензойная кислота (12), тиазин (13); (б): исходный раствор (1), раствор выдержан 1 (2), 2 (3), 3 (4), 5 (5), 6 суток (6)

На рис. 41-42 показана устойчивость лиганда L<sup>1</sup> в водном и в физиологическом растворах в сравнении с устойчивостью структур, входящих в состав лиганда. Были получены (рис. 43) молярные коэффициенты поглощения L<sup>1</sup> в различных растворителях, которые приведены в табл. 11. В водном растворе устойчивость лиганда оказалась зависимой от его концентрации, что может быть связано с таутомерными переходами и/или возможностью образования водородных связей.

При концентрации  $8 \cdot 10^{-6}$  моль·л<sup>-1</sup> L<sup>1</sup> · HBr устойчив не менее 7 суток, в то время как при концентрации  $5.6 \cdot 10^{-5}$  моль·л<sup>-1</sup> – уже не менее 11 суток (рис. 41). В физиологическом

растворе концентрационной зависимости не наблюдается, лиганд устойчив в течение 6 суток, а далее распадается с образованием тиазина (рис. 42). К сожалению, комплексы меди с лигандом  $L^1$  нерастворимы в воде и получить для них константу связывания методом потенциометрии не удалось.

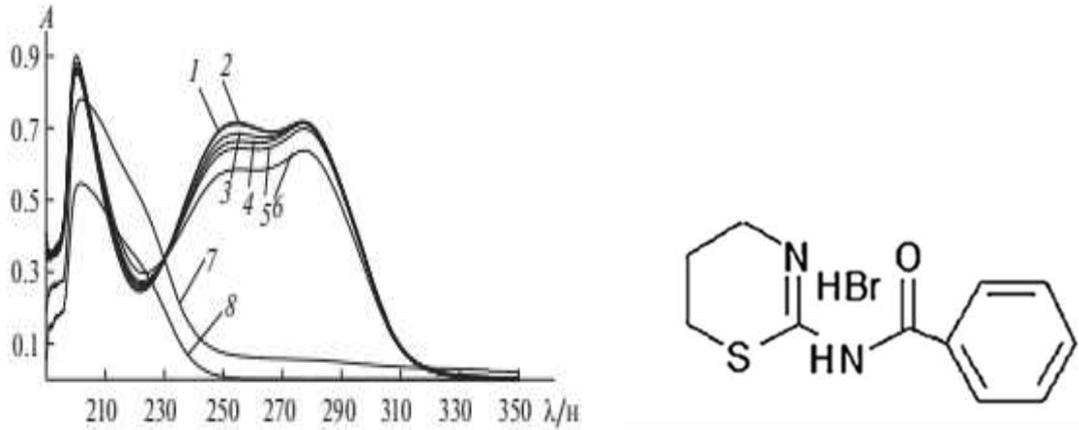


Рис. 42. Устойчивость  $L^1$  в физиологическом растворе: исходный раствор (1), раствор выдержан 1 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5), 5 (6), 7 суток (7), тиазин (8); и формула  $L^1$

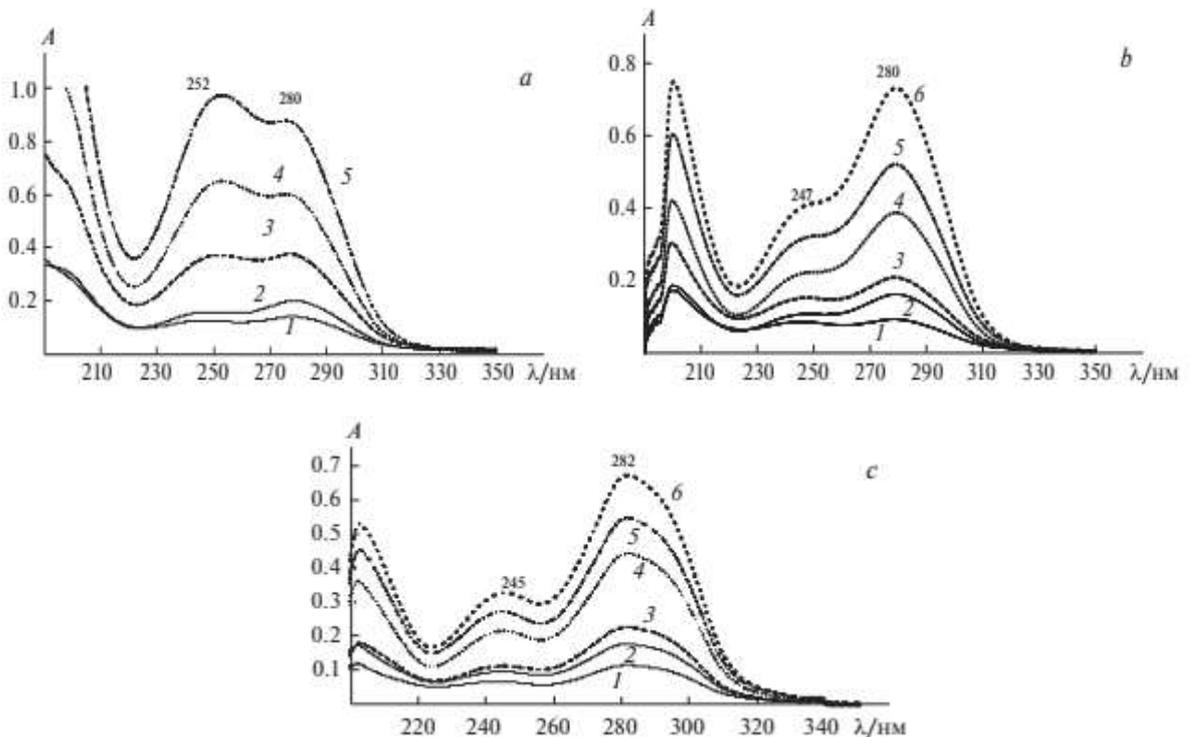


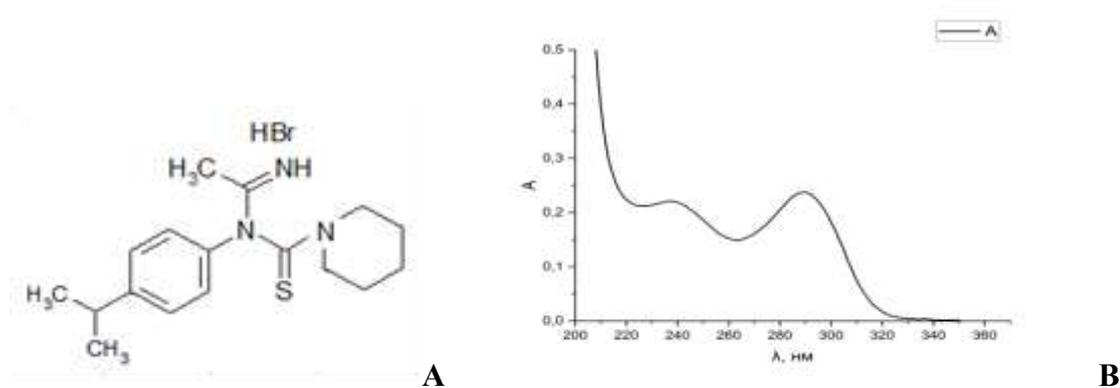
Рис. 43. Определение молярного коэффициента поглощения  $L^1$  в водном (а), физиологическом (b) и спиртовом (с) растворах; цифры у кривых — длины волн максимумов (нм); а:  $c = 1.80$  (1),  $2.70$  (2),  $5.40$  (3),  $9.00$  (4) и  $13.50$  мкг·мл<sup>-1</sup> (5); b:  $c = 1.07$  (1),  $2.14$  (2),  $3.57$  (3),  $5.35$  (4),  $7.13$  (5) и  $10.7$  мкг·мл<sup>-1</sup> (6); с:  $c = 1.51$  (1),  $2.26$  (2),  $3.01$  (3),  $6.02$  (4),  $7.53$  (5) и  $9.04$  мкг·мл<sup>-1</sup> (6)

Другим используемым в работе лигандом является гидробромид  $N$ -(4-изо-пропилфенил)- $N$ -(1-иминоэтил)пиперидин-1-карботиоамида -  $L^2$  (рис. 44), для которого

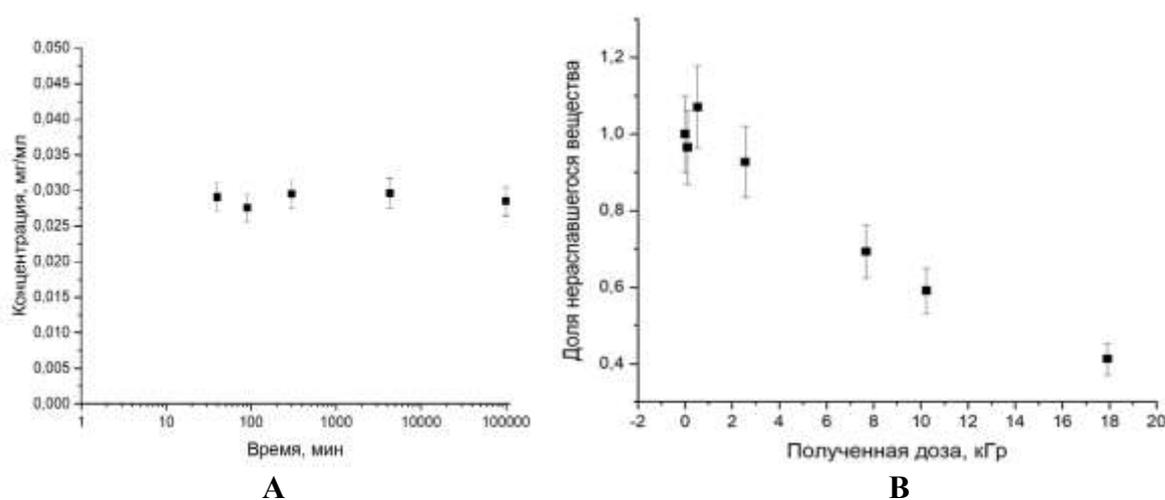
на рис. 45 представлена устойчивость в водном растворе и радиационная устойчивость под действием гамма-облучения (на  $\gamma$ -400).

**Таблица 11.** Молярные коэффициенты поглощения лиганда  $L^1$  в различных растворителях.

Соединение, растворитель	$\lambda/\text{нм}$	$\epsilon \cdot 10^{-4}$ /л·моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$
$L^1 \cdot \text{HBr}$ водный раствор	252	$2.15 \pm 0.03$
	280	$2.13 \pm 0.07$
$L^1 \cdot \text{HBr}$ физиологический раствор	247	$1.26 \pm 0.04$
	280	$2.53 \pm 0.06$
$L^1 \cdot \text{HBr}$ спиртовой раствор	245	$1.09 \pm 0.01$
	282	$2.26 \pm 0.02$



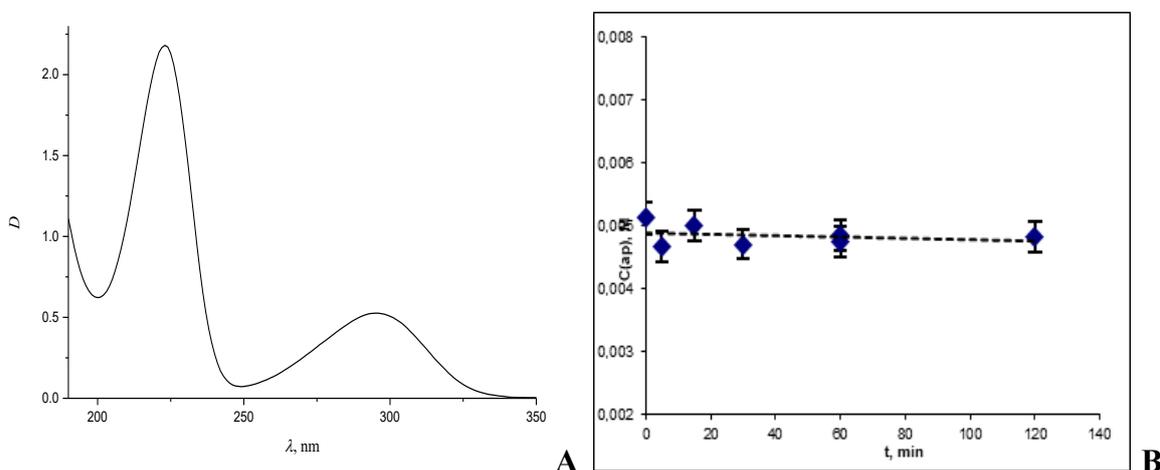
**Рис. 44.** Лиганд активатор iNOS -  $L^2$  - гидробромид *N*-(4-изопропилфенил)-*N*-(1-иминоэтил)пиперидин-1-карботиоамида: формула (А), УФ-спектр поглощения в  $\text{H}_2\text{O}$  (В) [194]



**Рис. 45.** Стабильность  $L^2$  в водном растворе (А) и радиационная устойчивость (на  $\gamma$ -источнике) в физиологическом растворе (В) [194]

Синтез комплексов меди с лигандом  $L^1$ , их спектры ЯМР и элементный анализ описаны в экспериментальной части. ЯМР-спектроскопия показала, что лиганд при образовании всех полученных комплексов не разлагается. Получены характеристики структуры этих комплексов. Поскольку невозможно определить константу связывания меди с этим лигандом методом потенциометрии, то до некоторой степени о величине константы для комплекса можно судить по константе протонирования, которая приведена выше.

Для того, чтобы оценить возможности ГАП в качестве носителя комплексов меди была предпринята попытка использовать метод адсорбции на ГАП<sub>0</sub> и ГАП<sub>Е</sub> комплекса  $Cu(AP)_2Cl_4$  (**1**). Несмотря на достаточную стабильность этого комплекса, оцененную потенциометрическим методом ( $\lg K = 15.2 \pm 0.6$ ) и высокую величину сорбции ионов меди на ГАП<sub>0</sub>, оказалось, что при сорбции комплекса происходит его распад.



**Рис. 46.** Спектр поглощения комплекса (**1**) в водном растворе (А); Кинетическая кривая сорбции (**1**) на ГАП<sub>0</sub> [206]

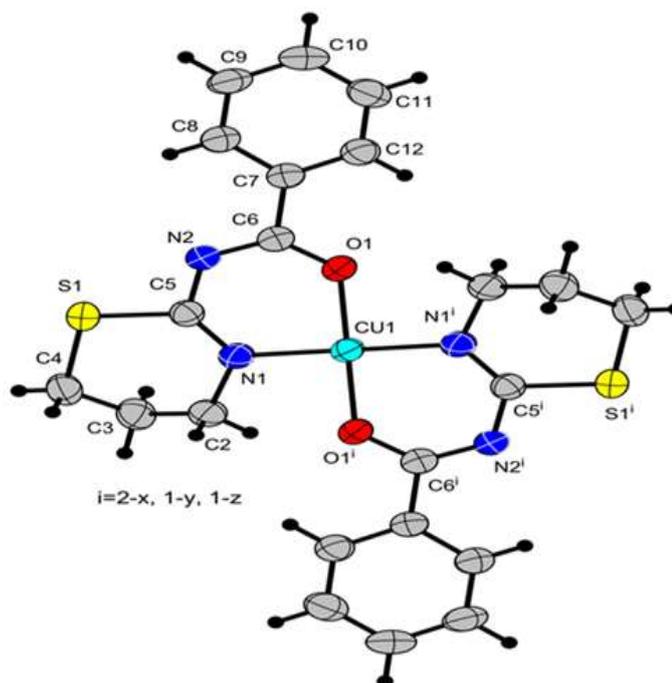
При этом ионы меди сорбируются на твердой фазе (происходит окрашивание ГАП в синий цвет), а лиганд (**рис. 46**) остается в растворе, т. е. происходит ионный обмен с кальцием. Выход ионов кальция при сорбции меди на ГАП может косвенно характеризовать степень протекания этого обменного процесса, что показано **на рис. 18А** (в эксп. части).

Аналогичная картина наблюдалась и в случае ГАП<sub>Е</sub>. Это может происходить из-за более выгодного связывания лиганда с ионами кальция, которые вытесняются из структуры ГАП ионами меди, обладающими высоким сродством к нему. Однако и сорбции индивидуального лиганда на структурах ГАП также не наблюдалось (см. выше).

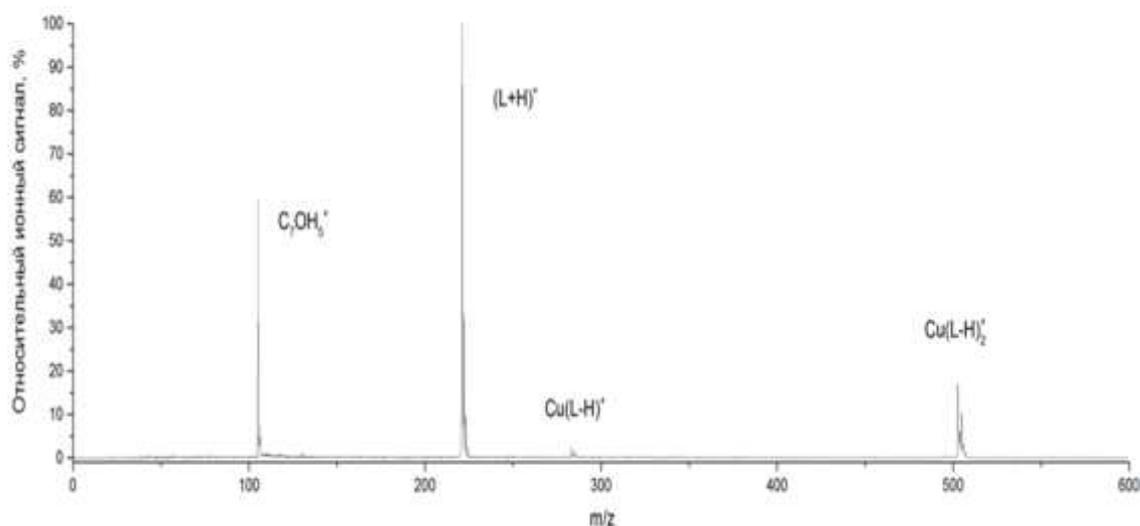
Для комплекса  $CuL^1_2$  (**2**) был выполнен РСА (на Химическом факультете МГУ, см. данные в приложении) и получены следующие параметры:  $M = 502.09$ , моноклинная,

пространственная группа  $P2_1/n$ , 295(2) К,  $a = 6.8403(4)$ ,  $b = 13.5674(6)$  и  $c = 11.5670(6)$  Å,  $\beta = 97.162(4)^\circ$ ,  $Z = 2$ ,  $V = 1065.10(10)$  Å<sup>3</sup>,  $d_{\text{calc}} = 1.566$  г/см<sup>3</sup>,  $F(000) = 518$ , размеры кристалла  $21 \times 16 \times 12$  мм. Данные по структуре находятся в CCDC № 2027415. Молекулярная структура комплекса приведена на **рис. 47**.

В комплексе  $\text{CuL}_2$ , как следует из полученных данных, медь находится в состоянии Cu(II). В масс-спектре (**рис. 48**) комплекса **2** наблюдаются две группы пиков, содержащих атомы меди с  $m/z$  503–507 и 283–286, что соответствует  $\text{Cu(L-H)}^{2+}$  и его фрагментарному иону  $\text{Cu(L-H)}^+$ . Масс-спектр также содержит две группы пиков с  $m/z$  221 и 105, соответствующие протонированным молекулам лиганда и его фрагментарному иону.



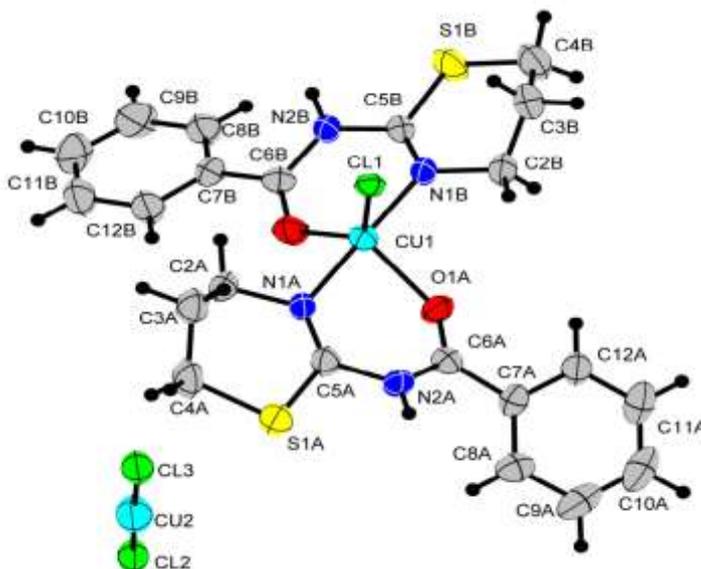
**Рис. 47.** Молекулярная структура комплекса  $\text{CuL}_2$  (**2**)



**Рис. 48.** Масс-спектр LETDI комплекса  $\text{CuL}_2$ , полученный в режиме регистрации положительных ионов

Следует учитывать, что присутствие некоторого количества несвязанного лиганда приводит к появлению значимого сигнала в масс-спектре (повышение интенсивности пиков), так как эффективность ионизации высокоосновных ионов (как лиганд) значительно выше, чем у металлоорганических соединений (как комплекс).

Для комплекса  $\text{Cu}_2\text{L}^1_2\text{Cl}_3$  (**3**) (зеленый). рентгено-структурный анализ (РСА) (выполнено на Химическом факультете МГУ, см. данные в приложении) показал следующие характеристики:  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{Cl}_3\text{Cu}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ ,  $M = 674$ , триклинная, пространственная группа  $P_1$ , 295(2) К,  $a = 8.6885(7)$ ,  $b = 12.8230(9)$  и  $c = 12.8264(9)$  Å,  $\alpha = 81.014(7)^\circ$ ,  $\beta = 87.864(6)^\circ$ ,  $\gamma = 70.607(7)^\circ$ ,  $Z = 2$ ,  $V = 1331.24(18)$  Å<sup>3</sup>. Данные по структуре находятся в CCDC № 2050373. Молекулярная структура комплекса приведена на **рис. 49**.

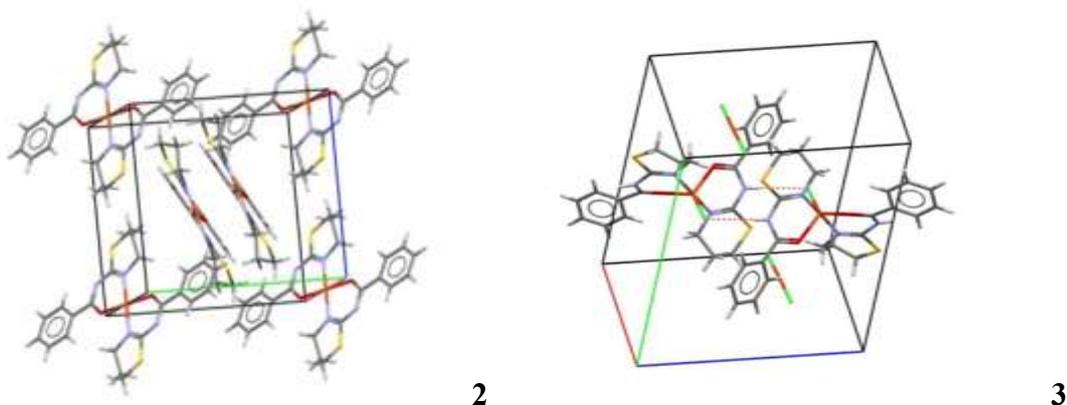


**Рис. 49.** Молекулярная структура комплекса  $\text{Cu}_2\text{L}^1_2\text{Cl}_3$  (**3**), соответствующая  $\text{CuL}^1_2\text{Cl} \cdot 2\text{CuCl}$

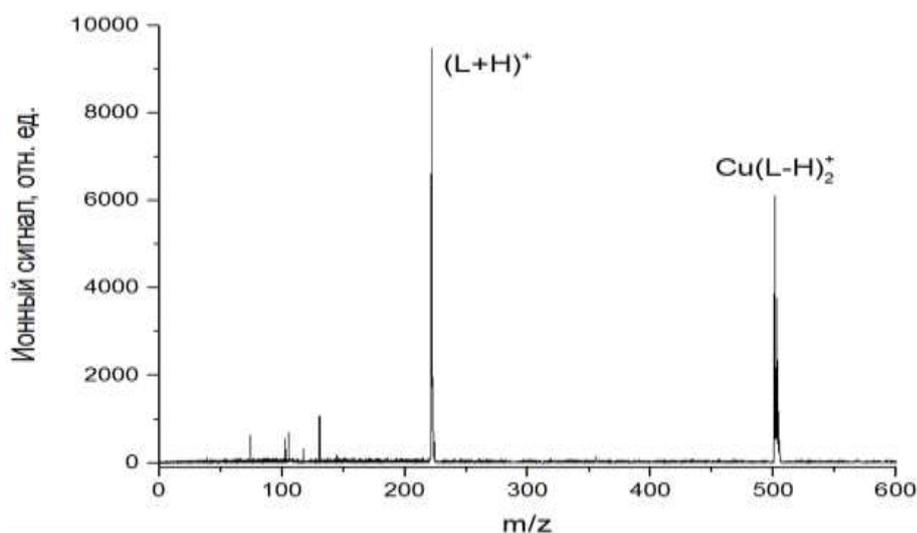
В  $\text{Cu}_2\text{L}^1_2\text{Cl}_3$  (**3**) медь находится в двух состояниях Cu(I) и Cu(II). При переходе от одного комплекса к другому происходит частичное восстановление меди(II) (при избытке лиганда) и наблюдается увеличение длин связей  $\text{Cu} \cdots \text{O}$  с 1,908(2) (2) до 2,055(3)–2,062(3) Å (1) и уменьшение длины связи  $\text{Cu} \cdots \text{N}$  от 1,985(2) (2) до 1,956(3)–1,958(3) Å (1). Происходит и изменение значений торсионных углов. Кроме того, в комплексе (**2**) расстояние  $\text{C}=\text{O} \cdots \text{Cu}$  [1,277(2) Å] больше по сравнению с комплексом (**3**) [1,234(5)–1,235(5) Å]. Упаковка молекул комплексов **2** и **3** в кристаллы представлена на **рис. 50**.

На масс-спектре LETDI (выполнено на базе ГЕОХИ РАН) комплекса  $\text{CuL}^1_2\text{Cl}_2$  (**4**) (ярко-зеленый) (**рис. 51**), полученном в режиме регистрации положительных ионов при капельном нанесении из раствора метанола на кремниевую подложку, видны две группы пиков: первая соответствует ионам протонированных молекул  $\text{L}^1$ , вторая соответствует молекулярным ионам комплекса с соотношением меди и лиганда, как  $\text{Cu} : \text{L}^1 = 1 : 2$ . Пики

с максимальной интенсивностью характеризуются величинами  $m/z$  221 и 501, соответственно.



**Рис. 50.** Упаковка молекул комплексов (2) и (3) в кристалл

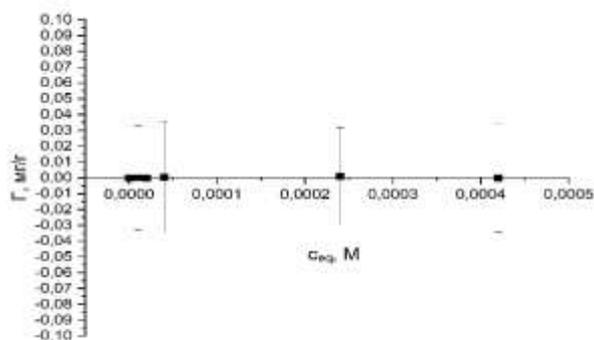


**Рис. 51.** Масс-спектр LETDI комплекса  $\text{CuL}_2\text{Cl}_2$ , полученный в режиме регистрации положительных ионов [196]

Данный комплекс оказался неустойчивым в водной среде, где происходит его разложение с выделением ионов меди и окрашиванием раствора в голубой цвет. Однако в водно-этанольной среде и в этаноле его устойчивость достаточно высокая.

Полученная для комплекса (4) изотерма сорбции на  $\text{ГАП}_0$  (рис. 52) указывает на отсутствие процесса сорбции.

Было исследовано взаимодействие транспортного белка крови БСА с ионами меди(II), с  $\text{L}^1$  и с комплексом  $\text{CuL}_2\text{Cl}_2$  (4) методом флуоресценции. Для оценки связывания малых молекул с белком используют константу Штерна–Волмера, связывающую гашение



**Рис. 52.** Изотерма сорбции  $\text{CuL}^{12}\text{Cl}_2$  на  $\text{GAPO}$  [212]

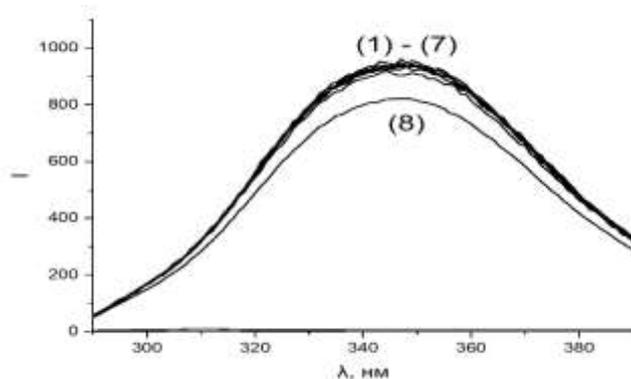
флуоресценции белка с концентрацией малой молекулы в исходном растворе. График Штерна–Волмера строится по уравнению:

$$I_0/I = 1 + K_{SV} \cdot \lg[Q],$$

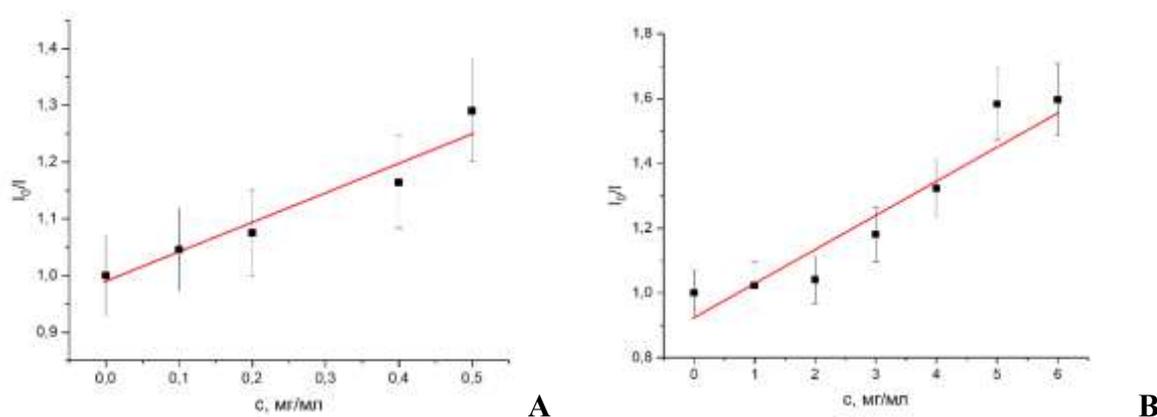
где  $I_0$  и  $I$  – интенсивность флуоресценции белка в отсутствие и в присутствии гасителя (исследуемой малой молекулы);  $K_{SV}$  – константа Штерна–Волмера;  $[Q]$  – концентрация гасителя. Отклонения от линейности реального графика зависимости  $I_0/I$  от  $[Q]$  свидетельствуют о наличии более чем одного сайта связывания и о более сложном механизме взаимодействия белка с молекулой.

Оказалось, что взаимодействия несвязанного лиганда с белком не происходит (**рис. 53**), в то же время для ионов меди и для комплекса взаимодействие происходило и были получены прямые Штерна–Волмера (**рис. 54**).

В этих случаях константы Штерна–Волмера составили 1.86 мл/мкмоль для меди(II) и 8.79 мл/мкмоль для комплекса (4).



**Рис. 53.** Зависимость интенсивности флуоресценции для систем  $\text{BSA-L}^1$  разной концентрации (1-7),  $\text{BSA}$  (8) [212]



**Рис. 54.** График Штерна–Волмера для систем: БСА–Cu - уравнение  $y = 0.5376x + 0.9863$ ,  $R^2 = 0.9394$  (А); БСА–CuL<sup>1</sup>Cl<sub>2</sub> – уравнение  $y = 0.113x + 0.9076$ ,  $R^2 = 0.9117$  [212]

Даже при небольшом изменении условий синтеза комплекс **4** может переходить в комплекс CuL<sup>1</sup>Cl<sub>2</sub> (**5**) (и наоборот), для которого были получены данные элементного анализа и спектры ЯМР. Таким образом, наблюдается высокая вариабельность комплексов меди с лигандом L<sup>1</sup> в зависимости от условий получения и среды.

#### 4.2.2. Сравнение цитотоксичности полученных комплексов меди *in vitro* на клеточных линиях

(Работы с клетками выполнены на базе МНИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева и НИИ Биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича)

Сравнение цитотоксичности изученных комплексов методом МТТ представлено в **табл. 12**.

Очевидно, что максимальный эффект воздействия на лейкемические клетки достигается в присутствии комплекса **2**, в котором отсутствуют ионы хлора, а ионы меди находятся в состоянии Cu(II). Считается, что Cu(I) является более цитотоксичной по отношению к раковым клеткам [10], однако данные **табл. 12** говорят о том, что, видимо, не столько валентность меди имеет значение при воздействии на раковые клетки, сколько строение комплекса и входящие в комплекс компоненты, причем строение комплекса, по-видимому, важнее.

Комплекс меди с 2-аминопиримидином (AP) аналогично с таким же комплексом цинка имеют небольшой терапевтический индекс (ТИ) по отношению к клеткам острых лейкозов и практически не воздействует на клетки хронического миелолейкоза (*K-562*). В целом, видно, что комплексы меди имеют повышенное влияние на разновидности клеток острого Т- (*MOLT-4*, *Jurkat*) и отчасти В- лимфобластного лейкоза.

Симбиоз ГАП<sub>0</sub>-Zn, как и исходный ГАП<sub>0</sub> не проявляют цитотоксичности ни к здоровым, ни к лейкемическим клеткам. Наночастицы ГАП<sub>0</sub>-Cu воздействуют примерно одинаково как на *MOLT-4* (Т-ОЛЛ), так и на *K-562*, т. е. не проявляют селективности среди

лейкемических линий клеток. Серьезной токсичности по отношению к лимфоцитам здоровых доноров ни один из представленных комплексов не проявляет.

Комплекс  $\text{Cu}(\text{AP})_2\text{Cl}_4$  (1) был использован для оценки механизма его цитотоксического воздействия через определение раннего и позднего апоптоза здоровых лимфоцитов и клеточной линии *Jurkat* в его присутствии.

**Таблица 12.** Выживаемость ( $\text{LC}_{50}$ ) клеток под действием различных образцов-комплексов\*.

Комплекс	$\text{LC}_{50}$ , мкмоль/мл							
	ЗД	<i>Jurkat</i>	<i>B-ОЛЛ</i>	<i>T-ОЛЛ</i>	<i>Molt-4</i>	<i>K-562</i>	<i>ОМЛ</i>	$\text{TI}_{\text{max}}$
$\text{Cu}(\text{AP})_2\text{Cl}_4$ (1)	$0.38 \pm 0.05$	-	$0.26 \pm 0.03$	$0.11 \pm 0.02$	-	$0.35 \pm 0.04$	$0.25 \pm 0.04$	3.5
$\text{CuL}^1_2$ (2)	$0.52 \pm 0.08$	$(20 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$	-	-	-	-	-	258
$\text{Cu}_2\text{L}^1_2\text{Cl}_3$ (3)	$0.65 \pm 0.05$	$0.057 \pm 0.012$	-	-	-	-	-	11.4
** $\text{Zn}(\text{AP})_2\text{Cl}_2$	$0.24 \pm 0.02$	-	$0.061 \pm 0.005$	-	$0.062 \pm 0.005$	-	-	4.0
ГАП <sub>0</sub> -Cu	> 5	-	-	-	$2.1 \pm 0.1$	$2.5 \pm 0.5$	-	-
ГАП <sub>0</sub> -Zn	> 5	-	-	-	> 5	> 5	-	-
ГАП <sub>0</sub>	>> 5	-	-	-	> 5	> 5	-	-
$\text{L}^1$	$10.6 \pm 2.3$	$0.92 \pm 0.09$			$1.2 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.3$		11.5
$\text{L}^2$	$0.5 \pm 0.2$	$0.41 \pm 0.02$			$0.10 \pm 0.03$	$0.14 \pm 0.05$		3.5

\*\* Обозначение типов клеток: ЗД – здоровых доноров; В-ОЛЛ – острого В-лимфобластного лейкоза (линейные); Т-ОЛЛ – острого Т-лимфобластного лейкоза; ОМЛ – острого миелоидного лейкоза.  $\text{TI}_{\text{max}} = \text{LC}_{50}(\text{ЗД})/\text{LC}_{50}(\text{лейкемич. клетки})$  – максимальный полученный терапевтический индекс (клетки, для которых произведен расчет, выделены); \* - комплекс предоставлен для испытания к. х. н. Трофимовой Т. П.; AP – 2-аминопиримидин.

Полученные результаты представлены на **рис. 55, 56** и в **табл. 13**. Как на здоровые клетки, так на линию *Jurkat* AP и его комплекс (1) воздействуют, увеличивая процент раннего апоптоза, причем комплекс увеличивает этот процесс примерно в 1.4 раза больше, чем AP в случае здоровых лимфоцитов. На лейкемические клетки AP оказывает меньшее воздействие, чем на здоровые, а комплекс усиливает воздействие таким образом, что

практически все клетки попадают в апоптоз, причем ранний апоптоз имеет в 5 раз большее преимущество.

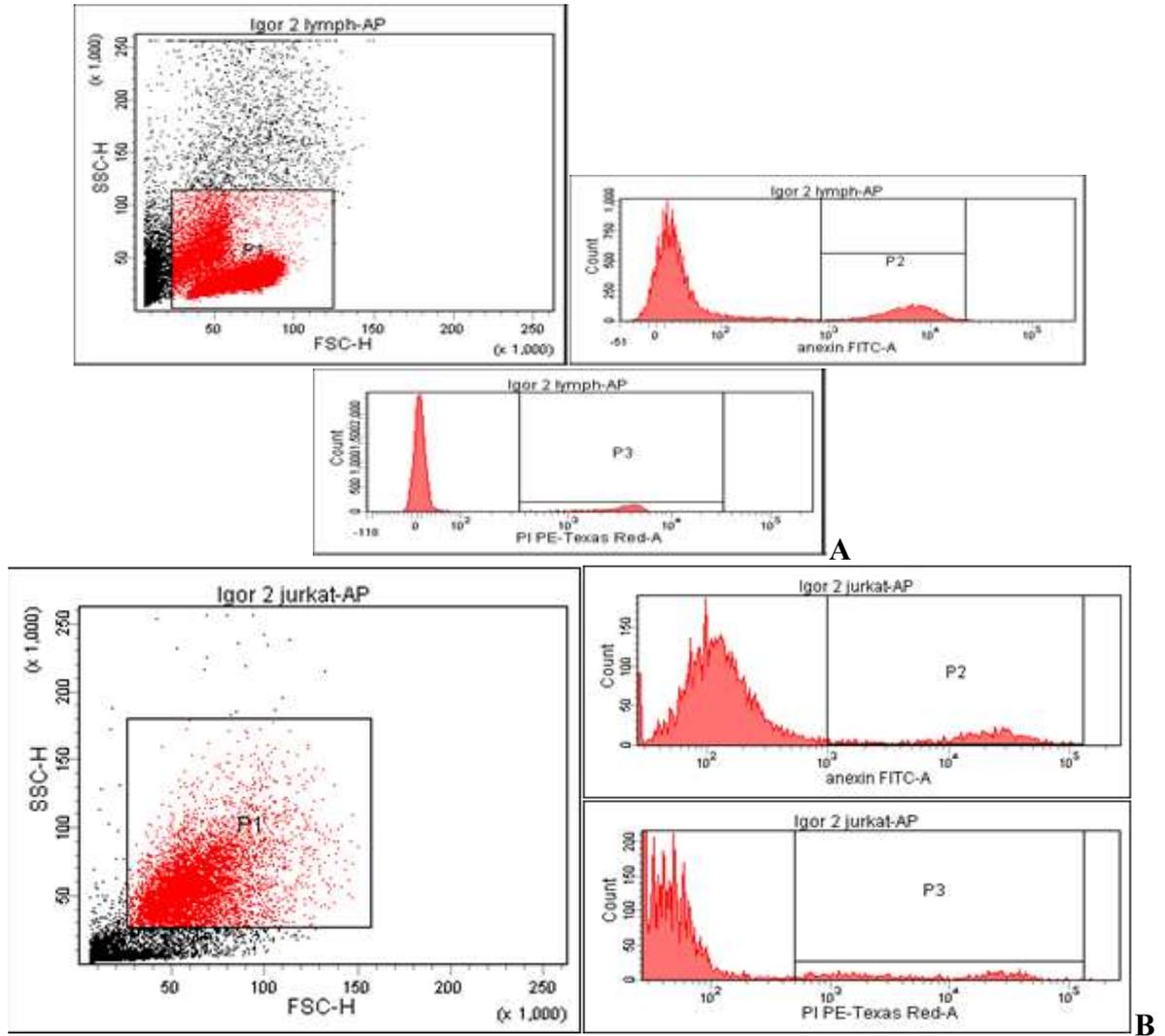


Рис. 55. Ранний и поздний апоптоз нормальных лимфоцитов (А) и клеточной линии *Jurkat* (В) под действием АР (получено методом проточной цитометрии). [204]

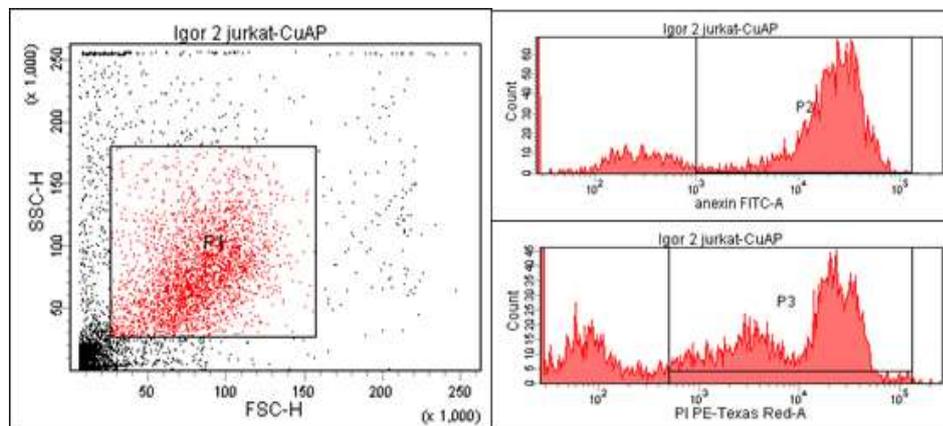


Рис. 56. Ранний и поздний апоптоз клеточной линии *Jurkat* под действием комплекса (1) [196]

#### 4.2.3. Распределение комплексов *in vivo* в органах на мышинной модели [публикации автора 196]

Для понимания поведения комплексов в организме: распределения/накопления и выведения комплексов – была использована мышинная модель и радионуклид  $^{67}\text{Cu}$ . Было показано, что соотношение удельной активности по отношению к введенной в печени и почках зависит от того, используется препарат с носителем или без носителя (табл. 9 и 10). В последнем случае преобладает выведение через почки, что может быть и результатом потери радионуклида в организме, т. е. разложения комплекса. Однако в препарате с носителем наблюдается небольшая зависимость от времени нахождения комплекса в организме мыши: чем больше время нахождения, тем выше содержание в печени. Это может быть результатом того, что в печени имеется мишень, реагирующая с комплексом, что задерживает его выведение из организма.

**Таблица 13.** Цитотоксичность ( $\text{LC}_{50}$ ) и количественные данные определения раннего и позднего апоптоза, полученные методом проточной цитометрии, для клеток нормальных лимфоцитов (HD) и лейкемической клеточной линией *Jurkat*, обработанных AP и комплексом (1).

Клетки	Соединение	Количество клеток	Ранний апоптоз, $\alpha$ , %	Поздний апоптоз, $\beta$ , %	Соотношение $\alpha/\beta$
ЗД	-	2870	7.9	12.3	0.64
ЗД	AP	22.031	22.1	16.8	1.32
ЗД	комплекс (1)	22774	30.9	22.8	1.36
<i>Jurkat</i>	-	2524	7.9	17.5	0.45
<i>Jurkat</i>	AP	6523	16.3	13.4	1.21
<i>Jurkat</i>	комплекс (1)	3033	79.1	15.5	5.1

**Таблица 14.** Распределение удельной активности комплекса (3) между печенью и почками мышей.

образец, меченный $^{67}\text{Cu}$	Время экспозиции, мин		Ауд., %		
	реакции обмена	нахождения в мышцах	печень	почки	отношение печень/почки
комплекс (1)	30	35	$50 \pm 5$	$50 \pm 5$	1
комплекс (1)	30	60	$60 \pm 5$	$40 \pm 5$	1.5
комплекс (1)	без носителя	60	$22 \pm 6$	$78 \pm 4$	0.28

Это косвенно подтверждается результатами *in vivo* воздействия комплекса (4), где также

наблюдается рост содержания комплекса в печени при увеличении времени выдерживания его в организме.

**Таблица 15.** Удельная активность препаратов в органах мыши при введении радионуклида без носителя.

Образец, меченный $^{67}\text{Cu}$	Время экспозиции в мышши без носителя, мин	Ауд., Бк/г					
		мозг	сердце	легкие	печень	почки	отношение печень/почки
комплекс (4)	15	$0.26 \pm 0.05$	$2.1 \pm 0.3$	$1.26 \pm 0.09$	$0.24 \pm 0.02$	$0.68 \pm 0.07$	0.35
комплекс (4)	30	$0.30 \pm 0.04$	$1.8 \pm 0.2$	$1.5 \pm 0.2$	$0.35 \pm 0.04$	$0.62 \pm 0.08$	0.56
комплекс (4)	60	-	$1.7 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.2$	$0.45 \pm 0.05$	$0.61 \pm 0.05$	0.74
$^{67}\text{CuCl}_2$	15	$0.21 \pm 0.02$	$2.1 \pm 0.4$	$1.9 \pm 0.1$	$0.21 \pm 0.02$	$0.82 \pm 0.08$	0.26
$^{67}\text{CuCl}_2$	60	-	$1.7 \pm 0.1$	-	$0.23 \pm 0.02$	$0.74 \pm 0.06$	0.31

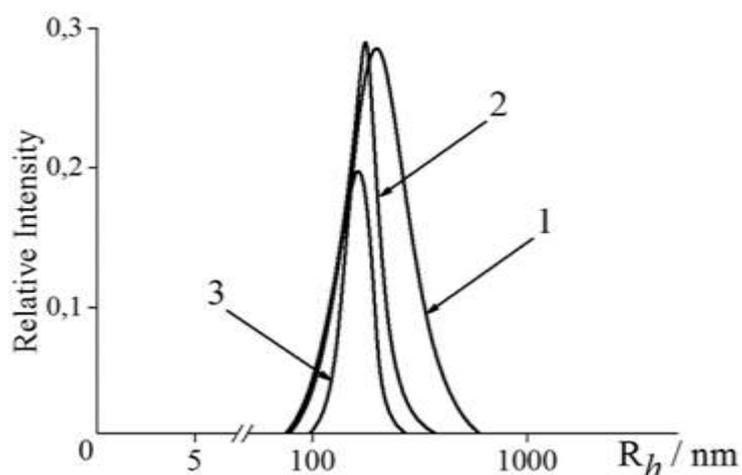
**Краткий вывод.** Впервые были синтезированы комплексы **1** и **4**, меченные  $^{67}\text{Cu}$  с носителем и без носителя, и получено распределение активности в органах мыши при разном времени нахождения радиоактивного препарата в организме (табл. 14 и 15). Интерес представляет соотношение активности в печени и почках, как системах выведения препаратов из организма. Различие в распределении комплексов (без носителя) и свободных ионов меди-67 ( $^{67}\text{CuCl}_2$ ) по органам незначительное за исключением печени и почек, где для обоих комплексов превалирует выведения через почки, но в случае комплекса **4** соотношение печень/почки примерно в 1.5-2 раза выше, чем для свободных ионов меди, а для комплекса **1** различий не наблюдается. Однако в случае использования носителя для комплекса **1** наблюдается почти равное распределения между системами экскреции. В целом, можно предполагать, что полученные распределения говорят о частичном или даже полном разложении комплексов или о перехелатировании ионов меди, особенно в случае, когда радионуклид используется без носителя. При этом не исключено, что для комплекса **1** в печени имеется биологическая мишень. Комплексы проявляют цитотоксичность по отношению к различным линиям лейкемических клеток, вызывая значительный апоптоз, причем в ряде случаев преимущественно ранний апоптоз.

### 4.3. Карбоксиметилцеллюлоза и микрогели на ее основе [публикации автора 213,214]

Синтез полимерных микрогелей (двойных комплексов) с ионами меди(II) был проведен при различных мольных соотношениях мономерных звеньев анионного полимера [моно-единица КМЦ] и ионов  $[Cu^{2+}]$ . Во всех полученных комплексах КМЦ–Cu (I–III) концентрация КМЦ была постоянной и составляла  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л, а варьировали  $[Cu^{2+}]$  таким образом, чтобы мольное отношение  $Q_1 = [Cu^{2+}]/[\text{моноединица КМЦ}]$  изменялось от 0.07 до 0.14. Были получены хорошо растворимые в воде волокнистые светло-голубые продукты. Спектрофотометрическое определение меди в полученных продуктах, основанное на способности поглощения ярко-синего аммиачного комплекса меди (табл. 16) показало, что оно в них совпадает с содержанием меди в реакционных смесях  $Q_1$ , и это свидетельствует о количественном связывании ионов меди с КМЦ, а содержание  $Cu^{2+}$  в образцах I–III напрямую определяется составом реакционной смеси.

**Таблица 16.** Результаты определения меди в образцах КМЦ–Cu.

Образцы	$A_{ср.}$	$m_{доб.}(Cu)$ на 1 мг КМЦ, мг	$m_{теор.}(Cu)$ на 1 мг КМЦ, мг	$m_{эксп.}(Cu)$ на 1 мг КМЦ, мг	Доверительный интервал, мг
I	0.1377	0.03	0.03	0.03	$\pm 0.01$
II	0.1139	0.04	0.04	0.04	$\pm 0.01$
III	0.1850	0.05	0.05	0.05	$\pm 0.01$



**Рис. 57.** Функция распределения размеров частиц в водных растворах образцов I (1), II (2), III (3) [213]

Значения гидродинамических диаметров исследуемых частиц уменьшаются по мере увеличения содержания ионов меди от 380 нм для (I) до 340 нм для (III) (рис. 57, табл. 17). Диаметр исходных макромолекул КМЦ в водном растворе составляет ~400 нм. Значения индекса полидисперсности (PDI) частиц образцов I–III также уменьшаются с увеличением

содержания ионов меди: от 0.34 для (I) до 0.27 для (III), в то время как для КМЦ эта величина составляет 0.38 (табл. 17).

**Таблица 17.** Гидродинамические и электрокинетические характеристики водных растворов частиц КМЦ–Cu<sup>2+</sup> с различным содержанием ионов меди.

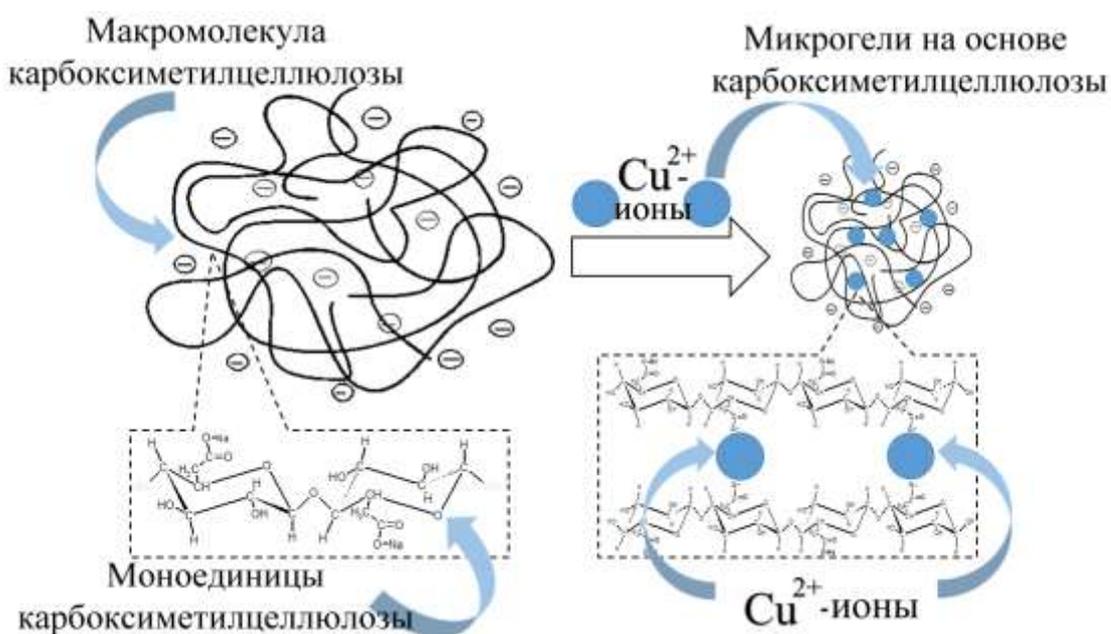
Образец	№	Q <sub>1</sub>	Гидродинамический диаметр, нм	PDI	ЭФП, мкм/с/(В/см)
КМЦ–Cu <sup>2+</sup>	I	0.07 ± 0.01	340 ± 12	0.34	-(2.41 ± 0.02)
КМЦ–Cu <sup>2+</sup>	II	0.11 ± 0.01	370 ± 12	0.32	-(2.90 ± 0.01)
КМЦ–Cu <sup>2+</sup>	III	0.14 ± 0.01	380 ± 11	0.27	-(3.19 ± 0.01)
КМЦ		0	400 ± 14	0.38	-(3.21 ± 0.06)

Электрокинетические характеристики водных растворов (I–III), изученные методом лазерного микроэлектрофореза (табл. 17) показали, что все образцы характеризуются отрицательными значениями электрофоретической подвижности (ЭФП), которые изменяются по мере увеличения содержания ионов меди от -3.19 мкм/с/(В/см) для (I) до -2.41 мкм/с/(В/см) для (III). Для исходного полисахарида КМЦ эта величина составляет -3.21 мкм/с/(В/см). Очевидно, что частицы (I–III) характеризуются существенно меньшими размерами и значениями PDI по сравнению с исходными макромолекулами КМЦ. Этот результат обусловлен изменением конформации (поджатием) макромолекул КМЦ за счет образования мостиковых электростатических контактов между фрагментами макромолекул полисахарида через ионы меди. Этот процесс сопровождается формированием микрогелевой структуры частиц КМЦ–Cu<sup>2+</sup>. Кроме того, микрогели I–III, а также исходные макромолекулы КМЦ характеризуются высокой агрегативной (коллоидной) устойчивостью. Таким образом, как и ожидалось, увеличение количества связанных ионов Cu<sup>2+</sup> вызывало частичную нейтрализацию ЭФП полисахарида для комплекса III с максимальным содержанием меди. Значительный суммарный отрицательный заряд частиц микрогеля КМЦ–Cu<sup>2+</sup> обеспечил им устойчивость к агрегации в окружающей воде.

В табл. 18 для сравнения были получены характеристики для связывания с КМЦ

ионов цинка. Видно, что результаты значительно различаются, хотя в обоих случаях агрегативная устойчивость высокая. Однако известно, что не только средние или суммарные свойства определяют электрофоретическую подвижность частицы, но также и характер распределения этих свойств по поверхности играет важную роль.

Измерения дзета-потенциала коллоидных частиц при помощи электрофоретических методов позволяет определить лишь эффективный средний потенциал частицы, который может резко отличаться от локальных значений. Поскольку цинк и медь имеют достаточно близкие размеры атома, полученные различия характеризуют изменения в распределении заряда по поверхности в результате неравномерности в связывании этих ионов с КМЦ. Связывание ионов меди с КМЦ схематично представлено на **рис. 58**.

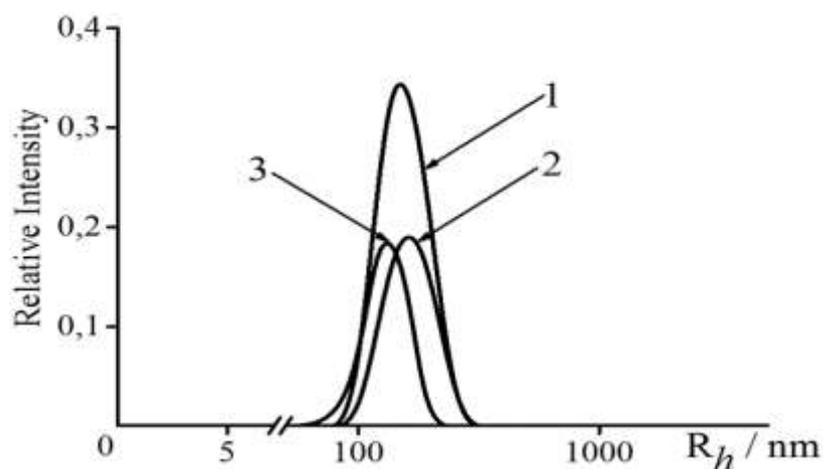


**Рис. 58.** Схема связывания иона меди с единицами КМЦ [214]

**Таблица 18.** Гидродинамические и электрокинетические характеристики образцов КМЦ–Zn (0.15 моль/л, pH 7).

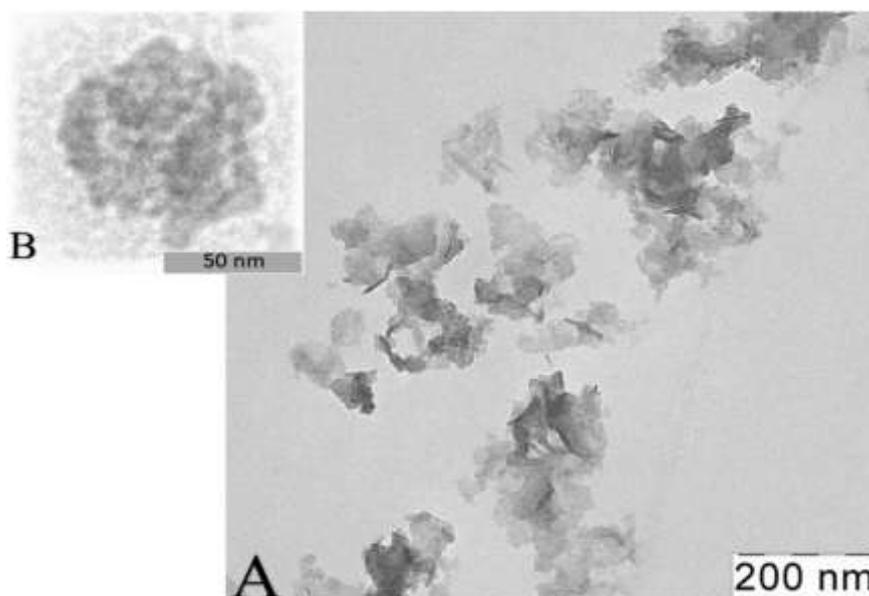
Образец	Zn/КМЦ = 1/10	Zn/КМЦ = 1/7	Zn/КМЦ = 1/5	КМЦ, исходный
Диаметр частиц, нм	180	190	160	380
ЭФП, (мкм/с)/(В/см)	-2.0	-2.0	-2.0	-3.2
Дзета-потенциал, мВ	-25.5	-25.5	-25.5	-29.3
PDI	0.17	0.15	0.12	0.19

При использовании физиологического раствора ( $0.15 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1} \text{ NaCl}$ ) гидродинамические диаметры значительно уменьшаются, и функция распределения частиц по размерам изменяется в зависимости от содержания ионов меди (**рис. 59**). Частицы микрогеля КМЦ–Cu ( $10 \div 1$ ) визуализировали с помощью ПЭМ. На ПЭМ-изображении микрогеля присутствуют участки серого цвета, размер которых варьируется в широком диапазоне от 80 до 400 нм (**рис. 60А**). Наименьшие объекты в поле микроскопа имеют размер 80 нм.



**Рис. 59.** Функция распределения размеров частиц в физиологическом растворе для образцов I (1), II (2), III (3) [213]

Они характеризуют отдельные частицы микрогеля (**рис. 60В**). Более крупные объекты, наблюдаемые в поле микроскопа, характеризуют агрегаты микрогеля, при этом отдельные частицы микрогеля КМЦ–Cu ( $10 \div 1$ ) являются сферически-симметричными.



**Рис. 60.** ПЭМ-изображение микрогеля КМЦ–Cu ( $10 : 1$ ): А) отдельные и агрегатные частицы; В) индивидуальные частицы микрогеля [213]

При связывании **I-III** с 2-аминопиримидином (AP), как модельным представителем лекарственного средства (т.к. на основе AP синтезированы многие антиопухолевые (и, в частности, антилейкемические препараты) были получены частицы **IV-VI**, где мольное соотношение  $[KMЦ] \div [AP]$  поддерживали равным 2 : 1. Определение AP в микрогелях приведено в **табл. 19**. Образцы **IV-VI**, полностью растворялись в воде при концентрации 0.1 % вес. Количественное отношение реагентов в трехкомпонентных системах даны в **табл. 20**.

**Таблица 19.** Определение AP в микрогелях.

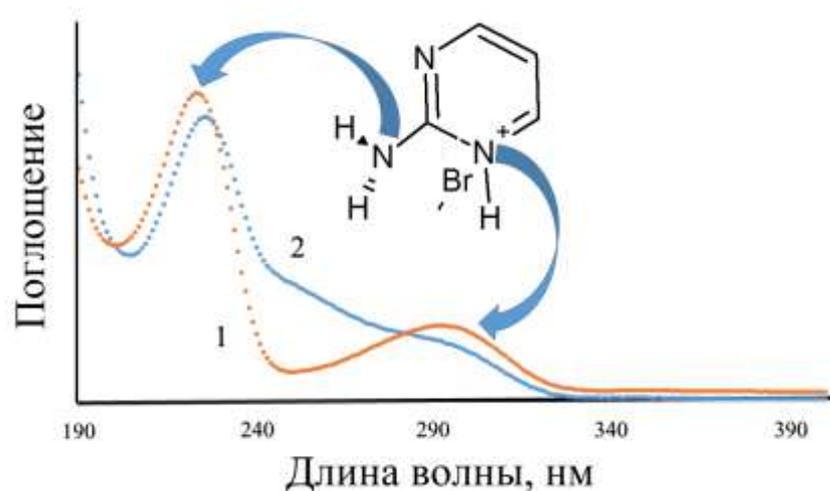
Масса растворенного образца, г	Отношение КМЦ/Cu	Концентрация начального раствора КМЦ, М	Концентрация AP по калибровке, М	Масса AP, г	Концентрация AP до растворения, М	Масса AP <sub>теор.</sub> для 100% выхода, г	% вставки в КМЦ
0.0028	7	0.00187	$5.51 \cdot 10^{-7}$	$3.675 \cdot 10^{-5}$	$5.51 \cdot 10^{-5}$	$1.62 \cdot 10^{-4}$	22.64
0.032	10	0.00213	$2.02 \cdot 10^{-6}$	$5.38 \cdot 10^{-5}$	$8.07 \cdot 10^{-5}$	$1.875 \cdot 10^{-4}$	28.67
0.052	15	0.00333	$6.79 \cdot 10^{-5}$	$6.79 \cdot 10^{-4}$	$1.02 \cdot 10^{-4}$	$2.95 \cdot 10^{-4}$	23.01

Спектр исходного AP (**рис.61(1)**) содержит два пика: при  $\lambda = 210$  и  $290$  нм, отвечающих поглощению амидной группы и ароматического гетероцикла в протонированной форме, соответственно. В свою очередь, поглощение КМЦ практически полностью отсутствует. Типичный спектр комплекса (на примере **IV**) представлен на **рис. 61(2)**. В спектре наблюдается существенное уменьшение интенсивности пика с  $\lambda = 290$  нм. При этом интенсивность пика при  $\lambda = 210$  нм остается неизменной. Очевидно, это изменение связано с образованием электростатического контакта между положительно заряженным фрагментом AP (протонированным ароматическим гетероциклом) и карбоксильной группой в составе полисахарида.

Введение третьего составляющего (AP) приводит к уменьшению размеров частиц за счет дальнейшего сжатия (**табл. 21**). Еще большее уменьшение гидродинамического диаметра наблюдается в физиологическом растворе (**рис. 62**) и, далее, в физиологическом растворе, содержащем бычий сывороточный альбумин (БСА) (**табл. 22, рис. 63**). Последнее происходит, видимо, вследствие экранирования зарядов карбоксильных групп КМЦ, ответственных за набухание макромолекулы, зарядами небольших противоионов натрия.

**Таблица 20.** Количественное отношение реагентов в трехкомпонентных нано/микрогелях КМЦ-Cu(II)-AP.

Образцы	Молярное отношение элементов КМЦ/Cu	КМЦ, моль	Cu <sup>2+</sup> , моль	AP, моль
<b>IV</b>	15/1	$2 \cdot 10^{-4}$	$2.00 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$
<b>V</b>	10/1	$2 \cdot 10^{-4}$	$2.86 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$
<b>VI</b>	7/1	$2 \cdot 10^{-4}$	$4.00 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$



**Рис. 61.** УФ-спектры отдельно AP (1) и комплекса IV (2)

**Таблица 21.** Гидродинамические и электрокинетические характеристики водных растворов IV-VI.

Образец	№	Q <sub>1</sub>	Отношение: КМЦ ÷ AP (моль)	D <sub>h</sub> , нм	PDI	ЭФП, мкм/с/(В/см)
КМЦ-Cu <sup>2+</sup> -AP	<b>IV</b>	$0.07 \pm 0.01$	2 ÷ 1	$350 \pm 12$	0.31	$-(1.90 \pm 0.05)$
КМЦ-Cu <sup>2+</sup> -AP	<b>V</b>	$0.11 \pm 0.01$	2 ÷ 1	$360 \pm 15$	0.30	$-(2.02 \pm 0.02)$
КМЦ-Cu <sup>2+</sup> -AP	<b>VI</b>	$0.14 \pm 0.01$	2 ÷ 1	$370 \pm 15$	0.26	$-(2.03 \pm 0.02)$

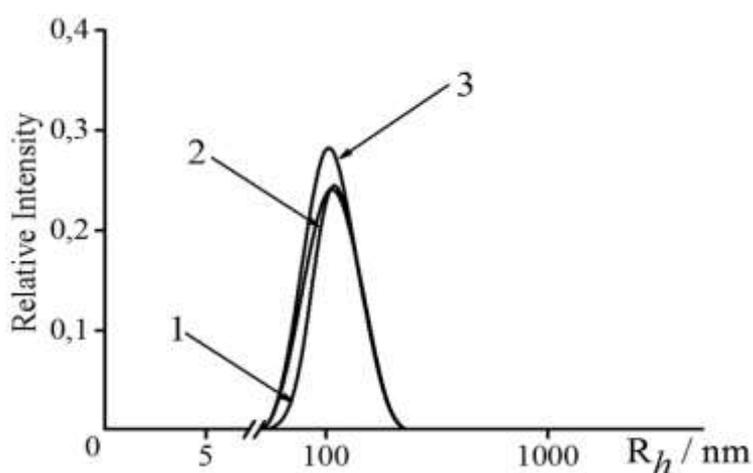
Добавление БСА в физиологической концентрации (40 мг/мл) незначительно уменьшало размер тройного микрогеля, указывая, по-видимому, на протекания слабого связывания.

Из электрокинетических параметров следует, что связывание АР сопровождается дополнительной нейтрализацией отрицательного заряда частиц бинарного комплекса КМЦ–Cu<sup>2+</sup> (табл. 23). Это также указывает на электростатический характер связывания АР через образование солевых мостиков между протонированным азотом в молекулах АР и карбоксильными группами в макромолекуле полисахарида, что описано в литературе.

**Таблица 22.** Размеры микрогелей КМЦ–Cu<sup>2+</sup>–АР в физиологическом растворе и в физиологическом растворе, содержащем БСА.

Образец	Гидродинамический диаметр, нм	
	Физиологический раствор (0.15 М NaCl)	Физиологический раствор + 40 мг/мл р-р БСА
<b>IV</b>	200 ± 9	195 ± 7
<b>V</b>	210 ± 8	205 ± 5
<b>VI</b>	220 ± 8	215 ± 5

В образовавшемся тройном комплексе КМЦ–Cu<sup>2+</sup>–АР степень свободных (некомплексных) анионных групп КМЦ составила  $A = 1 - 2Q_1 - Q_2 = 0.36$  (каждый ион Cu<sup>2+</sup> образовывал два ионных мостика с ионными группами КМЦ,  $Q_2 = [AP]/[\text{мономерное звено КМЦ}] = 0.5$  – молярное соотношение компонентов в системе), что, тем не менее, было достаточным для стабилизации тройного комплекса от агрегации.



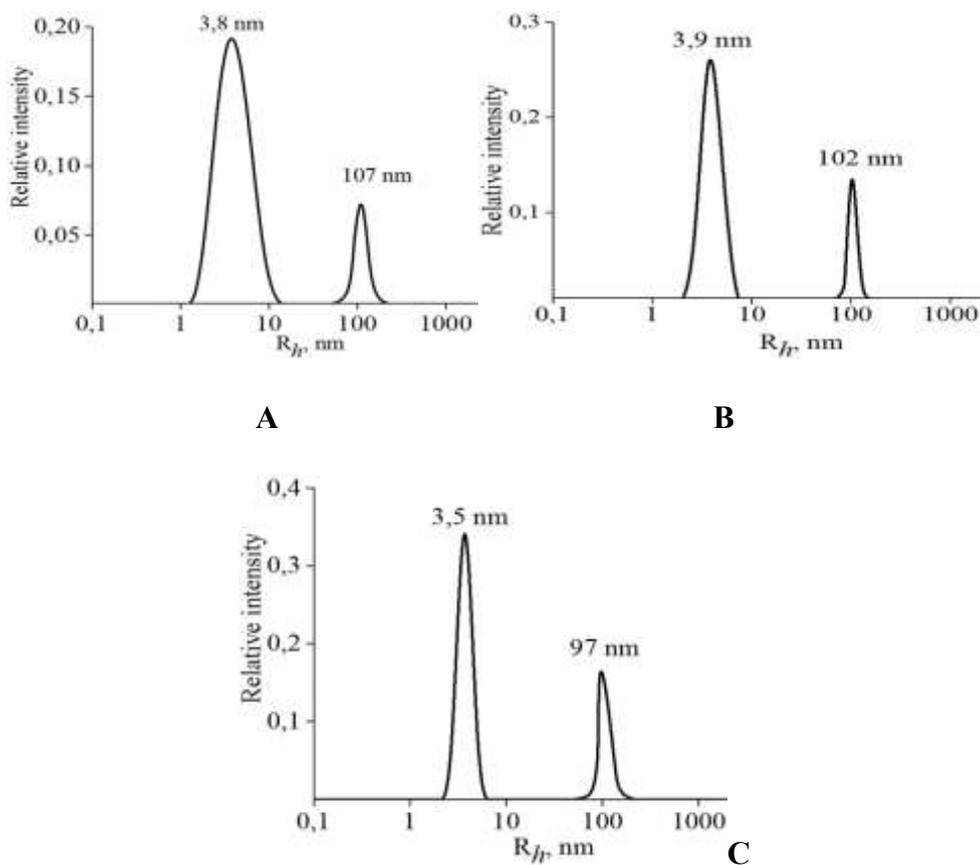
**Рис. 62.** Функции распределения размеров частиц микрогелей КМЦ в физиологическом растворе: IV (1); V (2); VI (3) [213]

Функции распределения по размерам частиц (IV–VI) в физиологическом растворе в присутствии БСА (рис. 63) являются бимодальными, т. е. характеризуются двумя пиками.

Значение первого пика примерно соответствует размеру БСА (~3.7 нм), а второго пика - размеру частиц тройного комплекса (в районе 100 нм). Таким образом, в физиологическом растворе в присутствии БСА, не происходит как агрегации (IV–VI) друг с другом, так и не видно их серьезной агрегации с БСА.

**Таблица 23.** Гидродинамические и электрокинетические характеристики микрогелей I–VI в физиологическом растворе.

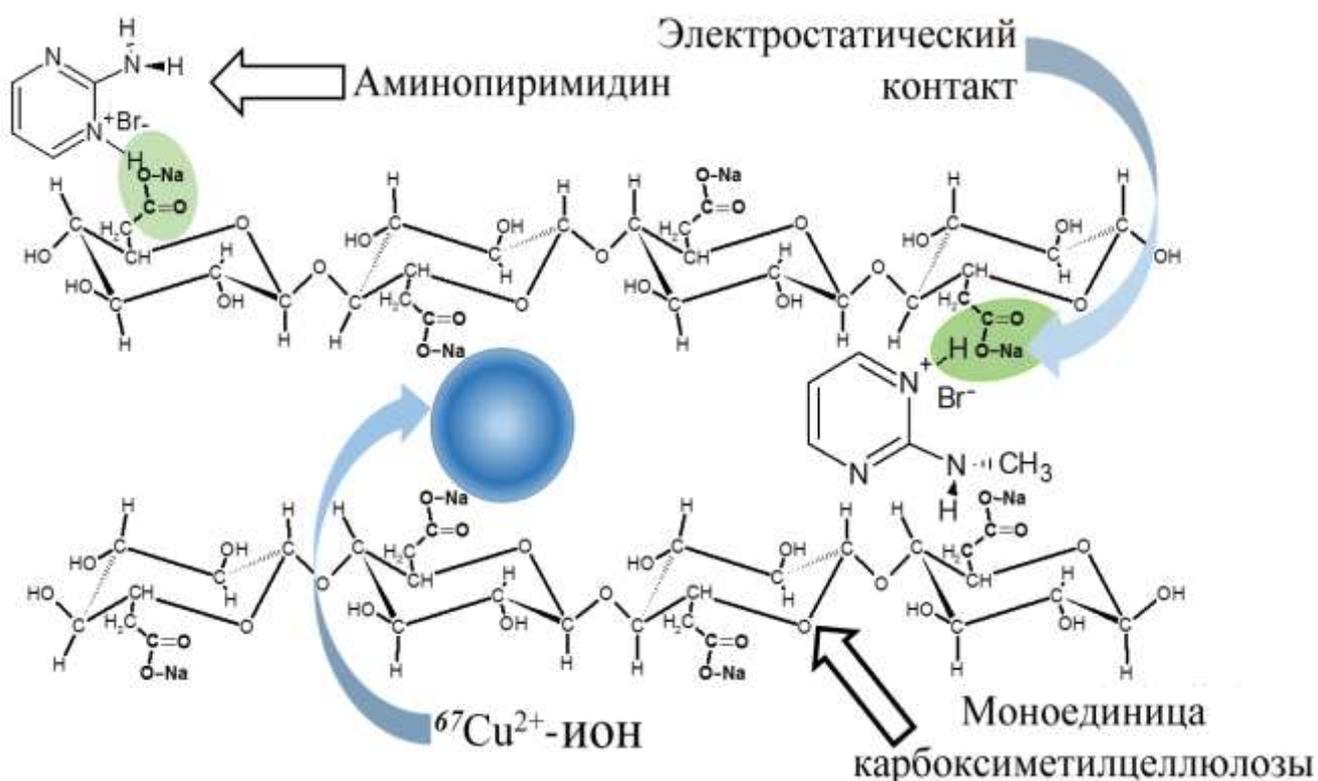
Образцы	Гидродинамический диаметр, нм	PDI
<b>I</b>	260	0.27
<b>II</b>	306	0.31
<b>III</b>	300	0.34
<b>IV</b>	200	0.30
<b>V</b>	210	0.31
<b>VI</b>	220	0.32



**Рис. 63.** Функции распределения частиц микрогелей в присутствии БСА (в физиологическом растворе): А – (IV), В – (V), С – (VI) [213]

Однако, в присутствии БСА микрогели демонстрируют тенденцию к дополнительному поджатию (от 5 до 7 нм) по сравнению с размерами, определёнными для них только в физиологическом растворе. Это указывает на то, что связывание с БСА происходит. Схематическое строение полимерных тройных композитов приведено на **рис. 64**.

Трёхкомпонентные системы КМЦ–Cu<sup>2+</sup>–L<sup>1</sup> (**VII-IX**) были получены аналогично образцам **IV-VI**. Эти соединения являются водорастворимыми (до  $c = 5$  мг/мл), спектрофотометрически было подтверждено устойчивое состояние полученных полимерных микрогелей (**рис. 65**). Условия синтеза и состав микрогелей приведены в **табл. 24**.



**Рис. 64.** Схематическая структура микрогелей **IV-VI**. Зеленое – электростатическое взаимодействие между АР и моноединицей КМЦ, голубое – поперечное сшивание двух полимерных фрагмента ионом меди

**Таблица 24.** Количественное соотношение реагентов в трёхкомпонентных нано/микрогелях КМЦ–Cu(II)–L<sup>1</sup>.

Образцы	Молярное отношение элементов КМЦ/Cu	КМЦ, моль	Cu <sup>+2</sup> , моль	L <sup>1</sup> , моль (исходное)	% вставки в КМЦ
<b>VII</b>	15/1	$2 \cdot 10^{-4}$	$1.33 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$	75.85
<b>VIII</b>	10/1	$2 \cdot 10^{-4}$	$2.00 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$	75.85
<b>IX</b>	7/1	$2 \cdot 10^{-4}$	$2.86 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$	82.74

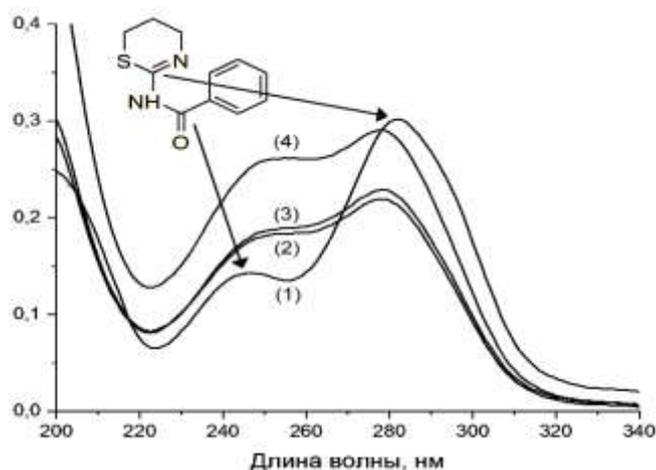


Рис. 65. УФ- спектры  $L^1$  (1) и комплексов VII-IX (2-4, соответственно) [212]

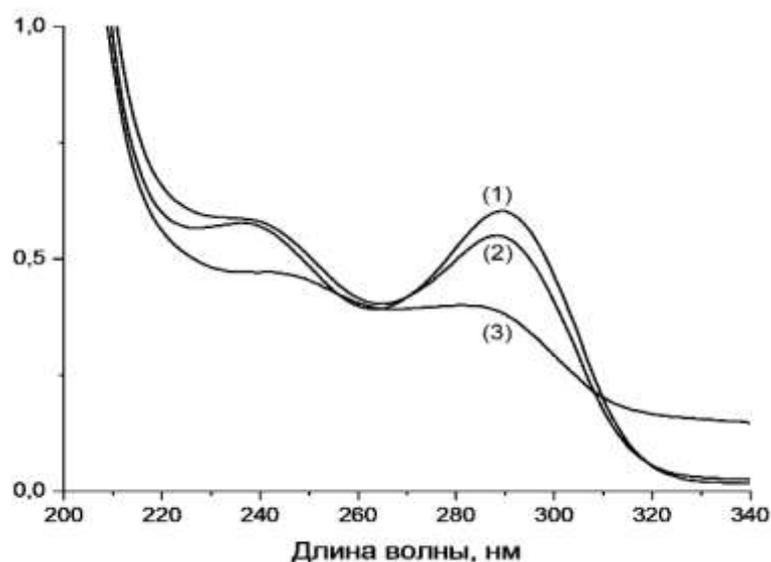
В табл. 25 показаны физико-химические характеристики полученных микрогелей, содержащих лиганд  $L^1$ . Видно, что при увеличении количества ионов меди размеры конъюгатов уменьшаются, причем в физиологическом растворе этот процесс сжатия проявляется сильнее. В случае сравнения бинарной и трехкомпонентной композиций X-XI, содержащих активатор iNOS – лиганд  $L^2$  (табл. 26-27) видно, что повышается устойчивость микрогелей и наблюдается уменьшение гидродинамических размеров по сравнению с микрогелями, содержащими как AP, так и  $L^1$ . Спектрофотометрические данные (рис. 66) изменяются, указывая на взаимодействие  $L^2$  с КМЦ.

Таблица 25. Гидродинамические и электрокинетические характеристики микрогелей VII-IX в водных и физиологических растворах.

Образец	№	Отношение: КМЦ ÷ $L^1$ (моль)	$D_h$ (водный р-р), нм	ЭФП (водный р-р) (мкм/с)/(В/с м)	$D_h$ (0.15 М NaCl), нм
КМЦ– $Cu^{2+}$ – $L^1$	VII	2 ÷ 1	370 ± 25	-(3.34 ± 0.05)	285
КМЦ– $Cu^{2+}$ – $L^1$	VIII	2 ÷ 1	340 ± 25	-(3.31 ± 0.02)	230
КМЦ– $Cu^{2+}$ – $L^1$	IX	2 ÷ 1	230 ± 15	-(3.46 ± 0.02)	190

Таблица 26. Количественное соотношение реагентов в трехкомпонентных нано/микрогелях КМЦ–Cu(II)– $L^2$ .

Образец	Номер	КМЦ, моль	$Cu^{+2}$ , моль	$L^2$ , моль	Соотношение КМЦ / Cu	Соотношение КМЦ / $L^2$	% вставки в КМЦ
КМЦ– $Cu^{2+}$ – $L^2$	XI	$2 \cdot 10^{-4}$	$2.00 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$	1 / 10	1 / 4	
КМЦ– $L^2$	X	$2 \cdot 10^{-4}$	0	$10^{-4}$	-	1 / 4	90%



**Рис. 66.** УФ-спектры  $L^2$  (1) и комплексов X-XI (2-3, соответственно) [212]

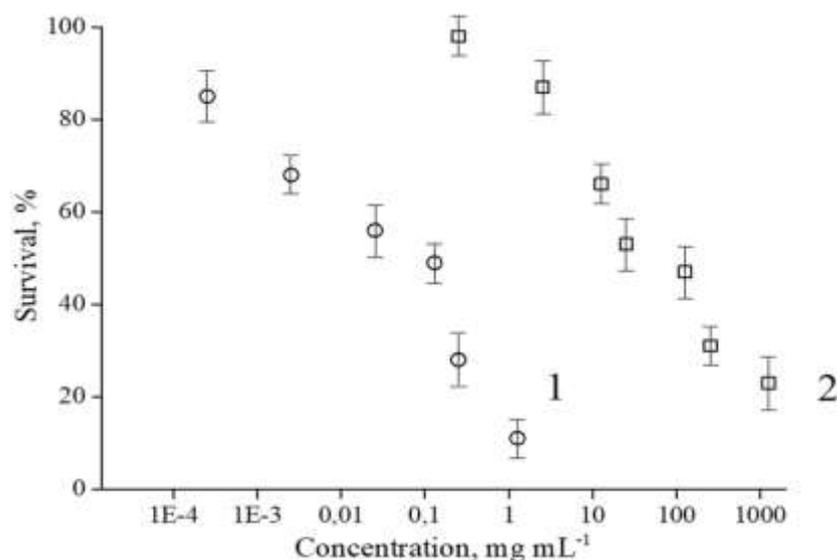
**Таблица 27.** Гидродинамические и электрокинетические водных растворов микрогелей X-XI.

Образец	№	$D_h$ , водный раствор нм	$D_h$ , физ. раствор, нм	ЭФП, (мкм/с)/(В/см)
КМЦ- $Cu^{2+}$ - $L^2$	X	250	180	-4,86
КМЦ- $L^2$	XI	220	110	-5,99

Это говорит о дополнительных центрах связывания молекулы активатора с КМЦ по сравнению с  $L^1$ .

#### 4.3.1. Сравнение цитотоксичности полученных микрогелей *in vitro* на клеточных линиях

Была исследована цитотоксичность бинарных и тройных микрогелей по отношению к двум типам клеток: лейкемическим клеткам линии *Jurkat* и здоровым донорским лимфоцитам (ЗД) с использованием метода МТТ (см. Экспериментальную часть). Сравнение препаратов I и III (табл. 28) показывает сильное влияние содержания меди в составе микрогелей, как в плане выживаемости здоровых лимфоцитов, так и клеток линии *Jurkat*. На рис. 67 показан полулогарифмический график выживаемости клеток под действием комплекса I. Величина терапевтического индекса в комплексах I и III достаточно высокая. Введение в микрогель AP немного понижает величину ТИ, однако незначительно, при этом сам AP, как и КМЦ, не проявляет заметной цитотоксичности (ТИ~1).



**Рис. 67.** Полулогарифмический график выживаемости под действием комплекса **I** клеток линии *Jurkat* (1) и клеток здоровых доноров (2) [213]

**Таблица 28.** Выживаемость ( $LC_{50}$ , *in vitro*) клеток лейкемической линии *Jurkat* и лимфоцитов здоровых доноров (ЗД) под действием микрогелей, содержащих медь в сравнении с КМЦ, сшитом с ионами цинка и с комплексом меди.

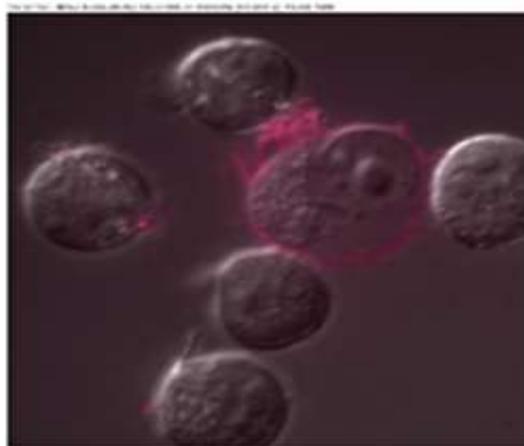
Образец	$LC_{50}$ (μмоль/мл)		
	ЗД	<i>Jurkat</i>	ТИ*
AP	15 ± 1	15 ± 1	<b>1</b>
КМЦ	2.1 ± 0.2	1.95 ± 0.08	~1
<b>I</b>	50 ± 5	0.06 ± 0.01	<b>833</b>
<b>III</b>	2.1 ± 0.2	0.0023 ± 0.0004	<b>913</b>
<b>IV</b>	50 ± 5	0.065 ± 0.005	<b>769</b>
КМЦ–Zn–AP	0.7	0.038	<b>18.4</b>
Cu <sub>2</sub> L <sup>1</sup> <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub> ( <b>1</b> )	0.65 ± 0.05	0.057 ± 0.012	<b>11.4</b>
КМЦ–L <sup>2</sup>	0.86 ± 0.07	0.041 ± 0.02	<b>21</b>

\*терапевтический индекс ( $LC_{50}(ЗД)/LC_{50}(Jurkat)$ )

Однако микрогели, содержащие ионы меди, показывают значительно более высокие значения ТИ и более высокую цитотоксичность по отношению к лейкемическим клеткам, чем аналогичные микрогели, содержащие ионы цинка. Значения ТИ для комплекса меди (**1**) оказалось также на порядок ниже в сравнении с бинарными комплексами на основе КМЦ,

однако, в этом случае, из-за более высокой цитотоксичности по отношению к клеткам здоровых доноров.

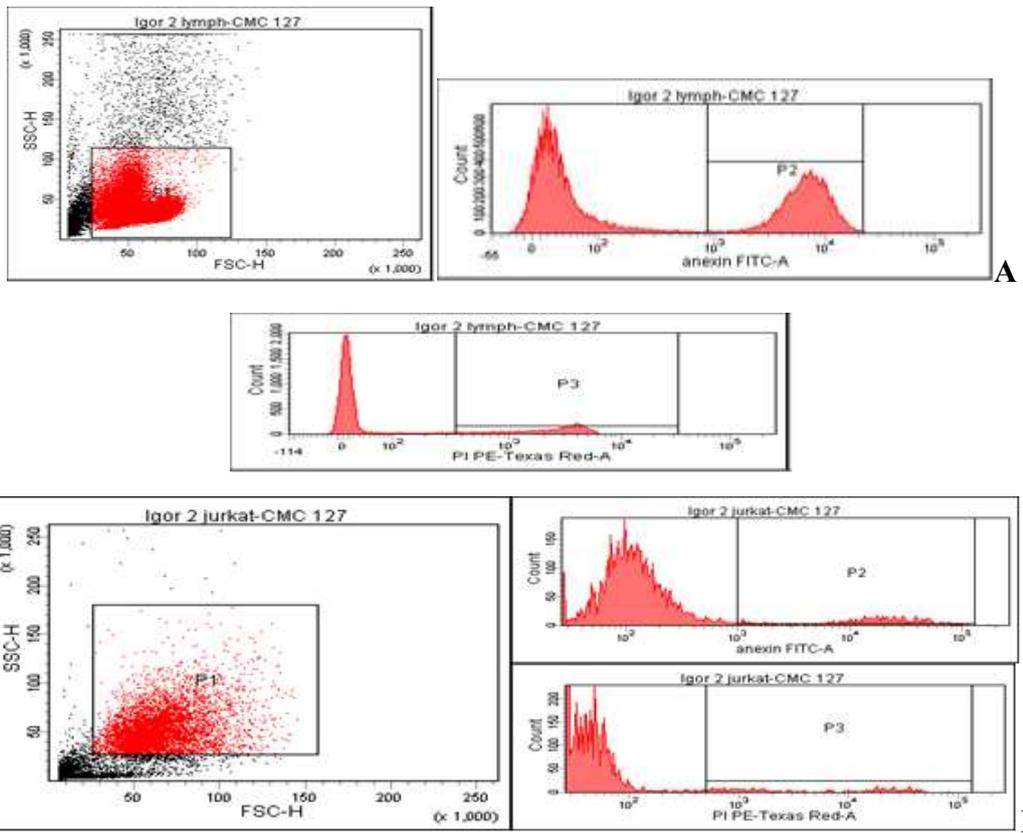
На **рис. 68** показаны клетки ЗД под действием **I** на начальной стадии апоптоза. Обращение к методу проточной цитометрии показывает (**рис. 69 и 70**), что, как и в случае комплекса (**1**), микрогели увеличивают процент раннего апоптоза нормальных клеток, особенно в случае **I** (**табл. 29**), где содержание ионов меди больше. Чуть меньше это увеличение наблюдается в случае клеток линии *Jurkat*. Однако эти значения значительно меньше, чем увеличение раннего апоптоза клеток *Jurkat* под действием комплекса (**1**), что показывает еще раз сильную зависимость цитотоксичности от структуры медных композиций.



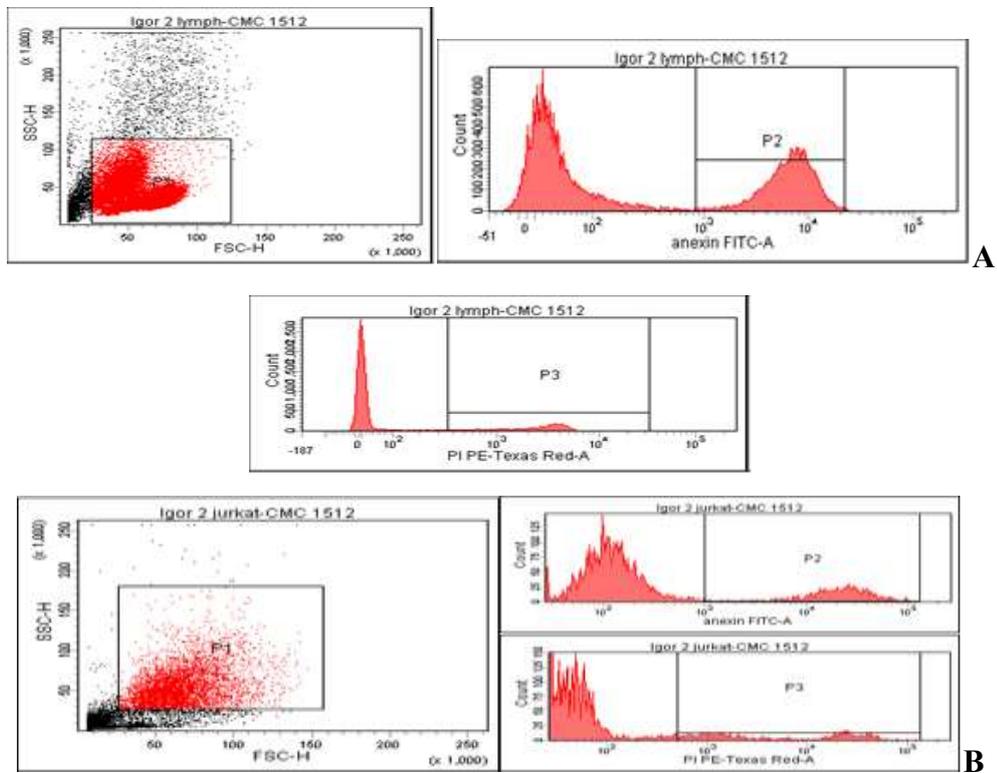
**Рис. 68.** Клетки здоровых доноров под действием **I** в ранней стадии апоптоза на конфокальном микроскопе

**Таблица 29.** Цитотоксичность ( $LC_{50}$ ) и количественные данные определения раннего и позднего апоптоза, полученные методом проточной цитометрии, для клеток нормальных лимфоцитов (HD) и лейкемической клеточной линией *Jurkat*, обработанных комплексами **I** и **III**.

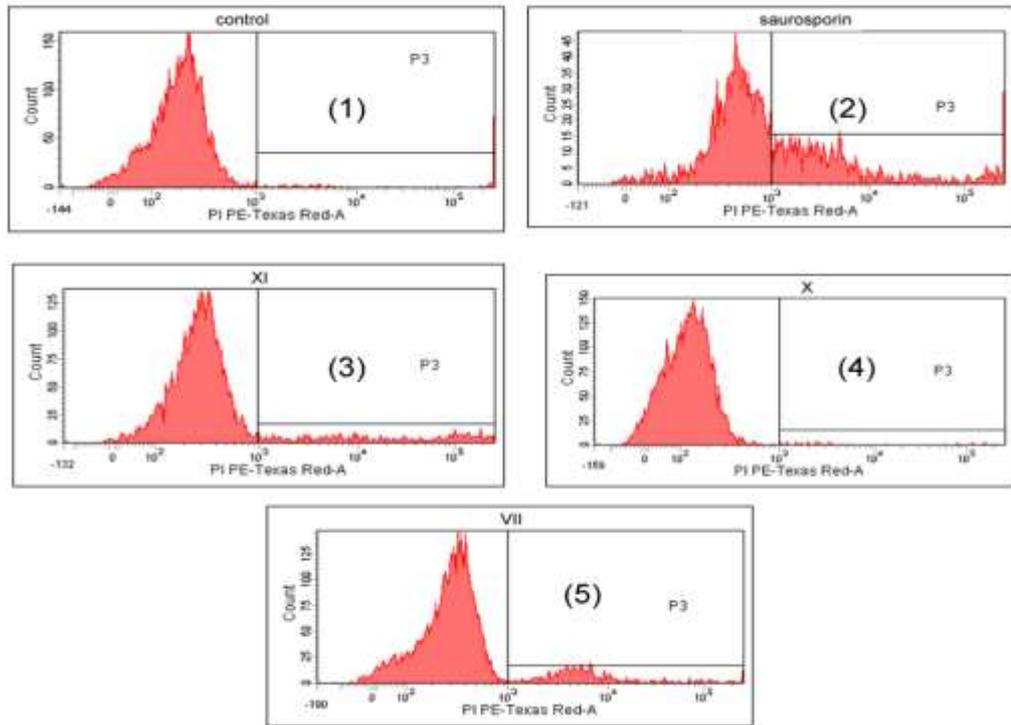
Клетки	Образец	Количество клеток	Ранний апоптоз, $\alpha$ , %	Поздний апоптоз, $\beta$ , %	Соотношение $\alpha / \beta$
ЗД	-	2870	7.9	12.3	0.64
ЗД	комплекс <b>I</b>	22753	42.0	28.0	1.5
ЗД	комплекс <b>III</b>	22774	39.9	26.9	1.48
<i>Jurkat</i>	-	2524	7.9	17.5	0.45
<i>Jurkat</i>	комплекс <b>I</b>	6260	14.1	11.2	1.26
<i>Jurkat</i>	комплекс <b>III</b>	5091	24.2	18.7	1.29



**Рис. 69.** Метод проточной цитометрии: ранний и поздний апоптоз нормальных лимфоцитов (А) и клеточной линии *Jurkat* (В) под действием комплекса I [196]

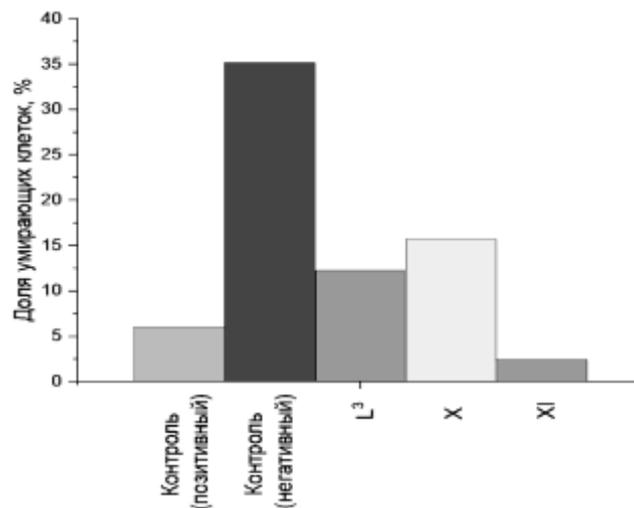


**Рис. 70.** Метод проточной цитометрии: ранний и поздний апоптоз нормальных лимфоцитов (А) и клеточной линии *Jurkat* (В) под действием III [196]



**Рис. 71.** Метод проточной цитометрии: поздний апоптоз и некроз клеточной линии *Jurkat*: негативный контроль (1), позитивный контроль в присутствии стауроспорина (2), в присутствии XI (3), X (4), VII (5) [212]

Используя метод цитофлуориметрии были получены результаты по появлению апоптоза+некроза под действием конъюгатов VII, X, XI, содержащих лиганды  $L^1$  и  $L^2$  (рис. 71). Диаграммы проточной цитофлуориметрии представлены на рис. 72.



**Рис. 72.** Метод проточной цитометрии: диаграмма долей апоптических и некротических клеток через двое суток в клеточной линии *Jurkat*: негативный контроль, позитивный контроль в присутствии стауроспорина, под воздействием XI, X, VII [212]

Видно, что более сильным воздействием на раковые клетки обладает конъюгат, содержащий ионы меди и лиганд  $L^2$ .

**Краткий вывод.** Таким образом, установлен механизм образования двух и трехкомпонентных микрогелей за счет образования электростатических контактов ионов меди (как и цинка) и электростатического связывания пиримидинового/тиазинового фрагмента с карбоксильными группами полимера. Установлено, что поверхность водорастворимых микрогелей заряжена отрицательно. Показано, что размеры и цитотоксичность трехкомпонентных наноносителей (выполняющих роль мультифункциональных наноконтейнеров) зависят от содержания меди и лигандов в их составе и имеется весьма значительное терапевтическое окно (ТИ) между здоровыми и лейкемическими клетками. Полученные результаты показывают перспективы возможного использования таких носителей для комплексной доставки нескольких лекарственных компонентов, в том числе радионуклидов. Также впервые показано, что основным механизмом воздействия является увеличение апоптоза, причем чем сильнее цитотоксическое воздействие, тем больше наблюдается увеличение в сторону раннего апоптоза.

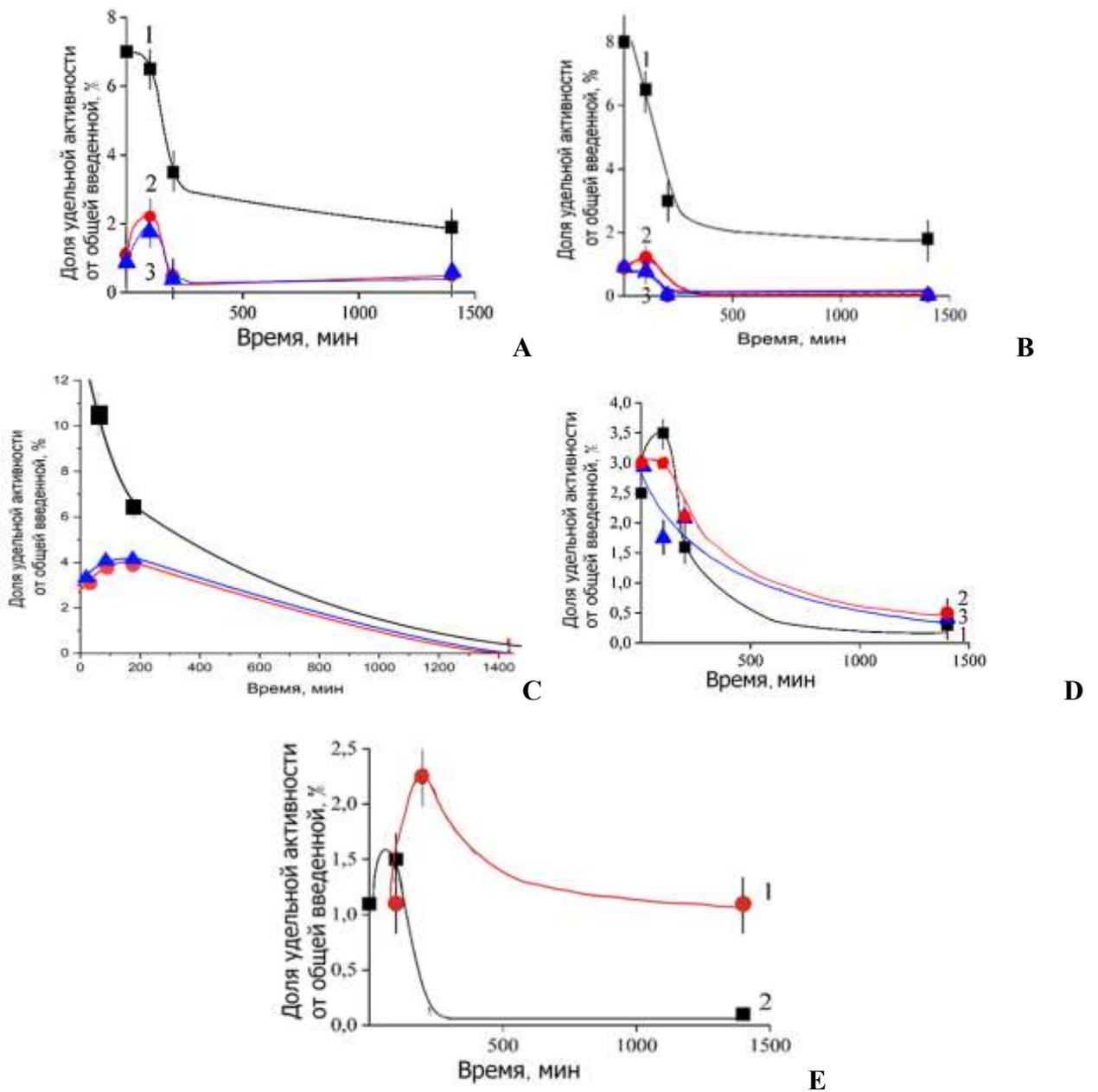
#### **4.3.2. Распределение полученных микрогелей меди в организме *in vivo* на мышинной модели [публикация автора 214, приложение 1].**

Для понимания поведения комплексов и микрогелей КМЦ в организме были получены меченые  $^{67}\text{Cu}$  препараты (см. Экспериментальную часть) и *in vivo* рассмотрена кинетика их распределения по органам на модели мышей. Для сравнения было получено распределение свободных ионов меди в организме при введении  $^{67}\text{CuCl}_2$ , что позволяет прикидочно оценить силу связи между радионуклидом и носителем в организме. Несмотря на устойчивую связь ионов меди (как и радионуклида) в микрогелях, все же существует теоретическая вероятность, что радионуклид способен покинуть микрогель, т. е. выйти из КМЦ непосредственно в организме. Поэтому необходимо учитывать не только распределение микрогеля КМЦ- $^{67}\text{Cu}$ , но и распределение собственно частиц КМЦ, которые для этого были помечены тритием непосредственно в структуру КМЦ. Сравнение результатов, полученных при распределении меченных тритием микрогелей [ $^3\text{H}$ ]КМЦ-Cu и микрогелей КМЦ- $^{67}\text{Cu}$  в сравнении с КМЦ[ $^3\text{H}$ ] дает более полную картину поведения микрогелей в организме. Кроме того, таким образом можно ответить на вопрос о вероятности дополнительной дозовой нагрузки на организм, если потери радионуклида носителем в процессе нахождения в организме окажутся значительными. Для введения трития в КМЦ и КМЦ-Cu использовали метод термической активации трития [215,216] (работа выполнена на кафедре радиохимии совместно с к. х. н. Г.А.Бадуним, д. х. н. М. Г. Чернышовой и студентом Ф. С. Чикуновым).

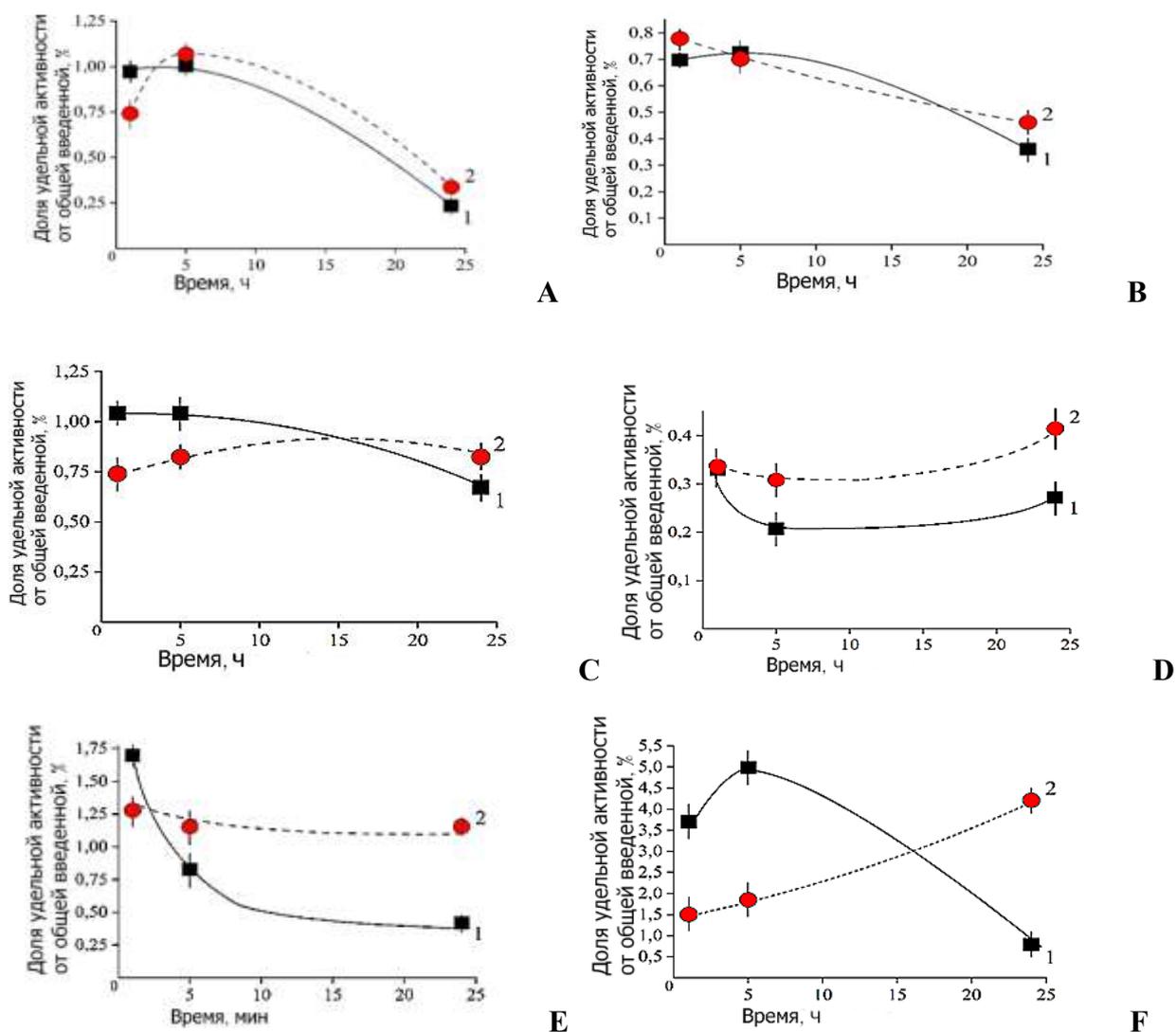
Изучено накопление и выведение микрогелей КМЦ- $^{67}\text{Cu}$  по сравнению с  $^{67}\text{CuCl}_2$  *in vivo* (мышинная модель). Были рассмотрены микрогели КМЦ- $^{67}\text{Cu}$  с соотношением компонентов 15 / 1 и 7 / 1. Их распределение в организме мышей совместно с распределением  $^{67}\text{CuCl}_2$  показано на **рис. 73** и определяется по активности  $^{67}\text{Cu}$ . Видно, что накопление и выведение  $^{67}\text{Cu}^{2+}$  протекает быстрее, чем  $^{67}\text{Cu}$ -КМЦ, а время максимального накопления для большинства органов находится в пределах 0.25-1 ч после введения. Для сердца, легких и почек время максимального накопления  $^{67}\text{Cu}$ -КМЦ составляет ~1,5 ч, а для печени и селезенки ~3 ч. Наблюдается некоторая разница между накоплением  $^{67}\text{Cu}$ -КМЦ с соотношением 1 / 15 и 1 / 7 в почках, что может быть связано с некоторой разницей в размерах микрогелей, которые тем меньше, чем больше атомов меди содержат. Для мочевыделительной системы размеры имеют принципиальное значение при выведении препаратов. Зависимость времени накопления  $^{67}\text{Cu}$ -КМЦ от соотношения компонентов в почках меняется в следующем порядке:  $1/15 > 1/7 > ^{67}\text{Cu}^{2+}$ . Через 24 ч после введения препарата в почках еще присутствует определенное количество свободных ионов меди, тогда как количество микрогелей близко к нулю. В селезенке наблюдается аналогичная картина, т.е. максимальное время накопления  $^{67}\text{Cu}$ -КМЦ зависит от соотношения  $^{67}\text{Cu}$  / КМЦ как  $1 / 15 > 1 / 7$ , однако процесс выведения  $^{67}\text{Cu}$ -КМЦ с соотношением 1 / 7 значительно быстрее, чем с соотношением 1 / 15, что, вероятно, также определяется изменением размера частиц. Через 24 часа после введения в селезенке остается 1 / 15 часть пробы, тогда как в других органах содержание микрогелей, как и ионов меди, к этому времени стремится к нулю.

Также изучено накопление и выведение микрогелей  $[^3\text{H}]$ КМЦ- $\text{Cu}^{2+}$  и частиц  $[^3\text{H}]$ КМЦ *in vivo*. Была использована метка тритием частицы с соотношением КМЦ /  $\text{Cu} \sim 10 / 1$ . Время максимального накопления микрогелей  $[^3\text{H}]$ КМЦ- $\text{Cu}$  находится в пределах от 1.5 до 5 ч в зависимости от органа (**рис. 74**). Самый быстрый клиренс наблюдается в крови (**рис. 75**). В хвостовой вене (место инъекции) через 1.5 ч сохранялось от 10 до 25% введенной активности, через 24 ч – от 5 до 10%. В моче, крови, легких и сердце принципиальной разницы в накоплении и выведении между самой частицей  $[^3\text{H}]$ КМЦ и микрогелем  $[^3\text{H}]$ КМЦ- $\text{Cu}^{2+}$  не наблюдалось, а через 24 ч после инъекции остаточная активность здесь стремилась к нулю.

В поджелудочной железе (**рис. 74**) микрогели  $[^3\text{H}]$ КМЦ- $\text{Cu}$  выводятся медленнее, а для частиц  $[^3\text{H}]$ КМЦ выведение в этом органе не происходит полностью даже за 24 ч. Самый длительный клиренс для этих частиц, по-видимому, относится к селезенке, хотя количество поглощенной активности там невелико.



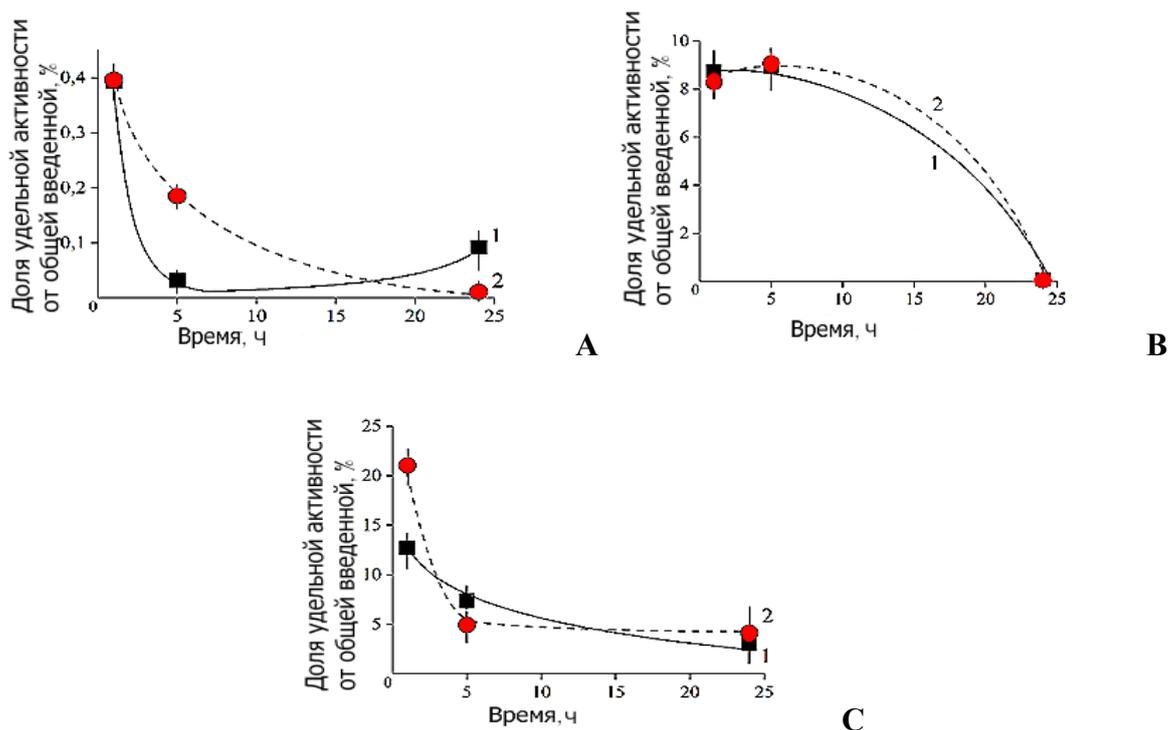
**Рис. 73.** Кинетика содержания (выведения) микрогелей  $^{67}\text{CuCl}_2$  (1) и  $^{67}\text{Cu-KMЦ}$  (в удельных процентах от введенной в мышь) в соотношении: 1 / 7 (2) и 1 / 15 (3) из органов в зависимости от времени нахождения препаратов в организме мышей : А - легкие; В – сердце; С – печень; D – почки, Е – селезенка {здесь нумерация:  $^{67}\text{Cu-KMЦ}$ : 1/7 (1) и 1/15 (2)} [214]



**Рис. 74.** Кинетика распределения микрогеля  $[^3\text{H}]\text{КМЦ-Cu}$  (1) и частиц  $[^3\text{H}]\text{КМЦ}$  (2) по органам в зависимости от времени нахождения препаратов в организме мышей: А - легкие; В – сердце; С – поджелудочная железа; D – селезенка; Е – почки; F – печень [214]

Выведение микрогелей  $[^3\text{H}]\text{КМЦ-Cu}$  из почек практически полностью происходит за 24 ч при максимальном времени накопления  $\leq 1,5$  ч. Однако частицы  $[^3\text{H}]\text{КМЦ}$ , не подверженные сжатию при образовании сшивок КМЦ с ионами металлов, в течение 24 ч постоянно находятся в этом органе на одном и том же (хотя и сравнительно низком) количественном уровне. Вероятно, это также связано с наличием и/или отсутствием сшивок ионами меди и изменением вследствие этого размеров и «упругости» частиц, часть которых не в состоянии быстро покинуть этот орган. Для почек особенно важен размер частиц из-за необходимости прохождения через систему выведения [217]. Следует отметить, что недавние исследования [218] указывают на возможность значительного уменьшения размеров микрогелей под воздействием УФ и локального нагрева. Возможно, аналогичный процесс может происходить и при облучении изнутри микрогеля, если введенная доза облучения будет значительна, что должно ускорить клиренс через почки. Кроме того,

недавние исследования показали, что фермент гиалуронидаза способна расщеплять КМЦ, однако скорость этого процесса в организме неизвестна [224].

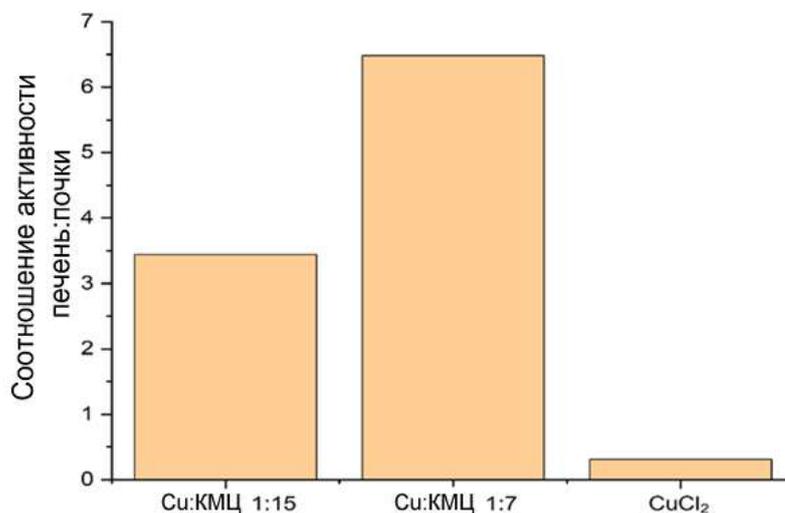


**Рис. 75.** Кинетика распределения микрогелей  $[^3\text{H}]\text{КМЦ-Cu}$  (1) и частиц  $[^3\text{H}]\text{КМЦ}$  (2) в компонентах организма в зависимости от времени нахождения препаратов в организме мышей: А - крови; В – моча; С – хвостовая вена [212]

Наибольшие различия наблюдались в печени (рис. 74), где поведение микрогелей  $[^3\text{H}]\text{КМЦ-Cu}$  было сходным с поведением других органов, т. е. с максимальным временем накопления  $\sim 5$  ч и практически полным выведением через 24 ч. Однако накопление частиц  $[^3\text{H}]\text{КМЦ}$  здесь к 24 ч увеличивается. Учитывая огромное количество процессов, происходящих в печени, и существование там различных переносчиков, можно предположить, что частицы  $[^3\text{H}]\text{КМЦ}$ , не подверженные сжатию, имеют свободные центры связывания при отсутствии ионов меди, которые используются биологическими объектами печени для их захвата, что и способствует их удержанию в этом органе.

Сравнение поведения микрогелей с разными метками и свободными ионами меди ( $^{67}\text{Cu}^{2+}$ ) указывает на стабильность комплексов  $\text{КМЦ-}^{67}\text{Cu}$  в организме, а также демонстрирует разницу в скорости процессов накопления-выведения, которая для  $^{67}\text{CuCl}_2$  значительно быстрее. Однако к 24 ч удаление микрогелей, несущих ионы меди (независимо от метки  $^{67}\text{Cu}$  или  $^3\text{H}$ ), из большинства органов практически полное. Что касается полимерных частиц КМЦ, то их клиренс более длительный, они могут задерживаться в некоторых из рассмотренных нами органах, особенно в печени. Соотношение радиоактивности печень/почки, как основных выводящих органов организма в сравнении

со свободными ионами меди (выведение которых происходит значительно быстрее, практически за 90 мин и, в основном, через почки) показано на **рис. 76**. Очевидно, что наибольший интерес представляют микрогели с наибольшим содержанием меди (и, соответственно,  $^{67}\text{Cu}$ ).



**Рис. 76.** Сравнение отношения удельной радиоактивности (от введенной) печень/почка в зависимости от количества соотношения КМЦ / Cu в микрогеле и в сравнении с  $\text{CuCl}_2$  [204]

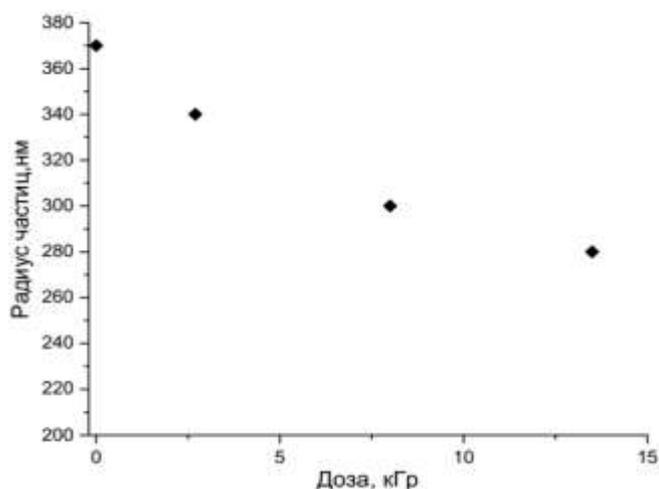
Таким образом, содержание меди в микрогелях в некоторых случаях может определять клиренс, по-видимому, влияя на структуру образующихся частиц, их размер и их возможную деградацию в организме. Это подтверждается тем, что при повышении содержания меди в микрогелях (III) повышается процент выведения через печень, что может означать изменение как структуры и её расщепления, так и наличие биологических мишеней в печени, реализующих связывание в случае бóльшего количества меди в комплексе.

#### 4.3.3. Определение устойчивости микрогелей при радиационном воздействии [публикация автора 219]

При получении радиофармпрепаратов используются радионуклиды с высокой активностью, что может вызывать радиационное разложение носителей и выход радионуклида в свободный доступ в организм. Это приводит к облучению здоровых тканей и повышает дозовую нагрузку на человека. В связи с этим необходимо рассмотреть радиолит полученных частиц, чтобы оценить опасность «выпадения» из них радионуклида меди. Несмотря на то, что излучение радионуклида в носителе действует изнутри, мы использовали модельное внешнее  $\gamma$ -облучение (см. экспериментальную часть). Чтобы оценить адекватные дозы облучения, сравнимые с реально использующимися в медицине,

была теоретически рассчитана доза от реально используемой активности  $^{67}\text{Cu}$ . Теоретическую поглощенную дозу рассчитывали с помощью программы OLINDA/EXM®V (Radiation Dose Assessment Software Application) для полного распада радионуклида  $^{67}\text{Cu}$ , включенного в микрогель с активностью 5 мКи ( $18.5 \cdot 10^7$  Бк), что является реальной активностью для применения в ядерной медицине. При этом считалось, что частица геля представляет собой жидкость с плотностью 1 г/мл в форме идеальной сферы объемом 1 мл. Расчет показал, что при полном распаде радионуклида поглощенная доза ( $D_{\text{п}}$ ) составляет 750 Гр.

Устойчивость микрогеля КМЦ–Cu с соотношением 10 / 1 определяли методом ДРС (динамического рассеяния света), и на **рис. 77** представлены результаты изменения от дозы гидродинамических диаметров микрогелей.



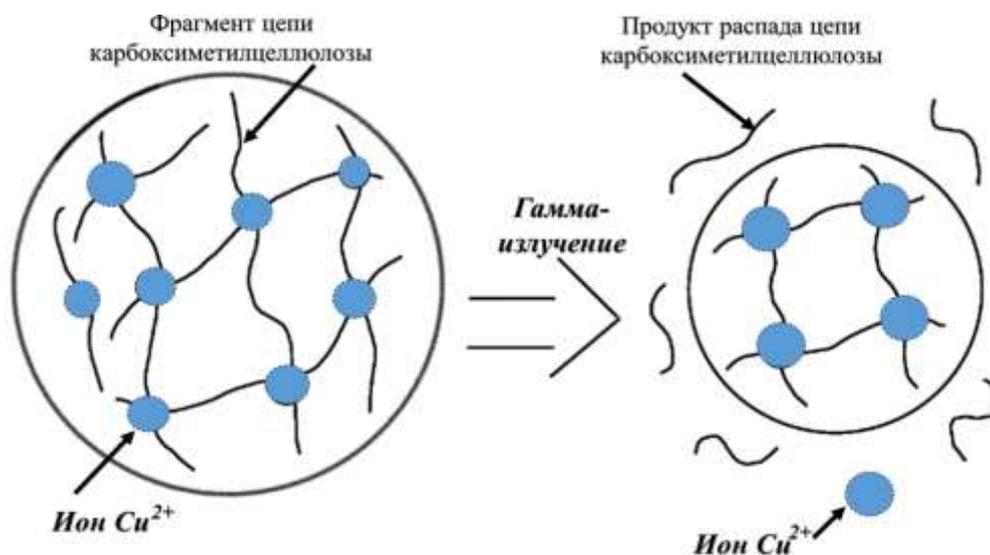
**Рис. 77.** Зависимость размеров (гидродинамического диаметра) микрогеля КМЦ–Cu<sup>2+</sup> от поглощенной дозы ( $D_{\text{п}}$ ) от внешнего  $\gamma$ -облучения в водном растворе [219]

**Таблица 30.** Выход ионов меди из микрогеля в раствор в зависимости от дозы внешнего гамма-облучения (здесь  $m$  и  $m_0$  — масса вышедших ионов меди и начальная масса меди, соответственно).

Доза, Гр	Вышедшие ионы меди, $m$ , мкг	$m/m_0$ 100%
0	0	0
2700	$4.29 \pm 0.05$	8.1
8200	$18.97 \pm 0.04$	35.8
190000	$26.06 \pm 0.04$	49.2

Для того, чтобы понять, влияет ли разрушение/изменение микрогеля на выход ионов меди, методом ICP-AES определяли появление ионов меди в растворе. В **табл. 30** приведена зависимость % вышедшей меди от дозы облучения. Как видно, при 2700 Гр выделяется около 8% меди от исходного количества. Однако теоретический расчет показал реальную дозу, как 750 Гр и, следовательно, медь, которую может потерять микрогель, должна быть примерно в 3 раза меньше ( $< 3\%$ ), т. е. совершенно незначительной (особенно, учитывая короткий период полураспада).

Таким образом, увеличение поглощенной дозы внешнего гамма-излучения, хотя и сопровождается медленным последовательным уменьшением размеров частиц микрогеля в водной среде, но не угрожает повышением дозового давления на здоровые клетки организма.



**Рис. 78.** Модель разрушения микрогелей КМЦ–Cu [219]

Медленный процесс радиационно-химической деструкции микрогеля должен происходить путем разрушения поверхностных фрагментов КМЦ. При этом участки полисахарида, локализованные в объеме микрогеля, по-видимому, сохраняют свою устойчивость. Известно [220-222], что в основе радиолитического распада целлюлозы лежат процессы ионизации, нейтрализации ион-электронных пар, гибели возбужденных состояний, что приводит к распаду, преимущественно, гликозидных связей в макромолекуле целлюлозы. Помимо этого, радиационно-химический акт под действием  $\gamma$ -излучения сопровождается разрушением глюкопиранозных циклов [223].

Разрушение циклов является следствием жесткоцепного характера макромолекул целлюлозы. При введении ионов меди и, соответственно  $^{67}\text{Cu}$  в такой «каркас» КМЦ

приводит, как было показано выше, к существенной компактизации структуры полисахарида за счет формирования ионных и координационных связей. При этом структура микрогеля должна стать более напряжённой по сравнению с исходной структурой, и наибольшее напряжение будет на поверхности микрогеля. Поэтому распад частиц под действием  $\gamma$ -излучения сопровождается преимущественным разрушением наиболее напряжённых фрагментов полисахаридных макромолекул, что можно представить схемой, изображенной на **рис. 78**. Процесс радиационного воздействия носит радикальный характер, и можно было бы ожидать появления процесса полимеризации [20], однако, как следует из **рис. 77**, гидродинамический диаметр частиц, наоборот, достаточно равномерно уменьшается, что говорит об отсутствии влияния такого процесса.

**Краткий вывод.** Таким образом, оценка устойчивости микрогеля на основе анионного полисахарида, содержащего ионы меди, что является моделью для действие высоких доз радионуклида  $^{67}\text{Cu}^{2+}$ , показала: 1) незначительный распад микрогеля под действием внешнего  $\gamma$ -излучения путем деструкции гликозидных связей фрагментов макромолекул КМЦ на поверхности микрогелей; 2) высвобождение при таких процессах свободных ионов меди незначительное и не может создать угрозы неконтролируемой дозовой нагрузки на организм.

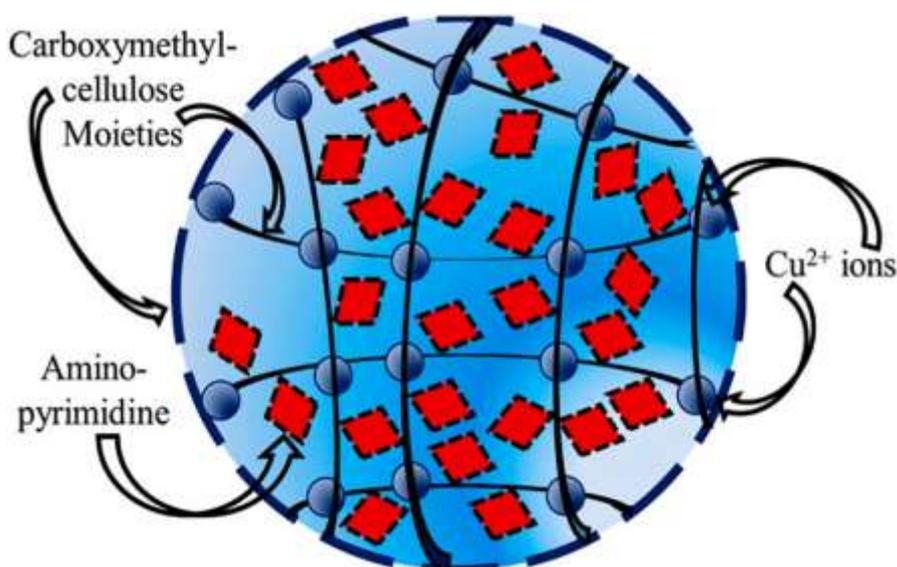


Схема микрогеля КМЦ-Cu-Ligand [212]

## 5. Заключение

В работе использованы две потенциальные наноплатформы для упаковки радионуклидов меди и эффекторов NO-синтазы (в качестве антиопухолевого и/или радиопротекторного агента), а также для создания мультифункциональных конъюгатов на их основе. В качестве таких платформ применяли гидроксипатит разной структуры, размеров, сорбционной емкости и углеводный полимер - карбоксиметилцеллюлозу.

Было показано, что ГАП является удобным носителем для радионуклидов меди и выбраны условия наибольшей сорбции ионов меди. В зависимости от медицинской необходимости наночастицы ГАП-Cu\* могут быть созданы на основе ГАП<sub>0</sub> или ГАП<sub>E</sub>, что определяет размеры частиц и, соответственно, возможности применения и введения в организм. Более крупные частицы на основе ГАП<sub>E</sub> перспективны для применения в радиоэмболизации, в то время как частицы на основе ГАП<sub>0</sub> могут рассматриваться, как диагностический или терапевтический инструмент при заболевании скелета. Однако ГАП не сорбирует лиганды и не перспективен, как мультифункциональный носитель.

Впервые исследованы кристаллические структуры комплексов меди с ингибитором индуцибельной NO-синтазы (лиганд L<sup>1</sup>) и показано, что структура и степень окисления меди в комплексах зависит от соотношения реагентов, а цитотоксичность комплексов зависит не только от состояния ионов меди в них, но в большей степени от кристаллической структуры. Наибольшее терапевтическое окно для линии *Jurkat* было получено для комплекса CuL<sup>1</sup><sub>2</sub>. Впервые были синтезированы комплексы **1** и **4**, меченные <sup>67</sup>Cu с носителем и без носителя, и получено распределение активности в органах мышей при разном времени нахождения радиоактивного препарата в организме. Комплексы недостаточно устойчивы в организме и как отдельные препараты не перспективны для использования без упаковки в носитель.

Установлен механизм образования двух и трехкомпонентных микрогелей на основе КМЦ за счет образования электростатических контактов ионов меди и электростатического связывания пиримидинового/тиазинового фрагмента с карбоксильными группами полимера. Установлено, что поверхность водорастворимых микрогелей заряжена отрицательно и найдены гидродинамические диаметры частиц, которые уменьшаются в физиологических растворах и в присутствии альбумина, как представителя белков крови. Показано, что размеры и цитотоксичность трехкомпонентных наноносителей сильно зависят от содержания меди и лигандов в их составе и получены составы микрогелей, которые имеют весьма значительное терапевтическое окно цитотоксичности между здоровыми и лейкоэмическими клетками (*Jurkat*). Впервые показано, что механизмом

цитотоксического воздействия микрогелей является увеличение апоптоза, причем чем сильнее цитотоксическое воздействие, тем больше наблюдается увеличение в сторону раннего апоптоза.

Впервые показана высокая радиационная устойчивость полученных микрогелей и незначительное высвобождение свободных ионов меди из микрогеля при значении поглощенной дозы, соответствующей медицинским значениям для радиофармпрепаратов, что в результате не может создать угрозы неконтролируемой дозовой нагрузки на организм. Впервые получены и исследованы *in vivo* распределение в организме мышей микрогелей КМЦ- $^{67}\text{Cu}$  в сравнении с несвязанными ионами меди  $^{67}\text{CuCl}_2$  и меченых тритием полимерных молекул [ $^3\text{H}$ ]КМЦ в сравнении с микрогелем [ $^3\text{H}$ ]КМЦ-Cu.

Показано, что наноплатформа на основе КМЦ является перспективным наноносителем для мультифункциональных препаратов, содержащих радионуклид меди и медицинский препарат (в частности, ингибитор iNOS). Полученные результаты показывают потенциальную возможность использования таких носителей для комплексной доставки нескольких лекарственных компонентов одновременно, включая радионуклиды. Дальнейшее развитие данной работы заключается в подборе соответствующего вектора доставки наноконтейнера на основе КМЦ, способного связывать такие конъюгаты без потери их биологической активности.

## 6. Выводы

1. Сравнение сорбции ионов меди на ГАП, полученным различными способами, показало, что медь сорбируется на ГАП необратимо и особенно высокую сорбционную емкость имеет ГАП<sub>Е</sub>, которая также сильно зависит от кристаллической структуры, морфологии и размеров частиц. Показано влияние момента введения ионов меди при сокристаллизационном методе получения ГАП и способность ионов меди перехелатировать ионы кальция из структуры ГАП.
2. Для комплексов меди с N-(5,6-дигидро-4Н-1,3-тиазин-2-ил)бензамида (L<sup>1</sup>) различного состава методом РСА получены их структуры, показавшие наличие в составе комплекса не только Cu(II), но и смешанной валентности Cu(II)-Cu(I). Изменение структуры комплексов сильно влияет на их цитотоксичность по отношению к клеточным линиям.
3. Установлен механизм образования двух- и трехкомпонентных медьсодержащих микрогелей на основе КМЦ за счет образования электростатических контактов ионов меди (и цинка) и электростатического связывания пиримидинового (/тиазинового/иминного) фрагмента с карбоксильными группами полимера.
4. Впервые получены микрогели, содержащие <sup>67</sup>Cu и показано, что КМЦ может служить мультифункциональным наноконтейнером для биологически активных соединений и радионуклидов, при этом цитотоксичность таких трехкомпонентных наноносителей сильно зависит от содержания меди и структуры лигандов в их составе.
5. Впервые определенная радиационная стабильность микрогелей КМЦ–Cu<sup>2+</sup> позволяет их использование в условиях радиоактивности, соответствующей медицинским радионуклидам, а на основе двойного мечения <sup>67</sup>Cu–КМЦ и <sup>3</sup>H–КМЦ на модели мыши показана способность выведения микрогелей через почки.

## 7. Список литературы

1. Г.Е. Кодина, Р. Н. Красикова. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. МЭИ, Москва, 2014, 281 с
2. B. Lippert. Impact of Cisplatin on the recent development of Pt coordination chemistry: a case study // *Coord. Chem. Rev.*, 1999, V. 182, P. 263-265. Doi: 10.1016/S0010-8545(98)00192-1
3. S. Tardito, L. Marchio. Copper compounds in anticancer strategies // *Curr. Med. Chem.*, 2009, V. 16, N. 11, P. 1325-1348. Doi: 10.2174/092986709787846532.
4. J.J.R. Fraústo da Silva, R.J.P. Williams. *The Biological Chemistry of Elements. The Inorganic Chemistry of Life.* Oxford University Press, 2001, 575 pp
5. C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano. Advances in copper complexes as anticancer agents // *Chem. Rev.*, 2014, V. 114, N. 1, P. 815-862. Doi: 10.1021/cr400135x.
6. R. Tabti, N. Tounsi, C. Gaidon, E. Bentouhami, L. Desaubry. Progress in Copper Complexes as Anticancer Agents // *Med. Chem. (Los Angeles)*, 2017, V. 7, N. 5, P. 875-879. Doi: 10.4172/2161-0444.1000445.
7. D. Hedley, A.C. Schuh, J.M. Brandwein, M.D. Seftel, V. Gupta, K.W.L. Yee, A.D. Schimmer. A phase I study of elesclomol sodium in patients with acute myeloid leukemia // *Leuk. Lymphoma*, 2016, V. 57, N. 10, P. 2437-2440. Doi: 10.3109/10428194.2016.1138293
8. Y. Lee, Y. Lin, C. Lima, J. Chin. Factors controlling the role of Zn and reactivity of Zn-bound cysteines in proteins: application to drug target discovery // *Chem. Soc.*, 2014, V. 61, N. 1, P. 142-150. Doi: 10.1002/jccs.201300392
9. C. Saporito-Magriña, M.L. Facio, L. Lopez-Montañana, G. Pagano, M.G. Repetto. Copper-induced aggregation of IgG: a potential driving force for the formation of circulating protein aggregates // *Metallomics*, 2023, V. 15, № 2, mfad005. Doi: 10.1093/mtomcs/mfad005
10. D. Denoyer, S. Masaldan, S. La Fontaine, M.A. Cater. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer' // *Metallomics*, 2015, V. 7, N. 11, 1459-1476. Doi: 10.1039/c5mt00149h
11. M. Mohanraj, G. Ayyannan, G. Raja, C. Jayabalakrishnan. Synthesis, characterization and in vitro biological assays of copper(II) and nickel(II) complexes with furan-2-carboxylic acid hydrazide // *Appl. Organometal. Chem.*, 2017, V. 31, N. 4, P. e3582. Doi: 10.1002/aoc.3582.
12. B.J.M. Ferreira, P. Brandao, M. Meireles, F. Martel, A. Correia-Branco, D.M. Fernandes, T.M. Santos, V. Felix. Synthesis, structural characterization, cytotoxic properties and DNA binding of a dinuclear copper(II) complex // *Inorg. Biochem.*, 2016, V. 161, P. 9-17. Doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.04.026
13. D.A. Armstrong, R.E. Huie, W.H. Koppenol, S.V. Lyman, G. Merenyi, P. Neta, B. Ruscic. Standard electrode potentials involving radicals in aqueous solution: inorganic radicals // *Pure Appl Chem.*, 2015, V. 87, N. 11-12, P. 1139-1150. Doi: 10.1515/pac-2014-0502
14. E.M. Shepard, D.M. Dooley. Inhibition and oxygen activation in copper amine oxidases // *Acc. Chem. Res.* 2015, V. 48, N. 5, P. 1218-1226. Doi: 10.1021/ar500460z
15. J. Kardos, L. Héja, Á. Simon, I. Jablonkai, R. Kovács, K. Jemnitz. Copper signalling: causes and Consequences // *Cell Comm. Signaling*, 2018, V. 16, N. 1, P. 71. Doi: 10.1186/s12964-018-0277-3
16. I. Iakovidis, I. Delimaris, S.M. Piperakis. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach // *Mol. Biol. Inter.*, 2011, article number 594529. Doi:10.4061/2011/594529
17. К.И. Тищенко, Канд. Дисс. Новые производные 2-тиоксо-тетрагидро-4Н-имидазол-4-онов и их медьсодержащие комплексы. Москва, МГУ. 2017 г.
18. K. Schmidt, M. Ralle, T. Schaffer, S. Jayakanthan, B. Bari, A. Muchenditsi, S. Lutsenko. ATP7A and ATP7B copper transporters have distinct functions in the regulation of neuronal

- dopamine- $\beta$ -hydroxylase // *J. Biol. Chem.*, 2018, V. 293, N. 52, P. 20085-20098. Doi: 10.1074/jbc.RA118.004889.
19. S. Yahata, S. Yung, M. Mandai, T. Nagahara, D. Kuzume, H. Sakaeda, S. Wakusawa, A. Kato, Y. Tatsumi, K. Kato, H. Hayashi, R. Isaji, Y. Sasaki, M. Yano, K. Hayashi, M. Ishigami, H. Goto. Phenotypes and chronic organ damage may be different among siblings with Wilson's disease // *J. Clin. Transl. Hepatol.*, 2017, V. 5, N. 1, P. 27-30. Doi: 10.14218/JCTH.2016.00064.
  20. M. Concilli, S. Iacobacci, G. Chesi, A. Carissimo, R. Polishchuk. A systems biology approach reveals new endoplasmic reticulum-associated targets for the correction of the ATP7B mutant causing Wilson disease // *Metallomics*, 2016, V. 8, N. 9, P. 920-930. Doi: 10.1039/c6mt00148c
  21. M. Aschner, A. Skalny, A.C. Martins, A.I. Sinitskii, M. Farina, R. Lu, F. Barbosa Jr., Y.G. Gluhcheva, A. Santamaria, A.A. Tinkov. Ferroptosis as a mechanism of non-ferrous metal toxicity // *Arch. Toxicol.*, 2022, V. 96, N. 9, P. 2391-2417. Doi: 10.1016/j.etap.2014.09.009
  22. C. Angelé-Martínez, K.V. Nguyen, F.S. Ameer, J.N. Anker, J.L. Brumaghim. Reactive oxygen species generation by copper(II) oxide nanoparticles determined by DNA damage assays and EPR spectroscopy // *Nanotoxicology*, 2017, V. 11, N. 2, P. 278-288. Doi: 10.1080/17435390.2017.1293750
  23. M.J. Hosseini, F. Shaki, M. Ghazi-Khansari, J. Pourahmad. Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ROS production // *Cell Biochem Biophys*. 2014, V. 70, N. 1, P. 367-381. Doi: 10.1007/s12013-014-9922-7
  24. M.O. Isei, D. Stevens, C. Kamunde. Copper modulates heart mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission differently during fatty acid and pyruvate oxidation. // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol.*, 2022, V. 254, N. 109267. Doi: 10.1016/j.cbpc.2022.109267
  25. K. Ngamchuea, C. Batchelor-McAuley, R.G. Compton. The copper(II)-catalyzed oxidation of glutathione // *Chemistry*, 2016, V. 22, N. 44, P. 15937-15944. Doi: 10.1002/chem.201603366
  26. M.F. Poyton, A.M. Sendeki, X. Cong, P.S. Cremer. Cu<sup>(2+)</sup> binds to phosphatidylethanolamine and increases oxidation in lipid membranes. // *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, V. 138, N. 5, P. 1584-1590. Doi: 10.1021/jacs.5b11561
  27. S. Tardito, L. Marchio. Copper compounds in anticancer strategies // *Curr. Med. Chem.*, 2009, V. 16, N. 11, P. 1325-1348. Doi: 10.2174/092986709787846532
  28. A.P. Orlov, M.A. Orlova, T.P. Trofimova, S.N. Kalmykov, D.A. Kuznetsov. The role of zinc and its compounds in leukemia // *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2018, V. 23, N. 3, P. 347-362. Doi: 10.1007/s00775-018-1545-9
  29. W. Maret. The quintessence of metallomics: a harbinger of a different life science based on the periodic table of the bioelements // *Metallomics*, 2022, V. 14, mfac051. Doi: 10.1093/mtomcs/mfac051
  30. M.A.Orlova, S.N.Kalmykov, T.P.Trofimova, D.A.Kuznetsov. Trace Elements in Medicinal Metallomics // *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2024, V. 25. Doi: 10.2174/0113895575333766240912162252
  31. S.R. Lee. Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. // *Oxidat. Med. Cell. Long.*, 2018, V. 2018, N. 9156285. Doi: 10.1155/2018/9156285
  32. S. R. Simon, R.F. Branda, B.H. Tindle, S.L. Burns. Copper deficiency and sideroblastic anemia associated with zinc ingestion // *American J. Hematol.*, 1988, V. 28, N. 3, P. 181-183.
  33. M. Pellei, L. Bagnarelli, L. Luciani, F. Del Bello, G. Giorgioni, A. Piergentili, W. Quaglia, M. De Franco, V. Gandin, C. Marzano, C. Santini. Synthesis and Cytotoxic Activity Evaluation of New Cu(I) Complexes of Bis(pyrazol-1-yl) Acetate Ligands Functionalized with an NMDA Receptor Antagonist // *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, V. 21, N. 2616. Doi: 10.3390/ijms21072616.
  34. M.H. Khan, M. Cai, J. Deng, P. Yu, H. Liang, F. Yang. Anticancer Function and ROS-Mediated Multi-Targeting Anticancer Mechanisms of Copper (II) 2-hydroxy-1-naphthaldehyde Complexes // *Molecules*, 2019, V. 24, N. 7, P. 2544. Doi: 10.3390/molecules24142544
  35. T. Sabithakala, V.R.R. Chittireddy. DNA Binding and in vitro anticancer activity of 2-((1H-benzimidazol-2-yl)methylamino)acetic acid and its copper(II) mixed-polypyridyl complexes:

- Synthesis and crystal structure // *Appl. Organomet. Chem.*, 2018, V. 32, e4550. Doi: 10.1002/aoc.4550
36. R. Takjoo, R. Centore, S. Hayatolgheibi. Mixed ligand complexes of cadmium(II) and copper(II) dithiocarbazate: Synthesis, spectral characterization, X-ray crystal structure // *Inorg. Chim. Acta.*, 2018, V. 471, P. 587-594. Doi: 10.1016/j.ica.2017.11.043
  37. S. Indoria, T. S. Lobana, H. Kaur, D. S. Arora, B.S. Randhawa, A.K. Jassal, J.P. Jasinski. Synthesis and structures of 5-methoxy-salicylaldehyde thiosemicarbazones of copper(II): Molecular spectroscopy, ESI-mass studies and antimicrobial activity // *Polyhedron*, 2016, V. 107, P. 9. Doi: 10.1016/j.poly.2015.12.057.
  38. D. Mahendiran, S. Amuthakala, N.S.P. Bhuvanesh, R.S. Kumar, A.K. Rahiman. Copper complexes as prospective anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation, selective targeting of cancer cells by DNA damage and S phase arrest // *RSC Adv.*, 2018, V. 8, N. 30, P. 16973-16990. Doi: 10.1039/c8ra00954f
  39. M. Schaier, E. Falcone, T. Prstek, B. Vileno, S. Hager, B.K. Keppler, P. Heffeter, G. Koellensperger, P. Faller, C.R. Kowol. Human serum albumin as a copper source for anticancer thiosemicarbazones // *Metallomics*, 2023, V. 15, N. 8, mfa046. Doi: 10.1093/mtomcs/mfad046.
  40. K.S. Patel, J.C. Patel, H.R. Dholariya, V.K. Patel, K.D. Patel. Synthesis of Cu(II), Ni(II), Co(II), and Mn(II) Complexes with Ciprofloxacin and Their Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Anti-Tubercular Activity // *Open J. Metal.*, 2012, V. 2, P. 49-50. Doi: 10.4236/ojmetal.2012.23008
  41. T.P. Trofimova, V.A. Tafeenko, A.S. Borodkov, A.N. Proshin, M.A. Orlova. New copper complexes with N-(5,6-dihydro-4H-1,3-thiazin-2-yl) benzamid ligand // *Mendeleev Commun.*, 2021, V. 31, N. 5, P. 552-554. Doi: 10.1016/j.mencom.2021.07.039
  42. B. Singh, J. Mishra, K. S. Pitre, A. Pradhan, P. Soni. Anticancer Activity of New Copper (II) Complexes with 6-Thiuanine Drug // *Int. J. Biotechnol. Wellness Industries*, 2013, V. 2, P. 39-44. Doi: 10.6000/1927-3037.2013.02.01.6
  43. D.K. Mahapatra, S.K. Bharti, V. Asati, S.K. Singh. Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications // *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, V. 174, N. 1, P. 142-144. Doi: 10.1016/j.ejmech.2019.04.032.
  44. A. Olyaei, M. Sadeghpour, M. Khalaj. Mannich bases derived from lawsone and their metal complexes: synthetic strategies and biological properties // *RSC Adv.*, 2020, V. 10, P. 30265-30281. Doi: 10.1039/D0RA05717G.
  45. L.M. T. Frija, A. J. L. Pombeiro, M. N. Kopylovich. Coordination chemistry of thiazoles, isothiazoles and thiadiazoles // *Coord. Chem. Rev.*, 2016, V. 308, P. 32-55. Doi: 10.1016/j.ccr.2015.10.003.
  46. J. Han, L. Liua, X. Yue, J. Chang, W. Shi, Y. Hua. A binuclear complex constituted by diethyldithiocarbamate and copper(I) functions as a proteasome activity inhibitor in pancreatic cancer cultures and xenografts // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2013, V. 273, N. 3, P. 477-483. Doi: 10.1016/j.taap.2013.09.009
  47. D. Chen, Q.C. Cui, H. Yang, Q.P. Dou. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity // *Cancer Res.*, 2006, V. 66, N. 21, P. 10425-10433. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2126
  48. G. Chen, C. Niu, J. Yi, L.Sun, H. Cao, Y. Fang, T. Jin, Y. Li, C. Lou, J. Kang, W. Wei, J. Zhu. J. Novel Triapine Derivative Induces Copper-Dependent Cell Death in Hematopoietic Cancers // *Med. Chem.*, 2019, V. 62, N. 6, P. 3107-3121. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01996
  49. S. Baldari, G. Di Rocco, G. Toietta. Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy // *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, V. 21, N. 3, P. 1069. Doi: 10.3390/ijms21031069
  50. A. Saxena, E.C. Dugan, J. Liaw, M.D. Dembo, R.D. Pike. Copper(I) complexes of heterocyclic thiourea ligands // *Polyhedron*, 2009, V. 28, N. 18, P. 4017-4031. Doi: 10.1016/j.poly.2009.08.023.

51. Y. Huang, H.-J. Cho, N. Bandara, L. Sun, D. Tran, B.E. Rogers, L.M. Mirica. Metal-chelating benzothiazole multifunctional compounds for the modulation and  $^{64}\text{Cu}$  PET imaging of A $\beta$  aggregation // *Chem. Sci.*, 2020, V. 11, P. 7789-7799. Doi: 10.1039/d0sc02641g
52. O.O. Krasnovskaya, D.A. Guk, A.E. Naumov, V.N. Nikitina, A.S. Semkina, K.Yu. Vlasova, V. Pokrovsky, O.O. Ryabaya, S.S. Karshieva, D.A. Skvortsov, I.V. Zhirkina, R.R. Shafikov, P.V. Gorelkin, A.N. Vaneev, A.S. Erofeev, D.M. Mazur, V.A. Tafeenko, V.I. Pergushov, M.Ya. Melnikov, M.A. Soldatov, V.V. Shapovalov, A.V. Soldatov, R.A. Akasov, V.M. Gerasimov, D.A. Sakharov, A.A. Moiseeva, N.V. Zyk, E.K. Beloglazkina, A.G. Majouga. Novel Copper-Containing Cytotoxic Agents Based on 2-Thioxoimidazolones // *J. Med. Chem.*, 2020, V. 63, N. 21, P. 13031-13063. Doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01196
53. O. Krasnovskaya, A. Naumov, D. Guk, P. Gorelkin, A. Erofeev, E. Beloglazkina, A. Majouga. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents // *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, V. 21, N. 11, P. 3965. Doi:10.3390/ijms21113965
54. A. Steinbrueck, A.C. Sedgwick, J.T. Brewster, K.-C. Yan, Y. Shang, D.M. Knoll, G.I. Vargas-Zuniga, X.-P. He, H. Tian, J.L. Sessler. Transition metal chelators, pro-chelators, and ionophores as small molecule cancer chemotherapeutic agents // *Chem. Soc. Rev.*, 2020, V. 49, P. 3726-3749. Doi: 10.1039/c9cs00373h
55. В.Ф. Шульгин, Е.А.Замниус, А.Н.Гусев, О.В.Конник, Э.Б.Русанов, В.Я.Зуб, В.В.Минин. Биядерные комплексы меди(II) с ацилгидразами N-бензоилсульфонил-L-аспарагиновой кислоты // *Координационная химия*, 2011, Т. 37, № 4, С. 814-845.
56. О.В. Конник, Докторская диссертация. Спейсерированные координационные соединения на основе ацилгидразонов салицилового альдегида и его аналогов. Крымский федеральный университет им. В.И.Вернадского, Симферополь, 2017.
57. C. Weyh, K. Krüger, P. Peeling, L. Castell. The Role of Minerals in the Optimal Functioning of the Immune System // *Nutrients*, 2022, V. 14, N. 3, P. 644. Doi: 10.3390/nu14030644
58. K. Jomova, M. Makova, S.Y. Alomar, S.H. Alwasel, E. Nepovimova, K. Kuca, C.J. Rhodes, M. Valko. Essential metals in health and disease // *Chem.-Biol. Interact.*, 2022, V. 367, N. 110173. Doi: 10.1016/j.cbi.2022.110173
59. F. Albarede, P. Telouk, V. Balter, V.P. Bondanese, E. Albalat, P. Oger, P. Bonaventura, P. Miossec, T. Fujii. Medical applications of Cu, Zn, and S isotope effects // *Metallomics*, 2016, V. 8, P. 1056-1070. Doi: 10.1039/c5mt00316d
60. G. Pupillo, T. Sounalet, N. Michel, L. Mou, J. Esposito, F. Haddad. New production cross sections for the theranostic radionuclide  $^{67}\text{Cu}$  // *Nucl. Inst, Methods Phys. Res. B*, 2018, V. 415, P. 41-47. Doi: 10.1016/j.nimb.2017.10.022
61. A.-M. Rolle, M. Hasenberg, C.R. Thornton, D. Solouk-Saran, L. Männ, J. Weski, A. Maurer, E. Fischer, P.R. Spycher, R. Schibli, F. Boschettie, S. Stegemann-Koniszewski, D. Bruder, G.W. Severin, S.E. Autenrieth, S. Krappmann, G. Davies, B.J. Pichler, M. Gunzer, S. Wiehr. ImmunoPET/MR imaging allows specific detection of *Aspergillus fumigatus* lung infection in vivo // *PNAS*, 2016, V. 113, N. 8, P. E1026-E1033. Doi: 10.1073/pnas.1518836113
62. F. Cantiello, V. Gangemi, G.L. Cascini, F. Calabria, M. Moschini, M. Ferro, G. Musi, S. Buttice, A. Salonia, A. Briganti, R. Damiano. Diagnostic Accuracy of  $^{64}\text{Cu}$  Copper Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Primary Lymph Node Staging of Intermediate to High-risk Prostate Cancer: Our Preliminary // *Exp. Oncol.*, 2017, V. 106, P. 139-145. Doi: 10.1016/j.urology.2017.04.019
63. B.V. Egorova, O.A. Fedorova, S.N. Kalmykov. Cationic radionuclides and ligands for targeted therapeutic radiopharmaceuticals // *Russ. Chem. Rev.*, 2019, V. 88, N. 9, P. 901-924. Doi: 10.1070/RCR4890
64. Y. Huang, H.-J. Cho, N. Bandara, L. Sun, D. Tran, B.E. Rogers, L.M. Mirica. Metal-chelating benzothiazole multifunctional compounds for the modulation and  $^{64}\text{Cu}$  PET imaging of A $\beta$  aggregation // *Chem. Sci.*, 2020, V. 11, P. 7789. Doi: 10.1039/D0SC02641G

65. G. Hao, T. Mastren, W. Silvers, G. Hassan, O. K. Öz, X. Sun. Copper-67 radioimmunotheranostics for simultaneous immunotherapy and immuno-SPECT // *Sci. Reports*, 2021, V. 11, N. 1, P. 3622-3633. Doi: 10.1038/s41598-021-82812-1
66. Z. Luo, H. Zhu, X. Lin, T. Chu, R. Luo, Y. Wang, Z. Yang. Synthesis and radiolabeling of (<sup>64</sup>Cu)-labeled 2-nitroimidazole derivative (<sup>64</sup>Cu)-BMS2P2 for hypoxia imaging // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, V. 26, N. 5, P. 1397-1400. Doi: 10.1016/j.bmcl.2016.01.077.
67. C.J. Anderson, T.J. Wadas, E.H. Wong, G.R. Weisman. Cross-bridged macrocyclic chelators for stable complexation of copper radionuclides for PET imaging // *J. Nucl. Mol. Imaging*, 2008, V. 52, N. 2, P. 185-192. PMID: 18043536.
68. S.V. Smith. Molecular imaging with copper-64 // *J. Inorg. Biochem.*, 2004, V. 98, N. 11, P. 1874-1901. Doi: 10.1016/j.jinorgbio.2004.06.009.
69. C.A. Boswell, X. Sun, W. Niu, G.R. Weisman, E.H. Wong, A.L. Rheingold, C.J. Anderson. Comparative *in Vivo* Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraazamacrocyclic Complexes // *J. Med. Chem.*, 2004, V. 47, N. 6, P. 1465-1474. Doi: 10.1021/jm030383m.
70. I. Novak-Hofer, K. Zimmermann, H.R. Maecke, H.P. Amstutz, F. Carrel, P.A. Schubiger. Tumor Uptake and Metabolism of Copper-67-Labeled Monoclonal Antibody chCE7 in Nude Mice Bearing Neuroblastoma Xenografts // *J. Nucl. Med.*, 1997, V. 38, N. 4, P. 536-544.
71. B.J. Prince, M.M. Turnbull, R.D. Willett. Copper(II) Halide Complexes of 2-Aminopyrimidines: Crystal Structures of [(2-aminopyrimidine)<sub>n</sub>CuCl<sub>2</sub>] (n=1,2) and (2-amino-5-bromopyrimidine)<sub>2</sub>CuBr<sub>2</sub> // *J. Coord. Chem.*, 2003, V. 56, P. 441-456. Doi: 10.1080/0095897031000099983.
72. T.W. Price, J. Greenman, G.J. Stasiuk. Current advances in ligand design for inorganic positron emission tomography tracers <sup>68</sup>Ga, <sup>64</sup>Cu, <sup>89</sup>Zr and <sup>44</sup>Sc // *Dalton Trans.*, 2016, V. 45, P. 15702-15724. Doi: 10.1039/c5dt04706d
73. M. Shokeen, C. J. Anderson. Molecular Imaging of Cancer with Copper-64 Radiopharmaceuticals and Positron Emission Tomography (PET) // *Acc. Chem. Res.*, 2009, V. 42, N. 7, P. 832-841. Doi: 10.1021/ar800255q
74. M. Zhou, Y. Chen, M. Adachi, X. Wen, B. Erwin, O. Mawlawi, S.Y. Lai, C. Li. Single agent nanoparticle for radiotherapy and radio-photothermal therapy in anaplastic thyroid cancer // *Biomaterials*, 2015, V. 57, P. 41-49. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.013
75. H. He, D. Altomare, U. Ozer, H. Xu, K. Creek, H. Chen, P. Xu. Cancer cell-selective killing polymer/copper combination // *Biomater. Sci.*, 2016, V. 4, P. 115-120. Doi: 10.1039/C5BM00325C
76. S. Sasada, H. Kurihara, T. Kinoshita, M. Yoshida, N. Honda, T. Shimoi, A. Shimomura, M. Yunokawa, K. Yonemori, C. Shimizu, A. Hamada, Y. Kanayama, Y. Watanabe, Y. Fujiwara, K. Tamura. <sup>64</sup>Cu-DOTA-Trastuzumab PET imaging for HER2-specific primary lesions of breast cancer // *Ann. Oncol.*, 2017, V. 28, N. 8, P. 2028-2029. Doi: 10.1093/annonc/mdx227.
77. J.E. Mortimer, J.R. Bading, J.M. Park, P.H. Frankel, M.I. Carroll, T.T. Tran, E.K. Poku, R.C. Rockne, A.A. Raubitschek, J.E. Shively, D.M. Colcher. Tumor Uptake of <sup>64</sup>Cu-DOTA-trastuzumab in patients with metastatic breast cancer // *J. Nucl. Med.*, 2018, V. 59, N. 1, P. 38-43. Doi: 10.2967/jnumed.117.193888
78. T.J. Wadas, E.H. Wong, G.R. Weisman, C.J. Anderson. Copper Chelation chemistry and its Role in Copper Radiopharmaceuticals // *Curr. Pharmaceut. Design*, 2007, V. 13, N. 1, P. 3-16. Doi: 10.2174/138161207779313768.
79. M.R. Lewis, C.A. Boswell, R. Laforest, T.L. Buettner, D. Ye, J.M. Connett, C.J. Anderson. Conjugation of monoclonal antibodies with TETA using activated esters: biological comparison of <sup>64</sup>Cu-TETA-1A3 with <sup>64</sup>Cu-BAT-2IT-1A3 // *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2001, V. 16, N. 6, P. 483-494. Doi: 10.1089/10849780152752083
80. Z. Cai, C.J. Anderson. Chelators for copper radionuclides in positron emission tomography radiopharmaceuticals // *Label Compd. Radiopharm.*, 2014, V. 57, N. 4, P. 224-230. Doi: 10.1002/jlcr.3165

81. J.S. Lewis, R. Laforest, T.L. Buettner, S-K. Song, Y. Fujibayashi, J.M. Connett, M.J. Welch. Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): an agent for radiotherapy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, V. 98, N. 3, P. 1206-1211. Doi: 10.1073/pnas.98.3.1206
82. A. Ahmedova, B. Todorov, N. Burdzhiev, C. Goze. Copper radiopharmaceuticals for theranostic applications // *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, V. 5, P. 1406-1425. Doi: 10.1016/j.ejmech.2018.08.051.
83. R. Chakravarty, S. Chakraborty, A. Dash.  $^{64}\text{Cu}^{2+}$  Ions as PET Probe: an emerging paradigm in molecular imaging of cancer // *Mol Pharm.*, 2016, V. 13, N. 11, P. 3601-3612. Doi: 10.1021/acs.Molpharmaceut.6b00528
84. T. Katabuchi, S. Watanabe, N.S. Ishioka, Y. Iida, H. Hanaoka, K. Endo, S. Matsuhashi. Production of  $^{67}\text{Cu}$  via the  $^{68}\text{Zn}(p,2p)^{67}\text{Cu}$  reaction and recovery of  $^{68}\text{Zn}$  target // *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2008, V. 277, P. 467-470. Doi: 10.1007/s10967-007-7144-9
85. N.A. Smith, D.L. Bowers, D.A. Ehst. The production, separation, and use of  $^{67}\text{Cu}$  for radioimmunotherapy: a review // *Appl. Radiat. Isot.*, 2012, V. 70, N. 10, P. 2377-2383. Doi: 10.1016/j.apradiso.2012.07.009
86. F. Szelecsenyi, G. Blessing, S.M. Qaim. Excitation functions of proton induced nuclear reactions on enriched  $^{61}\text{Ni}$  and  $^{64}\text{Ni}$ : Possibility of production of no-carrier-added  $^{61}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$  at a small cyclotron // *Appl. Radiat. Isot.*, 1993, V. 44, P. 575-580.
87. P. Burke, O. Golovko, J.C. Clark, F.I. Aigbirhio. An automated method for regular productions of copper-64 for PET radiopharmaceuticals // *Inorg. Chim. Acta*, 2010, V. 363, N. 6, P. 1316-1319. Doi: 10.1016/j.ica.2010.01.038
88. K. Abbas, J. Kozempel, M. Bonardi, F. Groppi, A. Alfarano, U. Holzwarth, F. Simonelli, H. Hofman, W. Horstmann, E. Menapace, L. Leseticky, N. Gibson. Cyclotron production of  $^{64}\text{Cu}$  by deuteron irradiation of  $^{64}\text{Zn}$  // *Appl. Rad. Isotopes*, 2006, V. 64, N. 9, P. 1001-1005. Doi: 10.1016/j.apradiso.2005.12.021
89. D.W. McCarthy, R.E. Shefer, R.E. Klinkowstein, L.A. Bass, W.H. Margeneau, C.S. Cutler, C.J. Anderson, M.J. Welch. Efficient production of high specific activity  $^{64}\text{Cu}$  using a biomedical cyclotron // *Nucl. Med. Biol.*, 1997, V. 24, N. 1, P. 35-43. Doi: 10.1016/s0969-8051(96)00157-6
90. R.R. Zinn, T.R. Chaudhuri, T.P. Cheng, J.S. Morris, W.A.J. Meyer. Production of no-carrier-added  $^{64}\text{Cu}$  from zinc metal irradiated under boron shielding // *Cancer*, 1994, V. 73 (S.3), N. 774-778.
91. C.S. Cutler, H.M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai, S.S. Jurisson. Radiometals for combined imaging and therapy // *Chem. Rev.*, 2013, V. 113, N. 2, P. 858-883. Doi: 10.1021/cr3003104
92. C. Bolzati, A. Caporale, S. Agostini, D. Carta, M. Cavazza Ceccato, F. Refosco, F. Tisato, E. Schievano, G. Bandoli. Avidin-biotin system: a small library of cysteine biotinylated derivatives designed for the  $[\text{}^{99}\text{mTc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$  metal fragment // *Nucl. Med. Biol.*, 2007, V. 34, N. 5, P. 511-522. Doi: 10.1016/j.nucmedbio.2007.04.006
93. M.R. Lewis, M. Wang, D.B. Axworthy, L.J. Theodore, R.W. Mallet, A.R. Fritzberg, M.J. Welch, C.J. Anderson. *In vivo* evaluation of pretargeted  $^{64}\text{Cu}$  for tumor imaging and therapy // *Nucl. Med.*, 2003, V. 44, N. 8, P. 1284-1292.
94. A. Roux, R. Gillet, S. Huclier-Markai, L. Ehret-Sabatier, L.J. Charbonnière, A.M. Nonat. Bifunctional bispidine derivatives for copper-64 labelling and positron emission tomography // *Org. Biomol. Chem.*, 2017, V. 15, N. 6, P. 1475-1483. Doi: 10.1039/c6ob02712a
95. M. Brandt, J. Cardinale, M.L. Aulsebrook, G. Gasser, T.L. Mindt. An Overview of PET Radiochemistry, Part 2: Radiometals // *J. Nucl. Med.*, 2018, V. 59, N. 10, P. 1500-1506. Doi: 10.2967/jnumed.117.190801
96. N. Wu, C.S. Kang, I. Sin, S. Ren, D. Liu, V.C. Ruthengael, M.R. Lewis, H.-S. Chong. Promising bifunctional chelators for copper  $^{64}\text{-PET}$  imaging: practical  $^{64}\text{Cu}$  radiolabeling and high *in vitro* and *in vivo* complex stability // *Biol. Inorg. Chem.*, 2016, V. 21, N. 2, P. 177-184. Doi: 10.1007/s00775-015-1318-7

97. A. Guillou, L.M.P. Lima, D. Esteban-Gomez, N. Le Poul, M.D. Bartholoma, C. Iatas-Iglesias, R. Delgado, V. Patinec, R. Tripier. Methylthiazolyl Tacn Ligands for Copper Complexation and Their Bifunctional Chelating Agent Derivatives for Bioconjugation and Copper-64 Radiolabeling: An Example with Bombesin // *Inorg. Chem.*, 2019, V. 58, N. 4. P. 2669-2685. Doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b03280
98. E. Aguilar-Ortiz, A.R. Jalilian, M.A. Avila-Rodriguez. Synthesis, characterization and evaluation of a Cu-labeled macrocyclic-porphyrin as a potential chelator for <sup>64</sup>Cu-based radiopharmaceuticals // *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2019, V. 320, N. 14, P. 79-86. Doi: 10.1007/s10967-019-06454-4
99. S. Sarkar, N. Bhatt, Y.S. Ha, P.T. Huynh, N. Soni, W. Lee, Y.J. Lee, J.Y. Kim, D.N. Pandya, G.I. An, K.C. Lee, Y. Chang, J. Yoo. High *in Vivo* Stability of <sup>64</sup>Cu-Labeled Cross-Bridged Chelators Is a Crucial Factor in Improved Tumor Imaging of RGD Peptide Conjugates // *J. Med. Chem.*, 2018, V. 61, N. 1, P. 385-395. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01671
100. L. Farzin, S. Sheibani, H.E. Moassesi, M. Shamsipur. An overview of nanoscale radionuclides and radiolabeled nanomaterials commonly used for nuclear molecular imaging and therapeutic functions // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2019, V. 107A, N. 1, P. 251-285. Doi: 10.1002/jbm.a.36550
101. Y. Matsumura, H. Maeda. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS // *Cancer Res.*, 1986, V. 46, P. 6387-6392.
102. А.П. Орлов, Т.П. Трофимова, М.А. Орлова. Переходные металлы, их органо-комплексы и радионуклиды, перспективные для медицинского применения // *Изв. Акад. наук. Сер. хим.*, 2022, Т. 79, №3, С. 415-429. Doi: 10.1007/s11172-022-3429-y
103. M. Shamsipur, L. Farzin, M. A. Tabrizi, M. Shanehsaz. CdTe amplification nanoplatfoms capped with thioglycolic acid for electrochemical aptasensing of ultra-traces of ATP // *Mater. Sci. Eng. C*, 2016, V. 69, P. 1354-1360. Doi: 10.1016/j.msec.2016.08.038.
104. C. Combes, C. Rey. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials // *Acta Biomater.*, 2010, V. 6, P. 3362-3378. Doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.017.
105. F. Sun, H. Zhou, J. Lee. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration // *Acta Biomaterialia*, 2011, V. 7, N. 11, P. 3813-3828. Doi: 10.1016/j.actbio.2011.07.002
106. V. Bayazit, M. Bayazit, E. Bayazit. Evaluation of bioceramic materials in biology and medicine // *J. Nanomater. Biostruct.*, 2010, V. 7, N. 1, P. 211-222.
107. S. Ramesh, R. Tolouei, M. Hamdi, J. Purbolaksono, Y.C. Tan, M. Amiriyan, D.W. Teng. Sintering behavior of nanocrystalline hydroxyapatite produced by wet chemical method // *Curr. Nanosci.*, 2011, V. 7, N. 6, P. 845-849. Doi: 10.2174/157341311798220538.
108. T. Laonapakul. Synthesis of hydroxyapatite from biogenic wastes // *KKU Eng. J.*, 2015, V. 42, N. 3, P. 269-275. Doi: 10.14456/kkuenj.2015.30.
109. F. Korber, G.Z. Tromel, J. // *Electrochem.*, 1932, V. 38, P. 578-580.
110. A. Ezerskyte-Miseviciene, A. Kareiva. Everything old is new again: a reinspection of solid-state method for the fabrication of high quality calcium hydroxyapatite bioceramics // *Mendeleev Commun.*, 2019, V. 29, N. 3, P. 273-275. Doi: 10.1016/j.mencom.2019.05.010
111. A.A. Chaudhry, S. Haque, S. Kellici, P. Boldrin, I. Rehman, F.A. Khalid, J.A. Darr. Instant nano-hydroxyapatite: A continuous and rapid hydrothermal synthesis // *Chem. Commun.*, 2006, P. 2286-2288. Doi: 10.1039/b518102j.
112. W.Y. Zhou, M. Wang, W. Cheung, B. Guo, D. Jia. Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanospheres through nanoemulsion // *Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, V. 19, N. 1, P. 103-110. Doi: 10.1007/s10856-007-3156-9.
113. C. Hoffmann, C. Zollfrank, G. Ziegler. Enzyme-catalysed synthesis of calcium phosphates // *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, V. 19, N. 2, P. 907-915. Doi: 10.1007/s10856-007-0165-7
114. М.А. Орлова, А.Л. Николаев, Т.П. Трофимова, А.П. Орлов, А.В. Северин, С.Н. Калмыков. Наночастицы на основе гидроксиапатита и порфирифуллерена для

- диагностического и терапевтического применения парамагнитных ионов и радионуклидов // Вестн. РГМУ, 2018, № 6, С. 94-102. Doi: 10.24075/brsmu.2018.075.
115. М.А. Трубицын, Н.Г. Габрук, И.И. Олейникова, Л.В. Тхуан, Д.В. Дат, Х.В. Хунг. Исследование биоактивности и сорбционных свойств наноразмерного кремнийсодержащего гидроксиапатита // *Фундаментальные исследования*, 2014, Т. 1, С. 71-75.
  116. И.В. Мелихов, В.Ф. Комаров, А.В. Северин, В.Е. Божевольнов, В.Н. Рудин. Двумерно-кристаллический гидроксиапатит // *Докл. АН*, Т. 2000, № 373, С. 355-358.
  117. Е.В. Сафронова, В.И. Путляев, А.И. Сергеева, Э.В. Куненков, Ю.Д. Третьяков. Синтез нанокристаллического гидроксиапатита кальция из сахаратов кальция и гидрофосфата аммония // *Докл. АН*, 2009, Т. 426, № 4, С. 491-496.
  118. E.S. Thian, T. Konishi, Y. Kawanobe, P.N. Lim, C. Choong, B. Ho, M. Aizawa. Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties // *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2013, V. 24, N. 2, P. 437-445. Doi: 10.1007/s10856-012-4817-x
  119. А.П. Орлов, М.А. Орлова, Т.П. Трофимова, Е.Ю. Осипова. Действие салицилатов и солей цинка на лейкоэмические клетки // *Изв. Акад. наук. Сер. хим.*, 2016, С. 1879-1881. Doi: 10.1007/s11172-016-1525-6.
  120. Т.П. Трофимова, М.А. Орлова, А.В. Северин, Е.С. Шаламова, А.Н. Прошин, А.П. Орлов. Комплекс цинка с N(5,6-дигидро-4Н-1,3-тиазин-2-ил)бензамидом // *Изв. Акад. наук. Сер. хим.*, 2018, №4, С. 768-773. Doi: 10.1007/s11172-018-2135-2
  121. M. Othmani, H. Bachoua, Y. Ghandour, A. Aissa, M. Debbabi. Synthesis, characterization and catalytic properties of copper-substituted hydroxyapatite nanocrystals // *Mat. Res. Bull.*, 2018, V. 97, P. 560-566. Doi: 10.1016/j.materresbull.2017.09.056
  122. S. Kadouche, H. Zemmouri, K. Benaoumeur, N. Drouiche, P. Sharrock, H. Lounici. Metal ion binding on hydroxyapatite (Hap) and study of the velocity of sedimentation // *Procedia Eng.*, 2012, V. 33, P. 377-384. Doi: 10.1016/j.proeng.2012.01.1217
  123. A. Corami, F. D'Acapito, S. Mingnardi, V. Ferrini. Removal of Cu from aqueous solutions by synthetic hydroxyapatite: EXAFS investigation // *Mater. Sci. Enng.*, 2008, V. 149, N. 2, P. 209-213.
  124. G. Vesselle, I. Petit, S. Boucebc, T. Rocher, S. Velasco, J.-P. Tasu. Radioembolization with yttrium-90 microspheres work up: Practical approach and literature review // *Diagn. Interv. Imaging*, 2015, V. 96, N. 6, P. 547-562. Doi: 10.1016/j.diii.2014.03.014
  125. N. Watanabe, N. Oriuchi, K. Endo, T. Inoue, S. Tanada, H. Murata and Y. Sasaki. Yttrium-90-labeled human macroaggregated albumin for internal radiotherapy: combined use with DTPA // *Nucl. Med. Biol.*, 1999, V. 26, N. 7, P. 847-852.
  126. G. Wei, P. X. Ma. Nanostructured Biomaterials for Regeneration // *Adv. Funct. Mater*, 2008, V. 18, N. 22, P. 3566-3682. Doi: 10.1002/adfm.200800662
  127. Y. Huang, X. Niu, L. Wang, J. Fan, X. Li, G. Zhou, Q. Feng, Y. Fan. Effects of hydroxyapatite/collagen composite on osteogenic differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells // *J. Composite Mater.*, 2014, V. 48, N. 16, P. 1971-1980. Doi: 10.1177/0021998313493808
  128. M. Jarcho. Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications // *Dent. Clin. North. Am.*, 1992, V. 36, N. 1, P. 19-26. PMID: 1310651
  129. M. Tirrell., E. Kokkoli, M. Biesalski. The role of surface science in bioengineered materials // *Surf. Sci.*, 2002, V. 500, N. 1-3, P. 61-83. Doi: 10.1016/S0039-6028(01)01548-5
  130. X. Zhu, O. Eibl, C. Berthold, L. Scheideler, J. Geis-Gerstorfer. Structural characterization of nanocrystalline hydroxyapatite and adhesion of pre-osteoblast cells // *Nanotechnology*, 2006, V. 17, N. 2711. Doi:10.1088/0957-4484/17/11/001
  131. P. Rawat, I. Ahmad, S.C. Thomas, S. Pandey, D. Vohora, S. Gupta, F.J. Ahmad, S. Talegaonkar. Revisiting bone targeting potential of novel hydroxyapatite based surface modified PLGA nanoparticles of risedronate: pharmacokinetic and biochemical assessment // *Int. J. Pharm.*, 2016, V. 506, N. 1-2, P. 253-261. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.049
  132. A.L.C. Maia, C.H. Cavalcante, M.G.F. De Souza, A.F. De Carolina, D. Rubello, S. Chondrogiannis, V.N. Cardoso, G.A. Ramaldes, A.L.B. De Barros, D.C.F. Soares.

- Hydroxyapatite nanoparticles: preparation, characterization, and evaluation of their potential use in bone targeting: an animal study // *Nucl. Med. Commun.*, 2016, V. 37, N. 7, P. 775-782. Doi: 10.1097/MNM.0000000000000510
133. M. Huysal, M. Senel. Dendrimer functional hydroxyapatite nanoparticles generated by functionalization with siloxane-cored PAMAM dendrons // *J. Colloid Interface Sci.*, 2017, V. 500, P. 105-112. Doi: 10.1016/j.jcis.2017.04.004
134. M.F. Cipreste, W. Mussel, J.B. da Silva, M.B. de Freitas Marques, R.J.C. Batista, P.L. Gastelois, W.A. de Almeida Macedo, E.M.B. de Sousa. A new theranostic system for bone disorders: Functionalized folate-MDP hydroxyapatite nanoparticles with radiolabeled copper-64 // *Mater. Chem. Phys.*, 2020, V. 254, P. 123265. Doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.123265
135. M. Stapleton, K. Sawamoto, C. Almeciga-Díaz, W. Mackenzie, R. Mason, T. Orii, S. Tomatsu. Development of bone targeting drugs // *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, V. 18, N. 7, P. 1345. Doi: 10.3390/ijms18071345
136. D.E. Large, J.R. Soucy, J. Hebert, D.T. Auguste. Advances in receptor-mediated, tumor-targeted drug delivery // *Adv. Ther.*, 2019, V. 2, N. 1, P. 1800091. Doi: 10.1002/adtp.201800091
137. А. Лампрехт. Нанолечения. Концепции доставки лекарств в нанонауке. Науч. Ред. Н.Л. Клячко. М., Научный мир, 2010, 232 с.
138. N. Larson, H. Ghandehari. Polymeric Conjugates for Drug Delivery // *Chem. Mater.*, 2012, V. 24, N. 5, P. 840-853. Doi: 10.1021/cm2031569
139. H. Ringsdorf. Structure and properties of pharmacologically active polymers // *J. Polym. Sci.*, 1975, V. 51, N. 1, P. 135. Doi: 10.1002/polc.5070510111
140. P. Datta, S. Ray, J. Label. Nanoparticulate formulations of radiopharmaceuticals: Strategy to improve targeting and biodistribution properties // *Compd. Radiopharm.*, 2020, V. 63, P. 333. Doi: 10.1002/jlcr.3839
141. F. Chen, H. Hong, Y. Zhang, H.F. Valdovinos, S. Shi, G.S. Kwon, C.P. Theuer, T.E. Barnhart, W. Cai. *In vivo* tumor targeting and image-guided drug delivery with antibody-conjugated. Radiolabeled Mesoporous Silica Nanoparticles // *ACS Nano.*, 2013, V. 7, N. 10, P. 9027-9039. Doi: 10.1021/nn403617j
142. T.M. Shaffer, S. Harmsen, E. Khwaja, M.F. Kircher, C.M. Drain, J. Grimm. Stable radiolabeling of sulfur-functionalized silica nanoparticles with Copper-64 // *Nano Lett.*, 2016, V. 16, N. 9, P. 5601-5604. Doi: org/10.1021/acs.nanolett.6b02161
143. J. Liu, D. Pan, X. Huang, S. Wang, H. Chen, Y.Z. Zhu, L. Ye. Front. Targeting collagen in tumor extracellular matrix as a novel targeted strategy in cancer immunotherapy // *Oncol.*, 2023, V. 24, N. 1225483. Doi: 10.3389/fonc.2023.1225483
144. P.T. Nghiem, S. Bhatia, E.J. Lipson, R.R. Kudchadkar, N.J. Miller, L. Annamalai L, S. Berry, E.K. Chartash, A. Daud, S.P. Fling, P.A. Friedlander, H.M. Kluger. PD-1 blockade with pembrolizumab in advanced merkel-cell carcinoma // *New Engl. J. Med.*, 2016, V. 374, N. 26, P. 2542-2552. Doi: 10.1056/NEJMoa1603702
145. M.E. Suarez-Almazor, S.T. Kim, N. Abdel-Wahab, A. Diab. Review: immune-related adverse events with use of checkpoint inhibitors for immunotherapy of cancer // *Arthritis Rheumatol.*, 2017, V. 69, N. 4, P. 687-699. Doi: 10.1002/art.40043
146. T. van der Geest, P. Laverman, J.M. Metselaar, G. Storm, O.C. Boerman. Radionuclide imaging of liposomal drug delivery // *Expert Opin Drug Deliv.*, 2016, V. 13, N. 9, P. 1231-1242. Doi: 10.1080/17425247.2016.1205584
147. П.Б. Курапов, Е.Ю. Бахтенко. Медицинская нанобиотехнология. Под ред. акад. В.П. Чехонина. М., ФГАОУ ВО РНИМУ, 2021, 203 с.
148. F. Yamamoto, R. Yamahara, A. Makino, K. Kurihara, H. Tsukada, E. Hara, I. Hara, S. Kizaka-Kondoh, Y. Ohkubo, E. Ozeki, S. Kimura. Radiosynthesis and initial evaluation of <sup>18</sup>F labeled nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide // *Nucl. Med. Biol.*, 2013, V. 40, N. 3, P. 387-394. Doi: 10.1016/j.nucmedbio.2012.12.008
149. D.-E. Lee, J.H. Na, S. Lee, S. Lee, C.M. Kang, H.N. Kim, S.J. Han, H. Kim, Y.S. Choe, K.-H. Jung, K.C. Lee, K. Choi, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, K.-H. Lee, K. Kim. Facile method to radiolabel

- glycol chitosan nanoparticles with  $^{64}\text{Cu}$  via copper-free click chemistry for MicroPET imaging // *Mol Pharm.*, 2013, V. 10, N. 6, P. 2190-2198. Doi: 10.1021/mp300601r
150. M. Tanaka, A. Hosotani, T. Mukai. J. Label. Indium-111 labeling of high-density lipoprotein-mimicking phospholipid-styrene maleic acid copolymer complexes and its biodistribution in mice // *Compd. Radiopharm.*, 2018, V. 61, N. 11, P. 857-863. Doi: 10.1002/jlcr.3668
151. K.B. Gorden, K.S. Gorski, S.J. Gibson, R.M. Kedl, W.C. Kieper, X. Qiu, M.A. Tomai, S.S. Alkan, J.P. Vasilakos. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8 // *J. Immunol.*, 2005, V. 174, N. 3, P. 1259-1268. Doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1259.
152. P. Zhou, J. Qin, C. Zhou, G. Wan, Y. Liu, M. Zhang, X. Yang, N. Zhang, Y. Wang. Multifunctional nanoparticles based on a polymeric copper chelator for combination treatment of metastatic breast cancer // *Biomaterials*, 2019, V. 195, P. 86-99. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.01.007
153. H.-Y. Lee, Z. Li, K. Chen, A.R Hsu, C. Xu, J. Xie, S. Sun, X. Chenet. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles // *J. Nucl. Med.*, 2008, V. 49, N. 8, P. 1371-1379. Doi: 10.2967/jnumed.108.051243
154. G. Hong, S. Diao, A.L. Antaris, H. Dai. Carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal therapy // *Chem. Rev.*, 2015, V. 115, N. 19, P. 10816-10906. Doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00008
155. V.N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi. The properties and applications of nanodiamonds // *Nat. Nanotechnol.*, 2012, V. 7, P. 11-23. Doi: 10.1038/nnano.2011.209
156. R. Singh, D. Pantarotto, L. Lacerda, G. Pastorin, C. Klumpp, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2006, V. 103, N. 9, P. 3357-3362. Doi: 10.1073/pnas.0509009103
157. S.M. Rezayat, S.V. Bousheri, B. Samanian, A.O. Omidvari, S. Tarighat, S. Esmaeli, S. Sarcar, N. Amirshahi, R.N. Alyutdin, M.A. Orlova, I.N. Trushkov, P.K. Liu, A.L. Buchachenko, D.A. Kuznetsov. The porphyrin-fullerene nanoparticles to promote the ATP overproduction in myocardium.  $^{25}\text{Mg}^{2+}$  magnitic isotope effect // *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, V. 44, N. 4, P. 554-569. Doi: 10.1016/j.ejmech.2008.07.030
158. Г.М. Бердичевский, Л.В. Васина, М.А. Галкин, В.В. Шаройко, К.Н. Семенов. Изучение влияния детонационных наноалмазов и их конъюгатов с доксорубицином и диоксадэтом на функцию митохондрий // *Изв. Иркутского гос. ун-та. Сер. Биология. Экология*, 2022, Т. 41, С. 3. Doi: 10.26516/2073-3372.2022.41.3
159. A.V. Kabanov, S.V. Vinogradov. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities // *Angew Chem.*, 2009, V. 48, N. 30, P. 5418-5429. Doi: 10.1002/anie.200900441
160. K.S. Soni, S.S. Desale, T.K. Bronich. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation // *J. Control. Release*, 2016, V. 240, P. 109-126. Doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.009.
161. A.W. Bridges, R E. Whitmire, N. Singh, K.L. Templeman, J.E. Babensee, L.A. Lyon, A.J. García. Chronic inflammatory responses to microgel-based implant coatings // *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2010, V. 94, N. 1, P. 252-258. Doi: 10.1002/jbm.a.32669
162. J.H. Lee, H.S. Ahn, E.K. Kim, T. Kim. Efficacy of Sodium Hyaluronate and Carboxymethylcellulose in Treating Mild to Moderate Dry Eye Disease // *Cornea*, 2011, V. 30, N. 2, P. 175-179. Doi: 10.1097/ICO.0b013e3181e9adcc
163. М.А.Брусникина, М.В.Числов, О.И.Силуков, Т.В.Волкова, А.Н.Прошин, И.В.Терехова. Комплексообразование  $\beta$ -циклодекстрина и гидроксипролил- $\beta$ -циклодекстрина с биологически-активным соединением на основе 1,2,4-тиадиазола // *Химия в интересах устойчивого развития*, 2015, Т. 23, С. 601. Doi: 10.15372/KhUR20150514.

164. D. Hua, S. Gao, M. Zhang, W. Ma, C. Huang. A novel xanthan gum-based conductive hydrogel with excellent mechanical, biocompatible, and self-healing performances // *Carbohydrate Polymers*, 2020, V. 247, P. 116743. Doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116743
165. D. Chenthamara, S. Subramaniam, S.G. Ramakrishnan, S. Krishnaswamy, M.M. Essa, F.-H. Lin, M.W. Qoronfleh. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration // *Biomaterials Res.*, 2019, V. 23, N. 1. Doi: 10.1186/s40824-019-0166-x
166. M.F. Attia, N. Anton, J. Wallyn, Z. Omran, T.F. Vandamme. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites // *J. Pharm. Pharmacol.*, 2019, V. 71, N. 8, P. 1185-1198. Doi: 10.1111/jphp.13098
167. U. Wais, A.W. Jackson, T. He, H. Zhang. Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles // *Nanoscale*, 2016, V. 8, N. 1746-1769. Doi: 10.1039/c5nr07161e
168. A. Sundaramurthy. Responsive polyelectrolyte multilayer nanofilms for drug delivery applications // *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications*, 2018, V. 1, P. 247-266. Doi: 10.1016/B978-0-08-101997-9.00013-8
169. H.-W. Lu, L.-M. Zhang, C. Wang, R.-F. Chen. Preparation and properties of new micellar drug carriers based on hydrophobically modified amylopectin // *Carbohydrate Polymers*, 2011, V. 83, N. 4, P. 1499-1506. Doi: 10.1016/j.carbpol.2010.09.061
170. J. Jelken, S.-H. Jung, N. Lomadze, Y.D. Gordievskaya, E.Yu. Kramarenko, A. Pich, D. Santer. Tuning the Volume Phase Transition Temperature of Microgels by Light // *Adv. Funct. Mater.*, 2021, N. 2, P. 2107946. Doi: 10.1002/adfm.202107946.
171. А.В. Пономарев, Б.Г. Ершов. Фундаментальные аспекты радиационно-термических превращений целлюлозы и растительной биомассы // *Успехи химии*, 2012, Т. 81, № 10, С. 918-935. Doi: 10.1070/RC2012v081n10ABEH004266.
172. S. Saiki, N. Nagasawa, A. Hiroki, N. Morishita, M. Tamada, H. Kudo, Y. Katsumura. ESR study on radiation-induced radicals in carboxymethyl cellulose aqueous solution // *Rad. Phys. Chem.*, 2011, V. 80, N. 2, P. 149-152. Doi: 10.1016/j.radphyschem.2010.07.024.
173. A.V. Ponomarev, B.G. Ershov. Radiation-Induced High-Temperature Conversion of Cellulose // *Molecule*, 2014, V. 19, N. 10, P. 16877-16908. Doi: 10.3390/molecules191016877
174. М.А. Орлова, Т.П. Трофимова, А.П. Орлов. Роль NO и NO-синтаз в онкогенезе // *Изв. Акад. наук, Серия Химия*, 2015, Т. 6, С. 1211. Doi: 10.1007/s11172-015-1004-5
175. S. Daff. NO synthase: structures and mechanisms // *Nitric Oxide*, 2010, V. 23, N. 1. Doi: 10.1016/j.niox.2010.03.001
176. М.А. Орлова, С.А. Румянцев, А.П. Орлов, С.В. Никулин, Т.П. Трофимова Т.П.. М.В. Филимонова, А.А. Полозников, Е.Ю. Осипова. О перспективах некоторых новых подходов воздействия на лейкемические клетки // *Изв. Акад. наук Сер. Хим.*, 2014, №5, С. 1205-1220. Doi: 10.1007/s11172-014-0574-y
177. В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. Оксид азота [NO]. Вузовская книга, М., 2004, 359 сс
178. T. Tabatabaie, K.L. Graham, A.M. Vasques, R.A. Floyd, Y. Katake. Inhibition of the cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase expression in rat insulinoma cells by phenyl N-tert-butyl nitron // *Nitric Oxide*, 2000, V. 4, N. 2, P. 157-167. Doi: 10.1006/niox.2000.0281.
179. А.А. Мандругин, Т.П. Трофимова, В.М. Федосеев, С.Я. Проскураков, Л.В. Штейн, А.Н. Прошин, А.Н. Пушин. NO-ингибирующая активность производных 2-амино-2-тиазолина // *Химико-фармацевтический журнал*, 2007, Т. 41, Н.12, С. 61-63.
180. И.А. Замулаева, С.Г. Смирнова, Н.В. Орлова, С.Я. Проскураков, А.С. Саенко. Корреляция между внутриклеточным содержанием оксида азота и частотой мутантных лимфоцитов после радиационного воздействия в малых дозах // *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2007, Т. 47, № 1, С. 86-92.
181. S. Connolly, A. Aberg, A. Arvai, H.G. Beaton, D.R. Cheshire, A.R. Cook, S. Cooper, D. Cox, P. Hamley, P. Mallinder, I. Millichip, D.J. Nicholls, R.J. Rosenfeld, S.A. St.-Gallay, J. Tainer, A.C. Tinker, A.V. Wallace. 2-Aminopyridines as highly selective inducible nitric oxide synthase inhibitors. Differential binding modes dependent on nitrogen substitution // *J. Med. Chem.*, 2004, V. 47, N. 12, P. 3320-3323. Doi: 10.1021/jm031035n

182. C. Quiney, D. Dauzonne, C. Kern, J. Fourneron, J. Izard, R.M. Mohamma, J. Kolb, C. Billard. Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells // *Leukemia Res.*, 2004, V. 28, N. 8, P. 851-861. Doi: 10.1016/j.leukres.2003.12.003
183. P. Mukherjee, M.A. Cinelli, S. Kang, R.B. Silverman. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain // *Chem. Soc. Rev.*, 2014, V. 43, P. 6814-6838. Doi: 10.1039/c3cs60467e
184. C. Kellner, S.J. Zunino. Nitric oxide is synthesized in acute leukemia cells after exposure to phenolic antioxidants and initially protects against mitochondrial membrane depolarization // *Cancer Lett.*, 2004, V. 215, N. 1, P. 43-52. Doi:10.1016/j.canlet.2004.06.046
185. Н.Г. Гуманова. Оксид азота, его циркулирующие метаболиты NO<sub>x</sub> и их роль в функционировании человеческого организма и прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти // *Профилактическая медицина*. 2021, Т. 24, № 10, С. 102-125. Doi: 10.17116/profmed202124091102
186. R.M. Rapoport. Acute nitric oxide synthase inhibition and endothelin-1-dependent arterial pressure elevation // *Frontiers in Pharmacol.*, 2014, V. 5, article number 57. Doi: 10.3389/fphar.2014.00057
187. J.C. Cheng, S. Esparza, S. Sandoval, D. Shankar, C. Fu, K.M. Sakamoto. Potential role of CREB as a prognostic marker in acute myeloid leukemia // *Future Oncol.*, 2007, V. 3, N. 4, P. 475-480. Doi: 10.2217/14796694.3.4.475
188. D.B. Shankar, J.C. Cheng, K. Kinjo, N. Federman, N.B. Moore, A. Gill, N.P. Rao, E.M. Landaw, K.M. Sakamoto. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia // *Cancer Cell.*, 2005, V. 7, N. 4, P. 351-362. Doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.018
189. P.J. Shami, B. Weinberg. Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells // *Blood*, 1996, V. 87, N. 3, P. 977-982. Doi: 10.1182/blood.V87.3.977.bloodjournal873977
190. А.А. Мандругин, В.М. Федосеев, А.Г. Тарасенко, В.С. Чурилин. Механизмы природной и модифицированной радиочувствительности. Изд-во МГУ, Москва, 1977, 58 сс.
191. М.А. Орлова, Т.П. Трофимова, С.В. Никулин, А.П. Орлов. Взаимосвязь ингибиторной активности N-, S-содержащих гетероциклов по отношению к NO-синтазам с их радиопротекторными и антилейкемическими свойствами // *Вестн. Моск. ун-та, Химия.*, 2016, Т. 57, № 4, С. 269-275. Doi: 10.3103/s0027131416040052
192. П. Куна. Химическая радиозащита. М., 1989
193. А.В. Северин, Д.А. Панкратов. Синтез гидроксипатита в присутствии ионов железа // *Журн. неорган. химии*, 2016, Т. 61, № 3, С. 265-287.
194. А.С. Золотова, Т.П. Трофимова, А.В. Северин, М.А. Орлова. Особенности сорбции меди и эффекторов NO-синтазы на гидроксипатите. Влияние бычьего сывороточного альбумина на процесс сорбции // *Изв. Акад. Наук, Сер. Химия*. 2025, Т. 3, №1, С. 256-260.
195. C. Zanchini, R.D. Willett. Crystal structure, magnetism, and electronic and EPR spectroscopies of bis(2-aminopyrimidinium) tetrachlorocuprate(II): a square-planar CuCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> anion with semicoordinated cationic ligands // *Inorg. Chem.*, 1990, V. 29, N. 16, P. 3027-3064. Doi: 10.1021/ic00341a034
196. М.А. Орлова, Т.П. Трофимова, Н.С. Золотова, И.А. Иванов, В.В. Спиридонов, А.Н. Прошин, А.А. Бородков, А.А. Ярославов, А.П. Орлов. Комплексы меди: цитотоксичность и возможности транспорта // *Изв. Акад. наук, Сер. Химия*, 2019, №10, С. 1933-1939. Doi: 10.1007/s11172-019-2649-2
197. С.Н. Жабин, А.В. Пенто, А.А. Гречников, А.С. Бородков, С.Б. Сартаков, С.М. Никифоров, С.С. Алимпиев. О роли лазерного излучения в процессах лазерной десорбции/ионизации с кремниевых поверхностей // *Квантовая электроника*, 2011, Т. 41, С. 835.
198. А.А. Гречников, А.С. Бородков, С.С. Алимпиев, С.М. Никифоров, Я.О. Симановский. Дериватизация ионов в условиях лазерной десорбции/ионизации, активируемой

- поверхностью // Журн. аналит. химии, 2013, Т. 74, № 3, С. 211-217. Doi: 10.1134/S1061934812110056
199. STOE & Cie GmbH, Дармштадт, Германия, 2013
200. D.W. Huttmacher, J.T. Schantz, C.X.F. Lam, K.C. Tan, T.C. Lim, J. Tissue. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective // Eng. Regenerative Med., 2007, V. 1, N. 4, P. 245-260. Doi: 10.1002/term.24
201. G.M. Sheldrick. A Short History of SHELX // Acta Crystallogr., 2008, A64, P. 112-122. Doi: 10.1107/S0108767307043930
202. <http://www.bdbiosciences.com/eu/applications/research/apoptosis/apoptosis-kits-sets/fits-v-apoptosis-detection-kit-i/p/556547>
203. M.G. Ormerod. Flow Cytometry: a Practical Approach. Oxford Univ. Press, Oxford, 1994, P. 119.
204. L.M. Weisenthal, M.E. Lippman. Clonogenic and nonclonogenic *in vitro* chemosensitivity assays // Cancer Treat. Rep., 1985, V. 69, N. 6, P. 615-632. PMID 3893692.
205. A.J.P. Veerman, R. Pieters. Drug sensitivity assays in leukaemia and lymphoma // J. Haematol., 1990, V. 74, N. 4, P. 381-384. Doi: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb06323.x
206. Н.С. Золотова, В.К. Долгова, А.П. Орлов. Специфические свойства гидроксипатита, как потенциального транспортера ионов меди и её комплексов // Изв. Акад. наук, Сер. Хим., 2019, №5, С. 1102-1108. Doi: 10.1007/s11172-019-2526-z
207. M. Othmani, H. Bachoua, Y. Ghandour, A. Aissa, M. Debbabi. Synthesis, characterization and catalytic properties of copper-substituted hydroxyapatite nanocrystals // Mat. Res. Bull., 2018, V. 97, P. 560-566. Doi: 10.1016/j.materresbull.2017.09.056
208. A. Bigi, E. Foresti, M. Gandolfi, M. Gazzano, N. Roveri. Inhibiting effect of zinc on hydroxyapatite crystallization // J. Inorg. Biochem., 1995, V. 58, P. 49-58. Doi: 10.1016/0162-0134(94)00036-A
209. S. Brundavanam, G. Eddy, J. Poinern, D. Fawsett. Kinetic and Adsorption Behaviour of Aqueous Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> Using a 30 nm Hydroxyapatite Based Powder Synthesized via a Combined Ultrasound and Microwave Based // Am. J. Mater. Sci., 2015, V. 5, N. 2, P. 31-40. Doi:10.5923/j.materials.20150502.02
210. O. Livitska, N. Strutynska, I. Zatovsky, A. Baeda. Copper(II), zinc(II) and copper(II)/zinc(II)-containing carbonate-substituted hydroxyapatite: synthesis, characterization and thermal behavior // Mat.-wiss. u. Werkstofftech., 2016, V. 47, N. 2-3, P. 85-91. Doi: 10.1002/mawe.201600460
211. L. Cheng, F. Ye, R. Yang. Osteoinduction of hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula // Acta Biomaterialia, 2010, V. 6, N. 4, P. 1569-1574.
212. А.С. Золотова, М.А. Орлова, В.В. Спиридонов, Т.П. Трофимова, А.Ю. Лупатов, А.А. Ярославов, С.Н. Калмыков. Микрогели на основе карбоксиметилцеллюлозы, как мультифункциональный носитель для иммобилизации ингибитора и активатора индуцибельной NO-синтазы // Изв. Акад. наук, Сер. Хим., 2025, №1, С. 252-255. Doi: 10.1007/s11172-025-4520-y
213. М.А. Орлова, В.В. Спиридонов, А.П. Орлов, Н.С. Золотова, А.Ю. Лупатов, Т.П. Трофимова, С.Н. Калмыков, А.А. Ярославов. Complexes of carboxymethylcellulose with Cu<sup>2+</sup>- ions as a prototype of antitumor agent // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2022, V. 632, N. 127814. Doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.127814.
214. М.А. Орлова, В.В. Спиридонов, Г.А. Бадун, Т.П. Трофимова, А.П. Орлов, А.С. Золотова, А.В. Прилкова, Г.Ю. Аleshin, М.Г. Чернышева, А.А. Ярославов, С.Н. Калмыков. *In vivo* behavior of carboxymethylcellulose based microgels containing <sup>67</sup>Cu // Mendeleev Comm., 2022, V. 32, N. 5, P. 658-660. Doi: 10.1016/j.mencom.2022.09.030
215. А.В. Шишков, Э.С. Филатов, Е.Ф. Симонов, М.Ф. Унукович, В.И. Гольданский, А.Н. Несмеянов. Получение меченных тритием биологически активных соединений // ДАН СССР, 1976, Т. 228, С. 1237.

216. Г.А. Бадун, М.Г. Чернышова, Ю.Г. Казаишвили, Б.А. Рудой. Синтез полимерной субстанции «Кагоцел», меченной тритием: метод термической активации трития // Фармация, 2018, Т. 67, № 7, С. 14-20. Doi: 10.29296/25419218-2018-07-03
217. R. Manalich, L. Reyes, M. Herrera, C. Melendi, I. Fundora. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study // *Kidney International*, 2000, V. 58, N. 2, P. 770-773. Doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00225.x
218. J. Jelken, S.-H. Jung, N. Lomadze, Y.D. Gordievskaya, E.Yu. Kramarenko, A. Pich, S. Santer. Tuning the Volume Phase Transition Temperature of Microgels by Light // *Adv. Funct. Mater.*, 2022, V. 32, N. 2, P. 2107946. Doi: 10.1002/adfm.202107946
219. М.А. Орлова, Т.П. Трофимова, А.С. Золотова, А.А. Ларенков, А.П. Орлов, А.А. Бородков, В.В. Спиридонов. Радиационная стабильность микрогелей карбоксиметилцеллюлозы, сшитой ионами меди. Изв. Акад. наук, Сер. Химия, 2022, №11, С. 2515-2518. Doi: 10.1007/s11172-022-3681-1
220. A.V. Ponomarev, B.G. Ershov. Fundamental aspects of radiation-thermal transformations of cellulose and plant biomass // *Russ. Chem. Rev.*, 2012, V. 81, N. 10, P. 918-935. Doi: 10.1070/RC2012v081n10ABEH004266.
221. S. Saiki, N. Nagasawa, A. Hiroki, N. Morishita, M. Tamada, H. Kudo, Y. Katsumura. ESR study on radiation-induced radicals in carboxymethyl cellulose aqueous solution // *Rad. Phys. Chem.*, 2011, V. 80, N. 2, P. 149-152. Doi:10.1016/j.radphyschem.2010.07.024.
222. A.V. Ponomarev B.G. Ershov. Radiation-Induced High-Temperature Conversion of Cellulose // *Molecule*, 2014, V. 19, N. 10, P. 16877-16908. Doi: 10.3390/molecules191016877.
223. К.В. Мкртчян, А.А. Зезин, Е.А. Зезина, С.С. Абрамчук, И.А. Баранова. Формирование металлических наноструктур под воздействием рентгеновского излучения в пленках интерполиэлектролитных комплексов с различным содержанием ионов серебра // *Изв. Акад. наук, Сер. Хим.*, 2020, № 9, С. 1731-1739. Doi: 10.1007/s11172-020-2956-7
224. V. Spiridonov, A. Lukmanova, D. Pozdyshev, Yu. Antonova, V. Kusaja, V. Muronetz, A. Yaroslavov. Enzyme-induced degradation of natural and artificial linear polyanion // *Carbohydrate Res.*, 2024, V. 546, P. 109310. Doi: 10.1016/j.carres.2024.109310.

## 8. Приложения 1-4

### Приложение 1

Заявка с регистрационным номером: 124-ж (124-а) Дата регистрации: 27.01.2021 на исследования с использованием животных одобрена Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Номер протокола заседания: 126-д, дата заседания: 11.02.2021

### Приложение 2

#### РСА

Данные РСА для комплекса меди **3** -  $Cu_2L'_2Cl_3$  CCDC № 2050373

Table 1. Crystal data and structure refinement for (3).

Identification code	(3)	
Empirical formula	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>3</sub> Cu <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	
Formula weight	674.00	
Temperature	295(2) K	
Wavelength	1.54186 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P -1	
Unit cell dimensions	a = 8.6885(7) Å	α = 81.014(7)°.
	b = 12.8230(9) Å	β = 87.864(6)°.
	c = 12.8264(9) Å	γ = 70.607(7)°.
Volume	1331.24(18) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.681 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	6.444 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	682	
Theta range for data collection	3.489 to 66.370°.	
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 10, -15 ≤ k ≤ 15, -5 ≤ l ≤ 14	
Reflections collected	9012	
Independent reflections	4392 [R(int) = 0.0498]	
Completeness to theta = 66.370°	93.8 %	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	4392 / 0 / 325	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.906	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0466, wR2 = 0.1044	
R indices (all data)	R1 = 0.0820, wR2 = 0.1134	
Extinction coefficient	0.00084(16)	
Largest diff. peak and hole	0.461 and -0.728 e. Å <sup>-3</sup>	

Table 2. Bond lengths [ $\text{\AA}$ ] and angles [ $^\circ$ ] for (3).

---

Cu(1)-N(1B)	1.956(3)
Cu(1)-N(1A)	1.958(3)
Cu(1)-O(1A)	2.055(3)
Cu(1)-O(1B)	2.062(3)
Cu(1)-Cl(1)	2.2958(11)
Cu(2)-Cl(2)	2.0893(17)
Cu(2)-Cl(3)	2.0911(17)
S(1A)-C(5A)	1.742(4)
S(1A)-C(4A)	1.811(5)
O(1A)-C(6A)	1.235(5)
N(1A)-C(5A)	1.283(5)
N(1A)-C(2A)	1.476(5)
N(2A)-C(6A)	1.357(5)
N(2A)-C(5A)	1.398(5)
N(2A)-H(2A)	0.75(4)
C(2A)-C(3A)	1.501(6)
C(2A)-H(2A1)	0.9700
C(2A)-H(2A2)	0.9700
C(3A)-C(4A)	1.494(6)
C(3A)-H(3A1)	0.9700
C(3A)-H(3A2)	0.9700
C(4A)-H(4A1)	0.9700
C(4A)-H(4A2)	0.9700
C(6A)-C(7A)	1.477(6)
C(7A)-C(12A)	1.389(6)
C(7A)-C(8A)	1.394(6)
C(8A)-C(9A)	1.385(6)
C(8A)-H(8A)	0.9300
C(9A)-C(10A)	1.366(7)
C(9A)-H(9A)	0.9300
C(10A)-C(11A)	1.371(7)
C(10A)-H(10A)	0.9300
C(11A)-C(12A)	1.372(6)
C(11A)-H(11A)	0.9300
C(12A)-H(12A)	0.9300
S(1B)-C(5B)	1.751(4)

S(1B)-C(4B)	1.811(5)
O(1B)-C(6B)	1.234(5)
N(1B)-C(5B)	1.267(5)
N(1B)-C(2B)	1.480(5)
N(2B)-C(6B)	1.374(5)
N(2B)-C(5B)	1.404(5)
N(2B)-H(2B)	0.84(5)
C(2B)-C(3B)	1.503(5)
C(2B)-H(2B1)	0.9700
C(2B)-H(2B2)	0.9700
C(3B)-C(4B)	1.493(7)
C(3B)-H(3B1)	0.9700
C(3B)-H(3B2)	0.9700
C(4B)-H(4B1)	0.9700
C(4B)-H(4B2)	0.9700
C(6B)-C(7B)	1.471(6)
C(7B)-C(12B)	1.383(6)
C(7B)-C(8B)	1.384(6)
C(8B)-C(9B)	1.375(6)
C(8B)-H(8B)	0.9300
C(9B)-C(10B)	1.377(7)
C(9B)-H(9B)	0.9300
C(10B)-C(11B)	1.369(7)
C(10B)-H(10B)	0.9300
C(11B)-C(12B)	1.391(6)
C(11B)-H(11B)	0.9300
C(12B)-H(12B)	0.9300
N(1B)-Cu(1)-N(1A)	176.78(13)
N(1B)-Cu(1)-O(1A)	91.43(12)
N(1A)-Cu(1)-O(1A)	87.07(12)
N(1B)-Cu(1)-O(1B)	86.94(13)
N(1A)-Cu(1)-O(1B)	90.67(13)
O(1A)-Cu(1)-O(1B)	104.59(12)
N(1B)-Cu(1)-Cl(1)	92.38(10)
N(1A)-Cu(1)-Cl(1)	90.82(10)
O(1A)-Cu(1)-Cl(1)	122.59(9)
O(1B)-Cu(1)-Cl(1)	132.81(9)
Cl(2)-Cu(2)-Cl(3)	177.05(7)
C(5A)-S(1A)-C(4A)	102.1(2)

C(6A)-O(1A)-Cu(1)	125.1(3)
C(5A)-N(1A)-C(2A)	120.6(3)
C(5A)-N(1A)-Cu(1)	126.5(3)
C(2A)-N(1A)-Cu(1)	112.6(3)
C(6A)-N(2A)-C(5A)	127.5(4)
C(6A)-N(2A)-H(2A)	117(3)
C(5A)-N(2A)-H(2A)	115(3)
N(1A)-C(2A)-C(3A)	113.4(4)
N(1A)-C(2A)-H(2A1)	108.9
C(3A)-C(2A)-H(2A1)	108.9
N(1A)-C(2A)-H(2A2)	108.9
C(3A)-C(2A)-H(2A2)	108.9
H(2A1)-C(2A)-H(2A2)	107.7
C(4A)-C(3A)-C(2A)	111.3(4)
C(4A)-C(3A)-H(3A1)	109.4
C(2A)-C(3A)-H(3A1)	109.4
C(4A)-C(3A)-H(3A2)	109.4
C(2A)-C(3A)-H(3A2)	109.4
H(3A1)-C(3A)-H(3A2)	108.0
C(3A)-C(4A)-S(1A)	113.6(3)
C(3A)-C(4A)-H(4A1)	108.8
S(1A)-C(4A)-H(4A1)	108.8
C(3A)-C(4A)-H(4A2)	108.8
S(1A)-C(4A)-H(4A2)	108.8
H(4A1)-C(4A)-H(4A2)	107.7
N(1A)-C(5A)-N(2A)	121.7(4)
N(1A)-C(5A)-S(1A)	128.3(3)
N(2A)-C(5A)-S(1A)	110.0(3)
O(1A)-C(6A)-N(2A)	122.7(4)
O(1A)-C(6A)-C(7A)	119.0(4)
N(2A)-C(6A)-C(7A)	118.3(4)
C(12A)-C(7A)-C(8A)	119.4(4)
C(12A)-C(7A)-C(6A)	117.7(4)
C(8A)-C(7A)-C(6A)	122.9(4)
C(9A)-C(8A)-C(7A)	119.5(5)
C(9A)-C(8A)-H(8A)	120.3
C(7A)-C(8A)-H(8A)	120.3
C(10A)-C(9A)-C(8A)	120.2(5)
C(10A)-C(9A)-H(9A)	119.9
C(8A)-C(9A)-H(9A)	119.9

C(9A)-C(10A)-C(11A)	120.7(5)
C(9A)-C(10A)-H(10A)	119.6
C(11A)-C(10A)-H(10A)	119.6
C(10A)-C(11A)-C(12A)	120.1(5)
C(10A)-C(11A)-H(11A)	120.0
C(12A)-C(11A)-H(11A)	120.0
C(11A)-C(12A)-C(7A)	120.2(5)
C(11A)-C(12A)-H(12A)	119.9
C(7A)-C(12A)-H(12A)	119.9
C(5B)-S(1B)-C(4B)	102.6(2)
C(6B)-O(1B)-Cu(1)	124.4(3)
C(5B)-N(1B)-C(2B)	118.8(3)
C(5B)-N(1B)-Cu(1)	126.6(3)
C(2B)-N(1B)-Cu(1)	114.4(3)
C(6B)-N(2B)-C(5B)	126.4(4)
C(6B)-N(2B)-H(2B)	118(3)
C(5B)-N(2B)-H(2B)	116(3)
N(1B)-C(2B)-C(3B)	112.2(3)
N(1B)-C(2B)-H(2B1)	109.2
C(3B)-C(2B)-H(2B1)	109.2
N(1B)-C(2B)-H(2B2)	109.2
C(3B)-C(2B)-H(2B2)	109.2
H(2B1)-C(2B)-H(2B2)	107.9
C(4B)-C(3B)-C(2B)	111.8(4)
C(4B)-C(3B)-H(3B1)	109.3
C(2B)-C(3B)-H(3B1)	109.3
C(4B)-C(3B)-H(3B2)	109.3
C(2B)-C(3B)-H(3B2)	109.3
H(3B1)-C(3B)-H(3B2)	107.9
C(3B)-C(4B)-S(1B)	113.2(3)
C(3B)-C(4B)-H(4B1)	108.9
S(1B)-C(4B)-H(4B1)	108.9
C(3B)-C(4B)-H(4B2)	108.9
S(1B)-C(4B)-H(4B2)	108.9
H(4B1)-C(4B)-H(4B2)	107.8
N(1B)-C(5B)-N(2B)	122.4(4)
N(1B)-C(5B)-S(1B)	128.3(3)
N(2B)-C(5B)-S(1B)	109.3(3)
O(1B)-C(6B)-N(2B)	122.2(4)
O(1B)-C(6B)-C(7B)	121.2(4)

N(2B)-C(6B)-C(7B)	116.6(4)
C(12B)-C(7B)-C(8B)	119.6(4)
C(12B)-C(7B)-C(6B)	117.3(4)
C(8B)-C(7B)-C(6B)	123.1(4)
C(9B)-C(8B)-C(7B)	120.0(4)
C(9B)-C(8B)-H(8B)	120.0
C(7B)-C(8B)-H(8B)	120.0
C(8B)-C(9B)-C(10B)	120.7(5)
C(8B)-C(9B)-H(9B)	119.6
C(10B)-C(9B)-H(9B)	119.6
C(11B)-C(10B)-C(9B)	119.5(5)
C(11B)-C(10B)-H(10B)	120.3
C(9B)-C(10B)-H(10B)	120.3
C(10B)-C(11B)-C(12B)	120.6(5)
C(10B)-C(11B)-H(11B)	119.7
C(12B)-C(11B)-H(11B)	119.7
C(7B)-C(12B)-C(11B)	119.5(5)
C(7B)-C(12B)-H(12B)	120.2
C(11B)-C(12B)-H(12B)	120.2

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 3. Torsion angles [ $^{\circ}$ ] for **(3)**.

---

C(5A)-N(1A)-C(2A)-C(3A)	37.5(5)
Cu(1)-N(1A)-C(2A)-C(3A)	-136.3(3)
N(1A)-C(2A)-C(3A)-C(4A)	-65.1(5)
C(2A)-C(3A)-C(4A)-S(1A)	55.2(5)
C(5A)-S(1A)-C(4A)-C(3A)	-21.3(4)
C(2A)-N(1A)-C(5A)-N(2A)	176.2(4)
Cu(1)-N(1A)-C(5A)-N(2A)	-11.0(5)
C(2A)-N(1A)-C(5A)-S(1A)	-2.3(6)
Cu(1)-N(1A)-C(5A)-S(1A)	170.5(2)
C(6A)-N(2A)-C(5A)-N(1A)	-16.8(6)
C(6A)-N(2A)-C(5A)-S(1A)	161.9(3)
C(4A)-S(1A)-C(5A)-N(1A)	-5.4(4)
C(4A)-S(1A)-C(5A)-N(2A)	175.9(3)
Cu(1)-O(1A)-C(6A)-N(2A)	15.5(6)
Cu(1)-O(1A)-C(6A)-C(7A)	-165.4(2)
C(5A)-N(2A)-C(6A)-O(1A)	13.7(6)

C(5A)-N(2A)-C(6A)-C(7A)	-165.5(4)
O(1A)-C(6A)-C(7A)-C(12A)	27.0(6)
N(2A)-C(6A)-C(7A)-C(12A)	-153.8(4)
O(1A)-C(6A)-C(7A)-C(8A)	-150.5(4)
N(2A)-C(6A)-C(7A)-C(8A)	28.7(6)
C(12A)-C(7A)-C(8A)-C(9A)	1.8(6)
C(6A)-C(7A)-C(8A)-C(9A)	179.2(4)
C(7A)-C(8A)-C(9A)-C(10A)	-1.9(7)
C(8A)-C(9A)-C(10A)-C(11A)	1.4(8)
C(9A)-C(10A)-C(11A)-C(12A)	-0.9(8)
C(10A)-C(11A)-C(12A)-C(7A)	0.9(7)
C(8A)-C(7A)-C(12A)-C(11A)	-1.3(6)
C(6A)-C(7A)-C(12A)-C(11A)	-178.9(4)
C(5B)-N(1B)-C(2B)-C(3B)	42.5(5)
Cu(1)-N(1B)-C(2B)-C(3B)	-133.1(3)
N(1B)-C(2B)-C(3B)-C(4B)	-69.2(5)
C(2B)-C(3B)-C(4B)-S(1B)	50.6(5)
C(5B)-S(1B)-C(4B)-C(3B)	-12.3(4)
C(2B)-N(1B)-C(5B)-N(2B)	178.1(3)
Cu(1)-N(1B)-C(5B)-N(2B)	-6.9(5)
C(2B)-N(1B)-C(5B)-S(1B)	-0.7(5)
Cu(1)-N(1B)-C(5B)-S(1B)	174.29(19)
C(6B)-N(2B)-C(5B)-N(1B)	-20.9(6)
C(6B)-N(2B)-C(5B)-S(1B)	158.1(3)
C(4B)-S(1B)-C(5B)-N(1B)	-13.8(4)
C(4B)-S(1B)-C(5B)-N(2B)	167.3(3)
Cu(1)-O(1B)-C(6B)-N(2B)	19.7(5)
Cu(1)-O(1B)-C(6B)-C(7B)	-158.2(3)
C(5B)-N(2B)-C(6B)-O(1B)	13.0(6)
C(5B)-N(2B)-C(6B)-C(7B)	-169.0(4)
O(1B)-C(6B)-C(7B)-C(12B)	25.7(5)
N(2B)-C(6B)-C(7B)-C(12B)	-152.4(4)
O(1B)-C(6B)-C(7B)-C(8B)	-156.8(4)
N(2B)-C(6B)-C(7B)-C(8B)	25.2(5)
C(12B)-C(7B)-C(8B)-C(9B)	2.3(6)
C(6B)-C(7B)-C(8B)-C(9B)	-175.1(4)
C(7B)-C(8B)-C(9B)-C(10B)	0.0(6)
C(8B)-C(9B)-C(10B)-C(11B)	-1.7(7)
C(9B)-C(10B)-C(11B)-C(12B)	1.1(7)
C(8B)-C(7B)-C(12B)-C(11B)	-3.0(6)

C(6B)-C(7B)-C(12B)-C(11B)	174.6(4)
C(10B)-C(11B)-C(12B)-C(7B)	1.3(7)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Hydrogen bonds for (3) [ $\text{\AA}$  and  $^\circ$ ].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
C(2A)-H(2A1)...Cl(2)#1	0.97	2.87	3.663(5)	140.0
C(2A)-H(2A2)...S(1B)#2	0.97	3.03	3.943(4)	158.2
N(2A)-H(2A)...Cl(1)#3	0.75(4)	2.70(4)	3.434(4)	167(4)
N(2B)-H(2B)...Cl(1)#2	0.84(5)	2.54(5)	3.356(4)	165(4)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+2,-y,-z+1 #2 -x+1,-y+1,-z #3 -x+1,-y+1,-z+1

### Приложение 3.

#### PCA

Данные PCA для комплекса (2) -  $\text{CuL}_2$

CCDC № 2027415

Table 1. Crystal data and structure refinement for ... (2)...

Identification code	.....	
Empirical formula	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> Cu N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	
Formula weight	502.09	
Temperature	295(2) K	
Wavelength	1.54186 $\text{\AA}$	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21/n	
Unit cell dimensions	a = 6.8403(4) $\text{\AA}$ b = 13.5674(6) $\text{\AA}$ c = 11.5670(6) $\text{\AA}$	$\alpha = 90^\circ$ . $\beta = 97.162(4)^\circ$ . $\gamma = 90^\circ$ .
Volume	1065.10(10) $\text{\AA}^3$	
Z	2	
Density (calculated)	1.566 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	3.512 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	518	
Crystal size	.21 x .16 x .12 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	5.048 to 70.374 $^\circ$ .	
Index ranges	-8 $\leq$ h $\leq$ 4, -16 $\leq$ k $\leq$ 16, -11 $\leq$ l $\leq$ 14	
Reflections collected	7812	

Independent reflections	1963 [R(int) = 0.0410]
Completeness to theta = 67.686°	97.0 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data / restraints / parameters	1963 / 0 / 143
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.977
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0322, wR2 = 0.0840
R indices (all data)	R1 = 0.0428, wR2 = 0.0873
Extinction coefficient	0.0050(5)
Largest diff. peak and hole	0.333 and -0.400 e. Å <sup>-3</sup>

Table 2. Bond lengths [Å] and angles [°] for (2).....

---

Cu(1)-O(1)#1	1.9081(15)
Cu(1)-O(1)	1.9081(15)
Cu(1)-N(1)	1.9847(18)
Cu(1)-N(1)#1	1.9848(18)
S(1)-C(5)	1.765(2)
S(1)-C(4)	1.799(2)
O(1)-C(6)	1.277(2)
N(1)-C(5)	1.303(3)
N(1)-C(2)	1.483(3)
N(2)-C(6)	1.308(3)
N(2)-C(5)	1.361(3)
C(2)-C(3)	1.491(3)
C(2)-H(2A)	0.9700
C(2)-H(2B)	0.9700
C(3)-C(4)	1.515(3)
C(3)-H(3A)	0.9700
C(3)-H(3B)	0.9700
C(4)-H(4A)	0.9700
C(4)-H(4B)	0.9700
C(6)-C(7)	1.491(3)
C(7)-C(12)	1.391(3)
C(7)-C(8)	1.392(3)
C(8)-C(9)	1.374(3)
C(8)-H(8)	0.9300
C(9)-C(10)	1.373(4)
C(9)-H(9)	0.9300
C(10)-C(11)	1.374(4)
C(10)-H(10)	0.9300
C(11)-C(12)	1.382(3)

C(11)-H(11)	0.9300
C(12)-H(12)	0.9300
O(1)#1-Cu(1)-O(1)	180.0
O(1)#1-Cu(1)-N(1)	90.20(7)
O(1)-Cu(1)-N(1)	89.80(7)
O(1)#1-Cu(1)-N(1)#1	89.80(7)
O(1)-Cu(1)-N(1)#1	90.20(7)
N(1)-Cu(1)-N(1)#1	180.0
C(5)-S(1)-C(4)	104.08(11)
C(6)-O(1)-Cu(1)	126.81(14)
C(5)-N(1)-C(2)	120.01(19)
C(5)-N(1)-Cu(1)	121.74(16)
C(2)-N(1)-Cu(1)	117.50(13)
C(6)-N(2)-C(5)	122.37(18)
N(1)-C(2)-C(3)	116.1(2)
N(1)-C(2)-H(2A)	108.3
C(3)-C(2)-H(2A)	108.3
N(1)-C(2)-H(2B)	108.3
C(3)-C(2)-H(2B)	108.3
H(2A)-C(2)-H(2B)	107.4
C(2)-C(3)-C(4)	111.6(2)
C(2)-C(3)-H(3A)	109.3
C(4)-C(3)-H(3A)	109.3
C(2)-C(3)-H(3B)	109.3
C(4)-C(3)-H(3B)	109.3
H(3A)-C(3)-H(3B)	108.0
C(3)-C(4)-S(1)	110.18(17)
C(3)-C(4)-H(4A)	109.6
S(1)-C(4)-H(4A)	109.6
C(3)-C(4)-H(4B)	109.6
S(1)-C(4)-H(4B)	109.6
H(4A)-C(4)-H(4B)	108.1
N(1)-C(5)-N(2)	128.0(2)
N(1)-C(5)-S(1)	126.67(17)
N(2)-C(5)-S(1)	105.32(14)
O(1)-C(6)-N(2)	127.8(2)
O(1)-C(6)-C(7)	115.69(19)
N(2)-C(6)-C(7)	116.56(18)
C(12)-C(7)-C(8)	118.3(2)

C(12)-C(7)-C(6)	120.81(19)
C(8)-C(7)-C(6)	120.9(2)
C(9)-C(8)-C(7)	120.6(2)
C(9)-C(8)-H(8)	119.7
C(7)-C(8)-H(8)	119.7
C(10)-C(9)-C(8)	120.7(2)
C(10)-C(9)-H(9)	119.6
C(8)-C(9)-H(9)	119.6
C(9)-C(10)-C(11)	119.5(2)
C(9)-C(10)-H(10)	120.3
C(11)-C(10)-H(10)	120.3
C(10)-C(11)-C(12)	120.5(2)
C(10)-C(11)-H(11)	119.8
C(12)-C(11)-H(11)	119.8
C(11)-C(12)-C(7)	120.4(2)
C(11)-C(12)-H(12)	119.8
C(7)-C(12)-H(12)	119.8

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+2,-y+1,-z+1

Table 3. Torsion angles [°] for (2).

---

C(5)-N(1)-C(2)-C(3)	28.9(3)
Cu(1)-N(1)-C(2)-C(3)	-160.75(19)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-63.5(3)
C(2)-C(3)-C(4)-S(1)	59.9(3)
C(5)-S(1)-C(4)-C(3)	-27.8(2)
C(2)-N(1)-C(5)-N(2)	-174.7(2)
Cu(1)-N(1)-C(5)-N(2)	15.4(3)
C(2)-N(1)-C(5)-S(1)	3.4(3)
Cu(1)-N(1)-C(5)-S(1)	-166.52(12)
C(6)-N(2)-C(5)-N(1)	-0.2(4)
C(6)-N(2)-C(5)-S(1)	-178.66(18)
C(4)-S(1)-C(5)-N(1)	-2.8(2)
C(4)-S(1)-C(5)-N(2)	175.60(16)
Cu(1)-O(1)-C(6)-N(2)	-8.2(3)
Cu(1)-O(1)-C(6)-C(7)	172.17(14)
C(5)-N(2)-C(6)-O(1)	-4.4(4)
C(5)-N(2)-C(6)-C(7)	175.23(19)

O(1)-C(6)-C(7)-C(12)	0.8(3)
N(2)-C(6)-C(7)-C(12)	-178.9(2)
O(1)-C(6)-C(7)-C(8)	-179.1(2)
N(2)-C(6)-C(7)-C(8)	1.2(3)
C(12)-C(7)-C(8)-C(9)	-0.9(4)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	179.0(2)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	0.9(4)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	0.1(4)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	-1.1(4)
C(10)-C(11)-C(12)-C(7)	1.1(4)
C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	-0.1(4)
C(6)-C(7)-C(12)-C(11)	180.0(2)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

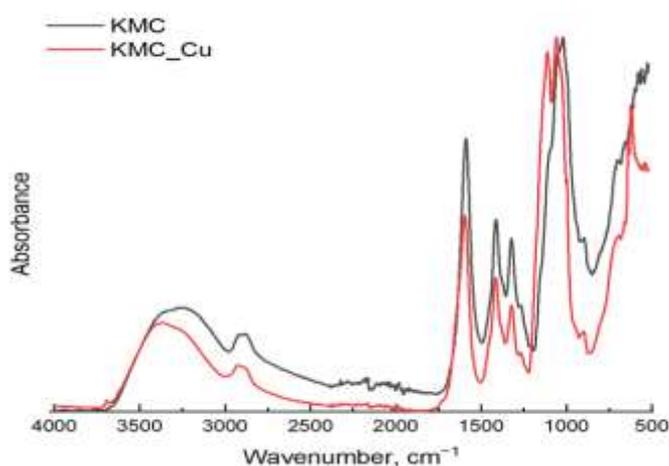
#1 -x+2,-y+1,-z+1

#### Приложение 4.

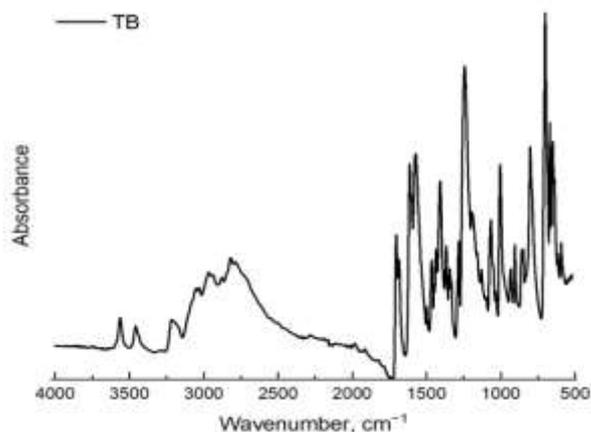
#### ИК-спектры

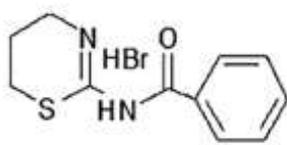
Исследование проводили при поддержке ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», национального проекта «Наука» и Программы развития МГУ. Инфракрасные спектры получили с помощью Фурье-спектрометра («Perkin Elmer», Spectrum Three FTIR spectrometer, Waltham, США) в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Диапазон волн составил 520-4000  $\text{cm}^{-1}$ , использовали универсальной для НПВО систему (алмаз/кристалл KRS-5).

1. ИК-НПВО спектр КМЦ (красная линия) и спектр **II** (черная линия) в диапазоне от 4000 до 520  $\text{cm}^{-1}$ . Число сканирований спектра и фона — 64, разрешение 2  $\text{cm}^{-1}$

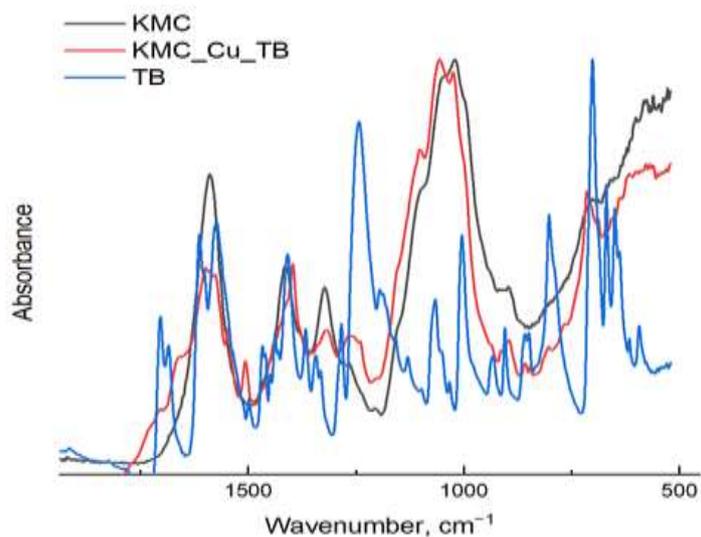


2. ИК-НПВО спектр **L<sup>1</sup>** (ТВ) в диапазоне от 4000 до 520  $\text{cm}^{-1}$ . Число сканирований спектра и фона — 64, разрешение 2  $\text{cm}^{-1}$

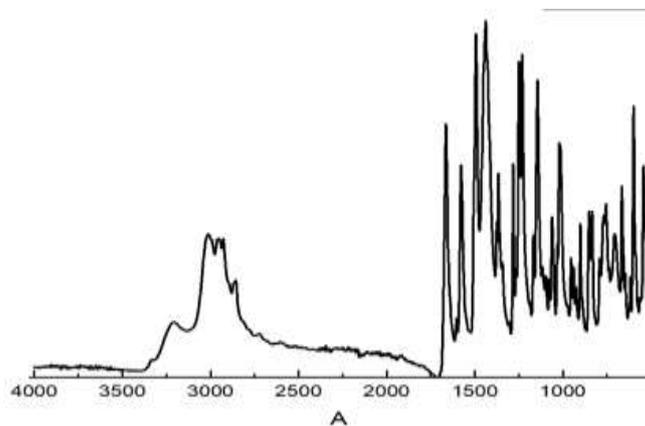


	Длина волны, см-1	
	3564	Водородные связи
	3460	амидная группа?
	3209	N-H или O-H
	3055	C-H (Аромат)
	2965	CH <sub>2</sub> в цикле
	2815	CH <sub>2</sub> в цикле
	1704	C=O
	1614	C=C (Аромат), но там еще вода! <a href="https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7732185&amp;Type=IR-SPEC&amp;Index=1">https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7732185&amp;Type=IR-SPEC&amp;Index=1</a>
	1573	C=C (Аромат)
	1467	CH <sub>2</sub> в цикле (деформационное) // CH
	1410	CH <sub>2</sub> в цикле
	1367	CH <sub>2</sub>
	1244	C-N (алифатические амины или амидные группы)
	1067	деформ. плоскостные колебания CH <sub>2</sub> в аром кольце
	1004	C-H деформ в аромат кольце // C-S
702	C-S	
593	C-S	

3. ИК-НПВО спектр КМЦ (черная линия), VIII (красная линия) и L<sup>1</sup> (синяя линия) в диапазоне от 4000 до 520 см<sup>-1</sup>. Число сканирований спектра и фона — 64, разрешение 2 см<sup>-1</sup>



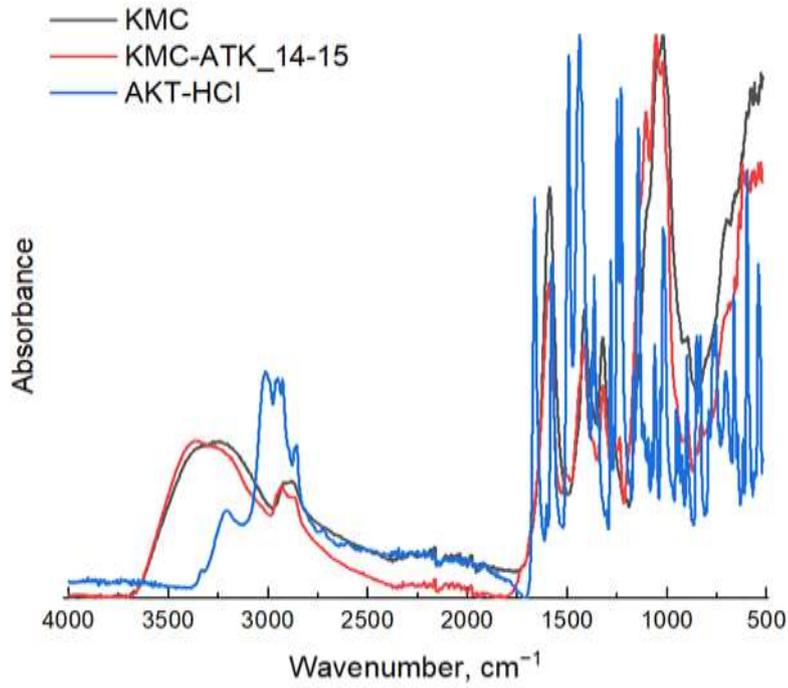
4. ИК-НПВО спектр  $L^2$  (сухое вещество) в диапазоне от 4000 до 520  $\text{cm}^{-1}$ . Число сканирований спектра и фона — 64, разрешение 2  $\text{cm}^{-1}$



	Длина волны, см-1	
	3215	иминная группа
	3016	C-H
	2950	пиперидиновое кольцо
	2450-1800	иминная группа
	2858	пиперидиновое кольцо
	1493	пиперидиновое кольцо?
	1438	S в тиомочевине?
	1366	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> и или Ar-N
	1250	Ar-N
	1231	S в тиомочевине
	1168	1,4-замещенное кольцо
	1143	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	1063	1,4-замещенное кольцо
	1020	1,4-замещенное кольцо
	852	1,4-замещенное кольцо
834	1,4-замещенное кольцо	

755	CH <sub>2</sub> в пиперидине?
708	CH <sub>2</sub> в пиперидине?
665	пиперидиновое кольцо
599	пиперидиновое кольцо

5. ИК-НПВО спектр КМЦ (черная линия), X (красная линия) и L<sup>2</sup> (синяя линия) в диапазоне от 4000 до 520 см<sup>-1</sup>. Число сканирований спектра и фона — 64, разрешение 2 см<sup>-1</sup>



## 9. Публикации автора

1. Золотова А.С., Особенности сорбции меди и эффекторов NO-синтазы на гидроксипатите и влияние бычьего сывороточного альбумина на процесс сорбции / Золотова А.С., Трофимова Т.П., Северин А.В., Орлова М.А. // Известия Академии наук. Серия химическая, 2025, Т. 74, № 1, С. 256-260. EDN: VEALGS (Импакт-фактор 1,035 (РИНЦ), 2.6 п.л./60%)

Zolotova A.S., Sorption of copper and NO synthase effectors on hydroxyapatite and effect of bivariate serum albumin on the sorption process / Zolotova A.S., Trofimova T.P., Severin A.V., Orlova M.A. // *Russian Chemical Bulletin*, 2025, V. 74, № 1, P. 256-260. EDN: UJUAAU (Импакт-фактор 0,31 (SJR), **Q3**, 2.6 п.л./60%)

2. Золотова А.С., Микрогели на основе карбоксиметилцеллюлозы как мультифункциональные носители для иммобилизации ингибитора и активатора индуцибельной NO-синтазы / Золотова А.С., Орлова М.А., Спиридонов В.В., Трофимова Т.П., Лупатов А.Ю., Ярославов А.А., Калмыков С.Н. // Известия Академии наук. Серия химическая, 2025, Т. 74, № 1, С. 252-255. EDN: CURWSW (Импакт-фактор 1,035 (РИНЦ), 1.95 п.л./70%)

Zolotova A.S., Microgels based on carboxymethylcellulose as multifunctional carriers for immobilization of inhibitor and activator of inducible NO synthase / Zolotova A.S., Orlova M.A., Spiridonov V.V., Trofimova T.P., Lupatov A.Yu, Yaroslavov A.A., Kalmykov S.N. // *Russian Chemical Bulletin*, 2025, V. 74, № 1, P. 252-255. EDN: ICVTTV (Импакт-фактор 0,31 (SJR), **Q3**, 1.95 п.л./70%)

3. Орлова М.А., Радиационная стабильность микрогелей карбоксиметилцеллюлозы, связанной ионами меди / Орлова М.А., Трофимова Т.П., Золотова А.С., Ларенков А.А., Орлов А.П., Бородков А.С., Спиридонов В.В. // Известия Академии наук. Серия химическая, 2022, № 11, С. 2515-2518. EDN: JTLEYZ (Импакт-фактор 1,035 (РИНЦ), 1.95 п.л./50%)

Orlova M.A., Radiation stability of carboxymethylcellulose microgels cross-linked by copper ions / Orlova M.A., Trofimova T.P., Zolotova A.S., Larenkov A.A., Orlov A.P., Borodkov A.S., Spiridonov V.V. // *Russian Chemical Bulletin*, 2022, V. 71, № 11, P. 2515-2518. EDN: VHKTZN (Импакт-фактор 0,31 (SJR), **Q3**, 1.95 п.л./50%)

4. Orlova M.A., *In vivo* behavior of carboxymethylcellulose based microgels containing <sup>67</sup>Cu / Orlova M.A., Spiridonov V.V., Badun G.A., Trofimova T.P., Orlov A.P., Zolotova A.S., Priselkova A.B., Aleshin G.Yu., Chernysheva M.G., Yaroslavov A.A., Kalmykov S.N. // *Mendeleev Communications*, 2022, V. 32, № 5, P. 658-660. EDN: OXKFYB (Импакт-фактор 1.7 (JIF), **Q3**, 1.3 п.л./40%)

5. Orlova M.A., Complexes of carboxymethylcellulose with  $\text{Cu}^{2+}$ -ions as a prototype of antitumor agent / Orlova M.A., Spiridonov V.V., Orlov A.P., Zolotova N.S., Lupatov A.Yu., Trofimova T.P., Kalmykov S.N., Yaroslavov A.A. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022, V. 632, article number 127814. EDN: PDKSHT (Импакт-фактор 5.4(JIF), **Q2**, 2.6 п.л./60%)

6. Орлова М.А., Комплексы меди: цитотоксичность и возможности транспорта / Орлова М.А., Трофимова Т.П., Золотова Н.С., Иванов И.А., Спиридонов В.В., Прошин А.Н., Бородков А.С., Ярославов А.А., Орлов А.П. // *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2019, № 10, С. 1933-1939. EDN: ZTAUPB (Импакт-фактор 1,035 (РИНЦ), 3 п.л/50%)

Orlova M.A., Copper complexes: cytotoxicity and transport possibilities / Orlova M.A., Trofimova T.P., Zolotova N.S., Ivanov I.A., Spiridonov V.V., Proshin A.N., Borodkov A.S., Yaroslavov A.A., Orlov A.P. // *Russian Chemical Bulletin*, 2019, V. 68, № 10, P. 1933-1939. EDN: WUXBVE (Импакт-фактор 0,31 (SJR), **Q3**, 3 п.л./50%)

7. Орлова М.А., Специфические свойства гидроксиапатита как потенциального транспортера ионов меди и её комплексов / Орлова М.А., Николаев А.Л., Трофимова Т.П., Северин А.В., Гопин А.В., Золотова Н.С., Долгова В.К., Орлов А.П. // *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2019, № 5, С. 1102-1108. EDN: JUGYUC (Импакт-фактор 1,035 (РИНЦ), 3.9 п.л/50%)

Orlova M.A., Specific properties of hydroxyapatite as a potential transporter of copper ions and its complexes / Orlova M.A., Nikolaev A.L., Trofimova T.P., Severin A.V., Gopin A.V., Zolotova N.S., Dolgova V.K., Orlov A.P. // *Russian Chemical Bulletin*, 2019, V. 68, № 5, P. 1102-1108. EDN: BVHUFW (Импакт-фактор 0,31 (SJR), **Q3**, 3.9 п.л/50%)

## 10. Благодарности

**Автор приносит огромную благодарность** всему коллективу кафедры радиохимии и её заведующему д. х. н., профессору, академику, вице-президенту РАН, Калмыкову Степану Николаевичу, а также научному руководителю в. н. с., д. х. н. Орловой Марине Алексеевне. Автор сердечно благодарит **сотрудников Химического факультета МГУ**, оказавших помощь и консультации при выполнении экспериментов:

с. н. с., к. х. н. Трофимову Т. П.

доц., к. х. н. Северина А. В.

доц., к. х. н. Спиридонова В. В.

к. х. н., с. н. с. Голина А. В.

доц., к. х. н. Бадуна Г. А.

проф., д. х. н. Чернышову М. Г.

чл.-корр. РАН, д. х. н. Ярославова А. А.

в. н. с., к. х. н. Тафеенко В. А.

н. с., к. х. н. Ларенкова А. А. (зав. отделом федерального медицинского биофизического центра имени А. И. Бурназяна)

в. н. с., к. х. н. Николаева А. Л.

инж. Кирюхина О. В.

доц, к. х. н. Колесник И. В.

к. х. н. Биневского П. В.

к. х. н. Алешина Г. Ю.

аспиранту Иванова И. А.

студента Чикунова Ф. С.

И приносит свою искреннюю благодарность **сотрудникам дружественных организаций:**

в. н. с., д. б. н. Лупатову А. Ю. (НИИ Биомедхимии им. В. Н. Ореховича)

зав. отделом, д. б. н. Осиповой Е. Ю. (МНИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева)

Бельшеву С. С. и Приселковой А. Б. (НИИЯФ МГУ им. Д. В. Скобельцына)

зав. лаб., д. х. н. Прошину А. Н. (ИФАВ РАН (г. Черноголовка))

к. х. н. Бородкову А. А. (ГЕОХИ РАН им. В. И. Вернадского)

проф., д. б. н. Кузнецову Д. А. (РНИМУ им. Н. И. Пирогова )

за предоставленную возможность выполнения ряда экспериментов, консультации и помощь.