

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЛЬВІВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»

ЯКОВІВ МАРІЯ ВАСИЛІВНА



УДК 541.64; 544.773.432; 66.095.26-922.3

**АМФІФІЛЬНІ ФЛУОРЕСЦЕЇНВІСНІ КОПОЛІЕСТЕРИ
N-ПОХІДНИХ ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ ОДЕРЖАНІ
ЗА РЕАКЦІЄЮ СТЕГЛІХА**

02.00.06 - хімія високомолекулярних сполук

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Львів-2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі органічної хімії Національного університету "Львівська політехніка" Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник – доктор хімічних наук, старший науковий співробітник
Варваренко Сергій Миколайович,
Національний університет "Львівська політехніка",
старший науковий співробітник кафедри органічної хімії

Офіційні опоненти – доктор хімічних наук, професор
Рябов Сергій Володимирович,
Інститут хімії високомолекулярних сполук
НАН України, м. Київ,
завідувач відділу модифікації полімерів

доктор хімічних наук, професор
Аксіментьєва Олена Ігорівна,
Львівський національний університет імені І.Франка
МОН України, м. Львів,
головний науковий співробітник кафедри фізичної та
колоїдної хімії.

Захист дисертації відбудеться «27» червня 2019 року о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.052.01 у Національному університеті "Львівська політехніка" за адресою: 79013, м. Львів, пл. Св. Юра 3/4, корпус 8, аудиторія 240).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету "Львівська політехніка" (79013, Львів-13, вул. Професорська, 1)

Автореферат розісланий 27 травня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 35.052.01



Будішевська О.Г.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність досліджень. Останнім часом спостерігається інтенсивний розвиток технологій, які пов'язані з наноб'єктами різної природи, насамперед, у галузі фармації і медицини. В цих галузях на особливу увагу заслуговують дисперсні системи наночастинок на основі амфифільних полімерів завдяки притаманним їм унікальним фізико-хімічним властивостям. Полімерні наночастинок, як носії, продемонстрували значне покращення терапевтичної ефективності лікарських препаратів і широко досліджуються як компоненти систем транспорту та вивільнення ліків. На відміну від інших типів наночастинок, в залежності від природи і властивостей, полімерні носії можуть конструюватися із здатністю орієнтуватись на певні органи, тканини чи клітини і, в кінцевому рахунку, біологічно розкладатися з мінімальною системною токсичністю. Цікавим також є розроблення наномедичних форм, у яких поєднуються можливості терапії та діагностики захворювань. Таке завдання щораз частіше ставлять за мету у дослідженнях, які проводяться на стику таких наукових галузей як хімія, фармацевтика і медицина. Основною перевагою таких полімерних наночастинок є те, що вони не обмежені тільки доставкою і вивільненням терапевтичних сполук, а здатні також забезпечувати надання інформації про їх поширення в живих тканинах, що дозволяє контролювати ефективність доставки терапевтичних засобів.

Значна кількість літературних даних вказує на те, що задовільняти вимоги, які ставлять до наносіїв, можуть полімери, отримані методом поліконденсації, такі, наприклад, як амфифільні кополіестери (т.зв. псевдополіамінокислоти) на основі N-похідних двоосновних природних амінокислот. Цей клас полімерів завдяки біодеградабельності, нетоксичності, біосумісності, є одним з найбільш перспективних для біомедичного використання. Введення в структуру таких полімерів хромофорних груп (флуоресцентних) із збереженням заданого балансу їх колоїдно-хімічних властивостей є актуальним завданням оскільки відкриває широкі можливості для створення нових багатофункційних полімерних наносистем доставки ліків та дослідження їх ефективності.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Тема дисертації відповідає науковому напряму кафедри хімічної технології переробки пластмас: теоретичні і прикладні аспекти одержання, модифікування, суміщення і переробки функціоналізованих (ко)полімерів, полімерних (нано)композитів, гідрогелів; розроблення технологій одержання виробів (литевих, конструкційних, ізоляційних, оптичних, плівкових, мембран, імплантантів, лікарських форм, клейових, адгезивів, синтетичних волокон, тканин і технологічних рідин) зі спеціальними властивостями. Дисертація виконана в межах науково-дослідних робіт: «Конструювання тераностиків на основі макромолекул псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення терапевтичних препаратів» (2013-2014) держ. реєстр. № 0113U003183; «Конструювання нано- і мікрочастинок ад'ювантів на основі блок-кополімерів природних амінокислот та поліетердіолів для створення вакцин» (2015-2017) № держреєстрації 0115U000442; "Функціональна мімікрія людської шкіри прищепленими до полімерної поверхні гібридними гід-

рогелями біополімерів для лікування її ушкоджень великої площі" (2018-2019) № держреєстрації 0118U000262. Автор дисертаційної роботи є одним з виконавців цих тем. Частина експериментального дослідження була проведена здобувачем під час стажування у Інституті Молекул і Матеріалів в м. Ле Ман (грант від Посольства Франції в Україні «Короткострокові стажування у Франції для молодих українських науковців»), а також під час стажування у Гданському технологічному університеті у рамках програми ERASMUS+ та міжуніверситетської угоди між Національним університетом «Львівська політехніка» та Гданським технологічним університетом (Польща).

Мета і завдання дослідження. Метою є встановлення закономірностей та розроблення синтезу нових амфіфільних кополієстерів N-похідних глутамінової кислоти з полієтердіолами і флуоресцеїном незворотною поліконденсацією за реакцією Стегліха, вивчення їх властивостей та дослідження водних дисперсій створених на їх основі.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

- обґрунтувати вибір флуоресцентного комономеру та дослідити особливості синтезу полієстерів флуоресцеїну при його нерівноважній поліконденсації з 2-(додеканоїламіно)пентадіоною кислотою за реакцією Стегліха;
- синтезувати за реакцією Стегліха нові амфіфільні кополієстери N-похідних глутамінової кислоти з полієтердіолами різної природи і молекулярної маси та флуоресцеїном, підтвердити їх структуру та встановити особливості реакції Стегліха при синтезі кополієстерів з використанням флуоресцеїну;
- провести комплексні дослідження фізико-хімічних властивостей у рядах кополієстерів, синтезованих на основі різних N-ацилпохідних глутамінової кислоти та полієтердіолів і флуоресцеїну та оцінити їх здатність понижувати поверхневий натяг водних розчинів, утворювати самостабілізовані дисперсії у воді з частинками визначених розмірів, солюбілізувати та вивільняти модельні ліпофільні сполуки;
- встановити взаємозв'язок будови та складу амфіфільних кополієстерів із стабільністю водних дисперсій на їх основі, закономірностями їх перерозподілу в системі вода-октанол та гідролітичного розкладу з вивільненням флуоресцеїну та впливу на ці процеси водорозчинних білків плазми крові;
- провести дослідження цитотоксичності амфіфільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів, оцінити ступінь їх впливу на живі клітини в залежності від складу кополієстерів та їх колоїдно-хімічних характеристик;
- продемонструвати шляхи практичного використання флуоресцеїнвмісних кополієстерів для візуалізації полімеру носія в живих клітинах та тканинах організму.

Об'єкт дослідження: Процес одержання кополієстерів N-похідних глутамінової кислоти з полієтердіолами і флуоресцеїном незворотною поліконденсацією за реакцією Стегліха, склад, структура та властивості нових флуоресцеїнвмісних кополієстерів.

Предмет дослідження: Амфіфільні флуоресцеїнвмісні кополієстери N-похідних глутамінової кислоти одержані незворотною поліконденсацією за

реакцією Стегліха, встановлення взаємозв'язку їх структури з колоїдно-хімічними властивостями, здатністю до формування колоїдних систем та ступенем їх впливу на біологічні об'єкти.

Методи дослідження: ІЧ - спектроскопія з Фур'є перетворенням, ^1H - та ^{13}C -ЯМР-спектроскопія, динамічне світлорозсіювання, фотоколориметрія, визначення поверхневого натягу (методом Дю-Нуї), функціональний аналіз, тонкошарова хроматографія, елементний аналіз, гель-проникна хроматографія.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що:

- вперше запропоновано та розроблено метод синтезу поліестерів флуоресцеїну та 2-(додеканоїламіно)пентадіової кислоти методом незворотньої поліконденсації за реакцією Стегліха;
- при використанні флуоресцеїну як комономеру у незворотній кополіконденсації за реакцією Стегліха отримано амфіфільні тер- та тетракополіестери N-ацилпохідних глутамінової кислоти з поліетердіолами;
- встановлено залежності складу та будови ряду синтезованих за реакцією Стегліха амфіфільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів від природи мономерних ланок (величини замісника в N-ацилпохідних глутамінової кислоти та молекулярної маси поліетердіолу), а також частки флуоресцеїну у мономерній суміші;
- показано, що кополіконденсація за реакцією Стегліха дозволяє отримувати флуоресцеїнвмісні кополіестери визначеного складу та будови з керованими параметрами їх поверхневого натягу у воді, розмірами частинок їх водних дисперсій, параметрами розподілу між водною та ліпофільною фазами, здатністю до сольбілізації малорозчинних у воді сполук та їх вивільнення, гідролітичною стійкістю у водних середовищах;
- показано, що будова та склад амфіфільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів визначає стабільність їх водних дисперсій при контакті з водорозчинними білками плазми крові, при цьому характеристики біорозподілу та гідролітичні властивості кополіестерів у комплексі з бичачим сироватковим альбуміном змінюються несуттєво;
- встановлено взаємозв'язок будови амфіфільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів з ступенем їх впливу на живі об'єкти і показано, що флуоресцеїнвмісні кополіестери, отримані з використанням поліетердіолів з молярними масами понад 1000 Да проявляють мінімальний рівень цитотоксичності.

Практичне значення отриманих результатів За результатами встановлених закономірностей та розробленого методу синтезу отримано нові поверхнево-активні кополіестери, які містять фрагменти флуоресцеїну в макроланцюгу. Наведені в роботі результати цілеспрямованих досліджень з формування на основі одержаних флуоресцеїнвмісних кополіестерів водних дисперсій, їх колоїдно-хімічних властивостей, здатності сорбувати альбумін, сольбілізувати та вивільняти малорозчинні у воді сполуки, отримання флуоресцентного відгуку дозволяють вважати їх перспективним матеріалом для застосування у медичних та біохімічних дослідженнях.

Дослідження *in vitro* їх взаємодії з живими клітинами показано здатність до взаємодії з клітинними мембранами і проникнення всередину клітини. Це дозволило сформулювати вимоги та рекомендації до використання флуоресцеїнвімісних кополієстерів у дослідженнях функціонування живих клітин, отриманням флуоресцентного відгуку.

Фізіологічні дослідження *in vivo* на тваринах (лабораторних щурах) показали, що одержані полімери є малотоксичними і з успіхом можуть бути використані як полімерні маркери для створення та вивчення ефективності носіїв у системах доставки терапевтичних препаратів.

Перспективність використання нових флуоресцеїнвімісних кополієстерів для потреб біології та медицини підтверджено дослідженнями, проведеними в Інституті біології тварин НААН України, публікаціями, які не ввійшли в перелік фахових та патентами на корисну модель.

Особистий внесок здобувача полягає в аналізі літературних джерел, обґрунтуванні мети та завдань досліджень, виконанні експериментальної роботи щодо одержання незворотньою кополіконденсацією за реакцією Стегліха флуоресцеїнвімісних кополієстерів N-похідних глутамінової кислоти і полієтердіолів, розробленні методів аналізу складу кополієстерів та комплексного дослідження властивостей кополієстерів та дисперсних систем на їх основі. Обговорення та узагальнення одержаних експериментальних результатів, вибір напрямків практичного застосування та формулювання висновків проводилось автором спільно з науковим керівником д.х.н. Варваренком С.М., а також д.х.н. Самариком В.Я., к.х.н. Носовою Н.Г. і д.х.н. Вороновим С.А. Спектральні та молекулярно-масові характеристики кополієстерів досліджувались в Інституті молекул та Матеріалів (м. Ле Ман, Франція). Біохімічні дослідження проводились в Інституті біології тварин НААН та обговорювались з д.с-г.н. Остапівим Д.Д.

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати дисертаційної роботи доповідалися й обговорювалися на: 16th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium) (Jena, Germany, 2014); VIII Ukrainian-Polish Conference "Polymer soft special applications" (Bukovel, Ukraine, 2014); 17th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium) (Munster, Germany, 2015); All-Ukrainian scientific-practical conference "The concept of sustainable development and its implementation" (Ternopil, Ukraine, 2015); XV науковій конференції "Львівські хімічні читання – 2015" (Львів, 2015); II Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми хімії та технології органічних речовин» (APCTOS2)» (Львів, 2015); Conference for young scientist 2015 (Kyiv, 2015); 18th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium) (Kiel, Germany, 2016); International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO – 2016) (Lviv, 2016); XXIV Українська конференція з органічної хімії (Полтава, 2016); Міжнародній науково-технічній конференції «Сучасні технології одержання та переробки полімерних матеріалів» (Львів, 2016); International youth science forum «LITTERIS ET ARTIBUS» (Lviv, 2016); II Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні проблеми хімії та хімічної технології» (Київ, 2016); III Міжнародній науково-практичній конференції «Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво» (Шостка, 2016); 19th JCF-Frühjahrssymposium (spring

symposium) (Mainz, Germany, 2017); IX International conference in chemistry Kyiv-Toulouse (ICKT-9) (Kyiv, 2017); IV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених і студентів «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості» (Херсон, 2017); I Міжнародній (XI Українська) науковій конференції студентів, аспірантів і молодих учених “Хімічні проблеми сьогодення 2018”, (Вінниця, 2018); 20th JCF-Frühjahrssymposium Jung Chemiker Forum (Konstanz, Germany, 2018); XIX Міжнародній конференції студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії" (Київ, 2018); II Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» (Житомир, 2018); II Всеукраїнській науково-практичній конференції "Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості"(Херсон, 2018); International conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018) (Kyiv, 2018); EastWest Chemistry Conference (Lviv, 2018).

Публікації. Основні положення дисертації відображені у 42 друкованих працях, з них 6 статей у наукових фахових виданнях України, 4 статті у виданнях, які включено до міжнародних наукометричних баз, 1 стаття у науковому періодичному виданні іншої держави, включеному до міжнародних наукометричних баз, 3 статті у інших наукових періодичних виданнях України, 2 патенти України на корисну модель, 26 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел літератури (186 найменувань). Загальний обсяг дисертації становить 209 сторінок, містить 25 таблиць та 85 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету і завдання досліджень, показано наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, розглянуто зв'язок роботи з науковими темами та особистий внесок здобувача, подано відомості про апробацію роботи та публікації.

У першому розділі наведено огляд нанорозмірних систем доставки ліків. Наведений перелік вимог, які висуваються до полімеру біомедичного призначення. Показано, що сучасний розвиток систем транспорту ліків пов'язаний із створенням багатофункційних структур, які окрім функції носія наділяються також властивостями націлювання в зону патології і візуалізації.

Описано методи надання носіям репортерних властивостей і показано, що найбільш привабливим є використання кополімерів, що містять фрагменти, здатні до флуоресценції.

Проаналізовано можливості візуалізації систем доставки та обумовлено природу та властивості фрагмента-репортера і методи введення його в структуру полімерів. На основі проведеного огляду літератури сформульовано мету дослідження.

У другому розділі наведено характеристики речовин, які використовуються у роботі, методику їх очистки, а також методику досліджень та аналізів.

Третій розділ присвячений розробленню методики синтезу амфіфільних кополієстерів, які містили би хромофорні групи, здатні до флуоресценції, і, разом з тим, зберігали баланс властивостей, притаманний наноносіям.

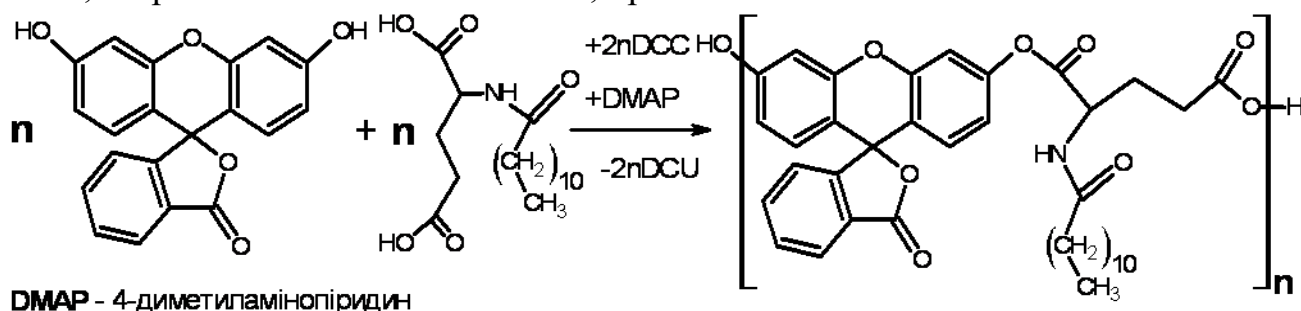


Рис.1. Схема кополіконденсації флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентандіовою кислотою (GluLa) за реакцією Стегліха.

Як хромофорний фрагмент було використано барвник ксантенового ряду – флуоресцеїн, молекула якого у неводних середовищах існує у формі нейтральної молекули з двома гідроксильними групами і закритою карбоксильною групою у формі лактону (рис.1).

Таблиця 1.

Умови синтезу та характеристики полієстерів флуоресцеїну і 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти.

Шифр продукту	Умови синтезу		Розчинник (масове співвідношення)	Вихід DCU, %	Практичний вихід полієстеру, %	Вміст флуоресцеїну в полієстері, %	Середня ММ
	Температура 288 К, загальна концентрація мономерів 0,178 моль/л						
	Співвідношення реагентів, моль						
	GluLa	F					
МД1	1,00	1,05	Бензен	78,6	44,0	33,8	1130
МД1.2			Метиленхлорид	73,0	41,0	30,7	1072
МД2.3			Бензен:ДМФА (1:1)	68,0	71,0	60,3	1505
МД2.2			Бензен:ДМФА (8:3)	76,0	81,0	58,8	1744
МД2.0				91,0	83,1	56,0	2570
МД2.4	1,0	0,91	Бензен:ДМФА (9:1)	90,5	45,0	32,2	1957
МД2.5	1,0	1,15		88,5	84,0	56,3	1791

Відсутність повідомлень про отримання методом поліконденсації кополієстерів флуоресцеїну спонукало до проведення досліджень, спрямованих на

встановлення особливостей перебігу незворотної поліконденсації за реакцією Стегліха флуоресцеїну, як гідроксилвмісного комономеру, та 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти, як карбоксилвмісного комономеру (рис.1). Порівняльні синтези спрямовані на виявлення оптимальних умов проведення реакції дали можливість встановити, що використання суміші розчинників бензен-ДМФА у співвідношенні 9:1 (табл.1) забезпечує розчинність флуоресцеїну і дозволяє досягати високих (понад 80%) практичних виходів кополієстерів та доволі високих (понад 90%) виходів дициклогексилсечовини (DCU), яка є кількісною характеристикою глибини перебігу реакції Стегліха.

На основі вивчення структури та складу кополієстерів (методами ^1H ЯМР спектроскопії, гель-проникної хроматографії, елементним аналізом), отриманих при використанні суміші розчинників бензен-ДМФА у співвідношенні 9:1 було виявлено, що у випадку проведення реакції у допустимому для реалізації реакції поліконденсації надлишку гідроксилвмісного мономеру, отримуються олігоєстери з вищим ступенем поліконденсації, кінцевими ланками яких є фрагменти флуоресцеїну (рис.2 А, зразок МД2.0). В іншому випадку (надлишок карбоксилвмісного мономеру) суттєво знижується вихід і молекулярна маса полімеру. Це пояснюється характерним для реакції Стегліха побічним процесом при її перебігу, який супроводжується перегрупованням активованої ДСС карбоксильної групи у неактивний фрагмент ацилсечовини, який виступає кінцевою ланкою макромолекул і зупиняє процес поліконденсації (рис.2 Б зразок МД2.4).

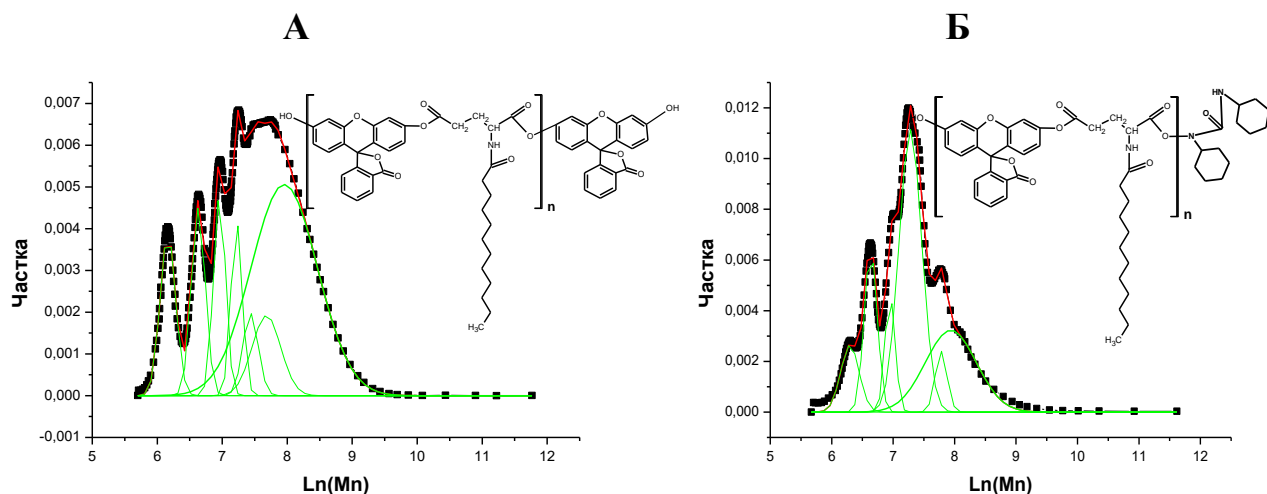


Рис.2. Молекулярно-масовий розподіл кополієстерів: А – отриманий при співвідношенні мономерів 1:1,05 (МД2.0); Б – при співвідношенні 1:0,91 (МД2.4)

Отримані результати підтвердили здатність флуоресцеїну вступати в реакцію незворотної кополіконденсації за Стегліхом і створили передумови для одержання амфіфільних кополієстерів більш складної будови, в яких флуоресцеїн, при використанні його як частки одного з гідроксилвмісних комономерів, може бути включений у структуру макромолекули. Реакцію Стегліха в даному випадку можна відобразити схемою (рис.3).

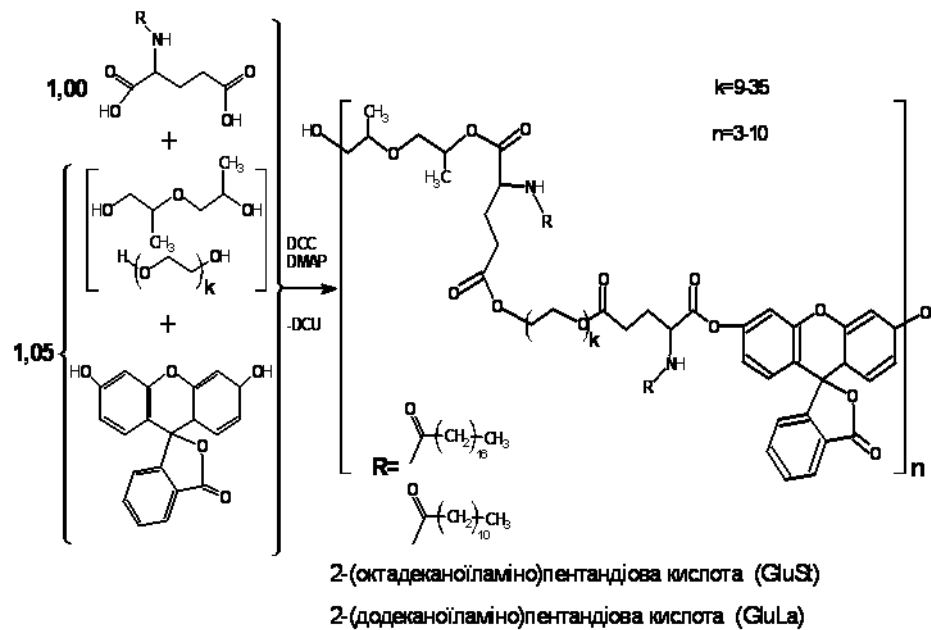
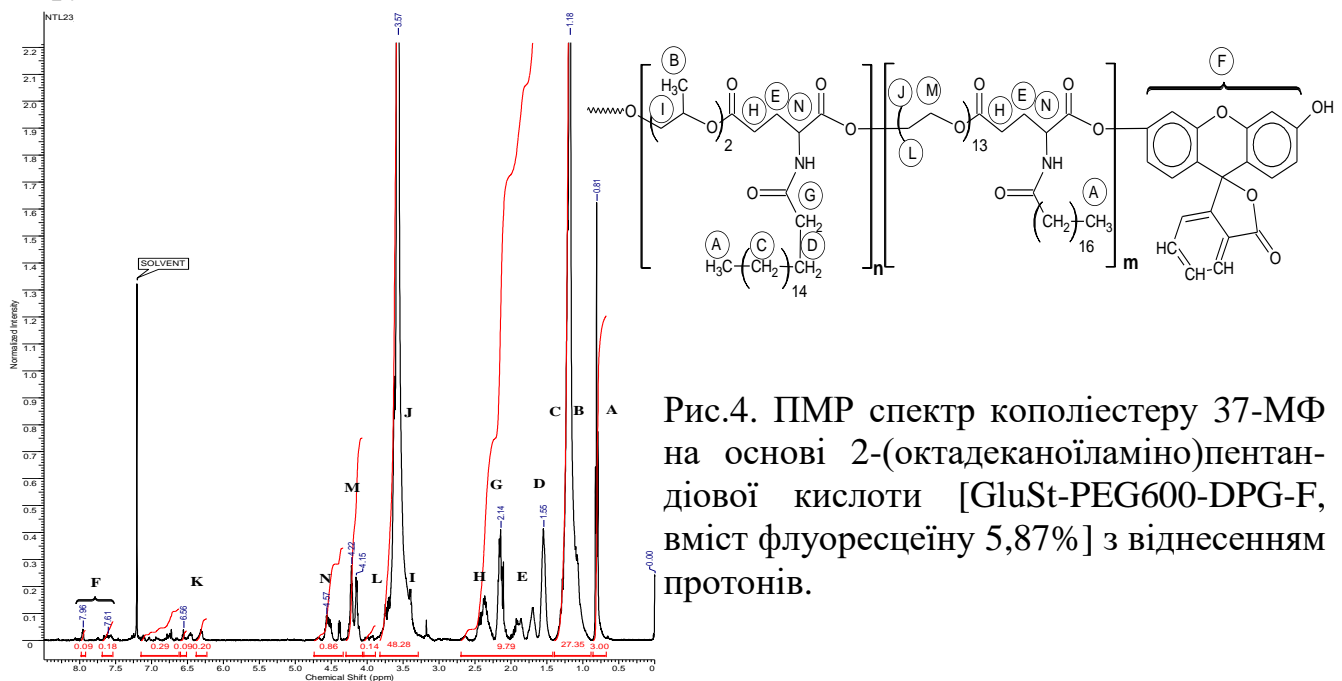


Рис.3. Схема утворення флуоресцеїнвмісного кополіестеру при кополіконденсації N-похідних глутамінової кислоти і поліетердіолів за реакцією Стегліха. Умови: $T=288$ К, загальна концентрація мономерів $0,176$ моль/л, завантаження флуоресцеїну – $0,02 \div 0,25$ мольн. ч.

Амфифільна будова кополіестерів, які можуть бути одержані за наведеною схемою визначається природою використаних комономерів – ліпофільних N-ацилпохідних глутамінової кислоти та гідрофільних поліетердіолів оксиетиленового ряду.

Методами ^1H ЯМР спектроскопії (рис. 4, табл.2) та гель-проникної хроматографії підтверджено структури та досліджено особливості будови отриманих флуоресцеїнвмісних кополіестерів, їх молекулярно-масові розподіли та функціональність.



Встановлено залежності складу та будови синтезованих за реакцією Стегліха амфифільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів від природи мономерних ланок (величини замісника в ліпофільних N-ацилпохідних глутамінової кислоти та молекулярної маси гідрофільного PEG) і частки флуоресцеїну у реакційній суміші.

Однак навіть в оптимальних умовах проведення поліконденсації за реакцією Стегліха для даної системи, у виділених продуктах спостерігаються фрагменти перегрупування активованої карбоксильної групи (рис.5).

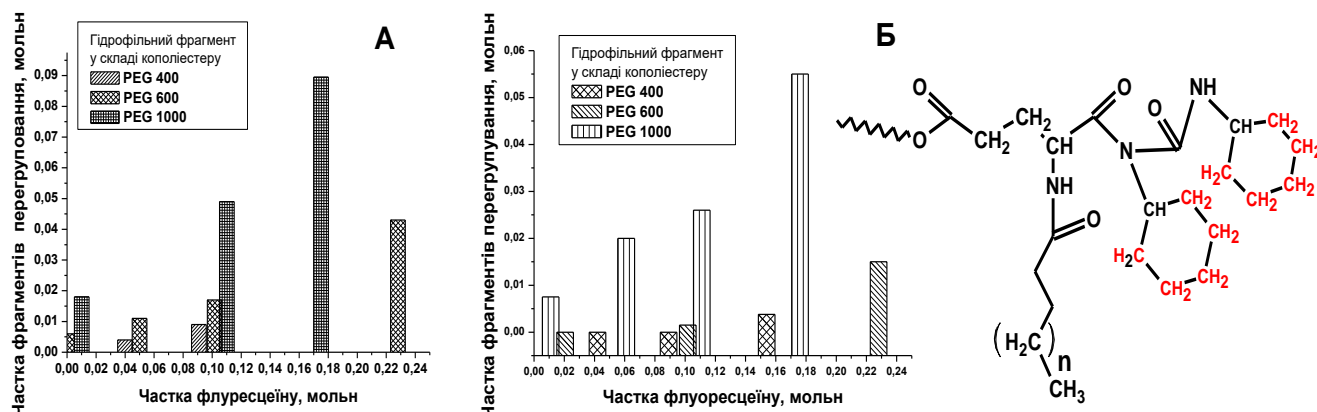


Рис.5 Залежність кількості фрагментів перегрупування карбоксильних груп у кополіестерах на основі GluSt (А) і GluLa (Б) з поліетердіолами різної молекулярної маси від частки флуоресцеїну в реакційній суміші.

Інтенсивність сигналів протонів циклогексильних замісників (фрагмента DCU) у ПМР-спектрах кополіестерів свідчить, що збільшення молекулярної маси гідроксилвмісних (PEG) і карбоксилвмісних (N-ацилпохідних глутамінової кислоти), а також частки флуоресцеїну в реакційній суміші призводить до збільшення частки фрагментів перегрупування у складі макромолекули (рис.5). Тим не менш, варто зазначити, що загальна частка макромолекул, які містять кінцеві фрагменти перегрупування, в загальному не є високою і не впливає на властивості отриманих кополіестерів (табл. 2).

Таблиця 2.

Склад кополіестерів загальної формули $\text{Glu(A)}_{1,0}\text{-(PEG)}_l\text{-(DPG)}_q\text{-(F)}_g$

№	Шифр зразка кополіестеру	Склад кополіестеру	Мольні частки мономерних ланок у кополіестері			Кількість фрагментів перегрупування, мольн. частки
			l	q	g	
1.	31-МФ	GluLa-PEG400-DPG-F	0,564	0,381	0,055	0
2.	32-МФ	GluLa-PEG400-DPG-F	0,512	0,388	0,15	0,0038
3.	27-МФ	GluLa-PEG600-DPG-F	0,527	0,415	0,135	0,0015
4.	28-МФ	GluLa-PEG600-DPG-F	0,465	0,355	0,22	0,015
5.	45-МФ	GluLa-PEG1000-DPG	0,631	0,415	0	0,0075
6.	36-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,62	0,375	0,06	0,02
7.	33-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,6	0,345	0,1	0,026
8.	34-МФ	GluLa-PEG1000-DPG-F	0,524	0,371	0,155	0,055
9.	46-МФ	GluLa-PEG1500-DPG-F	0,573	0,375	0,07	0,0335
10.	43-МФ	GluLa-PEG1000-F	0,782	-	0,18	0,054

11.	44-МФ	GluLa-PEG1000-DEG-F	0,853	-	0,14	0,0245
12.	39-МФ	GluSt-PEG400-DPG-F	0,654	0,287	0,08	0,009
13.	29-МФ	GluSt-PEG600-DPG-F	0,538	0,366	0,11	0,017
14.	30-МФ	GluSt-PEG600-DPG-F	0,488	0,278	0,225	0,043
15.	40-МФ	GluSt-PEG1000-DPG	0,651	0,362	0	0,018
16.	38-МФ	GluSt-PEG1000-DPG-F	0,620	0,298	0,075	0,049
17.	37-МФ	GluSt-PEG1000-DPG-F	0,516	0,324	0,105	0,0895
18.	47-МФ	GluSt-PEG1500-DPG-F	0,604	0,238	0,125	0,067

Проведення кополіконденсації з флуоресцеїном призводить до появи у складі виділеного продукту олігомерних фракцій із значно нижчими молекулярними масами і відповідно до зменшення середньої молекулярної маси кополіестеру (рис.6).

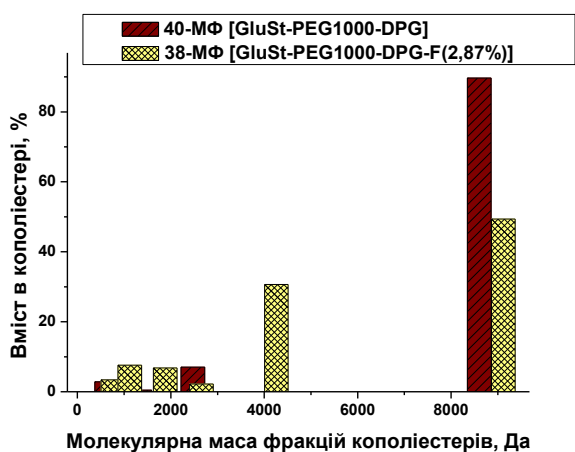


Рис.6 Молекулярно-масовий розподіл кополіестерів з флуоресцеїном 38-МФ [GluSt-PEG1000-DPG-F(2,87%)] і без 40-МФ [GluSt-PEG1000-DPG].

на те, що 30-60% фрагментів флуоресцеїну, який міститься в кополіестері, є кінцевою ланкою макромолекул.

У четвертому розділі наведено результати досліджень колоїдно-хімічних властивостей нових флуоресцеїновмісних кополіестерів. Показано, що в залежності від природи мономерних ланок, їх співвідношення та вмісту флуоресцеїну такі амфіфільні кополіестери знижують поверхневий натяг до 35-37 мН/м і здатні утворювати у водному розчині самостабілізовані дисперсії наночастинок. Ізотерми поверхневого натягу синтезованих кополіестерів є типовими для цього типу кополіестерів і мають два злами, перший з яких можна віднести до ККМ, а другий – характеризує завершення процесів надмолекулярних перебудов у частинках дисперсної фази і утворення агрегатів (ККА).

Вміст флуоресцеїну вносить суттєві зміни у характер ізотерм поверхневого натягу. Найбільш суттєво це спостерігається для ряду кополіестерів, у синтезі яких як гідрофільний комономер використано PEG1000 (рис.7). Збільшення вмісту флуоресцеїну у кополіестерах приводить до зменшення концентрації,

Зменшення середньої молекулярної маси кополіестеру, отриманого при введенні флуоресцеїну в початкову суміш мономерів, у порівнянні з його аналогом без флуоресцеїну можуть означати, що він є найменш реакційно-здатним серед використаних гідроксилвмісних мономерів і, входячи в структуру кополіестеру, утруднює приєднання наступної мономерної одиниці. Як наслідок – флуоресцеїн є, як мінімум, одним з кінцевих фрагментів у макромолекулах кополіестерів. Це підтверджено методами оптичної та ПМР спектроскопії, результати яких добре корелюють між собою і вказують

перевищення якої уже не супроводжується змінами поверхневого натягу (ККА). Це свідчить про завершення процесів перебудови частинок дисперсної фази.

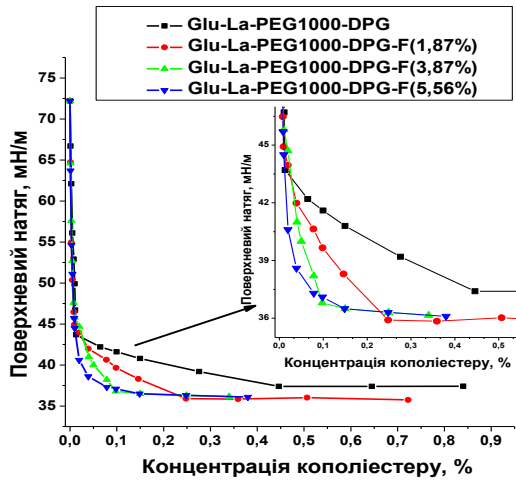


Рис. 7. Ізотерми поверхневого натягу кополієстерів на основі GluLa, DPG і PEG1000 з різним вмістом флуоресцеїну.

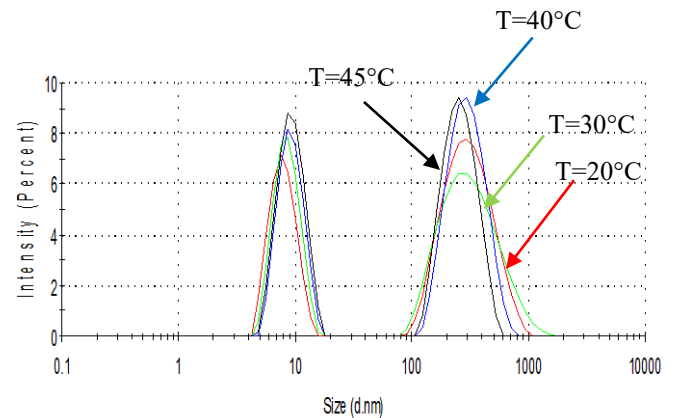


Рис. 8. Гістограми розподілу частинок дисперсної фази кополієстеру 37-МФ [GluSt-DPG-PEG1000-F(5,87%)] при різних температурах.

Встановлено, що частинки дисперсії кополієстерів на основі GluSt характеризуються вищими значеннями їх ζ -потенціалу (-22÷-25 mV) та меншою його залежністю від вмісту флуоресцеїну у порівнянні з кополієстерами на основі GluLa (-15÷-9 mV), що може свідчити про їх вищу стабільність.

Розподіл частинок дисперсної фази у водних дисперсіях нових флуоресцеїнівмісних амфіфільних кополієстерів має бімодальний характер. Гідродинамічний діаметр частинок першої моди знаходиться в межах 7÷20 нм, а другої – коливається від 180 до 400 нм в залежності від природи мономерів та їх співвідношення у кополієстері. При цьому із збільшенням концентрації дисперсії зростає частка частинок більшої фракції, збільшується їх гідродинамічний діаметр та коефіцієнт полідисперсності, що може свідчити про процеси надмолекулярної перебудови і зміни морфології частинок. Дослідження залежності розмірів частинок від температури, показало, що у температурному діапазоні 293÷318 К розподіл частинок дисперсної фази кополієстеру [GluSt-DPG-PEG1000-F(5,87%)] за розмірами зберігається постійним (рис.8).

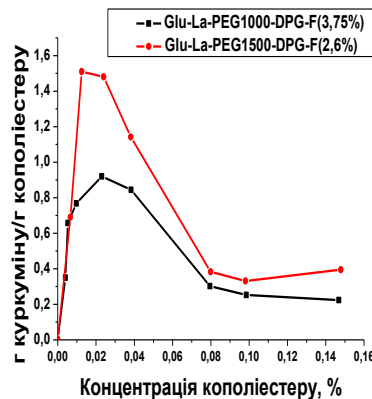
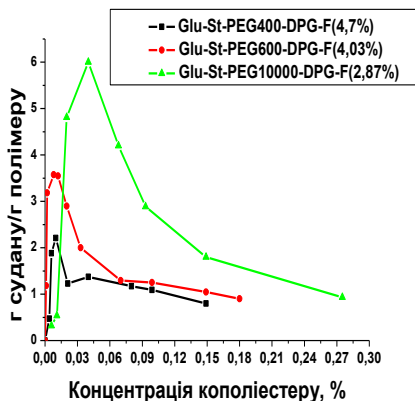


Рис. 9. Залежність кількості солубілізованого судану і куркуміну на одиницю маси флуоресцеїнівмісних кополієстерів від їх концентрації.

Солюбілізацію частинками дисперсної фази флуоресцеїнвмісних кополієстерів малорозчинних у воді сполук вивчали за використання судану (III) та куркуміну. Встановлено, що величина солюбілізаційної ємності визначається, як структурою кополієстеру, так і природою солюбілізату. Максимальною солюбілізацією судану характеризуються кополієстери на основі GluSt (2,3÷6 г/г) і залежить від довжини фрагмента PEG. Зі збільшенням молекулярної маси PEG в області концентрацій, близьких до ККМ солюбілізація судану суттєво зростає (рис. 9). Дослідження процесів вивільнення ліпофільного барвника (Судан III) з водних дисперсій кополієстерів показало, що в залежності від їх складу протягом 12÷25 годин через міжфазну границю вода/н-октанол відбувається перерозподіл в середовище н-октанолу до 80% солюбілізованого судану.

Солюбілізаційна здатність отриманих флуоресцеїнвмісних кополієстерів щодо куркуміну є нижчою ніж щодо судану, проте в цьому випадку максимальні значення солюбілізації (0,9÷1,5 г куркуміну на 1 г кополієстеру) проявляють більш гідрофільні кополієстери GluLa (рис.9).

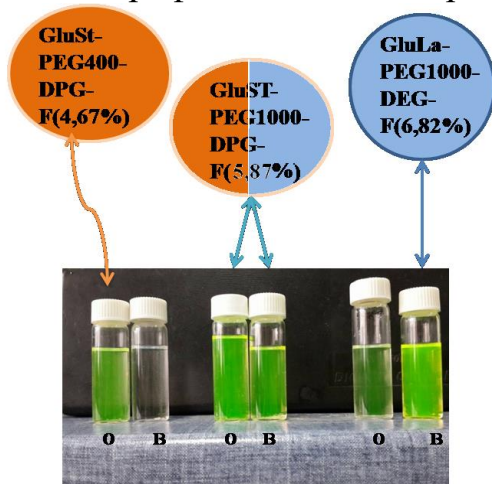


Рис.10. Розподіл флуоресцеїнвмісних кополієстерів між фазами н-октанолу (О) та водою (В) в залежності від їх складу.

ризується значеннями логарифма коефіцієнту розподілу ($\log P_{o/w}$) в межах від -0,5 до 0,5. Для кополієстерів GluSt з PEG невисокої ММ (400÷600) характерний розподіл переважно у фазу н-октанолу, а кополієстери GluLa з PEG 1000÷1500 залишаються переважно у водній фазі, при цьому кополієстер [GluSt-PEG1000-DPG-F(5,87%)] розподіляється рівномірно між фазами н-октанолу та води (рис.10).

Таким чином, реакція Стегліха дозволяє отримувати флуоресцеїнвмісні кополієстери визначеного складу та будови з керованим гідрофільно-ліпофільним балансом і, відповідно, їх розподілом між водною та ліпофільною фазами, що є одним з важливих факторів, які беруться до уваги при створенні та дослідженні систем транспорту ліків.

Введення дисперсій в живий організм передбачає, що полімерні наночастинки вступають в контакт з біологічним середовищем, яке містить значну кількість альбуміну (вміст альбуміну у крові 3,3÷4%). Альбумін здатний

Фрагмент фото-активної сполуки у складі кополієстерів не тільки сприяє їх візуалізації, але і дає можливість розробити зручну методику для кількісного визначення кополієстерів у фазах різної полярності. Значення гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ) кополієстерів, отримані методом розрахунку за відомим складом (табл. 2) з врахуванням групових вкладів за формулою Гріффіна, задовільно співпадають з отриманими за формулою Девіса через експериментальне визначення їхнього коефіцієнту розподілу між водою і ліпофільною фазою н-октанолу ($P_{o/w}$).

Більшість отриманих амфіфільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів характе-

до зв'язування лігандів різної природи, що може мати вплив на біорозподіл та фізико-хімічні властивості частинок носія.

Оцінка сорбції альбуміну частинками дисперсної фази отриманих кополієстерів була проведена через аналіз змін їх ζ -потенціалу та провідності дисперсій. Встановлено, що синтезовані кополієстери здатні утворювати комплекси з альбуміном. Кількість альбуміну сорбованого частинками дисперсій кополієстерів GluLa (0,01 г/г) є на порядок, а інколи і на два порядки нижчою, ніж дисперсіями кополієстерів GluSt (0,2-2 г/г). Ця різниця проявляється у змінах розподілу частинок за розмірами водних дисперсій у присутності бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Зменшення гідродинамічного діаметру наночастинок дисперсної фази кополієстерів на основі GluSt, яке відбувається в присутності альбуміну можна пов'язувати з покращенням стабільності окремих агрегатів з яких складаються частинки другої моди за рахунок додаткової стабілізації (рис.11).

При цьому кополієстери у комплексі з сорбованим БСА хоча і мають загальну тенденцію до збільшення частки утримування у водній фазі проте зберігають здатність до перерозподілу у ліпофільну фазу н-октанолу. Значення їх ГЛБ у присутності БСА суттєвої зміни не зазнає (збільшується в межах 10 %). Цей факт може свідчити про збереження стабільними властивостей наноносіїв при їх введенні у організм.

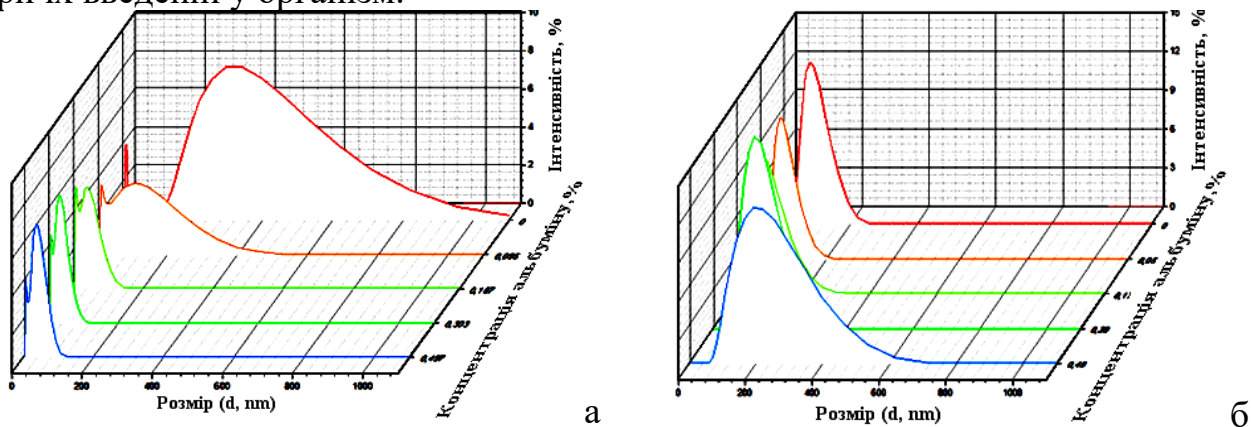


Рис.11. Зміни розподілу за розміром дисперсій кополієстерів в залежності від концентрації БСА 37-МФ [GluSt-PEG1000-DPG-F(5,87%)] (а) і 34-МФ [GluLa-PEG1000-DPG-F(5,56%)] (б)

До особливостей отриманих кополієстерів слід віднести те, що для естерних зв'язів, які пов'язують фрагменти флуоресцеїну у макромолекулах характерною є схильність як до гідролітичного, так і ензимного гідролізу.

Спонтанний гідроліз кополієстерів та комплексів кополієстер-альбумін з вивільненням флуоресцеїну досліджували, визначаючи зміну оптичної густини розчинів у буферному середовищі з рН=7,45, яке є характерним для крові. Присутність БСА збільшує швидкість гідролізу флуоресцеїнівмісних кополієстерів на основі GluLa в 1,5÷4 рази, в той час як для кополієстерів на основі GluSt цей параметр збільшується в 2÷6,5 разів. Тобто БСА, зв'язуючись з гідрофобними фрагментами макромолекул, збільшує їх доступність для гідролізу і зменшує захисну роль гідратованої поліоксиетиленової оболонки на поверхні частинок. Однак, в загальному ці значення є меншими у 15÷200 разів в порівнянні з

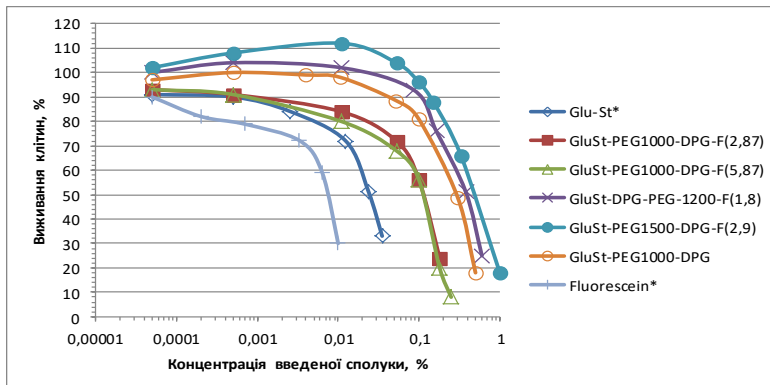
швидкістю гідролізу естерів флуоресцеїну, які використовуються в біомедичних дослідженнях.

Таблиця 3.

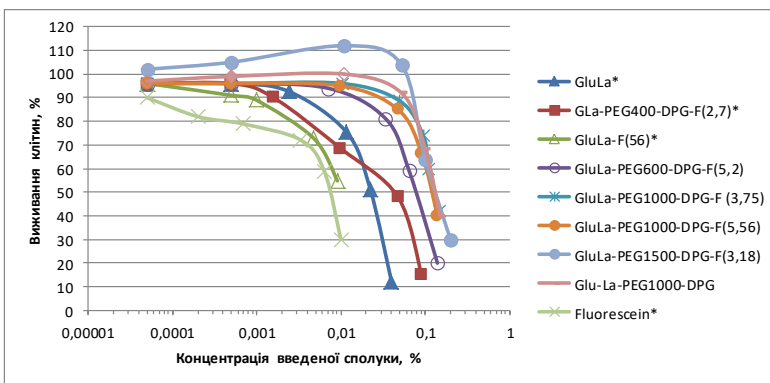
Швидкість гідролізу кополієстерів та комплексів кополієстер-альбумін з вивільненням флуоресцеїну

№	Шифр зразка	Структурна формула	Швидкість гідролізу*10 ³ , хв ⁻¹	
			Кополієстер	Комплекс кополієстер-БСА
1	31-МФ	[GluLa] _{0,5} -[PEG400] _{0,282} -[DPG] _{0,195} -[F] _{0,025}	9,1	16
2	33-МФ	[GluLa] _{0,5} -[PEG1000] _{0,3} -[DPG] _{0,172} -[F] _{0,05}	2,69	10
3	46-МФ	[GluLa] _{0,5} -[PEG1500] _{0,286} -[DPG] _{0,187} -[F] _{0,035}	0,90	1,8
4	29-МФ	[GluSt] _{0,5} -[PEG600] _{0,269} -[DPG] _{0,183} -[F] _{0,055}	0,45	0,9
5	38-МФ	[GluSt] _{0,5} -[PEG1000] _{0,31} -[DPG] _{0,15} -[F] _{0,037}	0,11	0,19
6	47-МФ	[GluSt] _{0,5} -[PEG1500] _{0,302} -[DPG] _{0,119} -[F] _{0,062}	0,12	0,78

У п'ятому розділі наведено результати досліджень *in vitro* впливу нових амфифільних кополієстерів на основі N-похідних глутамінової кислоти та поліетердіолів макромолекули яких містять ковалентно зв'язаний флуоресцеїн на життєздатність живих клітин (рис.12).



А



Б

Рис.12. Залежність кількості клітин, що вижили від концентрації кополієстеру на основі GluSt (а) та GluLa (б).

начається співвідношенням ліпофільної і гідрофільної складових у макромолекулі. Показано, що флуоресцеїнівмісні кополієстери, які містять у своєму складі поліетердіоли з молярною масою 1000 і вище проявляють

Результати цих досліджень показали, що цитотоксичність кополієстерів GluLa проявляється при концентраціях, вищих за ККМ і обумовлена утворенням міцел. Кополієстери GluSt хоча і взаємодіють з клітинами на рівні окремих макромолекул проте характеризуються більш пологими залежностями кількості клітин, які вижили від концентрації кополієстеру і порівняно вищими значеннями концентрації половинного виживання (C₅₀), що свідчить про їх вищу толерантність до живих організмів.

Проведений аналіз цитотоксичності кополімерів різного складу, показав, що їх вплив на статеві клітини виз

мінімальний рівень цитотоксичності (рис.13). Чіткої залежності виживання клітин від вмісту ланок флуоресцеїну в полімерах виявити не вдалося. Разом з тим, встановлено, що кополіестери, які містять зв'язаний флуоресцеїн проявляють значно нижчі рівні цитотоксичності (вищі значення C_{50}) у порівнянні з дією такої ж концентрації флуоресцеїну у вільному стані.

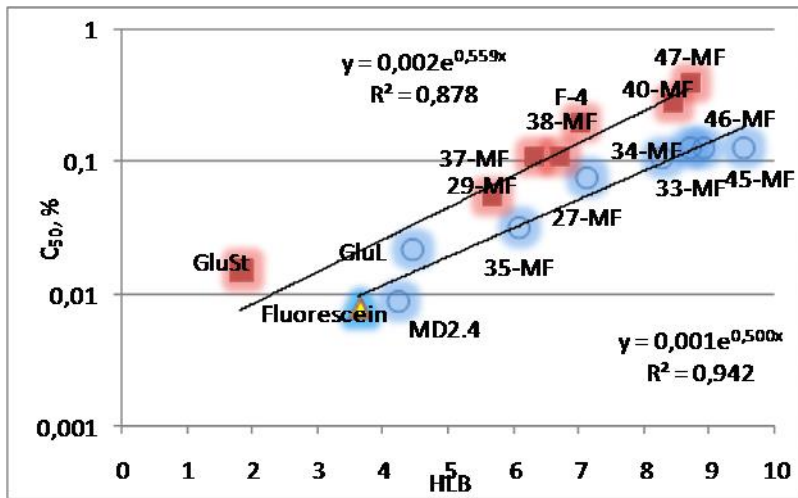


Рис. 13 Залежність концентрації кополієстерів та їх складових при якій спостерігається виживання 50% клітин (C_{50}) від їх ГЛБ.

промінювання флуоресцеїну, який вивільняється внаслідок гідролітичних процесів розкладу кополієстеру всередині клітини (рис.14).

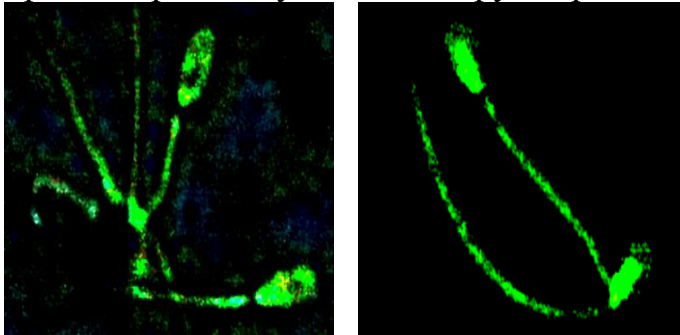


Рис.14. Мікрофотографії спермій після обробки дисперсією кополієстерів 47-MF [GluLa-PEG1500-DPG-F(2,4%)] та 31-MФ [GluLa-PEG400-DPG-F(5,53%)] (доза 1%-ї дисперсії 10 мкл/мл, витримка 1 год).

Частинки дисперсії флуоресцеїнівмісних кополієстерів після внутрішнього введення були виявлені методом флуоресцентної мікроскопії у тканинах внутрішніх органах піддослідних тварин.

Вивчення впливу флуоресцеїнівмісних кополієстерів на функціональний та структурний стан печінки та нирок лабораторних тварин дозволило зробити висновок про їх безпечність для організму та можливість використання як самостійних біохімічних маркерів у дослідженнях, так і в складі наносистем транспорту ліків для їх маркування та вивчення властивостей.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено науково-практичне завдання щодо розроблення методу синтезу нових амфифільних кополієстерів, які містять фрагмент флуоресцеїну як ланку макромолекули через нерівноважну

При порівнянні з поширеними блоккополімерами типу «Плюронік» встановлено, що флуоресцеїнівмісні кополіестери з таким же ГЛБ характеризуються значно вищими значеннями нетоксичної для клітин концентрації.

Оцінено здатність амфифільних кополієстерів до проникнення в живі клітини і можливість забезпечення контролю за цим процесом, використовуючи ефект люмінесцентного ви-

поліконденсацію за реакцією Стегліха, досліджені їх властивості та запропоновані шляхи застосування:

1. Обґрунтовано можливість використання флуоресцеїну, як мономеру, і за розробленим методом нерівноважної поліконденсації за реакцією Стегліха, синтезовано та охарактеризовано поліестер флуоресцеїну і 2-(додеканойламіно)пентандіової кислоти.
2. Через кополіконденсацію N-ацилпохідних глютамінової кислоти, поліетердіолів та флуоресцеїну за реакцією Стегліха одержано та охарактеризовано нові амфифільні кополіестери, які містять фрагменти хромофору в макроланцюгу, підтверджена їх будова, встановлено співвідношення мономерних ланок та досліджено особливості реакції Стегліха при синтезі кополіестерів з використанням флуоресцеїну.
3. Показано, що фізико-хімічні властивості поверхнево-активних кополіестерів, синтезованих на основі різних N-ацилпохідних глютамінової кислоти та поліетердіолів і флуоресцеїну, їх здатність до утворення міцел та їх агрегатів у водних середовищах, розміри частинок та стабільність водних дисперсій на їх основі визначається природою та співвідношенням мономерів.
4. Показано, що поліконденсація за реакцією Стегліха дозволяє отримувати флуоресцеїнмісні кополіестери заданого складу та будови з керованими параметрами їх гідрофільно-ліпофільного балансу, параметрами розподілу між водною та ліпофільною фазами ($\log P_{o/w} = -0,5 \div 0,5$), здатністю до солубілізації малорозчинних у воді сполук різної природи та їх вивільнення у неполярне середовище n-октанолу, закономірностями гідролітичного розкладу з вивільненням флуоресцеїну у водних середовищах.
5. Проведена оцінка впливу амфифільних флуоресцеїнмісних кополіестерів на живі клітини (спермії) в залежності від їх будови та колоїдно-хімічних характеристик та отримано емпіричну залежність між гідрофільно-ліпофільним балансом і їх цитотоксичністю. Показано, що збільшення молекулярної маси PEG фрагмента у складі кополіестеру мінімізує цитотоксичний ефект на клітини.
6. Досліджено, що амфифільні флуоресцеїнмісні кополіестери при взаємодії з мембранами клітин, проникають через них, здійснюючи доставку флуоресцентного маркера у внутрішні області клітини і її органели, що може бути використано в біохімічних дослідженнях.
7. Дослідження функціонального стану органів тварин (лабораторних щурів) показали, що одержані флуоресцеїнмісні кополіестери не проявляють системної токсичності і можуть бути перспективними як полімерні маркери при створенні систем доставки ліків для їх візуалізації в органах чи тканинах.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ ВИКЛАДЕНО В ТАКИХ ПУБЛІКАЦІЯХ:

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Дослідження амфифільних властивостей кополіестерів з хромофорними групами в системі вода-октанол / **М. В. Ференс**¹, Н. В. Фігурка, Т. М. Василюшин, О. В. Майкович, С. М. Варваренко // Chemistry, Technology and Application of

Substance=Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2018. Vol.1, № 1. P. 145–151. *(Особистий внесок: дослідження перерозподілу кополієстерів в системі вода-октанол, обговорення результатів, написання статті).*

2. Модифікація поліакриламідних гідрогелів із застосуванням поверхнево-активних псевдополіамінокислот / **М. В. Ференс**, В. Ф. Кір'янчук, А. В. Вороновська, С. М. Варваренко, С. А. Воронов // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2016. № 841. С. 444–450. *(Особистий внесок: синтез псевдополіамінокислот, дослідження їх колоїдно-хімічних характеристик, обговорення результатів).*

3. Флуоресцеїновмісні тераностики на основі псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення лікарських засобів. / С. М. Варваренко, В. Я. Самарик, В. В. Влізло, Д. Д. Остапів, Н. Г. Носова, І. Т. Тарнавчик, Н. В. Фігурка, **М. В. Ференс**, М. І. Нагорняк, Р. С. Тарас // Полімерний журнал. 2015. Т. 37, № 2. С. 193–199. *(Особистий внесок: дослідження поверхнево-активних властивостей флуоресцеїновмісних псевдополіамінокислот, обговорення результатів, участь у написанні статті).*

4. Флуоресцеїновмісні кополієстери глютамінової кислоти та поліетердіолів / **Ференс М. В.**, Н. Г. Носова, Н. В. Фігурка, С. М. Варваренко, В. Ф. Кір'янчук, С. А. Воронов // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2015. № 812. С. 443–448. *(Особистий внесок: синтез флуоресцеїновмісних кополієстерів, обговорення результатів, участь у написанні статті).*

5. Реакційна здатність гідроксильних груп зі складу сахарози в реакції Стегліха / М. І. Нагорняк, В. Я. Самарик, **М. В. Ференс**, І. А. Дронь. Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2015. № 812. С. 69–73. *(Особистий внесок: інтерпретація спектральних даних, обговорення результатів, участь у написанні статті).*

6. Amphiphilic aminofuncional diesterethers as dispersed system stabilizers / **M. V. Ferens**, N. G. Nosova, N. V. Fihurka, I. A. Dron, S. M. Varvarenko // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». 2014. № 787: Хімія, технологія речовин та їх застосування. С. 358–361. *(Особистий внесок: дослідження поверхнево-активних властивостей отриманих дієстеретерів, обговорення результатів, участь у написанні статті).*

Статті у наукових фахових виданнях України, які входять до міжнародних наукометричних баз:

7. Researches of amphiphilic properties of copolyesters with chromophore groups / **Mariia Yakoviv**, Nataliia Fihurka, Nataliya Nosova, Volodymyr Samaryk, Taras Vasylyshyn, Svitlana Hermanovych, Stanislav Voronov, Sergiy Varvarenko // Chemistry & Chemical Technology. 2018. Vol. 12, № 3. P. 318–325. *(Особистий внесок: одержання кополієстерів, дослідження їх властивостей, обговорення результатів, написання статті)*

¹ Прізвище **Ференс** змінено на **Яковів** у зв'язку з одруженням.

8. Одержання кополієстерів флуоресцеїну і 2-(додеканаміно)пентадіонової кислоти за реакцією Стегліха / С. М. Варваренко, **М. В. Ференс**, В. Я. Самарик, Н. Г. Носова, Н. В. Фігурка, Д. Д. Остапів, С. А. Воронов // Вопросы химии и химической технологии. 2018. № 2 (117). С. 5–15. *(Особистий внесок: виконання експериментальної роботи, обговорення результатів, написання статті)*
9. Characteristics of novel polymer based on pseudo-polyamino acids GluLa-DPG-PEG600: binding of albumin, biocompatibility, biodistribution and potential crossing the blood-brain barrier in rats / В. О. Chekh, **М. V. Ferens**, D. D. Ostapiv, V.Y.Samaryk, S.M. Varvarenko, V.V.Vlizlo // The Ukrainian Biochemical Journal. 2017.Vol. 89, iss. 4. P. 13–21. *(Особистий внесок: синтез псевдополіамінокислот різної структури, обговорення результатів, участь у написанні статті)*
10. Modification of polysaccharides by N-derivatives of glutamic acid using Steglich reaction / Mykhailo Nagornyak, Natalia Figurka, Volodymyr Samaryk, Serhiy Varvarenko, **Maria Ferens**, Victoria Oleksa // Chemistry & Chemical Technology. 2016. Vol. 10, № 4. P. 423–427. *(Особистий внесок здобувача: виконання частини експериментальної роботи, інтерпретація спектральних даних, обговорення результатів)*

Статті у закордонних виданнях, які входять до міжнародних наукометричних баз даних:

11. A study of an irreversible condensation of glutamic acid and polyoxyethylene/polyoxypropylene diols using thionyl chloride / Nataliia Fihurka, Ihor Tarnavchuk, Volodymyr Samaryk, Sergiy Varvarenko, Nataliya Nosova, Andriy Voronov, Mykhaylo Nagornyak, **Mariia Ferens**, Stanislav Voronov // Organic Preparations and Procedures International. 2018. Vol. 50, iss. 5. P. 502–508. *(Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*

Статті у інших наукових періодичних виданнях України:

12. GluLa-DPG-PEG600 nanopolymer binds proteins and spreads to rats' organs and tissues / В. О. Chekh, **М. V. Ferens**, Y. V. Martyn, D. D. Ostapiv, V. V. Vlizlo. Біологічні студії=Studia Biologica. 2016. Т. 10, № 3/4. С. 17–24. *(Особистий внесок здобувача: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів)*
13. Nanopolymer GluLa-DPG-PEG600-F can Penetrate into Cells and Deposit in Rats Body / В. Chekh, **М. Ferens**, N. Susol, S. Varvarenko, D. Ostapiv, V. Vlizlo // Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Біологічні науки. 2016. № 12. С. 138–142. *(Особистий внесок: синтез флуоресцеїнмісних кополієстерів, обговорення результатів)*
14. Functional and structural state of rats' kidneys and liver under the influence of nanopolymer based on pseudopolyamino acids / В. О. Chekh, **М. V. Ferens**, Y. V. Martyn, D. D. Ostapiv, V. V. Vlizlo // Біологія тварин= The Animal biology. 2016. Т. 18, № 3. С. 107–113. *(Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів, участь у написанні статті)*

Патенти на корисну модель:

15. № 119660 Спосіб одержання амфифільних кополієстерів природних двоосновних амінокислот та поліалкілендіолів розгалуженої будови та дисперсних середовищ на їх основі / Самарик В.Я., Тарас Р.С., Нагорняк М.І.,

Соловйова О.О., Козак І. А., Варваренко С.М., Носова Н.Г., **Ференс М.В.**, Воронов А.С., Тарнавчик І.Т., Воронов С.А. Патент опубліковано 10.10.2017, бюл. № 19/2017 (*Особистий внесок: апробація методик синтезу, синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів*)

16. № 98749 Спосіб одержання кополієстерів двоосновних α -амінокислот та поліетергліколів / Варваренко С.М., Самарик В.Я., Воронов А.С., Носова Н.Г., Тарнавчик І.Т., Фігурка Н.В., Дронь І.А., **Ференс М.В.**, Нагорняк М.І., Тарас Р.С., Воронов С.А. Патент опубліковано 12.05.2015, бюл. № 9/2015 (*Особистий внесок: синтез кополієстерів, аналіз одержаних результатів*)

Публікації у збірниках матеріалів та тез доповідей міжнародних і вітчизняних наукових конференцій:

17. **Mariia Yakoviv**, Olha Maikovych, Stanislav Voronov, Pamela Pasetto, Sergiy Varvarenko Multi-functional self-fluorescent micelles for controlled drug delivery and bioimaging // EastWest Chemistry Conference 10-12 October, 2018, Lviv, p. 111

18. **Yakoviv M.V.**, Nosova N.G., Samaryk V.Y., Varvarenko S.M., Pasetto P. Study of physical interactions of amphiphilic copolyester of fluorescein with albumin in aqueous dispersions // International conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018), 27 - 30 August, Kyiv, P.398.

19. **Yakoviv M.V.**, Pasetto P., Varvarenko S.M. Researches in amphiphilic properties of copolyesters with chromophore groups // II Всеукраїнська науково-практична конференція "Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості"—Херсон: ХНТУ, Україна, 22-23 травня 2018, с.35-36

20. **Яковів М.В.**, Варваренко С.М. Дослідження амфифільних властивостей кополієстерів з хромофорними групами в системі вода-октанол // II Всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи», - Житомир, Україна, 16 травня, 2018, с.338

21. Василюшин Т.М., **Яковів М.В.**, Фігурка Н.В., Остапів Д.Д., Варваренко С.М. Синтез та властивості афифільних кополієстерів з спеціальними властивостями // XIX Міжнародна конференція студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії", – Київ, Україна, 22-24 травня, 2018, с.140.

22. Olha Maikovych, **Maria Ferens**, Taras Vasylyshyn, Serhiy Varvarenko. Porous polyacrylamide hydrogels – preparation and properties // 20th JCF-Frühjahrssymposium Jung Chemiker Forum, Konstanz, Germany, 2018, March 21st – 24th, p. 216.

23. **Ференс М. В.**, Варваренко С. М., Фігурка Н. В., Майкович О. В. Особливості кополіконденсації флуоресцеїну в умовах реакції Стегліха // I Міжнародна (XI Українська) наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених “Хімічні проблеми сьогодні 2018” – Вінниця, Україна, 27–29 березня, 2018, с.336.

24. **Ференс М.В.**, Майкович О.В., Берчук Н.С., Стасюк А.В., Василюшин Т.М. Застосування амінофункційних дієстерів глютамінової кислоти для створення парфумерно-косметичних засобів // IV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених і студентів «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості»—Херсон: ХНТУ, Україна, 30-31 жовтня, 2017, с. 61

25. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Nataliya Nosova, Nataliia Berchuk, Semen Khomyak, Stanislav Voronov. Amphiphilic fluorescent copolyesters for monitoring in drug delivery // IX International conference in chemistry Kyiv-Toulouse (ICKT-9), Kyiv, Ukraine, June 4-9, 2017, p.52.
26. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Stanislav Voronov and Dmytro Ostapiv. Copolyesters based on natural aminoacids with special properties for drug delivery system // 19th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium), Mainz, Germany, 2017, March 29th - April 1st, p. 106.
27. **Ференс М.В.**, Носова Н.Г., Кірянчук В.Ф., Вороновська А.В., Варваренко С.М., Воронов С.А. Поверхнево-активні поліестеретери та композиції гідрогелів на їх основі // Міжнародна науково-технічна конференція «Сучасні технології одержання та переробки полімерних матеріалів», Львів, Україна, 21-23 вересня, 2016, С.98.
28. **Ференс М.В.**, Тарас Р.С., Товарніцький А.І., Варваренко С.М. Синтез нанорозмірного магнетиту, модифікованого структурованими псевдополіамінокислотами поліестерного типу для доставки лікарських препаратів // III Міжнародна науково-практична конференція «Хімічна технологія: наука, економіка та виробництво», Шостка, Україна, 23-25 листопада 2016 р., С. 104.
29. **Марія Ференс**, Сергій Варваренко, Володимир Самарик, Наталія Носова, Анна Вороновська, Станіслав Воронов, Богдан Чех, Дмитро Остапів. Флуоресцеїновмісні псевдополіамінокислоти – нові наносистеми для транспорту ліків // II Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми хімії та хімічної технології», Національний університет харчових технологій, Київ, Україна, 21-23 листопада 2016 р., С. 156-157
30. Voronovska A., Tovarnitskyi A., Zelenyak O., Ranevska M., Stasiuk A., **Ferens M.**, Fihurka N., Tarnavchuk I. Poly(ethylene glycol) and poly(propylene glycol) – containing aminofunctional copolyesters for biomedical application // International youth science forum «LITTERIS ET ARTIBUS», Lviv, Ukraine, 24-26 November 2016, P. 442.
31. Тарас Р.С., Нагорняк М.І., **Ференс М.В.**, Солодкий І.Т., Варваренко С.М., Самарик В.Я. Одержання амфифільних кополіестерів природних двоосновних амінокислот та поліалкілендіолів розгалуженої будови// Міжнародна науково-технічна конференція «Сучасні технології одержання та переробки полімерних матеріалів», Львів, Україна, 21-23 вересня, 2016, С.96.
32. **Ференс М.В.**, Нагорняк М.І., Цап В.Р., Варваренко С.М. Амінофункційні кополіестери із спеціальними властивостями для систем доставки ліків //XXIV Українська конференція з органічної хімії, Полтава, Україна, 19-23 вересня, 2016, С. 261.
33. **M.V. Ferens**, S.M. Varvarenko, B.O. Chekh, N.G. Nosova, A.V. Panchenko. The introduction of fluorescein into the structure of pseudo-poly(amino acids) and study of their colloidal-chemical properties // International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO – 2016), Lviv, Ukraine, August24-27, 2016,p.68.
34. **Mariia Ferens**, Roman Taras, Iryna Kozak, Sergiy Varvarenko, Volodymyr Samaryk, Bogdan Chekh. Synthesis nanoscale magnetite, modified structured

- pseudopoliaminoacids polyester type for the delivery of drugs // 18th JCF-Frühjahrssymposium (spring symposium), Kiel, Germany, 2016, March 16-19, p. 184.
35. Chekh B. O., **Ferens M.**, Vlizlo V. V. Testing of P-116 based of nano-polymer system containing pseudo polyamino acids.// Abstrct book for Conference for young scientist 2015, Kyiv, 2015, p. 117.
36. **Ференс Марія**, Кір'янчук Василина, Варваренко Сергій, Носова Наталя, Панченко Анна, Воронов Станіслав. Синтез та дослідження властивостей тераностичних систем доставки ліків з флуоресцеїновим фрагментом // Тези доповідей II Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми хімії та технології органічни хречовин» (АРСТОС2)». - Львів, Україна, 5–7 листопада 2015 р. С. 79.
37. **Марія Ференс**, Наталя Носова, Анна Панченко, Василина Кір'янчук, Сергій Варваренко, Станіслав Воронов. Флуоресцеїновмісні системи транспорту ліків на основі кополієстерів глютамінової кислоти та полієтердіолів // Тези доповідей XV наукової конференції “Львівські хімічні читання – 2015”. - м.Львів, 24–27 травня 2015 р. - С. 130.
- 38 **Ferens M.V.**, Ilchuk V.V., Nagornyak M.I., Panchenko A.V., Varvarenko S.M., Samaryk V.J. Synthesis and study of surface-active properties of aminofuncional fluorescent copolyesters. // Abstracts of the All-Ukrainian scientific-practical conference "The concept of sustainable development and its implementation," Ternopil, Ukraine, 2015, April 16-18, P.126-127.
39. **Mariia Ferens**, Sergiy Varvarenko, Nataliia Fihurka, Stanislav Voronov. Synthesis of novel pseudo-poly(amino acid)s with fluorescein fragments and study of their properties // 17th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium), Munster, Germany, 2015, March 25-28, p. P2-034.
40. R.S.Taras, **M.V. Ferens**, V.Y. Samaryk, M.I.Nagornyak , V.V. Ilchuk, S.A.Voronov. Getting cross-stitched polyester type pseudopoliaminoacid.// VIII Ukrainian-Polish Conference “Polymer sofspecial applications” Bukovel, Ukraine, October 1-4, 2014.
41. **Mariia Ferens**, Nataliya Nosova, Iryna Dron, Viktoriya Ilchuk, Sergiy Varvarenko. Aminofuncional diesterethers as stabilizers dispersed phase. VIII Ukrainian-Polish Conference “Polymer sofspecial applications” Bukovel, Ukraine, October 1-4, 2014.
42. Nagornyak Mykhaylo, Fihurka Natalia, **Ferens Mariia**. Polyesters based on glutamic acid as potential polymer for biomedical application.// 16th JCF-Frühjahrssymposium (springsymposium), Jena, Germany, 2014, March 26-29, p. 181.

АНОТАЦІЯ

Яковів М.В. Амфіфільні флуоресцеїнівмісні кополієстери N-похідних глютамінової кислоти одержані за реакцією Стегліха – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.06 - Хімія високомолекулярних сполук. – Національний університет “Львівська політехніка”, Міністерство освіти і науки України, Львів, 2019.

Дисертаційна робота присвячена синтезу незворотньою поліконденсацією за реакцією Стегліха амфіфільних кополієстерів на основі N-похідних природних

амінокислот, поліетердіолів і флуоресцеїну. Одержано та охарактеризовано нові амфифільні кополіестери, які містять фрагменти хромофору в макроланцюгу і підтверджена їх будова. Вивчено закономірності перебігу реакції Стегліха при використанні флуоресцеїну, як мономеру для поліконденсації і визначено оптимальні умови її проведення.

Встановлено, що отримані флуоресцеїнвмісні кополіестери проявляють поверхнево-активні властивості, утворюють у водних середовищах міцели, які здатні солюбілізувати ліпофільні сполуки. Показано, що в залежності від природи та співвідношення комономерів за реакцією Стегліха отримані флуоресцеїнвмісні кополіестери керованого складу та будови з заданими гідрофільно-ліпофільним балансом і параметрами їх розподілу між водною та ліпофільною фазами, що є важливим для створення та дослідження систем транспорту ліків.

Досліджено агрегативну стійкість водних дисперсій, сорбцію частинками дисперсної фази бичачого сироваткового альбуміну та встановлено залежності цих параметрів від складу та структури кополіестерів. Вивчено закономірності гідролітичного деградування з відщепленням флуоресцеїну кополіестерів та їх комплексів з альбуміном при рН крові.

Дослідження впливу амфифільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів на живі клітини (спермії) дозволило отримати емпіричну залежність між їх гідрофільно-ліпофільним балансом і цитотоксичністю, яка дає можливість прогнозувати властивості кополіестерів. Встановлено, що із збільшенням молекулярної маси гідрофільного фрагмента PEG у складі кополіестеру збільшується концентрація, при якій цитотоксичності не спостерігається.

При дослідженнях функціонального та структурного стану органів лабораторних тварин, виявлено тільки незначний токсичний вплив кополіестерів на організм, що свідчить про безпечність та можливість використання кополіестерів цього типу, як самостійних біохімічних маркерів, так і в складі наносистем транспорту ліків.

Ключові слова: флуоресцеїнвмісні кополіестери, реакція Стегліха, незворотня кополіконденсація, системи доставки ліків, полімерні міцели, поверхнево-активні речовини, амфифільні полімери біомедичного призначення.

АННОТАЦІЯ

Яковив М.В. Амфифильные флуоресцеинсодержащие сополиэфиры N-производных глутаминовой кислоты полученные по реакции Стеглиха - На правах рукописи.

Диссертационная работа посвящена синтезу амфифильных сополиэфиров на основе N-производных природных аминокислот, полиетердиолов и флуоресцеина необратимой поликонденсацией по реакции Стеглиха. Получены и охарактеризованы новые амфифильные сополиэфиры, содержащие фрагменты хромофора в макроцепи и подтверждено их строение. Изучены закономерности протекания реакции Стеглиха при использовании флуоресцеина, как мономера для поликонденсации и определены оптимальные условия ее проведения.

Установлено, что полученные флуоресцеинсодержащие сополиэфиры обладают поверхностно-активными свойствами, образуют в водных средах мицеллы, которые способны солюбилизовать липофильные соединения.

Показано, что в зависимости от природы и соотношения комономеров за реакцией Стеглиха полученные флуоресцеинсодержащие сополиэфиры управляемого строения с заданными гидрофильно-липофильным балансом и параметрами их распределения между водной и липофильным фазами, что является важным при создании и исследовании систем транспорта лекарств.

Исследована агрегативная устойчивость водных дисперсий, сорбция частицами дисперсной фазы бычьего сывороточного альбумина и установлены зависимости этих параметров от состава и структуры сополиэфиров. Изучены закономерности гидролитического деградирования сополиэфиров с отщеплением флуоресцеина и их комплексов с альбумином при рН крови.

Исследование влияния амфифильных флуоресцеинсодержащих сополиэфиров на живые клетки (сперматозоиды) позволило получить эмпирическую зависимость между их гидрофильно-липофильным балансом и цитотоксичностью, которая дает возможность предсказывать свойства сополиэфиров. Установлено, что с увеличением молекулярной массы гидрофильного фрагмента PEG в составе сополиэфира увеличивается концентрация, при которой цитотоксичности не наблюдается.

При исследованиях функционального и структурного состояния органов лабораторных животных, обнаружены только незначительное токсическое воздействие сополиэфиров на организм, что свидетельствует о безопасности и возможность использования сополиэфиров этого типа, как самостоятельных биохимических маркеров, так и в составе наносистем транспорта лекарств.

Ключевые слова: флуоресцеинсодержащие сополиэфиры, реакция Стеглиха, необратимая кополиконденсация, системы доставки лекарств, полимерные мицеллы, поверхностно-активные вещества, амфифильные полимеры биомедицинского назначения.

SUMMARY

Yakoviv M.V. Amphiphilic fluorescein-containing copolyesters of N-derivatives of glutamic acid obtained by the Steglich reaction. - On the rights of the manuscript.

The thesis for obtaining a degree of Candidate of Sciences in Chemistry (PhD), speciality 02.00.06 «Chemistry of High-Molecular Compounds» – Lviv Polytechnic National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Lviv, 2019.

The dissertation is devoted to the irreversible polycondensation synthesis by the Steglich reaction of amphiphilic copolyester based on natural amino acids, polyether diols and fluorescein, and a comprehensive study of their structure, colloid chemical and biochemical properties as a perspective basis for the creation of polymer systems for the transport of drugs with visualization function.

Based on detailed study of the structure of the co-polyesters based on 2-(dodecanoylamino) pentanedioic acid and fluorescein, were revealed the features of the Steglich reaction during co-polycondensation of fluorescein and the main factors influencing this process. It created the prerequisites for obtaining a biocompatible copolyesters with more complex amphiphilic structure, in which fluorescein was used as one of the co-monomers and included into the structure of the macromolecule, as a fluorescent label, through the irreversible co-polycondensation by Steglich reaction.

The structures were confirmed and were characterized a number of obtained amphiphilic co-polyester of N-derivatives of glutamic acid and polyether diols with chromophoric fluorescein groups in the macrochain. Using the methods of ^1H NMR spectroscopy, high-performance SEC chromatography were studied the peculiarities of the structure of fluorescein-containing copolyesters, their molecular mass distribution and functionality, depending on the obtaining conditions and nature of co-monomers.

Represented the results of research of colloid-chemical properties of new amphiphilic fluorescein-containing co-polyesters. It is shown that such amphiphilic co-polyesters reduce the surface tension and are capable to form self-stabilized dispersion of nanoparticles in aqueous solution.

The results of the solubilization study of water-soluble compounds on the example of Sudan (III) and curcumin by particles of the dispersed phase of aqueous dispersions of amphiphilic fluorescein-containing copolyesters are given. It has been established that the amount of solubilization capacity of dispersions obtained from copolyester depends on their composition and the nature of solubilizate.

Performed an assessment of lipophilicity of new fluorescein-containing amphiphilic co-polyesters. As a result of the research, it was found that the synthesized co-polyesters is characterized by values of $\log P_{o/w}$ in the range from -0.5 to 0.5, which testifies their affinity for both water and lipid phases, which is one of the important factors that determine promising of amphiphilic compounds in the creation and research of drug delivery systems.

Presented the results of investigations of dependence of the aggregate stability of dispersions of fluorescein-containing co-polyesters in water and aqueous solutions of bovine serum albumin. Established that synthesized co-polyesters are capable to form complexes with albumin, which is accompanied with change of stabilization of particles of dispersed phase, depending on the composition of macromolecules.

For the first time is established the connexion between the structure and composition of copolyesters with parameters that determine their level of non-toxicity. It has been found that fluorescein-containing co-polyesters containing polyether diols with more than 1000 Da molar mass contributes an increase of cell survival compared to control group.

Evaluated the ability of amphiphilic co-polyesters to penetrate into living cells and the possibility to provide a control over this process, using the luminescence effect of fluorescein that liberate as a result of hydrolytic processes of the co-polyesters degradation in the cell.

The study of the effects of fluorescein-containing co-polyester on the functional and structural status of the liver and kidneys of laboratory animals made it possible to conclude that they are safe for the organism and they are able to be used as independent biochemical markers, as well as in the drug nanosystems for marking them and studying their properties.

Keywords: fluorescein-containing copolyesters, Steglich reaction, irreversible copolycondensation, drug delivery systems, polymeric micelles, surfactants, amphiphilic polymers for biomedical purpose.