

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco636712>

Исследование цитотоксичности наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона, загруженных куркумином, на 2D- и 3D-моделях *in vitro* аденокарциномы яичника человека

А.М. Гилева^{1,2}, Д.И. Куликова^{1,2}, Е.В. Куковякина², А.В. Яголович³, К.С. Кушнерёв², А.Н. Кусков², Е.А. Марквичева¹

¹ ГНЦ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия;

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Наночастицы на основе биосовместимых полимеров перспективны для доставки биологически активных веществ и лекарств, в частности противоопухолевых агентов. Известно, что полифенол куркумин обладает плейотропными терапевтическими эффектами, включая противоопухолевую активность. Противоопухолевый потенциал куркумина показан на различных типах опухолей, в том числе на аденокарциноме яичника. Однако его применение ограничено его липофильной природой и очень низкой биодоступностью. Инкапсулирование куркумина в наночастицы позволяет расширить спектр его применения, а также изучить возможность использования в качестве противоопухолевого препарата.

Цель. Получение полимерных наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона и его сополимеров с акриловой кислотой, загруженных куркумином; изучение их накопления в опухолевых клетках; оценка цитотоксичности *in vitro* в 2D- (монослойная культура клеток) и 3D-моделях (опухолевые сфероиды) на основе клеточной линии аденокарциномы яичника человека.

Материалы и методы. Полимеры на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона и его сополимеров с акриловой кислотой получены радикальной полимеризацией. Полимерные наночастицы получали эмульсионным методом. Накопление наночастиц в опухолевых клетках изучали с помощью проточной цитометрии (монослойная культура) или флуориметрии (сфероиды). Цитотоксичность исследовали с помощью МТТ-теста на 2D- и 3D-моделях на основе клеточной линии аденокарциномы яичника человека OVCAR-3.

Результаты. Показано эффективное накопление полимерных наночастиц, загруженных куркумином, как в клетках монослойной культуры, так и в опухолевых сфероидах. Наночастицы, загруженные куркумином, показали высокий уровень цитотоксичности для клеток аденокарциномы яичника человека OVCAR-3 в 2D-модели (IC₅₀ до 137±9 мкг/мл) и умеренный, но достаточно очевидный цитотоксический эффект на 3D-модели *in vitro*. При этом у всех образцов наночастиц, не загруженных куркумином, цитотоксическая активность отсутствовала независимо от их состава или наличия дополнительной модификации функциональными малеимидными группами.

Заключение. Полученные данные могут лечь в основу дальнейших исследований по безопасности и противоопухолевой активности *in vivo* наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона, загруженных куркумином.

Ключевые слова: куркумин; амфифильные производные поли-N-винилпирролидона; наночастицы; аденокарцинома яичника человека; клеточная линия OVCAR-3.

Как цитировать:

Гилева А.М., Куликова Д.И., Куковякина Е.В., Яголович А.В., Кушнерёв К.С., Кусков А.Н., Марквичева Е.А. Исследование цитотоксичности наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона, загруженных куркумином, на 2D- и 3D-моделях *in vitro* аденокарциномы яичника человека // Российский онкологический журнал. 2024. Т. 29, № 3. С. 171–182. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco636712>

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco636712>

Cytotoxicity of curcumin-loaded nanoparticles based on amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone derivatives in 2D and 3D *in vitro* models of human ovarian adenocarcinoma

Anastasia M. Gileva^{1,2}, Daria I. Kulikova^{1,2}, Ekaterina V. Kukovyakina², Anna V. Yagolovich³, Kirill S. Kushnerev², Andrey N. Kuskov², Elena A. Markvicheva¹

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

² Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Moscow, Russia;

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Nanocarriers based on biocompatible polymers are a promising delivery tool for biologically active substances and drugs, in particular antitumor agents. Curcumin, a polyphenol, is known to possess pleiotropic therapeutic effects, including antitumor activity. The antitumor potential of curcumin has been shown in various tumor types, including ovarian adenocarcinoma. However, its lipophilic properties and very low bioavailability limits its use. Incorporating curcumin into nanocarriers enhances its delivery options and expands its potential as an antitumor agent.

AIM: To produce curcumin-loaded polymeric nanoparticles based on amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone derivatives and its copolymers with acrylic acid, explore their accumulation in the tumor cells; evaluate *in vitro* cytotoxicity in 2D (monolayer cell culture) and 3D (tumor spheroids) models of human ovarian adenocarcinoma.

MATERIALS AND METHODS: The polymers of the amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone derivatives and its copolymers with acrylic acid were obtained using radical polymerization. Emulsion method was used to obtain polymeric nanoparticles. Accumulation of nanoparticles in tumor cells was assessed using flow cytometry (for monolayer culture) or fluorimetric analysis (for spheroids). Cytotoxicity was studied in 2D and 3D models obtained of the human ovarian adenocarcinoma cell line OVCAR-3 using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay).

RESULTS: The effective accumulation of curcumin-loaded polymeric nanoparticles in both monolayer culture cells and tumor spheroids was demonstrated. Curcumin-loaded nanoparticles exhibited high-level cytotoxicity in the 2D model of human ovarian adenocarcinoma cells OVCAR-3 (IC₅₀ up to 137±9 µg/mL) and a moderate, although significant cytotoxic effect in a 3D *in vitro* model. Meanwhile, nanoparticles not loaded with curcumin did not show any cytotoxic activity regardless of their composition or of the additional modification, i.e. with the use of maleimide functional groups.

CONCLUSION: These data can provide a foundation for further studies to assess the safety and *in vivo* antitumor activity of curcumin-loaded nanoparticles based on amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone derivatives.

Keywords: curcumin; amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone derivatives; nanoparticles; human ovarian adenocarcinoma; OVCAR-3 cell line.

To cite this article:

Gileva AM, Kulikova DI, Kukovyakina EV, Yagolovich AV, Kushnerev KS, Kuskov AN, Markvicheva EA. Cytotoxicity of curcumin-loaded nanoparticles based on amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone derivatives in 2D and 3D *in vitro* models of human ovarian adenocarcinoma. *Russian Journal of Oncology*. 2024;29(3):171–182. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco636712>

Submitted: 04.10.2024

Accepted: 27.11.2024

Published online: 27.11.2024

ОБОСНОВАНИЕ

Наночастицы играют важную роль в современной медицине, открывая возможности для направленной доставки противораковых препаратов непосредственно в опухолевые клетки, что существенно снижает побочные эффекты и усиливает их терапевтический эффект. В частности, инкапсулирование липофильных противоопухолевых лекарств в наночастицы позволяет повысить их эффективность в связи с улучшением их растворимости, селективности и пролонгированного высвобождения [1].

На сегодняшний день перспективны полимерные наночастицы, в частности наночастицы, обладающие высокой стабильностью, низкой токсичностью и возможностью эффективно инкапсулировать липофильные препараты [2]. Некоторые мицеллярные наночастицы, нагруженные противоопухолевыми препаратами, уже попали на фармацевтический рынок или находятся на разных стадиях клинических испытаний [3]. На данный момент особенно активно исследуются полимерные наночастицы, основанные на амфифильных блок-сополимерах, позволяющих осуществлять различные структурные и функциональные модификации формируемой системы доставки [4, 5]. К перспективным полимерам относится биосовместимый и биоразлагаемый поли-N-винилпирролидон (ПВП), на основе которого можно получать высокостабильные полимерные наноразмерные частицы [6]. Так, наночастицы из амфифильных производных поли-N-винилпирролидона стабильны в присутствии сыворотки крови, не оказывают существенного влияния на функции клеток крови и активацию системы комплемента, не обладают гемолитическим или воспалительным действием [7]. Ранее была показана возможность загрузки таких наночастиц на основе амфифильных производных ПВП противовоспалительным препаратом индометацином [8] и противоопухолевым препаратом бортезомибом [9].

Куркумин представляет собой полифенольный пигмент из корневища *Curcuma longa*, способный эффективно воздействовать на различные внутриклеточные сигнальные пути, оказывая, помимо противоопухолевого, также противовоспалительное, иммуномодулирующее, нейропротекторное, гепатопротекторное и противовирусное действие [10]. Куркумин часто используют в качестве модельного лекарства при разработке новых систем доставки, поскольку он является липофильным веществом, как большинство используемых в клинике противоопухолевых лекарств, имеет противоопухолевую активность и легко детектируется по флуоресценции. Показан потенциал применения куркумина для лечения различных типов опухолей, в частности аденокарциномы яичника человека [11, 12]. Однако стоит отметить, что терапевтическое применение куркумина и его аналогов ограничено низкой химической стабильностью и биодоступностью вследствие его липофильной природы [13]. Инкапсулирование в наночастицы может

позволить получить стабильные и эффективные лекарственные формы куркумина и тем самым повысить его эффективность, а также расширить спектр его применения, в том числе в качестве дополнительного средства для противоопухолевой терапии.

Цель работы заключалась в получении полимерных наночастиц на основе амфифильных производных ПВП и его сополимеров с акриловой кислотой, нагруженных куркумином; изучении их накопления в опухолевых клетках; оценке цитотоксичности *in vitro* на 2D- (монослойная культура клеток) и 3D-моделях (мультиклеточные сфериды) на основе клеточной линии аденокарциномы яичника человека OVCAR-3.

В данной работе мы показали цитотоксическую активность наночастиц на основе амфифильных производных ПВП и его сополимеров с акриловой кислотой, нагруженных куркумином, в отношении клеток аденокарциномы яичника человека в двух моделях *in vitro*. Кроме того, продемонстрировали, что модификация поверхности наночастиц функциональными малеимидными группами не приводила к появлению цитотоксичности. Такие модифицированные наночастицы в будущем можно использовать для ковалентной сшивки с белковыми молекулами (лигандами) для таргетной доставки в раковые клетки. Полученные результаты могут послужить основой для дальнейших исследований по безопасности и противоопухолевой активности *in vivo* наночастиц на основе амфифильных производных ПВП, нагруженных куркумином или другими липофильными препаратами с противоопухолевой активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Дизайн данной работы состоял из трёх этапов.

Первый этап — синтез полимеров на основе амфифильных производных ПВП, получение полимерных наночастиц с включённым куркумином.

Второй этап — оценка эффективности накопления наночастиц опухолевыми клетками OVCAR3 (2D- и 3D-модели *in vitro*).

Третий этап — оценка цитотоксической активности нагруженных куркумином наночастиц в 2D- и 3D-моделях на основе опухолевых клеток OVCAR3 *in vitro*.

Условия проведения и продолжительность исследования

Исследование проводилось на базе Института биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева и Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Продолжительность исследования: 03.2024–09.2024.

Описание методологии исследования

Синтез полимеров на основе амфифильных производных ПВП

Синтезированы два типа полимеров, представляющих собой амфифильные производные ПВП с молекулярной массой 3 кДа: Амф-ПВП (ПВП с одним концевым *n*-октадецильным фрагментом) и Амф-ПВП-АК (сополимер *N*-винилпирролидона и акриловой кислоты с одним концевым *n*-октадецильным фрагментом). Амф-ПВП и Амф-ПВП-АК получали следующим образом: в круглодонную колбу на 250 мл добавляли навески 0,115 г 2,2'-азобисизобутиронитрила (ДАК) и 0,429 г октадецилмеркаптана, затем приливали раствор 10,7 мл *N*-винилпирролидона в 40 мл 1,4-диоксана. В случае полимера Амф-ПВП-АК в систему также добавляли 350 мкл акриловой кислоты. Реакционную смесь перемешивали 5 мин до полного растворения всех компонентов. Полученный раствор оставляли при комнатной температуре на 1 ч, затем добавляли 100 мл дистиллированной воды. После этого отгоняли полученную полимерную смесь на ротационном испарителе (Hei-Vap Value Digital, Heidolph Instruments, Германия) для избавления от 1,4-диоксана. Готовую смесь диализовали против воды (Slide-A-Lyzer™ Dialysis Flask, 1 K MWCO, Thermo Scientific, США) в течение 4 дней и лиофилизовали (Alpha 1-4 LD plus, Martin Christ, Германия). Молекулярную массу полимеров определяли функциональным анализом (потенциометрическое титрование).

Модификация полимера Амф-ПВП-АК малеимидными группами

Навеску Амф-ПВП-АК 0,5 г диспергировали в 25 мл воды. Для модификации Амф-ПВП-АК подготавливали два раствора — 1 мг (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида в 2 мл воды и 16 мг *N*-гидроксисунцинимида в 3 мл воды — и оставляли перемешиваться в течение 15 мин, затем оба раствора приливали к раствору наночастиц. Навеску 4 мг 1-(2-аминоэтил)малеимида растворяли в 5 мл воды и добавили к раствору наночастиц, и затем всю реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч. Модифицированные наночастицы диализовали против воды, замораживали и лиофилизовали. Готовый порошок состоял из наночастиц, которые можно диспергировать в воде или фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) для получения стабильной суспензии наночастиц.

Получение наночастиц из амфифильных производных ПВП, нагруженных куркумином (Амф-ПВП-Кур)

Наночастицы Амф-ПВП-Кур получены эмульсионным методом. Для этого 0,1 г полимера диспергировали в 20 мл воды, а 0,0014 г куркумина растворяли в 5 мл ацетона. Затем раствор полимера подвергали ультразвуковой обработке в течение 5 мин при охлаждении. По окончании гомогенизации к раствору полимера приливали раствор

куркумина и также подвергали ультразвуковой обработке ещё 5 мин. Ацетон отгоняли на роторном испарителе (Hei-Vap Value Digital, Heidolph Instruments, Германия). Для отделения невключённого куркумина суспензию центрифугировали (Sigma 4–5 L, Германия). После этого супернатант лиофилизировали. Готовый порошок состоял из наночастиц, которые можно диспергировать в воде или фосфатно-солевом буфере для получения стабильной суспензии частиц.

Получение наночастиц из амфифильных производных поли-N-винилпирролидона, модифицированных акриловой кислотой и малеимидными группами и нагруженных куркумином (Амф-ПВП-АК-Мал-Кур)

Наночастицы Амф-ПВП-АК-Мал-Кур получены эмульсионным методом. Для этого 0,5 г полимера диспергировали в 25 мл воды, а 0,002 г куркумина растворяли в 5 мл ацетона. Затем раствор полимера подвергали ультразвуковой обработке в течение 5 мин при охлаждении. По окончании гомогенизации к раствору полимера приливали раствор куркумина и также подвергали ультразвуковой обработке ещё 5 мин. Ацетон отгоняли на роторном испарителе (Hei-Vap Value Digital, Heidolph Instruments, Германия). Для отделения невключённого куркумина суспензию центрифугировали (Sigma 4–5 L, Германия). После этого отбирали супернатант. Для модификации полученных наночастиц подготавливали два раствора — 1 мг (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида в 2 мл воды и 16 мг *N*-гидроксисунцинимида в 3 мл воды, и оставляли их перемешиваться в течение 15 мин, а затем оба раствора приливали к раствору наночастиц. Навеску 4 мг 1-(2-аминоэтил)малеимида растворяли в 5 мл воды и добавили к раствору наночастиц, всю реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч. Готовые модифицированные наночастицы диализовали против воды, замораживали и лиофильно высушивали. Готовый порошок состоял из наночастиц, которые можно диспергировать в воде или фосфатно-солевом буфере для получения стабильной суспензии частиц. Размеры частиц определяли методом динамического светорассеяния (Zetasizer Nano ZS, Marvern). Средний размер наночастиц лежал в диапазоне до 350 нм.

Эффективность включения куркумина в наночастицы рассчитывали по отношению общего содержания куркумина в частицах к общему количеству загруженного куркумина. Профиль высвобождения куркумина из наноразмерных частиц исследовали на протяжении 24 ч, как описано ранее [14]. Вкратце: наночастицы суспендировали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), после чего суспензию центрифугировали (9000 g, 15 мин) и определяли в буфере количество высвободившегося куркумина спектрофотометрически при 425 нм. Аликвоты проб отбирали через 0,5, 1, 2, 6, 12, 16 и 24 ч.

Культивирование клеток

Клеточная линия аденокарциномы яичника человека OVCAR-3 (Американская коллекция типовых клеточных культур, ATCC, США, Кат. № HTB-161) была любезно предоставлена канд. биол. наук В.В. Татарским (Институт биологии гена Российской академии наук). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FBS) в CO₂-инкубаторе (N-BIOTEK NB-203, Южная Корея) при 37 °C в газовой среде, содержащей 5% CO₂. Наблюдение за ростом клеток осуществляли ежедневно с помощью светового инвертированного микроскопа (Reichert Microstar 1820E, Германия).

Получение мультиклеточных сфероидов

Получение мультиклеточных сфероидов проводили непосредственно из монослойной культуры клеток OVCAR-3 по методике, разработанной авторами ранее [14]. Для этого в 96-луночный планшет (SPL Lifesciences, Корея) вносили суспензию клеток из расчёта 7500 клеток на лунку (в 100 мкл питательной среды RPMI-1640, 10% FBS), после чего планшет помещали в CO₂-инкубатор на 24 ч. Затем заменяли среду на 100 мкл свежей (с 10% FBS), содержащей 40 мкМ синтетического циклического RGD-пептида (cyclo-RGDfK(TPP)). Планшет переносили в CO₂-инкубатор, где в течение 72 ч происходила самопроизвольная агрегация клеток с образованием мультиклеточных сфероидов. Размеры сфероидов определяли с помощью светового микроскопа. Средний размер сфероидов был 150 нм.

Исследование эффективности накопления полимерных наночастиц *in vitro*

Проточная цитометрия

Для количественной оценки эффективности накопления полимерных наночастиц в клетках монослойной культуры OVCAR-3 использован метод проточной цитометрии на флуоресцентно-активируемом проточном цитометре (BD FACSCalibur, США) с программным обеспечением BD CellQuest. Клетки высевали в 24-луночный планшет (50 000 клеток на лунку) с последующей инкубацией в течение 24 ч (37 °C, 5% CO₂). Затем старую культуральную среду удаляли и добавляли свежую среду RPMI-1640, содержащую суспензию полимерных наночастиц, загруженных куркумином (0,5 мг/мл, образцы Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур соответственно). Далее клетки инкубировали с образцами в течение 5, 30 и 60 мин, после чего несвязавшиеся наночастицы удаляли трёхкратной промывкой фосфатно-солевым буфером (pH 7,4). Изучение образцов проводили при длине волны 488 нм. Данные проточной цитометрии выражали как среднюю интенсивность флуоресценции, делённую на фоновую интенсивность контрольной группы (необработанные клетки).

Флуориметрия

Количественную оценку накопления полимерных наночастиц в клетках сфероидов проводили с помощью флуориметрического анализа. Для этого культуральную

среду заменяли на свежую, содержащую 0,5 мг/мл суспензии полимерных наночастиц Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур, и инкубировали (37 °C, 5% CO₂) со сфероидами в течение 1, 3 и 7 ч соответственно. Затем сфероиды трижды отмывали от несвязавшихся наночастиц PBS (pH 7,4) и измеряли средний уровень флуоресценции (Promega GloMax-Multi detection system, США) при длине волны 425 нм (Кур λ_{ex} =571 нм, λ_{em} =467 нм). Данные о поглощении выражали в процентах от флуоресценции наночастиц, поглощённых клетками, по сравнению с флуоресценцией исходного раствора.

Исследование цитотоксичности полимерных наночастиц *in vitro*

Цитотоксичность наночастиц оценивали с помощью МТТ-теста. Для этого в случае монослойной культуры (2D-модель *in vitro*) клетки рассеивали в 96-луночный культуральный планшет (7500 клеток на лунку) и оставляли в инкубаторе (5% CO₂, 37 °C) на 24 ч. В случае сфероидов (3D-модель *in vitro*) использовали планшет с заранее подготовленными сфероидными культурами. Затем среду удаляли, а к клеткам или сфероидам добавляли свежую питательную среду RPMI-1640 (10% FBS), содержащую образцы наночастиц в различных концентрациях (1, 10, 50, 100 и 500 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 и 48 ч. После инкубации клетки или сфероиды обрабатывали 0,05% раствором МТТ-реагента в RPMI-1640 (без FBS) и оставляли на 3 ч. Далее среду удаляли, заменяли на диметилсульфоксид (100 мкл на лунку) и измеряли адсорбцию с помощью Multiskan FC reader (Thermo Scientific, США) при длине волны 540 нм. Полуингибирующая концентрация (IC50) была определена как концентрация образца, приводящая к подавлению роста 50% клеток. Монослойная культура клеток и сфероиды, к которым не добавляли наночастицы, были использованы в качестве контроля (100% жизнеспособных клеток). Результаты МТТ-теста были обработаны с помощью программы GraphPad Prism (США).

Статистический анализ

Все данные были распределены нормально и выражены в виде среднего значения или среднее \pm стандартное отклонение. Статистический анализ результатов проточной цитофлуориметрии и флуориметрии проводился с использованием двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественных сравнений Сидака. Анализ результатов МТТ-теста проводили с помощью двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Все эксперименты проводились не менее чем с 3 повторениями. Собранные данные были обработаны с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, США) и признаны достоверно отличающимися при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение амфифильных полимеров и наноразмерных частиц на их основе

Мы получили несколько вариантов полимеров амфифильного строения на основе N-винилпирролидона с различной по составу гидрофильной частью. В первом варианте (Амф-ПВП) водорастворимый блок представлен полимером N-винилпирролидоном, а во втором варианте (Амф-ПВП-АК) — сополимером N-винилпирролидона с акриловой кислотой. Акриловая кислота позволяет вводить от 1 до 5% функциональных карбоксильных групп, что может быть использовано для дальнейшей модификации поверхности получаемых на основе таких полимеров наноразмерных носителей [15]. В данной работе карбоксильная группа акриловой кислоты использована для введения в структуру полимера малеимидных функциональных

групп для дальнейшей конъюгации целевого противоопухолевого агента в мягких условиях. Для этого гидрофильную часть, состоящую из сополимеров N-винилпирролидона и акриловой кислоты, модифицировали 1-(2-аминоэтил)малеимидом в присутствии EDS/NHS в качестве интермедиата и проводили реакцию амидирования с получением полимера Амф-ПВП-АК-Мал (рис. 1).

Гидрофобный участок в обоих вариантах полимеров представлен n-октадецильным фрагментом. Полимеры Амф-ПВП, Амф-ПВП-АК и Амф-ПВП-АК-Мал были получены радикальной полимеризацией в присутствии инициатора и регулятора роста цепи, что позволило контролировать молекулярную массу получаемых полимеров, которая в данной работе для обоих вариантов полимеров составила 3 кДа. Строение и состав полимеров был определен и подтвержден рядом физико-химических методов анализа (ИК- и ЯМР-спектроскопия, функциональный анализ, элементный анализ, паровая

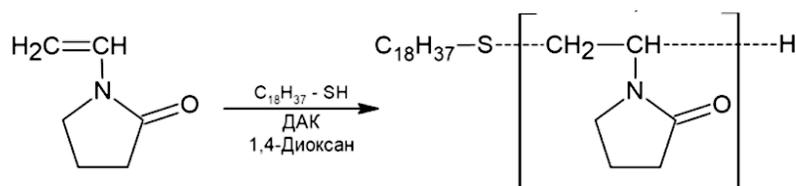


Схема радикальной полимеризации N-винилпирролидона в присутствии передатчика цепи N-октадецил меркаптана

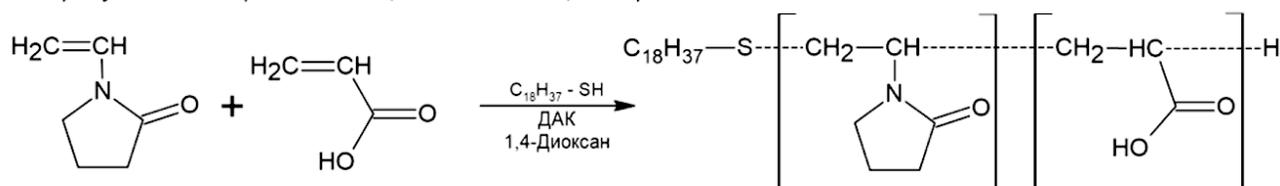


Схема радикальной полимеризации N-винилпирролидона и акриловой кислоты в присутствии N-октадецил меркаптана

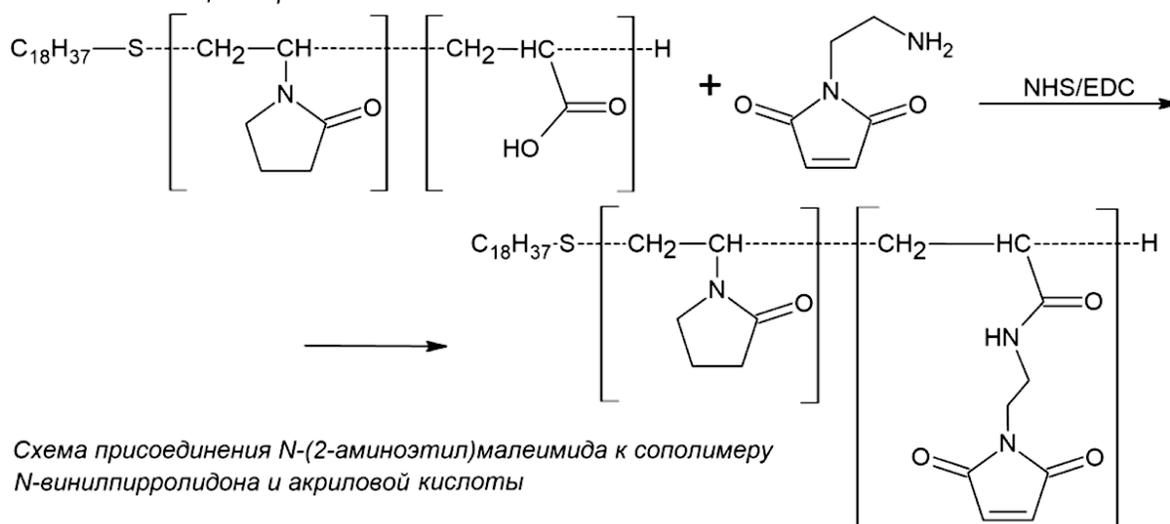


Схема присоединения N-(2-аминоэтил)малеимида к сополимеру N-винилпирролидона и акриловой кислоты

Рис. 1. Синтез амфифильных производных поли-N-винилпирролидона для последующего получения модифицированных полимерных наночастиц с куркумином.

Fig. 1. Synthesis of amphiphilic derivatives of poly-N-vinylpyrrolidone for subsequent production of modified polymeric nanoparticles with curcumin.

осмометрия), что отражено в наших предыдущих работах [15, 16].

Наличие как гидрофильного, так и гидрофобного фрагментов в структуре синтезированных полимеров способствует их самосборке в водных средах при концентрациях выше определённой критической концентрации агрегации с образованием наноразмерных ассоциатов по типу «гидрофобное ядро — гидрофильная оболочка». В ядро таких частиц был загружен куркумин, как плохорастворимая в воде активная субстанция, посредством гидрофобных взаимодействий с *n*-алкильными фрагментами полимеров, методом получения эмульсий с последующей отгонкой растворителя. В результате получили 2 типа наноразмерных агрегатов (Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур). Характеристики полученных частиц представлены в табл. 1.

Эффективность инкапсулирования куркумина в образцах составила 93–95%. Профиль высвобождения куркумина из наночастиц исследован на протяжении 24 ч с временными промежутками 0,5, 1, 2, 6, 12, 16 и 24 ч (рис. 2).

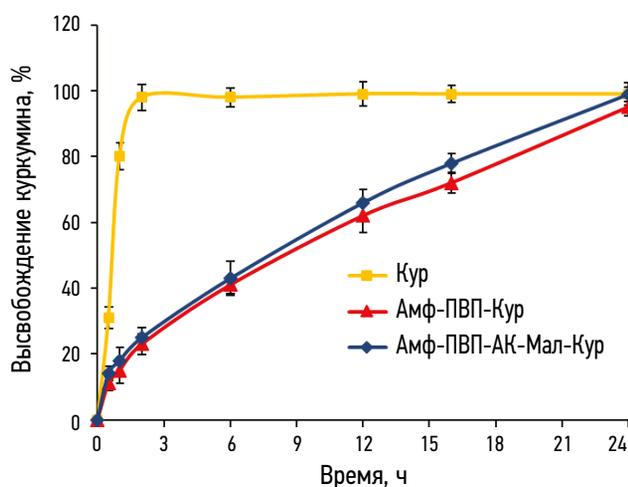


Рис. 2. Профили высвобождения куркумина из наночастиц Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур в модели *in vitro*. Контроль — свободный куркумин (Кур).

Fig. 2. *In vitro* release profiles of curcumin from the Amph-PVP-Cur and Amph-PVP-AK-Mal-Cur nanoparticles. Free curcumin was used as a control.

Таблица 1. Характеристики полимерных наноразмерных частиц

Table 1. Characteristics of polymer nanoparticles

Тип частиц	Средний размер, нм	Индекс полидисперсности	ζ-потенциал, мВ
Амф-ПВП-Кур	204	0,269	-18±-2
Амф-ПВП-АК-Мал-Кур	352	0,358	-15±-1,5

Примечание. Амф-ПВП-Кур — наночастицы из амфифильных производных поли-N-винилпирролидона, загруженные куркумином; Амф-ПВП-АК-Мал-Кур — наночастицы из амфифильных производных сополимеров поли-N-винилпирролидона с акриловой кислотой, модифицированные малеимидом и загруженные куркумином.

Note. Амф-ПВП-Кур — nanoparticles from amphiphilic derivatives of poly-N-vinylpyrrolidone loaded with curcumin; Амф-ПВП-АК-Мал-Кур — nanoparticles from amphiphilic derivatives of poly-N-vinylpyrrolidone copolymers with acrylic acid modified with maleimide and loaded with curcumin.

Для наночастиц Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур наблюдался двухфазный профиль высвобождения куркумина. В течение первых 30 мин высвобождалось 11 и 14% куркумина из наночастиц Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур соответственно, после чего следовало пролонгированное высвобождение в течение 24 ч. Полное высвобождение куркумина (100%) происходило за 24 ч. Для сравнения, более 30% куркумина из контрольного образца высвободилось в течение 30 мин, а полное высвобождение было достигнуто через 3 ч.

Исследование накопления полимерных наночастиц в опухолевых клетках *in vitro*

Эффективность накопления полимерных наноразмерных частиц, загруженных куркумином, а именно образцов Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур, исследована с помощью проточной цитометрии и флуориметрии (рис. 3).

Показано, что в случае монослойной культуры клеток OVCAR-3 (2D-модель *in vitro*) поглощение обоих образцов наночастиц происходило уже после 5 мин инкубации и составляло 7 и 10% для образцов Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур соответственно. При более длительной инкубации уровни накопления обоих образцов существенно возрастали и составляли уже 36 и 29% после 30 мин, а после 60 мин инкубации — 75 и 78% соответственно.

При этом в случае сфероидов (3D-модель *in vitro*) существенной разницы в накоплении образцов не наблюдали, но эффективность накопления существенно снижалась. Так, после 1 ч инкубации уровни накопления Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур составляли 29 и 34%, после 3 ч — 33 и 32%, а после 7 ч — 59 и 70% соответственно.

Исследование цитотоксической активности полимерных наночастиц, загруженных куркумином

Цитотоксичность полимерных наночастиц Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур, загруженных куркумином, исследована на клеточной линии аденокарциномы яичника OVCAR-3 с использованием 2D- и 3D-моделей *in vitro* с помощью МТТ-теста (табл. 2, рис. 4). Пустые полимерные наночастицы (без куркумина), а именно образцы Амф-ПВП, Амф-ПВП-АК и Амф-ПВП-АК-Мал, использованы в качестве контролей.

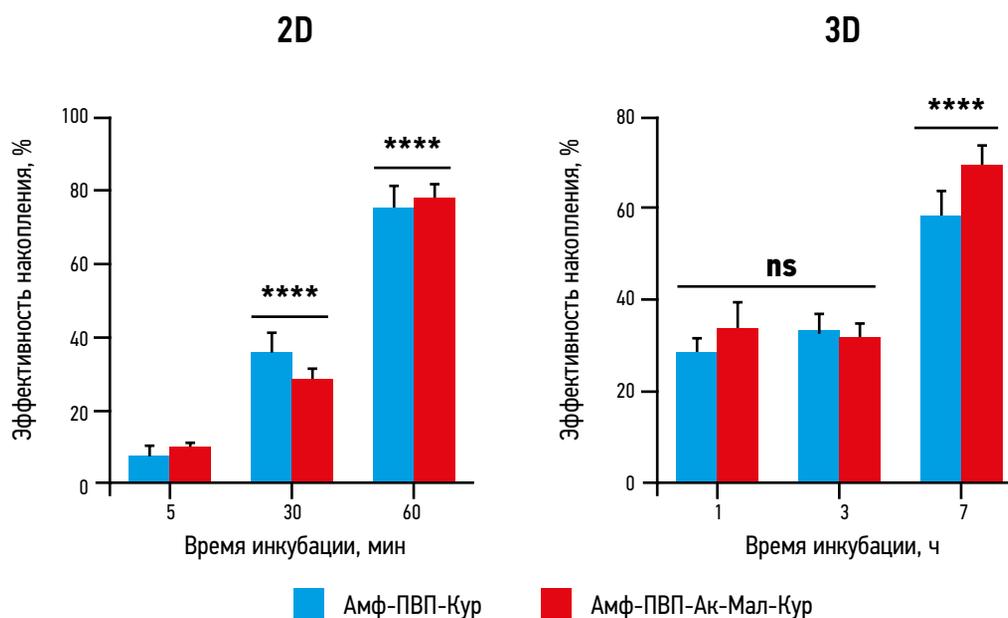


Рис. 3. Эффективность накопления полимерных наночастиц, загруженных куркумином, в клетках монослойной культуры (2D-модель *in vitro*) и сфероидах (3D-модель *in vitro*) из клеток линии OVCAR-3 (аденокарцинома яичника человека). Проточная цитометрия (2D-модель *in vitro*) и флуориметрия (3D-модель *in vitro*). **** $p < 0,001$.

Fig. 3. Accumulation efficiency of the polymeric nanoparticles loaded with curcumin in monolayer culture (2D *in vitro* model) and tumor spheroids (3D *in vitro* model) from human ovarian adenocarcinoma OVCAR-3 cells Flow cytometry (2D *in vitro* model) and fluorimetry (3D *in vitro* model). **** $p < 0.001$.

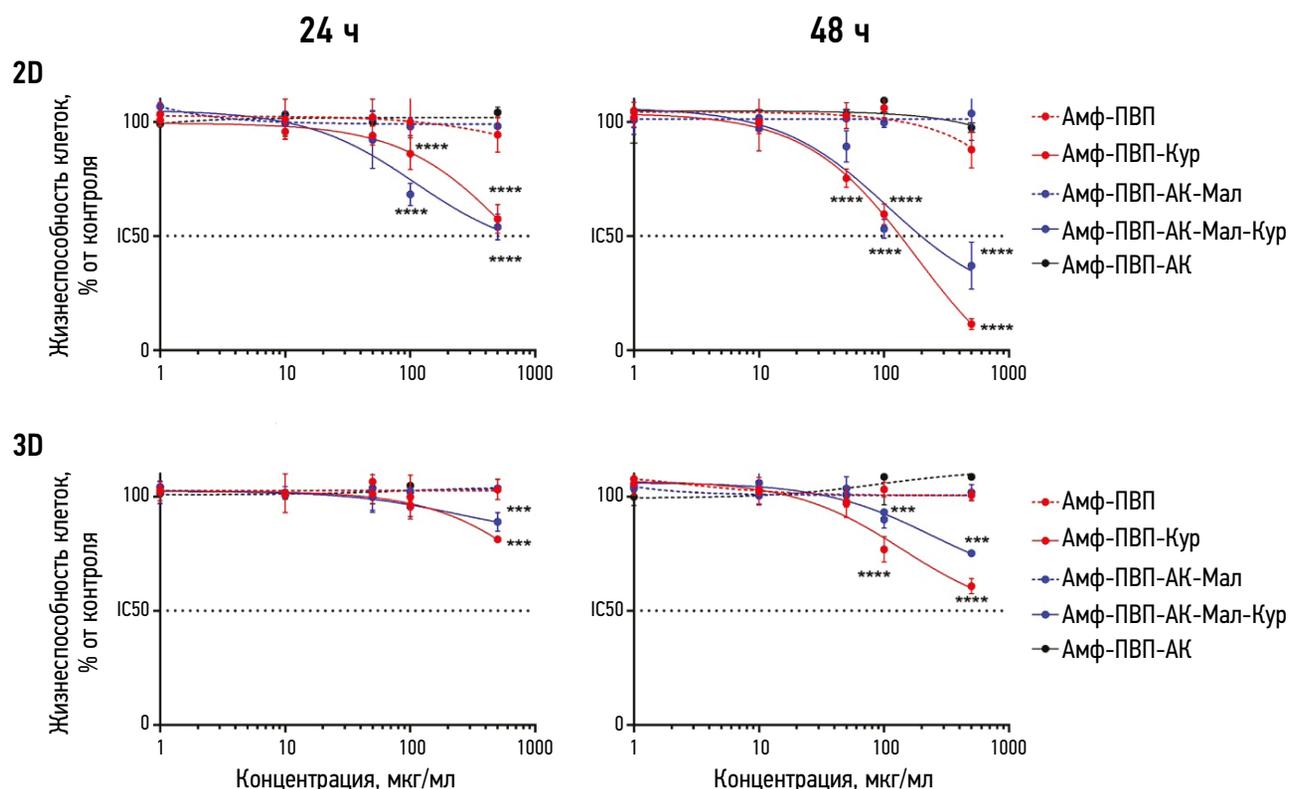


Рис. 4. Цитотоксичность полимерных наночастиц в монослойной культуре (2D-модель *in vitro*) и в опухолевых сфероидах (3D-модель *in vitro*) из клеток аденокарциномы яичника человека OVCAR-3 после инкубации в течение 24 и 48 ч. МТТ-тест.

Fig. 4. Cytotoxicity of the polymeric nanoparticles in monolayer culture (2D *in vitro* model) and in tumor spheroids (3D *in vitro* model) from human ovarian adenocarcinoma OVCAR-3 cells after incubation for 24 and 48 h. MTT-test.

Таблица 2. Цитотоксичность полимерных наночастиц в монослойной культуре (2D-модель *in vitro*) и опухолевых сфероидов (3D-модель *in vitro*) из клеток аденокарциномы яичника человека OVCAR-3. МТТ-тест

Table 2. Cytotoxicity of polymeric nanoparticles in monolayer culture (2D *in vitro* model) and tumor spheroids (3D *in vitro* model) from human ovarian adenocarcinoma OVCAR-3 cells. MTT test

Образец	IC50*, мкг/мл			
	2D-модель <i>in vitro</i>		3D-модель <i>in vitro</i>	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Амф-ПВП-Кур	> 500	211±13	> 500	
Амф-ПВП-АК-Мал-Кур		137±9		

Примечание. *IC50 — полуингибирующая концентрация. Амф-ПВП — наночастицы из амфифильных производных поли-N-винилпирролидона; Амф-ПВП-АК — наночастицы из сополимеров амфифильных производных поли-N-винилпирролидона с акриловой кислотой; Амф-ПВП-АК-Мал — указанные наночастицы, модифицированные малеимидом; Амф-ПВП-Кур — наночастицы Амф-ПВП, загруженные куркумином; Амф-ПВП-АК-Мал-Кур — наночастицы Амф-ПВП-АК-Мал, загруженные куркумином.

Note. * IC50 is a semi-inhibitory concentration. Амф-ПВП — nanoparticles from amphiphilic derivatives of poly-N-vinylpyrrolidone; Амф-ПВП-АК — nanoparticles from copolymers of amphiphilic derivatives of poly-N-vinylpyrrolidone with acrylic acid; Амф-ПВП-АК-Мал — specified nanoparticles modified with maleimide; Амф-ПВП-Кур — nanoparticles from amphiphilic derivatives of poly-N-vinylpyrrolidone loaded with curcumin; Амф-ПВП-АК-Мал-Кур — nanoparticles from amphiphilic derivatives of poly-N-vinylpyrrolidone copolymers with acrylic acid modified with maleimide and loaded with curcumin.

В случае монослойной культуры клеток контрольные образцы (без куркумина) оставались нетоксичными даже при его максимальной концентрации после 48 ч инкубации (IC50>500 мкг/мл). При этом образцы, загруженные куркумином, начинали оказывать цитотоксическое воздействие после 48 ч инкубации: IC50 составили 211±13 мкг/мл и 137±9 мкг/мл для образцов Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур соответственно. При этом в опухолевых сфероидах наблюдали аналогичную тенденцию: цитотоксичность образцов Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур возрастала после 48 ч (о чём свидетельствует характер соответствующих кривых), но не достигла полуингибирующей концентрации (IC50>500 мкг/мл).

ОБСУЖДЕНИЕ

Резюме основного результата исследования

В результате исследования получены новые данные о действии наночастиц на основе амфифильных производных ПВП и его сополимеров с акриловой кислотой на опухолевые клетки линии OVCAR-3. Показано, что ни исходные полимерные наночастицы (Амф-ПВП), ни наночастицы на основе сополимера ПВП с акриловой кислотой (Амф-ПВП-АК), ни эти же наночастицы, но модифицированные малеимидом (Амф-ПВП-АК-Мал) не проявляли цитотоксичности. Однако после загрузки куркумином наночастицы Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур демонстрировали ярко выраженный цитотоксический эффект (действие в 2D-модели) и проявляли более слабое, но вполне очевидное цитотоксическое действие на сфероидах (3D-модель), полученных из клеток аденокарциномы яичника человека OVCAR-3.

Обсуждение основного результата

Мы разработали новые *наночастицы* на основе амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона с акриловой кислотой (Амф-ПВП, Амф-ПВП-АК), которые были загружены липофильным противоопухолевым препаратом куркумином. Полученные наночастицы-носители охарактеризованы с точки зрения их физико-химических свойств (средний размер, ζ-потенциал), а также эффективности их накопления в опухолевых клетках OVCAR-3. Кроме того, была изучена их цитотоксичность в 2D- (монослойная культура) и 3D-моделях (опухолевые сфероиды) *in vitro* аденокарциномы яичника человека OVCAR-3.

Как известно, в последнее время мультиклеточные опухолевые сфероиды рассматриваются в качестве более релевантной модели *in vitro*, чем монослойная культура клеток. Благодаря своей трёхмерной структуре опухолевые сфероиды могут имитировать гетерогенность и микроокружение малых солидных (от англ. solid) опухолей *in vivo*, включая специфическую экспрессию генов, межклеточные взаимодействия, а также контакты клеток с внеклеточным матриксом, кинетику роста, скорость метаболизма и устойчивость к химиотерапии [17].

В нашей работе мы показали, что интернализация (поглощение) клетками наночастиц с модифицированной и немодифицированной дополнительными малеимидными группами поверхностью, содержащих в своём гидрофобном ядре куркумин (образцы Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур), происходила с приблизительно одинаковой эффективностью. Таким образом, использование наночастиц из производных сополимера ПВП с акриловой кислотой, модифицированных малеимидными группами, не оказывало существенного влияния на проникновение наночастиц в клетки. При этом в случае опухолевых сфероидов накопление происходило значительно медленнее, чем в монослойной культуре, что можно

объяснить более сложным и длительным проникновением наночастиц внутрь объёмной многослойной конструкции сфероидов. Полученные нами результаты подчёркивают необходимость исследования наночастиц с использованием не только всеми применяемых сегодня 2D-монослойных культур, но и 3D-моделей *in vitro*, позволяющих более точно имитировать условия солидной опухоли *in vivo* по сравнению с классическими 2D-моделями. Отметим также, что тестирование на 3D-моделях *in vitro* имеет ещё и важную гуманитарную составляющую, поскольку позволяет сократить количество животных в последующих доклинических испытаниях.

При изучении цитотоксичности образцов методом МТТ-теста было обнаружено, что наночастицы на основе Амф-ПВП, загруженные куркумином, подавляли метаболическую активность клеток монослойной культуры аденокарциномы яичника человека после 48 ч инкубации. Стоит отметить, что в случае сфероидов образцы Амф-ПВП-Кур и Амф-ПВП-АК-Мал-Кур также продемонстрировали умеренный цитотоксический эффект после 48 ч инкубации, но не достигли полуингибирующей концентрации. Этот результат можно объяснить более длительным временем, необходимым как для накопления наночастиц в клетках мультиклеточных сфероидов, так и для последующего высвобождения куркумина из наночастиц в сфероиде. Таким образом, как мы и ожидали, клетки в сфероиде были более резистентны к действию противоопухолевого препарата, чем в монослойной культуре. Этот результат хорошо коррелирует с ранее опубликованными результатами с другими клетками и другими противоопухолевыми препаратами [9], а также другими наночастицами, в частности полимерными наноконтейнерами, загруженными тимохиноном [18] или полиэлектролитными капсулами с доксорубицином [19].

При этом пустые полимерные наночастицы (без куркумина), использованные в качестве контроля, не проявляли цитотоксичности как в 2D-, так и в 3D-модели *in vitro* даже после 48 ч инкубации при всех исследованных концентрациях, что свидетельствует об отсутствии у них токсичности.

Ограничения исследования

К ограничениям исследования следует отнести недостаточный временной диапазон, в котором изучали действие наночастиц на опухолевые клетки. Однако из полученных результатов очевидно, что при увеличении времени инкубации до 72 ч и более цитотоксическое действие наночастиц, загруженных куркумином, было бы более выраженным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе получены наночастицы на основе амфифильных производных полимеров N-винилпирролидона и его сополимера с акриловой кислотой, в том числе

наночастицы с поверхностью, модифицированной функциональными малеимидными группами. Такая модификация наночастиц необходима для их дальнейшей конъюгации с целевыми опухоле-специфичными молекулами в рамках разработки комбинированных целевых наносистем с противоопухолевыми свойствами. Ни одна из модификаций полученных нами наночастиц не проявила цитотоксичности по отношению к клеткам аденокарциномы яичника человека. Это позволяет констатировать, что пустые наночастицы, не загруженные куркумином, не токсичны, а следовательно, они могут рассматриваться в качестве основы для разработки новых эффективных систем доставки противоопухолевых препаратов, в том числе для целевой терапии после введения в них соответствующих специфических лигандов. С использованием клеточной линии аденокарциномы яичника человека OVCAR-3 было также показано, что после загрузки куркумином наночастицы демонстрировали выраженный цитотоксический эффект на 2D *in vitro* модели и умеренный цитотоксический эффект на 3D *in vitro* модели. Таким образом, разработанные наночастицы имеют хороший потенциал, и в будущем на их основе могут быть получены новые эффективные целевые наносистемы для доставки противоопухолевых лекарств с высокой биодоступностью.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-15-00468, <https://rscf.ru/project/23-15-00468/>.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Вклад авторов распределён следующим образом: А.М. Гилева — разработка дизайна исследования, выполнение экспериментальной части работы, анализ полученных данных, написание текста статьи; Д.И. Куликова — выполнение экспериментальной части работы, написание текста статьи; А.В. Яголович — разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, статистический анализ, написание текста статьи; Е.В. Куковьякина, К.С. Кушнерёв — выполнение экспериментальной части работы; Е.А. Марквичева — разработка дизайна исследования, научное редактирование статьи; А.Н. Кусков — разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, научное редактирование статьи, руководство проектом.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The work was supported by the Russian Science Foundation grant #23-15-00468, <https://rscf.ru/project/23-15-00468/>

Competing interests. The authors declare no conflicts of interest related to the publication of this article.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship complies with the international ICMJE criteria (all authors made a significant contribution to the development of the concept, conducting the study and preparing the article, read and approved the final version before publication). The authors' contribution is distributed as follows: A.M. Gileva — study design, experimental part of the work, analysis of the obtained data, writing the text of the article;

D.I. Kulikova — experimental part of the work, writing the text of the article; A.V. Yagolovich — study design, analysis of the obtained data, statistical analysis, writing the text of the article; E.V. Kukovyakina, K.S. Kushnerev — experimental part of the work; E.A. Markvicheva — study design, scientific editing of the article; A.N. Kuskov — study design, analysis of the obtained data, scientific editing of the article, project management.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alqosaibi A. Nanocarriers for anticancer drugs: Challenges and perspectives. *Saudi J Biol Sci.* 2022. Vol. 29, N 6. P. 103298. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103298
2. Beach M., Nayanathara U., Gao Y., et al. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Chem Rev.* 2024. Vol. 124, N 9. P. 5505–5616. doi: 10.1021/acs.chemrev.3c00705
3. Hwang D., Ramsey J., Kabanov AV. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020. Vol. 156. P. 80–118. doi: 10.1016/j.addr.2020.09.009
4. Torchilin V. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm Res.* 2006. Vol. 24, N 1. P. 1–16. doi: 10.1007/s11095-006-9132-0
5. Hassankhani Rad A., Asiaee F., Jafari S., et al. Poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone)-based micelles for solubilization and tumor-targeted delivery of silibinin. *Bioimpacts.* 2019. Vol. 10, N 2. P. 87–95. doi: 10.34172/bi.2020.11
6. Luo Y., Hong Y., Shen L., et al. Multifunctional Role of Polyvinylpyrrolidone in Pharmaceutical Formulations. *AAPS PharmSciTech.* 2021. Vol. 22, N 1. P. 34. doi: 10.1208/s12249-020-01909-4
7. Tsatsakis A., Stratidakis A., Goryachaya A.V., et al. In vitro blood compatibility and in vitro cytotoxicity of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles. *Food Chem Toxicol.* 2019. Vol. 127. P. 42–52. doi: 10.1016/j.fct.2019.02.041
8. Berdiaki A., Perisyaki E., Stratidakis A., et al. Assessment of Amphiphilic Poly-N-vinylpyrrolidone Nanoparticles' Biocompatibility with Endothelial Cells in Vitro and Delivery of an Anti-Inflammatory Drug. *Mol Pharm.* 2020. Vol. 17, N 11. P. 4212–4225. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00667
9. Yagolovich A., Kuskov A.N., Kulikov P.N., et al. Assessment of the effects of amphiphilic poly (N-vinylpyrrolidone) nanoparticles loaded with bortezomib on glioblastoma cell lines and zebrafish embryos. *Biomed Rep.* 2024. Vol. 20, N 3. P. 37. doi: 10.3892/br.2024.1725
10. Kostyuk V.A. Biological activity of curcumin and perspectives for its pharmacological use. *J GrSMU.* 2022. Vol. 20, N 2. P. 144–151. doi: 10.25298/2221-8785-2022-20-2-144-151
11. Mohamadian M., Bahrami A., Moradi Binabaj M., et al. Molecular Targets of Curcumin and Its Therapeutic Potential for Ovarian Cancer. *Nutr Cancer.* 2022. Vol. 74, N 8. P. 2713–2730. doi: 10.1080/01635581.2022.2049321
12. Liu X., Qi M., Li X., et al. Curcumin: a natural organic component that plays a multi-faceted role in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2023. Vol. 16, N 1. P. 47. doi: 10.1186/s13048-023-01120-6
13. Górnicka J., Mika M., Wróblewska O., et al. Methods to Improve the Solubility of Curcumin from Turmeric. *Life (Basel).* 2023. Vol. 13, N 1. P. 207. doi: 10.3390/life13010207
14. Akasov R., Zaytseva-Zotova D., Burov S., et al. Formation of multicellular tumor spheroids induced by cyclic RGD-peptides and use for anticancer drug testing in vitro. *Int J Pharm.* 2016. Vol. 506, N 1–2. P. 148–157. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.005
15. Tawfik M., Hadlak S., Götze C., et al. Live In-Vivo Neuroimaging Reveals the Transport of Lipophilic Cargo Through the Blood-Retina Barrier with Modified Amphiphilic Poly-N-Vinylpyrrolidone Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol.* 2021. Vol. 17, N 5. P. 846–858. doi: 10.1166/jbn.2021.3073
16. Kulikov P.P., Kuskov A.N., Goryachaya A.V., et al. Amphiphilic poly-n-vinyl-2-pyrrolidone: Synthesis, properties, nanoparticles. *Polym Sci Ser D.* 2017. Vol. 10, N 3. P. 263–268. doi: 10.1134/S199542121703008X
17. Han S., Kwon S., Kim K. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell Int.* 2021. Vol. 21, N 1. P. 152. doi: 10.1186/s12935-021-01853-8
18. Borodina T., Gileva A., Akasov R., et al. Fabrication and evaluation of nanocontainers for lipophilic anticancer drug delivery in 3D in vitro model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021. Vol. 109, N 4. P. 527–537. doi: 10.1002/jbm.b.34721
19. Gileva A., Trushina D., Yagolovich A., et al. Doxorubicin-Loaded Polyelectrolyte Multilayer Capsules Modified with Antitumor DR5-Specific TRAIL Variant for Targeted Drug Delivery to Tumor Cells. *Nanomaterials (Basel).* 2023. Vol. 13, N 5. P. 902. doi: 10.3390/nano13050902

REFERENCES

1. Alqosaibi AI. Nanocarriers for anticancer drugs: Challenges and perspectives. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29(6):103298. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103298
2. Beach MA, Nayanathara U, Gao Y, et al. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Chem Rev.* 2024;124(9):5505–5616. doi: 10.1021/acs.chemrev.3c00705
3. Hwang D, Ramsey JD, Kabanov AV. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;156:80–118. doi: 10.1016/j.addr.2020.09.009
4. Torchilin VP. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm Res.* 2006;24(1):1–16. doi: 10.1007/s11095-006-9132-0
5. Hassankhani Rad A, Asiaee F, Jafari S, et al. Poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone)-based micelles for solubilization and tumor-targeted delivery of silibinin. *Bioimpacts.* 2019;10(2):87–95. doi: 10.34172/bi.2020.11
6. Luo Y, Hong Y, Shen L, et al. Multifunctional Role of Polyvinylpyrrolidone in Pharmaceutical Formulations. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2021;22(1):34. doi: 10.1208/s12249-020-01909-4
7. Tsatsakis A, Stratidakis AK, Goryachaya AV, et al. In vitro blood compatibility and in vitro cytotoxicity of amphiphilic

poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles. *Food Chem Toxicol.* 2019;127: 42–52. doi: 10.1016/j.fct.2019.02.041

8. Berdiaki A, Perisyaki E, Stratidakis A, et al. Assessment of Amphiphilic Poly- N -vinylpyrrolidone Nanoparticles' Biocompatibility with Endothelial Cells *in Vitro* and Delivery of an Anti-Inflammatory Drug. *Mol Pharm.* 2020;17(11):4212–4225. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00667

9. Yagolovich A, Kuskov A, Kulikov P, et al. Assessment of the effects of amphiphilic poly (N-vinylpyrrolidone) nanoparticles loaded with bortezomib on glioblastoma cell lines and zebrafish embryos. *Biomed Rep.* 2024;20(3):37. doi: 10.3892/br.2024.1725

10. Kostyuk VA. Biological activity of curcumin and perspectives for its pharmacological use. *J GrSMU.* 2022;20(2):144–151. doi: 10.25298/2221-8785-2022-20-2-144–151

11. Mohamadian M, Bahrami A, Moradi Binabaj M, et al. Molecular Targets of Curcumin and Its Therapeutic Potential for Ovarian Cancer. *Nutrition and Cancer.* 2022;74(8):2713–2730. doi: 10.1080/01635581.2022.2049321

12. Liu X, Qi M, Li X, et al. Curcumin: a natural organic component that plays a multi-faceted role in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2023;16(1):47. doi: 10.1186/s13048-023-01120-6

13. Górnicka J, Mika M, Wróblewska O, et al. Methods to Improve the Solubility of Curcumin from Turmeric. *Life.* 2023;13(1):207. doi: 10.3390/life13010207

14. Akasov R, Zaytseva-Zotova D, Burov S, et al. Formation of multicellular tumor spheroids induced by cyclic RGD-peptides and use for anticancer drug testing *in vitro*. *Int J Pharm.* 2016;506(1-2): 148–157. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.005

15. Tawfik M, Hadlak S, Götze C, et al. Live *In-Vivo* Neuroimaging Reveals the Transport of Lipophilic Cargo Through the Blood-Retina Barrier with Modified Amphiphilic Poly-N-Vinylpyrrolidone Nanoparticles. *J biomed nanotechnol.* 2021;17(5):846–858. doi: 10.1166/jbn.2021.3073

16. Kulikov PP, Kuskov AN, Goryachaya AV, et al. Amphiphilic poly-n-vinyl-2-pyrrolidone: Synthesis, properties, nanoparticles. *Polym Sci Ser D.* 2017;10(3):263–268. doi: 10.1134/S199542121703008X

17. Han S, Kwon S, Kim K. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):152. doi: 10.1186/s12935-021-01853-8

18. Borodina T, Gileva A, Akasov R, et al. Fabrication and evaluation of nanocontainers for lipophilic anticancer drug delivery in 3D *in vitro* model. *J Biomed Mater Res.* 2021;109(4):527–537. doi: 10.1002/jbm.b.34721

19. Gileva A, Trushina D, Yagolovich A, et al. Doxorubicin-Loaded Polyelectrolyte Multilayer Capsules Modified with Antitumor DR5-Specific TRAIL Variant for Targeted Drug Delivery to Tumor Cells. *Nanomaterials.* 2023;13(5):902. doi: 10.3390/nano13050902

ОБ АВТОРАХ

* **Гилева Анастасия Михайловна**, мл. науч. сотр.;
адрес: Россия, 117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;
ORCID: 0000-0001-8220-0580;
eLibrary SPIN: 3401-5241;
e-mail: sumina.anastasia@mail.ru

Куликова Дарья Игоревна;
e-mail: dkulikovaaa@mail.ru

Куквякина Екатерина Владимировна;
ORCID: 0009-0008-2918-185X;
eLibrary SPIN: 9172-4087;
e-mail: kev0700@yandex.ru

Яголович Анна Валерьевна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-3145-3726;
eLibrary SPIN: 2076-1814;
e-mail: anne-gor2002@yandex.ru

Кушнерев Кирилл Сергеевич;
ORCID: 0000-0003-2866-9796;
eLibrary SPIN: 4968-0941;
e-mail: firstavenue@mail.ru

Кусков Андрей Николаевич, д-р хим. наук, профессор;
ORCID: 0000-0001-8140-2754;
eLibrary SPIN: 6115-8494;
e-mail: kuskov.a.n@muctr.ru;

Марквичева Елена Арнольдовна, д-р хим. наук;
ORCID: 0000-0001-6652-3267;
e-mail: lemark@ibch.ru

AUTHORS' INFO

* **Anastasia M. Gileva**, Junior Researcher;
address: 16/10 Mikluho-Maklaya street, 117871 Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0001-8220-0580;
eLibrary SPIN: 3401-5241;
e-mail: sumina.anastasia@mail.ru

Daria I. Kulikova;
e-mail: dkulikovaaa@mail.ru

Ekaterina V. Kukovyakina;
ORCID: 0009-0008-2918-185X;
eLibrary SPIN: 9172-4087;
e-mail: kev0700@yandex.ru

Anna V. Yagolovich, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-3145-3726;
eLibrary SPIN: 2076-1814;
e-mail: anne-gor2002@yandex.ru

Kirill S. Kushnerev;
ORCID: 0000-0003-2866-9796;
eLibrary SPIN: 4968-0941;
e-mail: firstavenue@mail.ru

Andrey N. Kuskov, Dr. Sci. (Chemistry), Professor;
ORCID: 0000-0001-8140-2754;
eLibrary SPIN: 6115-8494;
e-mail: kuskov.a.n@muctr.ru

Elena A. Markvicheva, Dr. Sci. (Chemistry);
ORCID: 0000-0001-6652-3267;
e-mail: lemark@ibch.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author