

НАНОЧАСТИЦЫ РАЗНОГО СОСТАВА КАК ВЕКТОРЫ ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

*Г.Д. Телегеев, М.В. Дыбков,
П.Г. Телегеева, Д.С. Ефременко,
С.С. Малюта, Н.В. Куцевол,
С.А. Филипченко, Е.Ф. Воронин,
Л.В. Носач, Д.Ф. Глузман, М.П. Завелевич*

Доставка лекарственных препаратов в определенные клетки и ткани организма — одна из актуальных задач современной фармакотерапии. В последнее время наблюдается значительный интерес к разработке подходов, направленных на доставку лекарств непосредственно в клетки пораженных органов и тканей, не затрагивая при этом интактные клетки. Использование нанокompозитов различного состава (нетоксичных и биodeградируемых) для контролируемой целевой доставки лекарственных средств сокращает время действия препарата на нецелевые клетки, повышает эффективность лечения, снижает побочные эффекты. Ключевым моментом при этом является способ проникновения носителя в клетку. Ниже предложен оригинальный подход с использованием физиологических клеточных механизмов: фагоцитоза, присущего специализированным клеткам (нейтрофилам, моноцитам, макрофагам) и клатрин-зависимого эндоцитоза. В качестве носителей синтезированы и исследованы нанокompозиты на основе высокодисперсного кремнезема, магнитно-люминесцентные нанокompозиты на основе CoFe_2O_4 , нанокompозиты на основе разветвленного сополимера декстран-полиакриламида. Исследованы свойства наночастиц различного размера, нагруженных химиопрепаратами и рецепторными лигандами.

Синтез специфических нановекторов на основе наноразмерного кремнезема и их модификация

Для синтеза нановекторов применяли иммобилизацию высокомолекулярных соединений путем их адсорбции из жидкой фазы на поверхности наноразмерных частиц высокодисперсного кремнезема Асил-300. Для этого использовали ряд синтетических и природных полимеров из числа широко применяемых в медицинской практике: поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), поливиниловый спирт (ПВС) и желатин. Иммобилизацию полимеров проводили по протоколу [1]. Получено и охарактеризовано 6 векторов на основе высокодисперсного крем-

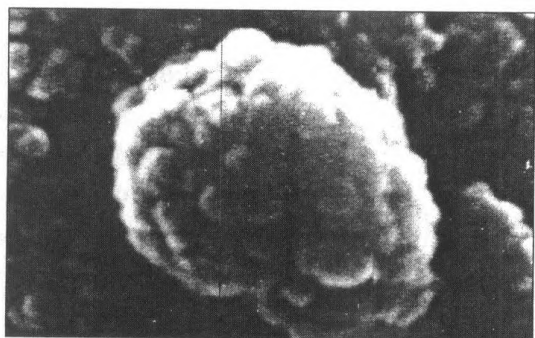


Рис. 1. Микрофотография высокодисперсного кремнезема (размер мира — 1 мкм)

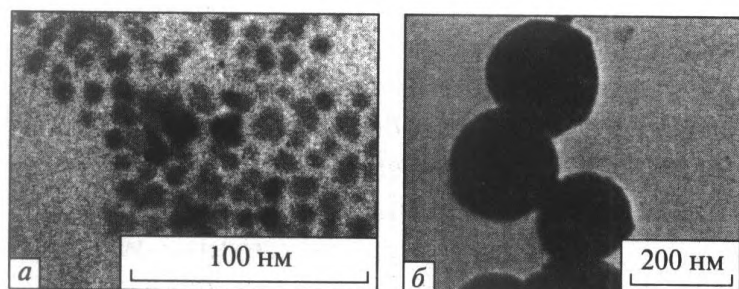


Рис. 2. Электронные микрофотографии магнитно-люминесцентных наночастиц: а — CoFe_2O_4 ; б — $\text{CoFe}_2\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}_2\text{O}_3$

незема (рис. 1) и полимеров в форме стабильных водных суспензий с содержанием твердой фазы 5 % мас.

Для определения эффективности проникновения наночастиц в клетку разработан жидкофазный способ иммобилизации флуоресцентного красителя изотиоцианата флуоресцеина (FITC) на поверхности нанокремнезема путем нековалентного связывания. Способ заключается в адсорбционной модификации нанокремнезема комплексами полимер-молекула FITC путем импрегнирования. Как полимеры были применены водорастворимый хитозан и полидекстран D70-g-РАА. Модификацию нанокремнезема проводили следующим образом. В раствор полимера добавляли FITC до заданной концентрации и выдерживали 24 ч для образования комплексов, а затем добавляли навеску нанокремнезема. Через 6 ч суспензию центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. Образец высушивали 24 ч при комнатной температуре и еще 3 ч при 50 °С. Этим методом на поверхность 1 г нанокремнезема наносили 100 мг полимера и 1,5 мг красителя.

Синтезированные образцы были охарактеризованы методами ИК- и УФ-спектроскопии и термогравиметрии. Показано, что адсорбированные на поверхности нанокремнезема комплексы удерживаются за счет образования многоцентровых водородных связей.

Синтез магнитно-люминесцентных наночастиц и их использование в экспериментах *in vitro*

Магнитно-люминесцентные нанокомпозиты являются перспективным материалом для целенаправленного транспорта лекарств. Использовали наночастицы состава CoFe_2O_4 и $\text{CoFe}_2\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}_2\text{O}_3$, размером 8 и 200 нм соответственно (рис. 2) [2].

Наночастицы CoFe_2O_4 были практически нетоксичными для клеток [3] в концентрации 0,099 мкг/мкл (на $1 \cdot 10^6$ клеток/см³). При концентрации 1,66 мкг/мкл содержание жизнеспособных клеток составляло $51 \pm 3,2$ %.

Наночастицы $\text{CoFe}_2\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{Cd}_2\text{O}_3\text{Eu}_2\text{O}_3$ были малотоксичны для клеток в концентрации 0,0196 мкг/мкл (на $1 \cdot 10^6$ клеток/см³), а в концентрации 0,14 мкг/мкл содержание жизнеспособных клеток составляло $75 \pm 2,3$ %.

Наночастицы эффективно проникают в перемываемые клетки мышиных макрофагов. По данным НТС-теста зафиксировано повышение уровня активных форм кислорода при концентрации 1,6 мкг/мкл CoFe_2O_4 , что коррелирует с повышенным уровнем гибели клеток. Можно предположить, что данные частицы индуцируют окислительный взрыв, приводящий к гибели клеток. Также, согласно нашим данным, ферромагнитные наночастицы способны адсорбировать атомы кислорода, что повышает окислительный фон (рис. 3).

Генотоксичность наночастиц определяли с помощью микроядерного теста. В контроле процент клеток с микроядрами составил около 9 %, а в пробе с максимальной концентрацией (1,66 мкг/мкл CoFe_2O_4) — около 10 %. Таким образом, исследованные наночастицы не проявляют значительной генотоксичности.

Для целевой доставки препаратов в опухолевые клетки, на которых экспрессируется рецептор

CD44, поверхность наночастиц модифицировали гиалуроновой кислотой [6]. Поглощение полученных наночастиц тестировали на различных культурах клеток: J774, Hep2G, HeLa, MG-63, HEK293, U937 [7]. Наличие наночастиц в клетках определяли окраской ферроцианидом калия. Наиболее эффективное поглощение наблюдалось в клетках Hep2G и MG-63, наименее эффективное — в U937 и HeLa (рис. 4).

Наночастицы CoFe_2O_4 также модифицировали лекарственным препаратом метотрексатом — антагонистом фолиевой кислоты, а затем покрывали гиалуроновой кислотой. Частицы инкубировали с клетками линии MG63 с последующим определением пролиферативной активности обработанных клеток. Свойства данных наночастиц позволяют (в дальнейшем) использовать их для генерации тепловой энергии при облучении магнитным полем, целевой доставки лекарств в опухолевые ткани.

Разветвленные полимеры декстран-полиакриламид как носители лекарственных противоопухолевых субстанций

Макромолекулы водорастворимых полимеров, благодаря их биосовместимости с клетками и живыми тканями и возможности их загрузки лекарственными формами, являются перспективными наноконтейнерами для доставки лекарственных препаратов к определенным участкам организма [8]. В настоящее время для создания векторов преимущественно используют наноконтейнеры из биосовместимых линейных полимеров. Теоретические и экспериментальные исследования молекулярной структуры разветвленных полимеров позволяют рассматривать их как наноструктурированные полимерные системы [9].

Разветвленные сополимеры синтезировали методом радикальной привитой полимеризации с использованием окислительно-восстановительной системы Ce(IV)/HNO_3 . Синтез и идентификация образцов с использованием методов ^1H ЯМР-спектроскопии и гель-проникающей хроматографии (SEC) детально описаны в [10, 11]. Разветвленные полиэлектролиты были по-

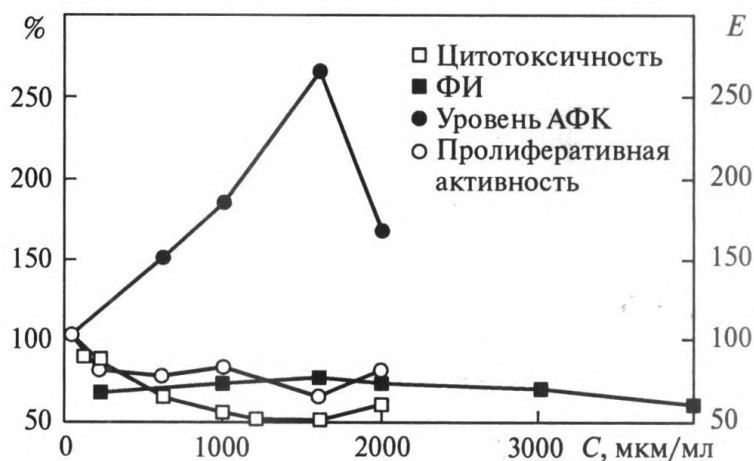


Рис. 3. Сопоставление уровня цитотоксичности, ФИ [4], уровня АФК [5] и пролиферативной активности (С — концентрация наночастиц; E — оптическая плотность (для НСТ теста) [6])



Рис. 4. Накопление наночастиц в клетках остеосаркомы (MG-63)

лучены щелочным гидролизом синтезированных сополимеров и линейного ПАА [12]. В дальнейшем образцы были обозначены как Д70-ПАА5ан. Содержание карбоксилатных групп в составе (А) макромолекулы модифицированного сополимера определяли потенциометрическим титрованием [12].

Оценивали влияние наноконтейнеров-полимеров без терапевтического препарата и нагруженного химиотерапевтическим цитотоксическим препаратом цисплатином на жизнеспособность клеток. В качестве модельного объекта использовали культуру мышинных макрофагов J774, клетки Т-клеточного лейкоза Jurkat, клетки острого миелоидного лейкоза U937.

Молекулярные параметры сополимера Д70-ПАА по данным SEC: $M_w = 2,15 \cdot 10^6$, $R_g = 85$ нм, $M_w/M_n = 1,72$, А = 43 %. Разветвленные поли-

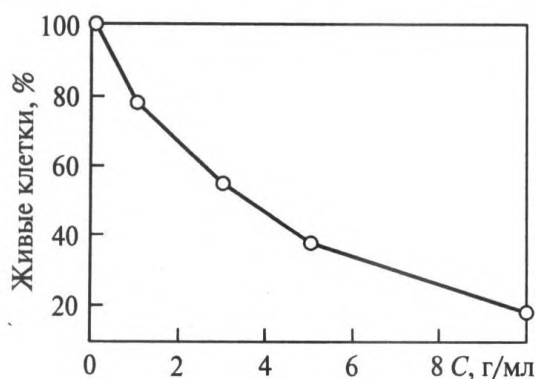


Рис. 5. Цитотоксичность наноконтейнеров с цисплатином для клеток J774

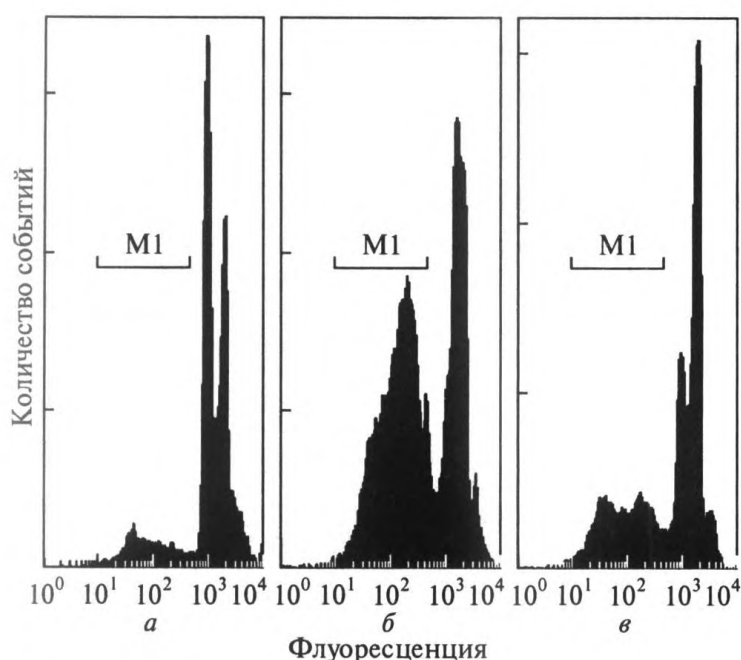


Рис. 6. Гистограммы распределения клеток U937 по содержанию ДНК при действии цисплатина в растворе и в сочетании с декстран-содержащими наночастицами: а — контроль; б — цисплатин в растворе 3 мкмоль/л; в — цисплатин в форме наночастиц 3 мкмоль/л

электролиты Д70-ПАА5ан характеризуются предельно развернутой конформацией привитых цепей в растворе.

Показано, что наноконтейнеры Д70-ПАА5 поглощались макрофагами и не были цитотоксичными. Фагоцитарный индекс составил 84 %, что позволило провести испытания с наноконтейнерами, нагруженными цитотоксичным химиопрепаратом цисплатином.

Кроме того, синтезированы комплексы сополимера Д70-ПАА5 и его анионного производного

с цисплатином. ИК спектры показали отсутствие взаимодействия негидролизованного сополимера с цисплатином, а на спектрах продукта взаимодействия цисплатина и Д70-ПАА5ан регистрировались изменения соотношений интенсивности полос поглощения карбамидных и карбоксильных групп в области 1500–1750 см^{-1} и полос поглощения в области 1250–1450 см^{-1} , что свидетельствует об образовании комплекса цисплатина с карбоксильными группами сополимера.

Дозозависимость цитотоксичности платиносодержащих комплексов для клеток J774 приведена на рис. 5.

Показано, что эффективность торможения клеточного роста в линиях Jurkat или U937 под действием препаратов платины в субтоксической концентрации 3 мкмоль/л одинакова, как для растворимой формы препарата, так и для цисплатина в форме наночастиц. Таким образом, платина в сочетании с декстран-содержащими наночастицами не теряет рост-тормозящего действия на эти клетки. Эффекты цисплатина на прохождение клеточного цикла также были одинаковыми для растворимой формы препарата и препарата в форме наночастиц (увеличение фракции клеток в фазах S и G₂/M). Но при этом уровень индукции апоптоза [13] препаратом в форме наночастиц несколько уступал таковому при действии эквимольной концентрации цисплатина в растворе (рис. 6). Таким образом, действие цисплатина в форме наночастиц на лейкозные клетки приводит к изменению соотношения между рост-тормозящей и проапоптотической эффективностью платины при эквимольном содержании действующего компонента.

В настоящее время ведутся исследования по использованию разветвленных полимеров декстран-полиакриламид как носителей для целевой доставки противоопухолевых препаратов в клетки миелоидных лейкозов М3–М5 на модели *ex vivo* не только для одного образца привитых сополимеров, а для всего спектра синтезированных образцов с разной молекулярной структурой.

Таким образом создана технология получения нановекторов на основе нанокремнезема, модифицированного функционизированными поли-

мерами, что позволяет расширить потенциальный круг используемых терапевтических агентов и возможных рецепторных лигандов.

Разработаны метод получения магнитно-люминесцентных нанокомпозитов типа "ядро@оболочка" на основе феррита кобальта и оксидов лантаноидов и протоколы их модификации рецепторными лигандами и противоопухолевыми препаратами. Показана эффективность действия наночастиц на культурах клеток. Свойства наночастиц позволяют использовать их для генерации тепловой энергии при облучении магнитным полем, целевой доставки лекарств в опухолевые ткани.

Разработаны теоретические и практические основы синтеза новых полифункциональных материалов разветвленной структуры на основе сополимеров декстран-полиакриламид. Нетоксичность сополимера, высокая терапевтическая емкость наноконтейнера, подтвержденная в экспериментах на культурах опухолевых клеток, свидетельствует о перспективности дальнейшей разработки композиции таких наночастиц с цитотоксическими химиопрепаратами и другими лекарственными веществами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние модифицирования высокодисперсного кремнезёма поливинилпирролидоном на адсорбцию желатина / А.П. Василенко [та ін.] // Хим.-фармацевт. журн. — 2010. — 44, № 2. — С. 33–36.
2. Влияние условий формирования на строение, морфологию и магнитные свойства наноразмерных ферритов $MIIFeIII_2O_4$ ($M = Mn, Co, Ni$) и Fe_2O_3 / Й.В. Василенко [и др.] // Теорет. и эксперим. химия. — 2007. — 43, № 5. — С. 323–329.
3. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability // Current Protocol Immunology. — 2001. — Appendix3: Appendix 3B. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
4. Pruzanski W., Saito S. Comparative study of phagocytosis and intracellular bactericidal activity of human monocytes and polymorphonuclear cells // Inflammation. — 1988. — 12, № 1. — P. 87–97.
5. Esfandiari N. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa // J. Andrology. — 2003. — 24. — P. 862–870.
6. Використання наночастинок $CoFe_2O_4$ для цільової доставки метотрексату в клітини остеосаркоми / Д.С. Єфременко [та ін.] // Доп. НАН України. — 2013. — № 6. — С. 157–161.
7. Labeling efficacy of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to human neural stem cells: comparison of ferumoxides, mono crystalline iron oxide, cross-linked iron oxide" (CLIO) - NH_2 and tat-CLIO/ M. Song [et al.] // Korean J. Radiology. — 2007. — 8, № 5. — P. 365–371.
8. Застосування наночастинок у біомедицині / Телегеева П.Г. [та ін.] // Biotechnologia. Acta. — 2013. — 6, № 2. — С. 21–32.
9. Иванчев С.С., Озерин А.Н. Наноструктуры в полимерных системах // Высокомолекулярные соединения. — 2006. — 48, № 3. — С. 1531–1544.
10. Solution properties of dextran-polyacrylamide graft copolymers / N. Kutsevol [et al.] // Polymer. — 2006. — 47. — P. 2061–2068.
11. Branched Polyelectrolytes Dextran-Graft-(Polyacrylamide-Co-Polyacrylic Acid) as Perspective Materials for Nanotechnology / N. Kutsevol [et al.] // Macromolec. Symposia. — 2012. — 317–318, Iss. 1. — P. 82–90.
12. Kutsevol N., Bezuglyi M., Bezugla T., Rawiso M. Star-like Dextran-graft-(polyacrylamide-co-polyacrylic acid) Copolymers / N. Kutsevol [et al.] // Ibid. — 2014. — 335. — P. 12–16.
13. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry / I. Nicoletti [et al.] // J. Immunolog. Methods. — 1991. — 139, № 2. — P. 271–279.