

## РН- И ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ НАНОГЕЛИ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ РНК И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛЕКАРСТВ

Коржиков-Влах В.А., Пилипенко Ю.М., Катернюк Ю. В., Тенникова Т.Б.

Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии

Университетский пр., 26, г. Санкт-Петербург, 199004, РФ; e-mail: v\_korzhiakov@mail.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2018.

**Аннотация.** Наногели представляют собой сшитые частицы на основе гидрофильных полимеров, обладающие наноразмерами. В данной работе формирование наногелей происходило путём ионной сборки в системах хитозан-гепарин и гепарин-поли(L-лизин). В полученные частицы были инкапсулированы модельные соединения – преднизолон и олиготимидин. рН-чувствительное высвобождение было обусловлено ионной природой макромолекул, а фоточувствительное высвобождение достигалось путём использования специального линкера. Также изучено проникновение данных частиц во внутриклеточное пространство.

**Ключевые слова:** наногели, рН- и фоточувствительное высвобождение, внутриклеточное проникновение.

Разработка систем направленной доставки лекарств на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров, представляет собой быстро развивающуюся область современной науки [1]. В качестве подобных систем, как правило, используют частицы различной химической природы и морфологии [2]. Использование частиц обусловлено их потенциальной способностью пролонгированно циркулировать в организме, а также пассивно или активно диффундировать в область пораженных тканей и клеток. Несомненно, требования к частицам для доставки того или иного лекарственного соединения обуславливаются конкретным типом применения. Среди общих требований к частицам для доставки лекарств следует выделить: биосовместимость, контролируемую кинетику высвобождения лекарства, способность выводиться из организма [3]. Развитие обсуждаемой научной области позволяет сформулировать новые задачи, которые должны быть решены при создании систем доставки лекарств. В частности, в ряде случаев необходимо обеспечить проникновение лекарства внутрь клетки, а затем «индуцировать» его быстрое высвобождение в цитозоль. Это может представлять интерес, как для увеличения внутриклеточной локализации низкомолекулярных препаратов, так и для доставки биомолекул, проникновение которых внутрь клетки самих по себе невозможно [4]. Необходимо отметить, что для инкапсулирования биомолекул необходимо использовать частицы, способные предоставить «мягкие условия», обуславливающие сохранение биологической активности инкапсулянта [5].

Учитывая сказанное выше, необходимо выделить относительно новый тип наночастиц, называемый наногелями [6]. Наногели формируют на основе гидрофильных макромолекул природного или синтетического происхождения, путём создания физических или ковалентных сшивок. Получение именно наночастиц, а не макрогеля, достигается путём подбора концентраций макромолекул. Наногели представляют собой мягкий тип наночастиц, способных реагировать на внешние условия [7]. В этом смысле они очень похожи по свойствам на живые системы, в частности, на межклеточный матрикс соединительной ткани. Кроме этого, они имеют, как правило, реакционно способные группы, пригодные для химической модификации с целью придания необходимых свойств: дополнительное сшивание, связывание таргетирующих лигандов и т.п.

В данной работе были получены наногели на основе полисахаридов и полиаминокислоты, а именно хитозана (Хит) и гепарина (Геп), а также Г и поли(L-лизина) (ПЛ). Изучены размеры и физико-химические свойства частиц, эффективность инкапсулирования и кинетика индуцированного высвобождения лекарственных веществ.

### *Получение наногелей.*

**Наногели Хит:Геп.** Гидрогелевые наночастицы были получены методом ионотропного гелеобразования за счёт электростатического взаимодействия поликатиона хитозана с полианионными группами гепарина и нуклеиновой кислоты. Процедура приготовления частиц была оптимизирована с целью получения гомогенного раствора наночастиц и заключалась в добавлении водного раствора гепарина (PBS 7,4, 0,2 мл, 1 мг/мл, MM= 8000-12000 Да, AppliChem GmbH, Германия) в водный раствор избытка хитозана (3 % CH<sub>3</sub>COOH, рН=6,0, 0,5 мл, MM= 190-350 кДа, 75-85 % деацетилирования, Aldrich, США) при ультразвуковом диспергировании низкой мощности 10 % (УЗ гомогенизатор Sonopuls HD2070, Bandelin, Германия) в течение 2 минут при комнатной температуре. Далее раствор частиц перемешивали на шейкере (Thermo-Shaker, TS-100C, Biosan, Латвия) в течение 2 часов. В случае инкапсулирования модельного олигонуклеотида его добавляли вместе с раствором гепарина и после получения частиц проводили очистку от несвязавшихся компонентов с помощью диализа с применением диализных мешков (OrDial D100, 100 кДа Orange Scientific, Бельгия).

Для получения наночастиц на основе хитозан-гепаринового интерполиэлектrolитного комплекса, обладающих наименьшим размером и оптимальным положительным зарядом поверхности, использовали различные массовые соотношения Хит:Геп (рис. 1). Размер частиц определяли методом динамического рассеяния света.

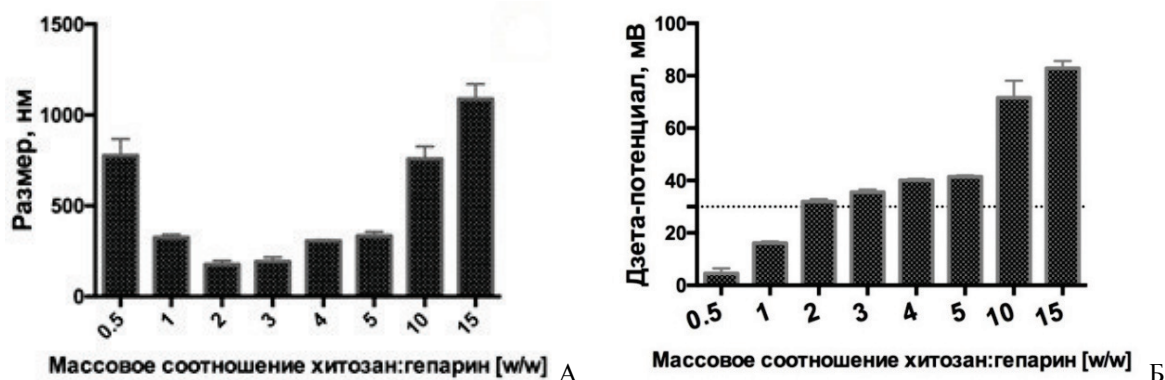


Рисунок 1. Влияние массовых соотношений Хит:Геп на размер частиц (А) и дзета-потенциал (Б)

Полученные данные говорят о том, что для получения наногелей наименьшего размера с достаточно высоким для стабилизации суспензии дзета-потенциалом возможно при массовом соотношении Хит:Геп = 2:1 и 3:1.

Микрофотографии гидрогелевых хитозан-гепариновых наночастиц, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показаны на рисунке 2. Видно, что частицы имеют средний размер 30 нм и сферическую форму. При этом, они склонны к агрегации при высушивании.

**Наногели Геп:ПЛ.** Данный тип наногелей получали способом, аналогичным описанному выше. При этом в качестве растворителя для обоих полимеров выступала дистиллированная вода без добавления солей (рН 6,8). Использовали ПЛ со среднечисленной молекулярной массой 26 000 Да. Результаты изучения влияния массовых соотношений Геп:ПЛ на размер частиц и дзета-потенциал представлены на рисунке 3. В данном случае, увеличение концентрации гепарина приводило к уменьшению размера частиц. При этом, электрокинетический потенциал оставался во всех случаях примерно одинаковым, что говорит о превалирующей концентрации гепарина на поверхности частиц при всех использованных соотношениях Геп:ПЛ.

К настоящему моменту исследование морфологии частиц было проведено с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). На полученных микрофотографиях можно различить агрегаты полученных наногелей с размером около 1 мкм.

*Инкапсулирование лекарственных препаратов.*

Оценку количества инкапсулированных препаратов олиготимидина и преднизолона проводили определяя концентрацию веществ в надосадочном растворе после получения частиц. При этом использовали закон Бугера-Ламберта-Бера:  $D_\lambda = \epsilon \cdot C \cdot l$ , где  $D_\lambda$  – поглощение раствора при длине волны  $\lambda$ ;  $C$  – концентрация вещества, мг/мл;  $l$  – длина пути пучка света в образце;  $\epsilon$  – коэффициент молярного поглощения, определяемый из калибровочной зависимости, как тангенс угла наклона.

Расчёт количества инкапсулированного вещества осуществляли по формуле:

$$Q_{\text{инкапс}} = C \times V_{\text{супернатант}} \tag{1}$$

Эффективность инкапсулирования (ЭИ, %) в процентах рассчитывали по формуле

$$\text{ЭИ, \%} = \frac{Q_{\text{инкапс}}}{Q_0} \times 100\% \tag{2}$$

где  $Q_0$  – взятое для инкапсулирования количество препарата.

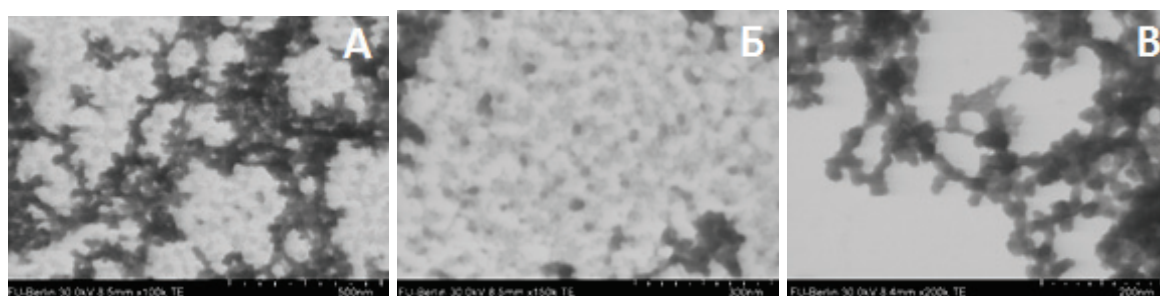


Рисунок 2. ПЭМ-микрофотографии гидрогелевых наночастиц хитозан-гепарин соотношение хитозан/гепарин [w/w] = 2/1, рН 6,5: (А) – увеличение x100,0к; (Б) – увеличение x150,0к; (В) – увеличение x200,0к

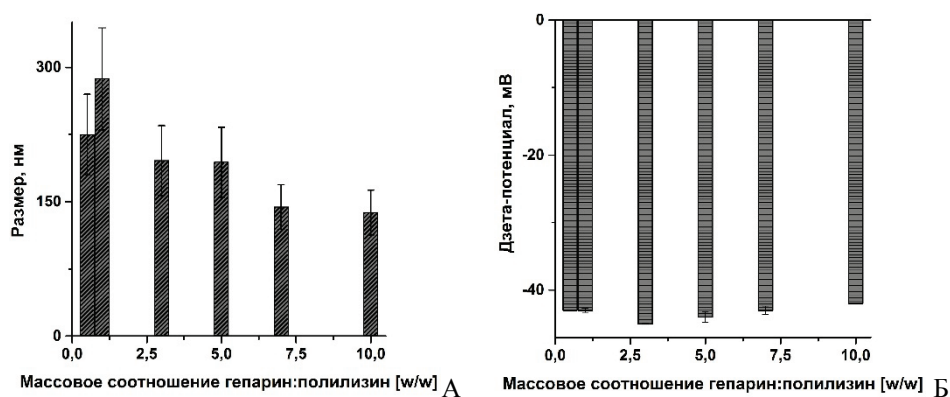


Рисунок 3. Влияние массовых соотношений Геп:ПЛ на размер частиц (А) и дзета-потенциал (Б)

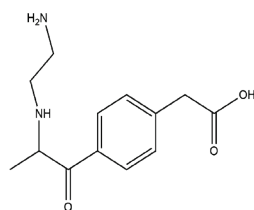
**Олиготимидин.** В качестве модели РНК для инкапсулирования в наногели использовали олиготимидин (23 п.о.), меченный флуоресцентной меткой Су3. Инкапсулирование олиготимидина происходит на стадии получения частиц, путём его добавления в избыток раствора поликатиона (Хит или ПЛ). В случае Хит:Геп была изучена эффективность включения модельного флуоресцентно меченного олиготимидина в полиэлектролитный комплекс при различных рН среды (рис. 5).

Видно, что с увеличением рН среды эффективность инкапсулирования (ЭИ, %) олиготимидина падает, что, по всей видимости, связано с уменьшением степени протонирования аминогрупп хитозана, а, следовательно, снижением возможной степени связывания полиэлектролитов. Наибольшая эффективность инкапсулирования наблюдается при рН среды от 5,0 до 6,0.

Инкапсулирование олиготимидина в частицы на основе Геп:ПЛ происходило в воде во всех случаях приводило к 100 %-й ЭИ.

**Преднизолон.** Для инкапсулирования преднизолона использовали частицы на основе Геп:ПЛ. Поскольку сами гидрофобные молекулы не могут быть инкапсулированы в гидрофильный гидрогель, проводили инкапсулирование комплекса преднизолона с бычьим сывороточным альбумином (БСА-пред). Эффективность инкапсулирования БСА-пред в частицы, полученные при массовом соотношении, Геп:ПЛ 5:1 составила 67 %.

Для обеспечения фоточувствительного высвобождения олиготимидина и БСА-пред из частиц на основе Геп:ПЛ они были дополнительно сшиты специально синтезированным линкером, а именно 2-(4-(2-(2-аминоэтиламино)пропаноил)фенил)уксусной кислотой. Для проведения сшивки карбоксильные группы линкера и Геп были предварительно активированы водорастворимым карбодиимидом (EDC). Создание узлов химической сшивки привело к компактизации частиц – их гидродинамический радиус уменьшился с 150 до 114 нм. Электрокинетический потенциал изменился с –44 до –35 мВ.



Структура фоточувствительного линкера

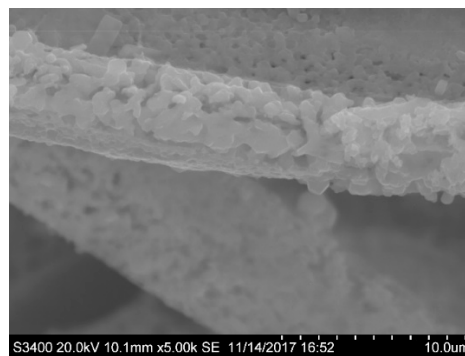
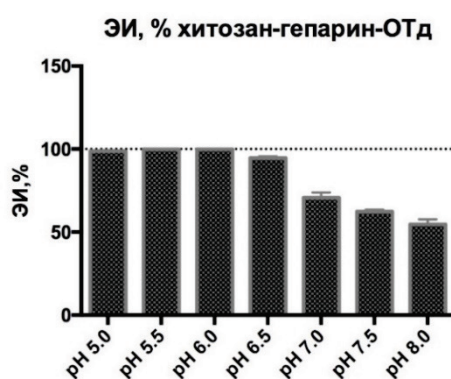


Рисунок 4. СЭМ-микрофотографии наногелей на основе Геп:ПЛ, полученные при массовом соотношении Геп:ПЛ: 5:1



**Рисунок 5.** Влияние pH на эффективность включения олиготимидина в хитозан-гепарин полиэлектrolитный комплекс

#### Высвобождение лекарств.

Для исследования *in vitro* высвобождения препаратов из коллоидный раствор частиц выдерживали в микропробирке на термо-шейкере при 25 °С и 100 об/мин. По окончании заданных интервалов времени, микропробирки вынимали из шейкера и центрифугировали в мембранной микропробирке при 15000 об/мин в течение 15 мин, фильтрат анализировали фотометрически или флуориметрически и вычисляли количество высвободившегося перпарата по формуле (3). Для проверки воспроизводимости результатов эксперимент повторяли трижды.

$$Q_{\text{высвобод}} = C \times V_{\text{надосад}} \quad (3)$$

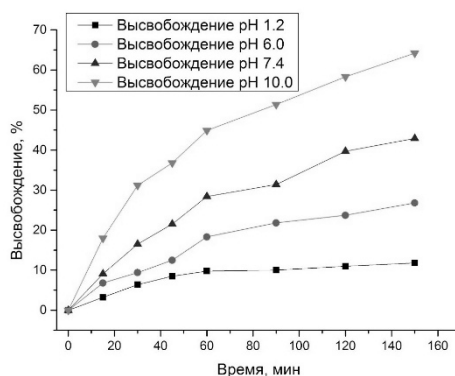
Процент высвобождения рассчитывали по формуле:

$$Q_{\text{высвобод}} \% = \frac{Q_{\text{высвобод}}}{Q_0} \times 100\% \quad (4)$$

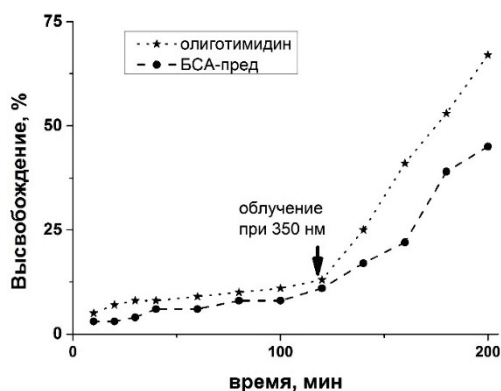
где  $Q_0$  – взятое для инкапсулирования количество препарата.

**pH-чувствительное высвобождение из Хит:Геп.** Известно, что полиэлектrolиты обладают pH-зависимыми свойствами. Они набухают в условиях, способствующих ионизации функциональных групп, и коллапсируют при отсутствии на них заряда. На рисунке 6 представлен график зависимости количества высвободившегося флуоресцентно меченного олиготимидина (СуЗ-ОТд) от времени при различных pH, моделирующих различные физиологические среды и внутриклеточные участки. Видно, что в щелочной среде высвобождение происходит наиболее стремительным образом. Вероятно, это связано со значительным депротонированием аминогрупп Хит и уменьшением взаимодействия Хит-Геп, приводящим к набуханию гидрогелевых частиц, которое облегчает диффузию модельного вещества в окружающую среду. Кроме того, уменьшение заряда Хит уменьшает взаимодействие Хит-олиготимидин. При этом, в кислых условиях высвобождение практически не происходит, что может быть обусловлено компактизацией частиц за счёт более высокого заряда на Хит.

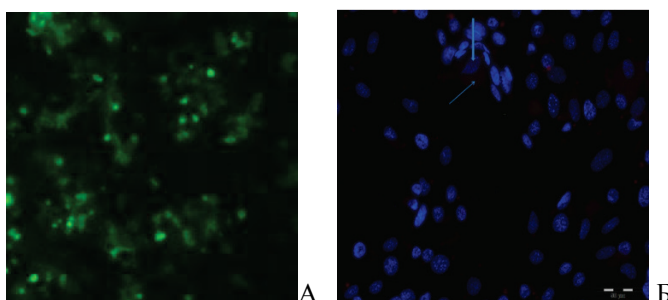
**Фоточувствительное высвобождение из Геп:ПЛ.** Для изучения фоточувствительного высвобождения были получены частицы Геп:ПЛ, содержащие икапсулированный олиготимидин или БСА-пред. Высвобождение происходило в 0,1 М фосфатно-солевом буферном растворе с pH 9,0. В течение 2-х часов наблюдалось лишь незначительное высвобождение. После облучения суспензий светом при длине волны 350 нм наблюдалось ускоренное высвобождение (рис. 7), обусловленное деструкцией фотолабильного линкера, а, следовательно, разрушение химических узлов сшивки.



**Рисунок 6.** Высвобождение в олиготимидина из наногелей Хит:Геп при физиологических pH среды



**Рисунок 7.** Фоточувствительное высвобождение олиготимидина и БСА-пред из наногелей Геп:ПД сшитых фоточувствительным линкером



**Рисунок 8.** Изображения с флуоресцентного микроскопа демонстрирующие: А – проникновение Хит:Геп+олиготимидин-Су3 внутрь эпителиоцитов HEK; Б - проникновение Геп:ПД+БСА-пред-TAMRA внутрь фибробластов NIH-3T3 (синее свечение – ядра клеток, окрашенные DAPI)

#### Проникновение частиц в клетки.

Проникновение частиц во внутриклеточное пространство необходимо для доставки инкапсулированных лекарств к их мишеням. Для изучения этого процесса были использованы клеточные культуры HEK и NIH-3T3. На рисунке 8 представлены результаты изучения проникновения частиц внутрь клеток, полученные с использованием флуоресцентной микроскопии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были получены наногели, способные инкапсулировать с высокой эффективностью модельные препараты. Высвобождение данных препаратов может быть индуцировано внешними условиями – изменением pH или облучением светом при определённой длине волны (350 нм). Оба типа наногелей способны доставлять инкапсулированные препараты внутрь клеток.

*Работа была выполнена за счёт средств Мегагранта Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.W03.31.0025).*

#### Список литературы / References:

1. Mäler L., Gräslund A. Artificial membrane models for the study of macromolecular delivery. *Macromol. Drug Deliv.*, 2009, vol. 480, no. 6, pp. 129-139.
2. De Jong W.H., Borm P.J. a. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 133-149.
3. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature*, 1998, vol. 392, no. 6679, pp. 5-10.
4. Bareford L.M., Swaan P.W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, vol. 59, no. 8, pp. 748-758.
5. Satish C.S., Satish K.P., Shivakumar H.G. Hydrogels as controlled drug delivery systems: Synthesis, crosslinking, water and drug transport mechanism. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2006, vol. 68, no. 2, pp. 133-140.
6. Eckmann D.M. [et al.] Nanogel Carrier Design for Targeted Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B.*, 2014, vol. 2, no. 46, pp. 8085-8097.
7. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, vol. 60, pp. 1638-1649.

**PH- AND PHOTSENSITIVE NANOGELS FOR INTRACELLULAR DELIVERY OF RNA AND DRUGS WITH LOW MOLECULAR WEIGHT****Korzhikov-Vlakh V.A., Pilipenko Yu.M., Katernuk Yu. V., Tennikova T.B.**

St. Petersburg State University

*Universitetskii pr., 26, St. Petersburg, 199004, Russia; e-mail: v\_korzhikov@mail.ru*

**Abstract.** Nanogels are cross-linked particles based on hydrophilic polymers that have been formed at nanoscale level. In this work, the formation of nanogels occurred by ionic assembly in chitosan-heparin and heparin-poly (L-lysine) systems. Modeled compounds, namely, prednisolone and oligothymidine, were encapsulated in the resulting particles. pH-sensitive release was due to the ionic nature of macromolecules, and photosensitive release was achieved by using a special linker. The penetration of obtained particles into the intracellular space has also been studied.

**Key words:** *nanogels, pH and photosensitive release, intracellular penetration.*