

*На правах рукописи*



**Максимова Екатерина Дмитриевна**

**Катионные наногели: синтез, свойства и использование  
для транспорта нуклеиновых кислот в живые клетки**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки

03.01.04 – биохимия, химические науки

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова на химическом факультете (кафедра высокомолекулярных соединений, лаборатория функциональных полимеров и полимерных материалов).

**Научные руководители:**

доктор биологических наук **Гроздова Ирина Дмитриевна**

доктор химических наук **Мелик-Нубаров Николай Сергеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Зубов Виталий Павлович**, доктор химических наук, профессор, Московский технологический университет, профессор кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений

**Максименко Александр Васильевич**, доктор биологических наук, профессор, Российский кардиологический научно-производственный комплекс министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией биохимической инженерии отдела биотехнологии Института экспериментальной кардиологии

**Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ИХФ РАН).**

Защита состоится 06 апреля 2016 г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.60 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова, д. 1, стр. 3, химический факультет, Лабораторный корпус «А», кафедра высокомолекулярных соединений, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова, и на сайте химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова <http://www.chem.msu.ru/rus/theses/2015/2015-12-31-maksimova/>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации <http://vak.ed.gov.ru/>.

Автореферат разослан “\_\_\_” февраля 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Долгова Алла Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В последние 15 лет стремительно растет количество публикаций, посвященных полимерам необычной макромолекулярной структуры: дендримерам, разветвленным и сетчатым полимерам. Особый интерес представляют разветвленные поликатионы, которые благодаря трёхмерному строению и заряду могут быть использованы в качестве носителей для доставки лекарственных препаратов и нуклеиновых кислот в живые клетки. Однако их применение сопряжено с целым комплексом фундаментальных проблем, связанных с особенностями взаимодействия полимеров и клеточных мембран. Свободные нуклеиновые кислоты заряжены отрицательно и поэтому не взаимодействуют с одноименно заряженной поверхностью клеток. Однако их комплекс с поликатионом легко попадает внутрь клеток и оказывается внутри пузырьков, окаймленных мембраной и предназначенных для переваривания попавших в них веществ (эндосомы и лизосомы). В настоящее время основная проблема введения нуклеиновых кислот в клетки заключается в поисках способа разрушения мембраны эндосом и обеспечения выхода нуклеиновой кислоты во внутренний объем клетки, что необходимо для осуществления требуемого биологического эффекта.

**Степень разработанности темы.** Около 15 лет назад было обнаружено, что катионные гидрогелевые частицы микро- и наноскопических размеров являются эффективными носителями для доставки олигонуклеотидов, а в ряде случаев, и больших молекул ДНК, в клетки. Несмотря на то, что в литературе предложено множество подходов к синтезу таких частиц из полимеров различной природы, систематического изучения зависимости свойств наногелей от количества добавленного сшивателя не проводилось. Между тем, этот параметр может иметь существенное значение для взаимодействия катионных наногелей с полианионами, в том числе нуклеиновыми кислотами, влиять на взаимодействие частиц комплексов с поверхностью клеток, их захват в эндосомы и доставку нуклеиновой кислоты к внутриклеточным мишеням.

**Целью работы** явилось получение наногелевых частиц на основе поли-(N,N-диметиламиноэтилметакрилата) и исследование влияния количества

сшивателя, добавленного в полимеризационную смесь, на размер частиц, их взаимодействие с полианионами, в том числе с нуклеиновыми кислотами, а также на и их способность доставлять ДНК и РНК в клетки.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**: 1) разработать метод синтеза катионных наногелей; 2) синтезировать серию катионных наногелей, варьируя содержание сшивателя N,N'-метиленабисакриламида (МБА) в полимеризационной смеси; 3) исследовать влияние количества добавленного МБА на физико-химические свойства наногелей и их комплексов с синтетическими и природными полианионами; 4) исследовать эффективность введения нуклеиновых кислот в клетки с помощью синтезированных катионных наногелей.

**Научная новизна работы.** Разработан метод синтеза узкодисперсных гидрогелевых наночастиц радиусом 25 - 50 нм путем радикальной сополимеризации N,N-диметиламиноэтилметакрилата и N,N'-метиленабисакриламида в обращенных мицеллах олеил-декаэтиленгликоля в циклогексане. Впервые показано, что индекс полидисперсности уменьшается с ростом количества добавленного сшивателя и при 2-5% МБА достигает величины 0.07, что соответствует практически монодисперсным частицам.

Показано, что при увеличении количества сшивателя, использованного при синтезе катионных наногелей, снижается доля аминогрупп, принимающих участие в образовании полиэлектролитных комплексов.

Обнаружено, что размер комплексов наногелей с плазмидной ДНК зависит от содержания сшивателя в полимеризационной смеси, использованной при синтезе наногеля, причем наименьший размер достигается при содержании сшивателя 2-5%.

Показано, что увеличение количества сшивателя, использованного при синтезе катионных наногелей, способствует проявлению их защитного действия на ДНК по отношению к нуклеазам.

Обнаружено, что повышение количества сшивателя, использованного в синтезе катионных наногелей, влияет на их способность обеспечивать транспорт плазмидной ДНК и малой интерферирующей РНК в живые клетки, причём наибольшей эффективностью обладают наногели с промежуточным содержанием сшивателя (около 2%).

В экспериментах на живых клетках впервые продемонстрировано, что при захвате во внутриклеточные везикулы с пониженным значением pH (эндосомы), сетчатая структура поликатионных носителей увеличивает их способность вызывать осмотическое набухание и разрушение везикул, приводящее к выходу комплексов наногелей с нуклеиновой кислотой внутрь клетки.

**Теоретическая значимость работы** состоит в том, что впервые в наногелях слабых полиаминов обнаружена внутренняя область, доступная для протонирования, но недоступная для взаимодействия с полианионами. Наличие такой области внутри частиц наногеля обуславливает их способность вызывать осмотическое набухание и разрушение во внутриклеточных везикулах с пониженным значением pH (эндосомах) при попадании в клетки.

**Практическая значимость работы.** Полученные в работе результаты показывают, что сетчатая структура макромолекулы десятикратно увеличивает эффективность катионных носителей для доставки нуклеиновых кислот в живые клетки. Данный подход может быть в дальнейшем использован для конструирования эффективных поликатионных носителей для генной терапии.

**Методология и методы диссертационного исследования** основаны на использовании комплексного подхода к решению поставленных в диссертации задач. Данный подход заключается в применении набора современных экспериментальных и теоретических методов исследования для определения чистоты, размера частиц, кислотно-основных свойств полученных катионных наногелей, изучения физико-химических свойств их комплексов с синтетическими полианионами и нуклеиновыми кислотами, исследования проникновения наногелей и их комплексов с нуклеиновыми кислотами в живые клетки. В работе применяли следующие методы исследования: метод динамического светорассеяния, ИК-спектроскопию, потенциометрическое титрование, метод лазерного микроэлектрофореза, метод конфокальной микроскопии, метод атомно-силовой микроскопии и другие.

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

- (1) радикальная сополимеризация N,N-диметиламиноэтилметакрилата и N,N'-метиленбисакриламида в обращённых мицеллах олеил-декаэтиленгликоля в циклогексане позволяет получать гидрогелевые частицы, характеризующиеся узким распределением по размерам;
- (2) гидродинамический радиус частиц зависит от содержания сшивателя и варьируется от 50 до 25 нм;
- (3) при увеличении содержания сшивателя в составе полимеризационной смеси катионных наногелей снижается доля аминогрупп, участвующих в образовании комплексов с полианионами;
- (4) размеры комплексов наногелей с плазмидной ДНК зависят от содержания сшивателя в составе наногеля, причём наименьший размер комплексов достигается при содержании сшивателя 2-5%;
- (5) катионные наногели защищают ДНК от нуклеаз, причём, защитное действие усиливается с увеличением содержания сшивателя в полимеризационной смеси наногелей;
- (6) содержание сшивателя катионных наногелей определяет их способность обеспечивать транспорт плазмидной ДНК и малой интерферирующей РНК в живые клетки, причём наибольшей эффективностью обладают наногели с промежуточным содержанием сшивателя (около 2%);
- (7) сетчатая структура слабых поликатионов имеет существенное значение для вызываемого ими эффекта осмотического набухания и разрушения эндосом в клетках, приводящего к 10-кратному увеличению эффективности доставки нуклеиновых кислот.

**Личный вклад автора** заключается в участии автора во всех этапах диссертационного исследования: в планировании и постановке задач; в сборе и анализе литературных данных; в непосредственном участии в научных экспериментах, в обработке, анализе и обсуждении полученных результатов; в подготовке публикаций по теме выполненного исследования и участии в тематических конференциях.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были доложены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012», Москва, Россия (2012); VI Всероссийской

конференции по химии среди студентов и аспирантов «Менделеев-2012», Санкт-Петербург, Россия (2012); Конкурсе молодых ученых НИИВС им. Мечникова РАМН, Москва, Россия (2012); 76-й Международной научной конференции «Полимеры в медицине», Прага, Чехия (2012), Балтийском Полимерном Симпозиуме, Лиепая, Латвия (2012), Шестой Всероссийской Каргинской Конференции «Полимеры — 2014», Москва, Россия (2014).

**Публикации.** Основные результаты диссертации изложены в 9 печатных работах, из них 1 статья, опубликованная в научном журнале из перечня ВАК рецензируемых научных журналов, входящих в международные базы данных, 2 статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых по базе Web of Science, и 6 тезисов докладов на международных конференциях.

**Объём и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (167 наименований). Работа изложена на 127 страницах, содержит 39 рисунков, 1 таблицу.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** дано обоснование актуальности диссертационной работы, указаны ее цель и задачи.

**Глава I** является **обзором литературы**, где описаны структура и свойства наногелей, методы их синтеза, возможности применения, также рассмотрена проблема доставки генетического материала в клетку с помощью поликатионных носителей, описаны свойства полиэлектролитных комплексов, влияющие на эффективность доставки, а также обсуждена роль разветвлённой структуры поликатионного носителя в процессе доставки генного материала в живые клетки.

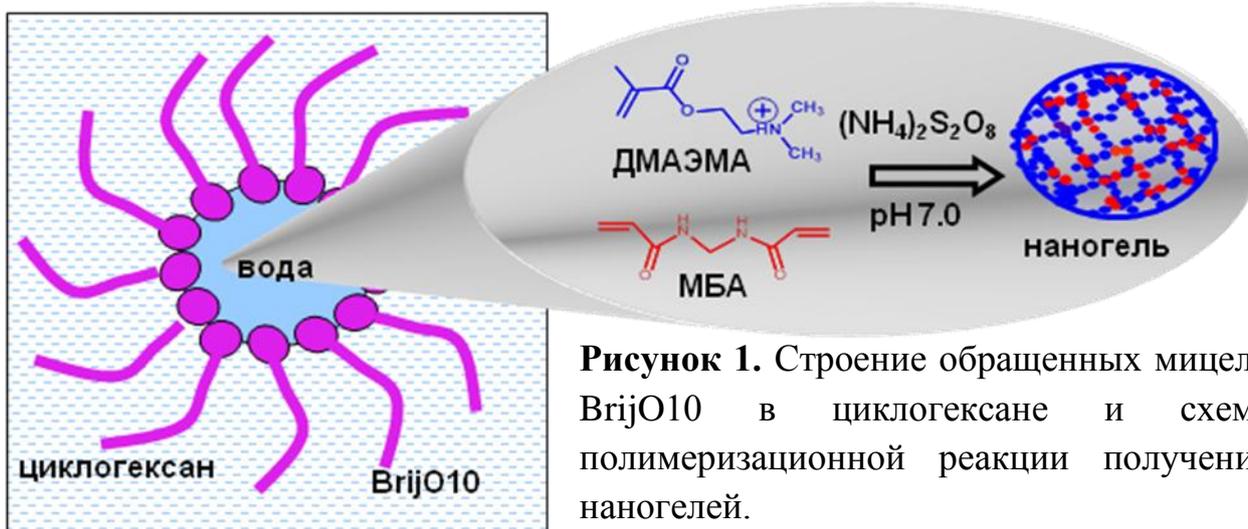
**Глава 2** - **экспериментальная часть**, содержащая описание объектов и методов исследования.

## **Глава 3. Результаты и их обсуждение**

### **3.1 Синтез и физико-химические свойства наногелей**

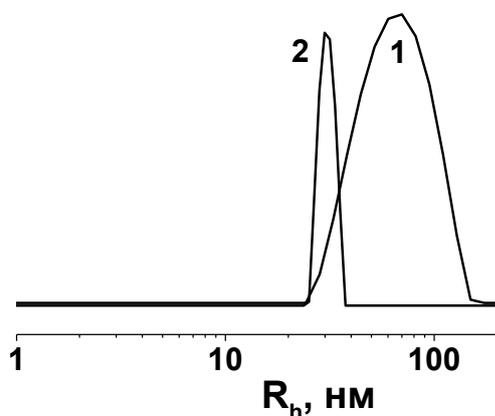
Синтез наногелей проводили в системе обращённых мицелл, образуемых олеилдекаэтиленгликолем (BrijO10) в циклогексане (рис. 1). Для

этого раствор ПАВа в циклогексане смешивали с водным раствором солянокислой соли N,N-диметиламиноэтилметакрилата (ДМАЭМА) и N,N'-метиленабисакриламида (МБА), которые локализовались в водной полости обращённых мицелл с образованием оптически прозрачной системы. Полимеризацию инициировали добавлением водного раствора персульфата аммония. Использование обращённых мицелл в качестве микрореакторов позволяло ограничить рост цепи и размер образующихся частиц.



**Рисунок 1.** Строение обращенных мицелл BrijO10 в циклогексане и схема полимеризационной реакции получения наногелей.

Дисперсионный анализ линейного поли(N,N-диметиламиноэтилметакрилата) (ПДМАЭМА) (рис. 2, кривая 1) и наногеля, содержащего 5% МБА (рис. 2, кривая 2), полученных полимеризацией в системе в обращённых мицелл, показал, что *введение в полимер сшивателя позволяет существенно уменьшить его гидродинамический радиус и приводит к исключительно узкому распределению частиц по размерам.*

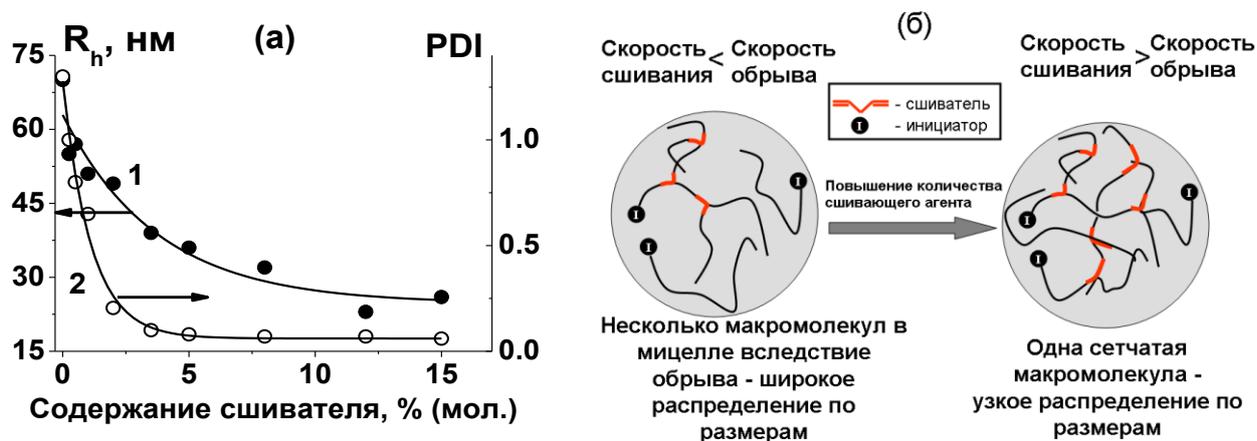


**Рисунок 2.** Распределение по размерам линейного ПДМАЭМА (кривая 1) и наногеля (кривая 2), полученного полимеризацией ДМАЭМА в водной полости обращённых мицелл BrijO10 в циклогексане.

При этом гидродинамический радиус наногелей закономерно уменьшался с ростом содержания сшивателя (рис. 3а, кривая 1), что, по всей видимости, обусловлено снижением равновесной набухаемости

полиэлектrolитного геля с ростом содержания сшивателя. Такая же закономерность наблюдалась и при изучении наногелей методом АСМ.

Интересно, что индекс полидисперсности резко снижается с увеличением содержания сшивателя до 2%, а затем выходит на плато на уровне около 0.05 (рис. 3а, кривая 2), указывая на то, что получающиеся частицы практически однородны по размерам. Хотя этот эффект до конца не понятен, можно предположить, что существенное сужение распределения происходит вследствие сшивания нескольких растущих цепей в пределах одной мицеллы. Можно предположить, что это происходит вследствие того, что вероятность сшивки различных растущих цепей превышает вероятность обрыва (рис. 3б). Когда количество сшивателя становится достаточным для того, чтобы обеспечить образование одной макромолекулы в каждой мицелле, ширина распределения перестает меняться с ростом содержания МБА. Таким образом, именно присутствие сшивателя в системе способствует образованию узкодисперсных частиц.



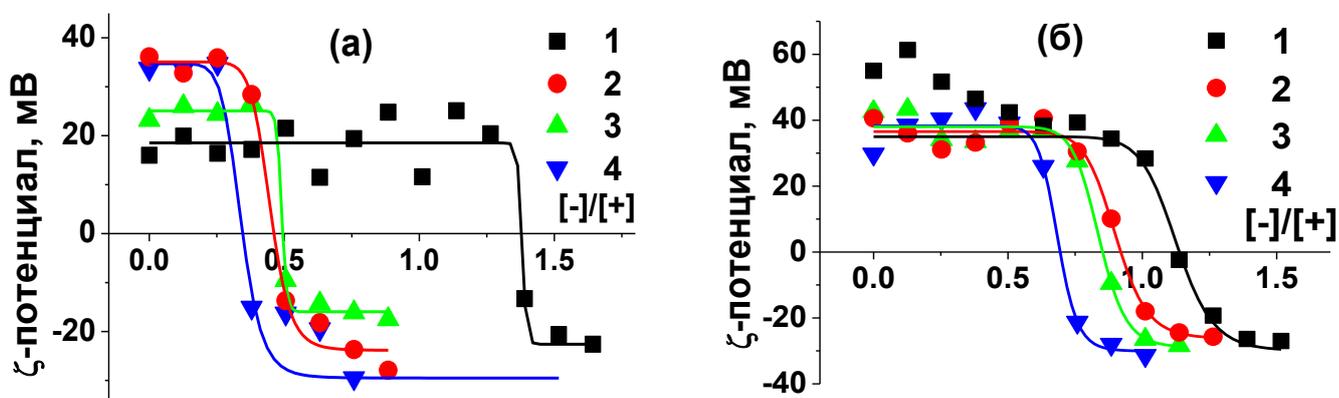
**Рисунок 3.** (а) Зависимость среднего гидродинамического радиуса  $R_h$  (кривая 1) наногеля и индекса полидисперсности (PDI) (кривая 2) частиц от содержания сшивателя; (б) схематическое объяснение причин уменьшения полидисперсности образцов наногелей при увеличении количества сшивающего агента

Исследование кислотно-основных свойств наногелей показало, что присутствие сшивателя в составе наногелей практически не влияет на степень их протонирования: кривые потенциометрического титрования линейного ПДМАЭМА и наногелей, полученных в присутствии 5% и 12% сшивателя, практически совпадают. Таким образом, аминогруппы полученных в настоящей работе наногелей полностью доступны для протонирования

низкомолекулярной кислотой. Совершенно иная ситуация наблюдается при взаимодействии наногелей с поликислотами.

### 3.2 Взаимодействие наногелей с полианионами

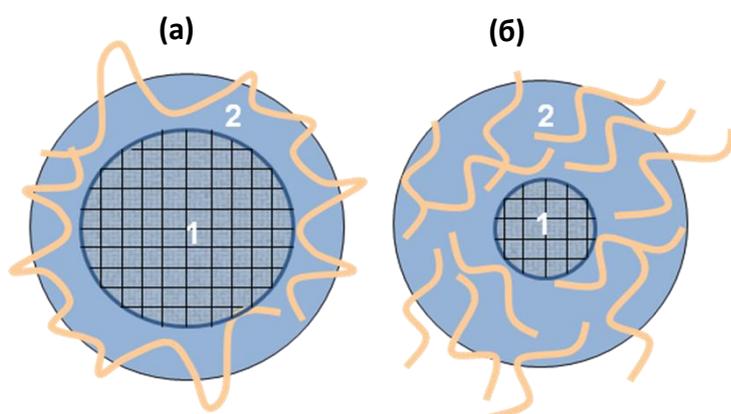
Взаимодействие синтезированных поликатионов с двумя образцами линейного полистиролсульфоната натрия (ПСС), сильно различающихся по степени полимеризации ( $P_n = 2500$  и  $8$ ), изучали методом лазерного микроэлектрофореза. При варьировании состава комплекса с линейным ПДМАЭМА измеряемый  $\zeta$ -потенциал частиц достигал нулевого значения при составе  $[-]/[+]=1.4$ . В то же время нулевая электрофоретическая подвижность комплексов с наногелями достигалась при добавлении значительно меньших количеств ПСС. Нулевой заряд комплексов с наногелями, полученными с 2%, 5% и 12% (мол.) сшивающего агента, достигался при  $[-]/[+] = 0.5, 0.45$  и  $0.4$ , соответственно (рис. 4а). Полагая, что в линейном ПДМАЭМА все аминогруппы доступны для комплексообразования с ПСС<sub>2500</sub>, мы рассчитали долю доступных аминогрупп в наногелях как соотношение точек нулевого заряда для наногеля и линейного полиамина. Оказалось, что эти величины составляют, соответственно, 0.35, 0.32 и 0.28, т.е. около 70% аминогрупп в наногелях недоступны для высокомолекулярного ПСС.



**Рисунок 4.** Зависимость  $\zeta$ -потенциала комплексов, образованных полистиролсульфонатом натрия со степенью полимеризации 2500 (а) и 8 (б) с линейным ПДМАЭМА (кривые 1) и наногелями, содержащими 2%, (кривые 2), 5% (кривые 3) и 12% (кривые 4) (мол.) сшивателя, от мольного соотношения зарядов в системе. Буферный раствор 5 мМ трис-уксусная кислота, рН 7.0.

Иные результаты были получены при исследовании взаимодействия тех же наногелей с короткоцепочечным ПСС<sub>8</sub> (рис. 4б). В этом случае доля недоступных для полианиона аминогрупп составляла, соответственно, 0.64,

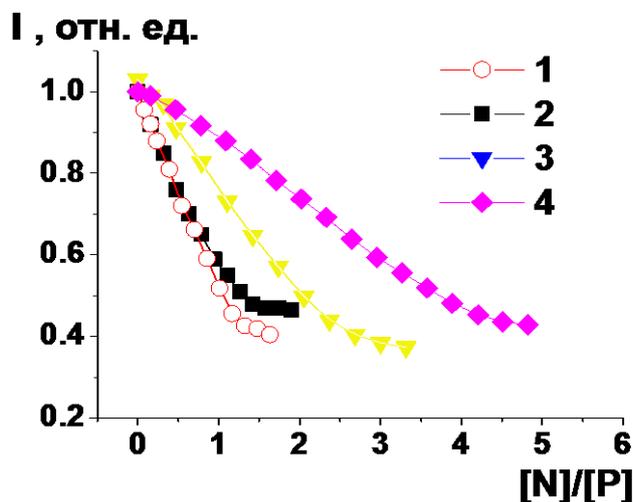
0.57 и 0.5 для наногелей, содержащих 2, 5 и 12% сшивающего агента. Эти результаты показали, что короткие цепи ПСС<sub>8</sub> способны проникать в наногели на большую глубину, формируя солевые контакты с большей долей аминогрупп наночастицы. Таким образом, изучение взаимодействия поликатионов с ПСС выявило существенные различия между линейным полимером и наногелями. *Полученные результаты указывают на наличие в частице наногеля зоны, не доступной для взаимодействия с полианионами. При этом способность полианиона проникать внутрь наногелевой частицы увеличивается с понижением его молекулярной массы и снижением содержания сшивателя в полимеризационной смеси (рис. 5).*



**Рисунок 5.** Схематическое изображение доступной (1) и недоступной (2) для высокомолекулярного (а) и олигомерного (б) полианиона областей частицы наногеля.

Взаимодействие наногелей с жёсткой молекулой ДНК подчиняется в целом сходным закономерностям. Для изучения комплексообразования поликатионов с ДНК использовали метод вытеснения интеркалирующего катионного красителя бромистого этидия. Добавление поликатионов к комплексу ДНК-краситель при физиологической ионной силе и нейтральном рН приводит к снижению флуоресценции бромистого этидия, что указывает на его вытеснение из двойной спирали в водный раствор (рис. 6).

Полное вытеснение красителя линейным ПДМАЭМА наблюдалось при эквимольном соотношении аминогрупп поликатиона и фосфатных групп ДНК (рис. 6, кривая 1). В то же время, в случае наногелей требовались значительно большие избытки поликатиона по отношению к ДНК, причём этот эффект закономерно увеличивался с увеличением количества сшивателя в составе наногеля. Так, наногели, содержащие 2%, 5% и 12% сшивающего агента, вытесняли бромистый этидий из комплекса с ДНК, соответственно, при 1.5-, 2.5- и 4-кратном молярном избытке аминогрупп по отношению к фосфатным группам ДНК (рис. 6, кривые 2, 3 и 4).



**Рисунок 6.** Зависимость интенсивности флуоресценции (I) бромистого этидия от соотношения концентраций аминокрупп линейного ПДМАЭМА (кривая 1) и наногелей, содержащих 2 (кривая 2), 5 (кривая 3), 12 (кривая 4) мол. % сшивателя и концентрации фосфатных групп ДНК ([N]/[P]). рН 7.4, 0.15 М NaCl.  $\lambda_{\text{возб.}} = 520$  нм,  $\lambda_{\text{флуор.}} = 605$  нм, 25°C.

Сходные результаты были получены и при исследовании комплексообразования методом вытеснения другого интеркалирующего красителя SYBR Green. Таким образом, так же, как и в случае ПСС, ДНК может взаимодействовать в наногелях лишь с теми аминокруппами, которые локализованы вблизи поверхности частиц, а звенья, спрятанные внутри наногеля, остаются недоступными для комплексообразования с нуклеиновой кислотой.

Таким образом, полученные результаты показывают, что наногели способны образовывать комплексы с полианионами при физиологической концентрации соли. При этом сетчатая структура наногелей существенно влияет на их способность вступать в полиэлектролитные реакции.

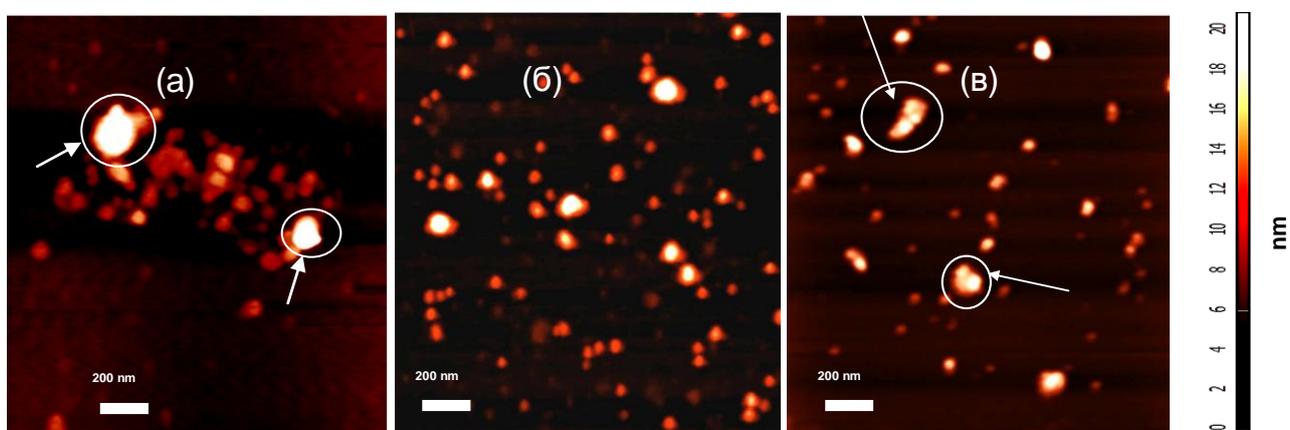
### 3.3 Размер комплексов наногелей с ДНК

Одно из требований, предъявляемых к полиаминам как к катионным носителям - это способность образовывать с ДНК частицы диаметром около 100-150 нм, поскольку частицы такого размера наиболее эффективно захватываются в клеточные везикулы. Исследование размеров частиц проводили методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) и динамического светорассеяния.

Исследование комплексов ДНК с линейным ПДМАЭМА (рис. 7а) и наногелями, содержащими 2% (рис. 7б) и 12% сшивающего агента (рис. 7в), с помощью АСМ показало, что свободная ДНК в образцах не регистрировалась. Это говорит об эффективном связывании ДНК наногелями. Во всех случаях формируются сферические частицы. Поскольку образцы для АСМ готовились путем высушивания водных растворов на слюде, высота частиц была в

несколько раз меньше их горизонтального размера. Это, с большой вероятностью, говорит о том, что частицы комплексов в водном растворе имеют сферическую форму.

Оценка распределения частиц по их высоте показала, что линейный ПДМАЭМА образовывал частицы комплексов с высотой 20-30 нм, в то время как комплексы, сформированные наногелями с 2% и 12% сшивающего агента, были заметно меньше (высота не превышала 7-10 нм). Однако комплексы, сформированные линейным ПДМАЭМА и наногелем с 12% сшивающего агента, проявляли склонность к агрегации (показаны стрелками на рисунках 7а и в). Высота этих областей соответствовала 20-30 нм.

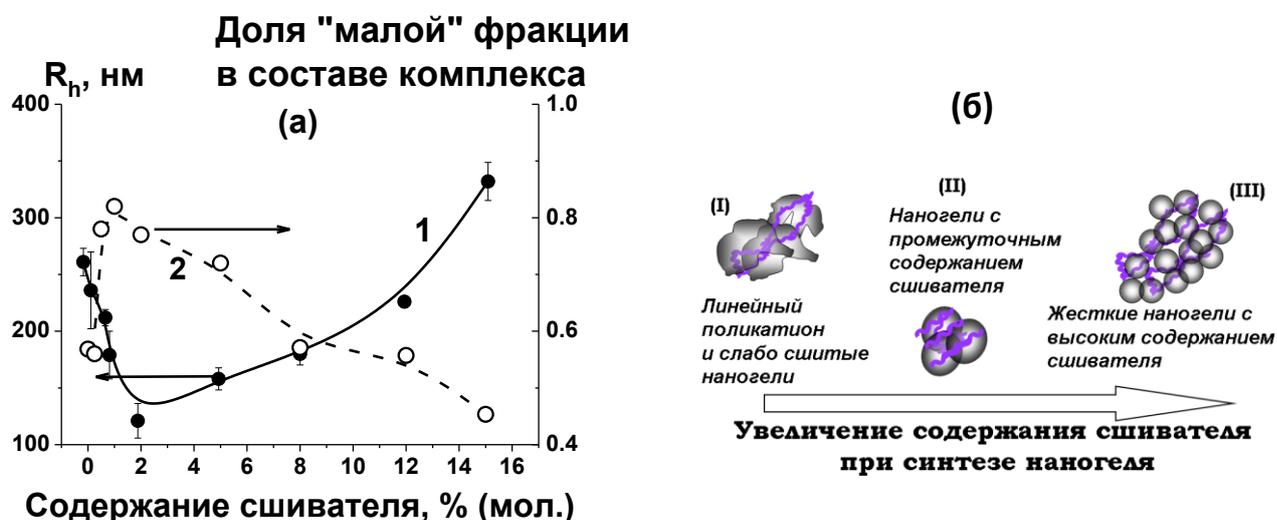


**Рисунок 7.** АСМ-изображения комплексов ДНК с линейным ПДМАЭМА (а), наногелем, содержащим 2% (б) и 12% (в) сшивающего агента при  $[N]/[P]=7.5$ . Стрелками показаны агрегированные частицы комплексов, образованных наногелями с 12% сшивающего агента. Справа показана цветовая шкала высот.

Однотипная сферическая форма частиц комплексов плазмидной ДНК со всеми исследованными наногелями дает возможность рассчитывать размеры комплексов по коэффициенту диффузии, измеряемому методом динамического светорассеяния (рис. 8 (а)).

Изучение комплексов наногелей с ДНК методом динамического светорассеяния показало, что в комплексах всегда присутствовали две сильно различающиеся по размеру фракции. Изменение содержания сшивающего агента, использованного при синтезе наногелей, влияло как на размер малой фракции, так и на её долю. При этом гидродинамический радиус этих фракций проходил через минимум при 2% сшивающего агента (рис. 8 (а), кривая 1), и в этой же точке достигалось максимальное содержание этой фракции в составе комплекса (рис. 8 (а), кривая 2).

Данный результат находится в полном соответствии с данными АСМ. Таким образом, размеры комплексов ДНК с поликатионами зависят не только от состава комплекса, что было известно ранее, но также и от содержания сшивателя в составе наногеля.



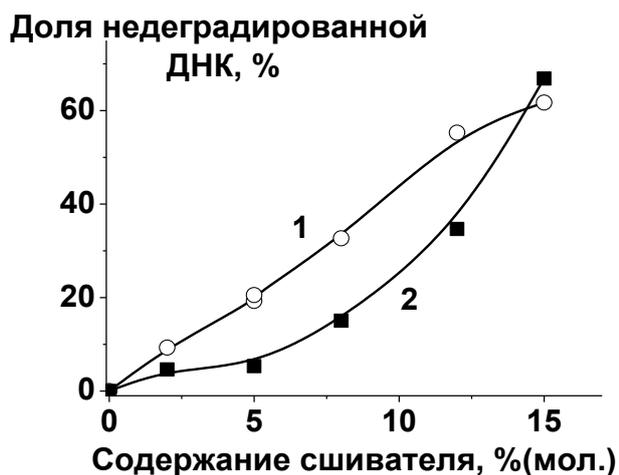
**Рисунок 8. (а)** Зависимость среднего гидродинамического радиуса  $R_h$  (кривая 1) и доли фракции малого размера (кривая 2) в составе комплексов плазмидной ДНК с поликатионами состава  $[N]/[P] = 7,5$  от содержания сшивателя в полимеризационной смеси; **(б)** схематическое изображение причин изменения размеров комплексов плазмидной ДНК (показана фиолетовым цветом) с поликатионами (показаны серым) при увеличении среднего содержания сшивателя в частицах.

Для объяснения обнаруженной повышенной способности наногелей с 2% сшивателя вызывать конденсацию ДНК необходимо принять во внимание два фактора: уменьшение размеров наногелей и увеличение их жёсткости с ростом содержания сшивателя. По мере увеличения количества сшивателя в составе наногеля должно уменьшаться среднее расстояние между узлами сетки ( $m_c$ ), вследствие чего при увеличении степени сшивки до 2-3% увеличивается размер предельно набухших частиц. Можно предположить, что это является причиной увеличения размеров комплексов поликатионов с ДНК при изменении содержания сшивателя до 2% (рис. 8 (б) I). Дальнейшее увеличение содержания сшивателя должно приводить к существенному увеличению жёсткости (уменьшению деформируемости) наногелевых частиц. Поэтому при образовании комплекса они не могут подстраивать свою конформацию под структуру ДНК. Вследствие этого, будучи добавленными к ДНК в большом избытке, частицы формируют на поверхности комплекса толстую полимерную оболочку (рис. 8б, III). При содержании сшивателя около

2-5% эти факторы, по всей видимости, уравниваются, что и способствует формированию малых частиц (рис. 8б II).

### 3.4 Защитная функция наногелей

Известно, что в сыворотке крови и клеточной среде содержатся нуклеазы, которые гидролизуют фосфодиэфирные связи в молекуле ДНК. Комплексообразование с поликатионами, как правило, стабилизирует ДНК от деградации под действием нуклеаз. Известно, что линейная плотность заряда на поликатионе и его молекулярная масса являются основными факторами, определяющими защитное действие поликатиона. Поскольку выше было показано, что структура комплекса с ДНК может меняться при варьировании содержания сшивателя в наногеле (рис. 7 и 8), можно было ожидать, что и защитные свойства поликатиона также могут меняться при изменении этого параметра. Поэтому мы исследовали влияние наногелей на степень деградации плазмидной ДНК под действием нуклеазы.



**Рисунок 9.** Зависимость доли недеградированной плазмидной ДНК в составе комплекса с наногелями  $[N]/[P]=15$  (кривая 1) и  $[N]/[P]=30$  (кривая 2) от содержания сшивателя в полимеризационной смеси наногелей, полученная денситометрией электрофоретических гелей.

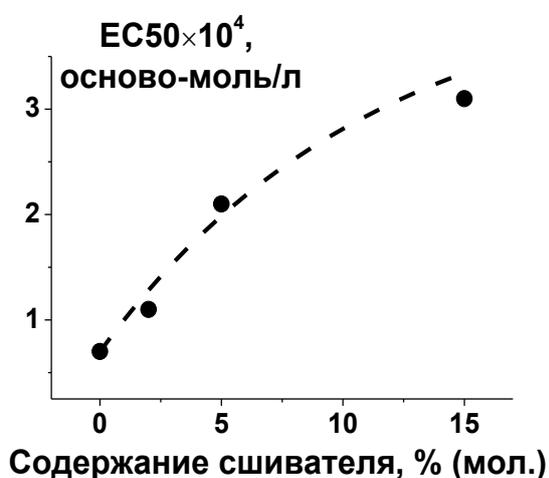
Для этого плазмидную ДНК и ее комплексы с поликатионами подвергали воздействию эндонуклеазы ДНКазы I в течение фиксированного времени и оценивали количество не расщепленной ДНК методом гель-электрофореза. Было показано, что наногели защищают ДНК от деградации более эффективно, чем линейный полимер, при этом степень защиты возрастает при повышении доли сшивателя (рис. 9).

Можно предположить, что повышение защитного действия сетчатых полиэлектролитов по мере увеличения содержания сшивателя объясняется тем, что при этом увеличивается жёсткость макромолекулы и поэтому уменьшается способность поликатиона образовать компактные комплексы с

ДНК. В условиях избытка поликатиона на поверхности комплекса сорбируются избыточные количества наногелевых частиц, в результате чего образуется достаточно толстый слой полимера, экранирующий ДНК от нуклеазы. Это объяснение хорошо согласуется с описанным выше ростом размера частиц комплексов при увеличении содержания сшивателя более 5% (рис. 7 и 8).

### 3.5 Цитотоксичность наногелей

Для количественной оценки цитотоксичности наногелей был использован метод прижизненного окрашивания клеток метилтетразолиевым синим (МТТ). В качестве параметра, отражающего цитотоксичность полимеров, использовалась концентрация полимера, вызывающая гибель половины клеток в культуре (EC50).



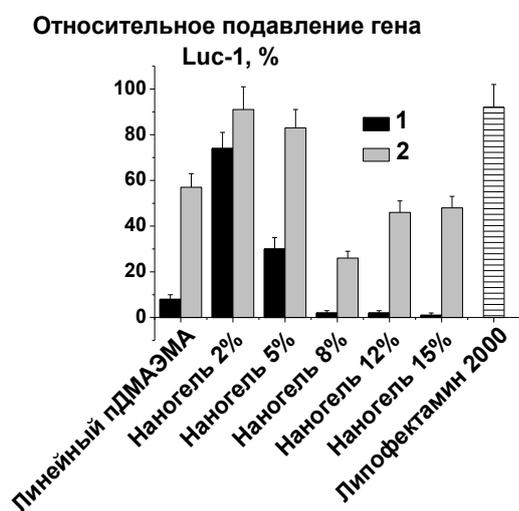
**Рисунок 10.** Зависимость концентрации наногелей ПДМАЭМА, вызывающей гибель 50% клеток (EC50) яичников китайского хомячка СНО в культуре, от содержания сшивающего агента, использованного при синтезе наногелей.

Чем выше величина EC50 данного соединения, тем ниже его цитотоксичность. Оказалось, что EC50 наногелей увеличивалась, т.е. их цитотоксичность уменьшалась, с ростом содержания сшивателя (рис. 10). Известно, что цитотоксичность полиаминов в основном определяется их взаимодействием с анионными центрами на клеточных мембранах. Обнаруженное нами уменьшение цитотоксичности сетчатых поликатионов с ростом содержания сшивателя, по всей видимости, объясняется снижением количества доступных аминогрупп в сильно сшитых наногелях.

### 3.6 Влияние наногелей на доставку малой интерферирующей РНК в живые клетки

Влияние поликатионов на доставку нуклеиновых кислот в живые клетки было исследовано на примере рибонуклеиновой кислоты (РНК). В данной серии экспериментов были использованы клетки СНО, содержащие искусственно введенный ген светляковой люциферазы. Для подавления

синтеза этого фермента в клетках использовали малую интерферирующую РНК (миРНК), которая способствует расщеплению матричной РНК (мРНК) люциферазы, и таким образом снижает количество фермента в клетках. В качестве контроля использовали миРНК, направленную к матричной РНК Р-белка респираторно-синтициального вируса (РСВ)<sup>1</sup>.



**Рисунок 11.** Относительное подавление активности люциферазы в клетках CHO-LUC1 при добавлении к ним полиплексов миРНК, расщепляющей мРНК фермента, при [N]/[P]=7.5 (1) и 15 (2). Относительное подавление вычислялось по формуле  $100\% \cdot \left(1 - \frac{A(aLUC1)}{A(aRSV)}\right)$ , где  $A(aLUC1)$  - активность фермента в клетках, обработанных комплексами с миРНК против мРНК люциферазы, а  $A(aRSV)$  - активность люциферазы в клетках, обработанных таким же количеством комплексов неспецифической миРНК против Р-гена РСВ.

Оказалось, что влияние наногелей на доставку миРНК существенно зависит от содержания сшивателя (рис. 11): наибольшую эффективность проявляли комплексы, образованные наногелями с 2% и 5% сшивателя в полимеризационной смеси. При дальнейшем увеличении содержания сшивателя активность наногелей уменьшалась. Комплексы состава [N] / [P] = 7.5 были гораздо менее эффективны.

Обнаруженная зависимость эффективности наногелей от содержания сшивателя может быть следствием суперпозиции двух явлений. С одной стороны, как было показано выше (рис. 8), размер комплексов наногелей с нуклеиновой кислотой при варьировании содержания сшивателя проходит через минимум, положение которого (около 2-3% сшивающего агента) как раз совпадает с максимумом эффективности поликатионов. Поскольку, по данным литературы, наиболее сильное влияние на транспорт нуклеиновых кислот оказывают комплексы размером порядка 100-200 нм, что соответствует

<sup>1</sup>Линия клеток CHO-LUC и оба препарата миРНК были любезно предоставлены к.б.н. Е.Б. Файзуловым (Институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН) в рамках совместной работы.

комплексам с наногелем, полученным с 2% сшивателя (рис. 8), увеличение активности сетчатых поликатионов при 2% сшивающего агента и её уменьшение при дальнейшем повышении содержания сшивателя представляется вполне объяснимым.

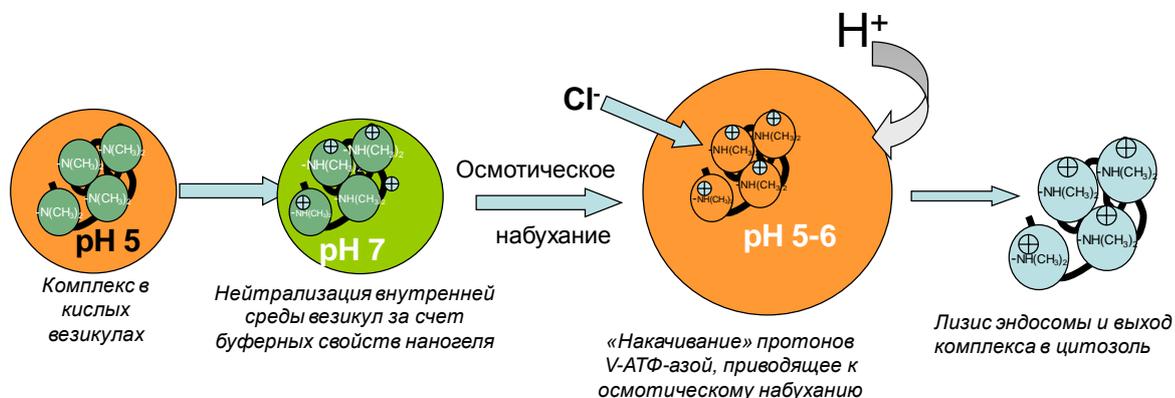
С другой стороны, более высокую по сравнению с линейным полимером эффективность наногелей можно объяснить недоступностью значительной части аминогрупп для фосфатных групп нуклеиновой кислоты. Эти аминогруппы, локализованные внутри частиц наногеля, могут присоединять протоны и, следовательно, проявлять буферные свойства. При попадании в слабокислую среду эндосом и лизосом несвязанные в комплекс аминогруппы протонируются, вызывая осмотическое набухание везикул по механизму «протонной губки» и их дальнейшее разрушение, что приводит к выходу комплекса в цитозоль клетки.

Эффективность доставки плазмидной ДНК pGI3, содержащей ген люциферазы, также проходила через максимум при содержании сшивателя 2% (мол.) и 5% (мол.). Однако, несмотря на то, что введение сшивок в состав ПДМАЭМА существенно (более, чем на порядок) увеличивало трансфекцию, эффективность наногелей по отношению к плазмидной ДНК в несколько десятков раз уступала трансфекционной активности полиэтиленимина и Lipofectamine 2000. Одно из возможных объяснений этого результата состоит в том, что экспрессия гена люциферазы возможна только при проникновении плазмидной ДНК внутрь ядра, а наногели гораздо менее эффективно преодолевают барьер ядерных мембран, чем ПЭИ.

Эффективность комплексов наногелей с миРНК была близка к эффективности липофектамина, являющегося «золотым» стандартом трансфекции. Это означает, что наногели с промежуточным содержанием сшивателя (2-5%) способны эффективно компактизовать нуклеиновые кислоты и обеспечивать преодоление лизо/эндосомального барьера.

Выход комплекса поликатиона и нуклеиновой кислоты из эндосом и лизосом, как правило, происходит вследствие разрушения мембраны этих органелл. В случае наногелей это могло быть обусловлено механизмом «протонной губки». Данный механизм заключается в том, что полиамины, способные протонироваться при рН 5-6, что соответствует кислотности

внутренней среды эндосом и лизосом, стимулируют работу протонного насоса V-АТФазы, что приводит к осмотическому набуханию и разрыву эндосомальных мембран (рис. 12). Чтобы проверить эту гипотезу мы исследовали влияние сетчатых поликатионов на рН внутренней полости эндосом и их целостность в эукариотических клетках.



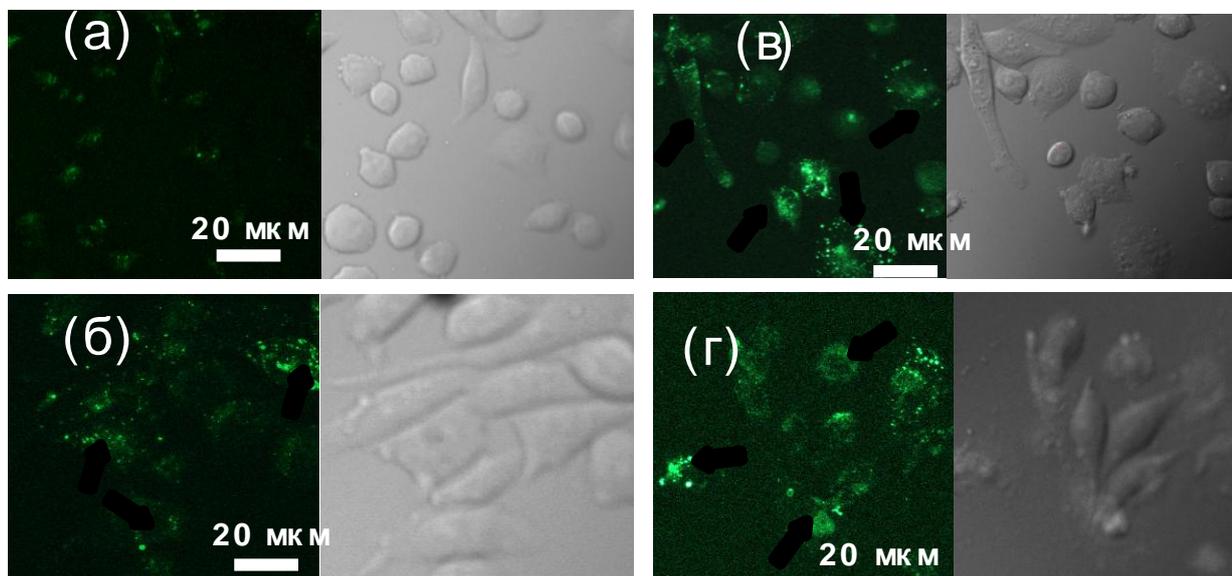
**Рисунок 12.** Схема, иллюстрирующая механизм действия «протонной губки».

### 3.7 Влияние наногелей на целостность эндосом

Для изучения влияния поликатионов на целостность эндосом в живых клетках мы использовали подход, основанный на использовании гидрофильного флуоресцентного рН-индикатора кальцеина. Поскольку молекула кальцеина имеет 4 карбоксильные группы, он практически не связывается с клеточными мембранами и проникает в клетку только путём эндоцитоза (процесса захвата внешнего материала клеткой, осуществляемый путём образования мембранных везикул). В кислой среде эндосом флуоресценция кальцеина в значительной степени понижена вследствие протонирования его ароматического гидроксила, входящего в состав хромофорной части молекулы. Однако при выходе кальцеина из кислых компартментов в цитозоль, где рН около 7, флуоресценция повышается, что дает возможность следить за целостностью эндосом с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии.

После кратковременной (30 мин) инкубации клеток с красителем в достаточно высокой концентрации (3 мМ) можно было наблюдать флуоресценцию в органеллах на периферии клеток (эндосомах). Последующая инкубация этих клеток с комплексом линейного ПДМАЭМА не приводила к изменению распределения флуоресценции в клетках (рис. 13а).

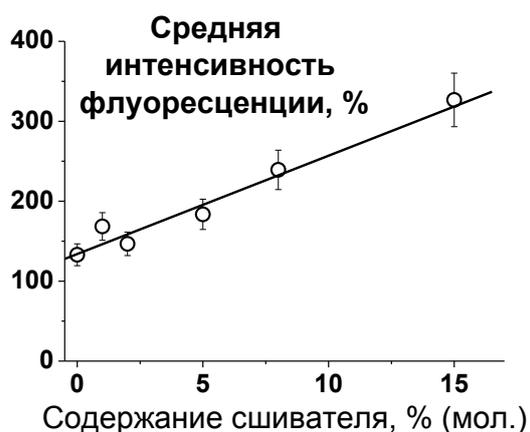
Однако инкубация обработанных кальцеином клеток с комплексами наногелей (рис. 13б, в) приводила к появлению диффузного окрашивания цитозоля, на фоне которого различимы ярко светящиеся точки. Влияние наногелей на внутриклеточную флуоресценцию кальцеина сопоставимо с влиянием полиэтиленimina (рис. 13г), способность которого разрушать эндосомы по механизму «протонной губки» была показана ранее.



**Рисунок 13.** Анализ эндосомального pH и целостности лизосом в клетках по флуоресценции кальцеина. Клетки CHO сначала инкубировали с 3 мМ кальцеина и затем обрабатывали комплексами линейного ПДМАЭМА (а), наногелей 2% (б), 8% (в) или ПЭИ 25 кДа (г) с плазмидной ДНК при  $[N]/[P]=7.5$ . На левых панелях показаны изображения, полученные методом сканирующей конфокальной микроскопии, а на правых - изображения того же поля, полученные методом дифференциального интерференционного контраста.

Увеличение яркости светящихся точек внутри клеток указывает на повышение эндосомального pH. В то же время появление диффузно окрашенных областей свидетельствует о вытекании кальцеина в цитозоль. Для получения количественной информации о способности наногелей вызывать разрушение эндосом был проведен анализ большого количества изображений и усреднена интенсивность флуоресценции 150-300 клеток в каждом образце. Средняя интенсивность флуоресценции клеток возрастала с увеличением содержания сшивателя в полимеризационной смеси наногелей (рис. 14), что свидетельствует о том, что сетчатая структура поликатиона увеличивает его способность вызывать разрушение кислых эндосом.

При pH 7.4, соответствующем кислотности среды вне и внутри клеток, степень протонирования ПДМАЭМА составляет около 40%, поэтому можно было ожидать, что этот полимер может дополнительно протонироваться при попадании в эндосомы и повышать в них pH. Тем не менее, в соответствии с данными литературы, линейный ПДМАЭМА не вызывал разрушения эндосомальных везикул. Видимо это объясняется тем, что при его взаимодействии с полианионами на поверхности клетки (сульфированные полисахариды (синдеканы) и гиалуроновые кислоты) происходит ионизация свободных аминогрупп, снижающая буферные свойства поликатиона.



**Рисунок 14.** Зависимость средней интенсивности флуоресценции клеток СНО, предобработанных кальцеином, а затем наногелями ПДМАЭМА, от содержания сшивателя в полимеризационной смеси.

Согласно нашим данным, введение в поликатион лишь 2% сшивателя делает более половины его аминогрупп недоступной для взаимодействия с полианионами (рис. 3 и 4). Эти свободные группы после попадания наногеля в эндосомы полностью протонируются при pH 5, что приводит к увеличению pH (рис. 13б). В результате этого должна увеличиваться активность протонного насоса (V-АТФазы), поддерживающего кислотность содержимого эндосом. При этом в водную полость эндосом накачиваются избыточные количества протонов и хлорид-анионов. Наши приблизительные оценки показали, что вызываемый наногелями ПДМАЭМА осмотический градиент соответствует измеренным в литературе градиентам концентрации хлорид-анионов, вызываемым полиамидамином или полиэтиленимином. Созданный наногелем градиент концентрации анионов приводит к разрыву эндосомальных мембран, что и наблюдалось в эксперименте (рис. 14). Этот эффект имеет существенное значение для понимания причин повышенной трансфекционной активности поликатионов, имеющих сетчатую или разветвленную структуру.

Таким образом, в настоящей работе впервые продемонстрировано значение сетчатой архитектуры слабых поликатионов для их взаимодействия с клетками и доставки нуклеиновых кислот.

## **Выводы**

1. Разработан метод получения катионных наногелевых частиц со средним гидродинамическим радиусом около 25 - 50 нм в зависимости от количества сшивателя, основанный на эмульсионной радикальной полимеризации N,N-диметиламиноэтилметакрилата и N,N'-метиленакриламида в обращенных мицеллах олеилдекаэтиленгликоля в циклогексане. Впервые показано, что индекс полидисперсности частиц резко снижается с увеличением количества добавленного сшивателя N,N'-метиленакриламида и достигает величины 0.07 при 2% сшивающего агента.

2. Обнаружено, что введение сшивателя N,N'-метиленакриламида в полиамин не влияет на его кислотно-основные свойства, т.е. аминогруппы сетчатых поликатионов полностью доступны для протонирования низкомолекулярной кислотой. При этом для высокомолекулярных соединений - полистиролсульфоната натрия и ДНК - часть аминогрупп в катионных наногелях недоступна.

3. Впервые установлено, что с увеличением количества добавленного сшивателя N,N'-метиленакриламида и молекулярной массы полианиона уменьшается доля аминогрупп, принимающих участие в формировании полиэлектролитных комплексов.

4. Впервые показано, что количество добавленного сшивателя N,N'-метиленакриламида определяет цитотоксичность наногелей, их способность защищать нуклеиновые кислоты от ферментативного гидролиза и обеспечивать введение нуклеиновых кислот в клетки. Впервые обнаружено, что сетчатая структура слабых поликатионов обуславливает их способность вызывать осмотическое набухание и разрушение клеточных эндосом.

## **Список используемых сокращений**

**ПАВ** – поверхностно-активное вещество;

**ДМАЭМА** – N,N – диметиламиноэтилметакрилат;

**МБА** – N,N` - метилен-бис-акриламид;

**ПДМАЭМА** – поли - N,N – диметиламиноэтилметакрилат;

**АСМ** – атомно-силовая микроскопия;

**ПСС** – полистиролсульфонат натрия;

**ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота;

**ЕС50** – концентрация полимера, вызывающая гибель 50% клеток в культуре;

**АТФ** – аденозинтрифосфат;

**СНО** – клетки яичников китайского хомяка;

**РНК** – рибонуклеиновая кислота;

**миРНК** – малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота;

**мРНК** – матричная рибонуклеиновая кислота;

**РСВ** – респираторно-синтициальный вирус.

### **Список печатных работ по теме диссертации**

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК РФ, а также индексируемых по базе Web of Science:

1. Maksimova E.D., Faizuloev E.B., Izumrudov V.A., Litmanovich E.A., Melik-Nubarov N.S. «Synthesis of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) nanogels in reverse micelles for delivery of plasmid DNA and small interfering RNAs into living cells» // Polymer Science - Series C, 2012, V. 54, № 1, P. 69–79. DOI: 10.1134/S1811238212040029.

(Максимова Е.Д., Файзулов Е.Б., Изумрудов В.А., Литманович Е.А., Мелик-Нубаров Н.С. «Синтез наногелей поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилата в обращенных мицеллах для доставки плазмидной ДНК и малых интерферирующих РНК в живые клетки» // Высокомолекулярные соединения. Сер. С, 2012, Т. 54, № 7, С. 1036-1047).

2. Maximova E.D., Faizuloev E.B., Kotova S.L., Solov'eva A.B., Izumrudov V.A., Litmanovich E.A., Kudryashova E.V., Melik-Nubarov N.S. «Cross-linking as a tool for enhancement of transfection efficiency of cationic vectors» //European Polymer Journal, 2015, V. 69, P. 110–120. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.05.024.

3. Maximova E.D., Zhiryakova M.V., Faizuloev E.B., Nikonova A.A., Ezhov A.A., Grozdova I. D., Melik-Nubarov N. S. «Cationic nanogels as Trojan carriers for disruption of endosomes» // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, V.136, P. 981–988. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.10.051.

Тезисы докладов на научных конференциях:

1. Мелик-Нубаров Н.С., Максимова Е.Д., Изумрудов В.А., Никонова А.А., Файзулов Е.Б., Ежов А.А. «Значение сетчатой структуры катионных наногелей для их способности облегчать доставку нуклеиновых кислот в живые клетки» // Сборник тезисов докладов Шестой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2014», Москва, 2014, С. 148.

2. Vishnevetsky D., Chernikova E., Melik-Nubarov N., Maximova E. «Design of polycationic carriers for synthetic interfering RNA delivery, specifically suppressing respiratory viruses reproduction» // Proceedings of Baltic Polymer Symposium, Liepaja, Latvia, 2012, Book of Abstracts, P. 87 – 88.

3. Maximova E.D., Faizuloev E.B., Izumrudov V.A., Melik-Nubarov N.S. «Cationic nanogels as vehicles for gene and siRNA delivery in cell cultures» // 76<sup>th</sup> Prague meeting on macromolecules «Polymers in Medicine», Book of Abstracts, Prague, Czech republic, 2012, P. 98.

4. Максимова Е.Д., Файзулов Е.Б., Изумрудов В.А., Литманович Е.А., Мелик-Нубаров Н.С. «Значение сетчатой структуры катионных наногелей для эффективной трансфекции клеток млекопитающих» // Материалы конференций молодых ученых НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, 2008-2013 гг. [Электронный ресурс], Киров: МЦНИП, 2013, 1 электрон. опт. диск (CD-ROM), С. 170.

5. Максимова Е.Д., Вишневецкий Д.В. «Разработка поликатионных носителей для доставки синтетических интерферирующих РНК, специфически подавляющих репродукцию респираторных вирусов in vitro и in vivo» // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2012» [Электронный ресурс], М.: МАКС Пресс, 2012, 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM), С. 92.

6. Максимова Е.Д., Файзулов Е.Б. «Комплексообразование наногелей на основе N,N-диметиламиноэтилметакрилата с нуклеиновыми кислотами» // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» [Электронный ресурс], СПб: Издательство. - 2012.- 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).- с.391-393.