

Введение Стратегии эффективной систематической доставки противораковых лекарств остаются ключевым аспектом успешного внедрения новых методов лечения рака. Использование наночастиц для направленной доставки терапевтических препаратов в область опухоли является одним из наиболее успешным и клинически перспективным аспектов в нанотехнологиях. Так, наноразмерные гидрогели (наногели) использовались в фармацевтике для развития новых методов лечения и диагностических методов. Они были созданы для получения различных соединений и даже частиц через взаимодействие электростатических, гидрофобных и водородных связей. Наногели являются очень перспективными соединениями при доставке лекарств, благодаря высокой способности к большим нагрузкам, высокой устойчивости и чувствительности к таким факторам окружающей среды, как ионные силы, pH и температура. В данной статье описывается новый тип ионных наногелей с регулируемым пространственным распределением полимерных цепочек и обсуждается возможности применения данных наногелей как носителей при доставке противораковых лекарств, также как и особенности их взаимодействия с клетками, перераспределение в тканях и токсичность. Методы Для получения ионных наногелей были использованы двойные гидрофильные блок сополимеры (графт-сополимеры), содержащие неионные и анионные полимерные сегменты ("блок" иономеры) [1]. Сочетание физико-химических методов (1H ЯМР, гель-проникающая хроматография, статическое и динамическое рассеяния света (ДРС), потенциометрическое титрование, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и атомная силовая микроскопия (АСМ)) применялось для измерения размера, состава, электрокинетического потенциала, формы и структуры этих материалов. Химиопрепараты (доксорубин (DOX) и цисплатин (CDDP) вводились в наногели простым смешением, в то время как несвязанное лекарство выделялось колонной NAP-10 и фильтрованием на фильтрах Amicon YM-30 с предварительной обработкой лекарства. Остаток Pt был проанализирован с помощью Масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой (ICP- MS), а остаток доксорубина - с помощью УФ-спектрометра. Далее наногели взаимодействовали с фолиевой кислотой через химию дивинилсульфонов [2]. Получение активных наногелей фолиевой кислоты было подтверждено поверхностным плазмонным резонансом при использовании фолатносвязанных белков, иммобилизованных на золотой сенсорный чип с нанесением декстрана. Конфокальный анализ флуоресценции сортированных клеток и иммуногистохимическое исследование применялись для изучения проникновения наногеля в раковые и здоровые клетки. На живых организмах биораспределение, фармакокинетика и эффективность терапии направленных и ненаправленных наногелей с загрузкой лекарства тестировались на животной модели с раком яичников. Результаты Получение и характеристика наногелей Синтез наногелей на подложке включает в себя самосборку и последующую

самосшивку двойных гидрофильных блок сополимеров поли(этилен оксид)-б-поли(метакриловая кислоты) (ПЭО-б-ПМК), как показано на рис.1. Таким образом, (ПЭО-б-ПМК) блок сополимеры были сначала сконденсированы CaCl_2 , что привело к образованию мицелл с оболочкой ПЭО и сложным ядром ПМК/ Ca^{2+} . Далее ядро было химически сшито с этилендиамином в присутствии водорастворимого карбодиимида, а ионы Ca^{2+} были удалены этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТУ). Полученные полимерные мицеллы представлены полностью гидрофильными наногельными структурами с размерами 100-200 нм с набухшими ядрами сшитой ПМК, окруженной оболочкой ПЭО [1, 3, 4]. Эти наногели существенно набухали с ростом pH из-за ионизации цепей ПМК в ядрах. Они имели сферическую структуру (рис. 1 В) и были практически однородны (такая узкая полидисперсность также подтверждалась результатами ДРС). Молярное соотношение этилендиаминных функциональных групп к группам карбоновой кислоты использовалось для контроля степени сшитости и pH чувствительности набухания наногелей. Набухание сопровождалось увеличением отрицательного заряда в цепи и было полностью обратимым. Наногели оставались устойчивыми при физиологических условиях в широких пределах концентраций (до 1,5% масса/объем) и не агрегировали с прошествием месяцев. Мы продемонстрировали, что разработанный подход синтеза наногелей является надежным и универсальным и позволяет создавать модификации с “мягким” ядром (т.е. сополимерный состав, гидрофобность сшивателя) и таким составом оболочки, который вследствие регулирует макроскопические свойства наногелей [3-5].

Рис. 1 - А) Схема получения наногелей на подложке; (В) Изображение наногеля, полученные атомной силовой микроскопией (АСМ) Загрузка и высвобождение лекарства Противораковые препараты, доксорубин и цисплатин, были успешно введены в ионные ядра наногелей с существенно высокой эффективностью (до 50% масса/объем доксорубина и 42% масса/объем для цисплатина) [6, 7]. В обоих случаях наблюдалось уменьшение размера и отрицательного заряда наногелей, что согласуется с нейтрализацией карбоксилатных групп лекарства. Загрузка лекарства сильно зависит от степени сшитости полимера и уменьшается при увеличении плотности сшивки. Наногели с загруженным лекарством сохраняли стабильность диспергирования частиц, могли подвергаться сублимированной сушке и полностью восстанавливаться в водной дисперсии практически без изменения своего начального размера. Наногели с загруженным лекарством показывали устойчивость и pH чувствительность при высвобождении лекарства, что можно было контролировать изменением степени сшитости ядра [6, 7]. Примечательно, что наногели с загрузкой цисплатином высвобождали биологически активные элементы Pt, способные образовывать аддукты при условиях, близких к внутриклеточной среде [6]. Неравномерная доставка и

цитотоксичность наногелей, загруженных лекарством Мы продемонстрировали, что наногели быстро переходят в эпителиальные клетки рака и перемещаются в лизосомы [8]. Поглощение клеткой наногеля в клетках рака происходит преимущественно через ямочно-индуцированный эндоцитоз. В противоположность этому, в сливающихся здоровых эпителиальных клетках этот маршрут эндоцитоза отсутствовал на апикальной (верхушечной) стороне и наногели изолировались в регионах плотного соединения клеточной мембраны, не входя в клетки. Разрыв плотного соединения от недостатка кальция приводит к перераспределению наногеля внутри клетки. Используя наногели с доксорубицином, которые соединены с ПМК-цепями через рН-чувствительную гидразоновую связь, мы демонстрируем, что наногели, загруженные лекарством направляются в лизосомы, где лекарство освобождается через рН-зависимый механизм, и выставляется избирательная токсичность для раковых клеток, но является нетоксичной для нормальных эпителиальных клеток, которые формируют плотные соединения [8]. Эти данные позволяют предположить, что ионные наногели проявляют способность проникать в клетки рака, но не в здоровые эпителиальные клетки, благодаря способности обнаруживать различия в механизмах эндоцитоза между этими клетками. Как и ожидалось, цитотоксичная активность доксорубицина (DOX) и цисплатина (CDDP) значительно снизилась после введения в наногели. Важно, что было обнаружено, что наногели сами по себе нетоксичны во всем диапазоне концентраций, используемых для лечения препаратами на основе наногеля. Следует отметить, что временное накопление Pt было значительно выше в раковых клетках, обработанных

Таблица 1 - Цитотоксический эффект наногелей, загруженных доксорубицином (DOX) или цисплатином (CDDP) в карциномных клетках яичников A2780 (n=8)

Образец	IC50 (mg/mL)	Относительный индекс
DOX	0.024	1
Деградируемые наногели	0.058	2.5
Недеградируемые наногели	0.381	16.2
CDDP	0.254	1
Деградируемые наногели	1.082	4.3
Недеградируемые наногели	5.997	23.7

aIC50представляет концентрацию для лекарства для 50% ингибирования в лабораторных условиях bОтносительный индекспредставляетсоотношениеIC50между контрольным соединением и наногелями в сравнении. С помощью наногелей с цисплатином (CDDP) по сравнению с теми, получившими только цисплатин, но без наногеля (CDDP) [6]. Образцы с Pt образовали аддукты Pt с ядерной ДНК, хотя и в меньшей степени по сравнению со свободным лекарством без наногеля. Такое уменьшение соотносится с медленным высвобождением лекарства из наногелей и, таким образом, уменьшает цитотоксичность лекарственных соединений (табл. 1). Наногели с биоразлагаемыми сшивающими агентами Мы предположили, что внутриклеточное разложение наногелей может усилить высвобождение лекарства. Это подтвердилось с помощью использования наногелей с низкоустойчивыми дисульфидными связями в ядрах (цистамин был использован

в качестве биоразлагаемого сшивающего агента) [9, 10]. В присутствии восстанавливающего агента (например, глутатион) такие наногели быстро разлагались [10-12]. Значительное ускорение выхода лекарственного препарата наблюдалась в присутствии глутатиона или цистеина в среде высвобождения в сравнении с нередуктивной средой. Эти различия были указывали на более высокую цитотоксическую активность разлагаемых наногелей, загруженных лекарством (табл. 1). Противоопухолевая активность наногелей, загруженных лекарством, у мышей Биораспределение и фармакокинетикананогелей, загруженных лекарством, тестировались на женских особях мышей, носителях ксенотрансплантатов A2780. Соединения наногелей показывали продолжительное сохранение препарата в циркуляции крови, что привело к увеличению уровня лекарства и времени пребывания в опухоли. Кроме того, концентрация доксорубицина (DOX) в сердце, почках и легких была значительно снижена наногелями, загруженными доксорубицином. Аналогично, наногели загруженные цисплатином (CDDP) демонстрируют показатели, примерно в 3 раза ниже максимальной концентрации Pt в почках - главного органа показывающего токсичность цисплатина (CDDP), чем мышей, обработанных только цисплатином без наногелей (CDDP). Органы, ответственные за удаление наногелей из кровотока, печени и селезенки имели повышенное содержание лекарства. Однако, такое накопление не приводит к нежелательным токсическим действием. Патологическая гистология тканей не выявила никаких изменений в почках, печени и селезенки в любой группе лечения наногелями. Значительное снижение роста опухоли ($p < 0,05$) по сравнению со свободным лекарством без наногеля наблюдалось при лечении обоими типами состава наногелей, в то время как пустые наногели не демонстрировали тормозящего эффекта на рост опухоли. Важно отметить, что у животных, обработанных наногелями с лекарством, значительно снизился показатель токсичности по сравнению с чистым препаратом без наногеля ($p < 0,05$). Направленность наногелей с лекарством Для дальнейшего накопления лекарства в участках опухоли и, тем самым, повышения его эффективности мы исследовали возможность поиска путей направленной доставки наногелей к опухоли. С этой целью, наногели были соединены с фолиевой кислотой (ФК) для направления фолатных рецепторов (ФР), которые сильно проявляются при раке яичников, но почти незаметны в здоровых тканях [2]. Плотность лигандов фолиевой кислоты была оптимизирована для поддержания высокой нагрузки лекарством, стабильности дисперсии и клеточного поглощения наногелей. Такие оптимизированные наногели с фолиевой кислотой избирательно доставляют лекарство в отмеченные клетки с ФР, что приводит к относительно высокой цитотоксичной активности по сравнению с ненаправленными наногелями без ФР. Животные, которым ввели наногели фолиевой кислоты с цисплатином демонстрировали гораздо большее содержание Pt в опухоли по сравнению с

обычной цистопластиной и ненаправленными наногелями/цитопластом (рис 2а), что приводит к статистически значимому торможению роста опухоли по сравнению с ненаправленными наногелями наряду со снижением системной токсичности (рис. 2 b, c) [2]. Стоит отметить, что направленность в опухоль и противоопухолевый эффект были ингибированы свободной фолиевой кислотой, предполагая что наногели с фолиевой кислотой покажут избирательность фолата и обладают

Рис. 2 - Противоопухолевое действие наногелей с цисплатином (CDDP) в женских особях мышей, носителях человеческих ксенотрансплантатов рака яичников A2780: а - накопление Pt в опухоли на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой (ICP- MS). Мыши были препарированы на 4 день после получения внутривенных инъекций (1) CDDP; 2 - CDDP/наногелей; 3 - CDDP/ФК- наногелей; 4 - смеси 1 мг/кг ФК и CDDP/ФК- наногеля. n= 4-5 (опухолей), *р 0.05, **р 0.01, ***р 0.001; b - Рост опухоли и (c) потеря веса тела после фиксирования соединений CDDP с дозой 4 мг CDDP эквивалент/каждый 4й день как показано стрелками. n= 7-8, *р 0.05, **р 0.01, NS - незначительные значения повышенной активностью через определенный механизм фолата при исследовании на живом организме. В случае с наногелями, загруженными доксорубицином, оба наногеля (с фолиевой кислотой и без нее) показали сравнительную противоопухолевую активность. Эти данные позволяют предположить, что направленные наногели принесут больше выгоды при доставке лекарства с более медленной кинетикой высвобождения. Выводы

Блок иономерные соединения, созданные на основе двойных гидрофильных сополимеров (ПЭО-б-карбоксилат-анионов) и ионов двухвалентных металлов были использованы для регулируемого синтеза на подложке нового типа мягких функциональных наноматериалов-ионных наногелей. Важно отметить, что разработанный подход синтезирования наногелей является надежным и универсальным и позволяет создавать соединения с ядром и оболочкой, которые впоследствии регулируют макроскопические свойства наногелей. Ионные наногели показали свою перспективность и универсальность в качестве макромолекулярной платформы для направленной доставки носителей заряженных противораковых лекарств или исследуемых молекул. Мы уверены, что рациональное проектирование общей структуры наногелей, в частности, их ионных ядер, может послужить эффективным инструментом для регулирования скорости высвобождения лекарств, для оказания влияния на взаимодействие опухоли/клеток хозяина и для достижения желаемого терапевтического эффекта. Наногели с лекарством показали продолжительную циркуляцию крови и увеличенное накопление в опухоли. При испытании на животной модели мыши наногели показали улучшенные ответы на опухоли, чем препараты с чистым лекарством без наногеля. Исследования на токсичность наногелей, загруженных лекарственным препаратом, выявили лучшие результаты исследования безопасности препарата, чем препараты на основе чистого лекарства. Мы также

показали эффективность отдельного антиракового лекарства: цисплатина, доставленного до ксенотрансплантатной опухоли при использовании таких наногелей на основе фолатных рецепторов. Таким образом, терапия, основанная на применении наногелей, может рассматриваться как эффективный способ лечения рака и открывает новые перспективы клинического развития подобных наносоединений.