

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра химии природных соединений

Терехов Станислав Сергеевич

**Биосовместимые полиэлектролитные микрогели для
систем направленной доставки лекарств**

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Научный руководитель:

д. ф.-м. н., проф. Виноградова О.И.

МОСКВА

2012

Оглавление

Список сокращений	4
1. Введение	6
2. Обзор литературы	7
2.1. Проблема противоопухолевой терапии и принципы направленной доставки	7
2.1.1. Принцип «активной» доставки	8
2.1.2. Принцип «пассивной» доставки, EPR-эффект, роль EPR-эффекта в современной противоопухолевой терапии	9
2.2. Фотодинамическая терапия опухоли	11
2.3. Микрогели	13
2.3.1. Определение микрогелей	13
2.3.2. Микрогели для направленной доставки	14
2.3.3. Классификация микрогелей, методы получения	19
2.4. Микрогели на основе винилкапролактама	22
2.4.1. Свойства поливинилкапролактама	22
2.4.2. Взаимодействия pVCL в воде	23
2.4.3. Синтез микрогелей на основе винилкапролактама	25
2.5. Выводы из обзора литературы	30
3. Цели и задачи работы	31
4. Материалы и методы	32
4.1. Синтез микрогелей	32
4.2. Измерения размеров и полидисперсности микрогелей	34
4.3. Измерения ζ -потенциала синтезированных микрогелей	35
4.4. pH-зависимое разбухание микрогелей	35
4.5. Кинетика образования и роста микрогелей	35
4.6. Сканирующая электронная микроскопия микрогелей с AA и Vim	36
4.7. Загрузка микрогелей препаратами	36
4.8. Оценка интенсивности флуоресценции микрогелей, загруженных ALPC и фототоксичность микрогелей с разной загрузкой	38
4.9. Культуры клеток	38
4.10. Измерение цитотоксичности	39

4.11. Проточная цитофлуориметрия	40
4.12. Конфокальная микроскопия	41
5. Результаты и обсуждение	42
5.1. Синтез микрогелей	42
5.1.1. Синтез микрогелей на основе VCL	42
5.1.2. Синтез микрогелей для направленной доставки фталоцианина алюминия	45
5.2. Физико-химические свойства микрогелей на основе VCL	51
5.2.1. Размер микрогелей после диализа	51
5.2.2. Сжатие микрогелей при повышении ионной силы раствора	52
5.2.3. Исследование изменения ζ -потенциала микрогелей при повышении ионной силы раствора	54
5.2.4. Исследование pH-зависимого набухания микрогелей	55
5.2.5. Изменение ζ -потенциала под действием pH	57
5.2.6. Кинетика образования и роста микрогелей	59
5.3. Эффективность фотодинамической терапии при помощи микрогелей, загруженных фталоцианином алюминия, <i>in vitro</i>	63
5.3.1. Хроническая, темновая токсичность микрогелей и ALPCS	63
5.3.2. Фототоксичность ALPCS и микрогеля, загруженного ALPCS	65
5.3.3. Фототоксичность ALPC	67
5.3.4. Фототоксичность микрогелей, загруженных ALPC	68
5.3.5. Флуоресценция микрогелей с различной загрузкой ALPC	71
5.3.6. Фототоксичность микрогелей, загруженных ALPC	72
5.3.7. Аномально высокая фототоксичность микрогелей, загруженных 0,15% ALPC	74
5.3.8. Результаты накопления ALPC в клетках полученные методом проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии	76
5.3.9. Проникновение микрогелей в клетки	78
6. Выводы	79
Список литературы	80
Приложение	86

Список сокращений

A – оптическая плотность раствора;

AA – акриловая кислота;

AAEM – ацетоацетоксиэтилметакрилат;

ALPC – фталоцианин алюминия;

ALPCS – «Фотосенс» (раствор смеси натриевых солей сульфированного фталоцианина алюминия);

AMPA – 2,2'-азобис(2-метилпропионамдин)дигидрохлорид;

BAC – N,N'-бис(акрилоил)цистамин;

BMOED – бис(2-метакрилоил)оксиэтилдисульфид;

C – концентрация;

d – диаметр;

DLS – динамическое светорассеяние;

DMEM – питательная среда ДМЕМ;

DMCO – диметилсульфоксид;

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования;

FMA – флуоресцеин O-метакрилат;

HAT – смесь гипоксантина, аминоптерина и тимидина;

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования;

KPS – пероксодисульфат калия;

λ – длина волны;

LDV – лазерная Доплеровская велосиметрия;

MBA – N,N'-метиленабисакриламид;

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолбромид;

НІРАМ – N-изопропилакриламид;

pNIPAM – поли(N-изопропилакриламид);

pVCL – поли(N-винилкапролактан);

ОЕОМА – метилполиэтиленгликольметакрилат $M_w \approx 2080$;

PBS – фосфатно-солевой буфер;

PdI – индекс полидисперсности;

PEG – полиэтиленгликоль;

PSA – пероксодисульфат аммония;

ПЦФМ – проточная цитофлуориметрия;

RCF – относительная центробежная сила;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

SDS – додецилсульфат натрия;

τ – время;

V – объем;

VCL – N-винилкапролактан;

VIm – N-винилимидазол;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

1. Введение

На данный момент существует огромное количество различных физиологически активных веществ. Однако большинство из них так и не становится лекарственными препаратами. Одна из наиболее распространенных причин, препятствующих использованию подчас наиболее активных соединений, является наличие нежелательных побочных эффектов. Другая, не менее важная, связана с тем, что многие лекарственные препараты либо не могут проникнуть в клетки, либо плохо удерживаются в тканях, подвергаемых терапевтическому воздействию. Многочисленные работы в области биомедицины показывают, что введение препаратов, загруженных в мицеллы, липосомы, полимеросомы и микрогели позволяет не только предохранить их от нежелательных воздействий организма (экстремальных рН или различных ферментов), но также снизить побочные эффекты и, что самое главное, обеспечить накопление препарата в области, где предполагается произвести лечение. Таким образом, использование лекарств, загруженных в подобные «наноконтейнеры», открывает широкие возможности для улучшения их терапевтических свойств.

Микрогели являются новым классом полимерных наночастиц, особенно интересных в качестве средств доставки, так как они находятся в воде в набухшем состоянии и могут удерживать внутри себя различные препараты, от низкомолекулярных до биополимеров: белков и нуклеиновых кислот. Помимо этого, использование соответствующих мономеров позволяет придать микрогелям необходимые свойства, в том числе такие как фото-, термо-, рН- чувствительность и биоразлагаемость.

В ходе данной работы были синтезированы и изучены свойства микрогелей на основе N-винилкапролактама, использованные для доставки препаратов, применяемых в фотодинамической терапии рака. Синтезированные микрогели были загружены препаратами на основе фталоцианина алюминия и в экспериментах *in vitro* проявляли высокую фотодинамическую активность. Использование микрогелей позволило многократно увеличить фототоксичность фталоцианина алюминия, что говорит о высоком потенциале использования микрогелей для фотодинамической терапии рака.

2. Обзор литературы

2.1. Проблема противоопухолевой терапии и принципы направленной доставки

Проблема противоопухолевой терапии в течение многих десятилетий является предметом пристального внимания огромного числа ученых. Этот вопрос крайне сложен, так как он ставит перед собой цель нахождения принципиальных отличий между клетками нормальной и раковой ткани. Раковые клетки являются переродившимися клетками организма, претерпевшими, в результате внешних воздействий, ряд серьезных мутаций, затрагивающих процессы регуляции клеточного цикла (см. рис. 1). В основе сложившихся в результате различий лежат молекулярно-биологические процессы, протекающие внутри переродившихся клеток организма [1]. При этом все эти процессы в той или иной степени имеют место и в нормальных клетках, что не дает иммунной системе эффективно распознать трансформировавшиеся клетки [2].

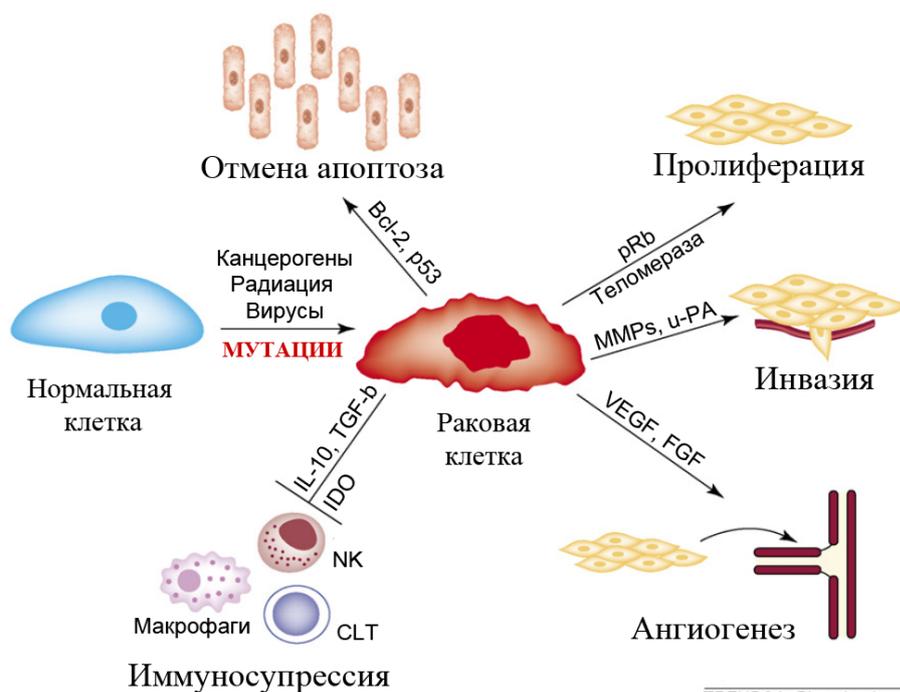


Рис. 1. Образование раковой опухоли и сопутствующие процессы [3].

Опухолевые клетки также способны выделять ряд ростовых факторов (TGF) [4] и цитокинов (IL-10) [5], вызывающих иммуносупрессию в ответ на реакцию иммунной системы, обусловленную гиперэкспрессией или пониженной экспрессией белков [6] (что является свидетельством отличия раковых клеток от нормальных). Помимо всего прочего, в них полностью (или частично) отсутствуют механизмы контроля деления, что придает им возможность к неограниченному делению, и что более важно, благодаря отсутствию

механизмов обратной связи с окружающей тканью, раковые клетки способны к инвазии, т.е. проникновению в другие органы и замещению одних клеток на другие – раковые [7]. Таким образом, сочетая в себе незаметность и высокую агрессивность, раковые клетки представляют огромную опасность для организма в целом.

2.1.1. Принцип «активной» доставки

Для онкотерапии крайне важно воздействовать на опухолевые клетки, оказывая минимальное воздействие на нормальные ткани. Поэтому крайне важно установить мишень – отличие раковой клетки от нормальной. В настоящее время известно множество белков, представленных преимущественно на опухолевых клетках [8]. Эти белки являются потенциальными мишенями для направленной терапии. Таким образом, молекула, селективно связывающаяся с молекулой-мишенью и несущая препарат или токсин, может селективно воздействовать лишь на опухолевые клетки. Данный принцип «магической пули», сформулированный Эрлихом еще в XIX веке, нашел свое применение в онкологии в виде многочисленных препаратов на основе моноклональных антител [9]. В то же время препараты, действующие по принципу «магической пули», не применяются повсеместно и находят свое основное применение при лечении лейкозов и аутоиммунных заболеваний. Существует несколько причин, по которым данные препараты не имеют массового применения. Одна из основных – это экономический фактор: для эффективной элиминации опухолевых клеток требуются значительные количества препарата, а эукариотическая экспрессия и аффинная очистка моноклональных антител приводят к крайне высокой стоимости конечного препарата [10]. Другой, не менее важной проблемой, является то, что в отличие от раков крови, где клетки являются частично дифференцированными и мишень для антитела строго определена и постоянна, в случае других типов рака мишень зачастую непостоянна, так как во многих случаях раковые клетки не полностью дифференцированы, более того, они способны терять дифференцировку и поверхностные антигены в процессе клональной селекции под давлением препарата, рассчитанного на данный антиген. В итоге складывается ситуация, когда профиль поверхностных маркеров клеток опухоли начинает изменяться и терапия теряет свою эффективность [11].

Суммируя сказанное, можно прийти к выводу, что «активная» направленная доставка (осуществляемая за счет высокоспецифичного узнавания молекул препарата и антигенов раковой клетки) требует наличия информации о профиле экспрессии антигенов на поверхности опухоли и наличия антител, специфично узнающих свою мишень. Причем, так как клетки способны менять профиль экспрессии, нужно иметь возможность

контролировать его в процессе лечения. Очевидно, что такая терапия в настоящее время не может быть общедоступной ввиду высокой стоимости анализов и препаратов.

2.1.2. Принцип «пассивной» доставки, EPR-эффект, роль EPR-эффекта в современной противоопухолевой терапии

Для того чтобы найти принцип доставки применимый ко всем опухолям, нужно подняться на следующий уровень организации тканей и рассмотреть опухолевое новообразование в целом, выявляя его отличие на уровне клеточной организации. Для раковой опухоли характерно состояние гипоксии [12], связанное с тем, что в области опухоли клетки постоянно делятся и поглощают большое количество питательных веществ. Помимо всего прочего, опухоль, образовавшись самопроизвольно, не имеет системы кровеносных сосудов для притока питательных веществ и кислорода. Находясь в состоянии гипоксии, раковые клетки выделяют факторы роста (VEGF, FGF), вызывающие неконтролируемый и неупорядоченный рост сосудов – ангиогенез опухоли [13]. Эти сосуды, растущие в опухоль, имеют совершенно иное строение: у них отсутствуют «плотные контакты», для них напротив характерны межклеточные промежутки, обеспечивающие «проницаемость» сосудов [14]. В то же время лимфатические сосуды в опухоли развиты крайне слабо, что приводит к плохому оттоку метаболитов из опухоли. В работе Torchilin et al [15], на примере проницаемости сосудов для липосом различного размера было показано, что размер «щелей» в межклеточных контактах сосудов опухоли составляет 100-780 нм в зависимости от типа опухоли и ее локализации. Таким образом, существует «пассивный» способ доставки, основанный на различии сосудов в нормальной и опухолевой ткани и обеспечивающий проникновение и концентрирование наночастиц в области опухоли (см. рис. 2). Этот эффект назван EPR-эффектом (Enhanced Permeability and Retention) [16].

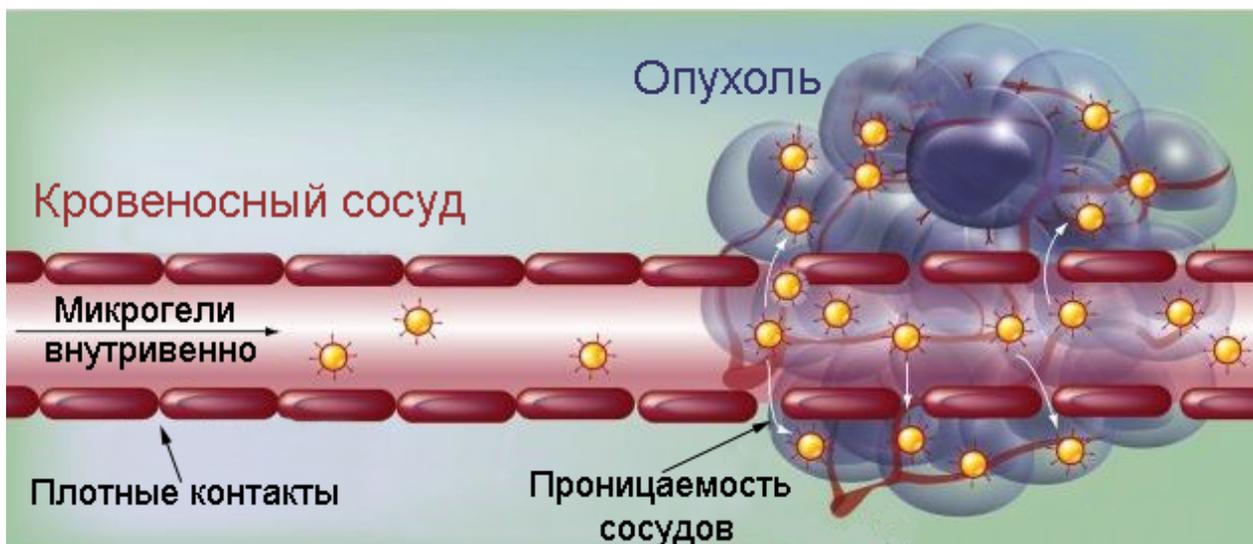


Рис. 2. Иллюстрация принципа «пассивной» доставки.

Условием того, чтобы наблюдался EPR-эффект является то, что препарат (в той или иной форме) должен представлять собой наночастицы с размером менее 200 нм, способные длительно находиться в кровотоке, не связываясь с эндотелием сосудов, не выводиться эффективно ретикулоэндотелиальной системой [17]. Высокий заряд частиц (особенно отрицательный) [18] также приводит к ускоренному выведению наночастиц из кровотока. Наиболее оптимальными условиями для проявления EPR-эффекта принято считать размер около 100 нм и наличие на поверхности гидрофильных полимеров с высокой конформационной свободой, таких как полиэтиленгликоль (PEG). Использование липосом, стабилизированных PEG («stealth»-липосом) позволяет добиться уникальных для липосом периодов полувыведения (около 10 часов), что используется в препаратах для лечения метастазирующих опухолей (Doxil/Caelyx). Использование липосом для «пассивной» доставки доксорубина позволяет избежать таких побочных эффектов как кардиотоксичность, в то же время, увеличивая выживаемость [19].

Принцип «пассивной доставки» не обеспечивает той селективности, что достигается при «активной» доставке, но позволяет улучшить фармакокинетику препарата, избавить его от некоторых побочных эффектов и увеличить выживаемость пациентов. Несмотря на свою эффективность, «активная доставка» требует наличие стадии функционализации, что резко удорожает процесс изготовления и препарата в виде данной формуляции. «Пассивная доставка» в этом плане является более общим принципом, применимым к большинству раковых опухолей, и в случае низкой стоимости формуляции и эффективности доставки находит свое применение в современной онкологии.

В данной работе мы использовали принцип «пассивной доставки» с целью увеличения концентрации препарата в опухоли за счет его загрузки в микрогели на основе термочувствительного полимера pVCL. В качестве препаратов были выбраны фталоцианины алюминия, применяемые для фотодинамической терапии опухоли, которая в настоящее время представляет все больший интерес, как с научной, так и с практической точки зрения.

2.2. Фотодинамическая терапия опухоли

Суть фотодинамической терапии заключается в действии препарата, играющего роль фотосенсибилизатора в процессе передачи поглощаемой энергии в виде кванта света определенной длины волны кислороду, меняющему при этом свое электронное состояние (см. рис. 3). Для фотодинамической терапии используются препараты, эффективно поглощающие свет в области «прозрачности» человеческого тела (650-900 нм) и имеющие стабильное триплетное возбужденное состояние [20].

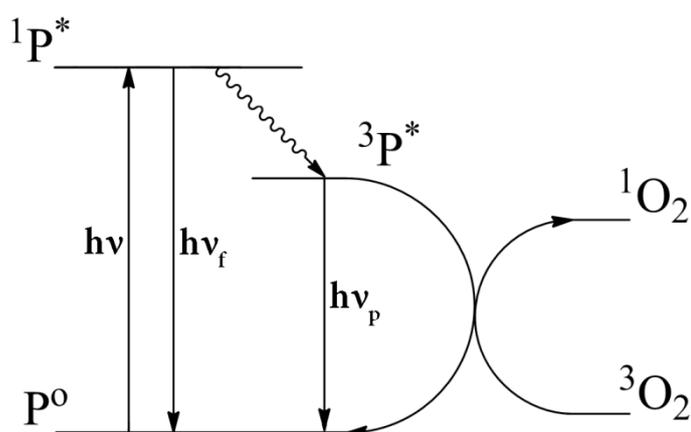


Рис. 3. Диаграмма, иллюстрирующая принцип генерации синглетного кислорода фотосенсибилизатором.

Синглетный кислород, образующийся в результате передачи энергии триплетным возбужденным состоянием фотосенсибилизатора, крайне высоко реакционноспособен (средняя длина пробега 10-55 нм [21]) и вызывает повреждения белков, липидов и особенно эффективно разрушает нуклеиновые кислоты. В результате клетки погибают при облучении по смешанным механизмам апоптоза, аутофагии и некроза [22]. Таким образом, фотосенсибилизатор играет роль катализатора, способного генерировать 10^3 - 10^5 молекул высокотоксичного синглетного кислорода, до своего «выгорания» [23]. Фотодинамическая терапия опухоли признана наименее инвазивной онкотерапией [20], так как терапевтический эффект наблюдается лишь в той области, в которой одновременно присутствуют препарат, источник света и кислород. Уникальной

составляющей данного вида терапии является активная презентация антигенов погибающих клеток макрофагами и выработка противоопухолевого иммунитета [24]. Большой интерес ученых привлекла возможность использования препаратов для фотодинамической терапии для направленного высвобождения из эндосом [25]. Суть этого явления заключается в том, что если в эндосомах, поглотивших тот или иной носитель содержится препарат для фотодинамической терапии, при облучении происходит генерация синглетного кислорода непосредственно в эндосомах, что вызывает их быстрое и эффективное разрушение с высвобождением содержимого в цитоплазму. Данный подход был успешно применен для направленного высвобождения siRNA и плазмидной ДНК. Использование фотодинамической терапии не только позволяет добиться высокой токсичности избирательно к облучаемым областям, но также крайне перспективно в плане доставки препаратов и генетического материала в контролируемые части организма.

Препараты на основе фталоцианина алюминия (ALPC) (см. рис. 4) хорошо зарекомендовали себя благодаря своей высокой стабильности и эффективности генерации синглетного кислорода.

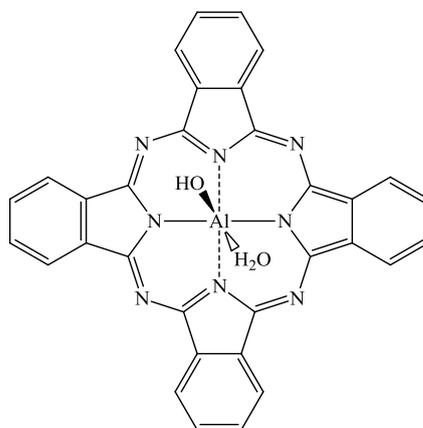


Рис. 4. Фталоцианин алюминия (ALPC).

К проблемам, связанных с применением данных препаратов следует отнести крайне низкую растворимость, низкую специфичность накопления в опухолевой ткани, а также способность данного препарата образовывать межмолекулярные комплексы, что приводит к потере стабильности триплетного состояния и генерации синглетного кислорода [26].

В данной работе мы использовали микрогели в качестве средства доставки с целью улучшения селективности накопления ALPC в опухоли за счет EPR-эффекта и

стабилизации триплетного состояния за счет образования комплекса между микрогелем и ALPC в молекулярном состоянии, что должно привести к более эффективной фотодинамической терапии рака.

2.3. Микрогели

2.3.1. *Определение микрогелей*

История создания микрогелей берет свое начало в 1949 году, когда в своей публикации «Микрогель, новая макромолекула» Бейкер ввел понятие «микрогель» для описания сшитых полибутадиеновых латексных частиц [27]. Корень «микро», относящийся к размеру синтезированных Бейкером латексных частиц в настоящее время все чаще заменяется на «нано» для частиц, размер которых не превышает 1 мкм. Вторая часть слова – гель была введена Бейкером с целью, указать на возможность набухать в органических растворителях. Работа Бейкера подчеркивает то, что микрогель представляет собой полимерную сеть с очень большой молекулярной массой, другими словами, каждая частица представляет собой индивидуальную молекулу полимера.

Со времен Бейкера понятие микрогель претерпело ряд изменений, и современное определение микрогеля звучит как коллоидная дисперсия частиц геля, что подразумевает следующие вещи [28]:

- 1) Размер микрогелей находится в области 10-1000 нм, что характерно для коллоидных частиц.
- 2) Микрогели в растворителе находятся в виде коллоидного раствора.
- 3) Микрогели находятся в растворителе в набухом состоянии.

Под данное определение попадает широкий список полимерных материалов. Поверхностно активные вещества и полимерные мицеллы также удовлетворяют трем приведенным критериям, однако их не относят к микрогелям. В случае мицелл, каждая отдельная мицелла имеет свое конечное время жизни. Мицеллы быстро обмениваются молекулами ПАВ, таким образом, в отличие от микрогелей, не имея постоянного состава. С другой стороны водные растворы амфифильного блок-сополимера, имеющего большие гидрофобные блоки, образуют долгоживущие мицеллы. Тем не менее, гидрофобное ядро таких мицелл не находится в набухом состоянии в воде. Таким образом, они скорее более напоминают латексные частицы, чем микрогели. В итоге наши рассуждения приводят к четвертому критерию, позволяющему определить микрогели.

4) Микрогели имеют постоянный состав. Данное постоянство реализуется либо за счет ковалентных связей, либо за счет сильных многоточечных взаимодействий внутри сетки микрогеля.

2.3.2. Микрогели для направленной доставки

Благодаря сетчатой структуре, содержащей в своих порах до 90% воды микрогели представляют собой новый класс контейнеров для доставки широкого спектра различных препаратов [29]. К неоспоримым преимуществам микрогелей можно отнести возможность управления составом и свойствами при синтезе путем использования различных подходов. Зачастую микрогели с близким химическим составом могут быть получены в широком диапазоне размеров от нескольких десятков нанометров до сотен микрометров (в зависимости от способа получения или состава реакционной смеси). Варьируя степень сшивки микрогелей, можно изменять размер пор внутри него, что может использоваться для контролируемого высвобождения препарата, загруженного в микрогель. Использование многочисленных реакций биоконъюгации позволяет функционализировать микрогели, что является необходимым шагом при переходе от «пассивной» к «активной» доставке [30].

Сетчатая структура придает микрогелям широкие возможности для создания гибридных нанобиоматериалов (см. рис. 5), способных сочетать в себе такие важные биомедицинские приложения как направленная доставка и визуализация (крайне популярный сейчас принцип «тераностики» [31], произошедший от сочетания слов терапия и диагностика) или направленная доставка и возможность локального разогрева (что используется для гипертермической терапии опухолей).

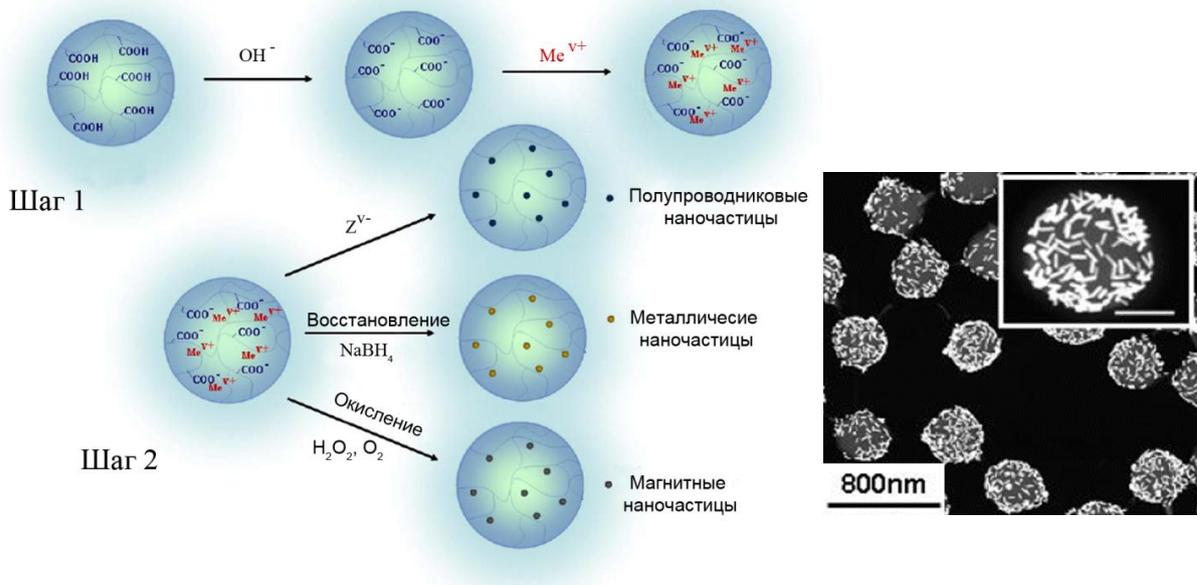


Рис. 5. Двухстадийный синтез гибридных наноматериалов на основе микрогелей [32] (слева), микрогели, содержащие золотые наностержни, для направленной гипертермии [32] (справа).

В отличие от липосом, широко изученных в течение последних десятилетий и в настоящее время широко используемых в терапии для направленной доставки, (Doxil, Myocet, DaunoXome) микрогели являются менее изученным и более широким классом контейнеров для доставки. Наиболее популярны микрогели на основе полисахаридов: хитозана, декстрана, целлюлозы и прочих [33]. Использование для направленной доставки микрогелей на основе белков менее предпочтительно, так как они обладают большей иммуногенностью, в свою очередь использование микрогелей на основе человеческих (альбумин) или неиммуногенных белков (коллаген, желатин) открывает возможности для простого синтеза биоразлагаемых лекарственных носителей [34]. Микрогели на основе природных полимеров обладают высокой биосовместимостью и крайне низкой токсичностью, но могут распознаваться компонентами иммунной системы и выводиться из организма. В свою очередь синтетические полимеры, в особенности те, что содержат гидрофильные макромономеры полиэтиленгликоля или полиглицерина обладают крайне высокой стабильностью в растворе и пониженной сорбцией белков, что делает их аналогами «stealth»-липосом. Среди синтетических полимеров подавляющее большинство работ было посвящено микрогелям на основе поли(N-изопропилакриламида) pNIPAM [35]. Причинами этого является легкость получения и монодисперсность микрогелей, синтезированных по механизму осадительной полимеризации в водном растворе (см. п. 1.3.3.). Среди других полимеров, используемых в направленной доставке при помощи микрогелей, высокое распространение получили сополимер молочной и гликолевой

кислоты, полимеры на основе 2-гидроксиэтилметакрилата (НЭМА), метилметакрилата (ММА), а также олигоэтиленгликольметакрилата (ОЕОМА) [34].

Для доставки лекарства крайне важно, чтобы микрогель загружал в себя значительные количества препарата и загруженный препарат высвобождался эффективно и контролируемо. Для эффективной загрузки необходимо, чтобы препарат связывался с микрогелем. Обычно это реализуется за счет гидрофобных взаимодействий (низкой растворимости препарата в воде), но было показано, что для достижения высоких (20% и более) степеней загрузки препаратом одних гидрофобных взаимодействий недостаточно, и требуется наличие других взаимодействий – водородных связей или электростатического притяжения [36]. В большинстве работ микрогели используют для доставки цитостатиков: доксорубицина, даунорубицина, цисплатина и метотрексата [37]. В этих работах микрогели являются аналогами липосомальных формуляций упомянутых препаратов и эффект, наблюдаемый при их использовании часто бывает схожим. В отличие от липосом, использование микрогелей открывает широкие возможности для доставки гидрофильных препаратов, имеющих большое количество заряженных групп. В этом случае связывание между препаратом и микрогелем осуществляется за счет многочисленных ионных взаимодействий между разноименными зарядами препарата и микрогеля. Данный подход был успешно применен в работах по доставке нуклеотидных аналогов трифосфатов [38]. Использование ионных взаимодействий для создания комплекса препарат – микрогель крайне важно для биомолекул: нуклеиновых кислот и белков. Микрогели могут весьма эффективно выполнять роль контейнеров для доставки таких биомолекул, как siRNA, белки и пептиды [39], что делает их использование, в качестве альтернативы липосом, весьма перспективным направлением в направленной доставке. Использование микрогелей позволяет избежать побочных эффектов цитостатиков, понизить их общую токсичность и нефротоксичность, что способствует улучшению состояния животных на моделях *in vivo*. В настоящее время область изучения направленной доставки препаратов является одной из наиболее быстроразвивающихся и очевидно, что многие другие препараты будут использованы для загрузки в микрогели.

Высвобождение препарата также крайне важно для эффективного воздействия микрогеля, загруженного препаратом на клетку-мишень (см. рис. 6). Во многих случаях высвобождение препарата происходит самопроизвольно, за счет диффузии или ионного обмена. Использование термочувствительных, фоточувствительных, pH-чувствительных полимеров позволяет осуществить контролируемое высвобождение препарата, что позволяет добиться селективности воздействия на опухоль [40].

Среда опухоли зачастую имеет более кислый рН, ввиду высокой метаболической активности и плохого развития лимфатических сосудов (см. п. 1.1.2.). рН зависимое набухание микрогелей является универсальным способом высвобождения препарата из микрогеля, широко применяемым в многочисленных работах. Интересен также подход, когда рН зависимое набухание приводит к экспонированию на поверхности микрогеля, функциональных групп, скрытых при нормальном рН=7,4. При этом функциональными группами могут быть как лиганды к рецепторам на поверхности раковых клеток, так и вирусные пептиды (ТАТ-пептид и др.), обеспечивающие эффективное рН-зависимое проникновение микрогелей в клетки [41].

Наличие в составе микрогеля групп, способных к протонированию в кислой среде также крайне важно для обеспечения выхода микрогеля из эндосом и высвобождения препарата непосредственно в цитоплазму клетки (см. рис. 6).

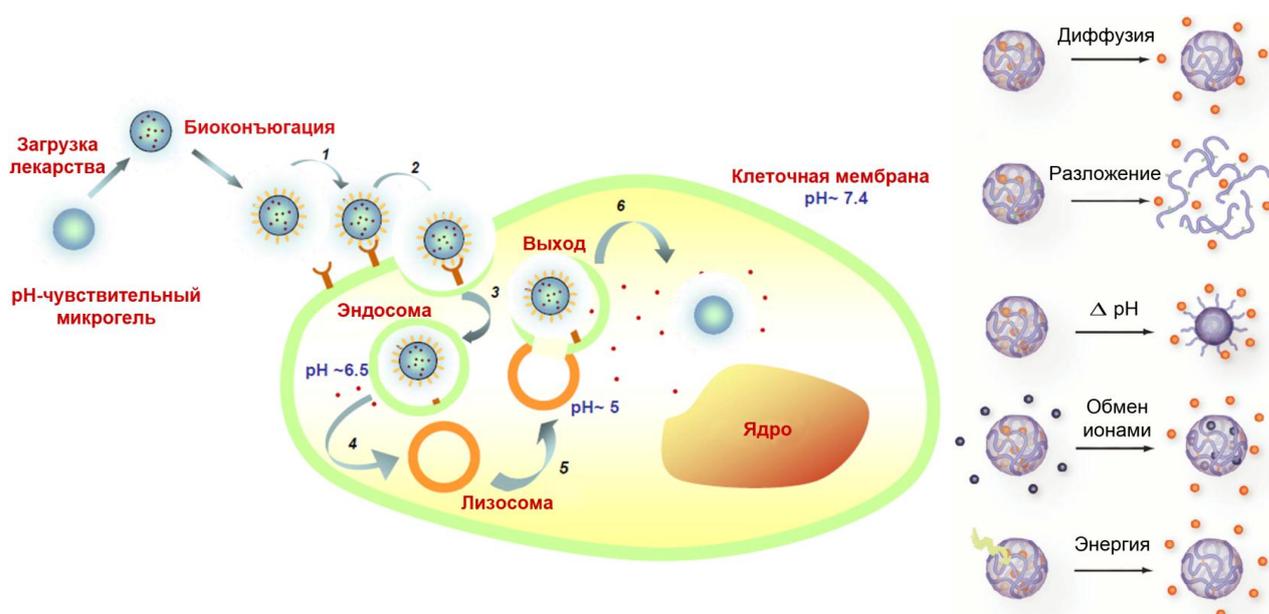


Рис. 6. Активная доставка и высвобождение из лизосомы благодаря эффекту «протонной губки» (слева), основные способы высвобождения препарата из микрогеля [40] (справа).

В случае «активной» доставки (см. рис. 6) после связывания рецептором клетки-мишени лиганда (1), конъюгированного с микрогелем, происходит интернализация микрогеля в клетку по механизму рецептор опосредованного эндоцитоза (2). В образовавшихся эндосомах находится микрогель с препаратом (3), после чего эндосомы сливаются с лизосомами (4) и происходит уменьшение рН. В лизосомах происходит протонирование рН-чувствительных групп микрогеля (рН не может опуститься до нужного значения благодаря буферному эффекту рН-чувствительных групп микрогеля),

что приводит к так называемому «эффекту протонной губки» (5), приводящему в итоге к повышению концентрации хлорид-ионов в лизосомах, рН-зависимому набуханию микрогелей и разрушению лизосом с выходом содержимого в цитоплазму (6). Обеспечение выхода препарата в цитоплазму и отсутствие воздействия кислой среды лизосом особенно важно, когда дело касается доставки белков, siRNA и особенно ДНК.

Разборка микрогеля на олигомеры (см. рис. б) является наиболее эффективным способом высвобождения капсулированного препарата. Для большинства биомедицинских приложений крайне важно, чтобы микрогели, попавшие в организм, имели возможность разложиться до более мелких фрагментов и быть выведенными из организма. Возможность разложения микрогеля после в организме важна с двух точек зрения. Во-первых, это позволит снизить системную токсичность, во-вторых, позволит максимально эффективно высвободить препарат (что бывает особенно важно в случае биополимеров). Существует несколько способов, используемых при создании биоразлагаемых микрогелей [42]. В первую очередь, можно использовать разлагаемые полимеры. Такими полимерами могут быть некоторые природные биополимеры: полисахариды или их производные, коллаген, сшитый глутаровым диальдегидом и многие другие, либо получившие широкое распространение полимеры на основе сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA) или их производных. С другой стороны необязательно, чтобы микрогель распадался в организме до мономеров. Сам полимер может быть неразложимым, но содержать сшивки, способные разлагаться в организме самопроизвольно (зачастую содержат связи, неустойчивые в области кислых рН, наблюдаемые в лизосомах клеток): β -тиопропионатные связи, метакриловые эфиры PLGA, ортоэфиры, либо под действием некоторых ферментов. Примером последних могут быть производные пептидов, специфически узнаваемых металлопротеиназами. Одним из самых простых и хорошо изученных способов добиться биоразложимости полимера является введение в него кросслинкера, содержащего дисульфидную связь. Зачастую реакция синтеза представляет собой «живую» радикальную полимеризацию (RAFT) [43]. Использование RAFT позволяет более четко контролировать состав и свойства синтезированных микрогелей. Дисульфидные связи способны легко восстанавливаться в клеточной цитоплазме за счет наличия системы восстановления, использующей фермент глутатионредуктазу и субстрат трипептид глутатион, присутствующий в клетках в концентрации порядка 5mM эффективно восстанавливающий $-S-S-$ связи за счет дисульфидного обмена.

2.3.3. Классификация микрогелей, методы получения

Особый интерес представляют микрогели, находящиеся в набухшем состоянии в водных растворах. Эта группа микрогелей также часто называется гидрогели. Именно гидрогели привлекают к себе огромный интерес, благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам и огромному числу практических приложений от фотонных кристаллов и микролинз до контейнеров для доставки лекарств [44]. Таким образом, микрогели представляют собой крайне широкий класс материалов с различным составом, размерами и морфологией.

По способу получения и характеру сшивок микрогели часто подразделяют на физические и химически сшитые [45]. К первым относят гели, представляющие собой полимерные сетки, связанные между собой благодаря переплетению отдельных макромолекул и/или многочисленным нековалентным взаимодействиям, существующим между полимерными цепями. Силы притяжения, удерживающие цепи между собой представляют собой водородные связи, Ван-дер-ваальсовы, электростатические или гидрофобные взаимодействия. Таким образом, такие микрогели могут быть обратимо растворены при определенных условиях, ослабляющих эти взаимодействия (изменение pH, ионной силы или добавление хаотропных реагентов). Другим классом гидрогелей являются химически сшитые гели. Эти микрогели обладают высокой стабильностью, благодаря наличию ковалентных связей, соединяющих цепи полимеров в сетке микрогеля. Основным способом получения таких микрогелей является полимеризация с использованием полифункциональных мономеров-кросслинкеров.

На данный момент микрогели включают в себя огромное множество полимерных частиц с различными свойствами. Различие в свойствах приводит к возможности классификации тех или иных микрогелей по типу чувствительности. Чувствительность выражается в способности изменять свои физико-химические свойства под действием различных внешних параметров. Самыми распространенными из них являются температура, pH (см. рис. 7), ионная сила, интенсивность света, электромагнитное излучение и даже некоторые простые органические молекулы [46]. Чаще всего микрогели претерпевают изменение своего объема, что может быть использовано во многих приложениях, в частности в области биотехнологии и биомедицины [47].

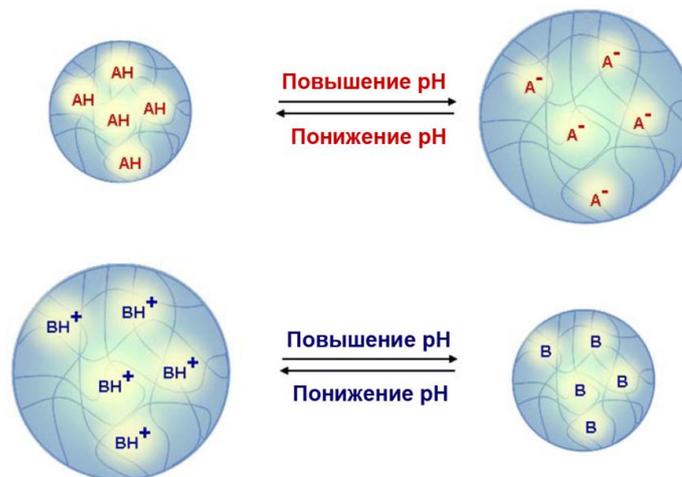


Рис. 7. pH-зависимое набухание заряженных микрогелей при ионизации [32].

Помимо классификации по типу чувствительности, существует классификация по способу получения. На данный момент существует множество различных методов, имеющих свои преимущества и недостатки.

Миниэмульсионная сополимеризация водорастворимых мономеров в несмешивающихся органических растворителях в присутствии ПАВ позволяет строго контролировать состав синтезируемых микрогелей. Таким образом, легко синтезировать микрогели с включенными в него водорастворимыми макромолекулами (белки, siRNA и др.), а также наночастицами (Fe_3O_4 , Pd, Ag, CdSe). К недостаткам метода полимеризации в миниэмульсиях [48] следует отнести необходимость использования внешнего диспергирующего воздействия, что зачастую приводит к разрушению включаемых в сетку микрогеля биомолекул.

Микрофлюидика является по своему уникальным методом синтеза микрогелей, позволяющим синтезировать полимерные частицы от 1 до 200 мкм, с максимально узким распределением по размеру. Это достигается за счет контролируемого распада струи одной фазы в среде другой. Особая геометрия канала и возможность генерировать различные типы капель позволяет синтезировать частицы различной формы, а диаметр сечения канала строго определяет область допустимых размеров частиц [49]. Размер синтезируемых микрогелей также зависит от скорости потока дисперсионной фазы. К достоинствам данного метода можно также отнести контроль за морфологией и структурой получаемых частиц. Микрофлюидика позволяет в максимально мягких условиях синтезировать частицы янусы [50], микрогели различной формы, а также слоистые структуры, путем полимеризации структур типа капля-в-капле[51], что

позволяет синтезировать гибридные частицы, в том числе содержащие живые клетки внутри [52]. К недостаткам данного метода можно отнести низкую производительность (но возможность масштабирования процесса), высокую стоимость и область размеров синтезируемых микрогелей от единиц до сотен микрометров.

Принципиально другой подход, схожий с микрофлюидикой был разработан DeSimone. Данный метод уникален тем, что он универсален и позволяет получать полимерные частицы размером от нескольких десятков нанометров до нескольких микрон. Данный метод [53], названный “PRINT” (Particle Replication In Non-wetting Templates) представляет собой вариант импринт литографии, использующий эластомерные формы, покрытые гидрофобным перфторполимером. Раствор мономеров или макромономеров в воде помещается между двумя гидрофобными поверхностями, проводится полимеризация или поликонденсация, после чего поверхности могут быть легко отделены друг от друга, а частицы извлечены из формы. Данный метод обладает неоспоримыми преимуществами, такими как строгий контроль размера частиц, их формы и состава, а также функциональности поверхности. Мягкие условия синтеза позволяют загружать внутрь таких микрогелей неустойчивые соединения и биомолекулы без потери их функциональности.

Послойная адсорбция полиэлектролита является одним из наиболее распространенных методов получения капсул и микрогелей. Decher создал поколение мультислойных пленок на поверхности путем последовательной адсорбции катионных и анионных полиэлектролитов [54]. Данный подход может быть использован для покрытия полиэлектролитами микрогелей или наночастиц. Например, Sauzedde [55, 56] описал элегантную процедуру, в которой анионные наночастицы оксида железа (около 10 нм) были адсорбированы катионными микрогелями. во время следующего шага полимер, содержащие карбоксильные группы образовывал оболочку на поверхности первых микрогелей, запаковывая наночастицы в свою оболочку.

Широкие возможности для широкомасштабного создания микрогелей с контролируемой структурой предоставляет комбинированный подход, сочетающий в себе 2 процесса: контролируемую самосборку полимерных мицелл с последующей ковалентной сшивкой. Данный метод позволяет получать широкий спектр микрогелей с разнообразной структурой путем простого подбора растворителей и контрионов. Таким образом были получены сферы, эллипсы и даже тороиды [40]. К недостаткам данного метода можно отнести необходимость использования монодисперсных полимеров со

строго контролируемой структурой и молекулярной массой, а также многостадийность синтеза от мономеров до конечных микрогелей.

Одним из самых привлекательных подходов к синтезу микрогелей является использование осадительной полимеризации [57]. К неоспоримым преимуществам данного метода можно отнести одностадийность, легкость масштабирования, высокие выходы, использование воды в качестве растворителя («зеленая химия»). Состав можно контролировать путем введения различных мономеров, способных придавать микрогелям требуемые свойства. Особенностью данной реакции является то, что при проведении полимеризации с использованием мономера, образующего термочувствительный полимер, частицы-зародыши образуются практически одновременно по всему объему. Это, в свою очередь, приводит к необычайно высокой для свободнорадикальной полимеризации монодисперсности микрогелей. К недостаткам этой реакции следует отнести необходимость проведения реакции при нагревании (обычно около 70°C) и в присутствии свободных радикалов, что исключает возможность прямого введения в реакцию чувствительных реагентов и биомолекул, однако это возможно эффективно осуществить после синтеза и очистки микрогелей. На основании преимуществ данного метода, мы использовали осадительную полимеризацию N-винилкапролактама (VCL) с целью получения монодисперсных биосовместимых микрогелей для доставки препаратов для фотодинамической терапии рака.

2.4. Микрогели на основе винилкапролактама

2.4.1. Свойства поливинилкапролактама

N-винилкапролактама (VCL) является твердым гигроскопичным веществом с температурой плавления 34 °C. VCL хорошо растворим в большинстве органических растворителей, однако его растворимость в воде менее 3% при комнатной температуре [58]. VCL имеет семичленный цикл, таким образом, молекула VCL не может быть плоской, амидная связь имеет пониженную конформационную свободу и конформация кресла является более предпочтительной. N-винилкапролактама устойчив к гидролизу, однако в случае закисления pH при синтезе наблюдается его гидролиз, приводящий к раскрытию лактамного кольца [59]. Свободнорадикальная полимеризация приводит к получению поливинилкапролактама (pVCL), содержащего повторяющиеся единицы циклического амида, в котором атом азота связан непосредственно с гидрофобной полимерной цепью (см. рис. 8).

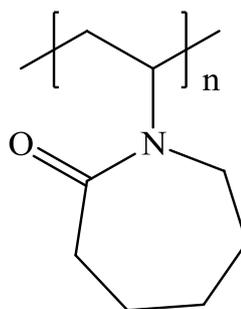


Рис. 8. Поливинилкапролактан (pVCL).

pVCL имеет синдиотактическую структуру основной цепи. pVCL является одним из немногих неионных водорастворимых полимеров, претерпевающих разделение фаз в воде при нагревании. В этом смысле pVCL сильно напоминает один из наиболее широко известных термочувствительных полимеров – поли(N-изопропилакриламид) (pNIPAM). Первые свидетельства о термозависимой растворимости pVCL датируются 1968, группой Solomon [60]. С тех пор полимеры на основе pVCL привлекают все большее внимание в качестве неионных биосовместимых полимеров с температурой фазового перехода 32°C.

Изучение цитотоксичности (по активности лактатдегидрогеназы и МТТ-тест на культуре Calu-3 клеток дыхательных путей и эпителиальных клеток кишечника Caco-2) трех полимеров с различными молекулярными массами ($M_w = 333$ kDa, 1300 kDa и 1500 kDa) показывает, что рост концентрации полимера от 0,01 до 10 мг/мл не приводит к гибели клеток [61]. Также VCL обладает меньшей токсичностью в сравнении с наиболее распространенным термочувствительным NIPAM. Таким образом, считается, что использование VCL в качестве альтернативы NIPAM является предпочтительным благодаря его меньшей токсичности.

2.4.2. Взаимодействия pVCL в воде

Термочувствительные свойства pVCL основаны на равновесии между двумя взаимодействиями: взаимодействиями pVCL-вода и pVCL-pVCL. С одной стороны, цепи pVCL претерпевают в воде сольватацию с образованием водородных связей с растворителем. С другой – существуют гидрофобные взаимодействия между цепями pVCL. Таким образом, температура фазового разделения pVCL (температура помутнения) сильно зависит от молекулярной массы полимера, увеличение M_w будет способствовать уменьшению сольватации и уменьшению температуры фазового разделения (см. рис. 9).

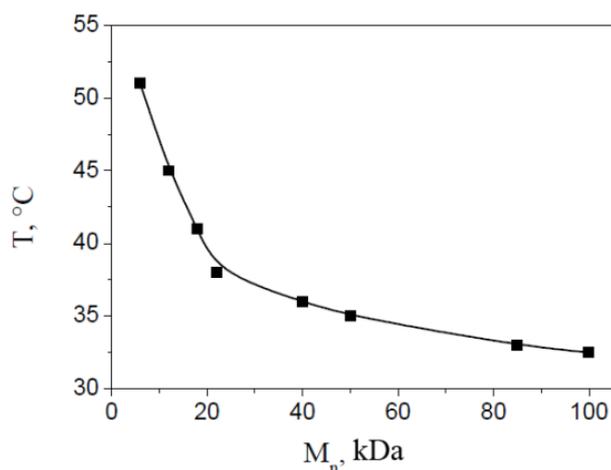


Рис. 9. Зависимость температуры помутнения pVCL от молекулярной массы pVCL [62].

На основании результатов динамической сканирующей калориметрии растворов pVCL Kirsh et al. [63] сформулировали механизм взаимодействия pVCL-вода (см. рис. 10). В присутствии воды полимер образует гидратный комплекс. Будучи диполем, каждая карбонильная группа VCL способна напрямую связать максимум 2 молекулы воды (тип 1 и тип 3). Остальные молекулы воды могут взаимодействовать с первыми, образуя водородные связи (тип 2). По-видимому, эта структура является основным компонентом первой водной оболочки комплекса pVCL-вода. Вероятность ее существования несоизмеримо выше той, что представлена, как тип 4.

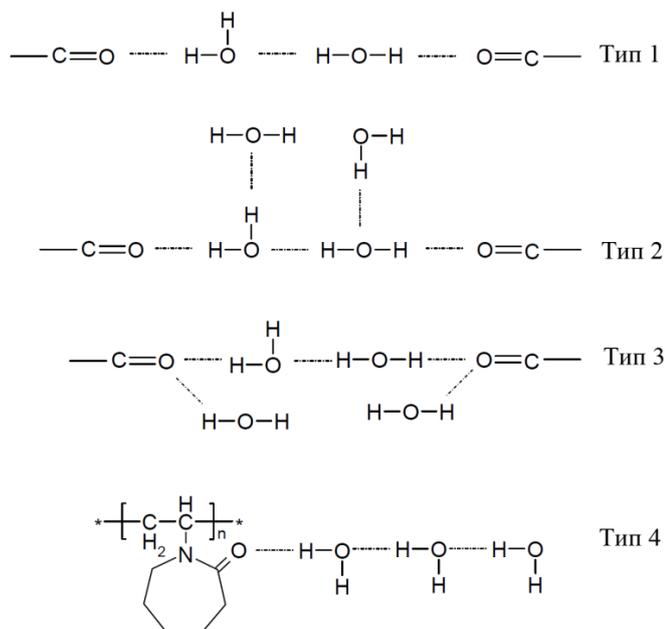


Рис. 10. Взаимодействия между pVCL и водой в растворе [63].

Гидратация pVCL в D₂O недавно была изучена путем комбинации методов FT-IR-спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии и компьютерного моделирования методом молекулярной динамики [64]. Они показали пониженную конформационную мобильность pVCL в сравнении с pNIPAM. Было также показано, что ниже температуры фазового перехода основную роль играют водородные связи, в то время как при повышении температуры выше фазового перехода основной вклад вносят гидрофобные взаимодействия. При анализе данных, полученных методом молекулярной динамики, было высказано предположение о наличии мезоглобул, имеющих более гидрофобное ядро и более гидрофильную оболочку, содержащих большее число молекул растворителя снаружи и меньшее внутри каждой мезоглобулы (см. рис. 11). Отсутствие внутримолекулярных водородных связей и топологические ограничения приводят к образованию структуры наподобие губки, способной при дальнейшем нагревании выталкивать «лишние молекулы» воды. В то же время pNIPAM имеет внутримолекулярные водородные связи, что приводит к структуре типа «ватного шарика» в которой отсутствует неравномерность распределения воды внутри.

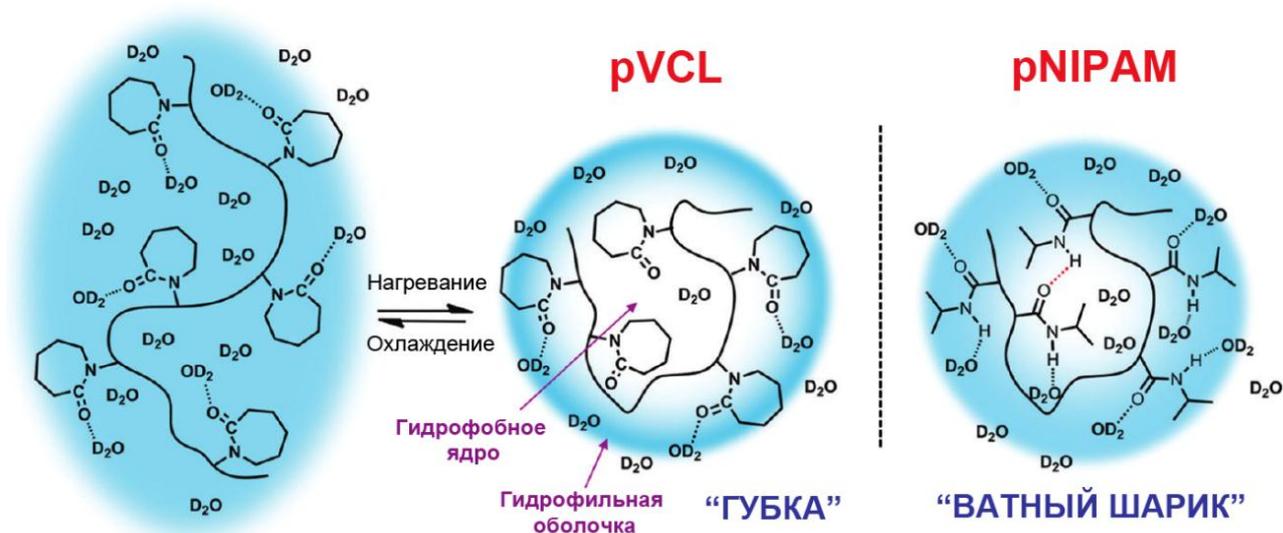


Рис. 11. Взаимодействия между pVCL и водой в растворе [64].

2.4.3. Синтез микрогелей на основе винилкапролактама

В отличие от микрогелей на основе N-изопропилакриламида, микрогели на основе N-винилкапролактама описаны менее подробно. Зачастую это связано с большими трудностями, возникающими при их получении.

Микрогели с узким распределением по размеру были получены при помощи осадительной свободнорадикальной полимеризации в воде с использованием персульфата аммония (PSA), калия (KPS) или трет-бутилгидропероксида (ТВНР) в качестве инициатора [65]. При этом, зачастую использование редокс-инициаторов нежелательно, так как в отличие от NIPAM, VCL чувствителен к окислителям. Наиболее предпочтительны растворимые азоинициаторы – 4,4'-азобис(4-циановалериановая кислота) (ACVA) и 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (АМРА) [66]. В качестве сшивающего агента чаще всего используется бифункциональный кросслинкер N,N'-метиленбисакриламид (МВА) или этиленгликольдиметакрилат (EGDMA).

На примере NIPAM хорошо изучена осадительная полимеризация в присутствии поверхностно активных веществ. Введение в реакционную среду ПАВ является универсальным методом контроля размера синтезируемых микрогелей [28]. Использование додецилсульфата натрия (SDS) при синтезе отрицательно заряженных или нейтральных микрогелей позволяет стабилизировать первичные частицы-зародыши. Чем меньше первичные частицы, тем больше их первоначальное количество, что приводит к меньшим микрогелям при той же концентрации мономеров (см. рис. 12).

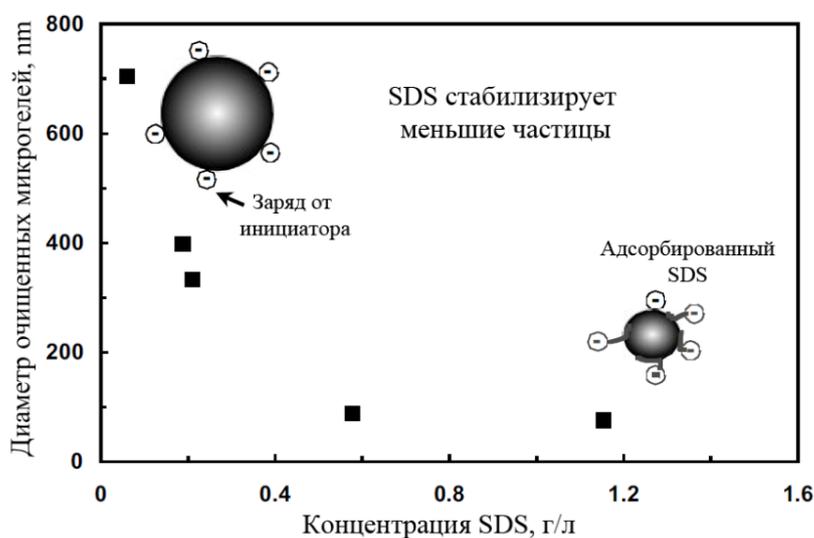


Рис. 12. Влияние SDS на размер синтезируемых микрогелей [28].

Добавление SDS также приводит к увеличению выхода и уменьшению их полидисперсности. В то же время микрогели, синтезированные в присутствии ПАВ зачастую содержат его высокие концентрации, что отрицательно сказывается на биосовместимости подобных частиц. Очистка таких микрогелей отнимает много времени и часто бывает неполной. Использование неионогенных ПАВ с высокой долей

полиэтиленгликоля (PEG) позволяет добиться аналогичных размеров частиц и большей биосовместимости микрогелей, получаемых в результате [67].

В большинстве случаев все мономеры и инициатор вводятся в реакцию однократно в начале синтеза. Это приводит к неоднородности состава: ядро более сшито, содержит более реакционноспособные мономеры (кросслинкер, акриловые и метакриловые мономеры) [68]. В то же время оболочка имеет меньшую плотность, обусловленную меньшей долей кросслинкера и большую долю виниловых мономеров (менее реакционноспособных в сравнении с кросслинкером и акриловыми мономерами). Влияние ПАВ, кросслинкера, инициатора, температуры на кинетику реакции синтеза микрогелей на основе VCL-MBA с инициатором KPS было исследовано в работе [69]. Увеличение доли инициатора приводит к резкому возрастанию скорости протекания реакции и выхода микрогелей. Повышение температуры от 60°C до 70°C вызывает резкое увеличение скорости полимеризации и выход продукта. Уменьшение концентрации VCL также приводило к значительным уменьшениям диаметра конечных микрогелей. Доля кросслинкера MBA значительно влияла на размер конечных микрогелей лишь при низких долях MBA в реакционной смеси (менее 5%).

Pich et al. [70-72] было показано, что введение ацетоацетоксиэтилметакрилата (AAEM) облегчает нуклеацию микрогелей, увеличивая выходы при синтезе микрогелей на основе VCL. Введение AAEM также оказывает стабилизирующее действие на микрогели, делая их более устойчивыми. В то же время было показано, что AAEM имеет тенденцию к концентрированию в ядре микрогеля, что можно объяснить более высокой реакционноспособностью метакриловых мономеров в сравнении с виниловыми, а также крайне низкой растворимостью AAEM.

Условия проведения реакции получения микрогелей на основе VCL-MBA с использованием редокс-инициатора (KPS) были изучены в работе [68]. Примечательно, что были изучены как реакции с однократным введением всех реагентов, так и с постепенным добавлением одного из них. Было показано, что размер и набухание микрогелей зависит от параметров реакции (концентрации кросслинкера, инициатора, ПАВ и основного мономера). В случае постоянного добавления кросслинкера или основного мономера микрогели не проявляли термочувствительных свойств. Проведение реакции при добавлении SDS приводит к наиболее ярко выраженным термочувствительным свойствам, что авторы объясняют проникновением ПАВ внутрь микрогеля.

Введение заряженных мономеров широко изучено на примере микрогелей на основе NIPAM. Подробно изучены микрогели на основе VCL, содержащие AAEM и N-винилимидазол (Vim) в качестве мономера, протонированного в кислой среде [73]. Особенность данных микрогелей состоит в том, что введение мономеров, способных протонироваться/депротонироваться в различных средах, придает им pH-чувствительные свойства (см. п. 2.3.2. и 2.3.3.). В зависимости от степени сшивки и доли заряженного мономера микрогели способны более или менее эффективно набухать или сжиматься под действием pH. Данный эффект связан с увеличением осмотического давления и сил электростатического отталкивания при возникновении зарядов внутри сетки микрогеля. Для заряженных микрогелей имеет место отклонение значения pK_a протонированных мономеров внутри микрогеля от значений для соответствующих растворов мономеров, что в первом приближении можно объяснить полиэлектролитным эффектом [47]. Заряженные мономеры, в свою очередь, зачастую имеют неравномерное распределение по объему микрогеля, что помимо причин, рассмотренных в этой главе ранее, связано с эффектами электростатики. Эти эффекты можно свести к минимуму, если проводить реакцию в соответствующем буфере.

Благодаря своей гидрофобности термочувствительные полимеры имеют тенденцию к необратимой коагуляции при нагревании выше температуры коллапса или увеличении ионной силы [70]. Для многочисленных приложений микрогелей очень важно добиться устойчивости суспензии микрогелей и предотвратить возможную агрегацию. Для стабилизации можно использовать как электростатическую так и стерическую стабилизацию. Крайне высокой устойчивостью обладают растворы коллоидных частиц, стабилизированных полиэтиленгликолем (PEG). PEG также зарекомендовал себя как полимер, обладающий высокой биосовместимостью и в течение многих лет используется в различных биомедицинских приложениях. Одним из удобных способов синтеза микрогелей, модифицированных PEG является использование реакционноспособных поверхностно активных макромономеров [74] (см. рис. 13).

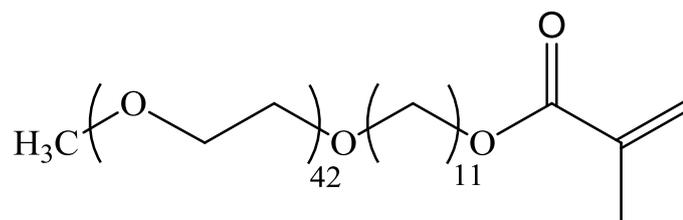


Рис. 13. Реакционноспособный поверхностно активный PEG-макрономер [74].

Подобные макромономеры имеют амфифильный характер и содержат часть, представляющую собой молекулу олигоэтиленгликоля и часть, содержащую гидрофобный углеводородный или фторуглеродный фрагмент. В растворе подобные мономеры находятся в виде мицелл и в процессе роста частиц микрогеля они являются центрами зародышеобразования, что приводит к высоким выходам конечных микрогелей, имеющих структуру ядро-оболочка, с оболочкой обогащенной PEG-макрономером. Для данной реакции очень важно, чтобы основной мономер, используемый для синтеза микрогелей, имел тенденцию локализоваться в ядре растущего зародыша, то есть обладал большей гидрофобностью, чем PEG-макрономер. По этой причине данный метод неприменим для хорошо растворимых, высокогидрофильных мономеров.

2.5. Выводы из обзора литературы

1. Одним из наиболее успешных и универсальных подходов к терапии рака является использование «пассивной доставки» наноматериалов, благодаря так называемому EPR-эффекту. Важнейшим свойством наноконтейнера, которое требуется для эффективной доставки, является продолжительная циркуляция в кровотоке. Использование наноформуляций препаратов зачастую позволяет осуществить селективность воздействия на опухоль, избежав при этом побочных эффектов препаратов.
2. Фотодинамическая терапия является крайне перспективной противораковой терапией за счет контролируемого воздействия на опухолевую область. Микрогели для доставки фотосенсибилизаторов ранее не использовались. Благодаря возможности направленного высвобождения из эндосом при облучении, фотодинамическая терапия может быть крайне эффективно использована для доставки препаратов (в том числе ДНК и РНК) в цитоплазму клетки-мишени.
3. Микрогели представляют собой новый класс контейнеров для направленной доставки с уникальными свойствами и синтетическими возможностями. Микрогели позволяют доставлять как гидрофобные, так и гидрофильные препараты, содержащие большое количество зарядов. Использование микрогелей особенно предпочтительно в случае биополимеров: белков, siRNA, ДНК.
4. Использование pH-, термо-, фоточувствительных полимеров обеспечивает контролируемое высвобождение препарата, а наличие биоразлагаемых сшивок повышает эффективность высвобождения и уменьшает токсичность микрогелей.
5. Осадительная полимеризация, ведущая к образованию термочувствительных полимеров, позволяет легко получать монодисперсные микрогели, в то время как введение поверхностно активных веществ при синтезе позволяет контролировать конечный размер не ухудшая протекание реакции синтеза.
6. Поливинилкапролактан является термочувствительным полимером обладающим повышенной биосовместимостью. Несмотря на то, что биомедицинские свойства поливинилкапролактама представляют большой интерес, использование микрогелей на основе поливинилкапролактама для направленной доставки изучено слабо.

3. Цели и задачи работы

Целями данной работы были синтез и изучение свойств микрогелей на основе N-винилкапролактама, для направленной доставки препаратов, используемых для фотодинамической терапии рака. В ходе работы были поставлены 3 основные задачи:

1. На основании статей Pich et al [70-73], описывающих синтез микрогелей на основе сополимера винилкапролактама и ацетоацетоксиэтилметакрилата (содержащих винилимидазол в качестве дополнительного заряженного мономера), провести аналогичный синтез с целью изучения данной реакции. Впервые синтезировать микрогели, с составом, аналогичным [73], но имеющие противоположный заряд (за счет замены винилимидазола на акриловую кислоту). На основании проделанной работы синтезировать микрогели, содержащие ОЕОМА с $M_w=2080$ в качестве реакционноспособного стабилизатора, и биоразлагаемый кросслинкер, содержащий дисульфидные связи, и постараться найти возможность контролировать размер микрогелей путем изменения концентрации ОЕОМА. Синтезированные микрогели должны обладать стабильностью в физиологических условиях.
2. Изучить зависимость размера синтезированных микрогелей от доли заряженного мономера и ионной силы, изучить рН-зависимое набухание микрогелей и изменение электрофоретической подвижности при изменении рН. Изучить кинетику образования и роста синтезируемых микрогелей (по данным светорассеяния и динамического светорассеяния).
3. Изучить токсичность микрогелей и эффективность фотодинамической терапии при помощи микрогелей, загруженных фталоцианином алюминия *in vitro* на линии эндотелиальных клеток (модель антиангиогенетической терапии опухоли). Изучить высвобождение препарата и его накопление в клетках *in vitro*, а также эффективность проникновения микрогелей в клетки методами конфокальной лазерной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

4. Материалы и методы

4.1. Синтез микрогелей

Реагенты

Для синтеза микрогелей использовались реагенты: N-винилкапролактан (VCL) 98%, N,N'-метиленабисакриламид (MBA), ацетоацетоксиэтилметакрилат (AAEM) 95%, N-винилимидазол (Vim) >99%, акриловая кислота (AA), 2,2'-азобис(2-метилпропионамдин)дигидрохлорид (AMPA) 97%, персульфат аммония (PSA), N,N'-бис(акрилоил)цистамин (BAC) >99%, бис(2-метакрилоил)оксиэтилдисульфид (BMOED) >99%, метилполиэтиленгликольметакрилат $M_w \approx 2080$ 50% раствор в воде (OEOMA), флуоресцеин O-метакрилат (FMA) 97%, диметилсульфоксид (ДМСО) $\geq 99.9\%$, полученные из Sigma Aldrich использовались без предварительной очистки. В экспериментах использовалась исключительно деионизированная вода с сопротивлением 18,2 МΩ (Millipore Milli-Q).

Условия синтеза и очистки

Реакция синтеза микрогелей представляла собой осадительную полимеризацию. Синтез микрогелей проводился в трех различных форматах: 1,5 мл полипропиленовые пробирки (Eppendorf, Германия), 50 мл центрифужные пробирки (Corning, США) и в двустенном реакторе, снабженном мешалкой и обратным холодильником (ИКА, Германия). Реакция легко масштабируется, во всех вариантах синтезированные микрогели обладали схожими свойствами. Основная часть микрогелей, использованных для последующего анализа и применявшаяся в экспериментах *in vitro* была получена в 50 мл центрифужных пробирках. Данный вариант синтеза позволяет одновременно в одинаковых условиях получить до 6 образцов, что позволяет быстро синтезировать большое количество различных микрогелей. Реакцию проводили в водяной бане, нагрев осуществляли при помощи магнитной мешалки C-MAG HS 10 (ИКА, Германия), контроль температуры осуществлялся электронным термометром ETS-D5 (ИКА, Германия).

Синтез микрогелей на основе VCL

Предварительно рассчитанные навески мономеров VCL и MBA взвешивали на аналитических весах и количественно переносили в 50 мл центрифужную пробирку (см. **Приложение**, табл. №1, 2), добавляли рассчитанные аликвоты AAEM, Vim (или AA) и растворяли в 29,0 мл деионизированной воды при 70°C в течение 30 минут. В пробирку с

раствором мономеров добавляли 1 мл раствора инициатора АМРА (для Vim) или PSA (для АА). Реакции проводились в течение 0,5-5 часов в зависимости от эксперимента и состава реакционной смеси. После окончания реакции дисперсии микрогелей были очищены диализом с помощью мембраны с размером пор 12-14 kDa (Sigma) в объеме 5 литров в течение 3-х дней против деионизованной воды со сменой воды каждые 8 часов.

Выход и концентрация микрогелей определялась по следующей методике. 3 мл раствора дисперсии помещалось в предварительно взвешенные виалы. Виала с раствором взвешивалась и раствор упаривался в контейнере, закрытым мембраной в сушильном шкафу при 80°C в течение 24 часов. После этого сухие виалы вновь взвешивались, концентрация и выход сухого микрогеля определялись по формуле:

$$c = 1000 \times \frac{m_{\text{сух}} - m_0}{m_{3\text{мл}} - m_0}$$

$$\text{Выход} = 100\% \times \frac{30\text{мл} \cdot c / 1000}{\sum m_{\text{мономер}}}$$

где

c – концентрация микрогеля (г/л),

$m_{\text{сух}}$ – масса виалы после сушки (г),

m_0 – масса виалы до добавления раствора микрогеля (г),

$m_{3\text{мл}}$ – масса виалы после добавления 3 мл раствора микрогеля (г),

$m_{\text{мономер}}$ – масса каждого мономера в реакции (г).

Синтез микрогелей на основе VCL, содержащих ОЕОМА и ВАС

Синтез микрогелей для клеточных экспериментов *in vitro* проводился в аналогичных условиях в 50 мл центрифужных пробирках. Примеры составов образцов микрогелей № 21 и № 31 (с размером 120 нм и 150 нм соответственно), использованных для экспериментов *in vitro* представлены в таблице № 3 (см. **Приложение**). Все остальные микрогели содержали разное количество ВАС, ААЕМ, Vim, ОЕОМА и АМРА, описанное в полученных результатах. Доля ВАС, ААЕМ, Vim и АМРА варьировалась для образца микрогеля с размером 150 нм путем изменения концентрации одного из мономеров при постоянных концентрациях остальных.

Предварительно рассчитанные навески мономеров VCL и ВАС взвешивали на аналитических весах и количественно переносили в 50 мл центрифужную пробирку, добавляли рассчитанные аликвоты ААЕМ, ОЕОМА, Vim и растворяли в 29,0 мл деионизованной воды при 70°C в течение 30 минут. В пробирку с раствором мономеров добавляли 1 мл раствора инициатора АМРА, реакции проводились в течение 1 часа при 70°C. После окончания реакции дисперсии микрогелей были очищены диализом с помощью мембраны с размером пор 12-14 kDa (Sigma) в объеме 5 литров, 7 раз против деионизованной воды со сменой воды каждые 12 часов. После диализа микрогели были окончательно очищены трехкратным центрифугированием. Для центрифугирования использовалась ультрацентрифуга Optima (Beckman Coulter, США) с ротором Type 90 Ti. Условия центрифугирования: число оборотов 25000-35000 в минуту (38700-75900 RCF) в зависимости от размера микрогелей (80-150 нм), время 30 минут, температура 25°C. Выход и концентрация микрогелей определялась по методике, аналогичной описанной ранее. В отличие от предыдущей, отдельно определялась концентрация микрогелей и примесных полимеров (чистые микрогели и примесные полимеры были получены в ходе центрифугирования).

Синтез флуоресцентно меченых микрогелей на основе VCL, содержащих ОЕОМА и ВАС

Для синтеза флуоресцентно меченых микрогелей производился описанный выше синтез микрогелей. После 1 часа протекания реакции полимеризации (к моменту окончания синтеза микрогелей), к реакционной смеси добавляли 4 мг FMA в 60 мкл ДМСО. Реакционную установку закрывали фольгой и проводили полимеризацию еще в течение 20 минут при 70°C. После этого микрогели были очищены методом диализа и центрифугирования, как описано ранее. Синтезированные микрогели имели яркую желто-зеленую окраску. Микрогели обладали сильной флуоресценцией, которую детектировали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа ECLIPSE TE2000U (Nikon, Япония).

4.2. Измерения размеров и полидисперсности микрогелей

Измерения размеров микрогелей и полидисперсности (PdI) проводились методом динамического светорассеяния (DLS) на приборе Zetasizer Nano - ZS (MALVERN instruments, Великобритания). Результаты измерений обрабатывались программным обеспечением MALVERN instruments. Все измерения проводились в термостатируемых

условиях при температуре 25°C. В качестве показателя преломления использовалось значение раствора чистого pVCL.

4.3. Измерения ζ -потенциала синтезированных микрогелей

Измерения электрофоретической подвижности проводились на приборе Zetasizer Nano - ZS (MALVERN instruments, Великобритания). Для измерения использовалась кювета снабженная двумя электродами. Принцип измерения – лазерная Допплеровская велосиметрия (LDV). Результаты измерения электрофоретической подвижности пересчитывались в электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) в приближении теории Смолуховского при помощи программного обеспечения MALVERN instruments.

4.4. pH-зависимое разбухание микрогелей

Эксперименты по зависимости гидродинамического радиуса микрогелей с VIm, от pH проводились в буферном растворе 0,001 М KCl для того, чтобы уменьшить влияние ионной силы на гидродинамический радиус. Раствор микрогеля перемешивался в течение 15 минут и затем титровался концентрированным раствором HCl в кислую область или NaOH в щелочную. При этом отбирались аликвоты и проводились измерения DLS и LDV.

4.5. Кинетика образования и роста микрогелей

Параллельные измерения DLS и оптической плотности реакционной смеси в процессе синтеза микрогелей

Для того, чтобы изучить кинетику роста микрогелей нами были произведены параллельные измерения DLS и оптической плотности дисперсии микрогеля. Изучалась кинетика роста частиц микрогеля на примере реакции синтеза микрогеля без винилимидазола, содержащего VCL, AAEM и MBA, инициатор АМРА. В процессе реакции отбирались аликвоты объемом 200-1000мкл, после чего отобранная аликвота добавлялась к 3 мл холодной деионизованной воды, что приводило к полной остановке реакции полимеризации. Параллельно производились измерения оптической плотности (при 25°C и длине волны 400 нм) и DLS.

Влияние концентрации инициатора на продолжительность индукционного периода

Кинетика образования и роста микрогелей была изучена методом измерения оптической плотности раствора в процессе протекания синтеза на примере микрогеля без винилимидазола, содержащего VCL, ААЕМ, МВА и инициатор АМРА. Для этого проводилась реакция синтеза микрогеля в кварцевой кювете, снабженной магнитной мешалкой в спектрофотометре Cary-50 (Varian, США) при термостатировании 70°C. Измерение оптической плотности проводили непрерывно при длине волны 400 нм. Из полученных зависимостей оптического поглощения от времени вычитался период до ввода инициатора.

Рост микрогелей с использованием зародышей

Рост микрогелей с использованием зародышей был изучен методом измерения оптической плотности раствора в процессе протекания синтеза. Для изучения возможности «доращивания» зародышей микрогелей были взяты 2 типа зародышей содержащих VCL, ААЕМ, МВА и инициатор АМРА: полученные *in situ* (с диаметром около 100 нм) и синтезированные ранее и очищенные диализом (с диаметром 320 нм). Частицы с диаметром около 100 нм были получены отбором аликвоты реакционной смеси в процессе полимеризации. Аликвота раствора микрогелей *in situ* была разведена раствором мономеров VCL, ААЕМ и МВА в 45 раза (в 60 раз в случае микрогелей синтезированных ранее и очищенных диализом) и после термостатирования в течение 30 минут вводился раствор АМРА.

4.6. Сканирующая электронная микроскопия микрогелей с АА и Vim

Образцы микрогелей были разведены и высушены на стеклянной подложке. Изображения микрогелей методом сканирующей электронной микроскопии были получены на приборе Nvision 40 (Carl Zeiss, Германия). Эксперименты проводились на базе ЦКП ВНИИОФИ, Москва.

4.7. Загрузка микрогелей препаратами

Синтезированные микрогели №21 и №31 были загружены двумя различными препаратами, любезно предоставленными нам нашими коллегами из лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФРАН, Москва. Первый – «Фотосенс», препарат для

фотодинамической терапии второго поколения, представляющий собой смесь определенного состава натриевых солей сульфированного фталоцианина алюминия (от ди- до тетразамещенного), называемый далее ALPCS. Второй – несульфированный, незамещенный фталоцианин алюминия (ALPC), практически нерастворимый в воде. Загрузка препаратом рассчитывалась как отношение массы препарата, сорбированного микрогелем, к массе микрогеля, умноженной на 100%. Результаты измерений обрабатывались исходя из калибровочных прямых препаратов.

Загрузка ALPCS осуществлялась путем инкубации смеси растворов препарата и микрогеля при 37°C в течение 48 часов, после чего раствор центрифугировался в течение 0,5-4 часов при 5000-21000 RCF (в зависимости от загрузки). Супернатанты анализировались спектрофотометрически при длине волны 678,8 нм (максимум поглощения ALPCS), с целью измерения степени загрузки.

Загрузка ALPC в микрогели осуществлялась несколькими способами: путем осаждения раствора ДМСО в растворе микрогеля, либо путем инкубации микрогеля и препарата выше температуры фазового перехода микрогеля (при 70°C).

В первом случае был приготовлен раствор ALPC в ДМСО с концентрацией 20 мг/мл. Микрогели, загруженные ALPC, получали добавлением к раствору ALPC раствора микрогеля. Затем микрогели инкубировали при помощи прибора Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия) при нагревании 70°C и перемешивании 1000 об/мин в течение 24 часов. После загрузки препаратом микрогели были очищены путем трехкратного центрифугирования (10000 RCF, 40 минут) с последующим удалением супернатанта и ресуспендированием в деионизованной воде, после чего следовало центрифугирование (800 RCF, 10 минут) с целью очистки от незначительных примесей осадка препарата. Супернатант, содержащий микрогели, загруженные препаратом, в итоге использовался для экспериментов *in vivo* и *in vitro*.

Во втором случае к 1 мл раствора микрогеля с концентрацией 5 мг/мл, добавлялось 0,2-0,4 мг ALPC в чистом виде. После этого препарат инкубировали в приборе Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия) при нагревании 70°C и перемешивании 1000 об/мин в течение 72 часов. После загрузки препаратом микрогели были очищены от примеси нерастворенного ALPC центрифугированием (800 RCF, 10 минут). Супернатант, содержащий микрогели, загруженные препаратом, в итоге использовался для экспериментов *in vitro*. Загрузка микрогелей препаратом оценивалась

спектрофотометрически по поглощению света с длиной волны 614,6 нм (максимум поглощения ALPC) раствором загруженного препаратом микрогеля.

4.8. Оценка интенсивности флуоресценции микрогелей, загруженных ALPC, и фототоксичность микрогелей с разной загрузкой

Оценка интенсивности флуоресценции ALPC, загруженного в микрогели, проводилась следующим образом. В 96-луночной планшете были приготовлены серийные (двукратные) разведения раствора ALPC в ДМСО раствором микрогеля №31. Разведения были приготовлены в интервале загрузок препаратом 0,02%-40%. Аналогично были приготовлены контрольные разведения раствора ALPC в деионизованной воде в аналогичных концентрациях. Полученные растворы инкубировали 4 часа при 37°C. Визуализацию проводили при помощи камеры, встроенной в прибор УФФ-630-01-Биомпек (БИОСПЕК, Москва) - устройство светодиодное видеофлуоресцентное для проведения диагностики и фотодинамической терапии опухолей и участков метастазирования.

4.9. Культуры клеток

В работе были использованы эндотелиальные клетки человека перевиваемой линии EA.Hy926, были любезно предоставлены доктором Edgel C. J. (Университет Северной Каролины, США). Культура была получена путем гибридизации первичной линии эндотелиальных клеток HUVEC с линией клеток аденокарциномы легкого A-549. Клетки линии EA.Hy926 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелиальным клеткам макрососудов [75]. Клетки EA.Hy926 культивировали в среде DMEM с глюкозой 4.5 г/л; 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 mM L-глутамина и НАТ. Пересев клеточных линий осуществляли 1 раз в 3-4 дня по общепринятой методике, вызывая дезинтеграцию монослоя 5-минутной экспозицией в растворе трипсина (0,25%) с ЭДТА. Все реагенты компании Gibco, США. В экспериментах использовали клетки 5-12 пассажей. Пассирование клеток осуществляли по достижению культурой 90 % конфлюента. Культивирование клеток осуществляли в 5 % CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37°C.

Оценка жизнеспособности клеток методом исключения красителя (трипановый синий)

Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя (трипановый синий, Invitrogen, США). Аликвоту суспензии (~20µl) от каждого образца смешивали с равным количеством 0.4% (w/v) красителя трипановый синий и помещали на поверхность рабочего слайда для анализа на автоматическом клеточном счётчике Countess (Invitrogen, США). Каждый исследуемый образец клеток был подсчитан в дуплете.

4.10. Измерение цитотоксичности

Измерение цитотоксичности и пролиферативной активности производилось исходя из активности клеточных редуктаз (МТТ-тест) спустя 72 часа после воздействия. Ростовая среда исследуемых клеток заменялась на свежую, содержащую МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолбромид) с концентрацией 0,5 мг/мл. Клетки инкубировались в течение 4 часов при 37°C, после чего раствор над клетками аккуратно удалялся при помощи многоканальной пипетки, а к осадку образовавшегося формазана добавляли лизирующий раствор (99,4 мл ДМСО, 0,6 мл СН₃СООН и 10 г додецилсульфата натрия). Лизис и растворение формазана проводили при интенсивном перемешивании на шейкере S-3.02 M (ELMI, Латвия) в течение 10 минут. Оптическая плотность измерялась на планшеточном ридере Plate CHAMELEON при 544 нм и 620 нм. Результаты обрабатывались следующим образом: из оптических плотностей растворов, измеренных при 544 нм и 620 нм вычитались значения фона при данной длине волны, а затем из значений оптической плотности, измеренных при 544 нм, вычитались соответствующие значения при 620 нм. Обработка результатов производилась при помощи программы GraphPad Prism 5. Аппроксимация кривых проводилась с использованием четырехпараметрического логистического уравнения сигмоидальной зависимости доза-ответ. Доверительный интервал рассчитывался для p=0,95.

Хроническая и острая токсичность препаратов и микрогелей

К клеткам линии EA.Hy926, культивированным в 96-луночном планшете, добавляли исследуемые образцы препаратов и микрогелей в различных концентрациях с разведением в полпорядка в ростовой среде. В случае хронической токсичности клетки инкубировали с образцами 72 часа в 5 % CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37°C. После этого производили измерение цитотоксичности (МТТ-тест). В случае острой токсичности клетки инкубировали с образцами 6 часов при 37°C после чего

ростовая среда удалялась, клетки промывались PBS, и добавлялась свежая ростовая среда. После замены ростовой среды клетки инкубировали 72 часа в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. После этого, производили измерение цитотоксичности (МТТ-тест).

Фототоксичность препаратов

К клеткам линии EA.Hy926, культивированным в 96-луночном планшете, добавляли исследуемые образцы препаратов и микрогелей в различных концентрациях с разведением в полпорядка в ростовой среде. Клетки инкубировали 2 часа при 37°C после чего их подвергали облучению прибором УФФ-630-01-Биомпек (БИОСПЕК, Москва), в течение 1, 2 или 4 часов в зависимости от эксперимента, дозы излучения составляли 6, 12 и 24 Дж/см² соответственно. Облучение проводили в 5 % CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37°C. После облучения ростовая среда удалялась, клетки промывались PBS, и добавлялась свежая ростовая среда. После замены ростовой среды клетки инкубировали 72 часа в 5 % CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. После этого, производили измерение клеточной цитотоксичности (МТТ-тест).

4.11. Проточная цитофлуориметрия

К клеткам линии EA.Hy926, культивированным в 12-луночном планшете, добавляли исследуемые образцы препаратов и микрогелей в различных концентрациях с разведением в один порядок. Клетки с препаратами инкубировали 2 часа при 37°C после чего промывали 3 раза раствором PBS. Отмытые от препарата клетки обрабатывали раствором трипсина (0,25%) с ЭДТА до полного открепления клеток. Открепившиеся клетки центрифугировали, удаляли супернатант и ресуспендировали в 0,5 мл PBS. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованным воздушно-охлаждаемым аргоновым лазером (длина волны 488 нм) и светодиодным лазером (длина волны 630 нм). В каждом образце анализировали 10000 событий. Эмиссию флуоресценции флуоресцеина регистрировали в канале FL1 (515-545 нм), а препарата (ALPC или ALPCS) в FL4 (653-669 нм). В качестве контроля использовались клетки, полученные путем добавления образца препарата или раствора микрогеля с препаратом максимальной концентрации и мгновенной отмывкой 3 раза раствором PBS. Анализ файлов данных проводили в программе Win MDI. Статистическая обработка данных, собранных методом проточной цитофлуориметрии, производилась с использованием t-критерия Стьюдента для p=0,95.

4.12. Конфокальная микроскопия

К клеткам линии EA.Hy926, культивированным в 6-луночной планшете на покровных стеклах, добавляли исследуемые образцы препаратов (ALPCS 20 мкг/мл и ALPC 10 мкг/мл), а также микрогелей (с концентрацией микрогеля 50 мкг/мл), загруженных различной долей препарата. Клетки с препаратами инкубировали 2 часа при 37°C после чего промывали 3 раза раствором PBS (фосфатно-солевой буфер) и фиксировали 4% параформальдегидом. Препараты для микроскопии были подготовлены путем перенесения покровных стекол на предметные и заключения в смоле (PermaFluor, Thermo scientific, USA). Визуализация субклеточной локализации проводилась при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия). Фталоцианин алюминия возбуждали лазером 633 нм, флуоресцеин - 488 нм, регистрация проводилась соответственно в диапазонах 650-750 нм и 500-600 нм.

5. Результаты и обсуждение

5.1. Синтез микрогелей

5.1.1. Синтез микрогелей на основе VCL

В первой части данной работы (п. 5.1.1.) были синтезированы микрогели, на основе VCL, имеющие состав близкий к описанным в литературе [70-73]. Синтез представлял собой свободнорадикальную осадительную полимеризацию (см. рис. 14):

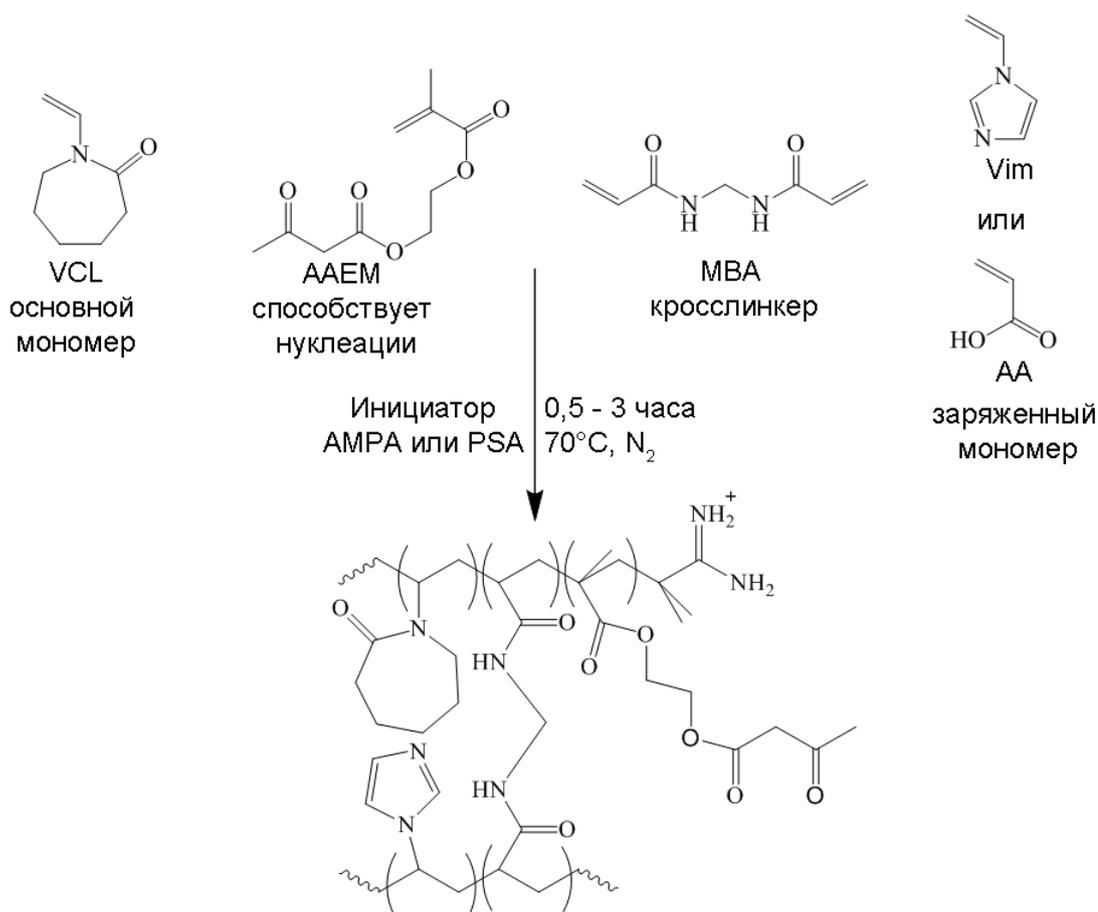


Рис. 14. Схема синтеза микрогелей на основе VCL, AAEM, MBA и Vim (или AA).

После синтеза было изучено набухание и ζ -потенциал синтезированных микрогелей, так как помимо изменения диаметра набухание приводит к высвобождению загруженного препарата, а величина ζ -потенциала является важной характеристикой, влияющей на проникновение в клетки и на продолжительность циркуляции в кровотоке.

Синтез микрогелей на основе VCL с различным содержанием Vim

Синтез микрогелей с Vim проводился в течение 1,5 часов, большие времена синтеза не приводят к росту частиц (см. п. 5.2.6.), в то же время существует вероятность протекания

побочных реакций. Полученные микрогели были бесцветны, наличия коагулировавших гелей не обнаружено. Выходы микрогелей были приблизительно одинаковы и составляли 65-55%. Высокие выходы (по сравнению с микрогелями, содержащими АА) можно объяснить тем, что в условиях протекания реакции лишь часть групп винилимидазола заряжена ($pK_a \text{ Vim}=7,0$), таким образом, эффекты электростатического отталкивания выражены не столь ярко, как в случае АА.

Синтез микрогелей на основе VCL и ААЕМ с различным содержанием АА

Первый синтез микрогелей с АА проводился в течение 5 часов, с использованием PSA в качестве инициатора (ввиду наличия не положительного заряженного Vim, а анионного АА), использование АМРА приводит к быстрой коагуляции за счет компенсации отрицательно заряженными группами АА, положительных групп инициатора АМРА. В процессе синтеза, примерно через час, полностью коагулировал гель без АА (рис. 15). По-видимому, причиной послужил низкий заряд микрогелей. В случае микрогелей с большим числом зарядов, содержащих АА, коагуляция наблюдалась, но удалось получить соответствующие наночастицы для всего ряда АА 1%-5%. Выходы соответствующих микрогелей напрямую зависели от их агрегативной устойчивости (см. табл. 2 **Приложение**) и были далеки от предельно возможных. Таким образом, данные условия синтеза не являлись оптимальными. В связи с тем, что коагуляция наблюдалась только после определенно времени протекания реакции, когда концентрация микрогелей в растворе возрастала, была предпринята попытка оптимизации времени синтеза. Для оптимизации времени синтеза был использован метод, основанный на рассеянии света частицами микрогелей. Суть заключалась в том, что по мере протекания реакции полимеризации отбирались аликвоты реакционной среды и разбавлялись деионизованной водой с последующим измерением их оптической плотности при 400 нм. Как показали предыдущие исследования (см. п. 5.2.6.), измерение оптической плотности является более чувствительным способом оценки полноты протекания реакции и окончания роста частиц микрогеля, а разведение реакционной смеси в 3 и более раз холодной деионизованной водой практически полностью останавливает реакцию.

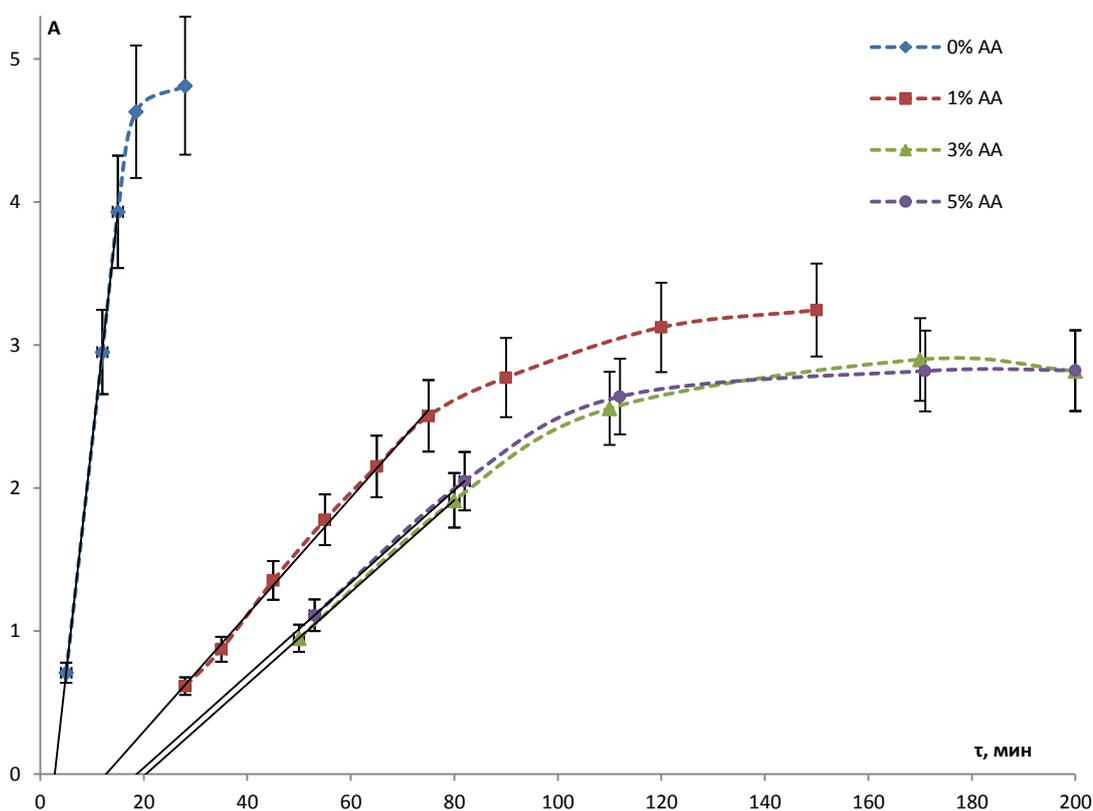


Рис. 15. Зависимость оптической плотности растворов от времени для реакционных смесей, содержащих различную долю АА.

Из рисунка 15 видно, что рост менее заряженных микрогелей протекает быстрее, а также, по-видимому, наличие зарядов сказывается на индукционном периоде образования зародышей микрогелей (см. п. 5.2.6.). Это связано с наличием электростатического отталкивания между заряженными мономерами в процессе роста и олигомерами в процессе образования внутренних шивков, что приводит к резкому уменьшению времени синтеза для микрогеля, не содержащего АА. На рис. 15 видно резкое различие между микрогелем без АА и микрогелем с концентрацией АА 1%. При дальнейшем увеличении доли АА в исходной смеси мономеров различие в кинетике роста и коагуляции нивелируется. Из рассмотрения кривых, изображенных на рис. 15 следует, что микрогели с 3% АА и 5% АА растут приблизительно с одинаковой скоростью и оптическая плотность их растворов выходит на плато приблизительно в один и тот же момент. При помощи оптимизации времени синтеза был увеличен выход синтезированных микрогелей в 2 и более раза, а также был синтезирован микрогель без АА, что показывает принципиальную возможность синтеза микрогелей с низким количеством зарядов при помощи остановки реакции полимеризации.

5.1.2. Синтез микрогелей для направленной доставки фталоцианина алюминия

Проведенные исследования физико-химических свойств синтезированных микрогелей на основе VCL (см. п. 5.1.1.) выявили ряд причин, по которым они принципиально не могут быть использованы для направленной доставки. Основные проблемы, не позволяющие использовать их для пассивной доставки противораковых препаратов представлены на рис. 16:



Рис. 16. Основные проблемы, препятствующие использованию микрогелей на основе VCL (п. 5.1.1.) для направленной доставки препаратов.

На основе существующей литературы (см. п. 2.3.3. и 2.4.3.) можно предложить основные пути к решению перечисленных проблем за счет изменения состава микрогелей (рис. 17):



Рис. 17. Пути к решению проблем приведенных на рис. 16. за счет изменения состава микрогелей.

В результате синтеза новых микрогелей, на основе изученных ранее, нам удалось решить указанные проблемы (см. рис. 17) и получить микрогели, которые можно эффективно использовать для направленной доставки. С этой целью пришлось изменить состав микрогелей, чтобы придать им новые, желаемые свойства. Был синтезирован ряд микрогелей на основе VCL и ААЕМ, содержащих ОЕОМА в качестве реакционноспособного стабилизатора, V_{im} в качестве заряженного мономера, ВАС в качестве кросслинкера и АМРА в качестве инициатора.

Стабилизация растворов микрогелей и влияние ОЕОМА на их размер

Проблему стабильности микрогелей при $pH > 7$ и концентрации соли порядка 0,15 М удалось решить введением макромономера, содержащего полиэтиленгликоль (ОЕОМА), который выполнял роль реакционноспособного стабилизатора. По-видимому, в ходе реакции полимеризации образовывался амфифильный сополимер ОЕОМА и VCL (+ ААЕМ и ВАС), в котором ОЕОМА выполнял роль гидрофильной части, а образовавшиеся фрагменты $pVCL$ при $70^{\circ}C$ имели гидрофобный характер. В результате в дальнейшем образование зародышей и рост происходили за счет гидрофобных взаимодействий VCL, в то время как гидрофильный полиэтиленгликоль концентрировался на поверхности растущего микрогеля, что приводило к ограничению его роста. Таким образом, варьируя концентрацию ОЕОМА удалось (по аналогии с SDS) добиться определенного размера микрогелей (см. рис. 18).

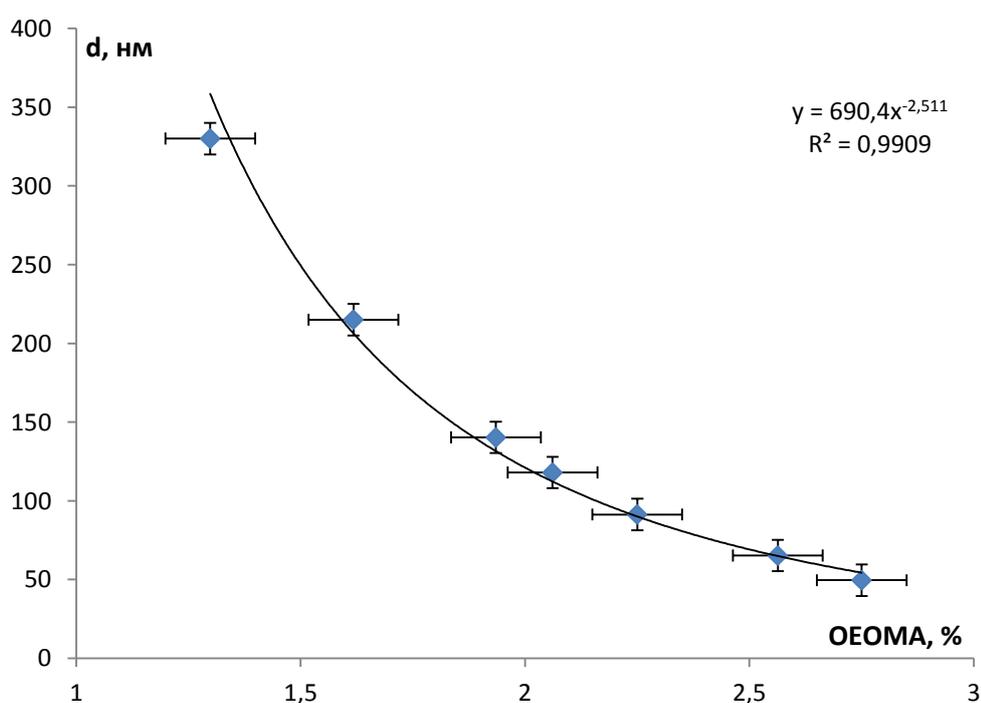


Рис. 18. Зависимость размера микрогелей от доли ОЕОМА в смеси мономеров.

Более того, зная зависимость размера микрогелей от доли ОЕОМА в смеси мономеров, полученную экспериментально и представленную на рис. 18, можно синтезировать микрогели с нужным размером в интервале 50-300 нм. На основании полученной зависимости удалось получить образцы микрогелей № 21 и № 31с размером 120 нм и 150 нм соответственно, использованные в дальнейшей работе. Синтезированные микрогели обладали коагуляционной стабильностью в растворах КСl с концентрацией 3М и рН=8, что позволило использовать их для загрузки препаратом и последующей очистки методом центрифугирования. Столь высокая устойчивость полученных микрогелей позволяет использовать их для направленной доставки лекарственных препаратов. К негативным последствиям введения ОЕОМА стоит отнести уменьшение монодисперсности микрогелей, значения PdI синтезированных микрогелей (по данным DLS) находился в интервале 0,1-0,3; причем полидисперсность особенно сильно возрастала при увеличении размеров микрогелей более 200 нм. Микрогели в интересующем нас диапазоне размеров имеют удовлетворительное значение PdI = 0,18.

Роль ААЕМ в синтезе микрогелей, содержащих ОЕОМА

Первоначально предполагалось синтезировать микрогели на основе VCL, не содержащие ААЕМ. Однако при попытке синтезировать микрогели, стабилизированные ОЕОМА, но не содержащие ААЕМ, были получены термочувствительные мицеллы. По-видимому, это связано с тем, что помимо того, что ОЕОМА препятствует росту микрогелей, он также препятствует зародышеобразованию, что приводит к синтезу полимеров со слаборазветвленной структурой. В то же время доля VCL в них высока и при 70°C по прошествии около 40 минут реакции синтеза, когда рVCL достигает определенной молекулярной массы, происходит термозависимое образование мицелл с ядром рVCL и оболочкой ОЕОМА. Однако, как мы узнали из экспериментов по кинетике образования и роста микрогелей (см. п. 5.2.6.), рост микрогелей на основе VCL, с инициатором АМРА останавливается спустя 16-20 минут ввиду обеднения реакционной смеси по кросслинкеру. Скорее всего, в этом случае также важно, чтобы частицы-зародыши микрогелей образовались не более чем через 20 минут, так как после этого момента в реакционной среде практически не останется свободного кросслинкера, что и приводит к тому, что образующиеся термочувствительные мицеллы не могут быть эффективно сшиты. Таким образом, роль ААЕМ заключается в интенсификации процесса зародышеобразования. Будучи метакриловым мономером, ААЕМ обладает большей реакционной способностью, чем VCL (при намного меньшей растворимости в воде), и, по-видимому, частицы-зародыши, образующиеся при синтезе микрогелей, содержат высокую

долю ААЕМ, которая вносит важный вклад в образование зародышей, что особенно важно, когда в реакционной смеси присутствует ОЕОМА, препятствующий зародышеобразованию. Таким образом, не удалось исключить, как оказалось, важный для зародышеобразования, мономер ААЕМ и все микрогели, синтезированные впоследствии, содержали ААЕМ.

Введение биоразлагаемых сшивок в микрогели

Первоначально введение биоразлагаемых сшивок предполагалось осуществить путем замены МВА на ВМОЕД. Однако ВМОЕД обладал недостаточной растворимостью, и хотя в процессе реакции он растворялся полностью и микрогели обладали схожими свойствами, для синтеза микрогелей, содержащих VCL, ААЕМ, и ОЕОМА было решено использовать ВАС, который исходно полностью растворялся в воде при 70°C. Оказалось, что доля кросслинкера имеет крайне важное значение и также позволяет синтезировать микрогели с заданным размером. Полученная зависимость размера синтезированных микрогелей от доли ВАС в смеси мономеров (на основе образца №31, при 2% ОЕОМА в смеси мономеров) показывает, что рост доли ВАС приводит к резкому увеличению диаметра микрогелей (см. рис. 19).

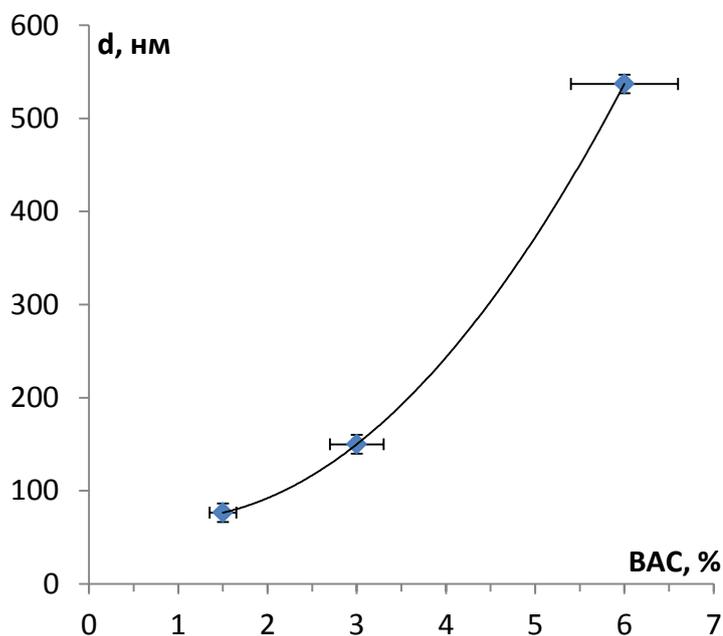


Рис. 19. Зависимость размера микрогелей от доли кросслинкера ВАС в смеси мономеров.

Причем не удастся синтезировать микрогели с долей ВАС более 7% ввиду их полной коагуляции в первые минуты синтеза. Для того чтобы фрагменты распада микрогеля в клетке имели минимальную молекулярную массу необходимо, чтобы микрогель содержал максимальную долю сшивки. Однако увеличение доли ВАС в смеси

мономеров более 3% приводит к резкому увеличению размера микрогеля, поэтому дальнейшей работе использовались микрогели, содержащие 3% ВАС.

Влияние доли заряженного мономера Vim

В ходе изучения влияния доли заряженного мономера были синтезированы микрогели на основе образца № 31, который использовался в дальнейших экспериментах. Было показано, что увеличение доли Vim в составе мономеров вплоть до 25% не приводило к значительному изменению размеров и полидисперсности микрогелей. Однако дальнейшее увеличение доли Vim приводило к уменьшению концентрации синтезируемых микрогелей и увеличению концентрации примесных полимеров (см. рис. 20).

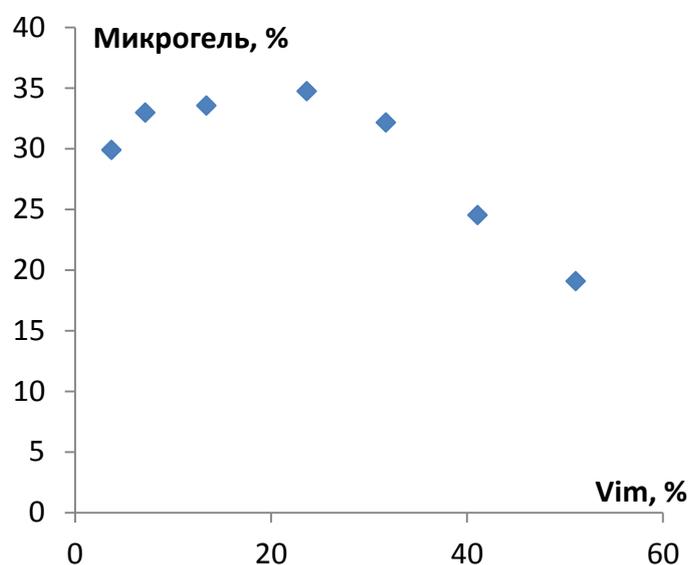


Рис. 20. Зависимость доли микрогелей в смеси полимеров после синтеза от доли Vim в смеси мономеров.

Интересно отметить, что при увеличении доли Vim более 60% микрогели не образуются. По-видимому, это связано с тем, что введение Vim (не обладающего термочувствительными свойствами) приводит к росту температуры фазового перехода образующихся полимеров и при некоторой критической концентрации (более 60% Vim в смеси мономеров) температура фазового перехода образующихся полимеров превышает 70°C. Таким образом, удалось синтезировать микрогели, содержащие 2-25% Vim в смеси мономеров без изменения их размеров, однако в дальнейшей работе использовались микрогели № 21 и № 31 (с размером 120 нм и 150 нм соответственно), содержащие 4% Vim, так как при большем содержании Vim образующиеся микрогели имеют большой ζ-потенциал (более 30 мВ), который может приводить к нежелательным процессам сорбции анионных белков сыворотки и опсонизации компонентами иммунной системы.

Влияние доля инициатора АМРА

Эксперименты по изучению физико-химических свойств микрогелей и в частности кинетики их образования и роста показали, что увеличение концентрации инициатора способствует более быстрому росту и увеличению выхода микрогелей. С этой целью при синтезе образцов микрогелей № 21 и № 31 мы увеличили долю инициатора с 1,25% до 3% в смеси мономеров, что не повлияло на размер конечных частиц, но привело к незначительному уменьшению индекса полидисперсности PdI с 0,25 до 0,18. Дальнейшее увеличение концентрации инициатора до 6% практически не сказывалось ни на размере, ни на полидисперсности микрогелей.

Синтез флуоресцентно меченых микрогелей

Первоначально предполагалось вводить флуоресцирующий мономер FMA непосредственно в начале реакции. Однако FMA обладал слишком низкой растворимостью, не позволявшей синтезировать микрогели с необходимым уровнем флуоресценции. Тогда FMA был растворен в ДМСО или этаноле, после чего он был добавлен в момент начала реакции. В данном случае микрогели не образовывались. Выяснилось, что даже незначительная доля (<0,3%), органических полностью ингибировала процесс образования зародышей микрогелей. Таким образом, было решено ввести флуоресцентную метку после синтеза микрогелей. Для этого было исследовано несколько условий реакции. Оптимальными условиями синтеза было введение раствора FMA в момент окончания обычного синтеза (через 60 минут) и дополнительное время полимеризации после введения FMA 20 минут. Микрогели обладали сильной флуоресценцией в области 520-550 нм при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм и при больших концентрациях микрогеля были способны окрашивать клетки (см. рис. 21).

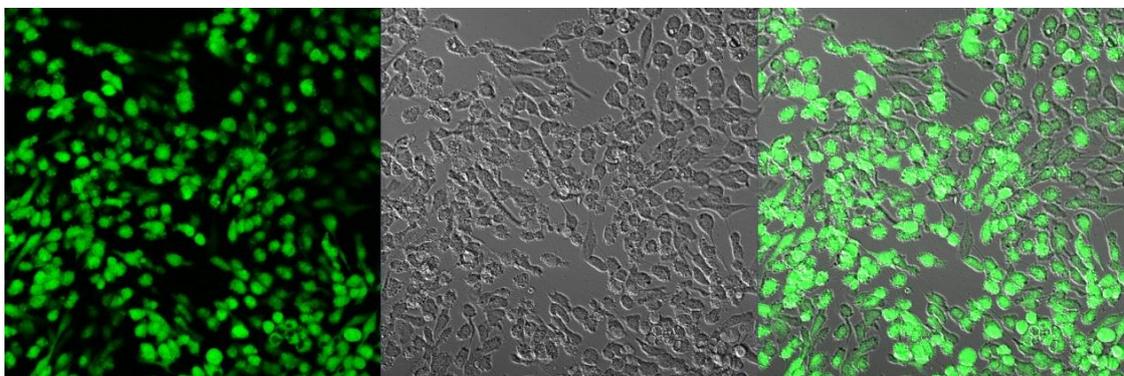


Рис. 21. Флуоресценция клеток, окрашенных концентрированным (1г/л) раствором микрогеля.

5.2. Физико-химические свойства микрогелей на основе VCL

Понимание процессов, влияющих на размер и заряд микрогелей необходимо для создания микрогелей для направленной доставки. Определенный размер крайне важен для продолжительной циркуляции и накопления в опухоли (см. п. 2.1.2). Процесс набухания играет первоочередную роль для выхода микрогеля в цитоплазму клеток (см. п. 2.3.2), а величина ζ -потенциала крайне важна для проникновения в клетку или длительной циркуляции в кровотоке (см. п. 2.1.2). С этой целью было изучено влияние ионной силы и pH на размер и ζ -потенциал синтезированных микрогелей.

5.2.1. Размер микрогелей после диализа

Размеры синтезированных микрогелей, измеренные при 25°C в деионизованной воде при pH \approx 6, коррелируют со скоростью роста частиц: частицы с меньшим числом зарядов больше, причем разница между микрогелями без заряженных мономеров и с долей заряженных мономеров 1% выражена наиболее отчетливо (см. рис. 22).

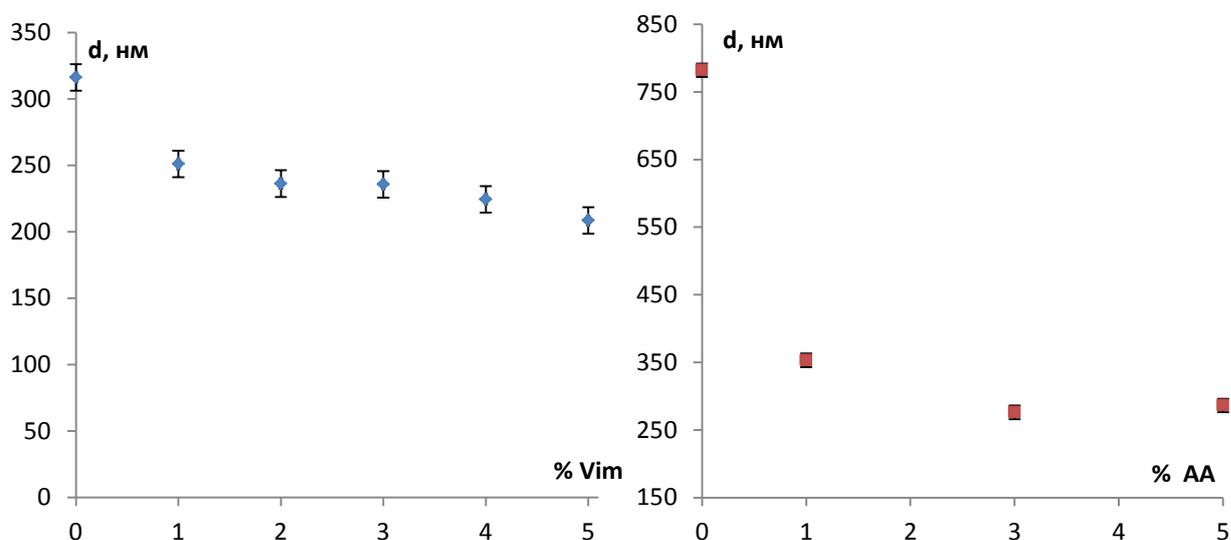


Рис. 22. Среднечисловой диаметр микрогелей в зависимости от доли Vim в реакционной смеси (слева), среднечисловой диаметр микрогелей в зависимости от доли AA в реакционной смеси (справа).

Синтезированные микрогели отличались высокой монодисперсностью, PdI находился в интервале 0,01-0,06. Результаты сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) также подтверждают полученные результаты (см. рис. 23, 24), но с отклонением 5-45 % в сторону меньших размеров, так как в высушенном состоянии микрогели,

содержавшие большое количество воды, сжимаются. Высокая монодисперсность синтезированных микрогелей также была показана методом СЭМ.

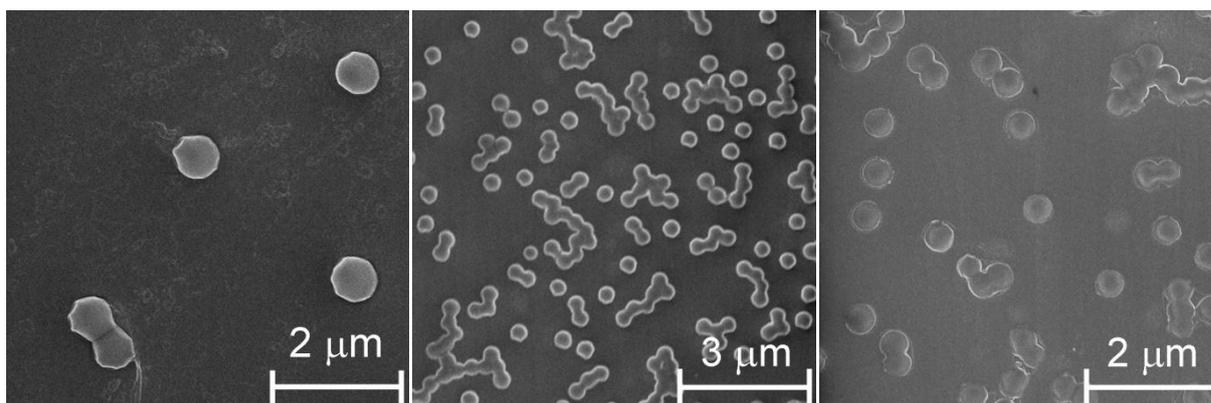


Рис. 23. Изображения микрогелей с 0%, 1% и 5% АА (слева направо), полученные СЭМ.

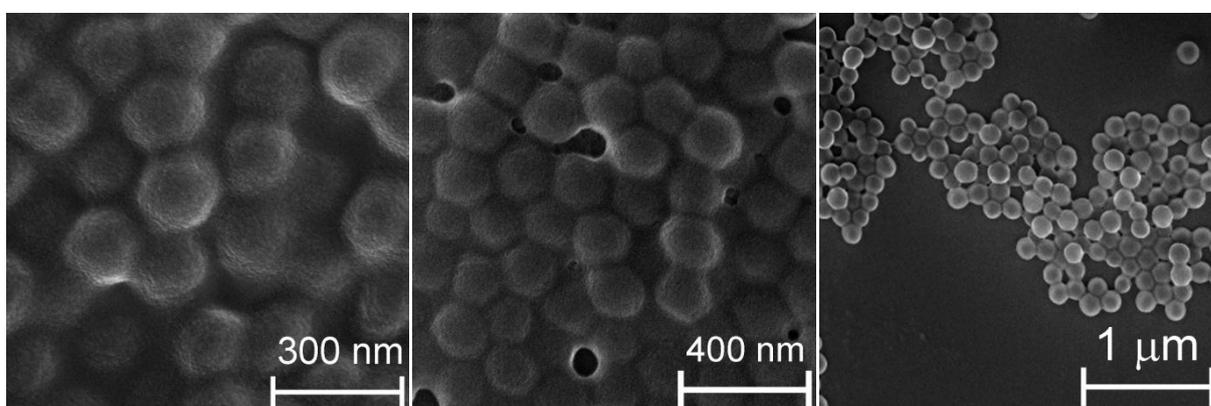


Рис. 24. Изображения микрогелей с 0%, 1% и 5% Vim (слева направо), полученные методом СЭМ.

Следует также отметить, что при высушивании большему сжатию подвергались образцы с меньшей долей заряженного мономера.

5.2.2. Сжатие микрогелей при повышении ионной силы раствора

Для измерения рН зависимости разбухания гелей было необходимо оценить влияние ионной силы на гидродинамический радиус микрогелей.

Влияние ионной силы на гидродинамический радиус заряженных микрогелей

В данном эксперименте измерялся гидродинамический радиус растворов микрогелей при 25°C, содержащих различное количество заряженных групп Vim в растворах KCl с различной концентрацией. Было показано, что сжатие микрогелей при увеличении ионной силы отличается от такового для латексов. Это связано с тем, что при температурах ниже температуры фазового перехода термочувствительный pVCL (в

отличие от гидрофобного полистирола) находится в набухшем состоянии, чему дополнительно способствует наличие одноименно заряженных мономеров Vim (или AA) внутри сетки микрогеля. Тем не менее, в процессе добавления соли концентрация контрионов повышается и происходит экранирование заряда ионизированных мономеров, что приводит к уменьшению силы отталкивания между соседними цепями сетки микрогеля и сжатию микрогеля.

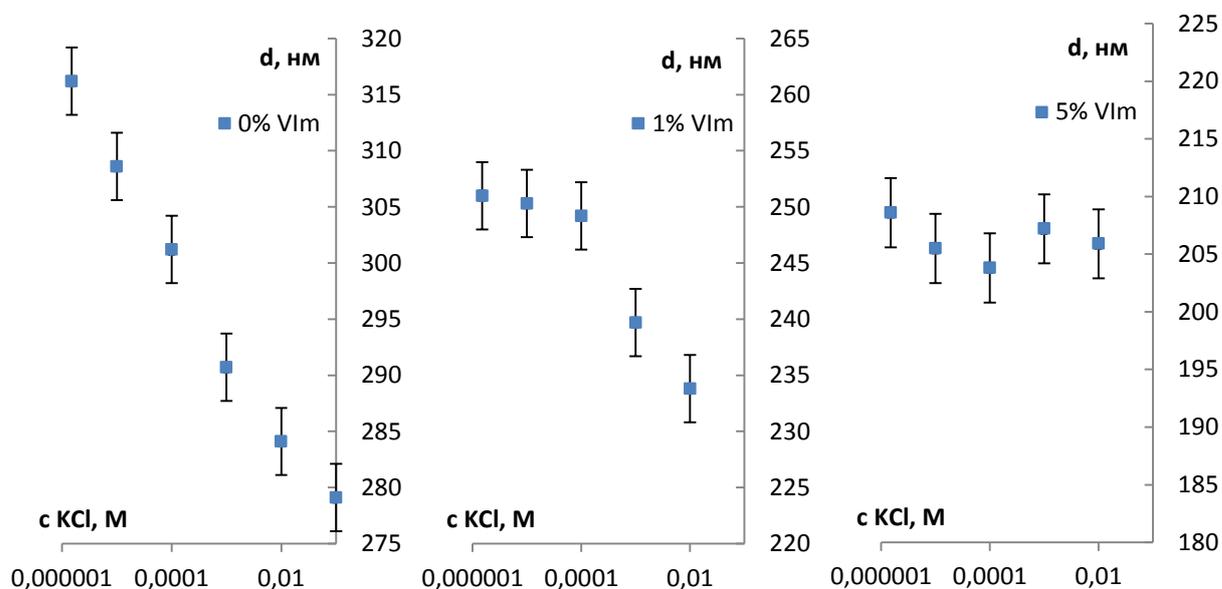


Рис. 25. Зависимости диаметра микрогеля с 0%, 1% и 5% Vim (слева направо) от концентрации KCl.

Стоит отметить, что если в случае микрогеля с 0% Vim зависимость гидродинамического радиуса от концентрации так же, как и в случае латекса имеет, логарифмический вид, но с намного большим коэффициентом при логарифме, то в случае микрогелей с зарядами наблюдаемая картина заметно отличается (см. рис. 25). Отличие поведения микрогелей с зарядами в растворах KCl связано с появлением устойчивости к сжатию под действием ионной силы. Было показано, что в случае 1% Vim существует определенная концентрация, до которой микрогель несжимаем, однако после увеличения концентрации соли выше определенной концентрации микрогель ведет себя так же, как и микрогель без заряженного мономера (см. рис. 25).

Суть данного эффекта заключается в том, что при низкой концентрации соли заряды внутри микрогеля эффективно взаимодействуют друг с другом и электростатическое отталкивание зарядов, расположенных на расстоянии меньше длины Дебая, вызывает набухание микрогеля. При дальнейшем повышении концентрации соли, при достижении критической концентрации, происходит экранирование заряженных мономеров внутри сетки микрогеля. Это приводит к тому, что микрогель с 1% Vim

начинает вести себя как аналогичный микрогель с 0% V_{im} , т.к. сила электростатического отталкивания между соседними заряженными мономерами становится меньше, силы притяжения цепей сетки внутри микрогеля и микрогель начинает сжиматься при дальнейшем увеличении концентрации соли и уменьшении длины Дебая.

В предельном случае высокой плотности зарядов в микрогеле (микрогель с 5% V_{im}), гидродинамический радиус практически не изменяется с ростом ионной силы (см. рис. 25). Скорее всего, это связано с тем, что при высокой концентрации заряженного мономера заряженные группы, расположенные внутри сетки микрогеля, находятся на расстоянии, меньше длины экранирования. Таким образом, внутреннее отталкивание цепей сетки микрогеля препятствует его сжатию при всех концентрациях, при которых коллоидный раствор микрогеля сохраняет свою устойчивость.

Данный эксперимент также показал, что синтезированные микрогели без ОЕОМА теряли свою коагуляционную стабильность уже в 0,1 М растворе KCl ($pH \approx 6$) и не могли быть использованы для направленной доставки.

5.2.3. Исследование изменения ζ -потенциала микрогелей при повышении ионной силы раствора

Для измерения pH зависимости ζ -потенциала микрогелей было необходимо оценить влияние ионной силы на ζ -потенциал микрогелей. Образцы микрогелей, были приготовлены путем разведения концентрированного раствора диализованного микрогеля в растворах KCl с известной концентрацией и $pH=6$. Зависимость ζ -потенциала, вычисленного по уравнению Смолуховского, от концентрации KCl представлена на рис. 26.

Стоит отметить, что добавление соли приводит к уменьшению электрофоретической подвижности микрогелей, при этом уменьшение не всегда носит монотонный характер. В случае микрогеля без винилимидазола зависимость монотонна и ζ -потенциал падает практически до нуля при концентрации KCl 0,01 М, вследствие чего раствор микрогеля без ОЕОМА практически полностью теряет свою коагуляционную устойчивость. В то же время в случае микрогелей, обладающих заряженными мономерами наблюдается эффект увеличения подвижности при добавлении низких концентраций соли, что может быть аналогией эффекта «всаливания», характерного для растворов белков.

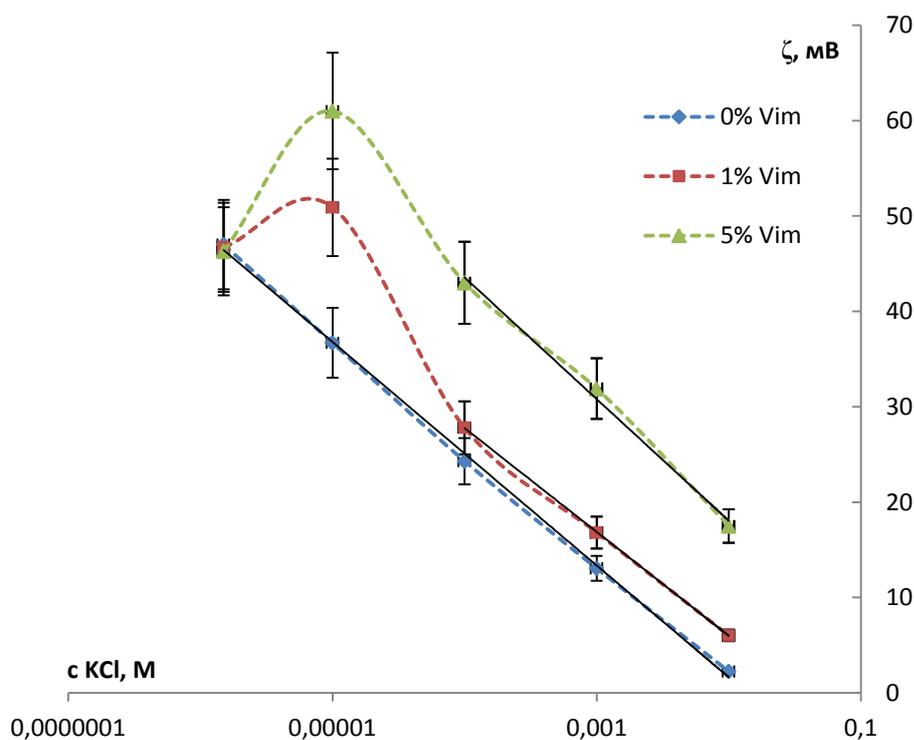


Рис. 26. Зависимость ζ -потенциала микрогелей с Vim от концентрации KCl.

Суть данного явления заключается в увеличении растворимости белков при переходе от деионизованного раствора к слабосоленому, за счет облегчения диссоциации карбоксильных групп и протонирования аминогрупп заряженных остатков аминокислот. Аналогичное образование заряженных групп может наблюдаться и в случае микрогелей. Именно это может приводить к увеличению подвижности микрогелей с винилимидазолом. Полученные значения ζ -потенциала pVCL микрогелей без Vim или AA вызывают ряд вопросов и будут дополнительно исследованы в последующих работах.

5.2.4. Исследование рН-зависимого набухания микрогелей

Зависимости гидродинамического диаметра от рН при 25°C представлены на рис. 27. рКа Vim = 7,0, в тоже время набухание микрогелей происходит в интервале рН 4-7. Отличие интервала набухания микрогеля от рКа мономера, связано с полиэлектролитным эффектом. Полиэлектролитный эффект часто наблюдается в случае микрогелей, содержащих заряженные группы [47]. При рН выше 7 раствор микрогеля с Vim без ОЕОМА необратимо коагулирует, что связано с падением ζ -потенциала. Зависимости гидродинамического радиуса микрогелей от рН, содержащих AA в качестве заряженного мономера, представлены на рис. 27.

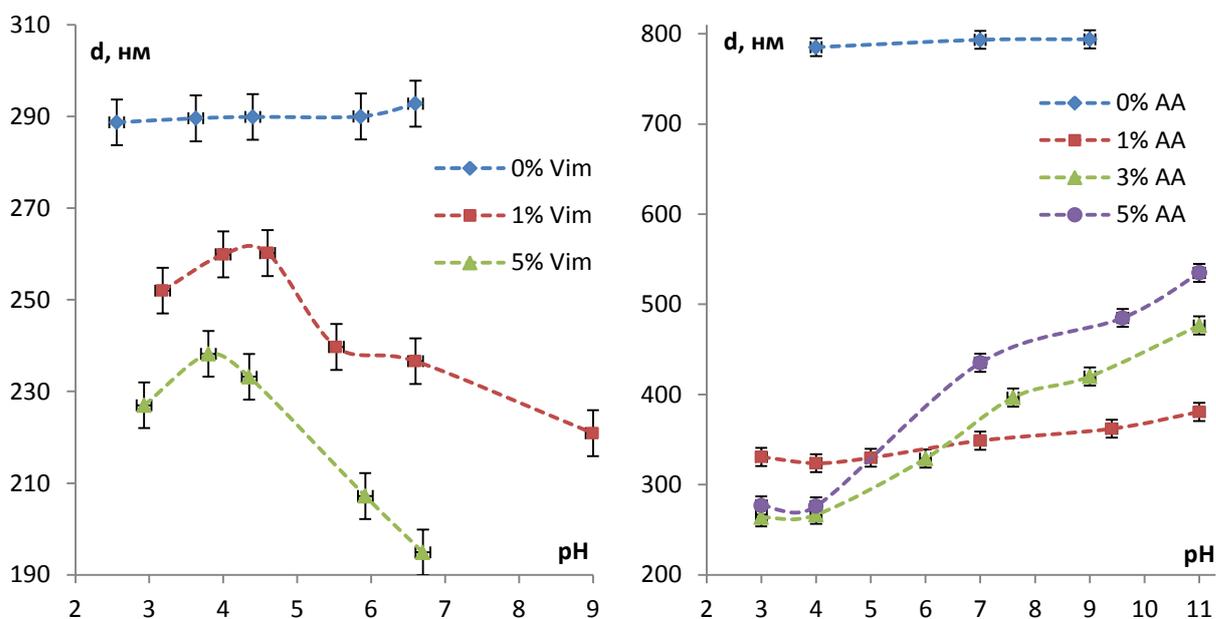


Рис. 27. Зависимость гидродинамического радиуса микрогелей с Vim от pH (слева), зависимость гидродинамического радиуса микрогелей с AA от pH (справа).

Наблюдаемое поведение микрогелей характерно для аналогичных микрогелей, описанных в литературе (см. п. 2.4.3.). Несмотря на то, что pK_a AA = 4,35, микрогели набухают при pH 4-8, что по аналогии с микрогелями с Vim обусловлено полиэлектролитным эффектом. Увеличение диаметра микрогелей в области pH более 10 может быть обусловлено енолизацией ацетоацетатной группы, имеющей pK_a = 10,6. Микрогели, содержащие AA были намного более устойчивы, чем микрогели с Vim и, теряли устойчивость лишь при $pH < 3$. По-видимому, это связано с тем, что в широком диапазоне pH 4-11 микрогели, содержащие AA, имеют сильный отрицательный заряд.

5.2.5. Изменение ζ -потенциала под действием pH

Влияние pH на электрофоретическую подвижность микрогелей с Vim

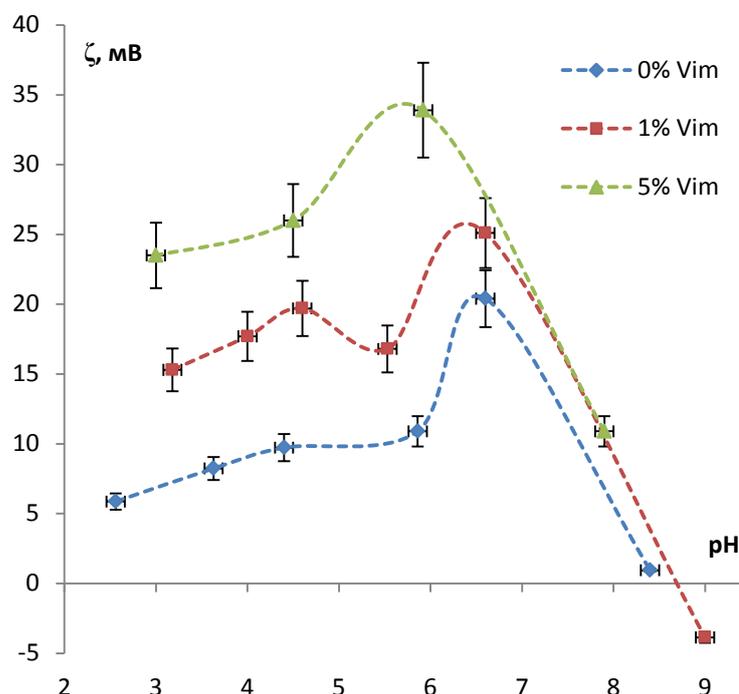


Рис. 28. Зависимость ζ -потенциала микрогелей с Vim от pH.

Уменьшение ζ -потенциала при pH ниже 5 (см. рис. 28) связано с увеличением ионной силы, т.к. добавление 0,001 М KCl неспособно полностью нивелировать очень сильный эффект уменьшения ζ -потенциала с ростом концентрации электролита в растворе. Из рис. 28 следует, что при pH больше 7 происходит очень резкое падение ζ -потенциала, что приводит к быстрой коагуляции раствора микрогеля без ОЕОМА, т.к. при pH ниже 7 происходит депротонирование групп винилимидазола. Удалось также показать, что при pH >8 микрогели имели очень слабый отрицательный заряд. Вероятно, это обусловлено депротонированием карбоксильных групп, образовавшихся в результате побочной реакции – гидролиза капролактаманного кольца при нагревании в процессе синтеза микрогелей.

Интересно отметить, что при измерении в области pH около 7 было показано резкое увеличение подвижности (см. рис. 28), что нельзя объяснить pH-зависимым сжатием микрогеля (в той же области pH), которое отсутствует у микрогеля без винилимидазола, а также влиянием ионной силы, которое не может проявиться в этой области благодаря буферному эффекту 0,001 М KCl. Данный эффект интересен тем, что несмотря на число положительно заряженных групп, отличное от максимального

(максимальное число положительно заряженных групп наблюдалось бы в более кислой среде), микрогели обладают большей электрофоретической подвижностью.

Влияние pH на электрофоретическую подвижность микрогелей с AA

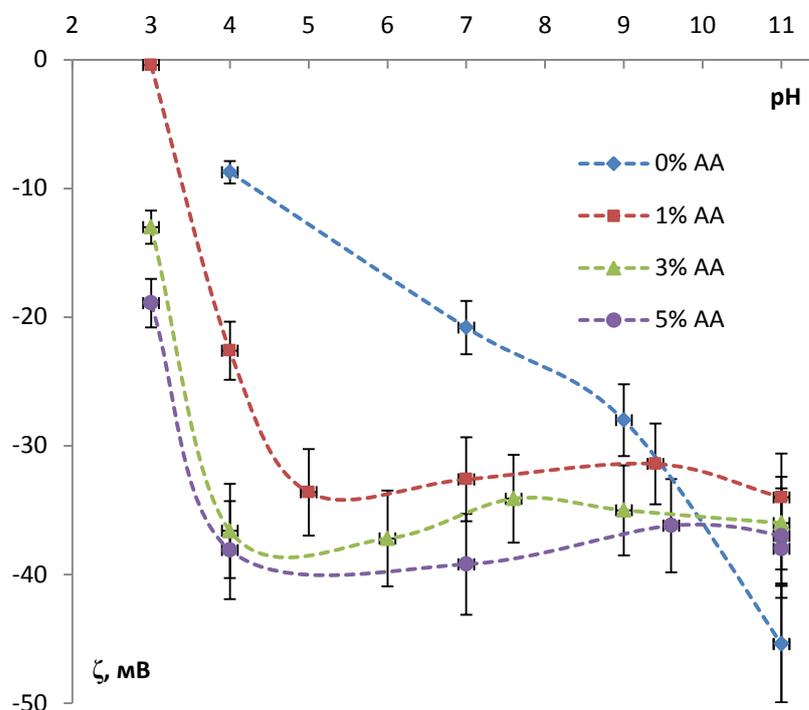


Рис. 29. Зависимость ζ -потенциала микрогелей с AA от pH.

Полученные зависимости (см. рис. 29) качественно схожи с теми, что описаны в литературе [47], для подобных термочувствительных микрогелей (на основе pNIPAM). При pH ниже 3 происходит уменьшение ζ -потенциала, связанное с протонированием карбоксильных групп AA. Интересно, что для микрогелей, содержащих AA, ζ -потенциал достигал своего минимального значения не при pH, соответствующему максимальному набуханию, а в области pK_a заряженного мономера, где не все группы AA микрогеля являются заряженными (как и в случае микрогелей с Vim). Если сравнивать микрогели с разным содержанием AA, то можно отметить, что увеличение доли AA влияет на значение ζ -потенциала в области кислых pH и их коагуляционную устойчивость. Микрогели без OEOMA с 3 и 5% AA устойчивы к коагуляции даже при pH ниже 3, микрогель с 1% AA устойчив около часа, в то время как микрогель без AA коагулирует в течение 10 минут. Полученные значения ζ -потенциала pVCL микрогелей без Vim или AA вызывают ряд вопросов и будут дополнительно исследованы в последующих работах.

5.2.6. Кинетика образования и роста микрогелей

Изучение кинетики реакции осадительной полимеризации термочувствительных мономеров представляет большой научный интерес, так как до сих пор не существует однозначной теории, которая позволяла бы объяснить монодисперсность микрогелей ($PdI < 0,05$), полученных в условиях свободной радикальной полимеризации. Кинетика роста микрогелей была исследована на примере микрогеля без Vim, содержащего VCL, AAEM и MBA, инициатор АМРА. Результаты параллельных измерений оптической плотности и DLS представлены на рис. 30.

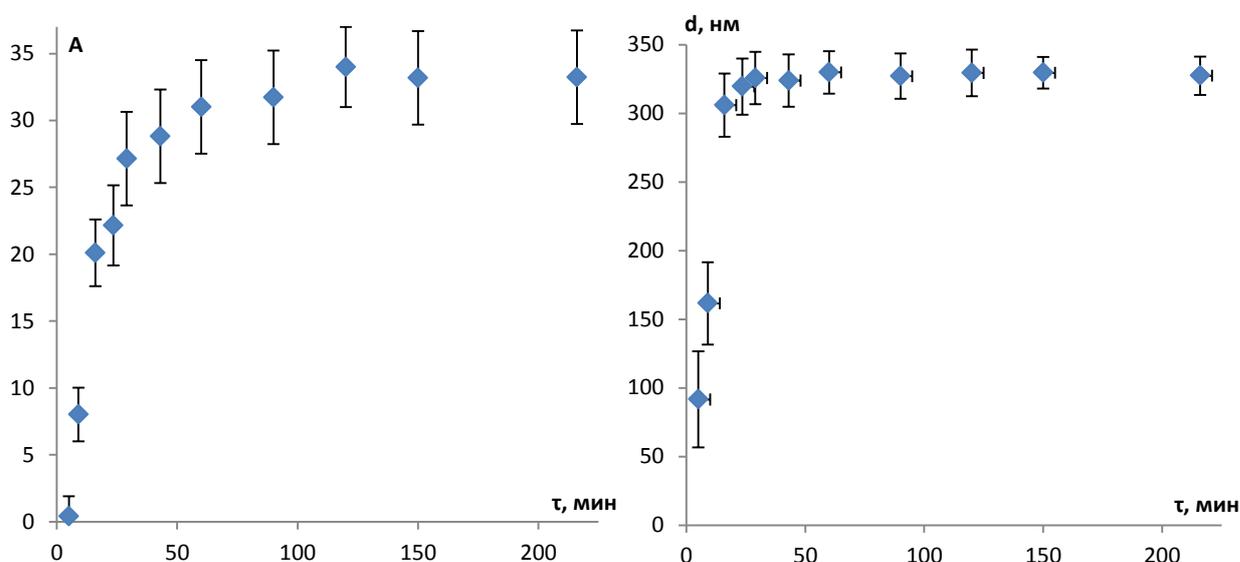


Рис. 30. Зависимость оптического поглощения раствора от времени синтеза (слева), зависимость диаметра микрогелей от времени синтеза (справа).

Из зависимости диаметра от времени (см. рис. 30) можно сделать вывод, что частицы практически полностью достигают своего максимального размера уже за 16 минут, однако увеличение оптической плотности позволяет более достоверно определять момент полного окончания роста, что дает возможность зарегистрировать увеличение оптической плотности еще в течение 90 минут, однако это очень слабо сказывается на их диаметре.

Следует отметить, что весь рост можно условно разбить на 3 этапа:

- 1) индукционный период;
- 2) период быстрого, линейного увеличения диаметра частицы со временем;
- 3) медленный процесс «дораствания» частиц микрогеля.

Таким образом, представляет большой интерес изучение процессов, происходящих в инкубационный период и переход от него к линейному росту диаметра.

Влияние концентрации инициатора на продолжительность индукционного периода

Прежде всего, представляло интерес определение влияния концентрации инициатора на индукционный период. С этой целью была изучена реакция синтеза на примере микрогеля без Vim, содержащего VCL, ААЕМ и МВА, инициатор АМРА. Полученные кривые роста оптической плотности реакционной смеси представлены на рис 31. Из полученных кривых можно сделать 3 принципиально важных вывода.

Во-первых, высказанное предположение о том, что у реакции существует индукционный период, который сменяется быстрым «линейным ростом» оказалось верным.

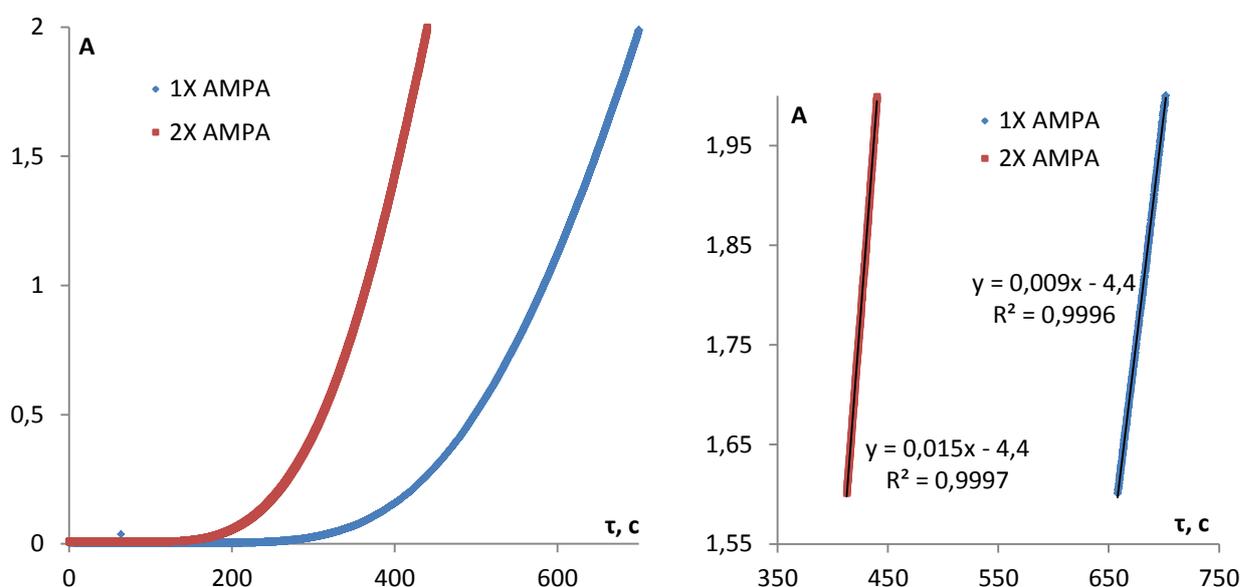


Рис. 31. Зависимость скорости реакции от концентрации инициатора (слева); участок, где наблюдается «линейный рост» микрогеля (справа).

Во-вторых, как видно из рис. 31 (справа), концентрация инициатора влияет на скорость роста частицы микрогеля. Причем при уменьшении концентрации инициатора в 2 раза скорость падает также практически в 2 раза, что говорит о том, что инициатор необходим для роста микрогелей, в том числе, и после индукционного периода.

В-третьих, концентрация инициатора напрямую влияет на величину индукционного периода (см. рис 32). Так для реакции, в которой использовалось удвоенное количество инициатора он составляет приблизительно 116 секунд, в то время как для реакции, содержащей обычное количество инициатора, продолжительность

инкубационного периода составляла 207 секунд. То есть с увеличением концентрации инициатора в 2 раза продолжительность инкубационного периода падает в 2 раза с ошибкой в пределах погрешности эксперимента.

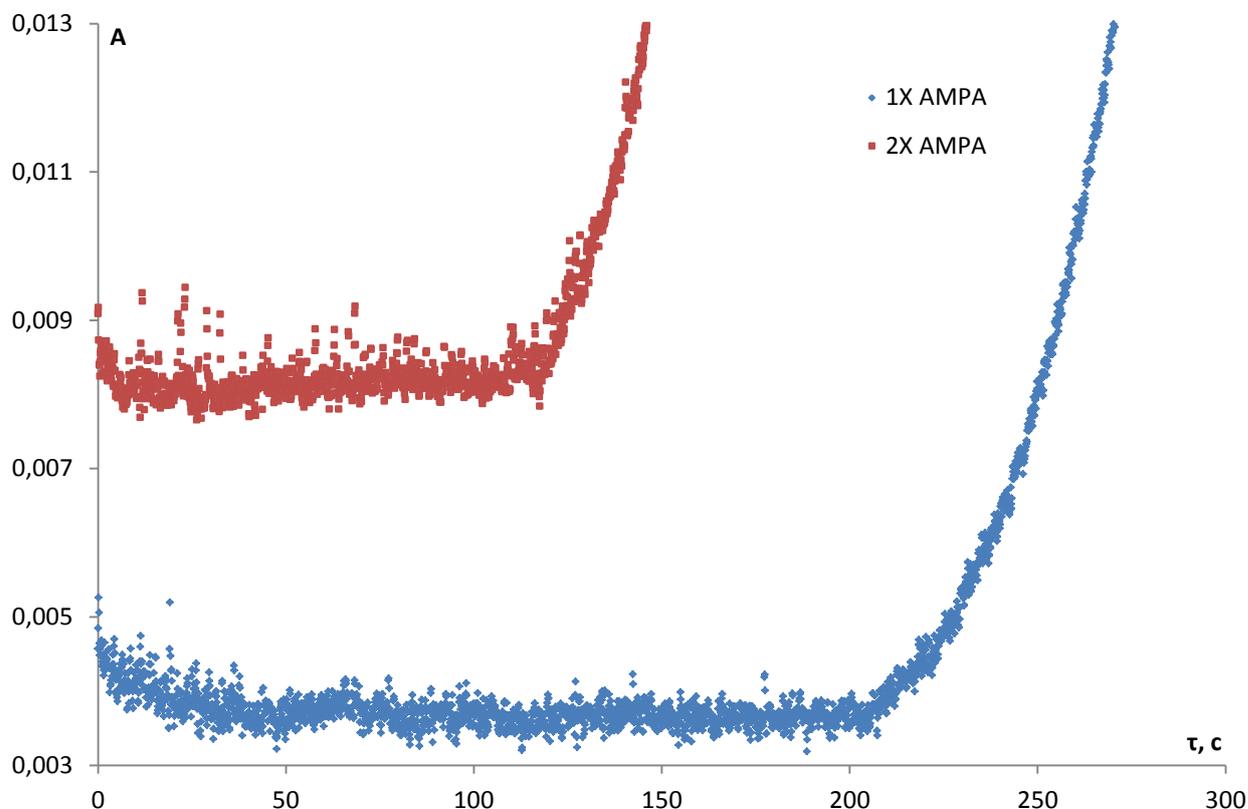


Рис. 32. Участок Рис. 31, где наблюдается «индукционный период» роста микрогеля.

По-видимому, отсутствие роста оптической плотности до определенного момента связано с тем, что олигомеры вырастают до определенного размера и концентрации, после которой происходит процесс, аналогичный мицеллообразованию, сопровождающийся фазовым разделением воды и гидратированного олигомера, причем олигомеры ассоциируют в растворе в частицы-зародыши практически одновременно. В дальнейшем происходит лишь рост образовавшихся зародышей, причем новые зародыши не могут образоваться, т. к. концентрация, аналогичная критической концентрации мицеллообразования (ККМ) для мицелл, в случае зародышей будет больше, чем для растущего микрогеля (образовавшийся микрогель больше и содержит большее количество pVCL). Таким образом, зародыши одновременно образуются и в дальнейшем растут с одинаковой скоростью.

Альтернативный механизм заключается в том, что олигомеры-зародыши растут до определенного размера и при некотором критическом размере цепи pVCL претерпевают фазовый переход, приводящий к образованию новой фазы – микрогелей, что и приводит к

скачку оптической плотности раствора. Данная теория является общепринятой, но не объясняет, почему микрогели образуются столь монодисперсными, т.е. почему в процессе реакции не могут образоваться новые зародыши.

Измерения размеров микрогелей, отобранных в виде аликвот в процессе роста, методом DLS показало, что монодисперсность микрогелей постоянна в процессе роста, т.е. в процессе роста не образуются новые зародыши.

Рост микрогелей с использованием зародышей

Принципиально интересной была возможность «дорастивания» зародышей микрогелей. Для этого были взяты 2 типа зародышей микрогеля с VCL, ААЕМ, МВА и инициатором АМРА: полученные *in situ* с диаметром около 100 нм и синтезированные ранее и очищенные диализом с диаметром 300 нм. Зависимости оптической плотности от времени в случае каждого из двух экспериментов представлены на рис. 33.

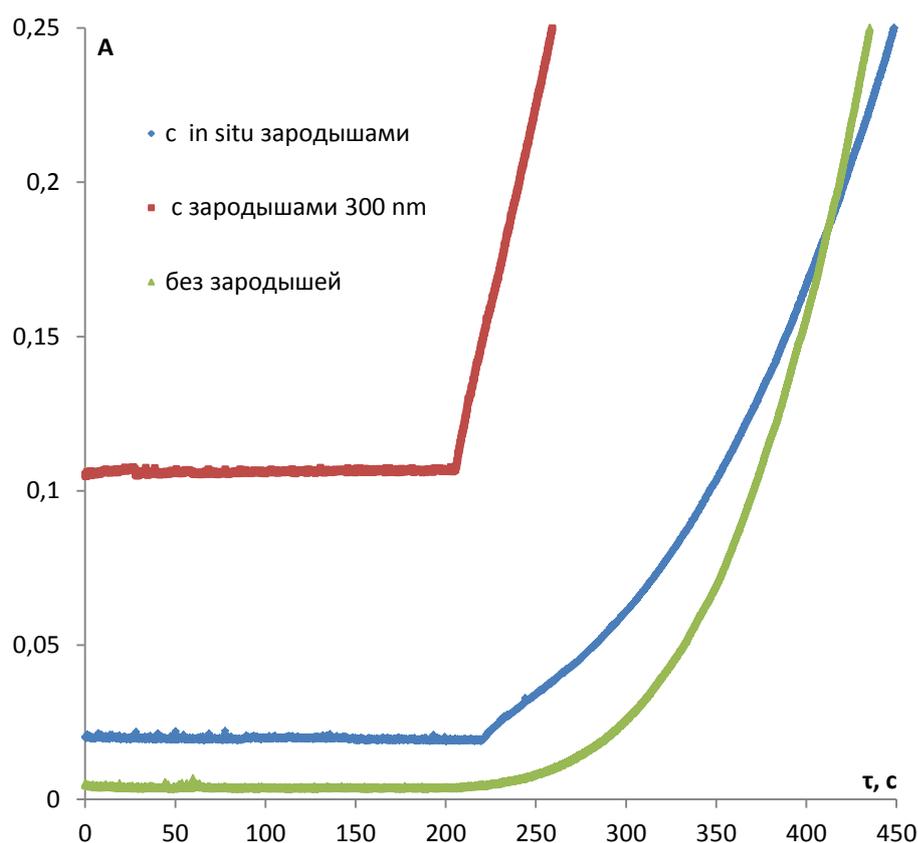


Рис. 33. Кинетика полимеризации с зародышами.

Из полученных зависимостей можно с уверенностью сделать вывод о наличии индукционного периода. Также на примере зародышей с диаметром 300 нм показано, что частицы микрогеля действительно дорастают в процессе полимеризации. Особенно

эффективным оказалось доращивание более крупных микрогелей. В случае зародышей с диаметром 300 нм содержание примесей более мелкого микрогеля было менее 5% (в числовом эквиваленте) по результатам DLS. Однако в случае микрогелей *in situ* инкубационный период практически не отличался от реакции синтеза без зародышей, что приводило к образованию значительной доли примеси более мелкого микрогеля (порядка 50% в числовом эквиваленте). Возможно, это обусловлено тем, что в данном эксперименте концентрация микрогеля-затравки была намного (в 45-60 раз) меньше той, что образуется самопроизвольно и из-за этого затравка не могла расти намного раньше, чем образуются зародыши. Таким образом, можно сделать вывод, что для данной реакции необходим тщательный подбор условий, помимо этого, показана принципиальная возможность доращивания микрогелей на основе VCL.

5.3. Эффективность фотодинамической терапии при помощи микрогелей, загруженных фталоцианином алюминия, *in vitro*

5.3.1. Хроническая, темновая токсичность микрогелей и ALPCS

Синтезированные микрогели обладали низкой токсичностью, так как были синтезированы на основе биосовместимого полимера pVCL. Микрогели №21 и №31 (с размером 120 и 150 нм соответственно) показали близкую токсичность $IC_{50} = 1098$ и 1681 мкг/мл (статистически более вероятно, что они равны). Таким образом, так как данные микрогели имеют практически одинаковый состав, можно утверждать, что размер микрогелей не влияет на их токсичность (см. рис. 34).

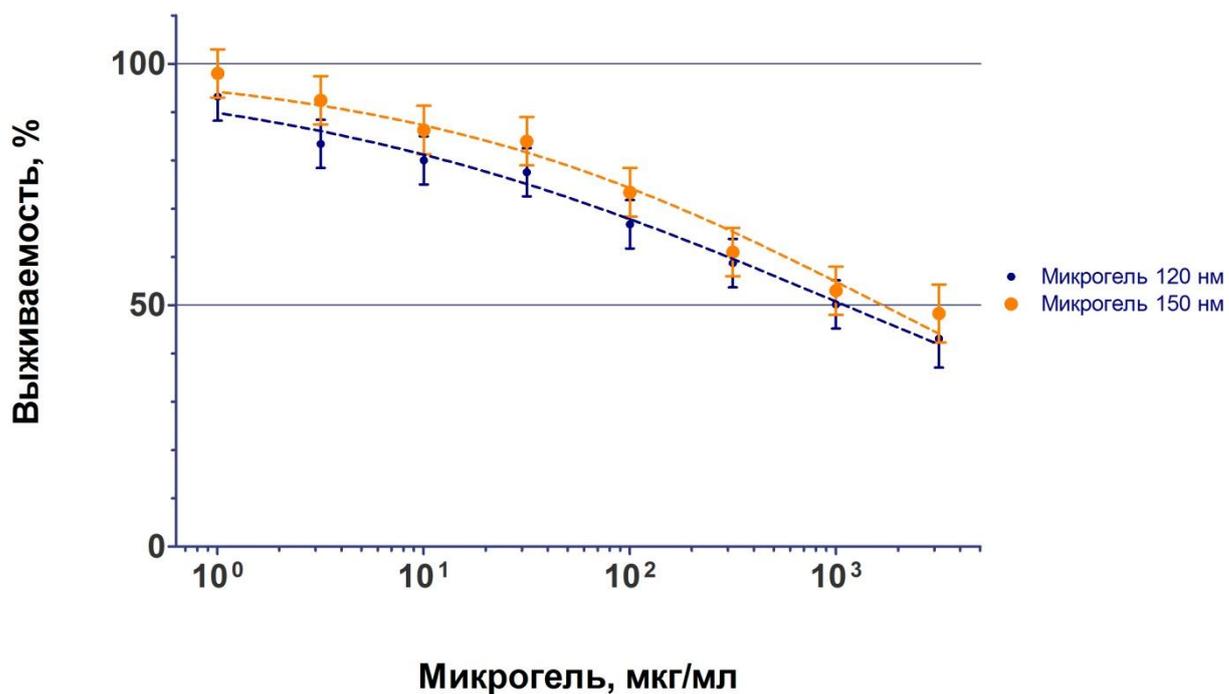


Рис. 34. Зависимость выживаемости клеток от концентрации микрогелей с диаметром 120 и 150 нм.

Токсичность препарата (ALPCS) $IC_{50} = 9,02$ мкг/мл без облучения (темновая токсичность) оказалась значительно выше, чем у микрогеля $IC_{50} = 1681$ мкг/мл и микрогеля, загруженного препаратом $IC_{50} = 230,8$ мкг/мл (см. рис. 35).

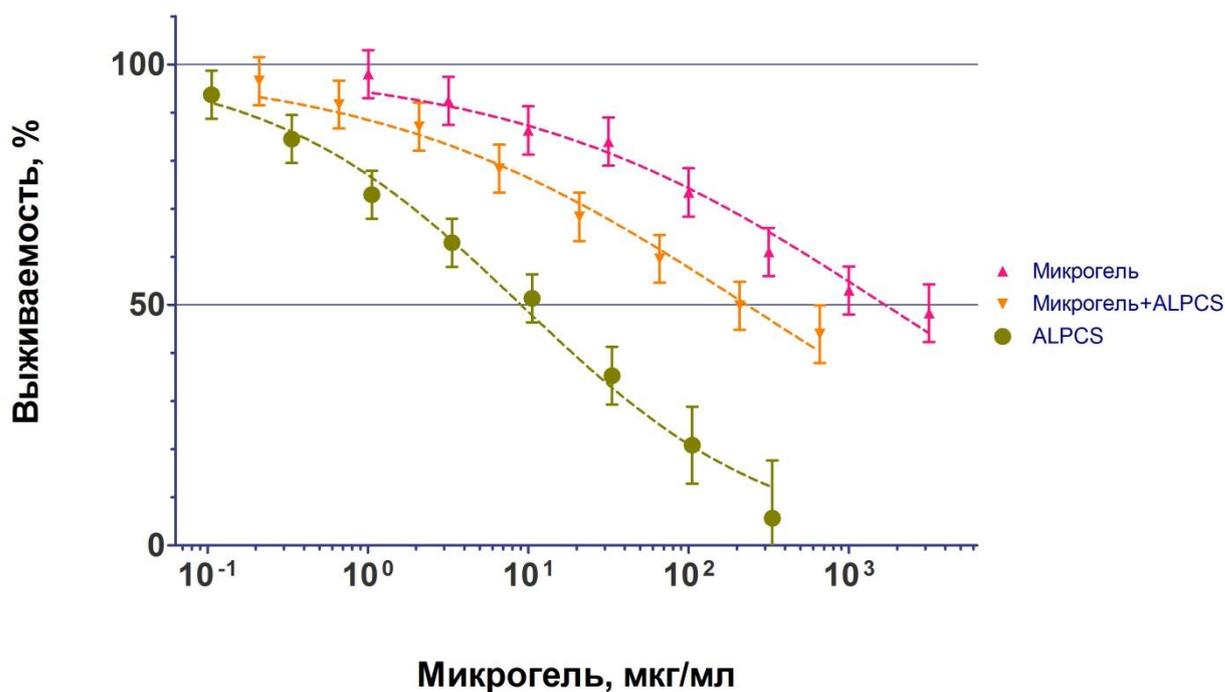


Рис. 35. Зависимость выживаемости клеток от концентрации микрогеля, микрогеля, загруженного ALPCS и чистого ALPCS.

Данный факт нельзя объяснить тем, что загруженный микрогель несет препарата меньше, чем чистый препарат. Если пересчитать темновую токсичность микрогеля, загруженного препаратом на препарат и сравнить ее с чистым препаратом (см. рис. 36), то получится, что препарат, загруженный в микрогель, обладает намного меньшей токсичностью $IC_{50} = 92,2$ мкг/мл (токсичность препарата в тех же условиях $IC_{50} = 9,02$ мкг/мл, на порядок выше).

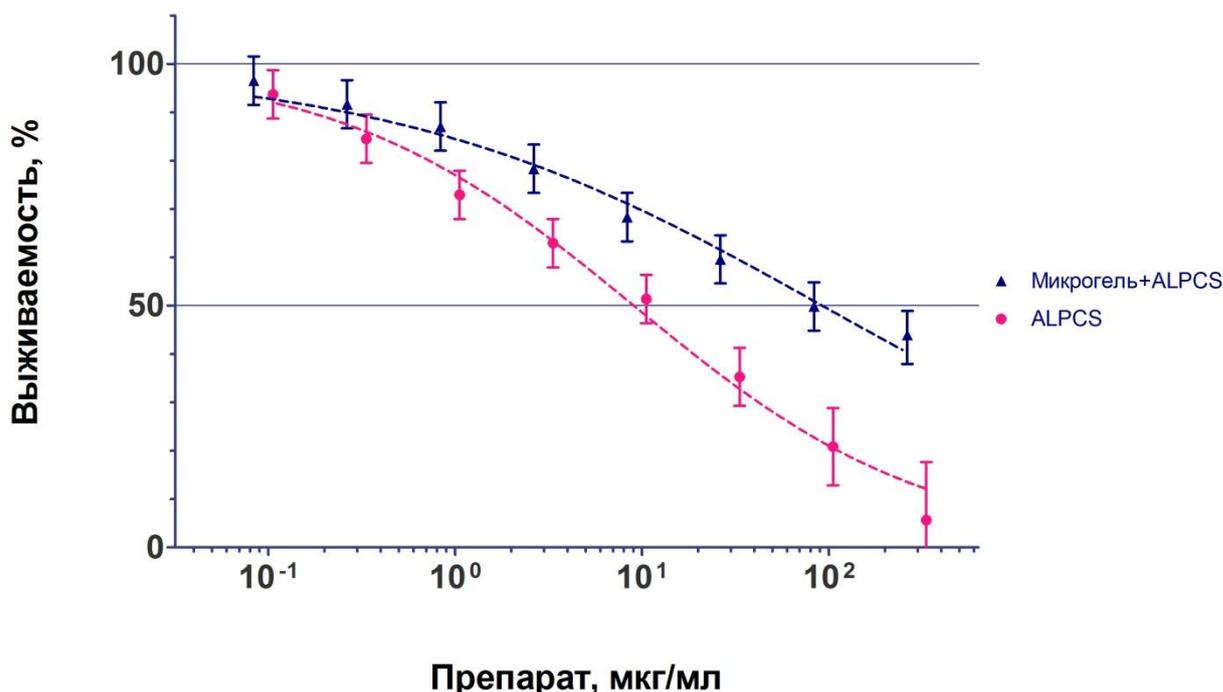


Рис. 36. Зависимость выживаемости клеток от концентрации ALPCS и микрогеля, загруженного ALPCS в пересчете на чистый препарат.

Таким образом, микрогель может снизить токсичность препарата, что может быть крайне важно в случае высокотоксичных препаратов. Возможно, это связано с тем, что микрогель играет для препарата роль депо, из которого он может высвобождаться в определенных количествах, причем большие, токсичные концентрации не могут образоваться в среде так как препарат вновь связывается микрогелем.

5.3.2. Фототоксичность ALPCS и микрогеля, загруженного ALPCS

В первую очередь, была изучена фототоксичность ALPCS при различных временах облучения 1, 2 и 4 часа (соответствующие дозы света порядка 6, 12 и 24 Дж/см²). Экспериментально определенные значения IC_{50} соответственно равны 28,1 мкг/мл, 11,3 мкг/мл и 5,01 мкг/мл. Таким образом, увеличение экспозиции приводит к росту

фототоксичности ALPCS (см. рис. 37). В дальнейшем все эксперименты по фототоксичности ALPCS и микрогелей, содержащих ALPCS, проводились при 4 часовом облучении.

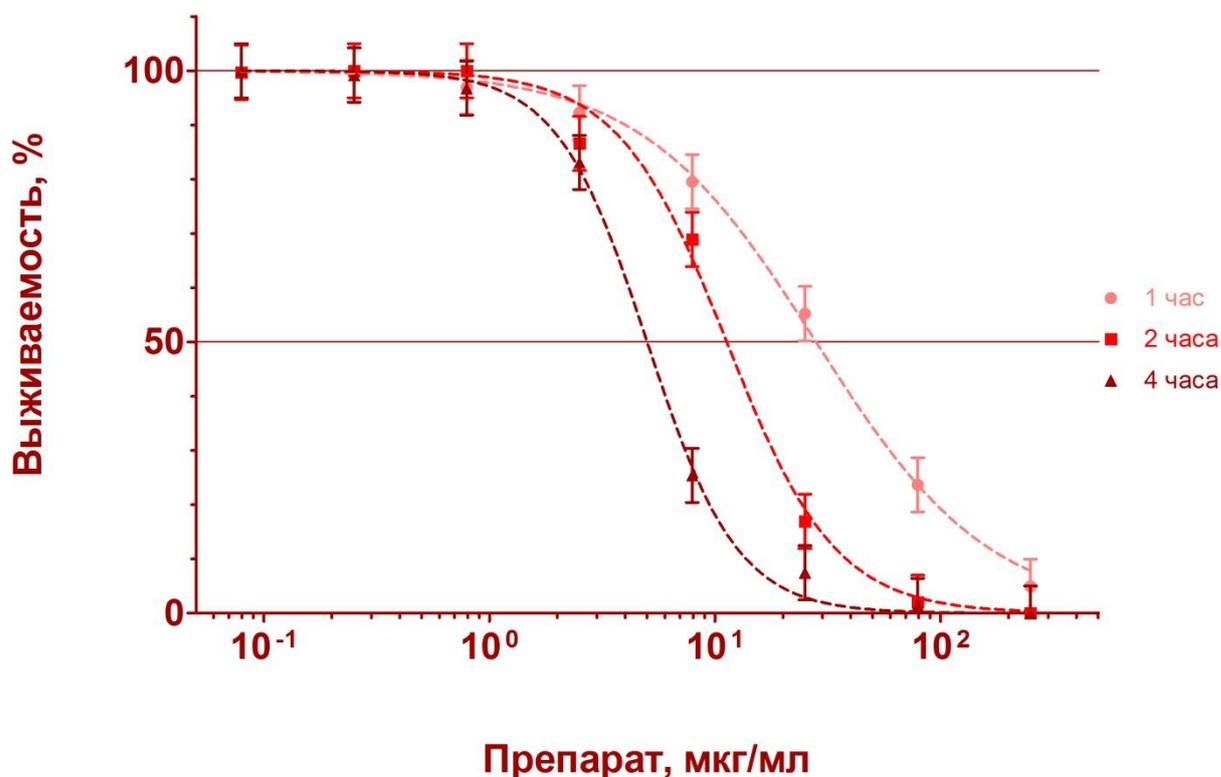


Рис. 37. Зависимость выживаемости клеток от концентрации ALPCS при различном времени облучения.

Микрогели, загруженные ALPCS были изучены на предмет своей фотодинамической активности *in vitro*. Фототоксичность микрогелей, загруженных ALPCS характеризовалась величиной $IC_{50} = 17,9$ мкг/мл. Полученные результаты в пересчете на загруженный препарат свидетельствуют о том, что микрогели, загруженные препаратом проявляют большую $IC_{50} = 3,54$ мкг/мл (хоть и крайне незначительно), а не меньшую фототоксичность, чем чистый ALPCS в тех же условиях $IC_{50} = 4,97$ мкг/мл (см. рис. 38). Эти результаты представляют большой интерес, так как, несмотря на меньшую темновую токсичность, микрогели, загруженные препаратом, в пересчете на чистый препарат, показали большую фототоксичность, что говорит о потенциальной возможности и целесообразности их применения для фотодинамической терапии.

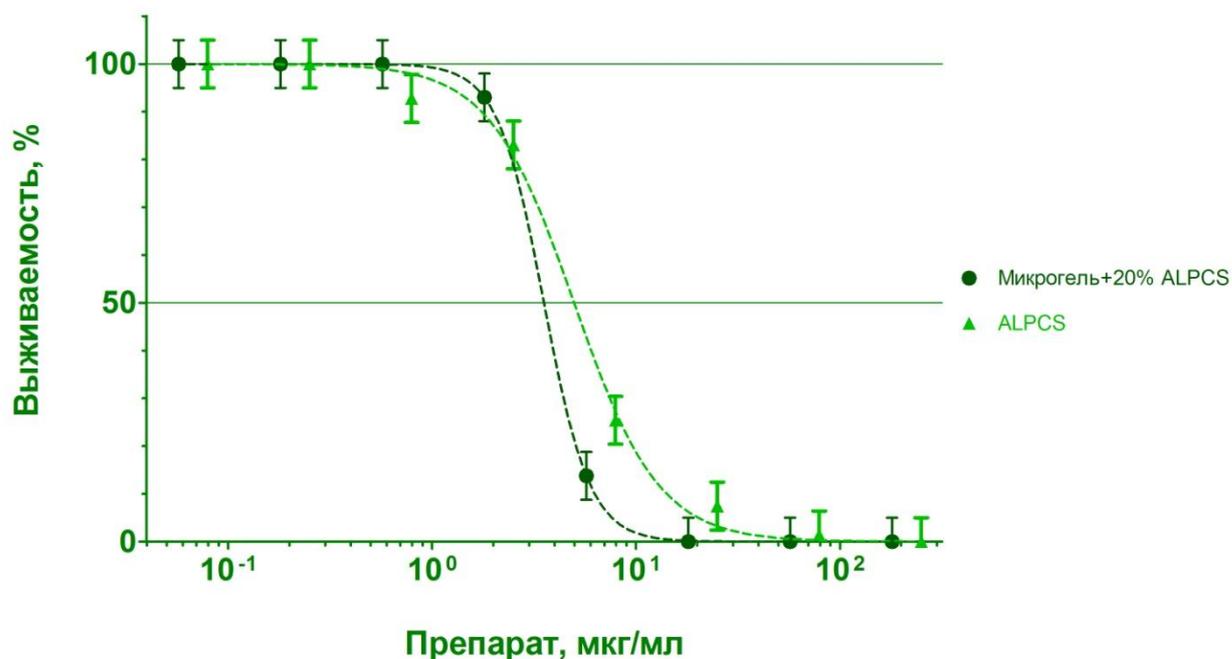


Рис. 38. Зависимость выживаемости клеток после облучения от концентрации ALPCS и микроделя, загруженного ALPCS в пересчете на чистый препарат.

5.3.3. Фототоксичность ALPC

Вторым препаратом, использовавшимся для загрузки микроделей был ALPC. Он представляет большой интерес для загрузки в микродели, так как в чистом виде практически нерастворим в воде, и вследствие этого не используется для фотодинамической терапии. В первую очередь мы сравнили фототоксичность ALPCS и ALPC между собой, с целью оценки целесообразности использования ALPC вместо ALPCS. Так как ALPC нерастворим в воде, его добавляли к ростовой среде в виде раствора в ДМСО в концентрации 20 мг/мл. Фототоксичность ALPC и ALPCS при 4 часовом облучении (доза света порядка 24 Дж/см²) представлена на рис. 39. Из экспериментов следует, что ALPC обладает фототоксичностью IC₅₀ = 0,109 мкг/мл более чем в полтора порядка большей, чем ALPCS IC₅₀ = 4,82 мкг/мл, что делает его крайне эффективным препаратом для фотодинамической терапии. Поэтому задача доставки ALPC интересна как с теоретической (доставка нерастворимого препарата с целью улучшения его фармакокинетики), так и с практической точки зрения.

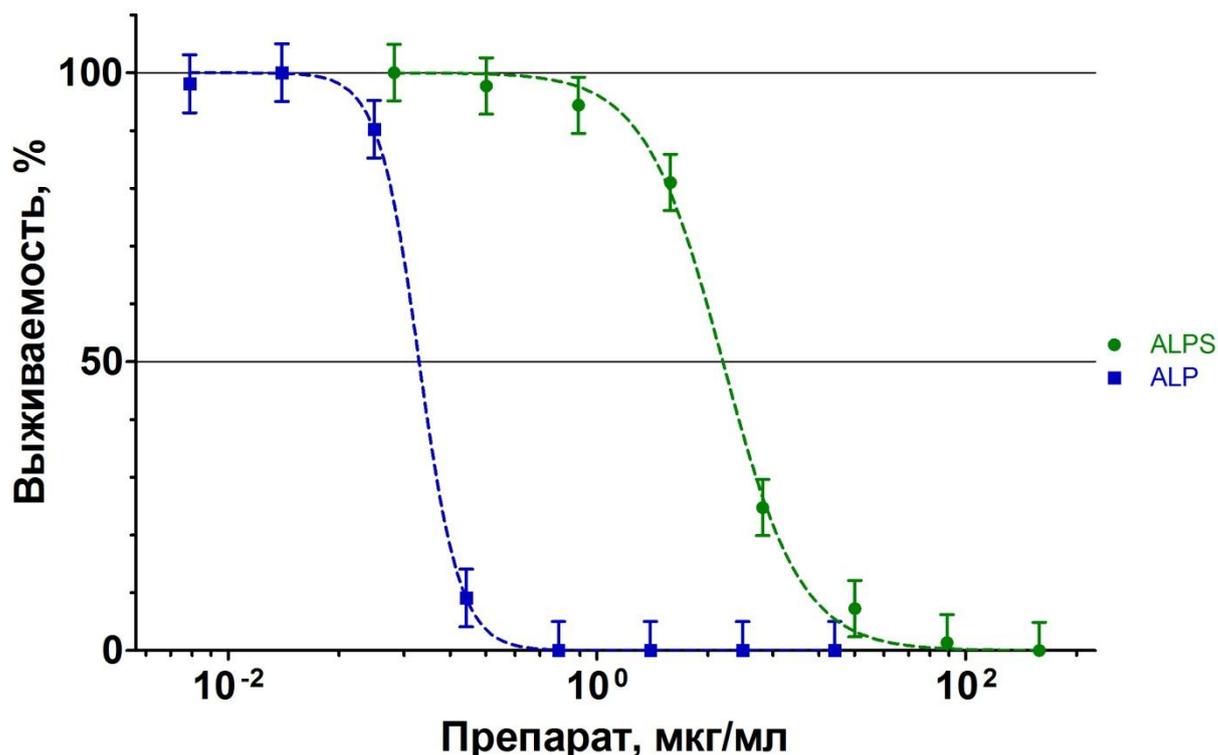


Рис. 39. Зависимость выживаемости клеток после облучения от концентрации ALPCS и ALPC.

Большая токсичность ALPC, по-видимому, связана с его способностью проникать и накапливаться в клетках, выраженной намного сильнее, чем у ALPCS, а также с разницей в спектрах поглощения (максимум поглощения для ALPCS имеет узкий пик при 678,8 нм, а ALPC – широкий при 614,6 нм, в то время, как максимум излучения, использованного в работе светодиодного источника, составляет 630 нм).

5.3.4. Фототоксичность микрогелей, загруженных ALPC

Микрогели загруженные препаратом были получены осаждением препарата из раствора в ДМСО в растворе микрогеля или инкубацией ALPC с раствором микрогеля выше температуры фазового перехода pVCL (при 70°C), то есть в условиях, когда микрогели по нашим предположениям имели гидрофобное ядро pVCL и гидрофильную оболочку ОЕОМА. В обоих случаях загрузка происходила при нагревании, что приводило к увеличению доли загружаемого в микрогель ALPC. При первом способе загрузки в зависимости от условий загрузки удавалось получить микрогели, загруженные препаратом в широком интервале (от 5% и менее). Во втором случае после продолжительной инкубации раствора микрогеля и препарата при нагревании загрузка препаратом была практически постоянна и составляла 0,15%. Удивительным в нашем случае оказалось то, что большие степени загрузки не означают большую

фототоксичность микрогелей. Эксперименты были проведены в условиях облучения 2 и 4 часа с образцами микрогелей с различным уровнем загрузки препаратом.

В случае облучения в течение 2 часов (доза света порядка 12 Дж/см^2) микрогели, загруженные простой инкубацией при нагревании (с загрузкой ALPC 0,15%) демонстрировали крайне высокую фототоксичность характеризующуюся величиной $IC_{50} = 4,82 \text{ мкг/мл}$. В то же время, микрогели содержащие намного большие концентрации ALPC имели меньшую фототоксичность (для микрогеля с 1% ALPC $IC_{50} = 22,6 \text{ мкг/мл}$, а для 5% ALPC $IC_{50} = 99,5 \text{ мкг/мл}$) см. рис. 40.

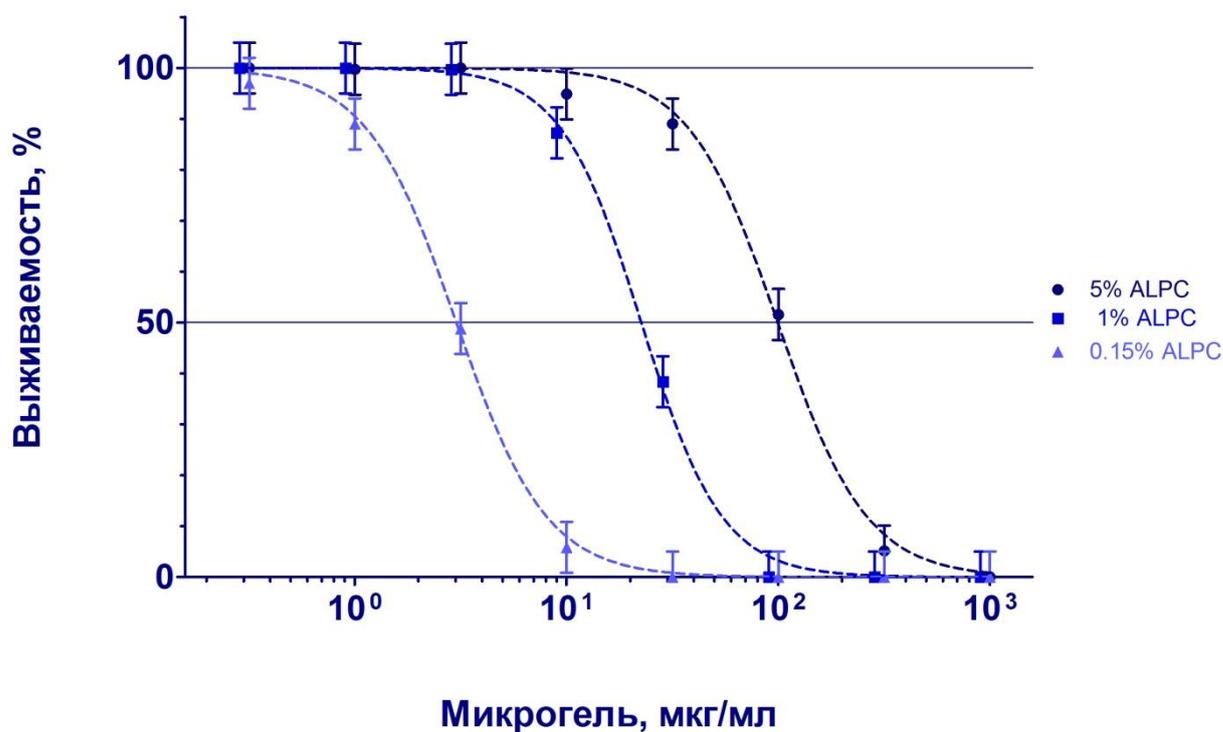


Рис. 40. Зависимость выживаемости клеток после облучения от концентрации микрогеля, загруженного ALPC (разные степени загрузки 0,15%, 1% и 5%).

Этот факт является очень интересным, так как при малых дозах экспозиции (12 Дж/см^2) микрогели, загруженные крайне низким количеством препарата (0,15%) демонстрировали столь необычайную фототоксичность, которая в пересчете на чистый ALPC характеризовалась величиной $IC_{50} = 4,54 \text{ нг/мл}$. Что является рекордной величиной для препаратов, применяемых в фотодинамической терапии.

Была также проанализирована фототоксичность при 4 часах облучения (24 Дж/см^2). В данном случае фототоксичность микрогелей была еще выше (см. рис. 41): для 0,15% ALPC $IC_{50} = 1,22 \text{ мкг/мл}$ и для 5% ALPC $IC_{50} = 22,22 \text{ мкг/мл}$.

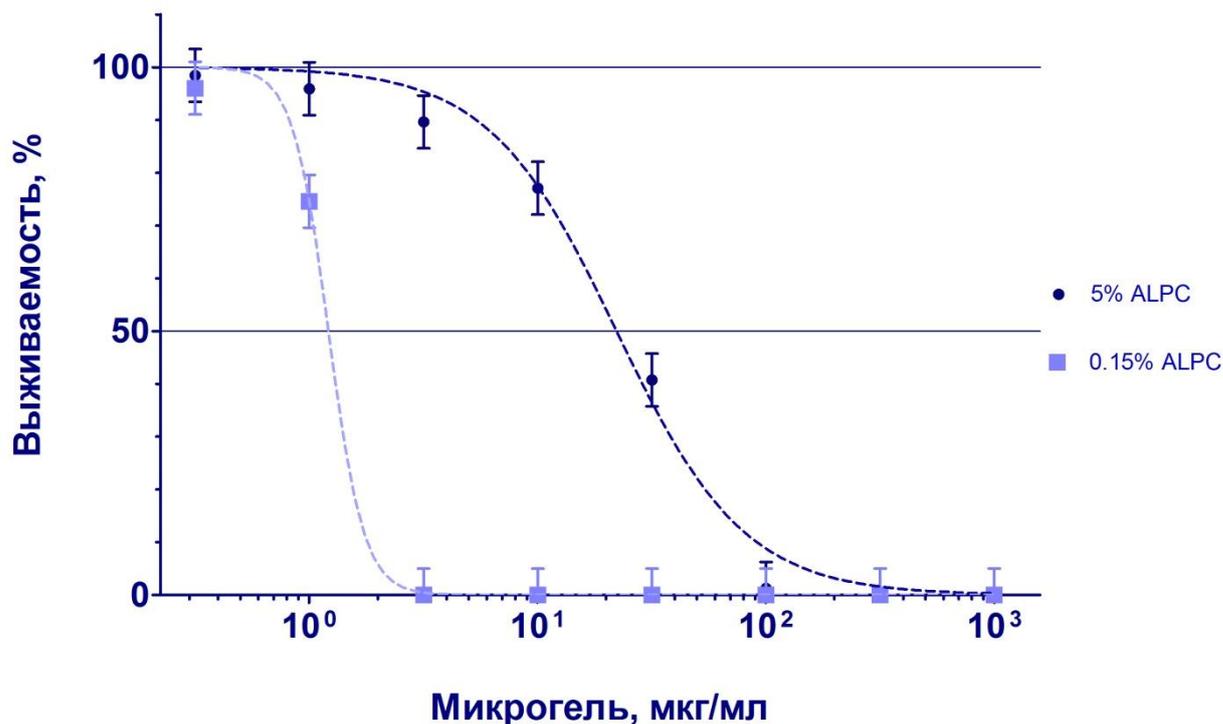


Рис. 41. Зависимость выживаемости клеток после облучения от концентрации микрогеля, загруженного ALPC (разные степени загрузки 0,15% и 5%).

Полученные данные многократно воспроизводились в различных форматах экспериментов. Особенно интересным оказался тот факт, что в пересчете на загруженный в микрогели ALPC фотоактивность препарата без микрогеля оказалась значительно ниже, чем у микрогеля с 0,15% ALPC и выше, чем у микрогелей с большим уровнем загрузки (см. рис. 42): 1% ALPC и 5% ALPC (для 0,15% ALPC $IC_{50} = 1,83$ нг/мл, для 5% ALPC $IC_{50} = 1,11$ мкг/мл, для 5% ALPC $IC_{50} = 0,426$ мкг/мл и для чистого ALPC $IC_{50} = 0,109$ мкг/мл) чему были посвящены дальнейшие исследования.

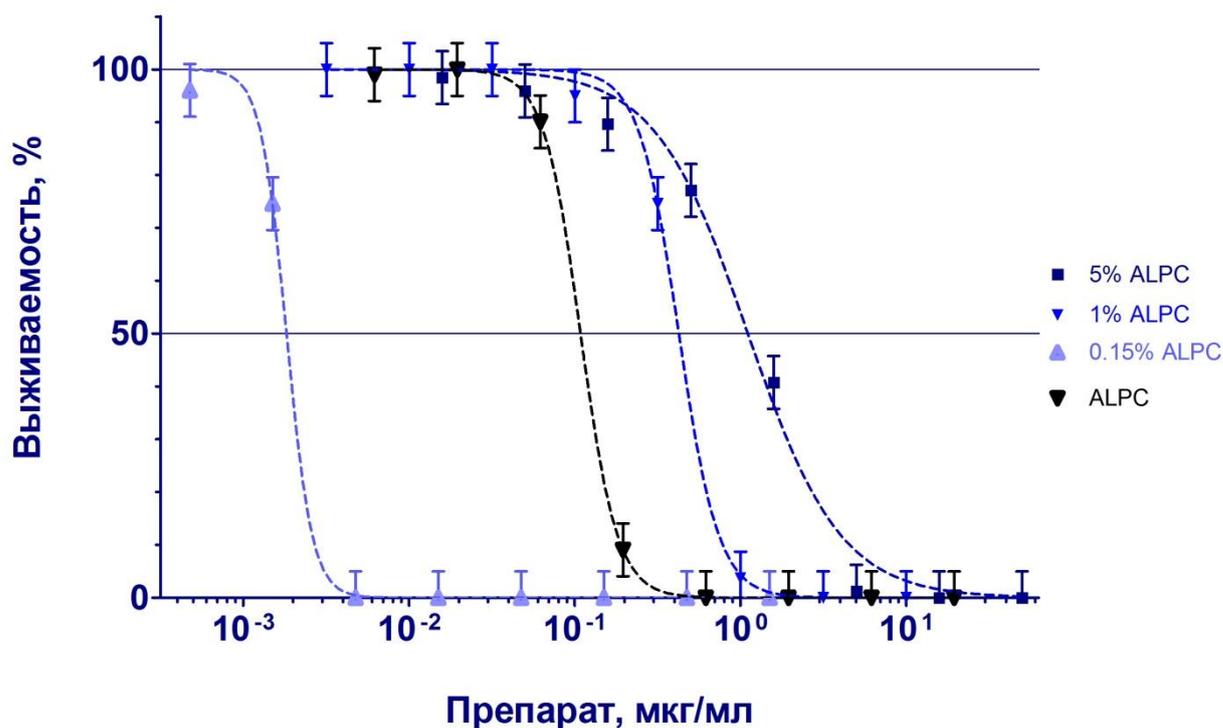


Рис. 42. Зависимость выживаемости клеток после облучения от концентрации ALPC и микрогелей, загруженных ALPC (разные степени загрузки 0,15%, 1% и 5%) в пересчете на чистый препарат.

5.3.5. Флуоресценция микрогелей с различной загрузкой ALPC

Флуоресценция препарата конкурирует с процессом интеркомбинационной конверсии (в первом приближении это конкурирующие реакции первого порядка), по уровню флуоресценции препарата можно судить о заселенности синглетного возбужденного состояния, что в свою очередь связано с заселенностью триплетного состояния и генерацией синглетного кислорода, приводящего в конечном счете к гибели клеток. Таким образом, оценка флуоресценции препарата загруженного в микрогель дает сведения о фототоксичности препарата при различной степени его загрузки в микрогель.

Для фталоцианинов алюминия характерен процесс образования димеров и олигомеров за счет стекинг-взаимодействий между молекулами фталоцианина, приводящий к потере стабильности возбужденного состояния и отсутствию флуоресценции и генерации синглетного кислорода. С целью изучения необычайно высокой активности микрогелей с загрузкой препарата 0,15% были приготовлены растворы препарата в воде и в растворе микрогеля. После инкубации при нагревании была измерена флуоресценция полученных растворов (см. рис. 43).

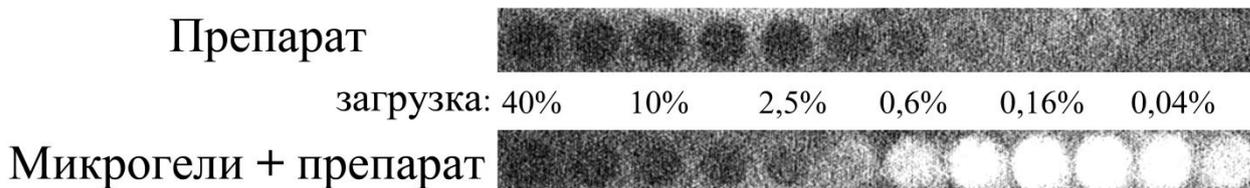


Рис. 43. Флуоресценция ALPC в воде и в растворе микрогеля с различной концентрацией ALPC.

ALPC в воде флуоресцировал слабо, активно поглощая свет, генерируемый в диапазоне 600-660 нм (о чем свидетельствует рис. 43 при загрузках 40%-1%). В то же время в том случае, когда в растворе ALPC присутствовал микрогель, наблюдалась сильная флуоресценция препарата (в области спектра, детектируемого камерой – 700-900 нм). Концентрация микрогеля во всех разведениях была одинакова, и использовались микрогели, не содержащие флуоресцентной метки. По-видимому, микрогель образует с препаратом комплекс (при загрузке препаратом около 0,15%), причем препарат находится в этом комплексе в мономолекулярном состоянии, а не в виде димеров или олигомеров, что приводит к тому, что большая часть молекул ALPC, будучи загруженной в микрогель, обладает фотодинамической активностью (что в данном эксперименте детектировали по уровню флуоресценции). Данное предположение было подтверждено экспериментом *in vitro* цитотоксичности микрогелей с различной загрузкой ALPC (см. п. 5.3.6.).

5.3.6. Фототоксичность микрогелей, загруженных ALPC

Для данного эксперимента были синтезированы микрогели, изначально содержащие разное количество загружаемого препарата в диапазоне 4%-0,016%. Полученные результаты фототоксичности отражают зависимости, полученные ранее в экспериментах на культурах клеток (см. п. 5.3.4.), а также в эксперименте по детектированию флуоресценции препарата, загруженного в микрогель (см. п. 5.3.5.): наибольшей фототоксичностью обладают микрогели с уровнем загрузки порядка 0,15%. В данном эксперименте микрогель с загрузкой 0,12% ALPC обладал наибольшей фототоксичностью, характеризуемой величиной $IC_{50} = 1,74$ мкг/мл, что в пересчете на чистый препарат, загруженный в микрогель, составляет 2,16 нг/мл. При уменьшении загрузки ниже 0,15% фотодинамическая активность микрогелей, загруженных препаратом падала, из-за уменьшения концентрации активного ALPC в комплексе с микрогелем (см. рис. 44).

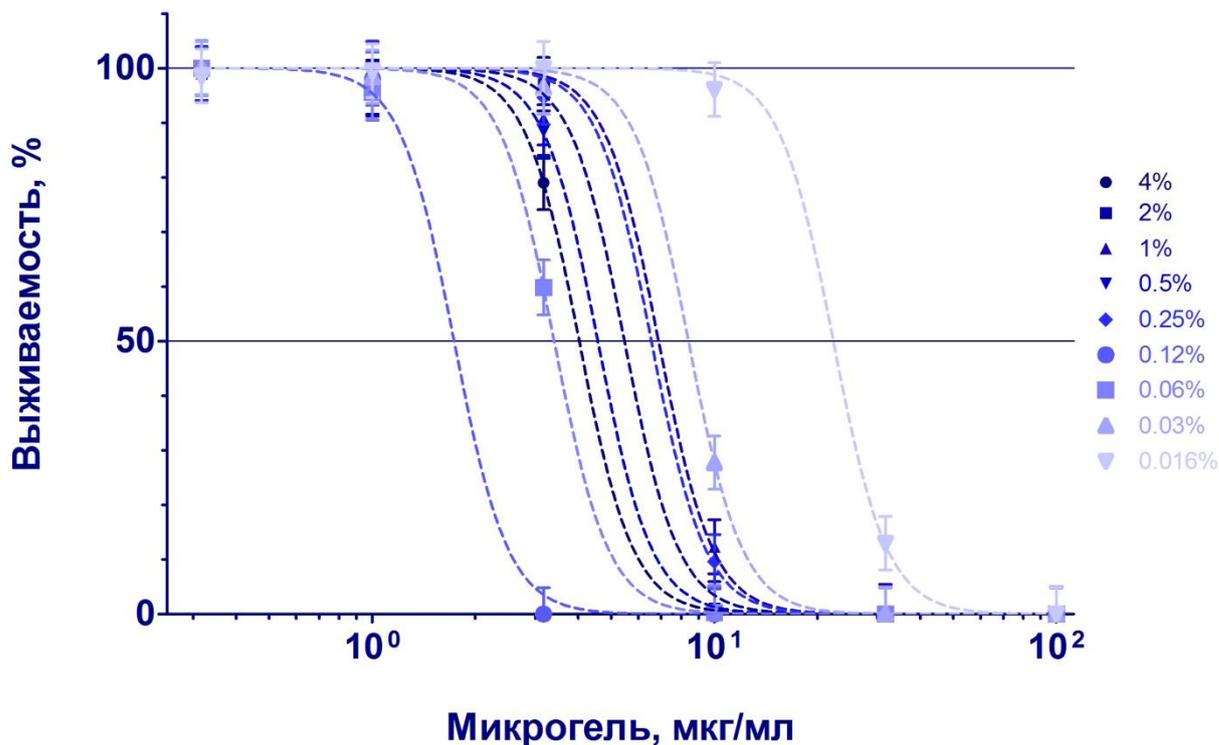


Рис. 44. Зависимость выживаемости клеток после облучения от концентрации микрогелей, нагруженных ALPC (разные степени загрузки 0,016%-4%).

В пересчете на чистый препарат, становится еще более очевиден тот факт, что фототоксичность препарата, нагруженного в микрогель падает с ростом загрузки, в то же время загрузка 0,15% ALPC является оптимальной, так как загружается максимальное количество «активного» ALPC, находящегося в виде комплекса с микрогелем, а не с самим собой (см. рис. 45).

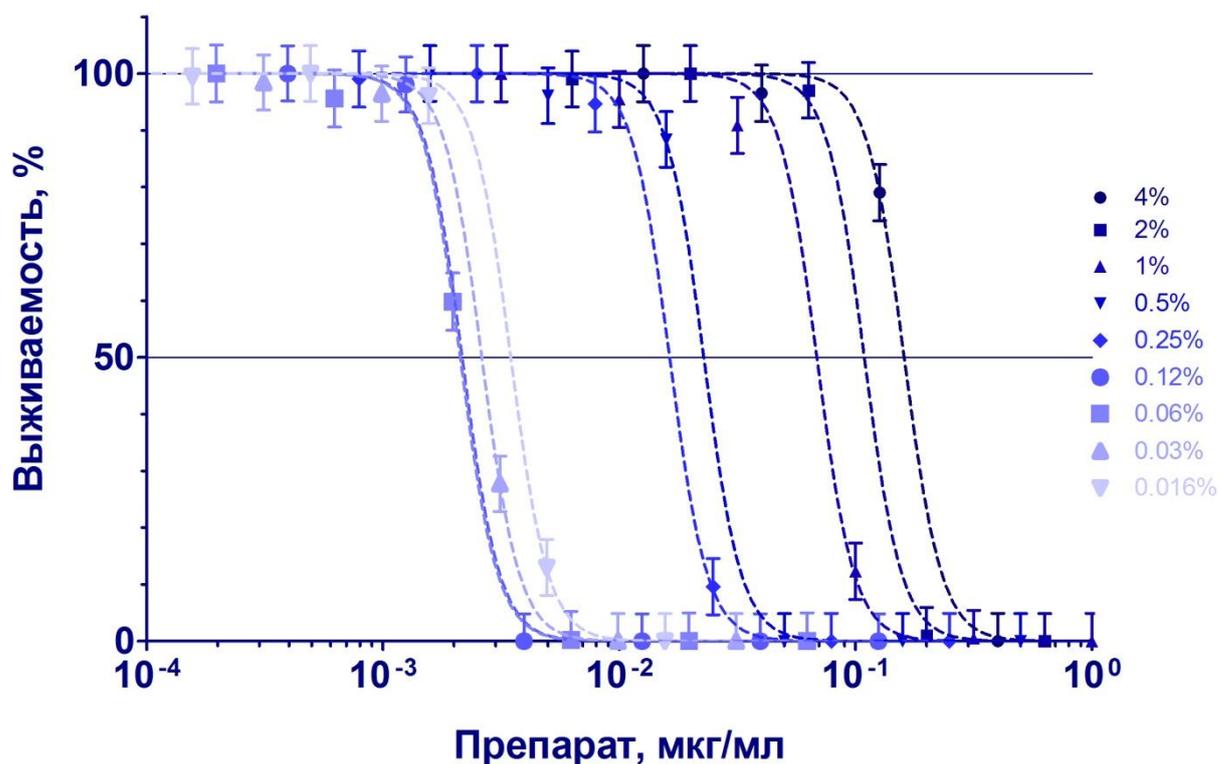


Рис. 45. Зависимость выживаемости клеток после облучения от концентрации микрогелей, нагруженных ALPC (разные степени загрузки 0,016%-4%) в пересчете на чистый препарат.

5.3.7. Аномально высокая фототоксичность микрогелей, нагруженных 0,15% ALPC

Для подтверждения того факта, что активность ALPC в комплексе с микрогелем получена именно для комплекса микрогель-ALPC и не является артефактом, возникшим благодаря наличию растворимых в воде примесей, вызывающих необычайно высокую фототоксичность были проанализированы различные контрольные образцы. В параллельном эксперименте была измерена фототоксичность микрогеля с загрузкой 0,15% ALPC, его супернатанта, не содержащего микрогеля и раствора, полученного растворением ALPC в виде кристаллов в деионизованной воде при 70°C и перемешивании 1000 об/мин в течение 72 часов (см. рис. 46).

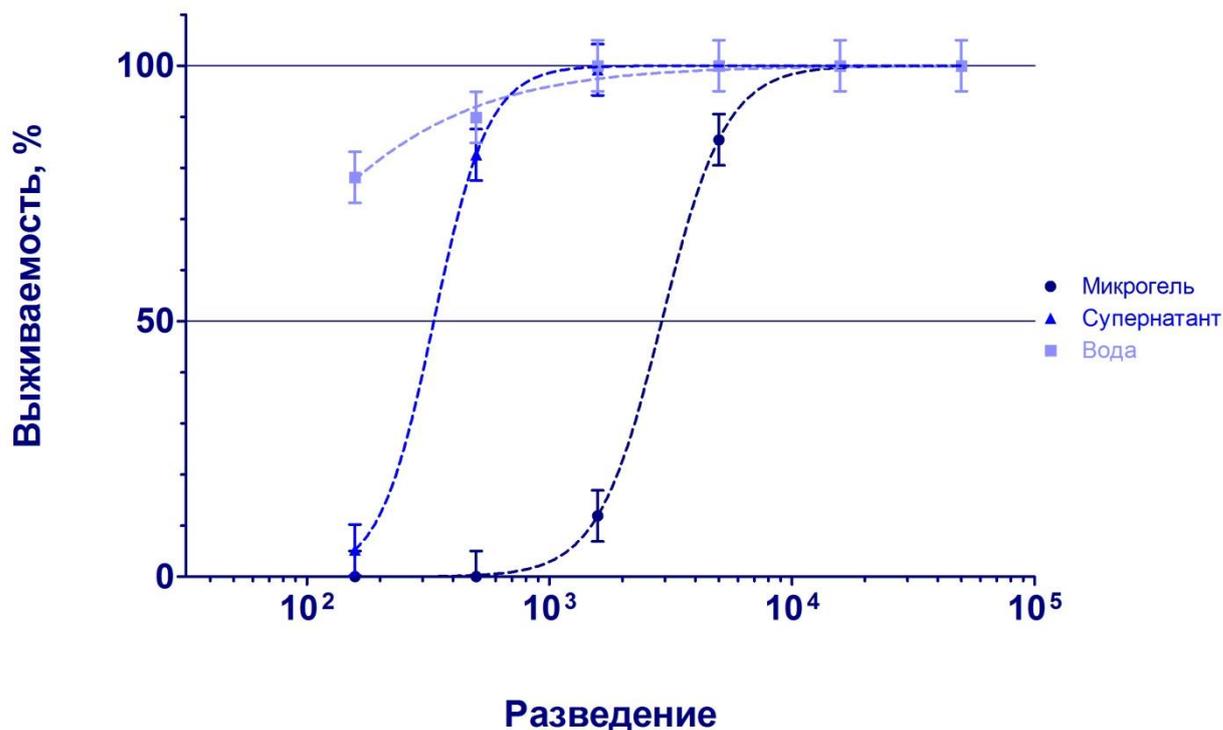


Рис. 46. Зависимость выживаемости клеток после облучения от разведения образца микрогеля, загруженного 0,15% ALPC, его супернатанта и воды, растворившей ALPC.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в исходном препарате не было растворимых примесей, обладающих столь высокой фототоксичностью, которая была получена в предыдущих экспериментах (см. п. 5.3.4. и 5.3.6.). При том, что IC₅₀ микрогеля, загруженного 0,15% ALPC наблюдалась при разведении исходного препарата в 2910 раз, IC₅₀ его супернатанта наблюдалась при разведении в 334,2 раза, а в случае воды, в которой могло раствориться максимальное количество ALPC, IC₅₀ наблюдалась при разведении в 47,2 раза. Тот факт, что активность супернатанта оказалась выше, чем активность ALPC, растворенного в воде, также не удивителен, так как загрузка препаратом производилась при нагревании, когда микрогель находился в коллапсированном состоянии, и его ядро было гидрофобно и способно растворить достаточное количество препарата. Однако при центрифугировании температура раствора составляла 25°C, что ниже температуры фазового перехода pVCL, таким образом, во время центрифугирования микрогель находился в набухшем состоянии и термодинамическая активность ALPC в нем была больше, чем в условиях загрузки при нагревании (так как гидрофобное ядро превратилось в гидрофильную сетку и связывание гидрофобного препарата уменьшилось), что в свою очередь приводило к большей концентрации ALPC в супернатанте над микрогелем, чем в воде над твердым ALPC. Фототоксичность всех

препаратов (микрогелей № 21, 31, 33 и 34), загруженных 0,15% ALPC была приблизительно одинакова и находилась в области значений $IC_{50} = 1,09-1,68$ мкг/мл в расчете на микрогель или $IC_{50} = 1,63-2,52$ нг/мл в пересчете на чистый ALPC соответственно.

5.3.8. Результаты накопления ALPC в клетках полученные методом проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии

Для оценки количества препарата, проникающего в клетки и удерживаемого ими был использован метод проточной цитофлуориметрии (ПЦФМ). Было показано, что количество препарата, находящегося в клетках в активном (флуоресцирующем) состоянии можно оценить методом ПЦФМ, что может быть использовано для оценки накопления активной формы препарата в будущем. Более того, что особенно важно, величина средней флуоресценции популяции клеток (инкубированных с микрогелями, загруженными различной концентрацией ALPC), полученная методом ПЦФМ, коррелирует с фототоксичностью той или иной формуляции. Для всех микрогелей с той или иной загрузкой значению IC_{50} , соответствовала одинаковая величина флуоресценции (значение средней флуоресценции одной клетки) измеренная методом ПЦФМ (см. рис. 47).

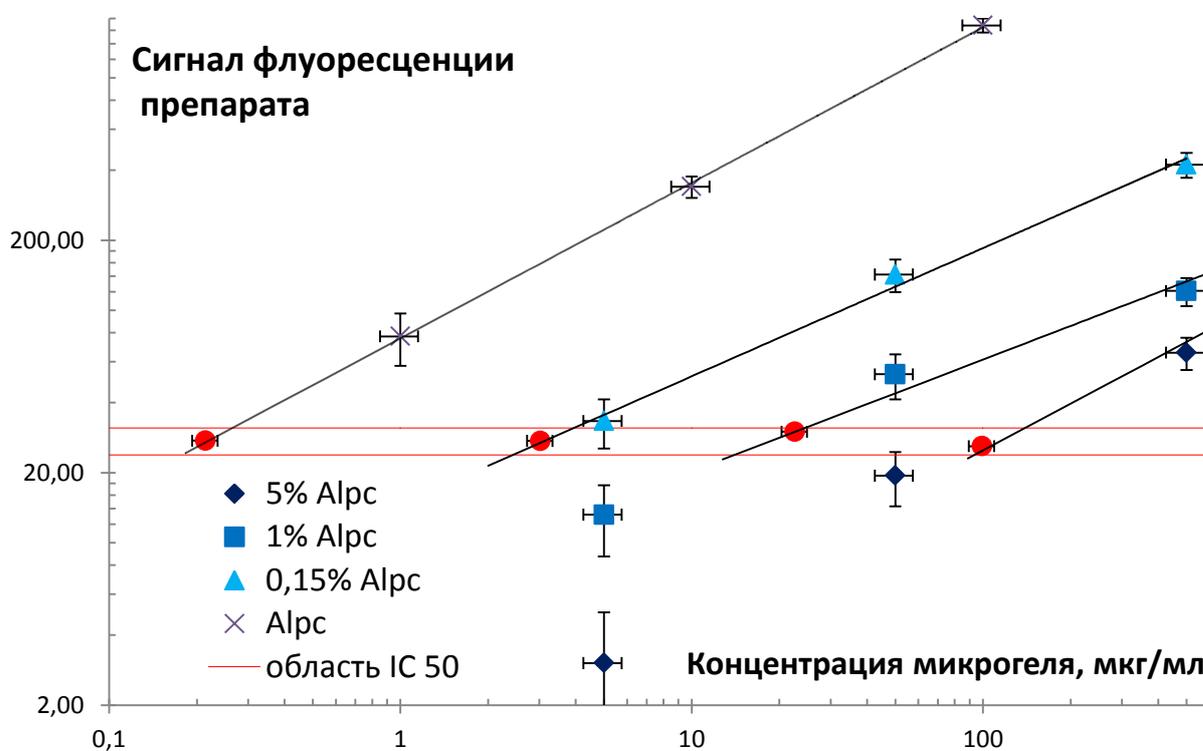


Рис. 47. Зависимость средней флуоресценции одной клетки от концентрации ALPC и микрогелей, загруженных ALPC (разные степени загрузки 0,15%, 1% и 5%).

Полученный результат означает, что оценка фототоксичности ALPC (или другого препарата для фотодинамической терапии, если для него известно значение IC_{50}), загруженного в микрогель (или находящегося в виде иной формуляции), может быть проведена путем измерения сигнала флуоресценции инкубированных с микрогелем клеток.

Результаты конфокальной микроскопии препаратов микрогелей, загруженных различной долей ALPC, также подтверждают полученные результаты о большей флуоресценции клеток инкубированных с микрогелем, содержащим 0,15% ALPC и свидетельствуют о некой компартиментализации накопления препарата (см. рис. 48). Флуоресценция клеток, инкубированных с 0,15% ALPC намного интенсивнее, чем в случае 5% ALPC, что, по-видимому, и является причиной большей фототоксичности 0,15% ALPC.

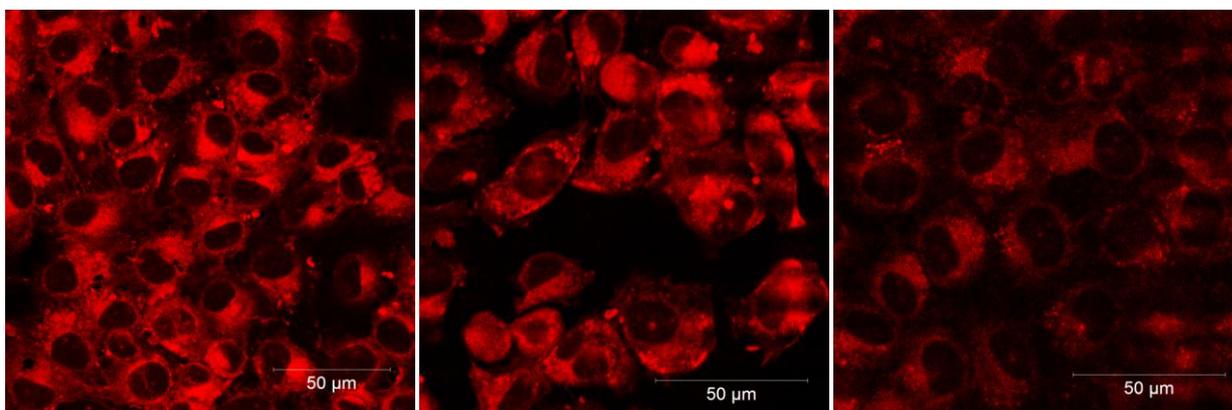


Рис. 48. Флуоресценция препарата в клетках, загруженных ALPC, а также микрогелями с 0,15% ALPC и 5% ALPC (слева направо).

В результате проведенных экспериментов (фототоксичность *in vitro*, флуоресценция микрогелей, ПЦФМ клеток и конфокальная микроскопия) нам удалось показать, что наиболее активными являются микрогели с загрузкой 0,15% ALPC. Полученные данные свидетельствуют о том, что ALPC при данной загрузке в микрогель обладает максимальной флуоресценцией и более активно проникает в клетки. По-видимому, все дело в том, что микрогель образует с препаратом комплекс, в котором ALPC находится в виде фотоактивного мономера. В то же время при большей степени загрузки препаратом в микрогеле образуются кластеры ALPC, теряющие свою фотоактивность. Таким образом, удалось получить формуляцию, в которой IC_{50} ALPC при облучении 24 Дж/см^2 составляет 1,83 нг/мл, что делает данный препарат одним из наиболее фотоактивных.

5.3.9. Проникновение микрогелей в клетки

Для пассивной доставки принципиально важно, чтобы контейнер, несущий загруженный препарат, не проникал свободно во все клетки и максимально долго циркулировал в кровотоке. Чтобы оценить проникновение в клетки микрогелей, загруженных 0,15% ALPC использовались микрогели меченые флуоресцентно (флуоресцеиновая метка). После инкубации 2 часа с микрогелем, загруженным препаратом был проведен анализ флуоресценции клеток методом ПЦФМ по двум каналам флуоресценции, соответствующим флуоресцеину (метка микрогеля) и препарату (см. рис. 49).

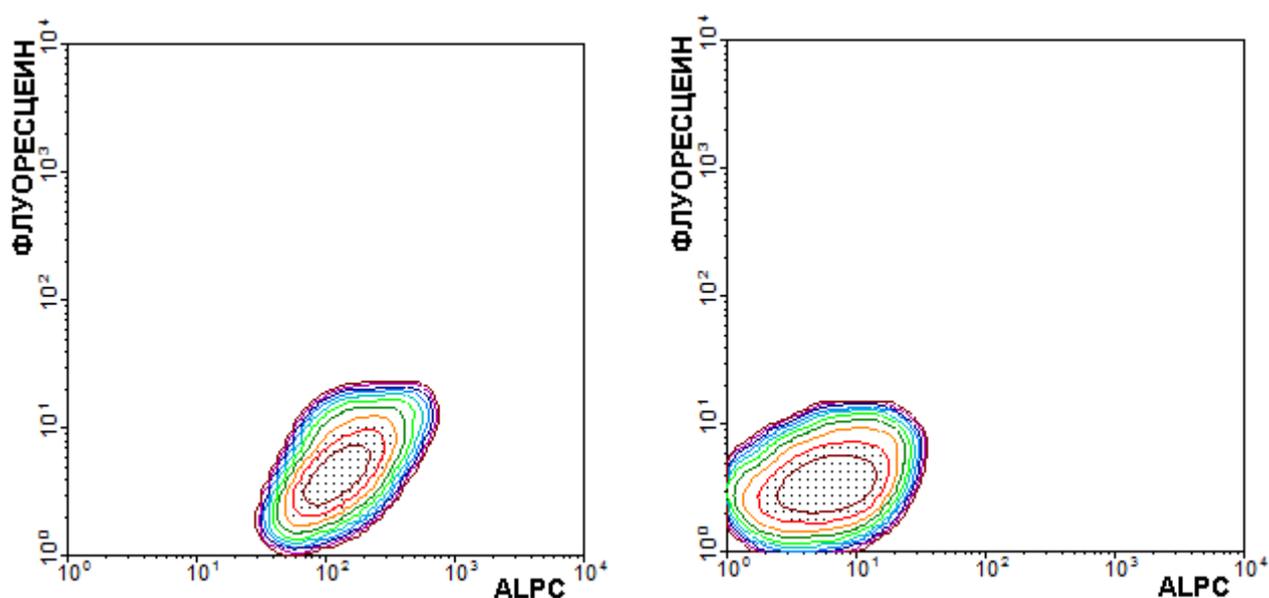


Рис. 49. Результаты ПЦФМ клеток, инкубированных с микрогелем, меченым флуоресцентно, загруженным 0,15% ALPC (слева) и контрольных клеток (справа)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инкубация клеток с микрогелем № 33 (меченым флуоресцентно), загруженным 0,15% ALPC приводит к росту сигнала флуоресценции препарата в клетках, но не сигнала флуоресценции микрогеля. Таким образом, проникновение ALPC происходит без проникновения значительного количества самих микрогелей.

6. ВЫВОДЫ

- Впервые синтезированы полимерные биосовместимые заряженные микрогели на основе винилкапролактама, обладающие способностью к рН-зависимому набуханию. Показано, что варьируя долю ОЕОМА можно синтезировать микрогели в широком диапазоне размеров 50-300 нм. Синтезированные частицы устойчивы в физиологических условиях и способны загружаться препаратом. Синтезированные микрогели не обладают эффективным проникновением в клетки и могут быть использованы для пассивной доставки.
- Определена область рН, при которой происходит набухание микрогелей, влияние ионной силы и рН среды на размер и подвижность синтезированных микрогелей. рН-зависимое набухание микрогелей, содержащих Vim происходит в области рН лизосом клеток (4-5), что говорит о том, что синтезированные микрогели могут проникать в цитоплазму клеток благодаря эффекту «потонной губки». Измеренные значения ζ -потенциала подтверждают полученные данные.
- Исследована кинетика роста микрогелей, высказано предположение о существовании аналогии между процессом мицеллообразования и образования зародышей термочувствительных микрогелей. Показано наличие индукционного периода при образовании зародышей.
- Синтезированные микрогели не обладают острой токсичностью и не активируют систему комплемента. Препарат, загруженный в микрогель не теряет своей активности, микрогель может увеличивать активность препарата *in vitro*, что может быть использовано для доставки нерастворимых препаратов. В случае ALPC при помощи загрузки в микрогель удалось добиться рекордной фототоксичности для фотосенсибилизаторов ($IC_{50}=1,8$ нг/мл при облучении 24 Дж/см²).
- Анализ флуоресценции при помощи ПЦФМ позволяет оценить фотоактивность препарата, загруженного в микрогель и сделать предположение о фотоактивности той или иной формуляции.

Список литературы

1. Bast R.C. Molecular approaches to personalizing management of ovarian cancer. // *Annals of Oncology*. 2011. V.22. P.viii5-viii15.
2. Chao M.P., Majeti R., Weissman I.L. Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer. // *Nat Rev Cancer*. 2012. V.12. P.58-67.
3. Bhutia S.K., Maiti T.K. Targeting tumors with peptides from natural sources. // *Trends in biotechnology*. 2008. V.26. P.210-217.
4. Bierie B., Moses H.L. Transforming growth factor beta (TGF- β) and inflammation in cancer. // *Cytokine Growth Factor Reviews*. 2010. V.21. P.49-59.
5. Huang F.-P., Chen Y.-X., To C.K.W. Guiding the “misguided” – functional conditioning of dendritic cells for the DC-based immunotherapy against tumours. // *European Journal of Immunology*. 2011. V.41. P.18-25.
6. Purdy A.K., Campbell K.S. Natural killer cells and cancer: Regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). // *Cancer Biology & Therapy*. 2009. V.8. P.2209-2218.
7. Hanahan D., Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. // *Cell*. 2011. V.144. P.646-674.
8. Kampen K. Membrane Proteins: The Key Players of a Cancer Cell. // *Journal of Membrane Biology*. 2011. V.242. P.69-74.
9. Strebhardt K., Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. // *Nat Rev Cancer*. 2008. V.8. P.473-480.
10. Scott A.M., Wolchok J.D., Old L.J. Antibody therapy of cancer. // *Nat Rev Cancer*. 2012. V.12. P.278-287.
11. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer. // *Nature*. 2012. V.481. P.306-313.
12. Avni R., Cohen B., Neeman M. Hypoxic stress and cancer: imaging the axis of evil in tumor metastasis. // *NMR in Biomedicine*. 2011. V.24. P.569-581.
13. Oettgen P. The role of ets factors in tumor angiogenesis. // *J Oncol*. 2010. V.2010. P.767384.
14. Le Guelte A., Dwyer J., Gavard J. Jumping the barrier: VE-cadherin, VEGF and other angiogenic modifiers in cancer. // *Biology of the Cell*. 2011. V.103. P.593-605.
15. Hobbs S.K., et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. V.95. P.4607-4612.
16. Seymour L.W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1992. V.9. P.135-87.

17. Sheng Y., et al. Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan. // *Biomaterials*. 2009. V.30. P.2340-2348.
18. Minchin R. Nanomedicine: Sizing up targets with nanoparticles. // *Nat Nano*. 2008. V.3. P.12-13.
19. Judson I., et al. Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL®/CAELYX®) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. // *European Journal of Cancer*. 2001. V.37. P.870-877.
20. Agostinis P., et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011. V.61. P.250-281.
21. Dysart J.S., Patterson M.S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. // *Phys Med Biol*. 2005. V.50. P.2597-616.
22. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2007. V.1776. P.86-107.
23. Kochevar I.E., Redmond R.W. Photosensitized production of singlet oxygen, in *Methods in Enzymology*. Academic Press. 2000. P. 20-28.
24. Mroz P., Hashmi J.T., Huang Y.Y., Lange N., Hamblin M.R. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. // *Expert Rev Clin Immunol*. 2011. V.7. P.75-91.
25. Norum O.-J., Selbo P.K., Weyergang A., Giercksky K.-E., Berg K. Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: From bench towards bedside medicine. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009. V.96. P.83-92.
26. Chan W.S., Brasseur N., Madeleine G.L., Quellet R., van Lier J.E. Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. // *European Journal of Cancer*. 1997. V.33. P.1855-1859.
27. Baker W.O. MICROGEL, A NEW MACROMOLECULE - RELATION TO SOL AND GEL AS STRUCTURAL ELEMENTS OF SYNTHETIC RUBBER. // *Industrial and Engineering Chemistry*. 1949. V.41. P.511-520.
28. Pelton R., Hoare T. Microgels and Their Synthesis: An Introduction, in *Microgel Suspensions.*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2011. P. 1-32.
29. Gonçalves C., Pereira P., Gama M. Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles for Drug Delivery Applications. // *Materials*. 2010. V.3. P.1420-1460.

30. Pangburn T.O., Petersen M.A., Waybrant B., Adil M.M., Kokkoli E. Peptide- and Aptamer-Functionalized Nanovectors for Targeted Delivery of Therapeutics. // *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*. 2009. V.131. P.
31. Caldorera-Moore M.E., Liechty W.B., Peppas N.A. Responsive Theranostic Systems: Integration of Diagnostic Imaging Agents and Responsive Controlled Release Drug Delivery Carriers. // *Accounts of Chemical Research*. 2011. V.44. P.1061-1070.
32. Das M., Sanson N., Fava D., Kumacheva E. Microgels Loaded with Gold Nanorods: Photothermally Triggered Volume Transitions under Physiological Conditions. // *Langmuir*. 2006. V.23. P.196-201.
33. Oh J.K., Lee D.I., Park J.M. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. // *Progress in Polymer Science*. 2009. V.34. P.1261-1282.
34. Oh J.K., Drumright R., Siegwart D.J., Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. // *Progress in Polymer Science*. 2008. V.33. P.448-477.
35. Talelli M., Hennink W.E. Thermosensitive polymeric micelles for targeted drug delivery. // *Nanomedicine (Lond)*. 2011. V.6. P.1245-55.
36. Bromberg L., Temchenko M., Hatton T.A. Smart Microgel Studies. Polyelectrolyte and Drug-Absorbing Properties of Microgels from Polyether-Modified Poly(acrylic acid). // *Langmuir*. 2003. V.19. P.8675-8684.
37. Goncalves C., Pereira P., Gama M. Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles for Drug Delivery Applications. // *Materials*. 2010. V.3. P.1420-1460.
38. Vinogradov S.V. Polymeric nanogel formulations of nucleoside analogs. // *Expert Opin Drug Deliv*. 2007. V.4. P.5-17.
39. Vinogradov S.V. Colloidal microgels in drug delivery applications. // *Curr Pharm Des*. 2006. V.12. P.4703-12.
40. Kabanov A.V., Vinogradov S.V. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. // *Angewandte Chemie International Edition*. 2009. V.48. P.5418-5429.
41. Lee E.S., Gao Z., Bae Y.H. Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. // *Journal of Controlled Release*. 2008. V.132. P.164-170.
42. Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., Jing X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. // *Progress in Polymer Science*. 2012. V.37. P.237-280.

43. Dong H., Mantha V., Matyjaszewski K. Thermally Responsive PM(EO)₂MA Magnetic Microgels via Activators Generated by Electron Transfer Atom Transfer Radical Polymerization in Miniemulsion. // *Chemistry of Materials*. 2009. V.21. P.3965-3972.
44. Nayak S., Lyon L.A. Soft Nanotechnology with Soft Nanoparticles. // *Angewandte Chemie International Edition*. 2005. V.44. P.7686-7708.
45. Hennink W.E., van Nostrum C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002. V.54. P.13-36.
46. Motornov M., Roiter Y., Tokarev I., Minko S. Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. // *Progress in Polymer Science*. 2010. V.35. P.174-211.
47. Saunders B.R., Laajam N., Daly E., Teow S., Hu X.H., Stepto R. Microgels: From responsive polymer colloids to biomaterials. // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009. V.147-48. P.251-262.
48. Landfester K. Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles. // *Angewandte Chemie-International Edition*. 2009. V.48. P.4488-4507.
49. Seo M., et al. Continuous Microfluidic Reactors for Polymer Particles. // *Langmuir*. 2005. V.21. P.11614-11622.
50. Nie Z., Li W., Seo M., Xu S., Kumacheva E. Janus and Ternary Particles Generated by Microfluidic Synthesis: Design, Synthesis, and Self-Assembly. // *Journal of the American Chemical Society*. 2006. V.128. P.9408-9412.
51. Seiffert S., Thiele J., Abate A.R., Weitz D.A. Smart Microgel Capsules from Macromolecular Precursors. // *Journal of the American Chemical Society*. 2010. V.132. P.6606-6609.
52. Rossow T., et al. Controlled Synthesis of Cell-Laden Microgels by Radical-Free Gelation in Droplet Microfluidics. // *Journal of the American Chemical Society*. 2012. V.134. P.4983-4989.
53. Perry J.L., Herlihy K.P., Napier M.E., Desimone J.M. PRINT: A Novel Platform Toward Shape and Size Specific Nanoparticle Theranostics. // *Accounts of Chemical Research*. 2011. V.44. P.990-998.
54. Caruso F., Sukhorukov G. Coated Colloids: Preparation, Characterization, Assembly and Utilization, in *Multilayer Thin Films.: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. 2003. P. 331-362.
55. Sauzedde F., Elaissari A., Pichot C. Hydrophilic magnetic polymer latexes. 2. Encapsulation of adsorbed iron oxide nanoparticles. // *Colloid and Polymer Science*. 1999. V.277. P.1041-1050.

56. Sauzedde F., Elaissari A., Pichot C. Hydrophilic magnetic polymer latexes. 1. Adsorption of magnetic iron oxide nanoparticles onto various cationic latexes. // *Colloid and Polymer Science*. 1999. V.277. P.846-855.
57. Pich A., Richtering W. *Microgels by Precipitation Polymerization: Synthesis, Characterization, and Functionalization; Chemical Design of Responsive Microgels.*: Springer Berlin / Heidelberg. 2011. P. 1-37.
58. Kudryavtsev V.N., Kabanov V.Y., Yanul N.A., Kedik S.A. Polypropylene Modification by the Radiation Graft Polymerization of N-Vinylcaprolactam. // *High Energy Chemistry*. 2003. V.37. P.382-388.
59. Imaz A., Miranda J.I., Ramos J., Forcada J. Evidences of a hydrolysis process in the synthesis of N-vinylcaprolactam-based microgels. // *European Polymer Journal*. 2008. V.44. P.4002-4011.
60. Solomon O.F., Corciovei M., Ciută I., Boghină C. Properties of solutions of poly-N-vinylcaprolactam. // *Journal of Applied Polymer Science*. 1968. V.12. P.1835-1842.
61. Vihola H., Laukkanen A., Valtola L., Tenhu H., Hirvonen J. Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam). // *Biomaterials*. 2005. V.26. P.3055-3064.
62. Yanul' N.A. Z.O.Y., Kirsh Yu.E., Kalnin'sh K.K. INTERACTION OF AQUEOUS ASSOCIATES WITH POLY-N-VINYLCAPROLACTAM IN CONCENTRATED POLYMER SOLUTIONS. // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 1998. V.72. P.1687-1692.
63. Kirsh Y.E., Yanul N.A., Kalninh K.K. Structural transformations and water associate interactions in poly-N-vinylcaprolactam–water system. // *European Polymer Journal*. 1999. V.35. P.305-316.
64. Sun S., Wu P. Infrared Spectroscopic Insight into Hydration Behavior of Poly(N-vinylcaprolactam) in Water. // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2011. V.115. P.11609-11618.
65. Gao Y.B., Au-Yeung S.C.F., Wu C. Interaction between surfactant and poly(N-vinylcaprolactam) microgels. // *Macromolecules*. 1999. V.32. P.3674-3677.
66. Bhattacharya S., Eckert F., Boyko V., Pich A. Temperature-, pH-, and Magnetic-Field-Sensitive Hybrid Microgels. // *Small*. 2007. V.3. P.650-657.
67. Chastek T., Wadajkar A., Nguyen K., Hudson S., Chastek T. Polyglycol-templated synthesis of poly(N -isopropyl acrylamide) microgels with improved biocompatibility. // *Colloid & Polymer Science*. 2010. V.288. P.105-114.

68. Imaz A., Forcada J. N-vinylcaprolactam-based microgels: Synthesis and characterization. // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2008. V.46. P.2510-2524.
69. Imaz A., Forcada J. Optimized buffered polymerizations to produce N-vinylcaprolactam-based microgels. // *European Polymer Journal*. 2009. V.45. P.3164-3175.
70. Boyko V., Pich A., Lu Y., Richter S., Arndt K.-F., Adler H.-J.P. Thermo-sensitive poly(N-vinylcaprolactam-co-acetoacetoxyethyl methacrylate) microgels: 1—synthesis and characterization. // *Polymer*. 2003. V.44. P.7821-7827.
71. Pich A., Lu Y., Boyko V., Arndt K.-F., Adler H.-J.P. Thermo-sensitive poly(N-vinylcaprolactam-co-acetoacetoxyethyl methacrylate) microgels: 2. Incorporation of polypyrrole. // *Polymer*. 2003. V.44. P.7651-7659.
72. Pich A., Lu Y., Boyko V., Richter S., Arndt K.-F., Adler H.-J.P. Thermo-sensitive poly(N-vinylcaprolactam-co-acetoacetoxyethyl methacrylate) microgels. 3. Incorporation of polypyrrole by selective microgel swelling in ethanol–water mixtures. // *Polymer*. 2004. V.45. P.1079-1087.
73. Pich A., Tessier A., Boyko V., Lu Y., Adler H.-J.P. Synthesis and Characterization of Poly(vinylcaprolactam)-Based Microgels Exhibiting Temperature and pH-Sensitive Properties. // *Macromolecules*. 2006. V.39. P.7701-7707.
74. Laukkanen A., Hietala S., Maunu S.L., Tenhu H. Poly(N-vinylcaprolactam) Microgel Particles Grafted with Amphiphilic Chains. // *Macromolecules*. 2000. V.33. P.8703-8708.
75. Edgell C.-J.S., McDonald C.C., Graham J.B.M. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. // *Nati Acad. Sci. USA*. 1983. V.80. P. 3734-3737.

Приложение

Таблица 1. Навески мономеров для синтеза микрогелей Vim 1-5% (на 50 мл).

Образец	m VCL, г	m AAEM, г	m Vim, г	m MBA, г	m AMPA, г	Выход полимеров, %
Vim 0%	0,3758	0,0676	0,0000	0,012	0,010	65,6
Vim 1%	0,3715	0,0669	0,0029	0,012	0,010	56,8
Vim 2%	0,3672	0,0663	0,0059	0,012	0,010	55,2
Vim 3%	0,3639	0,0655	0,0088	0,012	0,010	66,6
Vim 4%	0,3597	0,0647	0,0118	0,012	0,010	58,1
Vim 5%	0,3555	0,0642	0,0147	0,012	0,010	58,2

Таблица 2. Навески мономеров для синтеза микрогелей AA 1-5% (на 50 мл).

Образец	m VCL, г	m AAEM, г	m AA, г	m MBA, г	m PSA, г	Выход полимеров, %
AA 0%	0,3758	0,06767	0,000	0,12	0,08	16,3
AA 1%	0,3718	0,06691	0,023	0,12	0,08	28,0
AA 3%	0,3635	0,06551	0,068	0,12	0,08	29,8
AA 5%	0,3555	0,06415	0,113	0,12	0,08	30,5

Таблица 3. Навески мономеров для синтеза микрогелей № 21 и № 31 (на 50 мл).

Образец	VCL	AAEM	Vim	ВАС	АМРА	ОЕОМА	Выход микрогеля, %	Выход полимеров, %
Микрогель № 31 (150 нм)	0,4505	0,0673	0,014	0,0313	0,0305	0,1619	21	72
Микрогель № 21 (120 нм)	0,4505	0,0673	0,014	0,0313	0,0305	0,1726	21	70