

Микрогели на основе карбоксиметилцеллюлозы как multifunctional носители для иммобилизации ингибитора и активатора индуцибельной NO-синтазы

А. С. Золотова,^а М. А. Орлова,^{а,б*} В. В. Спиридонов,^а Т. П. Трофимова,^{а,в} А. Ю. Лупатов,^г
А. А. Ярославов,^а С. Н. Калмыков^а

^аМосковский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Химический факультет, Российская Федерация, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3.

E-mail: orlova.radiochem@mail.ru

^бРоссийский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Российская Федерация, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

^вФедеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук,

Российская Федерация, 142432 Черноголовка Московской обл., просп. Академика Семенова, 1

^гИнститут биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича,

Российская Федерация, 119435 Москва, Погодинская ул., 10, стр. 8

Получены трехкомпонентные микрогели на основе карбоксиметилцеллюлозы и ионов меди(II) с иммобилизованным ингибитором индуцибельной NO-синтазы (*N*-(5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин-2-ил)бензамидом), а также активатором этого фермента (гидробромидом *N*-(4-изопропилфенил)-*N*-(1-иминоэтил)пиперидин-1-карботиоамида). Исследованы гидродинамические и электрокинетические характеристики этих микрогелей, демонстрирующие их оптимальный размер и высокую коллоидную устойчивость как в водной, так и в физиологической среде. Синтезированные трехкомпонентные микрогели характеризуются повышением цитотоксичности, увеличивая апоптоз лейкемических клеток линии *Jurkat*.

Ключевые слова: карбоксиметилцеллюлоза, микрогели, ионы меди, эффекторы NO-синтазы, ранний апоптоз, клеточная линия *Jurkat*.

Механизм образования бинарных микрогелей карбоксиметилцеллюлоза-ионы меди (КМЦ—Cu) за счет образования электростатических контактов ионов меди(II) с карбоксильными группами полимера был изучен ранее¹. Установлен отрицательный заряд полученных водорастворимых микрогелей. Показано, что размеры и цитотоксичность таких наноносителей сильно зависят от содержания меди, а в некоторых случаях имеется весьма значительное терапевтическое окно между воздействием микрогелей на здоровые и лейкемические клетки. Полученные результаты открывают возможность широкого использования таких носителей для комплексной доставки нескольких лекарственных компонентов, включая радионуклиды и антиопухолевые препараты, т.е. для создания тройных микрогелей.

Среди антиопухолевых агентов различного строения^{2,3} следует выделить ингибиторы и активаторы NO-синтазы (NOS)⁴, среди которых хорошие показатели имеют *N*-(5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин-2-ил)бензамид (ингибитор iNOS, L¹)

и гидробромид *N*-(4-изопропилфенил)-*N*-(1-иминоэтил)пиперидин-1-карботиоамида (активатор NOS, L²). В качестве модельного лиганда был также использован 2-аминопиримидин (AP), на основе которого создано большое количество антилейкемических препаратов.

Целью настоящей работы является получение и исследование коллоидной устойчивости в водной и физиологической средах, эффективного размера и цитотоксичности водосовместимых тройных микрогелей КМЦ—Cu—L¹ и КМЦ—Cu—L².

Обсуждение полученных результатов

В описанные ранее¹ двухкомпонентные системы КМЦ—Cu (I—III), где молярное соотношение $Q_1 = [\text{Мономерное звено КМЦ}] : [\text{Cu}^{2+}]$ изменялось от 7 : 1 до 15 : 1, вводили L¹ (табл. 1) так, чтобы соотношение КМЦ : L¹ составило 2 : 1. Получили микрогели IV—VI, хорошо растворимые в воде, в отличие от самого лиганда, который в водных растворах практически нерастворим.

Таблица 1. Количественное соотношение реагентов в трехкомпонентных нано/микрогелях КМЦ—Cu^{II}—L¹

Образец	[Мономерное звено КМЦ] : Cu ²⁺ (мол.)	N/моль		
		КМЦ	Cu ^{II}	L ¹ (исходное)
IV	15 : 1	2 · 10 ⁻⁴	1.33 · 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
V	10 : 1	2 · 10 ⁻⁴	2.00 · 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
VI	7 : 1	2 · 10 ⁻⁴	2.86 · 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴

Таблица 2. Количественное соотношение реагентов в двух- и трехкомпонентных нано/микрогелях, содержащих L²

Образец	[Мономерное звено КМЦ] : Cu ²⁺ (мол.)	N/моль		[КМЦ] : [Cu]	[КМЦ] : [L ²]
		Cu ²⁺	L ²		
КМЦ—L ² (VII)	2 · 10 ⁻⁴	0	5 · 10 ⁻⁵	—	4 : 1
КМЦ—Cu ²⁺ —L ² (VIII)	2 · 10 ⁻⁴	2.00 · 10 ⁻⁵	5 · 10 ⁻⁵	10 : 1	4 : 1

Содержание лиганда в микрогелях **IV—VI** определяли спектрофотометрически. На рисунке 1 приведены УФ-спектры лиганда L¹ и полученных образцов **IV—VI**.

Аналогично синтезировали образцы с лигандом L²: двухкомпонентный КМЦ—L² и трехкомпонентный КМЦ—Cu—L² (**VII** и **VIII** соответственно) (табл. 2). Соответствующие УФ-спектры приведены на рисунке 2.

Гидродинамические и электрокинетические характеристики полученных микрогелей представлены в таблицах 3 и 4. Значения величин ЕРМ (электрофоретической подвижности) указывают на частичную нейтрализацию полисахарида за счет образования мостиковых электростатических контактов между фрагментами макромолекул через ионы меди, что сопровождается образованием микрогелевой структуры.

Из анализа физико-химических характеристик (см. табл. 3) микрогелей, содержащих лиганд L¹, следует, что при увеличении количества ионов меди размеры конъюгатов уменьшаются, причем в физиологическом растворе этот процесс сжатия проявляется сильнее. Ранее, при введении

в двухкомпонентный микрогель 2-аминопиримидина (АР) сжатие происходило от 400 нм для чистого КМЦ до 350 нм для трехкомпонентного микрогеля. При этом гидродинамический диаметр двухкомпонентного микрогеля КМЦ—Cu (7 : 1) составлял 380 нм в водном растворе и наблюдалась тенденция его уменьшения до 220 нм в физиологическом растворе и до 195 нм, если дополнительно вводили БСА.¹ При сравнении двух- и трехкомпонентных композиций **VII** и **VIII**, содержащих активатор NOS — лиганд L² (см. табл. 4), видно, что устойчивость микрогелей повышается, вероятно, за счет увеличения числа сайтов связывания КМЦ с этим лигандом. Вследствие этого наблюдается уменьшение гидродинамических размеров по сравнению с микрогелями, содержащими как АР, так и L¹. В физиологическом растворе размер таких частиц приближается к 0-мерным наночастицам, что является очень важным параметром для медицинских препаратов^{5,6}.

Для оценки цитотоксического воздействия микрогелей на клетки использовали проточную цитофлуориметрию на поздний апоптоз и некроз (рис. 3). Ранее⁷ было показано, что как для двух-,

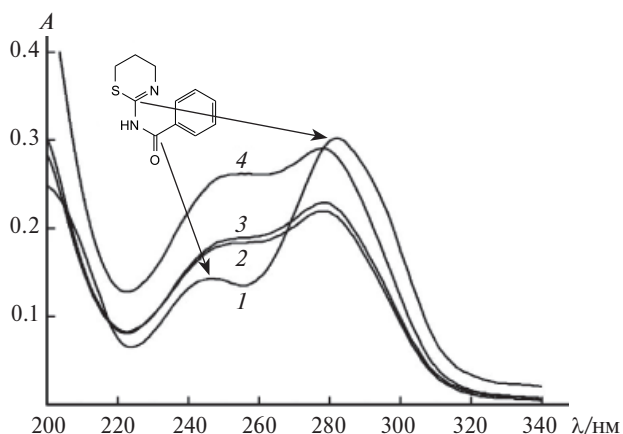


Рис. 1. УФ-спектры лиганда L¹ (1) и комплексов **IV—VI** (2—4 соответственно).

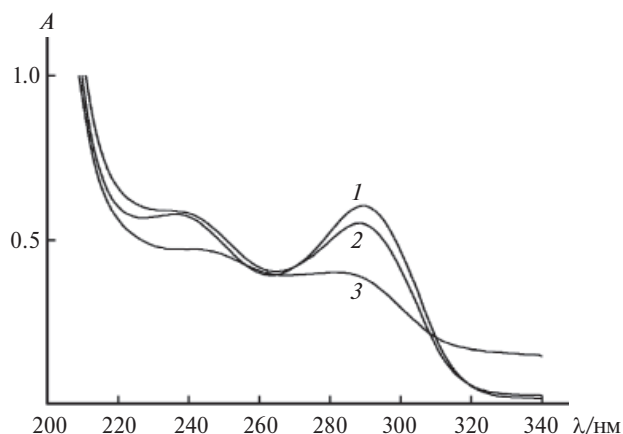


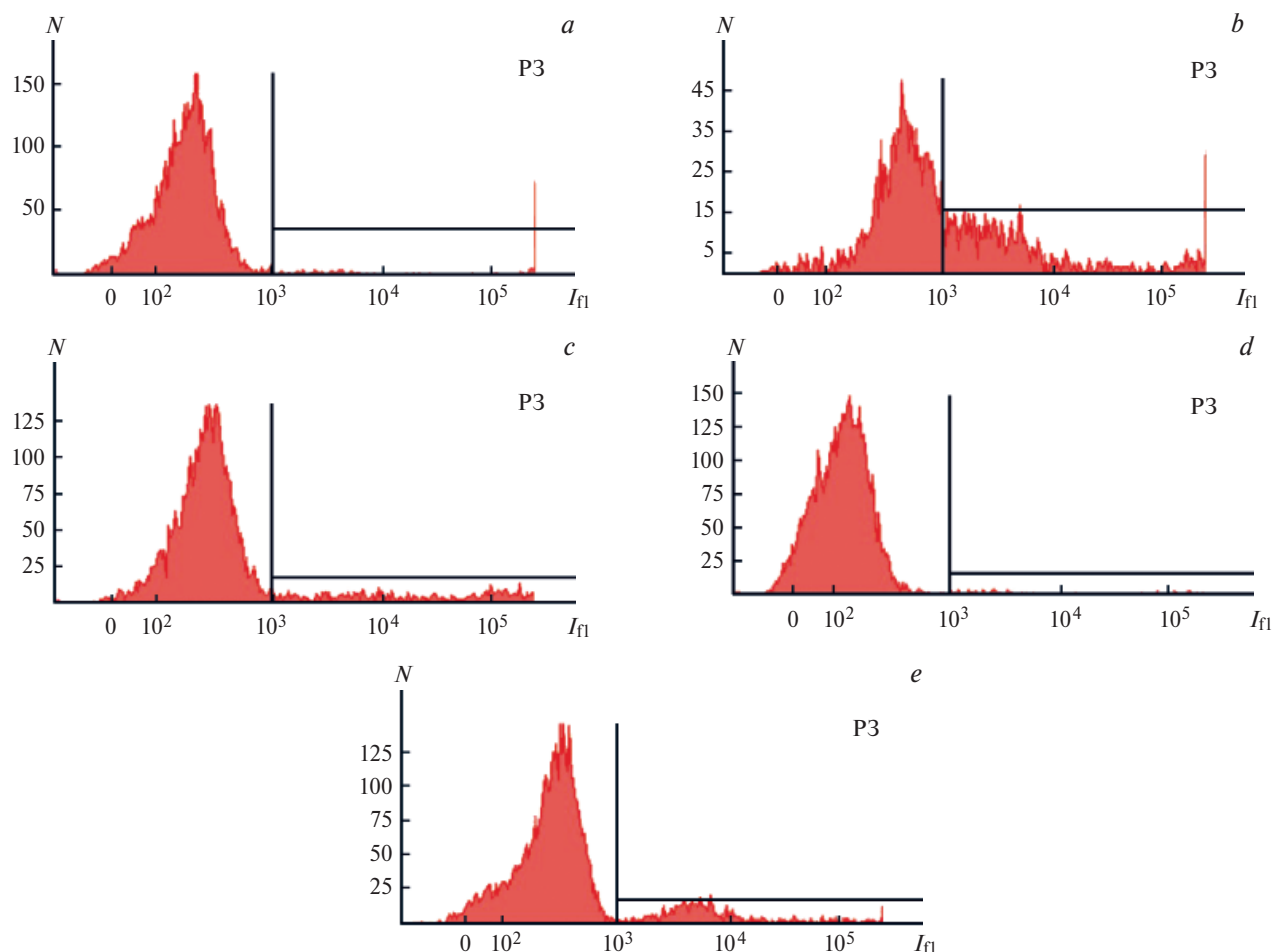
Рис. 2. УФ-спектры лиганда L² (1) и комплексов **VII** и **VIII** (2 и 3 соответственно).

Таблица 3. Гидродинамические и электрокинетические характеристики микрогелей **IV**–**VI** в водных и физиологических растворах

Образец	[КМЦ] : [L ¹] (мол.)	D_h^* /нм		ЕРМ**
		Водный раствор	0.15 M NaCl	
IV	2 : 1	370±25	285	–(3.34±0.05)
V	2 : 1	340±25	230	–(3.31±0.02)
VI	2 : 1	230±15	190	–(3.46±0.02)

* Гидродинамический диаметр. ** В мкм·см·с^{–1}·В^{–1}.**Таблица 4.** Гидродинамические и электрокинетические параметры водных растворов микрогелей **VII** и **VIII***

Образец	D_h /нм		ЕРМ**
	Водный раствор	0.15 M NaCl	
VII	220	110	–5.99
VIII	250	180	–4.86

* Концентрация водных растворов микрогелей во всех случаях составила 1 мг·мл^{–1}. ** В мкм·см·с^{–1}·В^{–1}.**Рис. 3.** Анализ гибели клеток клеточной линии *Jurkat*: отрицательный контроль (a), положительный контроль в присутствии сауропорина (b), в присутствии комплексов **VIII** (c), **VII** (d) и **IV** (e); N — число клеток, I_{fl} — интенсивность флуоресценции; P3 — клетки на поздней стадии апоптоза.

так и для трехкомпонентных микрогелей, содержащих AP, характерна тенденция увеличения раннего апоптоза, причем тем сильнее, чем больше было содержание ионов меди в образцах. Сходная картина гибели клеток линии *Jurkat* наблюдается и для образцов, содержащих в микрогелях лиганды L^1 и L^2 . С учетом в дальнейшем введения в микрогели радионуклидов меди была рассмотрена радиационная устойчивость лигандов. Оказалось, что под действием γ -облучения устойчивость лигандов в физиологическом растворе сохраняется примерно до дозы 1.5 кГр.

Экспериментальная часть

Лиганды L^1 и L^2 получены по методикам, описанным ранее^{4,8,9}.

Микрогели **IV–**VIII**.** Тройные микрогели синтезировали введением соответствующего лиганда в КМЦ—Cu (КМЦ: $M = 90$ кДа, степень замещения $\phi = 0.7$) так, чтобы молярное соотношение КМЦ : лиганд составляло 2 : 1, как описано в работе¹. Синтез двойных микрогелей Cu^{II}—КМЦ проводили при комнатной температуре: к 50 мл 0.1%-ного раствора КМЦ при интенсивном перемешивании по каплям добавляли 5 мл раствора, содержащего от 3.7 до 7.4 мг CuSO₄·5 H₂O. Таким

способом варьировали соотношение $Q = [\text{Мономерное звено КМЦ}] : [\text{Cu}^{2+}] = 15 : 1$ (IV), $10 : 1$ (V), $7 : 1$ (VI), увеличивая содержание Cu^{2+} в реакционной смеси. Полученные растворы перемешивали 20 мин, после чего проводили диализ в течение 1 сут («Sigma», MWCO (molecular weight cut-off) ~ 12000 Да) для вымывания низкомолекулярных солей. После диализа растворы лиофильно высушивали. Выход сухого продукта составлял ~ 90 мас. %.

Гидродинамический радиус/диаметр определяли методом динамического светорассеяния на приборе «ALV-5» («ALV», Германия) с помощью He—Ne-лазера с мощностью 25 мВт и длиной волны 632.8 нм, угол рассеяния 90° . Математическую обработку проводили методом регуляризации по Тихонову. Гидродинамические радиусы рассчитывали по уравнению Стокса: $R_h = kT/(6\pi\eta D)$, где R_h — стоксов радиус частицы, k — константа Больцмана, T — температура смеси, η — вязкость среды, D — коэффициент диффузии в данной среде. Измерение повторяли до 10 раз.

Электрокинетические характеристики (ЕРМ) определяли на анализаторе электрофоретического светорассеяния и размеров наночастиц «Brookhaven Instruments» («NanoBrook Omni», США).

Количественные измерения ионов меди и лигандов в образцах проводили спектрофотометрически («Shimadzu UV-1280», Япония), используя предварительно полученные калибровочные кривые.

Проточная цитофлуориметрия. Метод основан на облучении потока клеток лучом лазера и дальнейшей регистрации флуоресценции и рассеянного света каждой клетки. Для окрашивания клеток использовали пропидиййодид («Sigma—Aldrich», США) в концентрации $1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$, который способен проникать в клетку только через поврежденную мембрану клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза, или мертвых клеток. Для анализа образцов использовали цитофлуориметр «FACSAria» («BD Bioscience», США) с возбуждением флуоресценции аргоновым лазером ($\lambda = 488 \text{ нм}$). Данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 5.11.2.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания № 122012600116-4 «Получение и использование радионуклидов и меченых соединений для целей ядерной медицины, изучения биологически значимых процессов и взаимодействия живых организмов с ионизирующим излучением».

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания исследований с использованием в качестве объектов животных и людей.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Список литературы

1. М. А. Орлова, В. В. Спиридонов, А. Р. Орлов, Н. С. Золотова, А. Ю. Лупатов, Т. Р. Трофимова, С. Н. Калмыков, А. А. Ярославов, *Colloids Surfaces A.*, 2022, **632**, 127814; DOI: 10.1016/j.colsurfa.2021.127814.
2. Р. А. Туктарова, Л. У. Джемилева, У. М. Джемилев, В. А. Дьяконов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2024, **73**, 1408 [R. A. Tuktarova, L. U. Dshemileva, U. M. Dshemilev, V. A. D'yakonov, *Russ. Chem. Bull.*, 2024, **73**, 1408; DOI: 10.1007/s11172-024-4259-x].
3. С. В. Курмаз, И. И. Иванова, Н. В. Фадеева, В. М. Игнатъев, Н. С. Емельянова, Н. Л. Лапшина, А. А. Балакина, А. А. Терентьев, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2023, **72**, 1349 [S. V. Kurmaz, I. I. Ivanova, N. V. Fadeeva, V. M. Ignatiev, N. S. Emelyanova, M. A. Lapshina, A. A. Balakina, A. A. Terentiev, *Russ. Chem. Bull.*, 2023, **72**, 1349; DOI: 10.1007/s11172-023-3910-2].
4. М. А. Орлова, Т. П. Трофимова, С. В. Никулин, А. П. Орлов, *Вестн. Моск. ун-та*, 2016, **57**, 269 [M. A. Orlova, T. P. Trofimova, S. V. Nikulin, A. P. Orlov, *Mosc. Univ. Chem. Bull.*, 2016, **71**, 258; DOI: 10.3103/s0027131416040052].
5. L. Farzin, S. Sheibani, H. E. Moassesi, M. Shamsipur, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2019, **107A**, 251; DOI: 10.1002/jbm.a.36550.
6. M. Shamsipur, L. Farzin, M. A. Tabrizi, M. Shanehsaz, *Mater. Sci. Eng. C*, 2016, **69**, 1354; DOI: 10.1016/j.msec.2016.08.038.
7. М. А. Орлова, Т. П. Трофимова, Н. С. Золотова, И. А. Иванов, В. В. Спиридонов, А. Н. Прошин, А. А. Бородков, А. А. Ярославов, А. П. Орлов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2019, **68**, 1933 [M. A. Orlova, T. P. Trofimova, N. S. Zolotova, I. A. Ivanov, V. V. Spiridonov, A. N. Proshin, A. A. Borodkov, A. A. Yaroslavov, A. P. Orlov, *Russ. Chem. Bull.*, 2019, **68**, 1933; DOI: 10.1007/s11172-019-2649-2].
8. Т. П. Трофимова, О. Н. Зефирова, А. А. Мандругин, В. М. Федосеев, Д. И. Перегуд, М. Н. Онуфриев, *Вестн. Моск. ун-та. Сер. хим.*, 2008, 328 [T. P. Trofimova, O. N. Zefirova, A. A. Mandrugina, V. M. Fedoseev, D. I. Peregud, M. N. Onufriev, *Mosc. Univ. Chem. Bull.*, 2008, **63**, 274; DOI: 10.3103/S0027131408050088].
9. А. Н. Прошин, Т. П. Трофимова, С. О. Бачурин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2011, **60**, 2432 [A. N. Proshin, T. P. Trofimova, S. O. Bachurin, *Russ. Chem. Bull.*, 2011, **60**, 2432; DOI: 10.1007/s11172-011-0375-5].

Поступило в редакцию 27 августа 2024;
после доработки — 26 сентября 2024;
принято к публикации 8 октября 2024