

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

---

Химический факультет

*На правах рукописи*

МАКСИМОВА Екатерина Дмитриевна

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

02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки

03.01.04 – биохимия, химические науки

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

д.б.н. Гроздова Ирина Дмитриевна,

д.х.н. Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

Москва - 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>9</b>
1.1 НАНОГЕЛИ: МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ, СВОЙСТВА И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ.....	9
1.1.1. <i>Методы синтеза наногелей .....</i>	10
1.1.1.1. <i>Сшивание полимеров в разбавленных растворах в хороших растворителях...</i>	11
1.1.1.2 <i>Сшивание в агрегированных полимерных системах .....</i>	13
1.1.1.3 <i>Матричная полимеризация.....</i>	18
1.1.1.4 <i>Осадительная полимеризация.....</i>	18
1.1.1.5 <i>Эмульсионная полимеризация.....</i>	21
1.2.1 <i>Применение наногелей.....</i>	27
1.2.1.1 <i>Полимерные системы, содержащие неорганические частицы, для создания молекулярных устройств и катализаторов.....</i>	27
1.2.1.2 <i>Носители для биокатализаторов.....</i>	29
1.2.1.3 <i>Инженерия тканей.....</i>	30
1.2.1.4 <i>Применение наногелей для доставки лекарств.....</i>	31
1.2.1.5 <i>Температурно-чувствительные наногели .....</i>	31
1.2.1.6 <i>pH-чувствительные наногели для доставки лекарств.....</i>	33
1.2.1.7 <i>Использование наногелей для доставки нуклеиновых кислот .....</i>	34
1.2 ПРОБЛЕМА ТРАНСФЕКЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ЕЕ РЕШЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИКАТИОНОВ.....	35
1.2.1 <i>Механизмы доставки нуклеиновых кислот в клетки.....</i>	35
1.2.2 <i>Полиэлектролитные комплексы и их свойства .....</i>	40
1.2.2.1 <i>Структура полиэлектролитных комплексов .....</i>	40
1.2.2.2 <i>Структура и стабильность комплексов поликатионов с ДНК .....</i>	42
1.2.3 <i>Использование катионных наногелей и разветвленных поликатионов для трансфекции .....</i>	45
1.2.3.1 <i>Влияние катионных наногелей на трансфекцию эукариотических клеток .....</i>	46
1.2.3.2 <i>Использование разветвленных поликатионов для трансфекции .....</i>	49
<b>ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>51</b>
2.1 МАТЕРИАЛЫ.....	51
2.2 МЕТОДЫ .....	52
2.2.1 <i>Синтез линейного pDMAЭМА методом радикальной полимеризации.....</i>	52
2.2.2 <i>Синтез наногелей pDMAЭМА методом обратной микроэмульсионной свободно-радикальной полимеризации .....</i>	52
2.2.3 <i>Гель-проникающая хроматография .....</i>	54
2.2.4 <i>ИК-спектроскопия.....</i>	54

2.2.5 Изучение кислотно-основных свойств наногелевых частиц (метод потенциометрии) .....	54
2.2.6 Метод динамического светорассеяния.....	54
2.2.7 Лазерный микроэлектрофорез.....	56
2.2.8 Изучение комплексообразования поликатионов с ДНК методом конкурентного вытеснения интеркалирующих красителей SYBR Green и бромистого этидия.....	56
2.2.9. Метод атомно-силовой микроскопии .....	58
2.2.10 Методы работы с клетками в культуре .....	59
2.2.10.1 Методы культивирования клеток.....	59
2.2.10.2 Определение цитотоксичности полимеров на основе ДМАЭМА.....	59
2.2.10.3 Доставка в клетки СНО плазмидной ДНК, содержащей ген люциферазы .....	60
2.2.10.4 Доставка в клетки СНО-luc, устойчиво трансфецированные геном люциферазы, малой интерферирующей РНК, комплементарную матричной РНК люциферазы.....	61
2.2.10.5 Определение активности люциферазы в трансфецированных клетках.....	62
2.2.10.6 Оценка влияния полимеров на pH эндосом методом конфокальной микроскопии .....	63
2.2.10.7 Влияние полимеров на расщепление нуклеиновых кислот под действием нуклеаз (электрофорез в агарозном геле).....	64
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>66</b>
3.1 Синтез наногелей поли-(N,N-диметил-аминоэтилметакрилата).....	66
3.2. КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА НАНОГЕЛЕЙ.....	72
3.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОГЕЛЕЙ С ПОЛИАНИОНАМИ.....	74
3.4 РАЗМЕР КОМПЛЕКСОВ НАНОГЕЛЕЙ С ДНК.....	82
3.5 ЗАЩИТА ДНК ОТ ФЕРМЕНТОВ.....	89
3.6 ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ.....	93
3.7. ТРАНСФЕКЦИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК .....	94
3.8 ТРАНСФЕКЦИЯ МИРНК.....	96
3.9 ВЛИЯНИЕ НАНОГЕЛЕЙ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ ЭНДОСОМ .....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	105
ВЫВОДЫ.....	108
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	109
БЛАГОДАРНОСТИ .....	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	112

## ВВЕДЕНИЕ

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

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

**Целью работы** явилось получение наногелевых частиц на основе поли-(N,N-диметиламиноэтилметакрилата) и исследование влияния количества сшивателя, добавленного в полимеризационную смесь, на размер частиц, их взаимодействие с полианионами, в том числе с нуклеиновыми кислотами, а также на их способность доставлять ДНК и РНК в клетки.

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

#### **Научная новизна работы.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

метод динамического светорассеяния, ИК-спектроскопию, потенциометрическое титрование, метод лазерного микроэлектрофореза, метод конфокальной микроскопии, метод атомно-силовой микроскопии и другие.

**Положения, выносимые на защиту:**

(1) радикальная сополимеризация N,N-диметиламиноэтилметакрилата и N,N'-метиленабисакриламида в обращенных мицеллах олеил-декаэтиленгликоля в циклогексане позволяет получать гидрогелевые частицы, характеризующиеся узким распределением по размерам;

(2) гидродинамический радиус частиц зависит от содержания сшивателя и варьируется от 50 до 25 нм;

(3) при увеличении содержания сшивателя в составе полимеризационной смеси катионных наногелей снижается доля аминогрупп, участвующих в образовании комплексов с полианионами;

(4) размеры комплексов наногелей с плазмидной ДНК зависят от содержания сшивателя в составе наногеля, причем наименьший размер комплексов достигается при содержании сшивателя 2-5%;

(5) катионные наногели защищают ДНК от нуклеаз, причем, защитное действие усиливается с увеличением содержания сшивателя в полимеризационной смеси наногелей;

(6) содержание сшивателя катионных наногелей определяет их способность обеспечивать транспорт плазмидной ДНК и малой интерферирующей РНК в живые клетки, причем наибольшей эффективностью обладают наногели с промежуточным содержанием сшивателя (около 2%);

(7) сетчатая структура слабых поликатионов имеет существенное значение для вызываемого ими эффекта осмотического набухания и разрушения эндосом в клетках, приводящего к 10-кратному увеличению эффективности доставки нуклеиновых кислот.

**Личный вклад автора** заключается в участии автора во всех этапах диссертационного исследования: в планировании и постановке задач; в сборе и

анализе литературных данных; в непосредственном участии в научных экспериментах, в обработке, анализе и обсуждении полученных результатов; в подготовке публикаций по теме выполненного исследования и участии в тематических конференциях.

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

**Степень достоверности результатов** проведенных исследований подтверждена публикацией научных результатов диссертационной работы в трех научных статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией, из них две статьи опубликованы в рецензируемом научном журнале, индексируемом по базам Scopus и Web of Science.



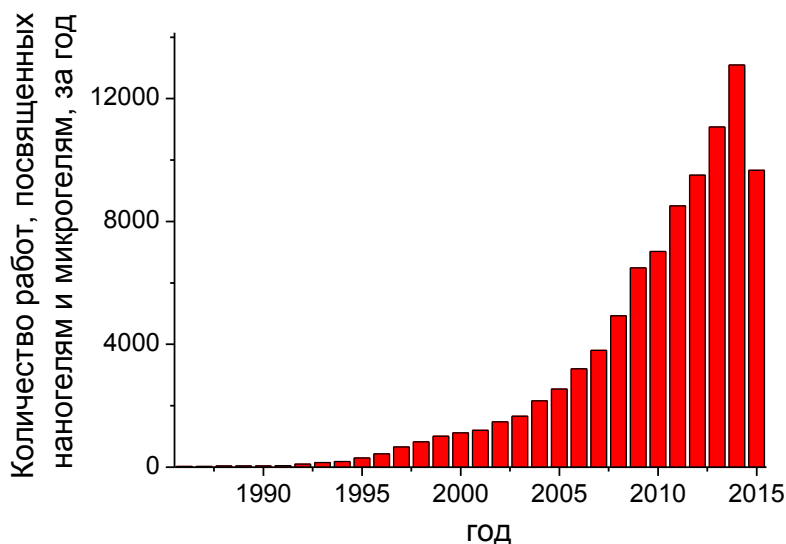
## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Наногели: методы получения, свойства и области применения

Наногели - это гидрогелевые наночастицы, состоящие из природных или синтетических полимеров, или биополимеров, сшитых химическими или физическими связями [1, 2, 3]. Частицы наногелей в водном растворе имеют, как правило, сферическую форму, а их диаметр варьируется от десятков нанометров до десятков микрон. Крупные частицы (размер порядка микрон или несколько меньше) называют микрогелями. Суспензии таких частиц стабилизируются в водной фазе за счет стерических и/или электростатических факторов.

Важнейшей характеристикой наногелей является средняя плотность сшивки, определяющая такие параметры, как степень набухания и проницаемость для молекул различного размера. Набухание наногелей в водной среде, так же как и макроскопических гелей, определяется балансом между энтропией растворителя, энергией его взаимодействия с полимерной цепью и жесткостью полимерной цепи. [4]. В случае полиэлектролитных гелей и наногелей набухаемость определяется в основном балансом между осмотическим давлением внутри геля и жесткостью полимерных цепей [5]. Соотношение между средней частотой сшивок в геле, персистентной длиной полимера и дебаевской длиной определяет чувствительность наногелей к внешним условиям и их проницаемость по отношению к малым молекулам и макромолекулам в водном растворе.

Количество работ, посвященных микро- и наногелям, в течение последних 30 лет увеличивается по экспоненциальному закону и исчисляется десятками тысяч в год (рис. 1). Такой интерес к наногелям определяется удачным сочетанием чувствительности к свойствам среды, характерной для макроскопических гелей, и высокой коллоидной стабильности, характерной для наночастиц. Эти свойства наногелей определяют все возрастающий интерес к этим системам в качестве носителей для доставки лекарств [6], модуляторов иммунного ответа [7] и формированию материалов, структурированных на субмикроскопическом уровне [8].



**Рис. 1.** Динамика публикаций, посвященных микро- и наногелям за последние 30 лет по данным сайта Web of Science.

В настоящей работе будет сделан акцент на исследовании синтеза полиэлектролитных наногелей с узким распределением по размерам и исследование изменений их свойств при варьировании содержания сшивателя. В частности, будет изучена способность таких наногелей вызывать осмотическое набухание и разрушение эндосомальных везикул в клетках, облегчая за счет этого транспорт генетического материала в живые клетки.

### **1.1.1. Методы синтеза наногелей**

Для синтеза наногелей используются, как правило, водорастворимые мономеры и бифункциональные или многофункциональные сшивающие агенты, которые при смешивании в водной среде легко образуют макроскопические гели. Для получения наногелевых частиц необходимо пространственно ограничивать рост полимерных цепей за счет различных кинетических или термодинамических факторов. В настоящем обзоре мы попытались классифицировать подходы к получению наногелей именно по природе физико-химических факторов, пространственно ограничивающих рост полимерных цепей, и сравнить их возможности для получения частиц с контролируемыми свойствами.

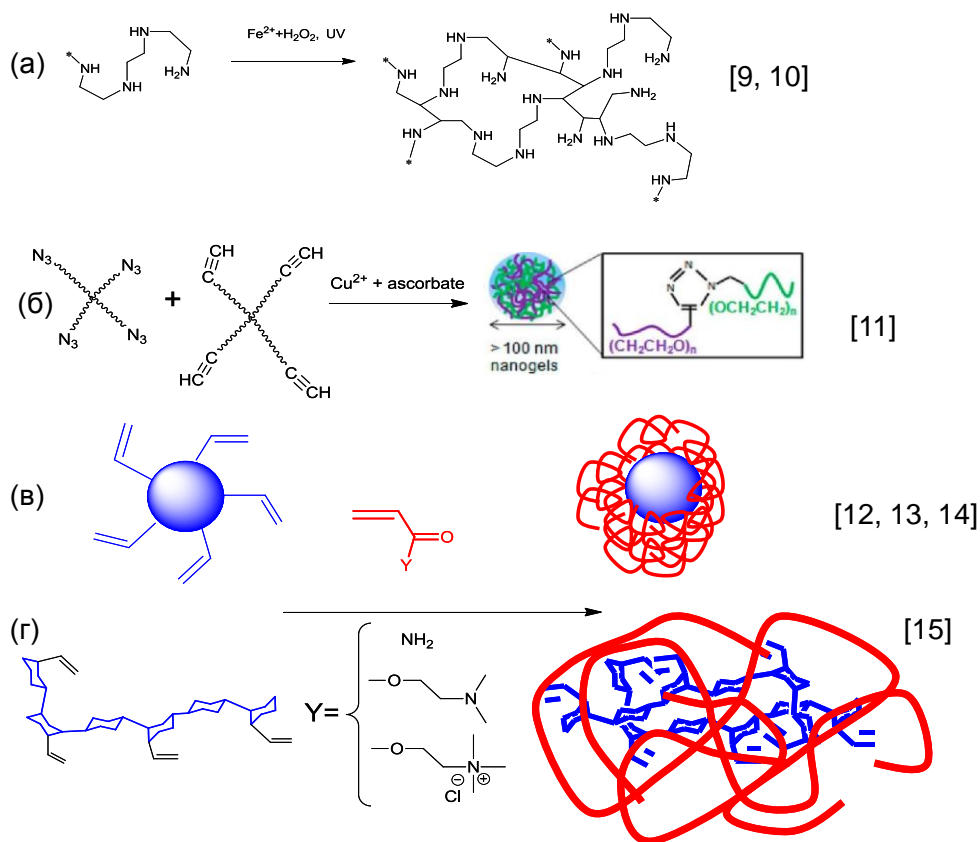
#### 1.1.1.1. Сшивание полимеров в разбавленных растворах в хороших растворителях

Распространенный подход к получению наногелей основан на сшивании высокомолекулярных соединений путем сшивания полимерных цепей с помощью конденсирующих агентов. В данном случае единственным фактором, ограничивающим распространение полимеризационного процесса в пространстве, является соотношение между кинетикой роста и обрыва цепного процесса.

Одним из примеров такого подхода является перекисное сшивание разветвленного полиэтиленimina (ПЭИ) с помощью пероксидных радикалов, генерируемых *in situ* с помощью реактива Фентона. Для этого к водному раствору ПЭИ с контролируемым рН в инертной атмосфере прибавляли  $\text{FeCl}_2$  и перекись водорода и облучали УФ-светом (рис. 2а). Варьирование времени облучения и условий реакции позволило получить линейку сферических наногелей различных размеров (от 38, 75, 87, 121, 132, 168 нм), причем индекс полидисперсности полученных частиц варьировался в пределах 0.2-0.5 [9]. По всей видимости, в описанной системе происходят радикальные реакции с гидроксил-анионами или ионами  $\text{FeO}_2^+$ , образующимися в ходе реакции Фентона [10]. При этом образуются радикалы на атомах углерода этилениминовых звеньев, которые впоследствии рекомбинируют с образованием поперечно-сшитых молекул наногеля, а контроль процесса определяется кинетикой образования (концентрация перекиси водорода, продолжительность облучения) и расходования радикалов (концентрация ПЭИ в растворе).

Еще один пример формирования наногелевых частиц путем перешивки линейных макромолекул в водном растворе заключается в сшивании молекул разветвленного полиэтиленоксида, одни из которых содержали алкиновые, а другие - азидные группы на концах цепи (рис. 2б). Синтез при этом проводился с помощью реакции циклоприсоединения в присутствии комплексов  $\text{Cu}^+$  (click-chemistry) [11]. По данным светорассеяния частицы наногеля имели диаметр 100 нм. Данные системы были использованы для получения покрытий, препятствующих сорбции белков плазмы крови.

Наногелевые частицы в водном растворе формируются также при полимеризации водорастворимого мономера в присутствии белков [12, 13, 14] (рис. 2в) или полисахарида [15] (рис. 2г), которые были предварительно модифицированы большим количеством акрилоильных или метакрилоильных групп. Было показано, что на начальных конверсиях на поверхности макромолекулярного (белкового) сшивателя формировался полимерный гидрогелевый слой или, в случае использования полисахаридов, взаимопроникающая полимерная сетка. Естественно, что, во избежание образования крупных частиц или макроскопического геля, полимеризацию проводят в разбавленных растворах мономеров, причем в некоторых случаях наногели образуются лишь на неглубоких конверсиях. В ряде случаев требуется дополнительное фракционирование продуктов полимеризации с помощью гельпроникающей хроматографии (ГПХ) [12, 13].



**Рис. 2.** Схемы синтеза наногелей путем сшивания полимерных систем в разбавленных водных растворах.

Анализ имеющейся литературы показывает, что описанные выше подходы к получению наногелей позволяют получать достаточно маленькие частицы с относительно узким молекулярно-массовым распределением. Существенным достоинством таких подходов является возможность проведения реакций в водной среде в мягких условиях, обеспечивающих сохранность белковых молекул, включаемых в частицы в процессе синтеза. Однако необходимость фракционирования продуктов по размерам и тщательного подбора условий синтеза для получения частиц с необходимыми свойствами делает эти подходы достаточно трудоемкими.

#### **1.1.1.2 Сшивание в агрегированных полимерных системах**

Целый ряд описанных в литературе подходов к синтезу наногелей основан на проведении химических реакций в агрегированных полимерных системах. В этой ситуации контроль размера получающихся частиц осуществляется не столько за счет кинетики реакций сшивания, сколько обусловлен способностью коллоидных систем к самоорганизации в водных растворах, хорошо описываемой теорией ДЛФО [16]. Известно, что такая самоорганизация часто приводит к образованию узко распределенных по размерам коллоидных систем, в которых неполярные группы экранированы от контакта с водой, а поверхность выстлана гидрофильными группами. Такая самоорганизация дает удобный инструмент для синтеза наногелей за счет введения ковалентных сшивок в области ядра или гидрофильной опушки.

В литературе имеются примеры получения наногелевых частиц за счет формирования интерполимерных комплексов различных типов. Например, анионный природный полисахарид гепарин образует полиэлектролитные комплексы с полиэтиленимином. Гепарин содержит карбоксильные и сульфатные группы. В работе [17] модифицировали карбоксильные группы гепарина с помощью N-гидроксисуцинимидом и карбодиимидом, после чего модифицированный гепарин добавляли к избытку ПЭИ, в результате чего формировался растворимый полиэлектролитный комплекс, в котором поверхность частиц выстлана катионными группами, а электронейтральные солевые пары спрятаны от контакта с водой. При этом часть концевых аминогрупп ПЭИ образовывала амидные связи с

карбокислыми группами гепарина (рис. 3а). Размер частиц наногеля сильно возрастал при добавлении недостаточного или эквивалентного по зарядам количества гепарина, очевидно вследствие образования стехиометрических полиэлектролитных комплексов. При составе комплекса, соответствующего избыточному количеству ПЭИ, получались частицы с размером 40-50 нм и узким распределением (индекс полидисперсности 0.157).

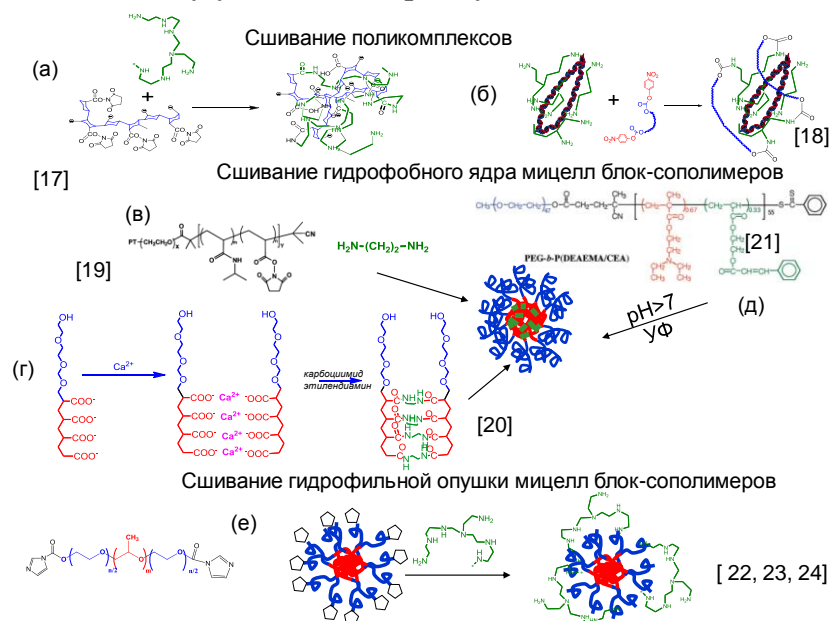
Наногели образуются также при перешивании растворимого полиэлектролитного комплекса ДНК с ПЭИ гидрофильным плуроником F127, гидроксильные группы которого были предварительно активированы п-нитрофенилхлорформиатом [18]. Размер полученного наногеля составлял около 1 мкм, но существенно уменьшался (до 230 нм) при нагревании до 37°C.

Сшивание гидрофобного ядра полимерных мицелл является удобным методом получения узко распределенных по размерам наногелевых частиц. Например, блок-сополимер полиэтиленоксида и статистического сополимера N-изопропилакриламида (NIPAM) и N-гидроксисукцинимидилакрилата, полученный методом ОПЦ-полимеризации, растворяли в воде при температуре выше НКТП (около 37°C для полимера NIPAM) с образованием мицелл, после чего активированные эфирные группы перешивали с помощью этилендиамина (рис. 3б) с образованием чрезвычайно узко распределенных частиц с радиусом около 28 нм. Понижение температуры ниже НКТП приводило к увеличению радиуса до 45 нм вследствие фазового перехода в мицеллярном ядре [19].

Эlegantный способ формирования интерполимерных комплексов с их последующим ковалентным сшиванием был использован в работах Нуковой [20]. В этом случае для формирования интерполимерного комплекса вместо поликатиона использовались двухвалентные ионы  $Ca^{2+}$ , которые прибавляли к блок-сополимеру полиэтиленоксида и полиметакриловой кислоты. В результате образовывались мицеллы, поверхность которых выстлана полиэтиленоксидом, а ядро сформировано полиметакрилатом кальция (рис. 3в). Дальнейшее сшивание карбокислых групп с помощью карбодиимида и этилендиамина с образованием амидных связей приводило

к образованию частиц с размером около 130 нм и исключительно узким распределением по размерам (индекс полидисперсности 0.06), что объясняется высокой степенью кооперативности образования мицелл на основе полиметакрилата кальция.

В работе [21] также использовали метод сшивания ядра полимерной мицеллы, однако в этом случае для образования межмолекулярных связей использовали фотохимические реакции. Для этого методом ОПЦ-полимеризации был синтезирован блок-сополимер ПЭГ-поли(2-(диэтиламино)этилметакрилат-со-циннамоилоксиэтил акрилат). В нейтральной среде диэтиламиноэтилметакрилат депротонируется и теряет растворимость в воде, в результате чего блок-сополимер образует мицеллы, которые далее подвергали действию ультрафиолетового излучения, в результате чего в ядре мицелл образовывались ковалентные связи между разными макромолекулами за счет димеризации остатков коричной кислоты (рис. 3г). В данной работе удалось получить наногели с исключительно маленьким гидродинамическим радиусом около 10 нм при рН 10 (идентичен радиусу несшитых мицелл) и узким молекулярно-массовым распределением. Протонирование диэтиламиноэтилметакрилата в кислой среде приводило к существенному увеличению радиуса частиц до 14 нм.

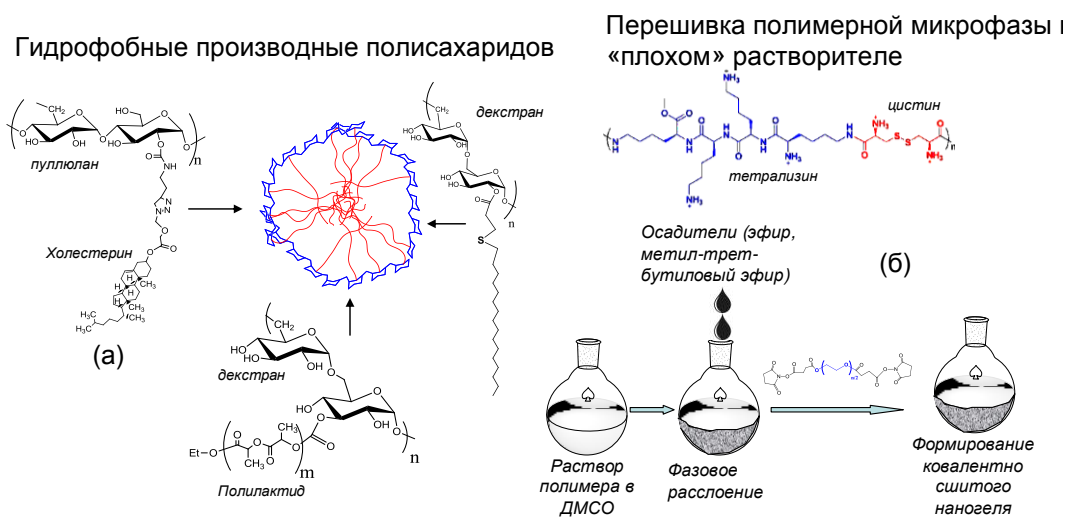


**Рис. 3.** Методы получения наногелей путем ковалентного сшивания поликомплексов или полимерных мицелл.

Фиксация гидрофильной опушки мицелл за счет химического сшивания концов амфифильного сополимера также приводит к образованию наногелевых частиц, однако в этом случае не удастся достичь столь узкого распределения по размерам, как в случае введения сшивок в гидрофобное ядро. Например, концевые гидроксильные группы гидрофильных блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида (плюронигов F127 и P85) при концентрации выше ККМ модифицировали карбонилдиимидазолом, после чего перешивали их с помощью полиэтиленimina. При этом в процессе синтеза образовывались и макроскопические частицы, которые приходилось удалять центрифугированием [22, 23] или гельпроникающей хроматографией [24] (рис. 3д).

Помимо ковалентных связей, трехмерная сетчатая архитектура наногелей может стабилизироваться и нековалентными взаимодействиями. Структуры такого типа были получены на основе полисахаридов, склонных к образованию трехмерной сетки водородных связей в концентрированных растворах. Присоединение к таким полимерам небольшого количества гидрофобных групп может приводить к формированию мицелл с гидрофобным ядром. Однако, в отличие мицелл, обсуждавшихся выше, опушка таких полисахаридных мицелл сильно агрегирована и представляет собой гидрогель, стабилизированный сеткой водородных связей. Например, модификация незначительного количества звеньев декстрана 1-гексадекантиолом [25], пуллолана холестерином [26] или декстрана олигомерами поли-L- и поли-D-молочной кислоты [27] приводила к формированию частиц с размерами 20, 26 и 70 нм соответственно. При этом образующийся наногель содержал гидрофобное ядро и гидрофильную опушку, которая была дополнительно стабилизирована водородными связями (рис. 4а).





**Рис. 4.** Методы получения наногелей, основанные на физическом взаимодействии полимерных макромолекул.

Интересным примером получения наногелей является перешивка полимерных агрегатов, формирующихся при ухудшении качества растворителя. В работе [28] катионные наногели получали, перешивая поли(цистил-тетрализил) или поли(цистил-олигоэтиленимин) бифункциональным N-гидроксисукцинимидным эфиром дисукцинил-ПЭГ. Для этого к раствору полимера в полярном органическом растворителе добавляли небольшие количества осадителей (диэтиловый эфир и метилтретбутиловый эфир) до появления слабой опалесценции, после чего прибавляли сшиватель, модифицирующий аминогруппы полимеров. В результате образовывались частицы со средним гидродинамическим диаметром около 200 нм, причем ни тип, ни длина сшивателя, ни степень сшивки существенно не влияли на конечный размер наногеля. Размер наногеля определялся только размером начальных полимерных агрегатов (рис. 4б).

Таким образом, примеры, рассмотренные в данном разделе, показывают, что методы, основанные на сшивании агрегированных полимерных систем (в том числе мицелл) приводят к получению узко распределенных частиц, размер которых определяется способом формирования полимерных агрегатов. При этом разнообразие предлагаемых методов позволяет получать наногели различной структуры. Тем не менее, недостатком этих подходов является трудность контроля частоты сшивки

наногелей, которая в данных подходах осуществляется, как правило, с помощью реакций, выход которых сильно отличается от 100%.

#### **1.1.1.3 Матричная полимеризация**

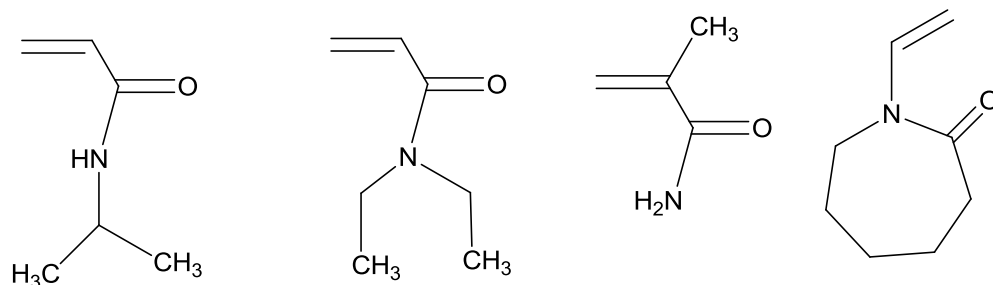
Еще один способ получения наногелей контролируемого размера основан на матричной полимеризации. В этом случае фактором, ограничивающим пространственное распространение полимеризационного процесса, выступает комплексообразование между растущей полимерной цепью и матричным полимером. Таким образом, в этом случае также осуществляется термодинамический контроль пространственного распространения цепного процесса.

Удачным примером использования этого подхода является получение наногеля из поли-(N-винилпирролидона) (ПВП) и полиакриловой кислоты (АК). В данном случае фактором, ограничивающим пространственное распространение полимеризационного процесса, является образование водородных связей между акриловой кислотой и ПВП. В работе [29] полимеризацию акриловой кислоты инициировали  $\gamma$ -излучением  $^{60}\text{Co}$ , регулируя размер частиц изменением дозы облучения, исходными концентрациями и мольным соотношением компонентов. Частицы средних гидродинамических диаметров от 80 до 120 нм (измерено при низком pH), образуются, когда молярные соотношения ПВП/АК составляют от 25/75 и 55/45 соответственно. Поскольку акриловая кислота образует комплексы с поли-(N-винилпирролидоном) только в полностью протонированной форме, такие частицы существуют лишь при pH ниже 5, а в нейтральной среде диссоциируют, что открывает перспективы получения pH-чувствительных носителей для доставки лекарств.

#### **1.1.1.4 Осадительная полимеризация**

Еще одним фактором, ограничивающим пространственное распространение полимеризационного процесса, является зависимость растворимости полимеров от температуры. Известно, что при полимеризации некоторых водорастворимых мономеров образуются полимеры, ограниченно растворяющиеся в воде при повышенной температуре, т.е. характеризующиеся нижней критической температурой растворения (НКТР). Это вызвано тем, что энтропия смешения с водой

низкомолекулярного и высокомолекулярного соединения сильно различаются. Вследствие этого, растворимость в воде соединений, содержащих, помимо гидрофильных групп, неполярные фрагменты, существенно снижается с ростом степени полимеризации. Такими свойствами обладают гидрофобные акриламиды (N,N-диэтил- и N-изопропилакриламид), N-метил-метакриламид, N-винилкапролактан (рис. 5) [30].



**Рис. 5.** Структура некоторых мономеров, используемых для получения наногелей методом осадительной полимеризации.

При некоторой критической степени полимеризации растущая макромолекула, состоящая из таких мономеров, претерпевает коллапс, образуя маленькие частицы, размер которых определяется, в основном, природой мономеров, температурой и концентрацией. Далее эти частицы продолжают расти за счет присоединения новых молекул мономера, макрорадикалов или за счет агрегации. Такие частицы, как правило, стабилизированы в растворе заряженными фрагментами инициатора (например, сульфатными группами при использовании персульфата в качестве инициатора). Даже на финальной стадии роста частицы наногеля содержат существенное количество воды в гидрофобном ядре. Содержание воды в таких наногелях отличает их от латексных частиц, получаемых эмульсионной полимеризацией водонерастворимых мономеров (стирола, метилметакрилата, бутилакрилата и т.п.).

После окончания процесса полимеризации и охлаждения смеси до температуры ниже НКТР частицы наногеля набухают и приобретают «мягкую» морфологию. В этих условиях наногели гидратируются, в результате чего их объем резко возрастает.

Поэтому все наногели, относящиеся к этому типу синтеза являются термочувствительными.

Осадительную полимеризацию широко применяют для синтеза термочувствительных наногелей поли-N-изопропилакриламида (PNIPAM). Например, в работе [31] водный раствор N-изопропилакриламида и N,N'-метиленбисакриламида (МБА) полимеризовали при 70°C в присутствии водорастворимого инициатора азобис(амидопропан)дигидрохлорида. В результате образовывались крупные частицы с размером порядка 7 мкм. Эффект температурно-зависимого коллапса полимерной цепи сохраняется, если в мономерную смесь вводить небольшие количества водорастворимых мономеров. Например, термо- и pH-чувствительные наногели получали, добавляя к смеси PNIPAM и МБА 5% акриловой кислоты. В результате образовывались частицы на порядок меньшего размера (менее 700 нм) [32]. Размер этих наногелей уменьшался вдвое при повышении температуры выше НКТР. Включение сомономера, содержащего кислотную группу, приводило к тому, что их гидродинамический диаметр увеличивался с повышением pH.

Для создания термочувствительных материалов было предложено использовать наногели NIPAM, бутилметакрилата и МБА, полученные в водной суспензии наноскопических нитей бактериальной целлюлозы. В процессе полимеризации наногели сорбировались на нитях целлюлозы, образуя длинные тяжи, покрытые плотной оболочкой из полимерных шариков (наногелей) [33]. При повышении температуры от 25°C до 32°C эффективный гидродинамический диаметр полученных наногелей падал от 450 нм до 150 нм. Полученный наноструктурированный материал претерпевал переход из геля в золь при изменении температуры всего на 7°C (от 25 до 32°C). Полученный материал обладал очень низкой цитотоксичностью, поэтому было предложено использовать его в биотехнологии для культивирования эукариотических клеток.

Для получения малых частиц наногеля растущие полимерные цепи должны быть эффективно стабилизированы в самом начале полимеризационного процесса. Стабилизация за счет ионных остатков инициатора, присоединенных к полимерным

цепям, недостаточна для экранирования всей площади поверхности малых частиц наногеля. Для минимизации роста полимерных цепей за счет агрегации и уменьшения поверхностного натяжения на поверхности частицы предлагается проводить полимеризацию в присутствии ПАВ. Как показали Пелтон с соавт., размер поли-N-изопропилакриламидных наногелей уменьшается на порядок при использовании додецилсульфата натрия в полимерной системе [34]. При использовании додецилсульфата натрия в качестве стабилизатора в работе [35] были получены термочувствительные гелевые частицы поли-(N,N-диэтилакриламида) размером около 800 нм. Было показано, что размер частиц уменьшается при увеличении скорости перемешивания реакционной смеси. Таким образом, используя ПАВ и варьируя природу сомономеров возможно контролировать размер наногелей, а также распределение частиц по размерам.

Таким образом, несмотря на все преимущества (простота исполнения, возможность получения термо- и рН-чувствительных полимеров), осадительная полимеризация также имеет и ряд ограничений. Во-первых, образующиеся частицы, как правило, достаточно велики по размеру (от 500 нм до нескольких микрон), а регуляция размеров с помощью ПАВ не всегда может применяться для получения биосовместимых полимерных носителей. Во-вторых, осадительная полимеризация термочувствительных полимеров требует проведения реакции при повышенной температуре. В этих условиях большинство биологических макромолекул претерпевает денатурацию, поэтому данный подход малопригоден для получения наночастиц, содержащих белок.

#### **1.1.1.5 Эмульсионная полимеризация**

Эмульсионная или микроэмульсионная полимеризация является давно известным методом получения полимерных частиц контролируемых размеров [36]. Данный подход нашел широкое применение в синтезе наногелей, причем были использованы как эмульсии типа «масло/вода» (прямые эмульсии), так и «вода/масло» (обращенные эмульсии). Эмульсионная полимеризация может быть инициирована как из водной,

так и из органической фазы. Как правило, для получения эмульсий используются ПАВ.

Метод, основанный на эмульсиях «масло в воде», был использован для получения гидрофильных катионных наногелевых частиц. Для этого дихлорметановый раствор полиэтиленгликоля или плуроника P85, модифицированного по обоим гидроксилам N,N'-карбонилдиимидазолом, эмульгировали в водном растворе разветвленного полиэтиленimina и обрабатывали ультразвуком для получения однородной эмульсии (рис. 6а). По мере испарения дихлорметана аминогруппы ПЭИ реагировали с концевыми карбонилимидазольными остатками. Размер полученных частиц (300-100 нм) контролировался поверхностно-активными свойствами использованных полимеров и длительностью обработки ультразвуком [37]. Вследствие низкой стабильности уретановых связей по отношению к нуклеофильной атаке, в том числе первичными аминогруппами ПЭИ, сетчатая структура таких наногелей полностью разрушается после нескольких дней инкубации в физиологических условиях.

Значительно чаще для получения гидрофильных наногелей используются эмульсии или микроэмульсии типа «вода/масло» (обращенные эмульсии). Это связано с тем, что капли раствора гидрофильных мономеров в воде, эмульгированные в органическом растворителе, могут служить микрореакторами, предотвращающими агрегацию и ковалентное сшивание цепей, растущих в разных частицах. Поэтому использование эмульсионных подходов представляет большой интерес для синтеза наногелей с узким молекулярно-массовым распределением.

Эмульсионная полимеризация в обращенных эмульсиях была успешно использована для получения слабосшитых (степень сшивки  $10^{-4}\%$  (мол.)) термочувствительных наногелей на основе поли-N-изопропилакриламида (рис. 6б). Для этого водный раствор мономера и сшивателя МБА эмульгировали в смеси тяжелых углеводородов (Isopar M, смесь додеканов, тридеканов и тетрадеканов) с помощью ПАВ SPAN 80 (моноолеат сорбита) и инициировали полимеризацию добавлением персульфата аммония и тетраметилэтилендиамина [38]. Радиус полученных наногелей составлял 220-240 нм.

Наногели, полученные полимеризацией гидрофильного акриламида в системе обращенных мицелл из диизооктилсульфосукцината натрия (АОТ) в гексане, были использованы для доставки двухфотонного фотосенсибилизатора 5,10,15,20-тетракис(1-метил-4-пиридилио) порфирина, который включали в состав наногелей в процессе синтеза [39]. Данные частицы имели сравнительно малый гидродинамический радиус 20-30 нм и, в отсутствие облучения, обладали очень низкой цитотоксичностью (рис. 6в). Чрезвычайно малые по размеру частицы (2-3 нм) полиакриламидных наногелей были приготовлены прямым эмульгированием акриламида и N,N-метиленабисакриламида в той же системе обращенных мицелл гексан/АОТ [40]. В присутствии воды в этой системе размер частиц увеличился до 20 нм [27].

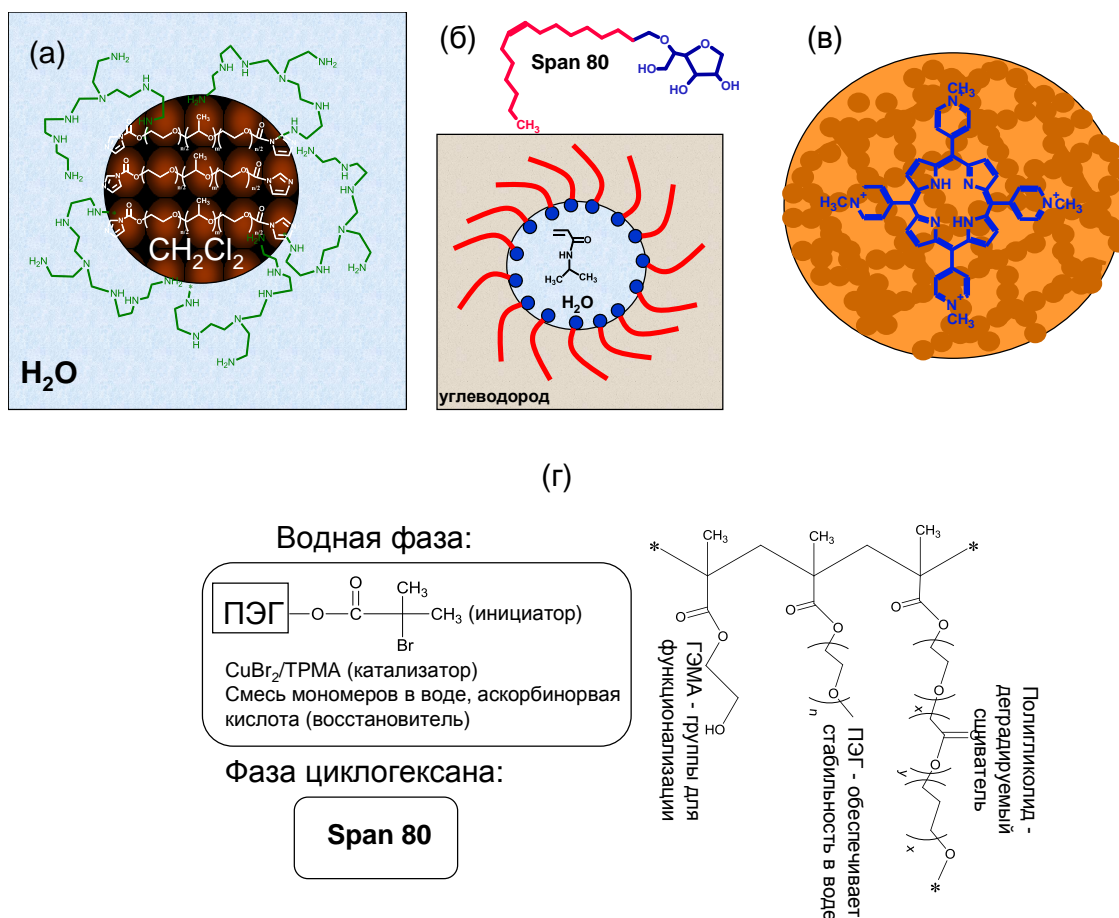


Рис. 6. Примеры получения наногелей методом эмульсионной полимеризации

Подход, основанный на применении обратных микроэмульсий, применяли также для получения катионных наногелей. В работе [41] для получения наногелей на основе 2-диэтиламиноэтилметакрилата (ДЭАЭМА) и этиленгликоль-диметакрилата в качестве стабилизатора эмульсии использовали ПЭГ, содержащий винилбензильную группу с одного конца и карбоксильную группу с другого. Полученные наногели имели размер около 60 нм при нейтральном рН и претерпевали резкое увеличение объема до 140 нм при изменении рН до 6. По данным измерения  $\zeta$ -потенциала, цепи ПЭГ, локализованные на периферии наногеля, эффективно экранируют положительный заряд катионного ядра.

Подробное исследование влияния степени сшивки на размер катионных наногелей было проведено на примере частиц, полученных сополимеризацией 2-гидроксиэтилметакрилата и 2-акрилоксиэтилтриметиламмоний хлорида в присутствии олигоэтиленгликоль диакрилата в качестве сшивателя. Полимеризацию проводили в обращенных мицеллах ПАВ Laureth-3 (триэтоксиглицированный додеканол) в гексане. Авторы обнаружили, что при увеличении мольной доли сшивателя от 3 до 50% радиус частиц, измеренный в водном растворе, уменьшался от 200 до 40 нм [42]. Можно полагать, что уменьшение размера частиц при увеличении количества сшивателя обусловлено ограниченным набуханием сильно сшитых наногелевых частиц в водном растворе. При этом в работе отсутствуют данные о полидисперсности образцов, полученных в результате полимеризации катионных мономеров в обращенных мицеллах. Между тем, этот параметр важен для понимания процессов, происходящих в ходе эмульсионной полимеризации. В нашей работе мы более детально остановимся на этом вопросе.

Дополнительные преимущества для получения наногелей, характеризующихся узким молекулярно-массовым распределением, дает псевдоживая радикальная полимеризация, проводимая в микроэмульсионной системе. Так, в работах Матиашевского были синтезированы биodeградируемые незаряженные наногели, состоящие из цепей полиэтиленоксида, соединенных дисульфидными мостиками [43, 44]. При этом в качестве макроинициатора использовали



полиэтиленгликольбромизобутират, в качестве мономера олигоэтиленгликольметилметакрилат (ОЭМА), а в качестве сшивателя - дитиопропионил поли(этиленгликоль) диметакрилат (рис. 6г). Полимеризацию проводили по схеме AGET ATRP, причем в качестве комплексообразователя для ионов двухвалентной меди использовали трис[(2-пиридил)метил]амин (TPMA), а в качестве восстановителя - аскорбиновую кислоту. Для проведения полимеризации смесь мономеров, катализатора и инициатора в водном растворе солюбилизировали в растворе Span 80 (моноолеат сорбита) в циклогексане и подвергали действию ультразвука. Было показано, что сходный по структуре ПАВ Span 85, содержащий 3 остатка олеиновой кислоты, не давал возможности получить стабильную миниэмульсию. Полученные в результате реакции наногели имели радиус около 260 нм с относительно широким распределением по размерам. По сравнению с наногелями, полученными простой радикальной полимеризацией в микроэмульсии, наногели, полученные ATRP, сильнее набухают в растворителях (в среднем в 1,6 раза), что можно объяснить более равномерным распределением молекул сшивателя в частице наногеля.

Полимеризация в обращенных миниэмульсиях Span 80 в циклогексане также была использована для синтеза катионных наногелей на основе 2-метакрилоил-оксиэтилтриметиламмоний хлорида [45] и биodeградируемых наногелей на основе сетчатого сополимера полиэтиленоксид-метакрилата и поли-(2-гидроксиэтилметакрилата) и биоразлагаемого сшивателя полигликолид-диметакрилата (рис. 6г) [46]. Средний гидродинамический диаметр полученных наногелей составлял около 200 нм, причем отклонения размера от среднего значения не превышали 50% [46].

Таким образом, свободнорадикальная полимеризация в обращенных эмульсиях дает возможность получать наногели самой различной структуры из любых виниловых водорастворимых мономеров и сшивающих агентов. Как видно из приведенных литературных данных, размер частиц наногелей, получаемых данным методом, сильно зависит от коллоидных свойств ПАВ, используемых для

стабилизации системы. Оказывается, что наиболее эффективны ПАВ, характеризующиеся гидрофильно-липофильным балансом около 4 [40, 41], т.е. имеющие низкую растворимость в воде и хорошо растворяющиеся в органической фазе. Такие ПАВ склонны образовывать поверхности с отрицательной кривизной, что и является причиной спонтанного или под воздействием ультразвука формирования высокодисперсной фазы. При этом именно полимеризация в обращенных мицеллах (т.е. спонтанно образующихся системах с размером менее 100 нм), как правило, дает наилучший способ контроля размеров получаемых частиц, поэтому в настоящей работе мы остановимся именно на этом подходе к синтезу наногелей.

Стабилизация коллоидной системы, достигаемая за счет использования ПАВ, позволяет регулировать размер получаемых частиц, причем в качестве ПАВ может выступать как сомономер, например, винилбензил-полиэтиленоксид, использованный в работе [42], так и неполимеризующийся ПАВ [38, 39, 40, 41, 43, 46, 47,]. В последнем случае необходимо тщательно отделяться от ПАВ, который может влиять не только на коллоидные свойства наногеля, но и существенно влиять на его токсичность и поведение в биологических системах. К сожалению, в большинстве работ данный вопрос практически не затрагивается. В настоящей работе степень очистки наногелей от следов ПАВ будет контролироваться с помощью Фурье-ИК спектроскопии.

---

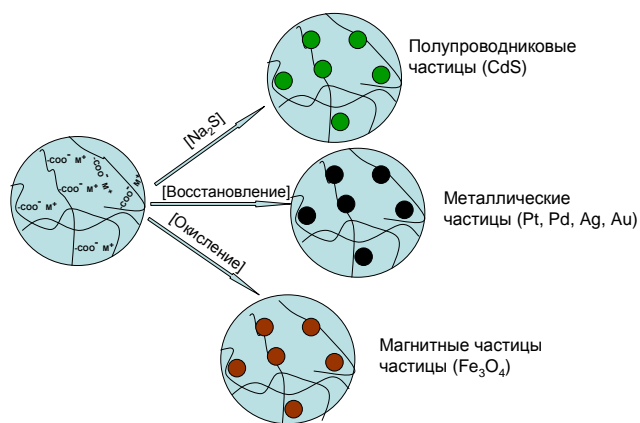
Итак, в литературе описаны пять групп методов получения наногелей. Для получения наногелей малого размера (диаметр до 150 нм), необходимых для доставки биологических агентов внутрь клетки наиболее подходящим способом является обратная микроэмульсионная полимеризация, поскольку с помощью этого метода можно получать частицы небольшого размера, оптимального для их взаимодействия с клетками, и при этом характеризующиеся относительно узким распределением по размерам. Еще одним важным преимуществом данного подхода является возможность варьирования степени сшивки наногелей путем изменения мольной доли сшивателя.

### 1.2.1 Применение наногелей

Создание наногелей с самого начала было мотивировано решением практических задач быстро развивающихся и вновь возникающих технологических направлений. Наногели могут быть использованы в любых устройствах, где требуется пространственная организация компонентов сложных систем на молекулярном уровне. Спектр областей, в которых наногели могут найти свое применение, чрезвычайно широк: оптимизация работы металлических катализаторов, аналитические и биоаналитические задачи, фоточувствительные системы, системы доставки лекарств и др. Не претендуя на полноту, мы в данном разделе остановимся на некоторых наиболее важных областях применения наногелей.

#### 1.2.1.1 Полимерные системы, содержащие неорганические частицы, для создания молекулярных устройств и катализаторов

Возможность пространственной организации компонентов сложных систем делает наногели удобной платформой для получения различных молекулярных устройств. Анионные наногели, получаемые из N-изопропилакриламида и акриловой кислоты, были использованы для получения полупроводниковых, металлических и магнитных наночастиц (рис. 7) [48].

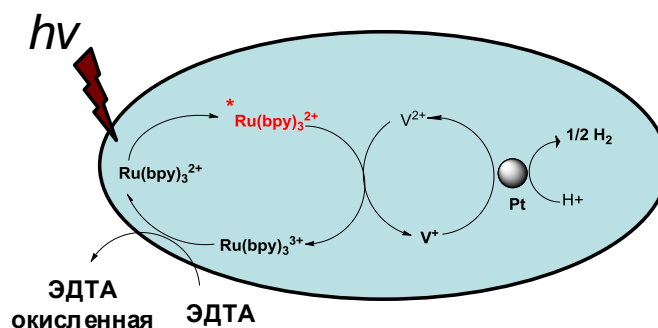


**Рис. 7.** Наногели как носители неорганических наночастиц

Наногели могут также быть использованы как носители металлических катализаторов с контролируемой каталитической активностью. Металлические наночастицы, стабилизированные наногелями, могут рассматриваться, как квази-гомогенные катализаторы, объединяющие преимущества гомогенных и гетерогенных

катализаторов: высокую активность и возможность повторного использования [49, 50].

Наногели, содержащие металлические наночастицы, были использованы для создания системы генерации кислорода под действием света, основанной на сборке в одной наногелевой частице фотосенсибилизатора (комплекс рутения с бипиридилом  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ), платиновых наночастиц и электронного переносчика метилвиологена (рис. 8).



**Рис. 8.** Схема функционирования водород-генерирующей системы на основе наночастиц металлической платины, включенных в наногелевые частицы.

Под действием света двухвалентный рутений переходит в возбужденное состояние, которое может быть окислено метилвиологеном  $\text{V}^{2+}$ . Восстановленный катион-радикал метилвиологена ( $\text{V}^+$ ) после этого способен передать электрон платине, которая катализирует восстановление протонов воды до атомов водорода. После этого окисленная форма рутениевого фотосенсибилизатора регенерируется за счет окисления растворенной в воде ЭДТА [51].

Включение наночастиц в полимерные наногели может использоваться для получения фотонных кристаллов, которые необходимы для создания новых устройств передачи и записи информации, низкопороговых и беспороговых лазеров, и позволяют добиться сверхвысокого разрешения оптических приборов. [49, 52, 53].

Наконец, магнитные наногели находят применение для адресной доставки лекарств и в качестве контрастирующих веществ при магнито-резонансной томографии (МРТ). На этих применениях наногелей мы остановимся ниже.

### 1.2.1.2 Носители для биокатализаторов

В еще большей степени, чем при конструировании катализаторов на основе неорганических наночастиц, наногели востребованы при разработке биокаталитических систем, используемых как в промышленности, например, в тонком органическом синтезе, так и в фармакологии при создании лекарственных форм [54]. Имобилизация ферментов в частицах наногелей позволяет повысить термостабильность, стабильность при хранении, стабильность по отношению к органическим растворителям, способствует быстрой и эффективной регенерации биокатализатора [55].

Поскольку важнейшим требованием к полимерной матрице, пригодной для иммобилизации ферментов, является ее инертность по отношению к белковой структуре, чаще всего для иммобилизации белков используются наногели из акриламида. На примере пероксидазы хрена [12], используемой в иммуноферментном анализе, и бычьей карбоангидразы [13] показано, что включение ферментов в наногели резко увеличивает их стабильность при хранении и термостабильность.

Влияние наногеля на стабильность ферментов по отношению к действию органических растворителей иллюстрируется полиакриламидными наногелями, в которые включали липазы сополимеризационным методом [14]. Данный препарат был способен растворяться в безводном ДМСО и, в отсутствие воды, катализировать реакцию синтеза сложных эфиров. По всей видимости, вода, связываемая гидрофильным полимером, защищает фермент от денатурации диметилсульфоксидом и позволяет липазе проявлять свою каталитическую активность. При этом этерификация, катализируемая липазой в органической фазе, региоселективна по отношению к гидроксильным группам сахаров, что невозможно достичь, используя синтетические катализаторы.

Итак, включение ферментов в наногелевые частицы является удобным приемом, позволяющим улучшить практические свойства ферментативных препаратов, используемых в биотехнологии.

### 1.2.1.3 Инженерия тканей

Еще одной важной областью применения наногелей является инженерия тканей, т.е. создание искусственных заменителей тканевого матрикса, на которые могут прикрепляться и клетки организма-хозяина [56]. В этом направлении особое значение имеют наногели из полисахаридов, поскольку такие материалы характеризуются идеальной тканевой совместимостью и могут служить субстратами для прикрепления клеток. Например, для целей тканевой инженерии был предложен материал, представляющий собой биосовместимый и биоразлагаемый иерархический гель. Для получения такого было предложено использовать липосомы, покрытые частицами наногелей холестеринового производного пуллулана, содержащего, помимо остатков холестерина, акрилоильные группы. Далее, концентрированную суспензию таких липосом смешивали с разветвленным ПЭГ, содержащим на конце тиольные группы. В результате реакции Михаэля акрилоильные группы алкилировали тиольные остатки, в результате чего происходило формирование геля. Было показано, что в присутствии плазмы крови этот гель постепенно растворялся, высвобождая липосомы. Этот материал может быть использован для регенерации тканей и контролируемой доставки лекарств [57].

Перспективным направлением регенеративной фармакологии является разработка наногелей на основе гиалуроновой кислоты. В работе [58] наногели, состоящие из метакрилоил-ПЭГ, 2-гидроксиэтилметакрилата и диметакрилоилированного трехблочного полигликолид-содержащего сополимера, полученные методом обратной эмульсионной полимеризации, также акрилоилировали по гидроксильным группам гидроксиэтилметакрилата и перешивали тиолированной гиалуроновой кислотой. В результате получали гелеобразный материал, который авторы предложили использовать для регенерации голосовых связок.

Наногелевые частицы, содержащие гидрофобное ядро и анионную опушку, состоящие из этилакрилата, метакриловой кислоты, бутандиолдиакрилата [59], а также из метилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата [60], изучали на предмет возможности регенерации истонченных межпозвонковых дисков. Оказалось, что

межпозвонковые диски, в которые вводили наногелевую дисперсию, обладали механическими свойствами, сравнимыми со свойствами неповрежденных дисков.

Таким образом, приведенные примеры показывают, что наногели позволяют создавать широкий спектр материалов, пригодных к использованию в тканевой инженерии, причем их потенциал в данной области медицины еще далеко не исчерпан.

#### **1.2.1.4 Применение наногелей для доставки лекарств**

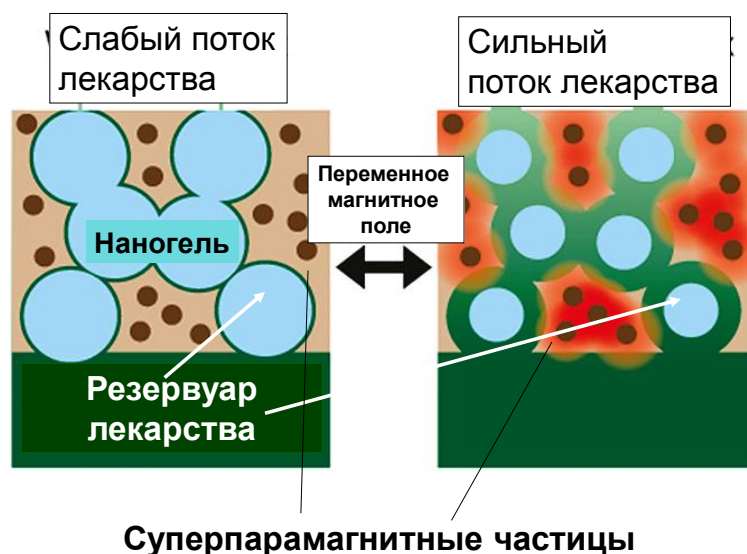
Наногели являются полимерными конструкциями, отвечающими всем требованиям к идеальному полимерному носителю для доставки лекарств: они полностью гидратированы и поэтому стабильны в водном растворе (нет риска агрегации, приводящей к закупорке сосудов и эмболии), они могут быть наполнены лекарством, степень сшивки наногелей может быть варьирована в широких пределах, давая простор для варьирования механических свойств и набухаемости частиц. Частицы наногелей возможно сконструировать таким образом, чтобы они могли нековалентно связывать биологически активные молекулы или лекарства за счет солевых, водородных или гидрофобных взаимодействий. Размер частиц наногелей, эффект экранирования и биodeградируемость являются важными аспектами для этих целей.

#### **1.2.1.5 Температурно-чувствительные наногели**

Использование температурно-чувствительных наногелей открывает широкие перспективы создания регулируемых молекулярных устройств для доставки лекарств. Например, наногели из поли-(N-изопропиламида) было предложено использовать для создания клапанов для контролируемого высвобождения лекарств. Для этого была создана микроячейка, в которой выход из резервуара, содержащего раствор лекарства, перекрывался мембраной, которую получали, высушивая этанольный раствор наногеля на основе NIPAM, суперпарамагнитных частиц  $Fe_3O_4$ , и этилцеллюлозы. В переменном магнитном поле суперпарамагнитные частицы разогреваются, вследствие чего наногели NIPAM коллапсируют, в результате чего в мембране появляются поры,

проницаемые для воды (рис.9). Если же поле не подается, наногели охлаждаются, набухают, и поры закрываются [32].

Еще одна система, позволяющая добиться контролируемого высвобождения лекарства при изменении температуры, основана на нановолокнах целлюлозы, покрытых частицами наногеля на основе NIPAM. При температуре ниже фазового перехода данная система представляет собой гель, однако при повышении температуры немного выше физиологической (38°C) наногели коллапсируют, в результате чего происходит переход геля в золь. При этом лекарственный препарат, включенный в гель, может высвобождаться [32].



**Рис. 9.** Схема работы переключаемого клапана, использующего температурно-чувствительные наногели из поли-(N-изопропилакриламида).

Авторам работы [47] удалось сконструировать внутриклеточный термометр путем включения в наногель из N-изопропилакриламида флуоресцентного красителя, (N-(2-(7-N,N-(диметиламиносульфонил-2,3-бендоксадиазол-4-ил)метиламино)этил-метилакриламида), эмиссия которого сильно уменьшается в водной среде. Сетчатая структура вокруг флуорофора позволяет избегать тушения флуоресценции из-за взаимодействия флуорофора с клеточными компонентами. При низкой температуре, когда наногель насыщен водой, флуоресценция данного флуорофора затухает. При



повышении температуры в узком интервале (от 29° до 35°C) флуоресценция возрастает в 5 раз из-за исключения воды из внутреннего пространства наногеля. В результате удалось выявить в клетке области с повышенной температурой (предположительно митохондрии).

Рассмотренные примеры, не претендуя на полноту, показывают, что зависимость свойств наногелей от температуры является важным аспектом, позволяющим использовать такие структуры для создания молекулярных устройств, которые могут найти свое применение в контролируемой доставке лекарственных препаратов.

#### **1.2.1.6 pH-чувствительные наногели для доставки лекарств**

Известно, что внутриклеточные везикулы, в которые в первую очередь попадают соединения, проникающие в клетку по эндоцитозному пути, имеют pH около 5. Пониженное значение pH (около 5.5-6) характерно также для межклеточной среды в опухолевых тканях, что обусловлено быстрым метаболизмом в трансформированных клетках и существенным вкладом гликолитического пути синтеза АТФ. Поэтому pH-чувствительность и биodeградируемость наногелей может быть инструментом для контролируемого высвобождения молекулы доставляемого биологического агента в целевых, в том числе раковых клетках. Ниже мы рассмотрим несколько примеров, использующих этот фактор для контролируемого высвобождения лекарств.

Например, привитой сополимер полиэтиленоксида и  $\gamma$ -глутаминовой кислоты, гидрофобизованной за счет модификации дистеарином, формировал везикулы, мембрану которых затем стабилизировали адсорбцией хитозана, который образовывал амидные связи с карбоксильными группами N-гидроксисукцинимидного эфира глутаминовой кислоты. Такие везикулы в процессе приготовления можно нагрузить доксорубицином за счет образования электростатических связей между аминогруппой лекарства и карбоксильными группами полиглутаминовой кислоты. При уменьшении pH от 7 до 4.8 эти связи разрушаются вследствие протонирования карбоксильных групп полиглутамата, причем одновременно частично разрываются и ионные связи между хитозаном и глутаматом, формирующие мембрану везикул. Поскольку хитозан в этих условиях протонируется, то мембрана контейнеров не может уже удерживать

доксорубицин, который вследствие этого вытекает из контейнера. Авторам удалось показать, что цитотоксичность доксорубицина, включенного в такие конструкции не снижается, что, по всей видимости, объясняется высокой эффективностью рН-индуцированного высвобождения лекарства в раковых клетках [6].

Для придания рН-чувствительности часто используются развязки или сшиватели, которые расщепляются в слабокислой среде эндосом. Например, в состав наногеля на основе N-винилформамида включали лизоцим, используя в качестве сшивателя 2-бис[2,2'-ди(N-винилформамид)этокси]пропан, содержащий кислото-лабильную ортоэфирную группу. При низких значениях рН сшиватель расщепляется, что вызывает растворение геля и высвобождение фермента [61].

Также в качестве вектора для доставки белков в работе [26] использовали пуллулан, модифицированный холестерином через кислото-лабильную развязку, содержащую группу простого винилового эфира. При кислом рН связи между холестерином и пуллуланом гидролизуются, в результате гель растворяется и высвобождает содержимое во внешний раствор.

В работе [29] рН-чувствительные наногели, полученные матричной полимеризацией акриловой кислоты на поливинилпирролидоне, применяли в качестве носителей пилокарпина для повышения его химической стабильности, эффективности и биодоступности.

Приведенные примеры показывают, что рН-чувствительность наногелей является важным инструментом контролируемой доставки лекарств к целевым клеткам. В то же время в литературе практически отсутствуют данные о роли сетчатой структуры наногелей для рН-зависимого лизиса эндосом и лизосом. Этому вопросу будет уделено внимание в настоящей работе.

#### **1.2.1.7 Использование наногелей для доставки нуклеиновых кислот**

Одним из наиболее важных применений наногелей является их использование для транспорта в клетки нуклеиновых кислот. Этот вопрос был предметом многих обзоров [2, 62], в которых отражены основные направления исследований в этой области. Поскольку рассмотрение закономерностей влияния катионных наногелей на

транспорт нуклеиновых кислот требуют введения целого ряда понятий, связанных со структурой полиэлектролитных комплексов и особенностей транспорта ДНК в клетки, мы вернемся к этому вопросу ниже.

В то же время, важнейший аспект, связанный с ограниченной доступностью аминогрупп наногелей для полианионов, практически не отражен в этих работах. Поэтому мы рассмотрим этот вопрос подробно в следующем разделе, после того как обсудим основные закономерности транспорта нуклеиновых кислот в клетку и барьеры, препятствующие доставке генетического материала.

## **1.2 Проблема трансфекции эукариотических клеток и ее решение с помощью поликатионов**

### ***1.2.1 Механизмы доставки нуклеиновых кислот в клетки***

Концепция генной терапии существует уже на протяжении последних двух десятилетий. Она заключается в том, что для лечения различных заболеваний необходимо исправлять саму их причину, заключающуюся в геноме пациента. Мишенью генной терапии могут быть наследственные, вирусные, аутоиммунные или онкологические заболевания [63]. Для реализации этой концепции необходимо доставлять нуклеиновые кислоты, способные редактировать поврежденные гены. Основным фактором, ограничивающим распространение этого подхода, является низкая эффективность проникновения нуклеиновых кислот в клетки, поэтому большие усилия прикладываются к созданию эффективных носителей, помогающих проникновению нуклеиновых кислот в клетки пациента [64, 65].

На начальных этапах развития генно-терапевтических подходов, исследования были сфокусированы на использовании непатогенных вирусов, таких как некоторые аденовирусы, которые очень эффективно доставляют ДНК и РНК в многочисленные линии клеток. Однако, фундаментальные проблемы, связанные с иммуногенностью и высокой вероятностью мутаций с образованием высокопатогенных вирусов, заставляют искать невирусные носители для доставки экзогенной ДНК в целевую ткань.

Многие невирусные носители, такие как катионные полимеры, липиды и пептиды, способны компактизовать и связывать ДНК. Однако, в отличие от вирусных аналогов, у которых развиты способы преодолевать клеточные барьеры и механизмы иммунного ответа в организме, невирусные носители ДНК показывают гораздо меньшую трансфецирующую способность, так как они задерживаются многочисленными вне- и внутриклеточными защитными барьерами. Однако глубокое исследование путей внутриклеточного транспорта нуклеиновых кислот, попадающих в клетку из внешней среды, позволило выявить некоторые особенности строения поликатионов, повышающие их способность доставлять ДНК в живые клетки. Ниже мы рассмотрим основные этапы внутриклеточного транспорта ДНК (рис. 10).

Первым барьером, который необходимо преодолеть комплексу ДНК с катионным носителем (полиплексу) на пути до клетки-мишени, является кровь и внеклеточная среда. Именно поэтому необходимо подобрать такие физико-химические параметры комплекса, чтобы увеличить его стабильность, избежать неспецифических взаимодействий и возможности иммунного ответа. Во-первых, в составе полиплекса ДНК должна быть защищена от действия внеклеточных нуклеаз [66]. Во-вторых, отрицательно заряженные белки сыворотки крови (альбумин, фибриноген, иммуноглобулины и др.) способны адсорбироваться на поверхности заряженных полиплексов, что ведет за собой изменение поверхностного заряда полиплексов, приводит к их агрегации и последующему выведению [67].

Следующим этапом доставки генетического материала в клетки-мишени является их взаимодействие с плазматической мембраной и поглощение клеткой. Связывание полиплексов с клетками происходит в результате электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной (за счет отрицательно заряженных поверхностных мембранных белков - протеогликанов) плазматической мембраной. В большинстве случаев такие полиплексы поглощаются путём неспецифического эндоцитоза. Для эффективного проникновения через плазматическую мембрану клетки оптимальным значением размера комплекса ДНК-поликатион является 100-150 нм [64].

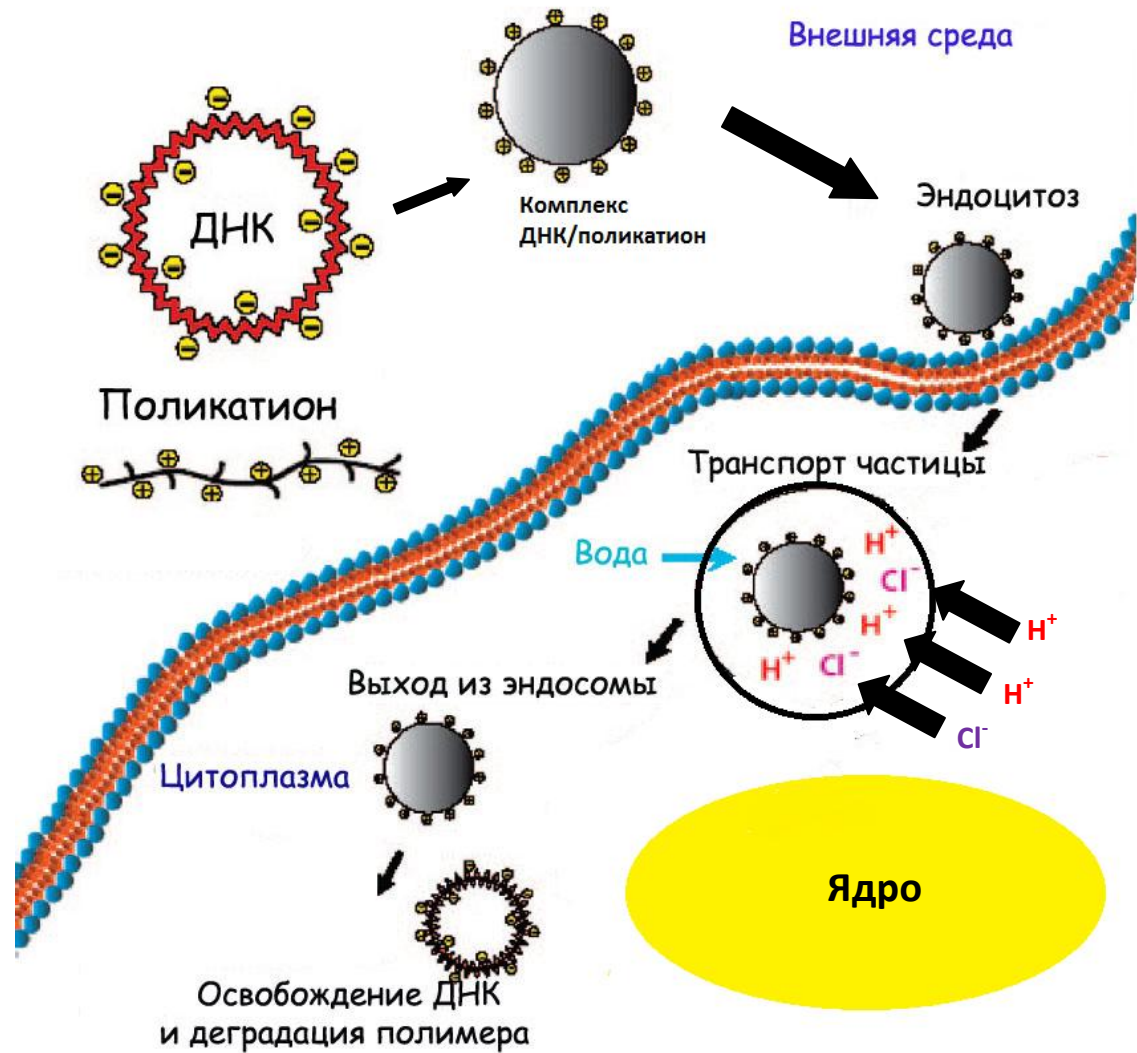
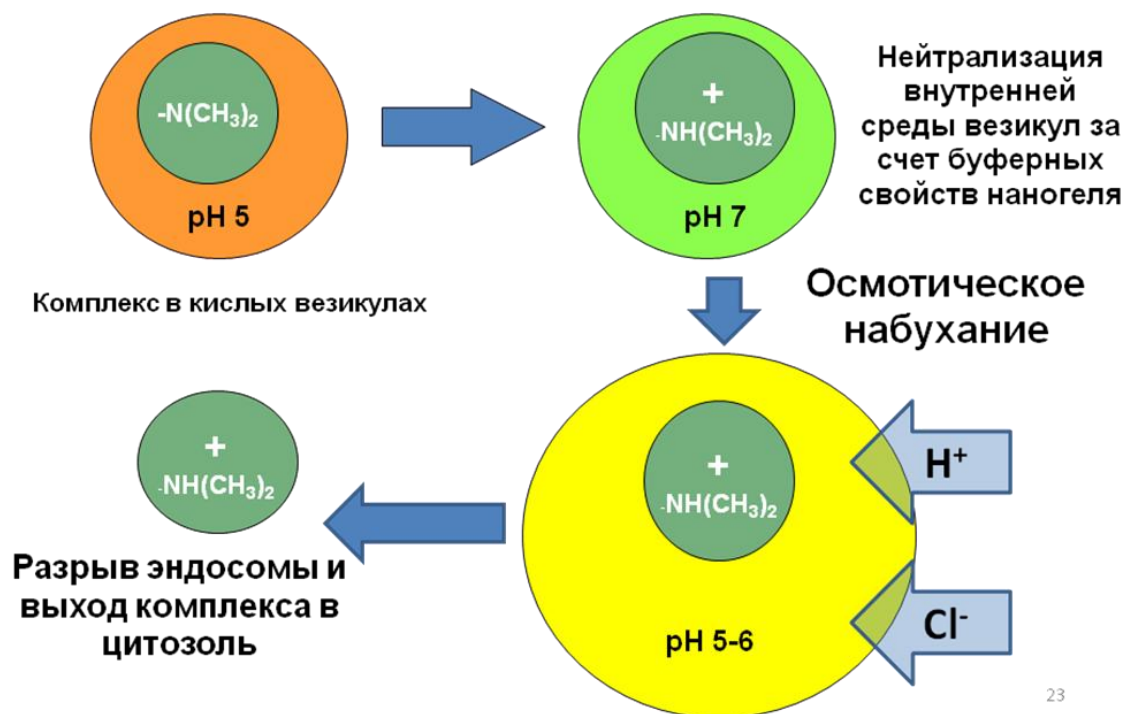


Рис. 10. Процесс транспорта ДНК в клетку.

Одним из самых важных этапов транспортного пути полиплексов является их выход из эндосом [68]. Эндосомы представляют собой везикулы с белково-липидной мембраной, функция которых состоит в транспорте белков в определенные части клетки. За счёт работы протонных насосов рН внутренней среды поддерживается на уровне около 6.5. Дальнейший транспорт может идти либо по пути рециркуляции с выбросом поглощённых молекул во внеклеточное пространство, либо по литическому пути, когда происходит дальнейшее закисление среды в поздних эндосомах, и макромолекулы поступают в лизосомы. В лизосомах содержимое

закидается до рН 5, и поглощенные молекулы деградируют под действием гидролитических ферментов, которые проявляют свою активность при низком рН. Продукты деградации удаляются из клетки путём экзоцитоза или переносятся в цитоплазму, где используются как строительный материал [64].

Один из способов преодоления эндосомального барьера был впервые продемонстрирован в конце 90-х [69]. Было показано, что некоторые полимеры, содержащие аминогруппы с  $pK_a$  5-6, способны разрушать эндосомы по механизму, названному «эффектом протонной губки» (рис. 11). Попав в кислые эндосомы, такие полимеры повышают рН внутри эндосом, способствуя нагнетанию избыточного количества протонов и противоионов (обычно  $Cl^-$ -анионов). Прямым измерением содержания хлорид-анионов в эндосомах было показано, что вызываемый полиэтиленимином и полиамидоамином осмотический градиент может достигать 50 мМ, что приводит к осмотическому набуханию и разрыву эндосом [70]. В результате этого комплекс нуклеиновой кислоты с поликатионным носителем выходит в цитозоль.



**Рис. 11.** Механизм осмотического разрушения эндосом под действием поликатионов по механизму «протонной губки».

Наиболее распространёнными носителями, способными вызывать эффект протонной губки являются полиамидаминовые дендримеры [71, 72], поли(L-гистидин) [73, 74, 75], полимеры, содержащие имидазольные группы [76, 77] и полиэтиленимин [78, 79, 80].

После выхода из лизосом, полиплексы оказываются в цитозоле, где комплекс диссоциирует на свободный поликатион и ДНК. Считается, что это происходит за счёт конкуренции за катионные группы между фосфатными группами ДНК и низкомолекулярными соединениями и анионами цитоплазмы. В некоторых случаях диссоциация комплекса происходит, по-видимому, в ядре. Главным барьером на пути плазмидной ДНК в клеточное ядро служит двойная ядерная оболочка. Только маленькие молекулы (<40 кД, ~10 нм) могут проходить путём пассивной диффузии через ядерный поровой комплекс. Так как освободившаяся после диссоциации комплекса свободная плазмидная ДНК не имеет сигнала ядерной локализации, то в ядро будет проходить очень незначительная часть плазмидной ДНК (не более 0,1—0,001%). Кроме того, установлено, что около 50% инъецированной ДНК деградирует в цитозоле уже через 1—2 часа после введения. Однако поскольку клетки опухолей, против которых часто и направлена генная терапия, отличаются активной пролиферацией, то ДНК без труда проникает в ядра дочерних клеток во время митотического цикла, когда ядерная оболочка демонтирована.

Таким образом, поликатионный носитель нуклеиновых кислот должен отвечать следующим требованиям:

- компактировать нуклеиновые кислоты с образованием положительно заряженных комплексов размером 100-150 нм;
- эффективно защищать нуклеиновую кислоту от деградации под действием меж- и внутриклеточных нуклеаз;
- способствовать попаданию нуклеиновой кислоты в цитозоль и проникновению ее в ядро;

- давать возможность нуклеиновой кислоте должна диссоциировать из комплекса с носителем для запуска транскрипционного процесса, проходящего в ядре;
- должен быть нетоксичным в условиях эксперимента.

Очевидно, что создать поликатионный носитель, соответствующий всем этим требованиям – чрезвычайно сложная задача, поэтому поиск факторов, позволяющих повысить эффективность трансфекции полимерного носителя, представляет большой интерес. В настоящей работе будет показано, что сетчатая структура поликатионного носителя является одним из таких факторов.

### **1.2.2 Полиэлектролитные комплексы и их свойства**

Образование и свойства комплексов ДНК с поликатионными носителями описывается закономерностями, ранее подробно исследованными для полиэлектролитных комплексов (ПЭК) [81]. Поэтому в настоящем разделе мы кратко остановимся на некоторых наиболее важных аспектах формирования, структуры и диссоциации полиэлектролитных комплексов.

#### **1.2.2.1 Структура полиэлектролитных комплексов**

Движущей силой образования полиэлектролитных комплексов является увеличение энтропии системы за счет вытеснения в раствор малых противоионов, «сконденсированных» вокруг макромолекулы полиэлектролита [82, 83]. В результате взаимодействия противоположно заряженных полиэлектролитов, как правило, образуются частицы, имеющие коллоидный размер и включающие несколько молекул взаимодействующих полиэлектролитов. Размеры образующихся частиц зависят от множества факторов, среди которых наибольшее значение имеют гибкость реагирующих макромолекул, их соотношение в составе комплексов, степень ионизации, линейная плотность заряда, рН и ионная сила раствора [84].

Взаимодействие в растворах между электростатически комплементарными полиэлектролитами, характеризующимися высокой плотностью заряда, приводит к образованию ПЭК, обычно выделяющихся из раствора в виде сольватированных малорастворимых осадков. Соотношение между противоположно заряженными



группами в них составляет 1:1 (стехиометричные СПЭК). Они способны ограниченно набухать в воде. Нестехиометричные ПЭК (НПЭК), образующиеся при избытке одного из компонентов, при соблюдении определенных условий не выпадают в осадок.

Результаты исследования равновесий реакции образования ПЭК приводят к представлению о них, как о полимерах лестничного строения, в которых более или менее длинные последовательности пар звеньев, связанных друг с другом солевыми связями, чередуются с петлями, составленными из последовательностей разобщенных звеньев. Изучение свойств СПЭК свидетельствует о наличии в них значительного количества дефектов в виде петель. Именно благодаря этим дефектам, в которых содержатся разобщенные гидрофильные звенья электростатически комплементарных цепей, СПЭК заметно набухают в воде. Гидрофобные лестничные участки ограничивают набухание ПЭК в гидрофильных средах. неполярные взаимодействия этих участков друг с другом приводят к компактизации частиц ПЭК в разбавленных водных растворах. Сворачивание частиц ПЭК в компактные глобулы становится возможным благодаря резкому изгибанию двутяжных образований по местам дефектов (петель).

Присутствие дефектов в продуктах завершенных реакций может быть обусловлено различными причинами. В бессолевых средах или в средах с низким содержанием соли происходит «замораживание» случайных межмолекулярных контактов, возникших на ранних стадиях быстро протекающих ионных реакций. Поэтому часто добавление некоторых количеств соли к растворимым ПЭК, полученным в бессолевой среде, приводит к формированию стехиометрических комплексов, выпадающих в осадок. После осаждения ПЭК его последующая перестройка в направлении «залечивания» дефектов идет, по-видимому, очень медленно. Таким образом, в системе фиксируются некоторые неравновесные состояния.

Другим важным фактором, определяющим дефектность, является отсутствие стерического соответствия между электростатически комплементарными цепями. Большинство описанных в литературе ПЭК являются продуктами взаимодействия

нерегулярных макромолекул. Такие ПЭК содержат около 20-30% процентов пар разобщенных звеньев [82]. В настоящей работе будут исследованы комплексы ДНК со сферическими наногелями, для которых наличие таких дефектов может быть особенно существенным.

#### **1.2.2.2 Структура и стабильность комплексов поликатионов с ДНК**

ДНК представляет собой жесткую стержнеобразную молекулу. Высокая плотность заряда ДНК обусловлена отрицательно заряженными фосфатными группами двойной спирали. При взаимодействии такой молекулы с поликатионами разной химической природы образуются комплексы, физико-химические свойства которых сильно отличаются от свойств полиэлектролитных комплексов, образованных линейным полианионом и различными поликатионами. В связи с этим особенности структуры и свойств поликомплексов с участием ДНК (полиплексов) требуют отдельного рассмотрения.

Как правило, поликатионы конденсируют ДНК в очень компактные тороидальные [85, 86, 87] или глобулярные [88, 89, 90] частицы. Конденсация ДНК поликатионами является результатом суперпозиции множественных взаимодействий. Конденсации препятствует электростатическое отталкивание зарядов ДНК, вклад изгибания ДНК, эффект исключенного объема ДНК и уменьшение конформационной энтропии ДНК во время его коллапса. Согласно теоретическим исследованиям Маннинга [91] конденсация ДНК происходит спонтанно при нейтрализации зарядов на полинуклеотидной цепи.

При взаимодействии с поликатионом молекула ДНК сворачивается, образуя глобулы, которые, в случае малого размера поликатиона, переходят в тороидальную структуру. ДНК образует глобулярные структуры с малыми олигокатионными молекулами, такими как протамин [92] или низкомолекулярные мультивалентные катионы [93], размер которых намного меньше размера ДНК. Синтетические поликатионы, такие как ПЭИ [94], поли-L-лизин [95], пДМАЭМА [96], как правило, образуют с ДНК комплексы глобулярного строения.

Большое количество исследований было посвящено изучению заряда и размера полиплексов в водных растворах. В работе [97] методом лазерного микроэлектрофореза и динамического светорассеяния было показано, что при недостатке поликатиона частицы комплекса с ДНК были заряжены отрицательно, заряд комплексов увеличивался с увеличением концентрации поликатиона. В точке эквивалентности образовывался СПЭК. Такие комплексы, как и следовало ожидать, образовывали большие агрегаты и выпадали в осадок. При взаимодействии с некоторыми поликатионами размер частиц сильно уменьшался в избытке поликатиона, например, такой эффект проявляли полиплексы, образованные ПЭВП [97], ПДМАЭМА [98], ПЭИ и ПАМАМ дендримерами [99]. В таких системах при повышении концентрации поликатиона наблюдалось растворение агрегатов (образование НПЭК), приводящее к образованию малых, сравнительно гомогенных положительно заряженных частиц (средний диаметр от 80 до 130 нм). Исходя из результатов исследования, была предложена модель строения комплекса типа «ядро-оболочка» [97]. Согласно этой модели, нейтрализованные цепи поликатиона и ДНК сегрегируют в гидрофобное «ядро». Это «ядро» окружено гидрофильной оболочкой заряженного поликатиона, адсорбированного на поверхности частиц. Поликатионная «корона» стабилизирует систему благодаря электростатическому отталкиванию и эффекту исключенного объема.

Можно определить несколько факторов, влияющих на стабильность комплексов поликатионов с ДНК. Один из них: длина поликатиона. В работах [100, 101] на примере комплексов ДНК и полиметакриловой кислоты с поли-(N-этил-4-винилпиридином) показано, что их стабильность резко возрастает с увеличением степени полимеризации поликатиона до приблизительно 100, после чего увеличивается незначительно.

Природа аминогрупп поликатиона также оказывает существенное влияние на стабильность комплексов с ДНК [102]. Диссоциация полиплексов, образованных поликатионами с кватернизованными аминогруппами в цепи, не зависит от рН и наиболее чувствительна к разрушающему действию добавляемой соли. Напротив,

поликатионы с первичными аминогруппами образуют с ДНК наиболее стабильные комплексы, устойчивые в широком интервале изменения рН. Полиплексы на основе поликатионов со вторичными и третичными аминогруппами по стабильности занимают промежуточное положение, причем их устойчивость сильно зависит от рН среды.

Приведенные данные указывают на важную роль расстояния между зарядами в ионных парах, при увеличении которого интерполиэлектродитное взаимодействие существенно ослабляется. О том же свидетельствуют результаты исследования полиплексов с поли(N-алкил-4-винипиридиниевыми) катионами, содержащими N-алкильные заместители различной длины [103]. Увеличение числа метиленовых групп от 1 до 6 сопровождалось последовательным снижением концентрации соли, необходимой для диссоциации комплекса. Это влияние было особенно выраженным у полиаминов с наиболее длинными метиленовыми фрагментами, создающими стерические препятствия тесному контакту заряженных пиридиниевых групп поликатиона и фосфатных групп ДНК.

В случае относительно слабых полиоснований, которые часто используются для синтеза полиплексов (ПЭИ, спермин, ПДМАЭМА), степень ионизации и плотность заряда изменяются в зависимости от рН среды. Поэтому интерполиэлектродитная реакция между такими поликатионами и ДНК сильно зависит от рН раствора. Однако, как следует из данных потенциометрического титрования (см. выше), в присутствии ДНК, как сильного полианиона, ионизированная форма поликатиона стабилизирована благодаря кооперативным электростатическим взаимодействиям поликатиона и ДНК.

Таким образом, устойчивость ДНК-содержащих комплексов можно эффективно контролировать, варьируя длину, плотность заряда и структуру поликатиона, а также используя различные низкомолекулярные электролиты. Для усиления эффекта можно комбинировать упомянутые факторы [102].

### **1.2.3 Использование катионных наногелей и разветвленных поликатионов для трансфекции**

К настоящему времени хорошо известны следующие структурные особенности, которые способствуют повышению трансфекционной активности поликатионных носителей:

1. Линейная плотность заряда на молекуле поликатиона является фактором, обеспечивающим компактизацию нуклеиновой кислоты, необходимую для успешного захвата ДНК клетками и защиты от ферментативного гидролиза сывороточными нуклеазами [104]. Этот параметр может варьироваться в достаточно широких пределах, причем в ряде случаев высокая плотность заряда не только не способствует, но даже и препятствует успешной трансфекции, поскольку увеличивает и цитотоксичность поликатиона, а значит, препятствует его введению в избыточных количествах по отношению к ДНК для получения растворимых комплексов.
2. Наличие электронейтральных гидрофильных цепей в составе поликатионного носителя, как правило, увеличивает эффективность трансфекции, т.к. уменьшает размеры комплексов, а значит, повышает эффективность их захвата клетками [1050]. Эти преимущества часто позволяют осуществлять исследование трансфекцию в присутствии сыворотки и даже *in vivo* [106]. В то же время этот фактор также не является абсолютным, и введение слишком длинных цепей нейтральных полимеров может, напротив, мешать эндозитозному захвату комплексов.
3. Повышение гидрофобности поликатиона может способствовать его дестабилизирующему действию на эндосомальные мембраны. Известно, что гидрофобизация полиэтиленimina [107] и поли-(N-этил-4-винилпиридина) [101] увеличивает их способность доставлять нуклеиновые кислоты. Однако параллельно с этим растет и токсичность поликатионов.
4. Наличие в поликатионе групп, проявляющих буферные свойства в интервале рН 5-6, способствует осмотическому набуханию кислых везикул, приводящему

к их разрушению и выходу комплексов в цитозоль. Поэтому наличие в молекуле полимера таких групп в некоторых случаях приводит к росту трансфекционной активности поликатиона [66]. Однако многие линейные поликатионы, имеющие группы, титруемые в указанной области pH, например, ПДМАЭМА [108] или поли(2-метилакриловой кислоты 2-[(2-(диметилмино)-этил)-метиламино] этиловый эфир) (ПДАМА) [109]) не способны разрушать эндосомы.

В настоящей работе мы предположили, что причина этого противоречия состоит в том, что линейные поликатионы с рКа аминокрупп около 6 способны приобретать положительный заряд при контакте с анионными центрами клеточной мембраны, в результате чего даже поликомплексы, несущие избыточное количество аминокрупп попадают в клетку в виде почти стехиометрических комплексов с углеводами мембраны, а следовательно, неспособны проявлять буферные свойства и вызывать осмотическое набухание и разрыв эндосом. Можно предполагать, что значительно слабее эффект зарядения свободных аминокрупп должен проявляться в случае наногелей и разветвленных полимеров, поэтому ниже мы рассмотрим литературу, посвященную этим типам поликатионов.

#### **1.2.3.1 Влияние катионных наногелей на трансфекцию эукариотических клеток**

Анализ литературы показывает, что наногели различной структуры и природы катионных групп являются достаточно эффективными носителями для доставки нуклеиновых кислот. Свойства наногелей, их комплексов с ДНК и эффективность с которой они обеспечивают транспорт нуклеиновых кислот в клетки суммированы в Таблице 1. Описанные в литературе наногели сильно варьируют по размеру самих наногелевых частиц. Так, в работах [16, 21, 35, 43] для трансфекции использовались достаточно крупные наногелевые частицы, тогда как в других исследованиях частицы наногелей не превосходили по размеру 100 нм. Практически во всех работах наибольшую трансфекционную активность проявляли комплексы с ДНК, не превосходящие 150 нм. Этот результат хорошо согласуется с представлениями, что

именно такие частицы наиболее эффективно захватываются в кислые везикулы. Этот размер комплексов достигался при добавлении к нуклеиновой кислоте больших избытков наногеля (от 5 до 100-кратного для различных полимеров).

Из анализа приведенных данных литературы следует, что подавляющее большинство наногелей, используемых для доставки нуклеиновых кислот, представляют собой производные полиэтиленimina сшитые плюрониками. Известно, что полиэтиленimin является наиболее активным трансфецирующим поликатионом, поэтому и наногели, полученные на его основе, также проявляют высокую трансфецирующую активность. При этом во многих работах сравнения трансфекционной активности наногелей с исходным полиэтиленимином не проводили. Однако в работах [15, 16, 110, 111] было обнаружено, что активность наногелей в 2-10 раз понижена по сравнению с линейным ПЭИ.

Высокая трансфекционная активность наногелей хорошо коррелирует с  $pK_a$  аминогрупп, входящих в состав полимера. Наиболее эффективными, как правило, оказываются полимеры с  $pK_a$  аминогрупп между 5 и 6, поскольку, по всей видимости, именно такие поликатионы способны вызывать осмотическое набухание кислых эндосом.

В работах [40, 110] была исследована трансфекционная активность кватернизованного ПДМАЭМА и наногелей на основе слабого полиамина поли-(N,N-диэтиламиноэтилметакрилата), причем также в обоих случаях эффективность трансфекции не сравнивалась с эффективностью линейных аналогов.

Таким образом, несмотря на то, что наногели используются для трансфекции эукариотических клеток около 10 лет, опубликованные работы не проясняют вопроса о влиянии сетчатой структуры на трансфекционную активность наногелей.

**Таблица 1. Эффективность наногелей как носителей для доставки ДНК или РНК**

Состав наногеля	Размеры наногеля, нм, в скобках индекс полидисперсности	Характеристика комплексов с ДНК, оптимальных для трансфекции		pKa аминокрупп	Эффективность трансфекции наногелям по сравнению с линейным аналогом (в скобках)	Ссылка
		Состав [N]/[P]	Гидродинамический диаметр, нм			
Полиэтилен-имин, сшитый плюронидами P85 или F127	50-200 нм	5	90	5-6	Высокая, сравнение с линейным аналогом не проводилось	[21]
Полиэтилен-имин, сшитый путем фотореакции Фентона	38, (0.3) 75,(0.4) 87,(0.3) 122, (0.5) 132, (0.4) 168(0.2)	73 22 16 4.4 3.5 3.5	47 86 98 167 171 260	5-6	30-40%, сравнение с линейным аналогом не проводилось	[21, 108]
Полиэтилен-имин-гепарин	80	7.3	Н.и.	5-6	40%. Менее эффективен, чем линейный ПЭИ	[15]
Комплекс ПЭИ-ДНК, содержащий плюроник F127	-	8	231 (5% F127) 772 (10% F127)	5-6	Эффективность в 4 и 10 раз уступает линейному ПЭИ	[16]
Полиэтилен-имин-полиэтиленгликоль	237±3 148±3	8	94±2 64±2	5-6	Проходит через гематоэнцефалический барьер	[35]
Полиэтиленоксид-2-оксиэтилакрилат-2-акрилоксиэтил-триметиламмоний хлорид	50	10	56	Катион при любом pH	Проникает в клетки, трансфекционная активность не исследовалась	[41]
Полиэтиленоксид, модифицированный лактозой	89	100	н.и.	5.5-6	Вызывает разрушение эндосом, сравнение с линейным полимером не проводилось	[112]
Циклоамилоза-холестерин-спермин	30	-	-	5-8	Введенная миРНК подавляла на 50% синтез целевого белка	[113]
Кватернизованный ПДМАЭМА	300	30	н.и.	Катион при любом pH	Сравнима с FuGene-ND, сравнение с линейным аналогом не проводилось	[43]



### 1.2.3.2 Использование разветвленных поликатионов для трансфекции

Влияние степени разветвленности поликатионов на их способность доставлять в клетки ДНК было исследовано в очень небольшом количестве работ. Тем не менее, анализ имеющихся публикаций подтверждает приведенные выше соображения, что разветвление поликатиона может способствовать повышению его трансфекционной активности. Например, разветвление пДМАЭМА путем включения нескольких процентов этиленгликольдиметакрилата в процессе ATRP-полимеризации привело к повышению эффективности трансфекции до уровня ПЭИ [114, 115]. Таким образом, введение разветвлений в полимер ПДМАЭМА может увеличить его трансфецирующую способность. Аналогичный вывод можно сделать и из работы [116], в которой было показано, что полициклооктен, привитой олиголизинном, проявлял повышенную трансфекционную активность по сравнению с линейным полилизинном. Гидрофобность основной цепи привитого полимера ослабляет его взаимодействие с ДНК по сравнению с линейным ПЛЛ. Дендримерный ПЛЛ (6 поколений) проявляет в 100 раз большую активность трансфекции, по сравнению с линейным благодаря тому, что дендримерный ПЛЛ проявлял эффект протонной губки [117].

Таким образом, имеющиеся данные подтверждают наше предположение о том, что разветвленная структура поликатиона способствует повышению его трансфекционной активности. Однако, для полиэтиленimina, наиболее эффективного трансфецирующего агента, данные по влиянию разветвления, не так однозначны. Например, в работе [118] было показано, что при низких N/P ( $N/P = 3$ ) разветвленный ПЭИ  $M_n=25$  кДа более эффективен, чем линейный  $M_n=22$  кДа, при доставке ДНК в клетки, однако, при повышении N/P эффективность доставки линейного и разветвленного ПЭИ уравнивается. С другой стороны, в работах [119, 120] было показано, что линейный ПЭИ превышает по эффективности разветвленный, а также менее токсичен. Данное отличие объясняется тем, что аминокислотные группы ПЭИ находятся в основной цепи, и разветвление приводит к появлению третичных и первичных аминокислотных групп, которые отличаются по свойствам от вторичных аминокислотных групп,

имеющихся в линейном ПЭИ. Однако и для ПЭИ разветвление, не меняющее природы аминогрупп, ведет к повышению эффективности трансфекции, так присоединение цепей линейного ПЭИ к циклодекстрину [121] или декстрану [122] с образованием щеткообразных полимеров привело к значительному увеличению трансфекционной активности по сравнению с линейным полимером.

Таким образом, на основании представленной литературы можно сделать вывод о том, что структурное разветвление, ведет к значительному повышению эффективности трансфекции поликатиона. Причины возникновения этого эффекта в литературе не обсуждались. В настоящей работе мы исследуем влияние сетчатой структуры катионных наногелей на их взаимодействие с клетками и влияние на транспорт плазмидной и короткой интерферирующей РНК.

## Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

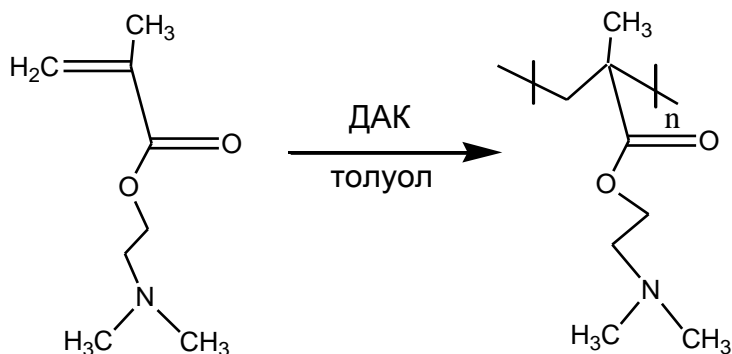
### 2.1 Материалы

N,N-диметил-аминоэтилметакрилат («Реахим», Россия), полиэтокселированный олеиновый спирт (BrijO10, степень полимеризации этиленоксида около 10), разветвленный полиэтиленимин, ( $M_r \sim 25$  кДа), длиноцепочечная двуспиральная ДНК спермы сельди, обработанная ультразвуком, фрагменты, содержащие от 581 до 857 пар оснований («Sigma-Aldrich», США), бромистый этидий (БЭ), дитиотреитол, персульфат аммония, питательные среды DMEM и Opti-MEM™, этиленгликоль-бис-(2-амиэтокси-N,N,N'-тетрауксусная кислота (ЭГТК), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) («Sigma-Aldrich», США), N,N'-метилен-бисакриламид (МБА, «Fluka», США), полистиролсульфонат натрия (ПСС-Na),  $P_n = 8$  и  $P_n = 2500$  («DuPont», Франция), трет-октил-феноксиполиоксиэтилен Triton X-100 («Serva», Германия), липофектамин 2000 («Invitrogen», США), сыворотка фетальная бычья («HyClone», США). Плазмидную ДНК pGL3 (5256 пар оснований), несущую ген светляковой люциферазы, получали с помощью набора фирмы «Promega» (США). Олигонуклеотиды для получения малых интерферирующих РНК (миРНК) к гену светляковой люциферазы и к гену фосфопротеина Р респираторно-синцитиального вируса [123], имеющие последовательность (5'-3') UUUCCGUCAUCGUCUUUCC-dTdT, GGAAGACGAUGACGGAAA-dTdT, и UCUUGCAGUUAUAUUAUCGdTdT, CGAUAAUAUAACUG-CAAGAdTdT соответственно были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Россия). Растворители и компоненты буферных растворов, использованные в работе, были наивысшей чистоты и не подвергались дополнительной очистке.

## 2.2 Методы

### 2.2.1 Синтез линейного пДМАЭМА методом радикальной полимеризации

Линейный поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилат был синтезирован методом свободнорадикальной полимеризации (рис. 12):



**Рис. 12.** Синтез поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилата методом классической радикальной полимеризации

Мономер N,N-диметиламиноэтилметакрилат сушили над гидридом кальция  $\text{CaH}_2$  в течение 2 ч, затем перегоняли при пониженном давлении. В ампулу помещали 3 г мономера ДМАЭМА, 12 мл толуола и 12.5 мг динитрила аминокислоты (ДАК) и продували аргоном в течение 1 часа, после чего запаивали ампулу и нагревали смесь в течение суток при  $80^\circ\text{C}$ . Затем полимер высаживали гексаном, трижды пересаждали в гексан в центрифужных пробирках для отделения от следов мономера и инициатора, после чего полимер высушивали на воздухе. Далее полимер растворяли в воде в присутствии эквивалентного количества соляной кислоты, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

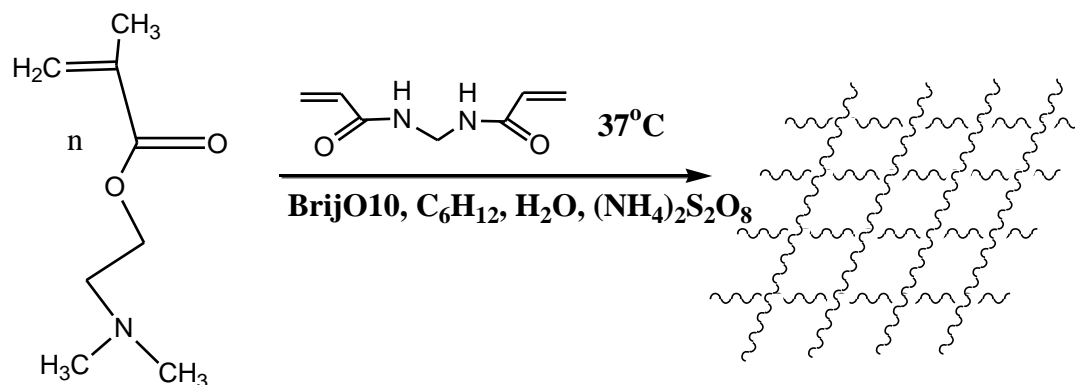
По данным ГПХ, проведенного в диметилформамиде,  $M_n = 17500$  г/моль,  $M_w = 34200$  г/моль,  $M_w/M_n = 1.9$ .

### 2.2.2 Синтез наногелей пДМАЭМА методом обратной микроэмульсионной свободно-радикальной полимеризации

Синтез наногелей пДМАЭМА проводили по методике, описанной ранее для акриламидных систем [54]. Метод основан на проведении реакции полимеризации

внутри обращенных мицелл, образованных поверхностно активным веществом (ПАВ) в органическом растворителе.

Для получения наногелей использовали микроэмульсионную полимеризацию в системе обращенных мицелл BrijO10 в циклогексане. Данная система оптически прозрачна и термодинамически стабильна, т.е. не требует специальных методов гомогенизации или ультразвукового диспергирования, в отличие от эмульсий на основе Span 80 [43]. С другой стороны, от ранее описанных методов полимеризации в обращенно-мицеллярных системах [54], использованный в настоящей работе подход отличается использованием неионогенного ПАВ, что позволило синтезировать наногели из катионных мономеров.



**Рис. 13.** Синтез наногеля в системе обращенных мицелл

1 мл 30% (2,12 М) раствора N,N-диметиламиноэтилметакрилата (ДМАЭМА) и N,N'-метилден-бисакриламида (МБА), взятых в различных соотношениях (50:1, 28:1, 20:1, 12,5:1, 8,3:1; 7:1) в воде подкисляли концентрированной HCl до pH<7.0 и смешивали с 30 мл 0.3 М раствора BrijO10 в циклогексане. При интенсивном встряхивании и нагревании до 40°C образуется прозрачная система обращенных мицелл, которые заполнены раствором мономеров. Далее в систему добавляли 200 мкл 1,65 М раствора инициатора ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), после чего система оставалась оптически прозрачной (рис. 13). Через 24 часа образовавшиеся полимеры высаживали ацетоном, тщательно промывали на центрифуге большим избытком ацетона и высушивали в вакууме. Полимер растворяли в воде, диализовали и лиофильно

высушивали. Наногели, также как и препарат линейного ПДМАЭМА, хранили без доступа влажного воздуха при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Выход полимеров составил около 300 мг (90%).

### **2.2.3 Гель-проникающая хроматография**

ГПХ производили на колонке Beckman TSK G4000SW с использованием элюента 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7.0. Скорость потока составляла 0.7 мл/мин, калибровочную кривую строили по стандартам ПЭГ (Waters, США).

### **2.2.4 ИК-спектроскопия**

ИК-спектры регистрировали при  $22^{\circ}\text{C}$  с использованием спектрометра Bruker Tensor 27, снабженного детектором МСТ, охлаждаемого жидким азотом, и термостатируемой ячейкой BioATR-II (Bruker, Германия). ИК-спектрометр продували постоянным потоком сухого воздуха. ИК-спектры получали в интервале 1000-2000  $\text{cm}^{-1}$  со спектральным разрешением  $1 \text{ cm}^{-1}$ , вычитая из спектра образца спектр растворителя. Спектр каждого образца получали усреднением 100 сканирований при скорости сканирования 20 кГц. Спектральные данные были обработаны с помощью программного обеспечения системы Bruker "Opus 7.0." (Bruker, Германия). Концентрации ВгijO10 и наногеля составляли 1 мг/мл.

### **2.2.5 Изучение кислотно-основных свойств наногелевых частиц (метод потенциометрии)**

Потенциометрическое титрование проводили с использованием pH-метра Orion SA720 (США) с комбинированным стеклянным электродом Ag/AgCl. Для определения концентрации титранта использовали свежеприготовленный фиксанал фумаровой кислоты (10 mM). Водные растворы полимеров и их комплексов с ДНК титровали гидроксидом калия и соляной кислотой при комнатной температуре.

### **2.2.6 Метод динамического светорассеяния**

Размер частиц наногелей, ДНК, мицелл и полиплексов измеряли методом динамического светорассеяния на гониометре PhotoCor ("PhotoCor Corp.", США), оснащенном He-Ne-лазером ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , 15 мВт) при угле  $90^{\circ}$  [124].

Метод динамического, или квазиупругого, светорассеяния дает возможность измерить коэффициент диффузии и рассчитать гидродинамический радиус полимерных цепей. Поскольку растворы полимеров не являются идеальными, для строгого определения значения коэффициента диффузии необходимо получить зависимость этой величины от концентрации полимера и экстраполировать ее к нулевому значению концентрации. Из полученного  $D_0$  можно рассчитать гидродинамический радиус частиц по уравнению Эйнштейна-Стокса:

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

Автокорреляционные функции флуктуации интенсивности рассеянного света (АКФ) измеряли с помощью 288-канального коррелятора FotoCor-SP с логарифмической временной шкалой от  $2.5 \times 10^{-8}$  до 6800 с.

АКФ связана с коэффициентом трансляционной диффузии частиц в растворе как

$$g(\tau) = A + B \left[ \int_{D_{\min}}^{D_{\max}} Z(D) \exp(-q^2 D \tau) dD \right]^2, \quad (1)$$

где  $A = 1$ , поскольку измеряли нормированную АКФ,  $D$  – коэффициент диффузии,  $q = (4\pi n_0/\lambda) \sin(\theta/2)$  – модуль волнового вектора рассеяния,  $\lambda$  – длина волны лазера в вакууме,  $\theta$  – угол рассеяния,  $n_0$  – показатель преломления растворителя (для воды  $n_0 = 1,33$ ).

Динамическую вязкость циклогексана и воды принимали за 0.894 и 0.692 сПз соответственно, и показатели преломления 1.426 и 1.333, соответственно. Автокорреляционную функцию обрабатывали в программе DynaLS 2.7.1 (Alango Ltd.), получая распределение частиц по размерам и средние размеры частиц.

Образцы фильтровали в кювету через фильтр Millipore (диаметр пор 0.45 мкм). Накопление данных проводили в течение 5 - 60 минут.

### 2.2.7 Лазерный микроэлектрофорез

Модификация метода динамического светорассеяния, называемая лазерным микроэлектрофорезом, позволяет производить измерение  $\zeta$ -потенциала коллоидных частиц. При приложении постоянной разности потенциалов к раствору находящиеся в нем частицы начинают двигаться от одного электрода к другому со скоростью, измеряемой методом динамического светорассеяния. Данная скорость зависит от потенциала между объемом раствора и границей скольжения частицы, т.е.  $\zeta$ -потенциала.

Усредненная электрофоретическая скорость движения  $\langle u \rangle$  в этом направлении используется для расчета  $\zeta$ -потенциала каждой частицы по уравнению Гельмгольца-Смолуховского:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta \langle u \rangle}{\epsilon_0\epsilon E},$$

где  $\eta$  — вязкость жидкости,

$\epsilon_0$  — электрическая постоянная,

$\epsilon$  — относительная диэлектрическая проницаемость жидкости,

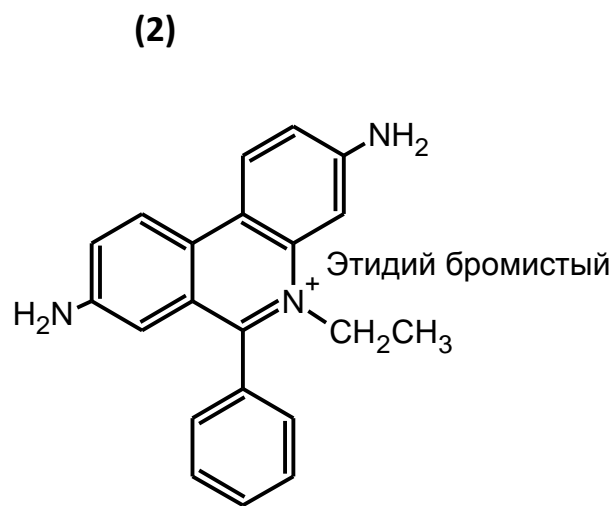
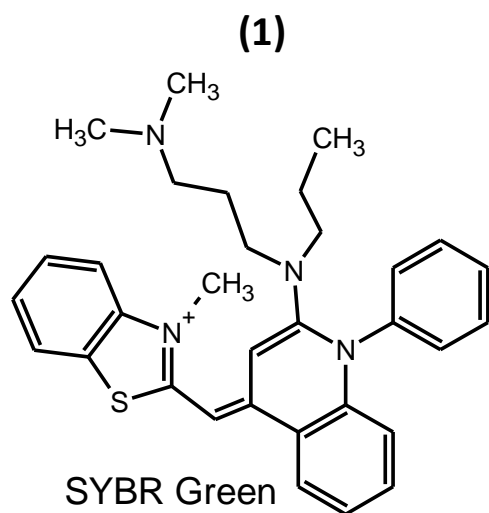
$E$  — напряженность электрического поля.

$\zeta$ -потенциал измеряли на приборе ZetaSizer NanoZS (Malvern), оснащенном HeNe лазером (633 нм), угол измерения рассеянного света  $17^\circ$ , при  $37^\circ\text{C}$ . Данные обрабатывали, используя программу Dispersion Technology 5.10. Измерения проводили в 5 мМ Трис-ацетатном буферном растворе при pH 7.0.

### 2.2.8 Изучение комплексообразования поликатионов с ДНК методом конкурентного вытеснения интеркалирующих красителей SYBR Green и бромистого этидия

За образованием и диссоциацией комплексов ДНК с поликатионами удобно следить с помощью метода тушения флуоресценции, используя интеркалирующие красители, в частности N,N'-диметил-N-[4-[(E)-(3-метил-1,3-бензотиазол-2-илиден)метил]-1-фенилхинолин-1-иум-2-ил]-N-пропилпропан-1,3-диамин (SYBR green 1, 1) и 2,7-диамино-10-этил-9-фенил-фенантридиний бромид (бромид этидия, 2):





В основе метода лежит способность некоторых катионных красителей самопроизвольно встраиваться (интеркалировать) между основаниями двойной спирали ДНК, что приводит к значительному росту интенсивности флуоресценции красителя. SYBR Green и этидий бромид в связанном с ДНК состоянии имеют полосы поглощения в голубой области спектра при 497 и 520 нм соответственно, а эмиссия характеризуется максимумом при 520 и 605 нм, соответственно. При этом конкурентное вытеснение интеркалятора из комплекса поликатионом, образующим с ДНК стабильный комплекс, сопровождается значительным тушением флуоресценции, что позволяет использовать такие красители для слежения за связыванием катионных носителей с двуспиральными нуклеиновыми кислотами.

Огромная чувствительность метода, основанного на использовании SYBR Green, делает возможным использование его для изучения связывания малых количеств нуклеиновых кислот. Так, в лунки 96-луночного планшета с прозрачным дном и черными стенками помещали по 0,05 мл растворов поликатионов различной концентрации, по 0,1 мл 0,1 осново-мМ раствора нуклеиновой кислоты (ДНК и мРНК), а также краситель SYBR Green I в конечном разведении 1:20,000. Все образцы готовили в 10 мМ HEPES, pH 7.2. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин при постоянном встряхивании, после чего измеряли интенсивность флуоресценции при  $\lambda_{\text{возб}} = 480$  нм и  $\lambda_{\text{эм}} = 520$  нм. Интенсивность флуоресценции образцов, содержащих поликатион, нормировали на сигнал

контрольных образцов без поликатиона. Данные представляли в качестве зависимости нормированной флуоресценции от соотношения молярных концентраций аминогрупп поликатионов [N] к фосфатным группам нуклеиновой кислоты [P] ( $[N]/[P]$ ).

Изучение флуоресценции бромистого этидия проводили в кювете флуориметра, снабженной магнитной мешалкой. Для этого 1 мл 0,312 мМ (по основаниям) раствора двухцепочечной ДНК в дистиллированной воде, 1 мл буферного раствора и 200 мкл 0.3 мМ раствора этидий-бромид в воде помещали к кювету и регистрировали значение интенсивности флуоресценции в отсутствие поликатиона. Далее проводили титрование полученного комплекса этидий-бромид/ДНК водными растворами поликатионов и следили за уменьшением интенсивности флуоресценции этидий-бромид при  $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм и  $\lambda_{\text{эм}} = 605$  нм.

### **2.2.9. Метод атомно-силовой микроскопии**

Метод атомно-силовой микроскопии основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом. В качестве зонда используется наноразмерное остриё, располагающееся на конце упругой консоли, называемой кантилевером. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли (Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, упругие силы, силы адгезии, капиллярные силы.). Появление возвышенностей или впадин под остриём приводит к изменению силы, действующей на зонд, а значит, и изменению величины изгиба кантилевера. Таким образом, регистрируя величину изгиба, можно сделать вывод о рельефе поверхности.

Образцы полимеров для изучения методом атомно-силовой микроскопии готовили следующим образом: 10 мкл водного раствора наногеля в концентрации 50 мкМ аминогрупп (соответствует приблизительно 0.5 нМ частиц) высушивали на пластинке свежесколотой слюды. Комплексы полимеров с ДНК готовили, смешивая 12 мкл водного раствора плазмидной ДНК pGL3 (53 мкМ) с 5 (N/P =7.5) или 10 мкл (N/P =15) растворов поликатионов (900 мкМ) и добавляя 50 мкл дистиллированной воды. Образцы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и высушивали на свежесколотой слюде (около 24-48 ч).

Изображения образцов получали с помощью атомно-силового микроскопа Solver P47 ACM (NT-MDT, Россия). В работе были использованы зонды NSG10 (NT-MDT, Россия) с номинальной жесткостью 11,8 Н/м, номинальной резонансной частотой 240 кГц и номинальным радиусом наконечника 10 нм. Для получения изображений с более высоким разрешением использовали также зонды TESP Bruker с номинальной жесткостью 42 Н/м, номинальной резонансной частотой 320 кГц и номинальным радиусом наконечника 8 нм. Изображения размером 14x14 мкм были получены при скорости сканирования 1 Гц, с разрешением 512x512 пикселей. Изображения обрабатывали с помощью приложения, встроенного в программное обеспечение для обработки изображений Nova (NT-MDT, версия 1.0.26.1443). Высоты частиц были измерены и сопоставлены с помощью приложения Grain Analysis в программном обеспечении, поставляемом с прибором, или с помощью программы ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, NIH).

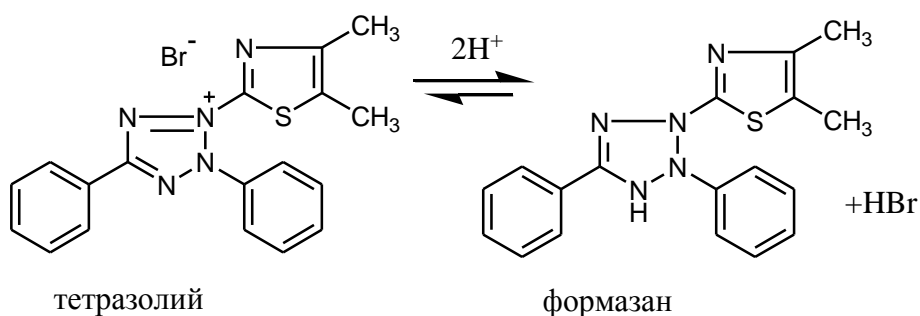
### **2.2.10 Методы работы с клетками в культуре**

#### **2.2.10.1 Методы культивирования клеток**

Клетки опухоли яичника китайского хомячка СНО культивировали в среде DMEM, содержащей 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4 мМ глутамина и 40 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 95% влажности (инкубатор «NAPCO», США). Клетки высевали в плотности 1-1.5×10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup> и пересеивали каждые 2-3 дня, когда их плотность достигала 2-3×10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup> (конец логарифмической фазы роста). За сутки до эксперимента клетки высаживали в плотности 10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup> (конец логарифмической фазы роста).

#### **2.2.10.2 Определение цитотоксичности полимеров на основе ДМАЭМА**

Определение цитотоксичности полимеров проводили, используя известный метод, основанный на восстановлении красителя метилтетразолиевого синего (МТТ) под действием восстановленной формы НАДН в митохондриях до нерастворимого в воде формазана [125]. МТТ имеет желтую окраску, а формазан окрашен в фиолетово-синий цвет. Число живых клеток пропорционально количеству восстановленного формазана, которое можно определить спектрофотометрически.



Клетки высаживали в 96-луночный планшет (плотность 3000 клеток/лунку) за сутки до эксперимента в среде для культивирования. Растворы полимеров в среде DMEM без сыворотки стерилизовали фильтрацией через микрофильтр Millipore, диаметр пор 0.22 мкм. Заменяли культуральную среду в планшете на среду без сыворотки. В лунках создавали различные концентрации полимеров методом последовательного разведения, инкубировали 1 час в CO<sub>2</sub>-инкубаторе NAPCO, затем вновь заменяли среду на культуральную (DMEM, 10% эмбриональной сыворотки) и держали 72 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Крайние лунки не использовали для определения цитотоксичности полимера во избежание «краевого эффекта».

Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора МТТ (1 мг/мл) в среде ДМЕМ без сыворотки до конечной концентрации МТТ 0.2 мг/мл и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Через 3 часа удаляли среду и выпавшие частицы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО. После растворения формазана определяли оптическую плотность раствора на фотометре Multiscan («Titertek», США) при длине волны 550 нм. Количество живых клеток рассчитывали как отношение оптической плотности в лунке с заданной концентрацией полимера к оптической плотности в контроле:

$$\text{количество живых клеток, \%} = A_{\text{ДМАЭМА}}/A_{\text{контроль}}$$

Каждое значение получали усреднением трех параллельных измерений.

### 2.2.10.3 Доставка в клетки СНО плазмидной ДНК, содержащей ген люциферазы

За день до трансфекции клетки СНО высевали в 12-луночные планшеты в такой плотности, чтобы на момент трансфекции плотность монослоя составляла 50-70% конфлуентности (около  $3 \times 10^5$  клеток на лунку). Непосредственно перед

экспериментом клетки промывали средой без сыворотки 2 раза и добавляли к клеткам по 1 мл среды Opti-MEM™ с 10 мМ HEPES.

Комплексы плазмидной ДНК, содержащей ген люциферазы, с поликатионами готовили, внося необходимое количество поликатиона в полипропиленовые пробирки на 0,2 мл, и доводили объем до 50-60 мкл средой Opti-MEM™. В отдельной пробирке готовили раствор плазмидной ДНК в Opti-MEM™ из расчета 2 мкг на 50 мкл. Далее растворы поликатионов смешивали с раствором плазмидной ДНК, тщательно перемешивали, инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, еще раз перемешивали и по каплям вносили в лунки с клетками. Для равномерного распределения комплексов по дну лунки, после внесения всех препаратов плашку покачивали. Клетки инкубировали с комплексами в течение 2-4 часов, после чего комплексы удаляли и помещали в лунки полную ростовую среду с сывороткой. Клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C, после чего собирали с помощью скребков и лизировали в растворе, содержащем 25 мМ Трис-фосфата, 2 мМ дитиотреитола, 2 мМ ЭГТА, 1 % Тритона X-100 и 10% глицерина. Далее в полученных образцах измеряли активность люциферазы по стандартному протоколу [126], используя набор реагентов Luciferase Assay System («Promega», США).

#### **2.2.10.4 Доставка в клетки CHO-luc, устойчиво трансфецированные геном люциферазы, малой интерферирующей РНК, комплементарную матричной РНК люциферазы**

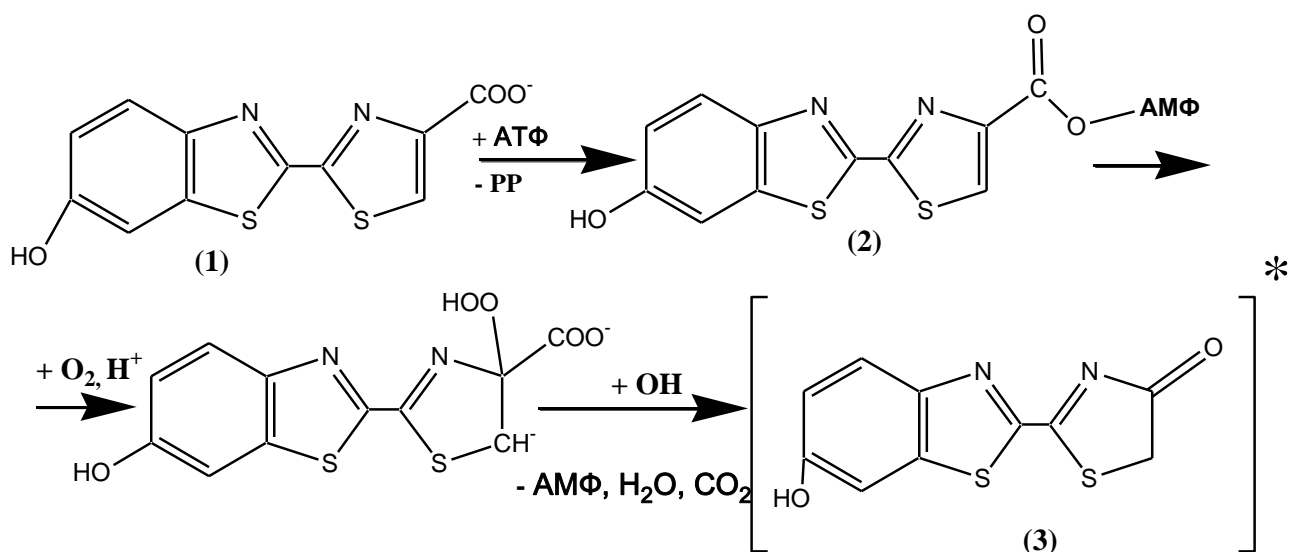
Для получения малой интерферирующей РНК смешивали эквимоллярные количества комплементарных линейных олигорибонуклеотидов, выдерживали 2 мин при 50°C, охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой, не содержащей РНКаз до конечной концентрации  $1.7 \times 10^{-5}$  моль/л.

Комплексы миРНК с поликатионами готовили по тому же протоколу, который использовали для приготовления комплексов поликатионов с плазмидной ДНК. К раствору миРНК добавляли поликатионы и доводили средой Opti-MEM таким образом, чтобы конечная концентрация миРНК в инкубационной смеси составляла  $3.4 \times 10^{-6}$  моль/л, выдерживали 20 мин при комнатной температуре и переносили в лунки с монослоем клеток CHO-luc, стабильно трансфецированных геном светляковой

люциферазы. Клетки инкубировали при 37°C в течение суток и определяли остаточную люциферазную активность. Результаты нормировали на активность люциферазы в клетках, обработанных комплексами такого же состава, но содержащих неспецифическую миРНК. Активность люциферазы в клеточных лизатах измеряли согласно стандартному протоколу [126], используя набор реагентов Luciferase Assay System («Promega», США).

### 2.2.10.5 Определение активности люциферазы в трансфецированных клетках

Метод определения активности люциферазы основан на оценке интенсивности люминесценции люциферина, субстрата люциферазы. При окислении люциферина до оксильюциферина за счет электронного перехода происходит выделение света. Катализатором этой реакции является светлячковая люцифераза, в качестве ко субстрата использующая АТФ•Mg<sup>2+</sup>. Первая стадия реакции – это взаимодействие люциферина (1) с АТФ с образованием люциферил-аденилата (2), который окисляется кислородом, образуя оксильюциферин в синглетном состоянии (3) (рис. 14). Деактивация оксильюциферина (3) сопровождается эмиссией видимого света [127].



**Рис. 14.** Схема реакции окисления люциферина до оксильюциферина под действием люциферазы с выделением видимого света.

Измерение активности люциферазы начинали немедленно после приготовления клеточных лизатов. В микрокювету для измерения интенсивности сигнала добавляли 100 мкл субстратной смеси (4 мМ АТФ, 0,3 мМ люциферина в буферном растворе 50

мМ Na-дифосфата, 4 мМ ЭДТА, 20 мМ MgSO<sub>4</sub>, pH 7,8, 10% бычьего сывороточного альбумина) и кювету устанавливали в измерительную ячейку люминометра ЛЮМ-1 («Люмтек», Россия), вносили 10 мкл клеточного лизата. Сигнал регистрировали в течение 60 с интервалом 10 с. Для оценки интенсивности люминесценции брали значение через 15 с после начала регистрации. Фон прибора - 0, фон субстратной смеси – 0.

#### **2.2.10.6 Оценка влияния полимеров на pH эндосом методом конфокальной микроскопии**

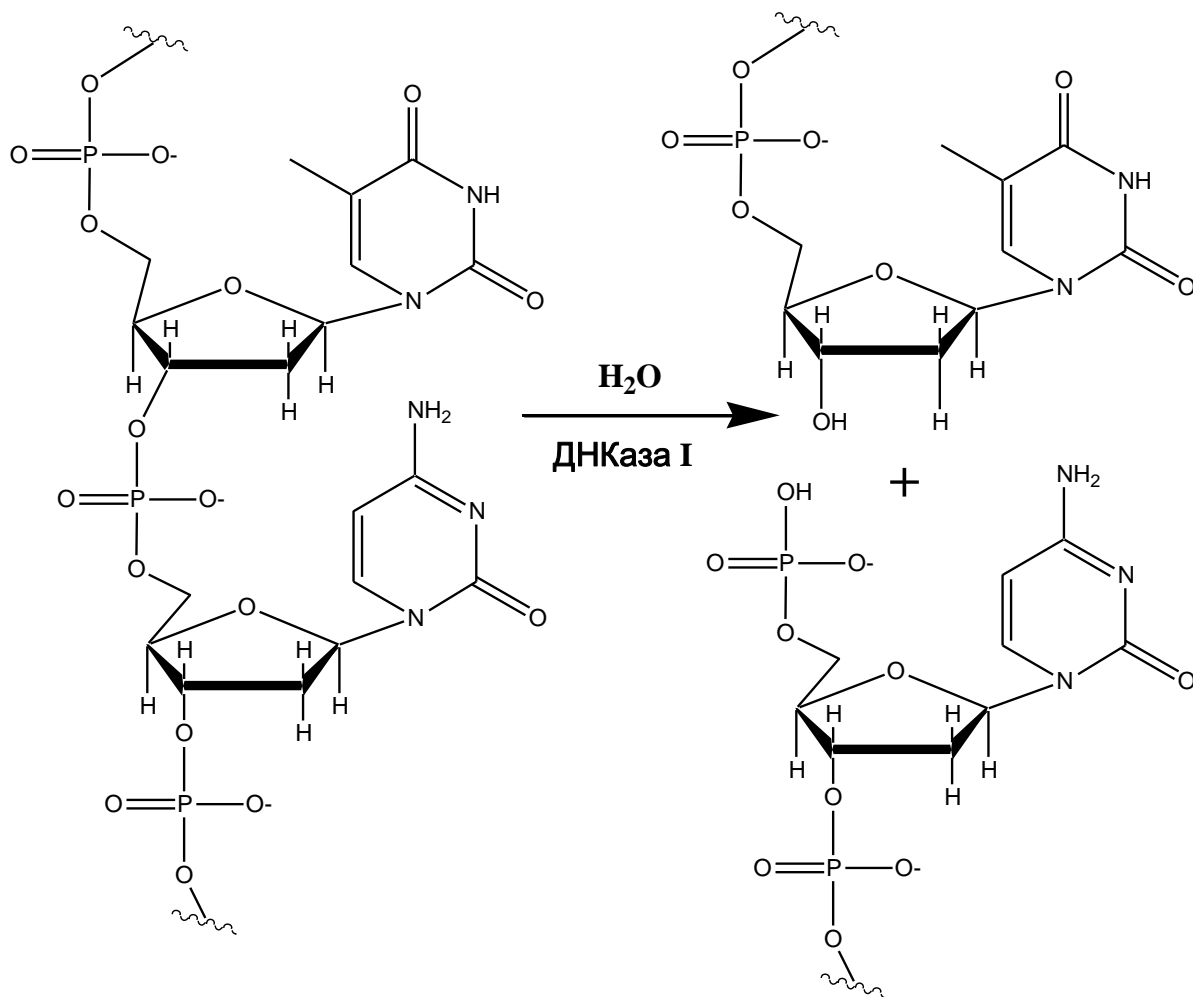
Клетки засеивали в чашки Петри со стеклянным дном за сутки до эксперимента (плотность посева 40000 клеток/чашка). Затем к клеткам добавляли раствор кальцеина 2 мг/мл в бессывороточной среде Opti-MEM, инкубировали в течение 30 мин и отмывали от красителя три раза свежим фосфатно-солевым буферным раствором, pH 7.4. Затем к клеткам добавляли комплекс поликатионов с ДНК ([N]/[P] = 15) также в бессывороточной среде Opti-MEM, инкубировали в течение 1 час в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Далее клетки анализировали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Метод конфокальной микроскопии позволяет получить высококонтрастное изображение живых клеток. Такой контраст оптического изображения достигается использованием апертурной диафрагмы, размещённой в плоскости изображения и ограничивающей поток фонового рассеянного света, идущего из глубины образца, то есть того света, который не попадает на фокальную плоскость объектива микроскопа [128].

Конфокальную микроскопию проводили на микроскопе FluoView FV1000 (Olympus Corp., Япония). Длина волны поглощения 488 нм (Ar-лазер), флуоресценцию регистрировали в области 500–600 нм. Фотографии получали с помощью программы FV10 ASW 1.7 (Olympus Corp., Япония), обрабатывали с помощью ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, США).

### 2.2.10.7 Влияние полимеров на расщепление нуклеиновых кислот под действием нуклеаз (электрофорез в агарозном геле)

Влияние наногелей на степень деградации плазмидной ДНК под действием модельной нуклеазы ДНКазы I изучали, взяв за основу методику, описанную в работе [129]. Фермент ДНКазы I расщепляет фосфодиэфирные связи в ДНК между пиримидиновыми нуклеотидами, и образует при этом полинуклеотиды с концевым 5'-фосфатом и свободной гидроксильной группой на 3'-конце (рис. 15).



**Рис. 15.** Схема реакции гидролиза ДНК под действием фермента ДНКазы I.

Фермент активируется ионами  $Mn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  и ингибируется анионами, связывающими указанные катионы, а также олигонуклеотидами. Механизм действия ДНКаз на ДНК таков, что вначале осуществляются в основном разрывы фосфодиэфирных связей в одной из цепей ДНК. Парные разрывы очень редки,



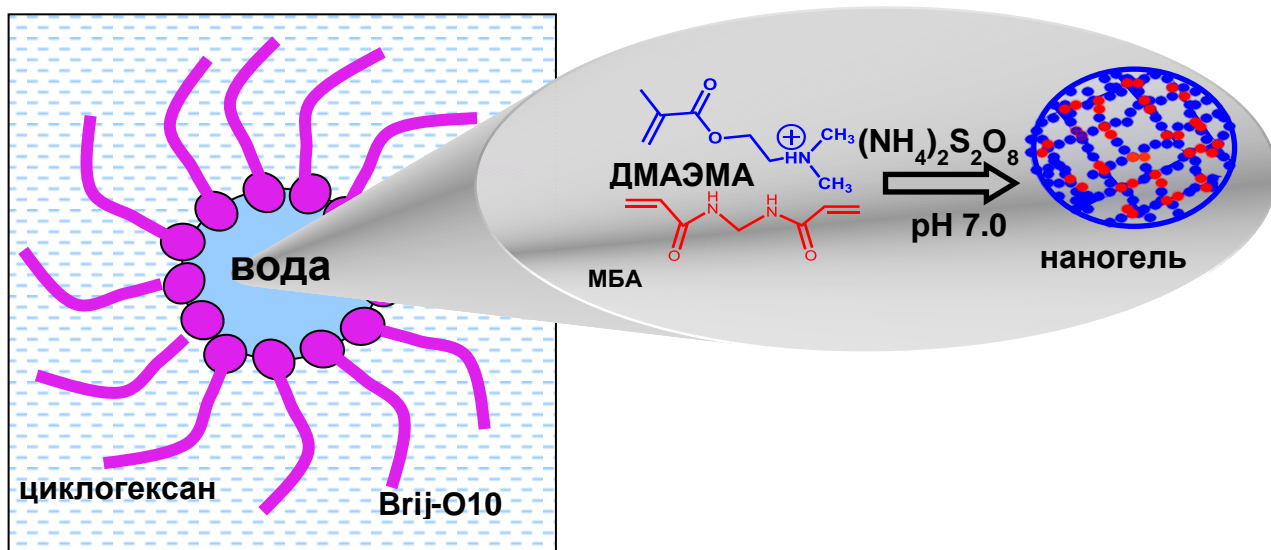
поэтому деполимеризация идет не сразу. ДНКаза I относится к классу эндонуклеаз, т.е. нуклеаз, действующих на внутренние межнуклеотидные связи. При их участии осуществляется деполимеризация нуклеиновых кислот до олигонуклеотидов [130].

Комплексы полимеров и плазмидной ДНК, содержащей ген люциферазы, концентрации 0.1 мг/мл готовили в среде MEM, содержащей HEPES (0.025 M), pH 7.0: смешивали растворы плазмидной ДНК pGL3 и ДМАЭМА в необходимом соотношении [N]/[P] и инкубировали в течение 20-30 мин при комнатной температуре. Затем 10 мкл раствора комплекса смешивали с раствором ДНКазы I (1 U/мкл, Fermentas, Lithuania) в буферном растворе, содержащем 50 mM Tris-HCl, 10 mM хлорида магния, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5), инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Деградацию останавливали добавлением 100 mM ЭДТА до конечной концентрации 20 mM (избыток по отношению к концентрации ионов кальция и магния). Для окончательной инактивации ДНКазы, образцы инкубировали 10 мин при 70°C. Для разрушения комплексов пДМАЭМА с ДНК к образцам добавляли 2 мкл 10% конкурентного полианиона полиакрилата натрия и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Агарозный гель готовили следующим образом: 1 г агарозы растворяли при нагревании в 100 мл дистиллированной воды, добавляли 2 мкл этидий-бромид, заливали горячим раствором агарозы подложку для геля с предварительно вставленной гребенкой, дожидались, пока гель застынет, и вынимали гребенку. Образцы объемом 12 мкл вносили в лунки агарозного геля, предварительно добавив к каждому образцу по 1 мкл раствора бромфенолового синего в воде, содежащего 40 % раствора глицерина в воде (для визуализации хода фореа и утяжеления образцов). Электрофорез проводили в трис-ацетатном буферном растворе (pH 8.0, 40mM mM Трис, 20 mM уксусной кислоты и 1 mM ЭДТА) в камере для горизонтального электрофореза SE-2 (Хеликон, Россия) в течение 30-60 мин. Оцифровка изображений люминесцирующей ДНК в гелях проводилась с помощью системы гель-документирования Gel Imager-2 (Хеликон, Россия). Изображения обрабатывали с помощью ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, США).

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Синтез наногелей поли-(N,N-диметил-аминоэтилметакрилата)

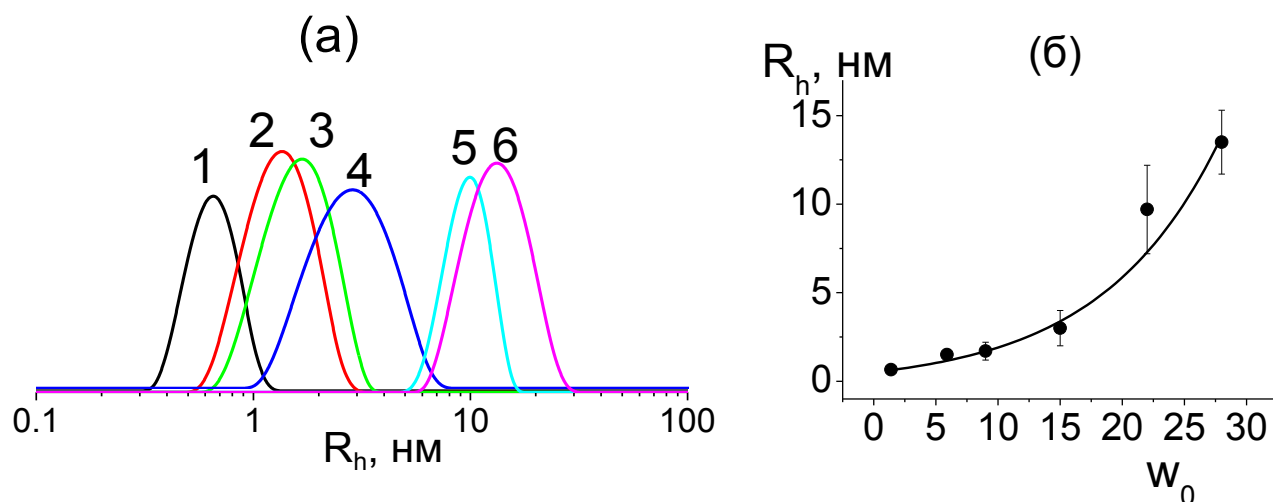
Получение наногелей проводили методом обращено-эмульсионной полимеризации в системе обращенных мицелл, образуемых олеилдекаэтиленгликолем (BrijO10). В отличие от миниэмульсий или эмульсий, формирование обращенных мицелл не требует гомогенизации или обработки ультразвуком, и происходит самопроизвольно при добавлении воды или водных растворов к мицеллярному раствору BrijO10 в циклогексане. Внутренняя полость таких мицелл заполнена водой или водным раствором мономеров, а стенка выстлана молекулами ПАВ, углеводородные хвосты которого обращены в сторону фазы циклогексана, а полярные цепи полиэтиленоксида находятся в водной фазе (рис. 16).



**Рис. 16** Строение обращенных мицелл BrijO10 в циклогексане и схема полимеризационной реакции получения наногелей.

Обращенные мицеллы представляют собой оптически прозрачную систему при температуре выше  $40^\circ\text{C}$ , поскольку размер частиц в этих условиях много меньше длины волны видимого света. Гидродинамический радиус мицелл BrijO10 в циклогексане имел достаточно широкое распределение (рис. 17a), которое закономерно сдвигалось в сторону больших размеров с ростом молярного соотношения  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}]$  от 0.7 нм при соотношении воды и BrijO10 1.4 до 14 нм

при  $[H_2O]/[ПАВ]=27$  (рис. 17б). Полученные нами результаты (рис. 17б) указывают на нелинейный рост радиуса мицелл при высоких степенях гидратации, что существенно отличается от ранее опубликованных данных о линейном увеличении радиуса мицелл диизооктилсульфосукцината натрия (Аэрозоля ОТ) при повышении степени гидратации обращенных мицелл [131].



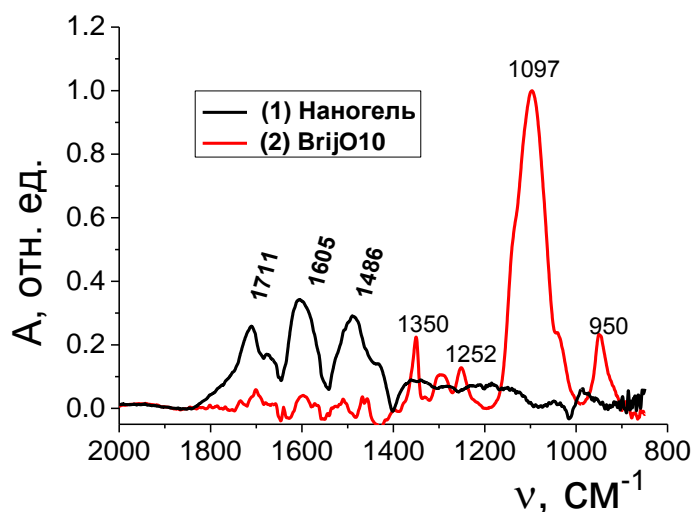
**Рис. 17** (а) Распределение гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) мицелл BrijO10 в циклогексане по интенсивности светорассеяния. Мицеллы были заполнены 2М раствором ДМАЭМА, нейтрализованного HCl до pH 7.0 при молярном соотношении вода/ПАВ,  $w_0$ , равном 1.4 (1), 5.9 (2) 9.3 (3), 15.4 (4) 21.9 (5) и 28 (6) при температуре полимеризации ( $45^\circ\text{C}$ ). (б) Зависимость среднего гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) обращенных мицелл BrijO10 от молярного соотношения  $w_0 = [\text{вода}]/[\text{ПАВ}]$ .

Одно из возможных объяснений этого явления может состоять в изменении конформации полиэтиленоксидной цепи, входящей в состав BrijO10. В циклогексане цепь полиэтиленоксида в значительной мере коллапсирована, поскольку алифатические растворители являются осадителями для ПЭГа. В то же время в сильно гидратированных мицеллах, т.е. при увеличении объема водной фазы, цепь приобретает полностью развернутую конформацию, вследствие чего происходит резкий рост размеров мицелл.

Анализ полученного полимера методом Фурье-ИК в водном растворе (рис. 18, кривая 1) показал, что в спектре заметны широкие полосы поглощения карбонильных

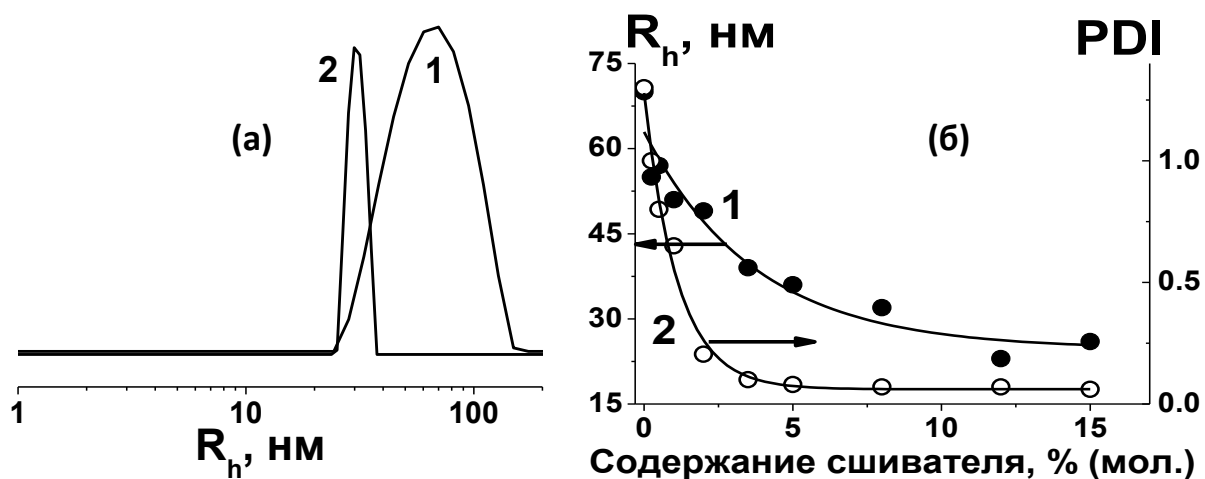
групп ПДМАЭМА ( $1711\text{ см}^{-1}$ ),  $\alpha$ -метильных и метиленовых групп ПДМАЭМА ( $1486\text{ см}^{-1}$ ) и амидных групп метилен-бисакриламида ( $1605\text{ см}^{-1}$ ) [132]. Это означает, что оба сомономера включаются в состав гидрогелевых частиц.

Анализ ИК спектра полученного образца также показывает, что в нем отсутствует полоса поглощения при  $1100\text{ см}^{-1}$ , характерная для С-О-С групп полиэтиленоксида, фрагмент которого входит в состав Brij-O10. Интенсивность этой полосы в спектре чистого ПАВ в воде очень велика (рис. 18, кривая 2). Отсутствие поглощения на этой длине волны в спектре наногеля свидетельствует о количественном отделении ПАВ от полимера в ходе выделения.



**Рис 18.** Фурье-ИК спектры 1 мг/мл растворов наногеля (1 мг/мл), и (2) BrijO10 (1 мг/мл) в водно-солевом фосфатном буферном растворе.

Анализ полученных полимеров методом динамического светорассеяния показал, что образец линейного ПДМАЭМА, синтезированного в обращенных мицеллах, характеризовался широким распределением по гидродинамическому радиусу, который в среднем составлял 70 нм (рис. 19, кривая 1). Сшитый полимер, содержащий 5% МБА, имел гораздо более узкое распределение по размерам (рис. 19, кривая 2), т.е. введение в полимер сшивателя позволяет не только уменьшить его гидродинамический радиус, но также приводит к значительному сужению распределения частиц по размерам.

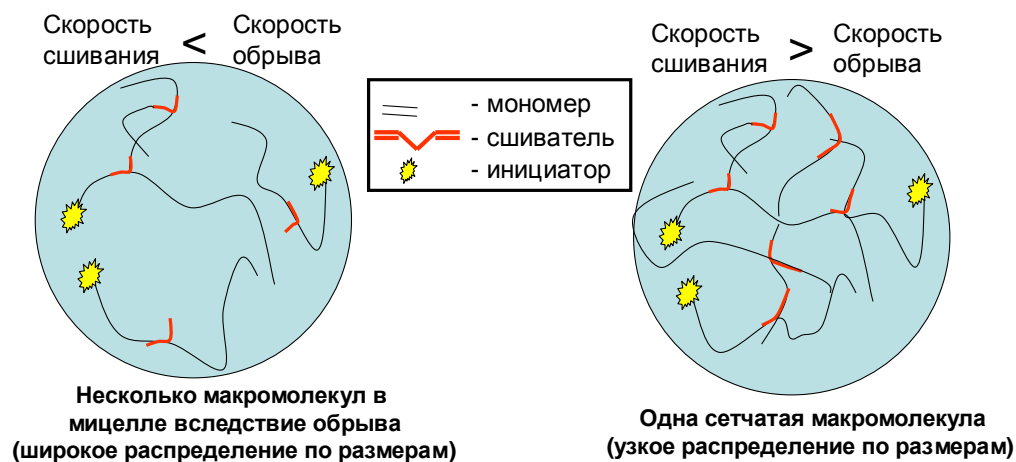


**Рис. 19.** (а) Распределение по интенсивности светорассеяния гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) линейного поликатиона ПДМАЭМА, полимеризованного в обращенных мицеллах, (1) и наногеля, содержащего 5% МБА (2). Концентрация полимеров составляла 4 мг/мл, фосфатный буферный раствор, 37°C. (б) Зависимость среднего гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) частиц наногелей (1) и индекса полидисперсности PDI (2) от молярного содержания МБА в полимеризационной смеси.

Можно предположить, что стерические ограничения, создаваемые молекулами ПАВ, препятствуют рекомбинации и диспропорционированию радикалов роста при межмицеллярных столкновениях, что способствует образованию частиц менее различающихся по размеру [133]. При этом их размер оказывается больше среднего размера мицелл, по всей видимости, вследствие межмицеллярного обмена мономером. Существенным фактором, повышающим средний размер образующихся частиц, является набухание сетчатых полиэлектролитов в водной среде, вследствие которого равновесный радиус образующихся гидрогелевых частиц также может быть несколько выше среднего радиуса мицеллярных нанореакторов. Следует отметить, что существенное превышение размеров равновесно набухшего наногеля по сравнению с наногелем, содержащимся в обращенной мицелле, ранее отмечалось для (2-(метакрилоилокси)этил)триметиламмоний хлорида [43].

Увеличение содержания МБА в интервале 0.2 – 15 мол. % приводит не только к уменьшению размера частиц (кривая 1), но и к существенному сужению их распределения по размерам (кривая 2). При содержании сшивателя выше 5%

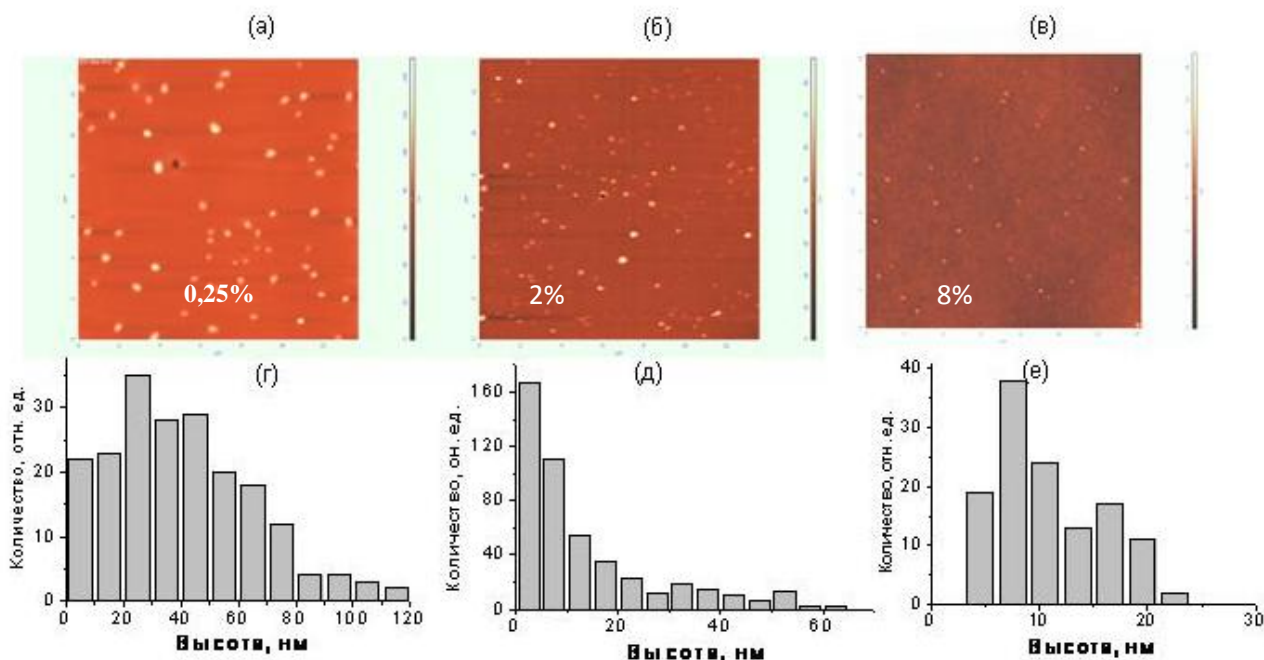
распределение частиц наногелей по размерам оставалось очень узким. Такое резкое снижение индекса полидисперсности при низких содержаниях МБА требует дальнейшего исследования, однако, можно предположить, что постепенное сужение распределения по размерам при увеличении содержания сшивателя до 2-3 мол. % МБА может быть результатом сшивания нескольких растущих цепей, находящихся внутри водной полости одной мицеллы, в одну макромолекулу. Очевидно, что вероятность такого сшивания возрастает при увеличении доли сшивающего агента, когда скорость разветвления за счет включения в цепь бифункционального мономера превышает скорость обрыва цепи (рис. 20). Наногели, полученные в присутствии сравнительно небольших количеств сшивающего агента, когда скорость обрыва цепи превышает скорость сшивания, содержат большие и малые молекулы, зародившиеся в одной мицелле. Напротив, образцы с промежуточным или высоким содержанием сшивателя содержат сшитые макромолекулы, включающие в себя весь мономер, изначально находившийся в мицеллярном реакторе.



**Рис. 20.** Схематическое объяснение причин уменьшения полидисперсности образцов наногелей при увеличении количества сшивающего агента.

Результаты исследования наногелей методами динамического светорассеяния были подтверждены методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Размер частиц уменьшался при увеличении мольной доли сшивающего агента. В образцах наногелей, содержащих 0.25%, 2% и 8% МБА, можно различить два типа частиц: очень мелкие частицы (радиус менее 5 нм) и достаточно крупные (радиус около 50

нм) (рис. 21). Содержание крупных частиц снижается с увеличением содержания сшивателя в составе наногелей. При 8% сшивателя полностью исчезает фракция крупных частиц, тогда как нангель, содержащий 0,25% МБА, содержал значительную долю крупных частиц диаметром близким к 80 нм.

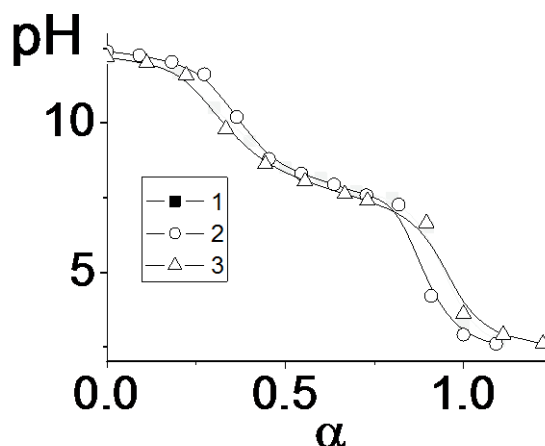


**Рис. 21.** Изображения (а-в) и распределение по размерам (г-е) образцов наногелей, содержащих 0,25% (а, г), 2% (б, д) и 8% (в, е) сшивающего агента, полученные методом АСМ.

Таким образом, разработанный метод синтеза позволяет без дополнительного фракционирования получать в одну стадию полимерные наногели с молекулярными характеристиками, которые отвечают требованиям, предъявляемым к носителям нуклеиновых кислот, а именно: гидродинамический радиус полученных полимерных частиц варьирует между 25 и 50 нм при узком распределении по размерам. Полученные данные свидетельствуют о значительном влиянии содержания сшивающего агента при синтезе наногелей на их размер. Следует отметить, что использованный в настоящей работе метод применим для полимеризации любых водорастворимых мономеров.

### 3.2. Кислотно-основные свойства наногелей

Кривые потенциометрического титрования водно-солевых растворов линейного ПДМАЭМА и наногелей, полученных при содержании сшивателя 5% и 12%, имеют сходный вид (рис. 22). В слабокислой среде при pH 5.5 (степень ионизации  $\alpha \approx 1$ ) все полимеры полностью протонированы. При нейтральном pH, степень ионизации линейного ПДМАЭМА и обоих наногелей примерно соответствует  $\alpha \approx 0.5$ , т.е. сетчатая структура наногелей не влияет на кислотно-основные свойства аминогрупп.



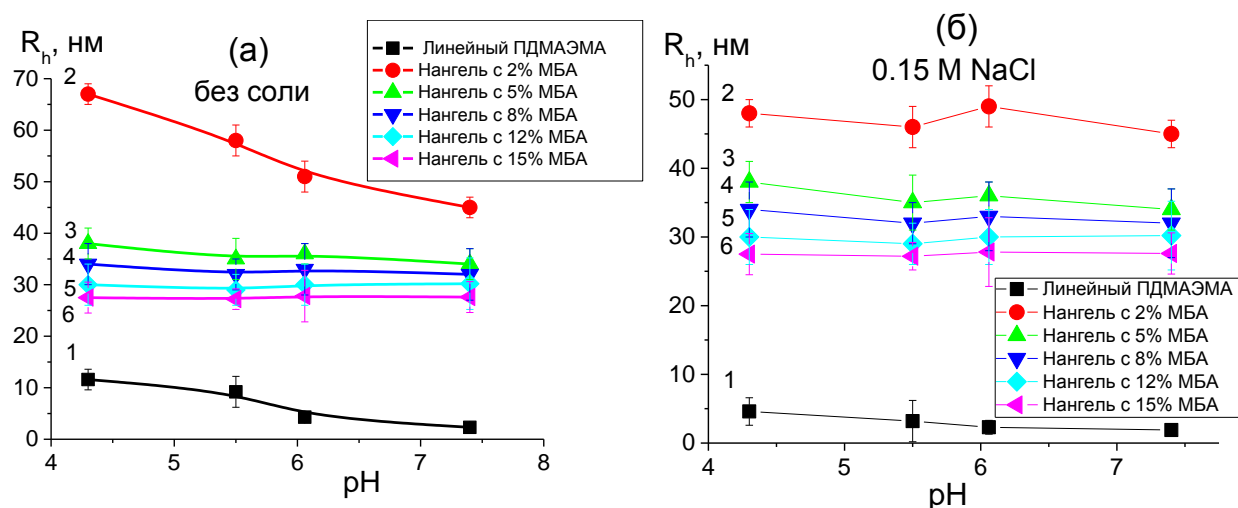
**Рис. 22.** Кривые потенциометрического титрования линейного ПДМАЭМА (1) и наногелей, содержащих 5% (2) и 12% (3) МБА. По оси абсцисс отложена степень ионизации  $\alpha$ . 0.15 М NaCl, 25°C.

Таким образом, сетчатая структура поликатиона не влияет на его кислотно-основные свойства.

Иная картина наблюдается при изучении влияния содержания сшивателя в составе поликатионов на pH-зависимое набухание полимерной макромолекулы. Влияние степени ионизации на конформацию поликатионов в растворе было исследовано методом динамического светорассеяния. Для этого были изучены зависимости коэффициентов диффузии поликатионов от pH и ионной силы раствора. В соответствии с данными литературы о влиянии pH на конформацию слабых полиэлектролитов [134], гидродинамический радиус линейного ПДМАЭМА заметно увеличивался при уменьшении pH. Очевидно, это увеличение размеров вызвано



Кулоновским отталкиванием между положительно заряженными аминогруппами полимерной цепи. Размер наногеля, полученного с 2% сшивающего агента, также увеличился при понижении pH, однако этот эффект был менее выражен, чем в случае линейного ПДМАЭМА (рис. 23). Размер частиц наногелей, содержащих 5% сшивателя и более, вообще не менялся при понижении pH раствора.



**Рис. 23.** pH-зависимость гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) линейного ПДМАЭМА (1) и наногелей с содержанием сшивателя 2% (2), 5% (3), 8% (4), 12% (5), 15% (6) в 1 мМ фосфатно-цитратном буферном растворе в отсутствие низкомолекулярного электролита (а) и в присутствии 0.15 М NaCl (б), 37°C.

Повышение концентрации NaCl до физиологического значения снижает чувствительность гидродинамического радиуса линейного ПДМАЭМА к изменению pH. Гидродинамические радиусы частиц наногеля, даже содержащие наименьшее количество сшивающего агента, 2%, оставались неизменными при уменьшении pH (рис. 23б).

Полученные результаты показывают, что сшивание поликатионов влияет на чувствительность их конформации к электростатическому отталкиванию. Включение только 2% поперечных связей в частицу наногеля привело к существенному ограничению разворачивания pH-индуцированной развернутой конформации. По всей видимости, это объясняется тем, что в наногеле даже с 2% сшивающего агента среднее расстояние между двумя узлами сетки геля не намного больше персистентной

длины ПДМАЭМА. По имеющимся в литературе данным, эта величина составляет около 27 звеньев для полностью протонированного полимера в присутствии 0.7 М соли [135]. По всей видимости, именно по этой причине изменение степени ионизации сшитого полимера при изменении рН и ионной силы слабо влияет на его гидродинамические размеры.

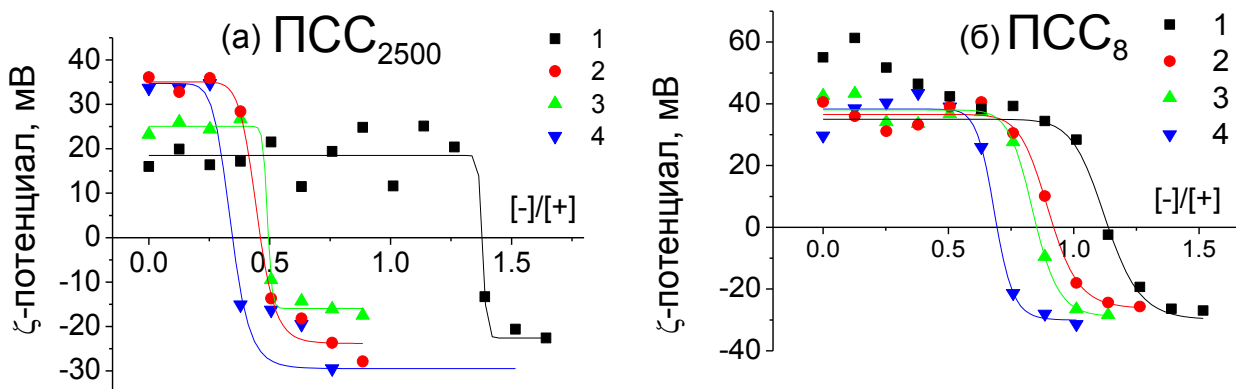
Таким образом, сетчатая структура поликатионов сильно ограничивает способность макромолекул изменять конформацию при изменении рН.

### **3.3. Взаимодействие наногелей с полианионами**

Взаимодействие синтезированных поликатионов с двумя образцами линейного полистиролсульфоната натрия, сильно различающихся по степени полимеризации (2500 и 8), изучали методом лазерного микроэлектрофореза, измеряя электрофоретическую подвижность и  $\zeta$ -потенциал комплексов при варьировании валового соотношения стиролсульфонатных и диметиламиногрупп (рис. 24). Во всех случаях по мере увеличения содержания ПСС в системе  $\zeta$ -потенциал вначале почти не менялся, оставаясь положительным, но при некотором критическом соотношении компонентов начинал резко снижаться, проходил через 0, и затем становился отрицательным. Соотношение компонентов, соответствующее нулевому заряду, является характеристикой данного образца поликатиона и показывает содержание в нем аминогрупп, доступных для взаимодействия с данным полианионом. Видно, что доступность аминогрупп в наногелях сильно отличалась от их доступности в линейном ПДМАЭМА. Так, для длинного ПСС ( $P_n=2500$ ) состав системы, соответствующий нулевому заряду комплекса с линейным ПДМАЭМА составлял около 1,4. Однако при взаимодействии этого же образца ПСС с наногелями этот параметр составлял 0,5, 0,45 и 0,4 (рис. 24а) для наногелей, содержащих 2%, 5% и 12% сшивающего агента соответственно.

Прежде чем двигаться дальше, необходимо рассмотреть причины отклонения от 1 соотношения зарядов в комплексе линейного ПДМАЭМА и ПСС, соответствующего нулевой электрофоретической подвижности. (рис. 24а, кривая 1 и рис. 24б, кривая 1). Как правило, состав комплексов, соответствующих нулевой электрофоретической

подвижности, соответствует эквимольному соотношению зарядов. Однако в литературе описано несколько примеров отклонения от 1 соотношения заряженных групп в комплексах, характеризующихся нулевой электрофоретической подвижностью. Электрофоретическая подвижность комплексов линейного PEI 2,5 кДа с ПСС становится нулевой при мольном соотношении зарядов  $[-]/[+]$  примерно 1,67 [136]. Повышенное значение точки нулевой электрофоретической подвижности было зафиксировано и для комплексов поли(диметилдиаллиламмоний) хлорида с чередующимся сополимером малеинового ангидрида и альфа-метилстирола [137, 138] и полиэтиленсульфоната [139]. Эти примеры показывают, что разница между точкой нулевой электрофоретической подвижности и молярной стехиометрии заряда не связана с силой поликатиона. Скорее всего, точка достижения нулевой подвижности может не совпадать с точкой исчезновения заряда в гетерогенной системе полиэлектролитов благодаря высокой конформационной подвижности полианиона. Выяснение причин выявленного отклонения выходит за рамки нашего исследования и заслуживает особого рассмотрения.

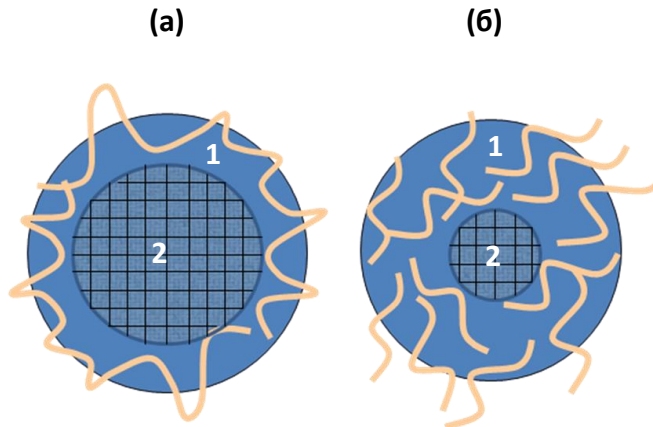


**Рис. 24.** Зависимость  $\zeta$ -потенциала комплексов, образованных полистиролсульфонатом натрия со степенью полимеризации 2500 (а) и 8 (б) с линейным ПДМАЭМА (1) и наногелями, содержащими 2%, (2), 5% (3) и 12% (4) (мол.) сшивателя, от мольного соотношения зарядов в системе. Буфер 5 мМ трис-уксусная кислота, рН 7.0.

Значительное уменьшение соотношения зарядов в комплексах наногелей, соответствующее нулевой электрофоретической подвижности, указывает на

уменьшение доступности аминогрупп в наногелях. Эти изменения позволили оценить долю аминогрупп  $\alpha$ , доступных для полианиона, как состав электронейтральных комплексов, образуемых наногелями, нормированный на состав 1,4, отвечающий нейтрализации линейного ПДМАЭМА. Доля доступных аминогрупп составляла 0,35, 0,32 и 0,28, соответственно. Это означает, что длинный ПСС может взаимодействовать лишь с 30% аминогрупп наногеля, а остальные группы, локализованные, по всей видимости, внутри гелевых частиц, недоступны для взаимодействия с полиэлектролитом.

При взаимодействии наногелей ПДМАЭМА с олигомерным полианионом ( $P_n=8$ ) эта тенденция сохранялась, но различия между линейным ПДМАЭМА и наногелями, полученными с различными количествами сшивающего агента были значительно менее выражены. В этом случае состав комплекса, соответствующий нулевому заряду, снижался от 1,2 для линейного ПДМАЭМА до 0,9, 0,8 и 0,7 для наногелей, содержащих соответственно 2%, 5% и 12% (мол.) сшивателя (рис. 24б, кривая 2). То есть доля доступных аминогрупп  $\alpha$  в наногелях составляла соответственно 0,75, 0,66 и 0,58.



**Рис. 25.** Схематическое изображение доступной (1) и недоступной (2) для высокомолекулярного (а) и олигомерного (б) полианиона областей наногелевой частицы

Таким образом, изучение взаимодействия поликатионов с ПСС выявило существенные различия между линейным полимером и наногелями. Полученные результаты указывают на наличие, по крайней мере, двух зон в частице наногеля, одна из которых может образовывать ионные пары с полианионами, а другая – недоступна

для такого взаимодействия. При этом способность полианиона проникать внутрь наногелевой частицы увеличивается с понижением его молекулярной массы и степени сшивки частиц (рис. 25). Этот результат представляется совершенно естественным, поскольку способность коротких заряженных молекул проникать внутрь противоположно заряженных дендримеров [140, 141] и ферментов [142, 143] была показана ранее.

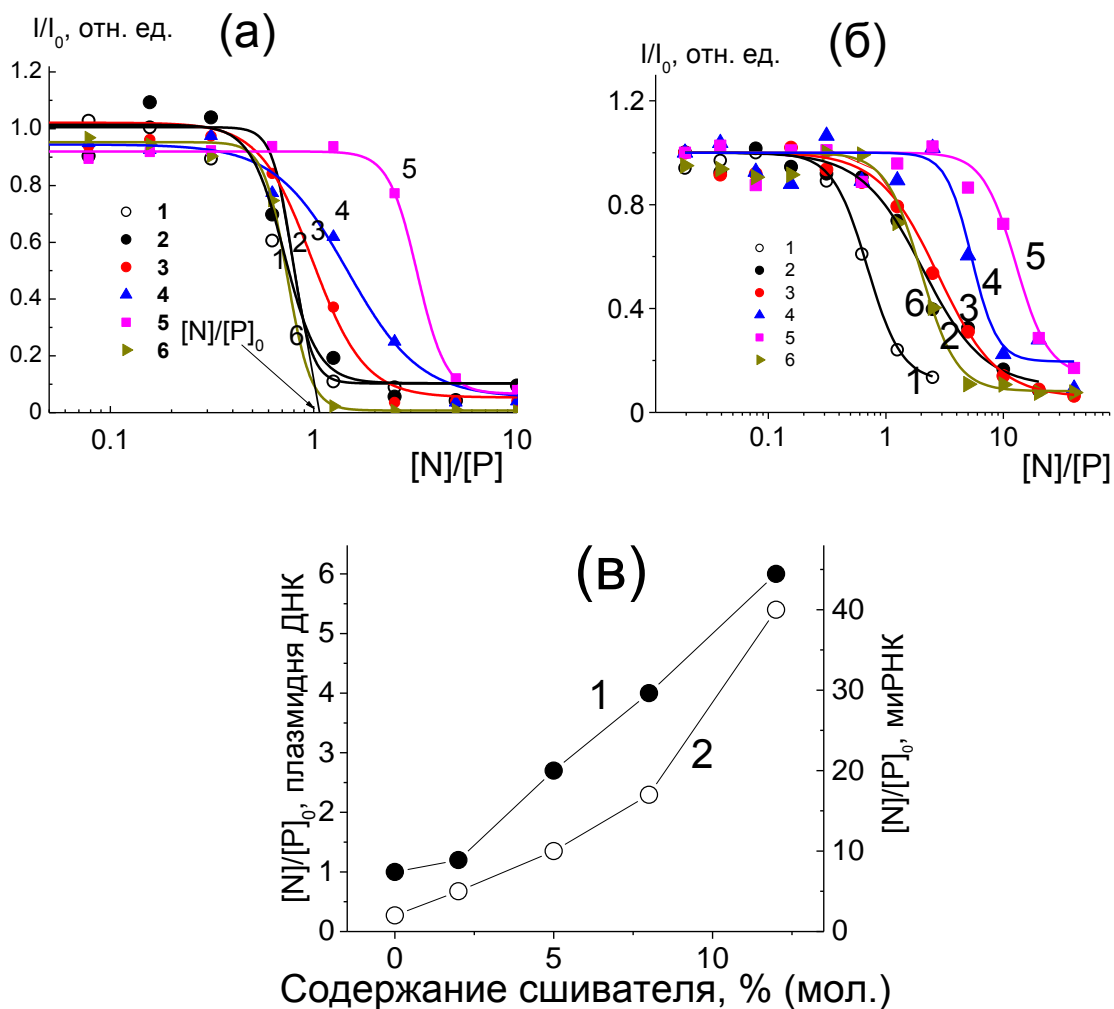
Обнаруженное явление по своей сути аналогично давно известному из ионообменной хроматографии белков явлению комбинации эффектов гель-фильтрации и электростатической адсорбции, когда небольшие по размеру пептиды способны проникать в поры макроскопического геля, остающиеся свободными после адсорбции крупных белков на поверхности гранул геля [144]. В нашей работе мы впервые продемонстрировали, что этот эффект наблюдается не только для макро- и микроскопических гелей, но и для сшитых систем наноскопических размеров.

На следующем этапе работы мы исследовали, как влияет количество сшивающего агента, использованного для получения наногелевых частиц, на их взаимодействие с жесткой двуспиральной молекулой ДНК. Величина сегмента Куна нуклеиновой кислоты составляет 100 нм [145], что существенно превышает величину 3.9 нм, характерную для ПСС аниона [146].

Способность наногелей взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами была изучена путем анализа вытеснения интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green. При встраивании красителя между основаниями ДНК можно наблюдать интенсивную флуоресценцию при длине волны 525 нм, которая уменьшается при вытеснении молекулы красителя из двойной спирали в окружающий раствор.

Флуоресценция комплексов SYBR Green с плазмидной ДНК (рис. 26а) и миРНК (рис. 26б) полностью тушилась при добавлении почти эквивалентных количеств линейного ПДМАЭМА (кривая 1) и разветвленного PEI (кривая 6). В противоположность этому значение  $[N]/[P]_0$ , соответствующее полному вытеснению красителя ((рис. 26а, кривые 2-5)) увеличивается с ростом содержания МБА в наногелях (рис. 26в). При этом введение только 5% сшивателя в состав наногеля

приводило к повышению значения  $[N]/[P]_0$  от 1 до 3 для плазмидной ДНК, что указывает на недоступность почти 70% аминогрупп в наногеле для плазмидной ДНК. Дальнейшее увеличение степени сшивки приводило к дополнительному существенному уменьшению доступности аминогрупп для плазмидной ДНК (рис. 24в).



**Рис. 26.** Вытеснение интеркалирующего красителя SYBR Green из его комплексов с ДНК (а) и миРНК (б) путем добавления линейного ПДМАЭМА (1), наногелей, содержащих 2% (2), 5% (3), 8(4), 12% (5) МБА и ПЭИ (6). Концентрация нуклеиновых кислот составляла 50  $\mu\text{M}$ . (в) Зависимость концентрации поликатионов, достаточной для полного вытеснения SYBR Green из комплексов с плазмидной ДНК (кривая 1) и миРНК (кривая 2) от содержания сшивателя в полимеризационной смеси при синтезе поликатионов.

Оказалось, что для полного вытеснения красителя из комплекса с короткой миРНК, состоящей из 21 пары оснований, требовались даже более высокие соотношения  $[N]/[P]$  (от 7 до 40) (рис. 26б, кривые 2-5, рис. 26в, кривая 2). Это говорит о том, что в отличие от гибкого короткоцепочечного ПСС, жесткая молекула двуспиральной миРНК не проходит в поры наногеля, а формирование ее комплекса с сетчатым полиэлектролитом происходит лишь при большом избытке аминогрупп поликатиона.

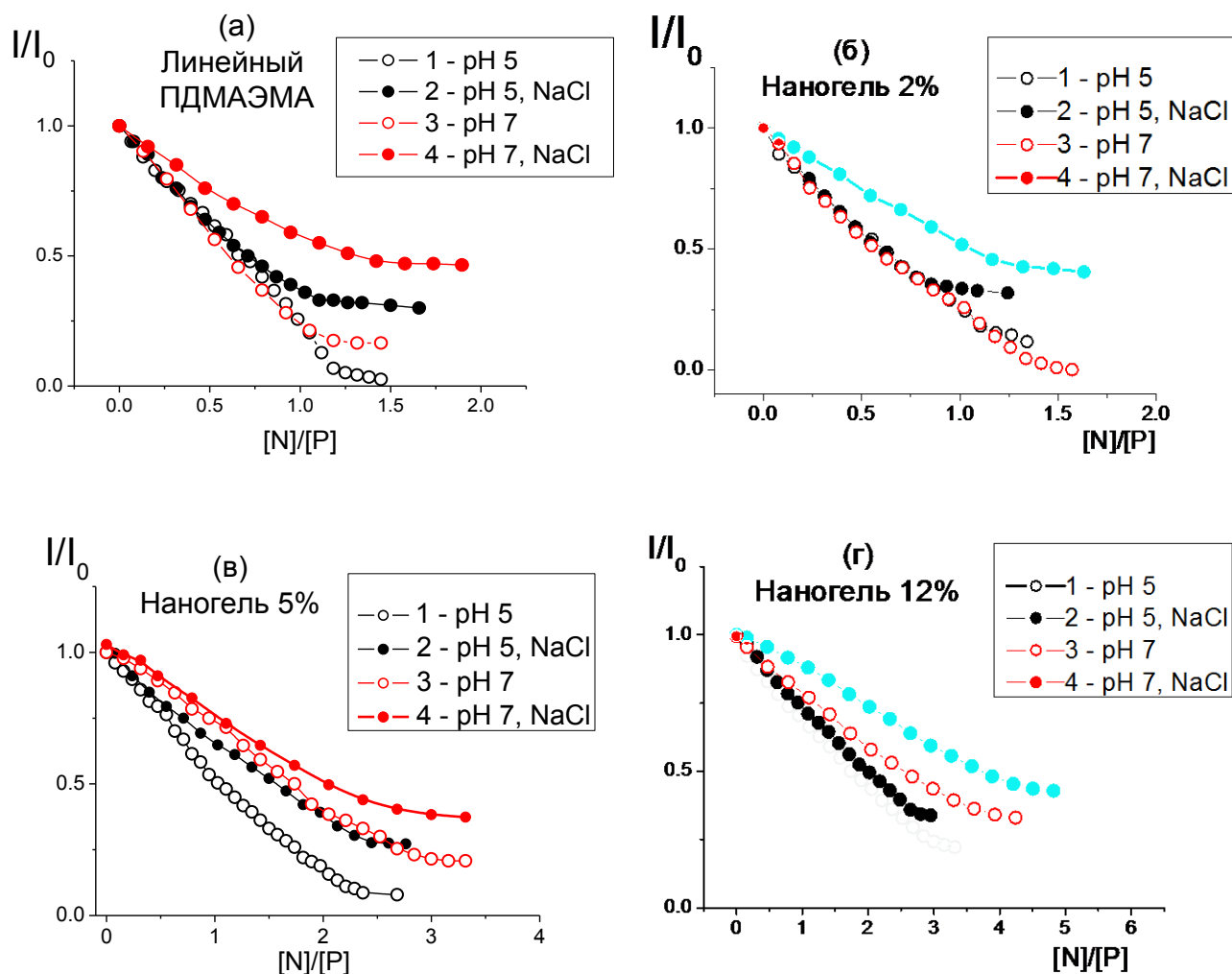
Полученные результаты свидетельствуют о том, что при большом избытке наногели связываются как с миРНК, так и с плазмидной ДНК, и только поверхностные группы частиц наногелей участвуют в этом взаимодействии.

Такие же закономерности наблюдались при изучении вытеснения другого интеркалирующего красителя бромистого этидия (БЭ) из комплексов полимеров на основе ДМАЭМА и ДНК сельди (рис. 27). Так же, как и в случае SYBR Green, при встраивании БЭ между парами оснований двойной спирали интенсивность флуоресценции раствора резко увеличивается. Добавление катионного полимера приводит к конкурентному вытеснению интеркалятора из ДНК в раствор, что сопровождается тушением флуоресценции БЭ [147].

В нейтральной среде при последовательном добавлении линейного ПДМАЭМА к комплексу ДНК-краситель при рН 7,4 интенсивность флуоресценции снижалась до точки соотношения зарядов, близкой к 1 (рис. 27а, кривая 3). Наногели же вытесняли краситель заметно слабее. Например, для полного вытеснения красителя требовался 3-х-кратный избыток сильно сшитого наногеля (12% сшивки) (рис. 27г, кривая 3). Слабо сшитый наногель (2%) отличался от линейного полимера не так сильно (рис. 27). Доля доступных для ДНК аминогрупп в наногеле постепенно снижалась от 0,7 для слабосшитого наногеля (2%) до 0,25 для наногеля, содержащего 12 мольн.% сшивателя.

Снижение рН от 7 (рис. 27 кривые 3 и 4) до 5 (рис. 27, кривые 1 и 2), при котором все аминогруппы ПДМАЭМА заряжены, не оказало заметного влияния на вытеснение красителя, по-видимому, вследствие того, что в нейтральной среде локальный рН

вблизи молекулы ДНК значительно снижен из-за электростатического притягивания протонов. Известно, что локальное изменение рН вблизи макромолекул полиэлектролитов может достигать 2 единиц рН [148]. Вследствие этого в нейтральной среде в образовании полиэлектролитного комплекса участвуют все доступные аминокруппы, независимо от их  $pK_a$ .

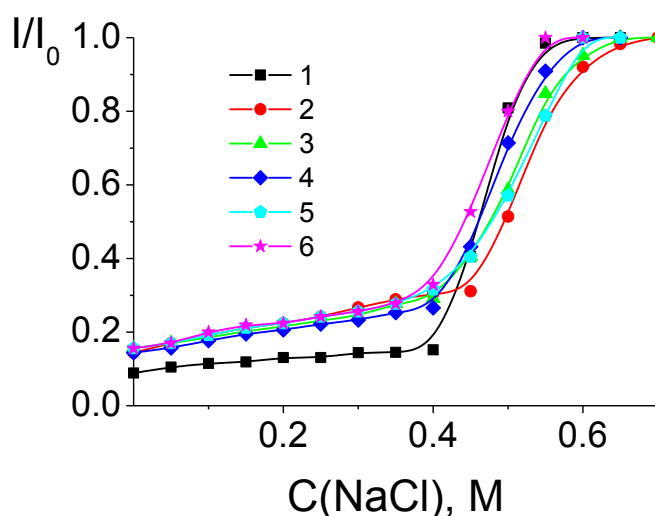


**Рис. 27.** Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса ДНК-БЭ от мольного избытка аминокрупп линейного ПДМАЭМА (а) и наногелей, содержащих 2 (б), 5 (в), 12 (г) мол.% сшивателя при рН 5, в отсутствие низкомолекулярного полиэлектролита при рН 5 (кривые 1) и рН 7 (кривые 3), а также в присутствии 0.15 М NaCl при рН 5 (кривые 2) и рН 7 (кривые 4),  $\lambda_{\text{возб.}} = 520$  нм,  $\lambda_{\text{флуор.}} = 605$  нм, 25°C.



Добавление хлорида натрия в концентрации, соответствующей физиологической ионной силе (0,15 М), также не вызвало значительных изменений в системе (рис. 27, кривые 2 и 4). Таким образом, относительно слабая способность наногелей вытеснять интеркалирующий краситель в основном определяется их сетчатой структурой и ограниченным доступом к внутренним аминок группам наногеля.

Метод вытеснения интеркалирующего красителя также может быть использован для изучения диссоциации полиплексов в присутствии низкомолекулярного электролита. Разрушение ионных пар приводит к появлению свободных участков двойной цепи, в которые интеркалирует краситель, вызывая повышение интенсивности флуоресценции  $I$ . Полной диссоциации комплексов соответствует  $I/I_0 = 1$ , где  $I_0$  – это интенсивность флуоресценции комплекса ДНК-БЭ при тех же условиях.



**Рис. 28.** Влияние ионной силы на стабильность комплексов ДНК с линейным ПДМАЭМА (1) и наногелями, содержащими 2% (2), 5% (3), 8% (4), 12% (5) и 15% (6) МБА.  $[N]/[P]=7.5$

Оказалось, что при физиологической ионной силе, 0,15М NaCl, различия в интенсивности флуоресценции комплексов ДНК с линейным ПДМАЭМА и всеми исследованными наногелями незначительны (рис. 28). Однако при дальнейшем добавлении хлорида натрия происходит полное разрушение комплексов, проявляющиеся в резком повышении интенсивности флуоресценции полиплексов в

присутствии 0.5-0.6 М NaCl. Концентрация соли, при которой происходит разрушение комплексов, практически одинакова для всех полимеров, т.е. сетчатая структура не влияет на кооперативность ионных взаимодействий в полиэлектролитных комплексах. Данный вывод вполне ожидаем, так как стабильность интерполиэлектролитных комплексов в водно-солевой среде определяется в основном природой заряженных групп и расстоянием между зарядами, нежели общим числом ионных пар [149].

Очевидно, что глубина проникновения зависит от жесткости полианиона. Например, как следует из рис. 22, около 40% аминокрупп наногеля, содержащего 12% (мол.) сшивающего агента, были доступны для длинного ПСС-аниона (степень полимеризации 2500), а нуклеиновая кислота способна связывать не более 25% аминокрупп данного наногеля (рис. 27). Другими словами, гибкие цепочки ПСС могут проникать внутрь наногеля глубже, чем жесткая двухцепочечная плазмидная ДНК. Этот факт в целом согласуется с опубликованными данными по проникновению катионизованного декстрана [150], поли-L-лизина [151] и поли-(N, N-диметилдиаллиламмоний хлорида) [152] внутрь полиэлектролитных микрогелей или целлюлозных волокон. Даже короткие олигомеры не могут распределиться на весь объем наногеля из-за образования слоя сколлапсированного комплекса на поверхности частиц наногеля. О подобном явлении ранее сообщалось для макроскопических полиэлектролитных гелей [153].

Итак, мы показали, что сетчатая структура поликатиона влияет на его взаимодействие с полианионами, причем доля сшивателя, использованного при получении наногелей, определяет долю аминокрупп, участвующих в образовании комплекса. Естественно ожидать, что и структура образующихся комплексов, и в первую очередь их размер, также может зависеть от степени сшивки наногелей. Между тем, как было отмечено в обзоре литературы, размер комплексов ДНК с поликатионами имеет решающее значение для их способности проникать в клетку.

### **3.4 Размер комплексов наногелей с ДНК**

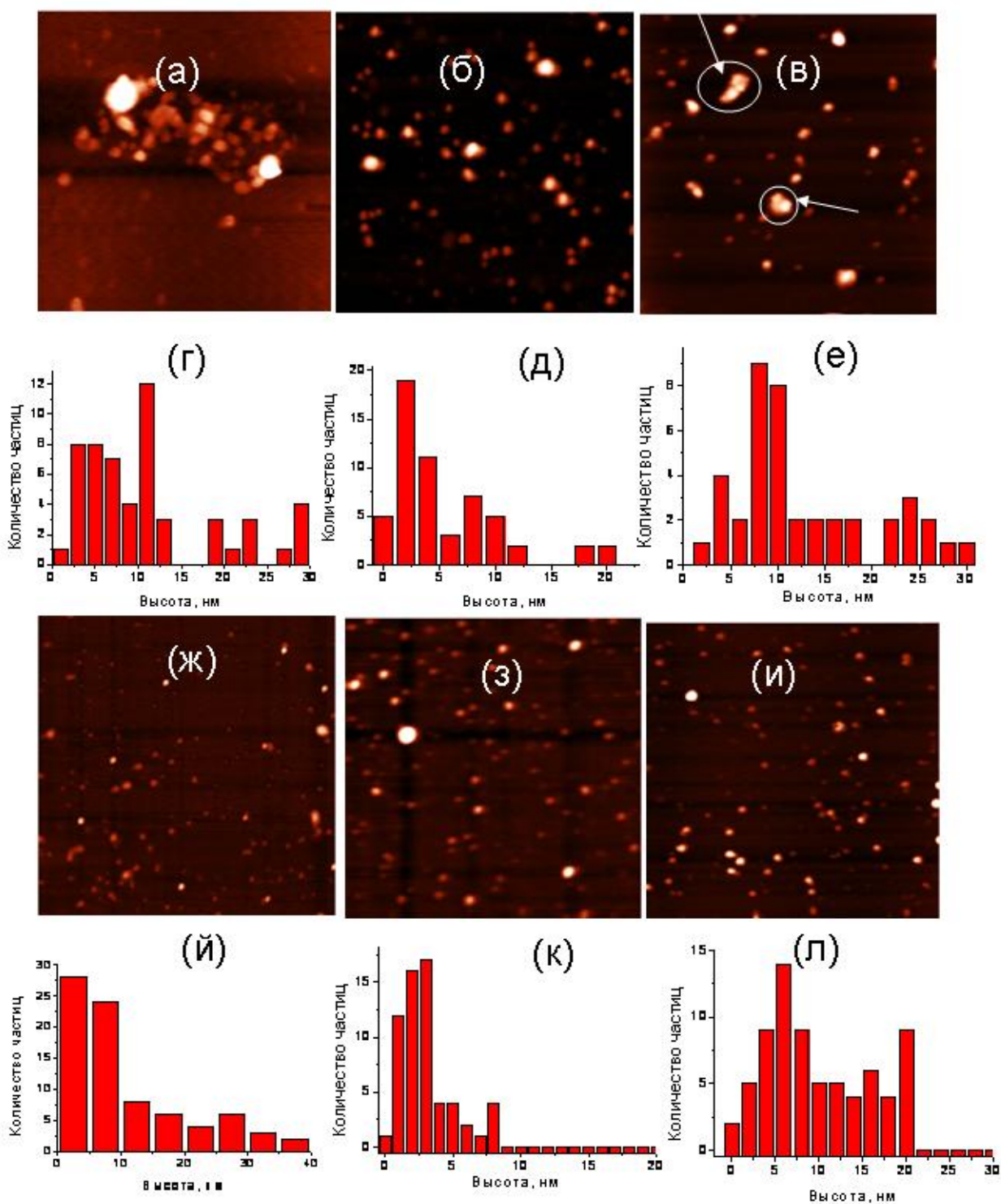
Одно из требований, предъявляемых к полиаминам как к катионным носителям, - это способность образовывать с ДНК частицы диаметром около 100-150 нм,

поскольку частицы такого размера наиболее эффективно эндоцитируются [68]. Наибольшая эффективность трансфекции достигается при образовании растворимых комплексов, полученных в избытке поликатиона при физиологических условиях (рН 7,4, 0,15 М NaCl) [98, 147]. В таких системах свободные цепи поликатиона находятся в равновесии с комплексом. Поэтому в данной работе мы изучили размеры комплексов, полученных в условиях избытка поликатиона. Исследование размеров частиц проводили методами атомно-силовой зондовой микроскопии (АСМ) и динамического светорассеяния.

Изучение комплексов плазмидной ДНК с линейным поликатионом и наногелями методом атомно-силовой микроскопии показало, что при составе комплексов  $[N]/[P]=7.5$  и  $[N]/[P]=15$  свободная ДНК в образцах не регистрировалась. Это говорит об эффективном связывании ДНК наногелями.

Поскольку образцы для атомно-силовой микроскопии были получены высушиванием разбавленных растворов комплексов на слюде, частицы имели форму сфер, сплюснутых в вертикальном направлении. Размер частиц в вертикальном направлении (10-30 нм) значительно меньше, чем в горизонтальном (20-50 нм). При этом круглая форма высушенных частиц, по всей видимости, свидетельствует о том, что комплексы наногелей и линейного ПДМАЭМА с ДНК имеют в растворе сферическую форму, характерную для комплексов ДНК с поликатионами. Полагая, что размеры и форма высушенных сплюснутых частиц пропорциональны размерам набухших частиц, мы проанализировали изменения высот при варьировании содержания сшивателя, использованного при синтезе наногелей.

Во всех изученных системах содержались два типа сферических частиц, которые, по всей видимости, отвечали свободным частицам наногелей и их комплексам с ДНК. Оказалось, что сетчатые полимеры с разным содержанием сшивателя образовывали комплексы разного размера.



**Рис. 29.** Изображения, полученные методом АСМ (а-в, ж-и) и распределение частиц по высоте (г-е, й-л), комплексов ДНК с линейным ПДМАЭМА (а, г, ж, й), с наногелем, полученным с 2% сшивки (б, д, з, к) и 12% сшивки (в, е, и, л) при  $N/P=7.5$  (а-е) и 15 (ж-л). Высота частиц на изображениях показана в цветовой шкале (чем выше, тем светлее).

В образцах, полученных из комплексов линейного ПДМАЭМА при  $[N]/[P]=7.5$  и  $15$ , в основном видны частицы высотой  $5-10$  нм, совпадающей по размерам с макромолекулами полимера, а также содержали небольшую фракцию высотой  $20-30$  нм, отвечающую, по всей видимости, частицам комплекса полимера с ДНК. Образец, содержащий комплексы, образованные наногелем с  $2\%$  сшивающего агента, содержал частицы меньшей высоты ( $2.5-5$  нм, рис. 29б, д), чем образец, содержащий комплексы линейного полимера ( $5-10$  нм, рис. 29а, г). Комплексы, образованные наногелем с высокой плотностью сшивки  $12\%$ , обнаруживали большую склонность к агрегации и образовывали частицы высотой  $20-30$  нм (рис. 29в, е). При увеличении соотношения  $[N]/[P]$  от  $7.5$  до  $15$  возрастало количество несвязанных катионных частиц, при этом количество частиц комплекса наногелей с ДНК не менялось.

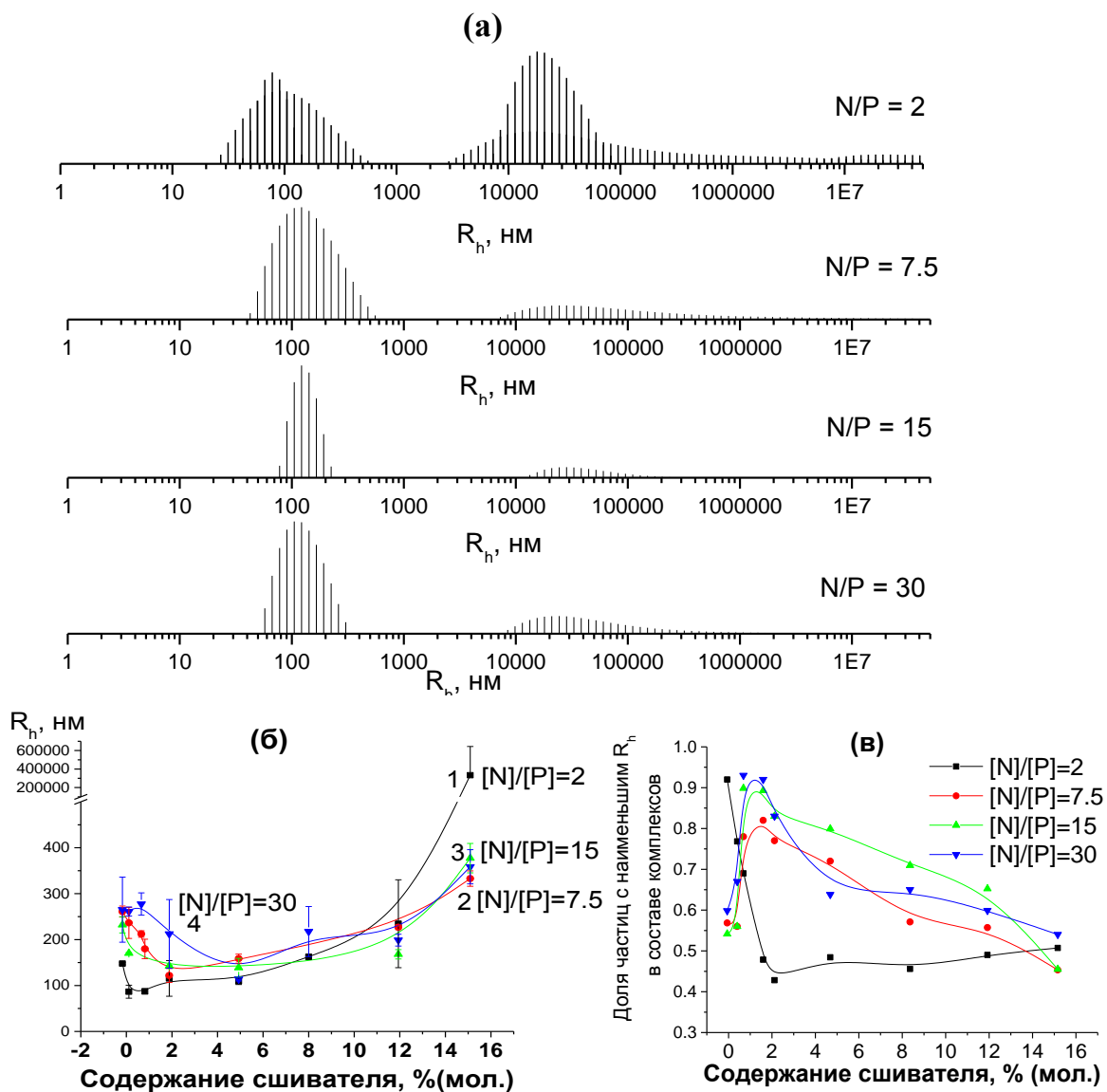
Таким образом, анализ структуры комплексов наногелей с ДНК методом атомно-силовой зондовой микроскопии показал, что наногель с промежуточной степенью сшивки  $2\%$  образует слабо агрегирующие комплексы небольшого размера.

Более детально зависимость размеров комплексов от степени сшивки наногелей была исследована методом динамического светорассеяния. В отличие от атомно-силовой микроскопии, этот метод позволяет изучать размеры комплексов в разбавленных водных растворах в условиях близких к тем, которые используются при работе с культурами клеток (физиологическая ионная сила  $0.15$  М NaCl, pH  $7.4$ ,  $37^\circ\text{C}$ ).

Оказалось, что все поликатионы при взаимодействии с ДНК образовывали комплексы, характеризующиеся бимодальным распределением по размерам (рис. 28а), причем «быстрая» фракция комплексов имела гидродинамический радиус, варьирующий от  $100$  до  $300$  нм, в зависимости от содержания сшивателя в составе мономерной смеси. При этом «медленная» фракция характеризовалась радиусом в несколько микрометров. Очевидно, что крупные частицы, отвечающие «медленной» фракции комплексов, не могут проникать в клетку. Поэтому можно ожидать, что наибольшую эффективность при транспорте ДНК в клетки будут проявлять комплексы, содержащие наименьшие количества крупных частиц, отвечающих «медленной» фракции.

Исследование комплексов поликатионов с ДНК методом динамического светорассеяния при фиксированном содержании сшивателя, использованного при синтезе наногеля, показало, что с ростом осново-мольного избытка поликатиона по отношению к ДНК ( $[N]/[P]$ ) средний гидродинамический радиус «быстрой» фракции комплексов немного увеличивается (рис. 30б). Однако доля быстрой фракции при этом значительно возрастает: если при  $[N]/[P]=2$  доля малых частиц составляла не более 0.5 для большинства поликатионов, то при увеличении избытка катионного полимера доля малых частиц увеличивалась до 0.6-0.95 (рис. 30в).

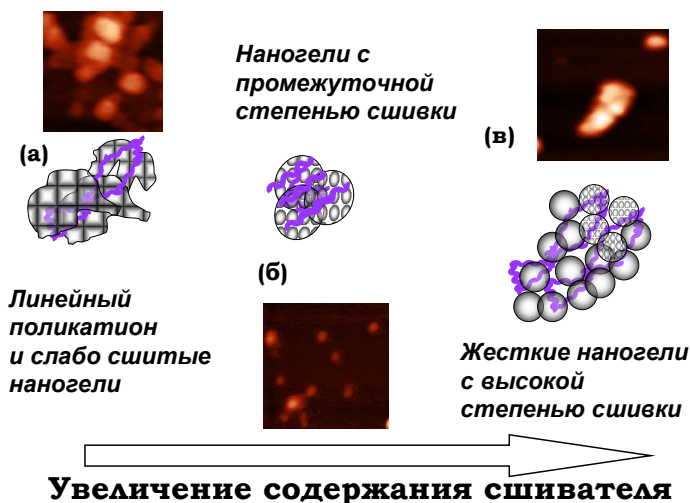
Варьирование количества сшивателя, использованного при получении наногелей, приводило к изменению размеров комплексов, причем было заметно небольшое уменьшение размеров комплексов от 250 до 100 нм при увеличении содержания сшивателя в интервале от 0 до 2%, а при дальнейшем его увеличении наблюдался заметный рост размеров до 200-300 нм. Наиболее яркие изменения при варьировании содержания сшивателя наблюдались по содержанию малой фракции в комплексах (рис. 30в). Наногель, полученный с 2% сшивающего агента, образовывал комплексы, в которых при  $[N]/[P]=15$  и 30 практически отсутствовала «медленная» (10 мкм) фракция. Таким образом, мы установили, что способность катионных наногелей конденсировать ДНК зависит не только от соотношения компонентов в составе комплексов, что было известно ранее [154, 155, 156], но, в случае сетчатых поликатионов, также определяется содержанием в их составе сшивающего агента.



**Рис. 30.** Распределение по интенсивности светорассеяния гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) комплексов наногеля с 2 % мольн. сшивателя при разных значениях  $[N]/[P]$  (от 2 до 30) (а) Зависимость среднего гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) малых частиц комплекса плазмидной ДНК и наногелей (б) и доли малых частиц в комплексе от мольной доли МБА в наногелях (в) от содержания сшивателя в полимеризационной смеси при разных значениях  $[N]/[P]$  (от 2 до 30).

Изменение свойств комплексов наногелей с ДНК при варьировании содержания в них сшивающего агента, по всей видимости, объясняется наложением двух факторов, действующих на размер образующихся частиц в противоположные стороны. Один из этих факторов - это отмеченное нами выше уменьшение размеров наногелей с

повышением содержания сшивателя (рис. 19б), а другой - повышенная жесткость сильно сшитых частиц. По мере увеличения количества сшивателя в составе наногеля должно уменьшаться среднее расстояние между узлами сетки ( $m_c$ ). Вследствие этого при увеличении содержания сшивателя от 0 до 2-3% увеличивается размер предельно набухших частиц. Можно предположить, что это является причиной увеличения размеров комплексов поликатионов с ДНК при изменении содержания сшивателя до 2% (рис. 31а). Дальнейшее увеличение содержания сшивателя должно приводить к существенному увеличению жесткости (уменьшению деформируемости) наногелевых частиц. Такие слишком сильно сшитые наногели, полученные в присутствии 8-15% сшивающего агента, представляют собой почти твердые сферы. Поэтому при образовании комплекса они не могут подстраивать свою конформацию под структуру ДНК, и поэтому, будучи добавленными к ДНК в большом избытке, формируют на поверхности комплекса толстую полимерную оболочку (рис. 31в). При содержании сшивателя около 2-5% эти факторы, по всей видимости, уравниваются, что и способствует формированию малых частиц (рис. 31б).



**Рис. 31.** Схематическое изображение причин изменения размеров комплексов плазмидной ДНК (показана фиолетовым цветом) с поликатионами (показаны серым) при увеличении среднего содержания сшивателя в частицах. Для сравнения показаны фрагменты АСМ-изображений, взятых из рис. 29, иллюстрирующие изменения размеров комплексов.



Нельзя исключить, что еще одним фактором, способствующим формированию комплексов малого размера, является совпадение размеров катионного наногеля и персистентной длиной нуклеиновой кислоты (около 100 нм). Можно предположить, что в этом случае наиболее выгодным способом формирования комплекса может быть «накручивание» ДНК на наногелевую частицу. Однако это возможно при определенном размере таких частиц, который должен соответствовать наименьшим напряжениям конформации при формировании комплекса.

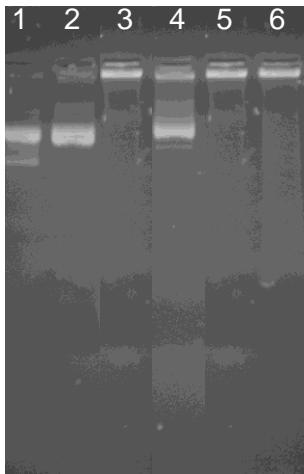
### **3.5 Защита ДНК от ферментов**

Известно, что в сыворотке крови и клеточной среде содержатся нуклеазы, которые гидролизуют фосфодиэфирные связи в молекуле ДНК. Комплексообразование с поликатионами, как правило, стабилизирует ДНК от деградации под действием нуклеаз. Однако степень этой стабилизации сильно зависит от природы поликатиона и структуры комплекса. Известно, что линейная плотность заряда на поликатионе и его молекулярная масса являются основными факторами, влияющими на степень защитного действия поликатиона. Можно было предположить, что содержание сшивающего агента в составе наногелей также может влиять на их способность защищать плазмидную ДНК от нуклеаз. Поэтому мы исследовали влияние наногелей на степень деградации плазмидной ДНК под действием ДНКазы I [157, 158].

Для этого комплексы ДНК - наногель подвергали воздействию эндонуклеазы, ДНКазы I, расщепляющей ДНК на короткие олигонуклеотиды. Для анализа продуктов деградации ДНК должна быть вытеснена из комплекса, например, путем добавления большого избытка конкурирующего полианиона. Поэтому сначала мы исследовали реакции интерполиэлектrolитного обмена с участием комплексов линейного ПДМАЭМА и наногелей с ДНК, используя для регистрации состава комплекса метод электрофореза в агарозном геле [129].

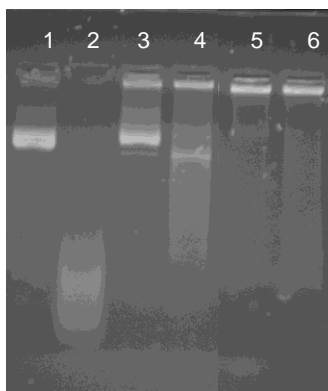
Оказалось, что комплексы наногелей с плазмидной ДНК обладают необычно высокой устойчивостью по отношению к реакциям полиэлектролитного обмена. Так, комплекс линейного ПДМАЭМА с ДНК диссоциировал на 60-70% при добавлении 15-кратного молярного избытка полиакриловой кислоты по отношению к

поликатиону (рис. 32, дорожка 4). В аналогичных условиях комплекс того же состава, образованного наногелем с 5% сшивающего агента, не диссоциировал вообще (рис. 32, дорожка 6). Этот результат указывает на исключительно высокую стабильность комплексов наногелей с ДНК.



**Рис. 32.** Электрофоретический анализ плазмидной ДНК, растворенной в воде (1) и в среде инкубации (2). Дорожки 3 и 5 содержали комплекс ( $N/P = 30$ ) плазмидной ДНК с линейным ПДМАЭМА (3) и наногелем, содержащим 5% сшивающего агента (5). Дорожки 4 и 6 содержали такие же комплексы, обработанные 15-кратным молярным избытком полиакрилат-аниона.

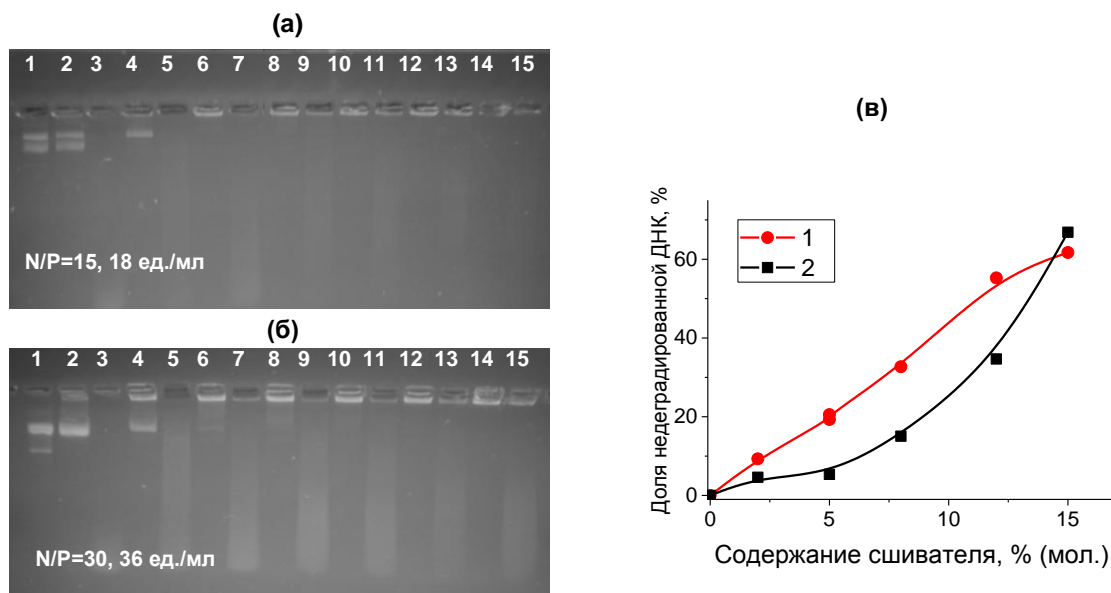
Деградацию плазмидной ДНК под действием нуклеазы мы исследовали, добавляя к комплексам ДНКазы I в концентрации (1.4 ед./мл), соответствующей ее концентрации в плазме крови человека ( $0.356 \pm 0.410$  ед./мл по данным [159]). В этих условиях свободная плазмидная ДНК (рис. 33, дорожка 1) полностью расщепляется за 15 мин инкубации с ДНКазой I (рис. 33, дорожка 2). Комплексообразование с линейным ПДМАЭМА существенно замедляет расщепление ДНК под действием нуклеазы (рис. 30, дорожки 3 и 4). Еще сильнее этот эффект проявился, если в качестве поликатиона был использован нангель с 5% сшивающего агента (рис. 33, дорожки 5 и 6).



**Рис. 33.** Электрофоретический анализ свободной плазмидной ДНК (1, 2) и ее комплексов с линейным поликатионом (3, 4) и наногелем, содержащим 5% сшивающего агента (5, 6), обработанных 15-кратным молярным избытком полиакрилат-аниона. Образцы 1, 3 и 5 не обрабатывались ферментом, а 2, 4 и 6 обрабатывались 1.4 ед./мл ДНКазы I.

Чтобы сравнить защитное влияние линейного ПДМАЭМА и наногелей, содержащих различное количество сшивающего агента, была использована повышенная концентрация ДНКазы I, превышающая концентрацию нуклеаз в плазме крови человека почти на два порядка. Оказалось, что в присутствии 18 ед./мл ДНКазы I комплексы, образуемые линейным ПДМАЭМА и слабо сшитым наногелем с 2% сшивающего агента, полностью деградировали в процессе инкубации (рис. 34).

Повышение содержания сшивателя в составе наногелей сопровождалось значительным повышением их защитного действия, если их добавляли к ДНК в 15-кратном молярном избытке по отношению к фосфатным группам (рис. 34а). Наногели, содержавшие 15% сшивающего агента, предотвращали расщепление 60-70% ДНК (рис. 34в). Сходная картина наблюдалась при дальнейшем двукратном повышении содержания ДНКазы I (рис. 34б), причем параллельно вдвое был увеличен и избыток поликатиона по отношению к ДНК ( $N/P=30$ ). В этом случае слабо сшитые наногели, содержащие 2, 5 и 8% сшивающего агента, практически не влияли на деградацию ДНК. Однако дальнейшее повышение степени сшивки в наногелях до 12 и 15% резко усиливало их защитное действие (рис. 34в, кривая 2). Таким образом, повышение плотности сшивки в наногелях способствовало формированию комплексов, в которых нуклеиновая кислота сильно экранирована от контакта с нуклеазами.



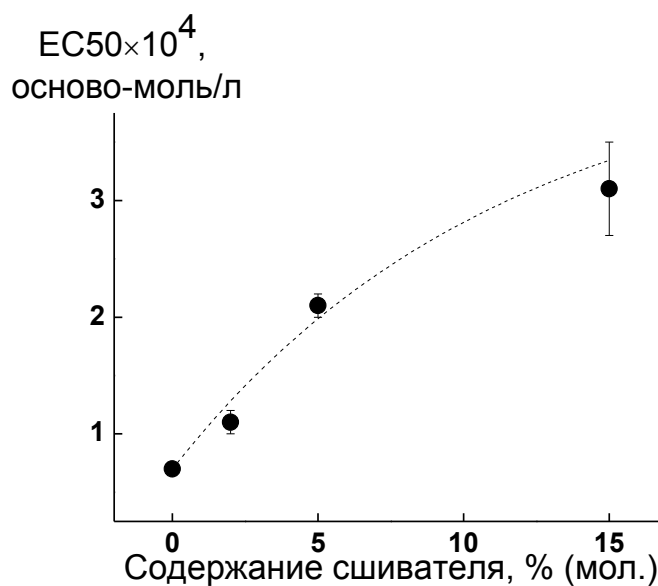
**Рис. 34.** Электрофоретический анализ ДНК после инкубации с 18 ед./мл (а) и 36 ед./мл (б) ДНКазы I. Дорожки 1 и 2 - свободная ДНК в водном растворе и в среде инкубации, 3 – свободная ДНК, обработанная ДНКазой I. Дорожки 4, 6, 8, 10, 12 и 14 – комплексы ДНК с линейным ПДМАЭМА и наногелями с 2, 5, 8, 12 и 15% сшивающего агента при  $N/P=15$  (а) и  $N/P=30$  (б). Дорожки 5, 7, 9, 11, 13 и 15 – такие же комплексы, обработанные ДНКазой I. (в) Зависимость доли недеградированной плазмидной ДНК в составе комплекса с наногелями от содержания сшивателя при  $N/P=15$  (1) и  $N/P=30$  (2).

Этот результат хорошо согласуется с описанными в предыдущем разделе данными, свидетельствующими об увеличении размеров комплексов при повышении содержания сшивателя. Действительно, при добавлении избытка линейного поликатиона или слабо сшитых наногелей к ДНК образуются крупные частицы, в которых ДНК защищена от нуклеаз в наименьшей степени (рис. 31а). Возможно, это объясняется тем, что линейные полимеры и слабо сшитые наногели при формировании комплексов с ДНК склонны образовывать петли и хвосты, т.е. структуру достаточно рыхлую для проникновения нуклеазы. Наногели с промежуточной степенью сшивки формируют маленькие и компактные комплексы, которые более стабильны к действию нуклеаз, чем комплексы, сформированные линейным полимером (рис. 31б). С одной стороны, эти наногели, как и линейный поликатион, могут деформироваться, подстраиваясь под двуспиральную ДНК. С

другой стороны, если они образуют полимерный слой на молекуле ДНК, то проникновение нуклеазы сквозь их сетчатую структуру значительно затруднено по сравнению с диффузией в слое линейного поликатиона. При дальнейшем увеличении степени сшивки наногели представляют собой уже недеформируемые сферы, которые образуют на поверхности ДНК толстый слой, который наиболее эффективно препятствует диффузии нуклеазы (рис. 31в).

### 3.6 ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

Для количественной оценки цитотоксичности наногелей был использован метод прижизненного окрашивания клеток метилтетразолиевым синим (МТТ). В качестве параметра, отражающего цитотоксичность полимеров, использовали концентрацию полимера, вызывающую гибель половины клеток в культуре (EC50). Чем больше эта концентрация полимера, тем он менее токсичен для клеток.



**Рис. 35.** Зависимость концентрации наногелей ПДМАЭМА, вызывающей гибель 50% клеток (EC50) яичников китайского хомячка СНО в культуре, от содержания сшивающего агента, использованного при синтезе наногеля.

Оказалось, что этот параметр сильно зависел от содержания сшивателя в составе наногеля и плавно повышался от  $0.65 \times 10^{-4}$  моль/л для линейного ПДМАЭМА до  $3 \times 10^{-4}$  моль/л для наногеля, содержащего 15% сшивателя (рис. 35). Т.е. с

увеличением количества сшивок в поликатионе происходит почти 5-кратное уменьшение его цитотоксичности.

Поскольку токсичность полиаминов в основном определяется их взаимодействием с анионными центрами на клеточных мембранах [160], разумно полагать, что выявленное уменьшение токсичности обусловлено снижением количества доступных аминогрупп в сильно сшитых наногелях.

### **3.7. Трансфекция плазмидной ДНК**

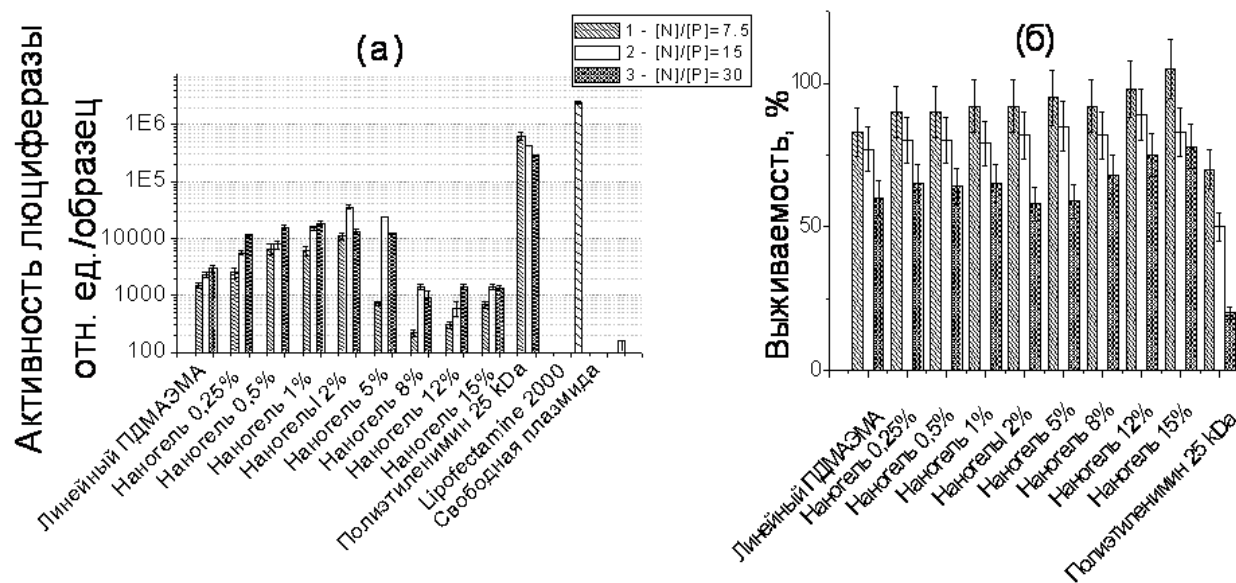
Для оценки трансфекционной активности поликатионов в работе была использована плазмидная ДНК рGL3, содержащая ген светляковой люциферазы LUC1. Данный фермент в присутствии АТФ катализирует реакцию окисления люциферина, сопровождающуюся легко регистрируемой билюминесценцией. Эксперименты проводили на клетках рака яичника китайского хомяка СНО.

Ранее нами было показано, что при физиологической ионной силе (0.15 М) в нейтральной среде (рН 7.4) полное связывание ДНК наногелями достигается лишь при значительном молярном избытке аминогрупп поликатиона по сравнению с фосфатными группами ДНК. Поэтому состав комплекса (N/P) варьировали от 7.5 до 30. При этом эффективность доставки в клетки плазмидной ДНК оценивали по уровню ферментативной активности светляковой люциферазы в клетках, обработанных комплексами ДНК с поликатионами.

Трансфекционная активность наногелей имела немонотонную зависимость от содержания сшивателя в наногеле (рис. 36а). Однако, даже самый слабо сшитый наногель, содержащий 0,25% мол. МБА, проявлял заметно более высокую трансфекционную активность, чем линейный ПДМАЭМА. Увеличение доли МБА от 0,25% до 2% приводило к росту трансфекционной активности наногеля на порядок, а затем, при дальнейшем увеличении степени сшивки (от 2% до 5%) трансфекционная активность падала до уровня линейного полимера. Наибольшей эффективностью обладал наногель, полученный в присутствии 2% МБА, однако, его активность была в 10 раз и 50 раз меньше активности стандартных трансфекционных агентов ПЭИ 25кДа и Липофектамина 2000 соответственно. Тем не менее, тенденция значительного роста

эффективности трансфекции при введении небольшого количества сшивающего агента в состав наногеля может быть важна для дальнейшего использования наногелей.

Эффективность трансфекции сильно повышалась при увеличении избытка положительных зарядов в комплексе  $[N]/[P]$  от 7,5 до 30, что согласуется с данными по размерам наногелей. При  $[N]/[P]=30$  слабо сшитые наногели образуют комплексы с гидродинамическим радиусом около 150 нм, тогда как при  $[N]/[P]=15$  образуются крупные частицы с радиусом около 200 нм. Вполне вероятно, что при  $N/P=7,5$  комплекс еще не обладает достаточным для эффективного взаимодействия с клетками положительным зарядом.



**Рис. 36.** Активность светляковой люциферазы (а) и цитотоксичность (б) в клетках СНО, трансфицированных комплексами плазмидной ДНК рGL3-LUC с линейным ПДМАЭМА и наногелями с варьируемой плотностью сшивки при разных соотношениях аминогрупп поликатиона и фосфатных групп ДНК (концентрация 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( $[N]/[P]=7.5$  (1);  $[N]/[P]=15$  (2);  $[N]/[P]=30$  (3)). Lipofectamine 2000 и свободная ДНК были использованы в качестве положительного и отрицательного контролей трансфекции. Все приведенные данные являются результатом усреднения 3 независимых экспериментов.

Таким образом, мы обнаружили, что трансфекционная активность слабого поликатиона может увеличиваться в десятки раз, если макромолекула имеет сетчатую

структуру, в которой значительная часть аминогрупп недоступна для крупных молекул.

Токсичность комплексов ДНК с наногелями была значительно ниже, чем комплексов на основе ПЭИ (рис. 36б). Так при добавлении к клеткам комплекса наногеля 2% с ДНК при оптимальном N/P=15, обеспечивается жизнеспособность 82% клеток в культуре, в то время как в присутствии полиплексов на основе ПЭИ только 50% клеток оставались живыми. Поскольку цитотоксичность полиаминов в основном обусловлена их взаимодействием с анионными центрами на поверхности биологических мембран [160], то разумно предположить, что низкая цитотоксичность определяется недоступностью части аминогрупп наногелей для ионных взаимодействий.

Таким образом, в настоящей работе показано, что сетчатые поликатионы проявляют более высокую способность доставлять плазмидную ДНК в живые клетки, чем линейный аналог. При этом их трансфекционная активность проходит через максимум при варьировании содержания сшивателя в наногелях. Положение этого максимума соответствует содержанию сшивающего агента, при котором частицы комплексов с ДНК имеют наименьший размер. Насколько нам известно, сетчатая структура поликатионов ранее не обсуждалась в литературе в качестве фактора, влияющего на их эффективность в качестве носителей для доставки ДНК. Влияние содержания сшивателя в катионных наногелях на их способность доставлять в клетки ДНК в настоящей работе также исследовано впервые.

### **3.8 Трансфекция миРНК**

Экспрессия маркерного гена в эукариотических клетках требует проникновения ДНК в ядро. Это предъявляет особые требования к свойствам поликатионов и образуемых ими комплексов с ДНК. В частности, в этом случае комплексы должны содержать пептидные сигналы (типа Lys-Lys-Arg-Lys), обеспечивающие транспорт частиц комплекса через ядерную мембрану. Эти требования снимаются, если для проявления активности нуклеиновой кислоты ее проникновения в ядро не требуется. Это относится к рибозимам и малым интерферирующим РНК (миРНК).



Малые интерферирующие РНК были открыты в 1998 г. А. Fire и С. Mello, которые ввели двухцепочечную РНК (dsRNA) в нематоду *Caenorhabditis Elegans*, что привело к деградации цитоплазматической мРНК, содержащей целевую последовательность [161]. Механизм РНК-интерференции включает: (1) связывание малого (длиной 20-30 пар оснований) РНК дуплекса (миРНК) с белком Аргонавтом, (2) расплетание дуплекса и полное разделение цепей РНК, (3) связывание отдельных цепей миРНК с белком RISC (RNA-induced silencing complex), (4) взаимодействие комплекса RISC-РНК с матричной РНК, комплементарной миРНК, и, наконец, (5) разрезание мРНК белком RISC, приводящее к полной остановке трансляции [162]. Поскольку RISC в эукариотических клетках локализован в цитозоле, для проявления биологического эффекта достаточно обеспечить транспорт миРНК через плазматическую мембрану целевой клетки.

В данной серии экспериментов мы использовали клетки СНО, устойчиво трансфицированные геном светляковой люциферазы. Данная линия была получена и любезно предоставлена нам к.б.н. Е.Б. Файзуловым (Институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН). Короткая интерферирующая РНК, направленная на ген светляковой люциферазы, была также любезно предоставлена Е.Б. Файзуловым в рамках совместной работы. Она была синтезирована в ЗАО «Синтол» (Россия) и имела следующую последовательность.

**GGAAAGACGAUGACGGAAAdTdT**

**dTdTCCUUUCUGCUACUGCC UUU,**

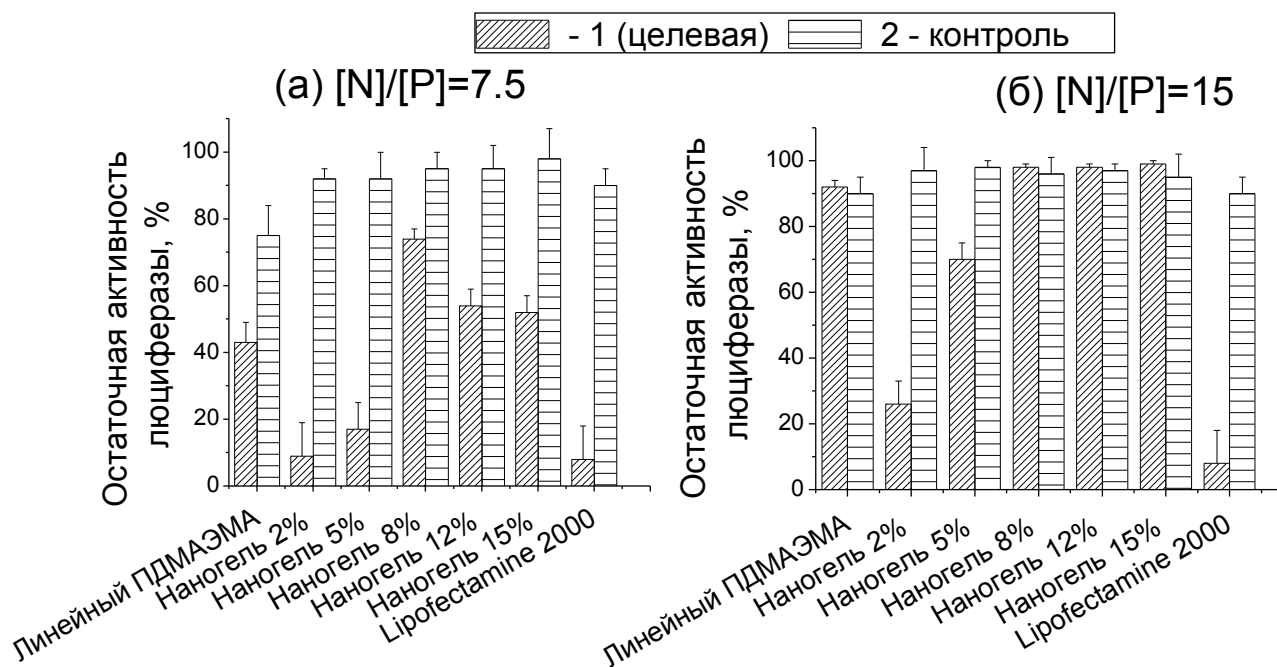
где жирными буквами отмечены дезоксирибонуклеотидные звенья, а обычным шрифтом показаны рибонуклеотиды.

Для оценки эффективности трансфекции миРНК в Институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова была специально получена культура клеток СНО, стабильно трансфицированная репортерным геном светляковой люциферазы [163]. С этой целью кодирующая последовательность светляковой люциферазы была встроена под контроль эукариотического промотора в плазмиду, содержащую селективный ген

устойчивости к неомицину. Затем этой плазмидной ДНК была трансфецирована культура клеток СНО и проведена селекция в присутствии неомицина, что позволило получить культуру клеток, несущих ген люциферазы. Использование таких клеток, стабильно экспрессирующих люциферазу, позволяет однозначно интерпретировать полученные данные и повышает надежность результатов трансфекции миРНК.

В качестве контроля в этих экспериментах были использованы комплексы, содержащие миРНК, направленную на Р-ген респираторно синциального вируса (РСВ). Поскольку данная противовирусная миРНК не может специфически влиять на экспрессию генов в клетках животных, использование этого контроля позволяет учесть все неспецифические эффекты поликатионов и миРНК, влияющие на экспрессию гена люциферазы в клетках СНО.

Как показано на рис. 37а, активность люциферазы в клетках, обработанных комплексами миРНК, направленной против светляковой люциферазы (1), была меньше активности в клетках, обработанных комплексами с контрольной миРНК (2).



**Рис. 37.** Остаточная люциферазная активность в клетках СНО-LUC1 при добавлении к ним полиплексов миРНК, направленной на ген LUC 1 (1), и неспецифической миРНК, направленной на Р-ген РСВ (2), при N/P = 7,5 (а) и 15 (б).

Эта разница была особенно заметна в случае комплексов, сформированных наногелями, которые были получены в присутствии 2% и 5% сшивающего агента. При составе комплекса  $[N]/[P]=15$  (рис. 37а) эти комплексы подавляли активность люциферазы на 90% и 80%, т.е. практически на уровне липофектамина (92%). При дальнейшем увеличении содержания сшивателя активность наногелей уменьшалась. Таким образом, влияние среднего содержания в наногелях на эффективность доставки миРНК полностью повторяют аналогичную закономерность, обнаруженную нами при исследовании транспорта в клетки плазмидной ДНК.

Комплексы миРНК с поликатионами состава  $N/P = 7.5$  (рис. 37б) были гораздо менее эффективны, как и в случае с пДНК. Эти данные согласуются с представленными выше данными о вытеснении красителя SYBR Green из комплексов с миРНК, которые показывают, что полное связывание миРНК происходит лишь при 10-15-кратном молярном избытке аминогрупп поликатионов по отношению к фосфатным группам миРНК (рис. 26). Можно полагать, что короткие цепи миРНК в разбавленном растворе в присутствии физиологической концентрации соли могут быть связаны в комплекс лишь при большом избытке катионного носителя.

Важно отметить, что полиплексы миРНК, направленной на подавление Р-гена РСВ, не вызвали значительного подавления активности люциферазы (2 на рис. 37). То есть, полиплексы проявляли лишь небольшую цитотоксичность за счет избытка наногелей при  $[N] / [P] = 7,5$  и 15, что соответствует результатам, полученным с плазмидной ДНК.

Таким образом, полиплексы, образованные слабо сшитыми наногелями и миРНК, проявляют гораздо большую эффективность трансфекции по сравнению с полиплексами, образованными линейным ПДМАЭМА и сильносшитыми наногелями. Эта закономерность наблюдается и при доставке плазмидной ДНК в клетки. Однако наногели 2-5% сшивки доставляли миРНК гораздо эффективнее, чем плазмидную ДНК. Скорее всего, это различие обусловлено тем, что подавление генов путем РНК-интерференции происходит в цитоплазме и не требует проникновения нуклеиновой кислоты в ядро. Это означает, что наногели с промежуточными степенями сшивки

очень эффективны при связывании, конденсации нуклеиновой кислоты и преодолении лизосомального/эндосомального барьера за счет эффекта "протонной губки" [69], в соответствии с которым слабые полиоснования, содержащие группы, титруемые при рН 5-6, могут вызывать разрушение эндосомы в результате осмотического набухания. В то же время, эти носители практически бесполезны для доставки нуклеиновых кислот в ядра.

Резкий спад эффективности трансфекции наногелей, содержащих 8-15% МБА, вероятно объясняется большими размерами их полиплексов (более 200 нм). Как было показано выше, повышение размеров комплексов, образованных сильно сшитыми наногелями, вызвано тем, что эти поликатионы не способны изменять свою конформацию для образования максимального количества ионных контактов с двуспиральными нуклеиновыми кислотами. Поэтому они формируют крупные агрегаты, эффективность эндоцитоза которых очень мала. Описанные закономерности могут иметь первостепенное значение для конструирования высокоэффективных катионных векторов для доставки нуклеиновых кислот в цитоплазму клетки.

Итак, мы показали, что наногели с промежуточным содержанием сшивателя проявляют высокую способность доставлять миРНК и, в меньшей степени плазмидную ДНК в клетки. При этом, значительный объем частиц наногеля остается недоступным для различных полианионов, в том числе для коротких олигомеров. В случае использования наногелей, содержащих слабоосновные группы, эта особенность может сказываться на характере их взаимодействия с отрицательно заряженными мембранами клеток. Так, степень ионизации линейных слабых поликатионов может приближаться к 1 вследствие их взаимодействия с анионными гликолипидами на клеточной поверхности. Поэтому можно ожидать, что линейные поликатионы должны захватываться клетками в виде ПЭК с гиалуроновой кислотой или синдеканами (сульфированными гликолипидами), расположенными на внешней стороне клеточной мембраны. В отличие от линейных поликатионов, взаимодействие сетчатых слабых полиоснований с клеточной поверхностью не должно приводить к исчерпанию всех аминокрупп макромолекулы (рис 24-27). Как следует из [164], не

доступные для взаимодействий с полианионами аминогруппы могут проявлять основные свойства в слабокислой среде. Так, при поглощении эндосомой эти группы могут вызвать осмотическое набухание и разрушение везикул. В следующем разделе мы исследуем, влияет ли содержание сшивателя в катионных наногелях на основе ПДМАЭМА на их способность вызывать изменение рН, осмотическое набухание и разрушение эндосом в клетках.

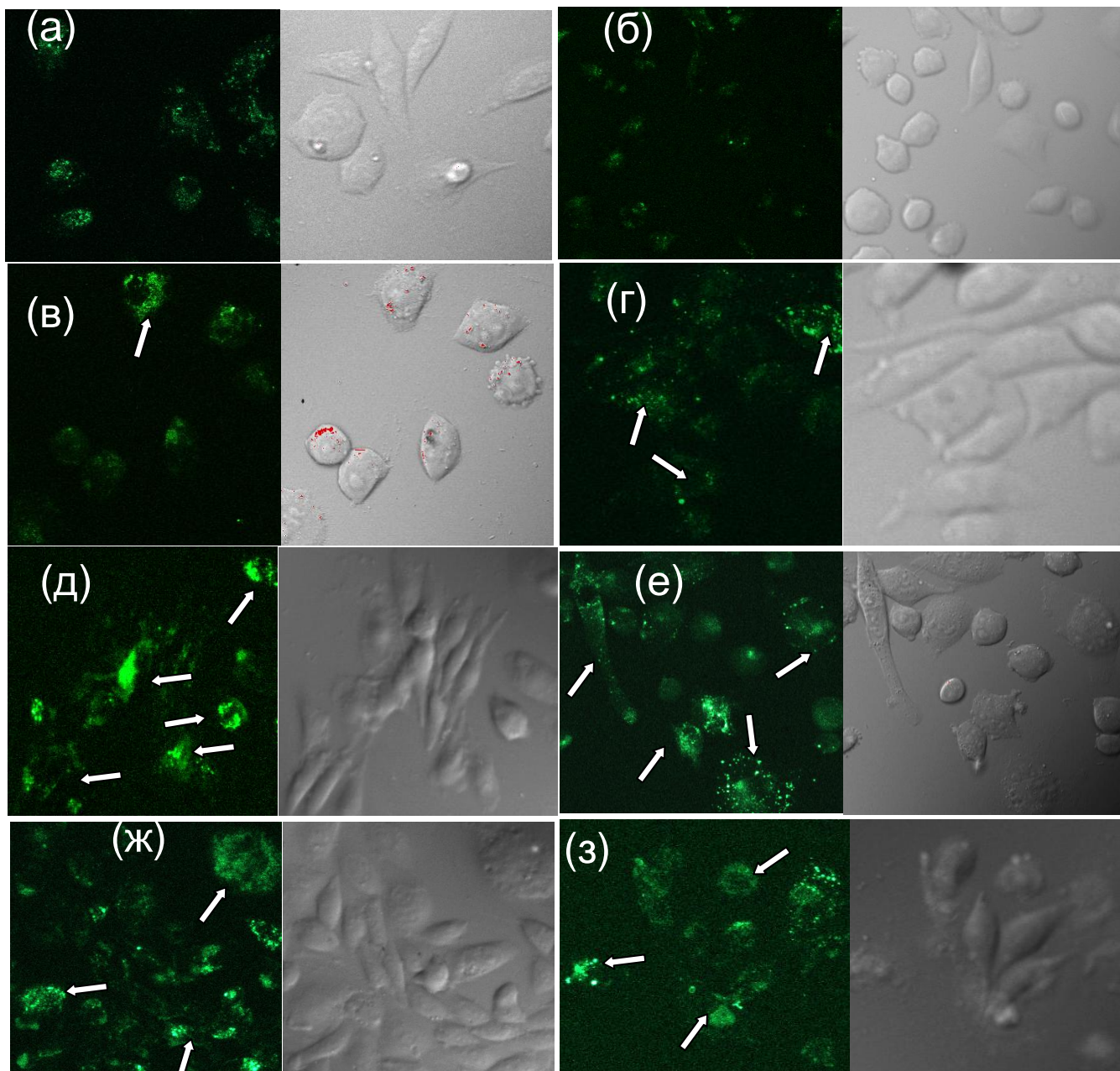
### **3.9 Влияние наногелей на целостность эндосом**

Для изучения влияния поликатионов на рН внутри эндосом в живых клетках мы использовали подход, основанный на использовании гидрофильного флуоресцентного рН-индикатора кальцеина. При этом интенсивность флуоресценции рН-индикатора в клетках и его локализацию изучали, используя метод сканирующей конфокальной микроскопии.

Спектры поглощения и флуоресценции данного соединения, являющегося производным флуоресцеина, сильно зависят от рН, причем при  $\text{pH} < 6$  его флуоресценция резко снижается, а при рН около 5 почти полностью пропадает. В отличие от флуоресцеина, данное соединение содержит 4 карбоксильные группы, и поэтому вообще не взаимодействует с клеточными мембранами и неспособно проходить в клетку по механизму растворения – диффузии. Однако, будучи добавленным в высокой концентрации (около 3 мМ), этот индикатор захватывается клеткой путем жидкофазного эндоцитоза (пиноцитоза), оказываясь в водной полости эндосом и лизосом. Поскольку рН в этих клеточных компартментах понижен за счет работы протонных насосов (V-АТФаз), флуоресценция этого индикатора в клетках достаточно низка (рис. 38а). При вытекании кальцеина в цитозоль происходит резкое увеличение интенсивности флуоресценции клеток и появление характерной окраски [106].

После 30 мин инкубации клеток с красителем в высокой концентрации (3 мМ) флуоресценция наблюдалась в органеллах на периферии клеток (эндосомах) (рис. 38а). При дальнейшей инкубации этих клеток с комплексом линейного ПДМАЭМА с плазмидной ДНК распределение флуоресценции в клетках не изменилось (рис. 38б),

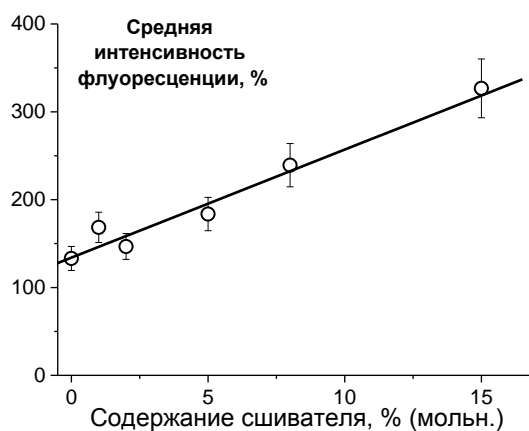
что подтверждает ранее опубликованные данные о том, что линейный ПДМАЭМА попадает в клетку путем эндоцитоза, но не вызывает разрыв эндосом [108].



**Рис. 38.** Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, демонстрирующие распределение флуоресценции кальцеина в клетках, которые предварительно инкубировали с красителем 3мМ (а), затем добавили полиплексы линейного ПДМАЭМА (б) или наногелей 0,5% (в), 2% (г), 5% (д), 8% (е) и 15% (ж) сшивки или ПЭИ 25 кДа (з). Комплексы готовили, используя пДНК концентрации 1 мг/мл при  $N/P=7.5$ . Стрелками показаны области, где заметно окрашивание цитозоля, свидетельствующее о выходе кальцеина из эндосом.

В то же время, инкубация клеток с комплексами наногелей привела к появлению клеток, в которых эндосомы флуоресцировали в виде ярких точек на фоне диффузного зеленого свечения цитоплазмы. Доля таких клеток возрастала с увеличением доли МБА в наногелях (рис. 38в-ф). Можно предполагать, что увеличение интенсивности флуоресценции эндосом свидетельствует о повышении рН их содержимого, а появление диффузно окрашенных областей говорит о вытекании красителя в цитозоль. При обработке клеток комплексами наногелей, содержащих 12% (рис. 38е) и 15% (рис. 36ж) сшивающего агента, флуоресценция возрастала практически до уровня флуоресценции клеток, обработанных ПЭИ (рис. 38з). Способность ПЭИ вызывать разрыв эндосом была показана ранее прямым измерением эндосомального рН и накопления хлорид-анионов в эндосомальных везикулах [70].

Вытекание кальцеина в цитозоль приводит к увеличению интенсивности флуоресценции за счет изменения локального рН. Логично предположить, что общая интенсивность флуоресценции в клетках возросла вследствие перераспределения кальцеина из эндосом в цитозоль. Чтобы проверить данное утверждение в каждом образце была измерена интенсивность флуоресценции клеток (рис. 39).



**Рис. 39.** Зависимость средней интенсивности флуоресценции клеток СНО, предварительно инкубированных с кальцеином, а затем с наногелем в течение часа, нормированная на контроль без поликатиона, от содержания сшивателя в полимеризационной смеси наногелей.

Чтобы избежать зашкала, измерения проводили при пониженной интенсивности лазера (0,1%). Полная интенсивность, усредненная по 200-300 клеткам, измеренная на 5-6 оптических срезах для каждого образца, постепенно увеличивалась при росте доли МБА в мономерной смеси, использованной при синтезе наногеля (рис. 39). Это означает, что увеличение содержания сшивающего агента в составе наногеля приводит к росту его эндосомолитической активности.

Таким образом, мы показали, что, в отличие от линейного полиамина, наногели способствуют разрушению эндосом. В чем же заключается причина увеличения эндосомолитических свойств слабого поликатиона в результате придания ему сетчатой структуры?

При pH 7.4 степень протонирования линейного ПДМАЭМА составляет около 45% (рис. 20) при  $pK_a$  его третичных аминогрупп 8.3 [165]. Учитывая полиэлектролитный эффект, совершенно естественно, что ПДМАЭМА титруется в интервале 6-8 вследствие влияния полимерной цепи на  $pK_a$  ионизуемых групп. Недавние исследования, проведенные путем численного моделирования осмотического набухания и разрушения эндосом по механизму протонной губки, позволили сделать вывод о том, что "полиамин с  $pK_a$  в диапазоне 7.25-6.25 с большой вероятностью вызывает разрыв эндосом". [166]. Между тем, линейные полимеры ПДМАЭМА [108] и ПДАМА [109] не вызывают разрушение эндосом, несмотря на то, что значения их  $pK_a$  находятся именно в этом интервале.

Для разрешения этого противоречия мы высказали гипотезу, что при взаимодействии слабых поликатионов с сильными анионными полиэлектролитами (синдеканами или другими сульфатными гликолипидами) [69, 167], локализованными на поверхности клетки, происходит ионизация свободных аминогрупп вследствие локального понижения pH. Это является причиной отсутствия эндосомолитических свойств линейного ПДМАЭМА. В своей работе мы обнаружили, что введение даже 2% сшивателя делает половину аминогрупп недоступными для взаимодействия с полианионами. Вероятно, эти недоступные для клеточных полианионов аминогруппы повышают pH внутри эндосом, индуцируя «эффект протонной губки».



Таким образом, наши данные показывают, что способность слабого поликатиона вызвать разрушение эндосом зависит не только от величины  $pK_a$  его аминогрупп, но также определяется его пространственной архитектурой. Роль сетчатой структуры в повышении эндосомолитических свойств слабых полиаминов в настоящей работе показана впервые.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, мы показали, что полимеризация смеси N,N-диметиламиноэтилметакрилата и N,N'-метилден-бисакриламида в системе обращенных мицелл BrijO10 в циклогексане приводит к образованию наногелей, размер которых уменьшается с увеличением степени сшивки. Впервые обнаружено, что индекс полидисперсности получающихся гидрогелевых наночастиц также резко снижается с увеличением содержания сшивателя и достигает величины 0.07 при содержании сшивающего агента около 2-5%. Такое низкое значение индекса полидисперсности говорит о том, что получающиеся гидрогелевые наночастицы практически однородны по размерам.

Исследование полиэлектролитных реакций с участием наногелей показало, что, несмотря на то, что все их аминогруппы могут протонироваться низкомолекулярной кислотой, взаимодействие с полианионами происходит лишь с участием аминогрупп, находящихся на поверхности частиц. При этом около 30-70% аминогрупп наногелей остаются недоступными для полианионов. Эта доля недоступных аминогрупп увеличивается с ростом степени сшивки наногелей и увеличением молекулярной массы полианиона.

Исследование размеров полиэлектролитных комплексов наногелей с плазмидной ДНК показало, что наибольшую способность компактизовать ДНК проявляют наногели, полученные при содержании сшивателя 2-5%. По всей видимости, это вызвано тем, что слабо сшитые наногели (менее 2% сшивающего агента) имеют крупный размер. В то же время очень сильно сшитые наногели (более 5% сшивателя) не способны подстраивать свою конформацию под структуру ДНК для формирования максимального количества электростатических контактов, и поэтому формируют

более крупные комплексы с ДНК, чем наногели с оптимальным содержанием сшивающего агента (2-5%).

Важная информация о структуре комплексов была также получена на основании экспериментов по изучению влияния полимеров на скорость ферментативного расщепления ДНК. Оказалось, что, хотя связывание ДНК всеми изученными поликатионами существенно повышало ее стабильность по отношению к ферментативному гидролизу, защитный эффект увеличивался с ростом содержания сшивателя. Таким образом, можно утверждать, что сильно сшитые наногели образуют крупные комплексы с ДНК, в которых фосфодиэфирные связи эффективно экранированы от внешнего раствора толстым слоем поликатиона.

Изучение способности описанных комплексов проникать в клетки показало, что и в этом случае содержание сшивателя, использованного при синтезе наногелей является важнейшим параметром, определяющим эффективность проникновения плазмидной ДНК и малой интерферирующей РНК. При этом наибольшую эффективность проявляли наногели с 2%, формирующие комплексы наименьшего размера.

Изучение взаимодействия наногелей с клетками выявило важную особенность сетчатых поликатионов – повышенную способность вызывать осмотическое набухание и разрушение эндосомальных везикул. В настоящей работе впервые показано, что наличие в сетчатой макромолекуле слабоосновных групп, недоступных для взаимодействия с клеточными полианионами, способствует проявлению этим полимером буферных свойств при попадании в кислые компартменты клетки. В данной работе впервые продемонстрировано, что в результате этого может происходить осмотическое набухание и разрушение эндосомальных везикул, способствующее проникновению нуклеиновых кислот в цитозоль клетки. Данный результат показывает, что сетчатая структура поликатионов является важным фактором, способствующим повышению эффективности доставки нуклеиновых кислот в живые клетки.

**Перспективы дальнейшей разработки данной тематики:** введение биodeградируемой сшивки в состав сетчатого поликатионного носителя для уменьшения его токсичности. Представляется целесообразным включение цепей полиэтиленгликоля в состав сетчатого поликатионного носителя для уменьшения размеров комплексов наногелей с нуклеиновыми кислотами.

## ВЫВОДЫ

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

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

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

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

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ПАВ** – поверхностно-активное вещество;
- ДМАЭМА** – N,N – диметиламиноэтилметакрилат;
- МБА** – N,N' - метилен-бис-акриламид;
- ПДМАЭМА**- поли - N,N – диметиламиноэтилметакрилат;
- АСМ** – атомно-силовая микроскопия;
- ПСС** – полистиролсульфонат натрия;
- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ЕС50** - концентрация полимера, вызывающая гибель 50% клеток в культуре;
- АТФ** – аденозинтрифосфат;
- СНО** – клетки яичников китайского хомяка;
- РНК** - рибонуклеиновая кислота;
- миРНК** – малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота;
- мРНК** – матричная рибонуклеиновая кислота;
- РСВ** – респиратно-синцитиальный вирус;
- ГПХ** – гель-проникающая хроматография;
- ДЛФО** – теория устойчивости коллоидных систем, разработанная Б. В. Дерягиным совместно с Л. Д. Ландау и независимо от них Э. Фервеем и Я. Овербеком;
- ОПЦ**-полимеризация – полимеризация по механизму обратимой передачи цепи;
- НИРАМ** – N-изопропилакриламид;
- НКТР** – нижняя критическая температура растворения;
- ПЭГ** – поли(этиленгликоль);
- ПВП** – поли(-N-винилпироллидон);
- АК** – акриловая кислота;
- РНИРАМ** – поли(-N-изопропилакриламид);
- АОТ** - диизооктилсульфосуцинат натрия;
- ОЭМА** – олигоэтиленгликольметакрилат;
- АМФ** – аденозинмонофосфат;

**ЭДТА** – этилендиаминтетраацетат натрия;  
**МРТ** – магнитно-резонансная томография;  
**ДМСО** – диметилсульфоксид;  
**ПЭК** – полиэлектролитный комплекс;  
**СПЭК** – стехеометричный полиэлектролитный комплекс;  
**НПЭК** - нестехеометричный полиэлектролитный комплекс;  
**ПАМAM**-дендримеры – дендримеры на основе поли(амидоамин);  
**БЭ** – бромистый этидий;  
**ПЭВП** – поли(винилпиридиний бромид);  
**ПДАМА** – поли( 2-[2-(диметиламино)-этил]-метил-амин]овый эфир 2-метилакриловой кислоты);  
**ПЛЛ** – поли(лизин);  
**ДАК** – динитрил аминокислоты;  
**МТТ** – краситель метилтетразолиевый синий.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает глубокую благодарность за помощь в выполнении экспериментов по изучению взаимодействия наногелей с живыми клетками, а также по исследованию защитных свойств наногелей сотрудникам лаборатории Молекулярной вирусологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова к. б. н., зав. лаб. Файзулоеву Е. Б., к. б. н., в. н. с. Никоновой А. А.; также сотрудникам Института химической физики им. Н. Н. Семенова РАН зав. лаб., д. х. н., проф. Соловьевой А. Б., с. н. с, к. х. н. Котовой С. Л. за помощь в проведении экспериментов методом АСМ и анализе полученных данных; сотруднику Физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова к. ф.-м. н., с. н. с. Ежову А. А. за помощь в изучении эндосомолитических свойств наногелей методом конфокальной микроскопии, а также д. х. н., в. н. с. проф. Изумрудову В. А. за помощь в планировании и представлении работы.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bencherif S.A., Siegwart D.J., Srinivasan A., Horkay F., Hollinger J.O., Washburn N.R., Matyjaszewski K. / Nanostructured hybrid hydrogels prepared by a combination of atom transfer radical polymerization and free radical polymerization. // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. - № 29. – P. 5270 – 5278
2. Kabanov A.V., Vinogradov S.V. / Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2009. – V. 48 - № 30. – P. 5418 – 5429
3. Pich A., Richtering W. / Polymer nanogels and microgels. // *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. – V. 10. – № 6. - P. 309 - 350
4. Daoud M., Bouchaud E., Jannink G. / Swelling of polymer gels. // *Macromolecules*. – 1986. – V. 19 - № 7. – P. 1955 – 1960
5. Katchalsky A., Michaeli J. J. / Polyelectrolyte gels in salt solutions. // *J. Polym. Sci.* – 1955. – V. 9. - № 69. – P. 69 - 86
6. Chiang W.-H., Huang W.C., Shen M.Y., Wang C.-H., Huang Y.-F., Lin S.-C., Chern C.-S., Chiu H.-C. / Dual-layered nanogel-coated hollow lipid/polypeptide conjugate assemblies for potential pH-triggered intracellular drug release. // *Plos One*. – 2014. – V. 9. - № 3. – P. e92268
7. Hosseinzadeh S, Bolhassani A. / Immunostimulant properties of chemical delivery systems in vaccine development. // *Curr Drug Deliv.* – 2015. - V. 12. - № 4 - P. 360 - 368.
8. Graham N.B., Cameron A. / IUPAC Nanogels and microgels: the new polymeric materials playground. // *Pure & Appl. Chem.* -1998. - V. 70. - № 6. - P. 1271 - 1275.
9. He J., Tong X., Zhao Y. / Photoresponsive nanogels based on photocontrollable cross-links. // *Macromolecules*. – 2009. – V. 42. – P. 4845 – 4852
10. Louwerse M.J., Vassilev P., Baerends E.J. / Oxidation of methanol by FeO<sub>2</sub><sup>+</sup> in water: DFT calculations in the gas phase and ab initio MD simulations in water solution. // *J. Phys. Chem. A*. – 2008. – V. 112. – P. 1000 - 1012
11. Donahoe D., Cohen T.L., Li W., Nguyen P.K., Fortner J.D., Mitra R.D., Elbert D.L. / Ultralow Protein Adsorbing Coatings from Clickable PEG Nanogel Solutions: Benefits of Attachment under Salt-Induced Phase Separation Conditions and Comparison with PEG/Albumin Nanogel Coatings Case. // *Langmuir*. – 2013. – V. 29. – № 12. - P. 4128 – 4139



12. Yan M., Ge J., Liu Z., Ouyang P. / Encapsulation of single enzyme in nanogel with enhanced biocatalytic activity and stability. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. – № 34. - P. 11008 - 11009
13. Yan M., Liu Z., Lu D., Liu Z. / Fabrication of single carbonic anhydrase nanogel against denaturation and aggregation at high temperature. // *Biomacromolecules.* – 2007. – V. 8. - № 2. – P. 560 - 565
14. Ge J., Lu D., Wang J., Liu Z. / Lipase nanogel catalyzed transesterification in anhydrous dimethyl sulfoxide. // *Biomacromolecules.* – 2009. – V. 10. - № 6. - P. 1612 – 1618
15. Raemdonck K., Naeye B., Høgset A., Demeester J., De Smedt S.C. / Prolonged gene silencing by combining siRNA nanogels and photochemical internalization. // *J. Control Release.* – 2010. – V. 145. – № 3. - P. 281 – 288
16. Дерягин Б.В., Чураев Н.В., Муллер В.М. / Поверхностные силы // М.: Наука. - 1987
17. Gou M.L., Men K., Zhang J., Li Y.H., Song J., Luo S., Shi H.S., Wen Y.J., Guo G., Huang M. J., Zhao X., Qian Z.Y., Wei Y.Q. / Efficient inhibition of C-26 colon carcinoma by VSVMP gene delivered by biodegradable cationic nanogel derived from polyethyleneimine. // *ACS Nano.* – 2010. – V. 4. - № 10. - P. 5573 – 5584
18. Lee J.I., Yoo H.S. / Pluronic decorated-nanogels with temperature-responsive volume transitions, cytotoxicities, and transfection efficiencies. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2008. – V. 70. - № 2. - P. 506 – 513
19. Ueki T., Sawamura S., Nakamura Y., Kitazawa Y., Kokubo H., Watanabe M. / Thermoreversible nanogel shuttle between ionic liquid and aqueous phases. // *Langmuir.* – 2013. – V. 29. – № 45. - P. 13661 – 13665
20. Nukolova N.V., Oberoi H.S., Zhao Y., Chekhonin V.P., Kabanov A.V., Bronich T.K. / LHRH-targeted nanogels as a delivery system for cisplatin to ovarian cancer. // *Mol. Pharmaceutics.* – 2013. – V. 10. - № 10. - P. 3913 – 3921
21. Yusa S., Sugahara M., Endo T., Morishima Y. / Preparation and characterization of a pH-responsive nanogel based on a photo-cross-linked micelle formed from block copolymers with controlled structure. // *Langmuir.* - 2009 – V. 25. - № 9. – P. 5258 – 5265
22. Vinogradov S.V., Kohli E., Zeman A.D. / Cross-linked polymeric nanogel formulations of 5'-triphosphates of nucleoside analogues: Role of the cellular membrane in drug release. // *Mol. Pharm.* – 2005. – V. 2. - № 6. – P. 449 - 461

23. Vinogradov S.V. / Colloidal microgels in drug delivery applications. // *Curr Pharm Des.* – 2006. – V. 12. - № 36 – P. 4703 – 4712
24. Galmarini C.M., Warren G., Kohli E., Zeman A., Mitin A., Vinogradov S.V. / Polymeric nanogels containing the triphosphate form of cytotoxic nucleoside analogues show antitumor activity against breast and colorectal cancer cell lines. // *Mol. Cancer Ther.* – 2008. – V. 7. - № 10. – P. 3373 – 3380
25. Gonçualves C., Martins J.A., Gama F.M. / Self-assembled nanoparticles of dextrin substituted with hexadecanethiol. // *Biomacromolecules.* – 2007. – V. 8. - № 2. – P. 392 - 398
26. Morimoto N., Hirano S., Takahashi H., Loethen S., Thompson D.H, Akiyoshi K. / Self-assembled pH-sensitive cholesteryl pullulan nanogel as a protein delivery vehicle. // *Biomacromolecules.* – 2013. – V. 14. - № 1. – P. 56 – 63
27. Nagahama K., Mori Y., Ohya Y., Ouchi T. / Biodegradable nanogel formation of polylactide-grafted dextran copolymer in dilute aqueous solution and enhancement of its stability by stereocomplexation. // *Biomacromolecules.* – 2007. - V 8. - № 7.– P. 2135 - 2141
28. Urakami H., Hentschel J., Seetho K., Zeng H., Chawla K., Guan Z. / Surfactant-free synthesis of biodegradable, biocompatible, and stimuli-responsive cationic nanogel. // *Biomacromolecules.* – 2013 – V. 14. - № 14. – P. 3682 – 3688
29. Abd El-Rehim A., Swilem A.E., Klingner A., Hegazy E. A, Hamed A.A. / Developing the potential ophthalmic applications of pilocarpine entrapped into polyvinylpyrrolidone–poly(acrylic acid) nanogel dispersions prepared by  $\gamma$  radiation. // *Biomacromolecules.* – 2013. – V. 14. – № 3. - P. 688 – 698
30. Tauer K., Hernandez H., Kozempel S., Lazareva O., Nazaran P. / Towards a consistent mechanism of emulsion polymerization—new experimental details. // *Colloid Polym. Sci.* – 2008. – V. 286. – № 5. - P. 499 – 515
31. Okeyoshi K., Suzuki D., Yoshida R. / Effect of nanointegration on photoinduced hydrogen-generating nanogel systems. // *Langmuir.* – 2012. - V. 28. – № 2. - P. 1539 – 1544
32. Nor H., Samah A., Heard C.M. / Enhanced in vitro transdermal delivery of caffeine using a temperature- and pH-sensitive nanogel, poly(NIPAM-co-AAc). // *Int. J. Pharm.*. – 2013. – V. 453 - № 2. - P. 630 – 640

33. Wu L., Zhou H., Sun H.J., Zhao Y., Yang X., Cheng S. Z., Yang G. / Thermoresponsive bacterial cellulose whisker/poly(NIPAM-co-BMA) nanogel complexes: synthesis, characterization, and biological evaluation. // *Biomacromolecules*. – 2013. – V. 14. – № 4. - P. 1078 – 1084
34. McPhee W., Tam K.C., Pelton R.H. / Poly(N- isopropylacrylamide) latices prepared with sodium dodecyl sulfate. // *J. Colloid. Interface Sci.* – 1993. – V. 156. - № 1. – P. 24-30
35. Panayitou M., Pohner C., Vandevyver C. / Synthesis and characterisation of thermoresponsive poly(N,N'diethylacrylamide) microgels. // *React. Funct. Polym.* – 2007. – V. 67. - № 9. - P. 807-819
36. Asua J.M. / Emulsion polymerization: from fundamental mechanisms to process developments. // *J. Pol. Sci.: Part A: Polymer Chemistry*. – 2004. - V. 42. – P. 1025 – 1041
37. Vinogradov S.V., Batrakova E.V., Kabanov A.V. / Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. // *Bioconjug. Chem.* – 2004. - V. 15. - № 1. - P. 50 - 60
38. Doherty A.S., Kan C.-W., Paegel B.M., Yeung S.H.I., Cao S., Mathies R.A., Barron A.E. / Sparsely cross-linked “nanogel” matrixes as fluid, mechanically stabilized polymer networks for high-throughput microchannel DNA sequencing. // *Anal. Chem.* – 2004. - V. 76 – P. 5249 - 5256
39. Gao D., Agayan R.R., Xu H., Philbert M.A., Kopelman R. / Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells. // *Nano Lett.* – 2006. - V. 6. - № 11. – P. 2383 - 2386
40. Gao D., Xu H., Philbert M.A., Kopelman R. / Ultrafine hydrogel nanoparticles: synthetic approach and therapeutic application in living cells. // *Angew. Chem.* – 2007. - V. 46. - № 13.– P. 2224 – 2227
41. Hayashi H., Iijima M., Kataoka K., Nagasaki Y. / pH-sensitive nanogel possessing reactive PEG tethered chains on the surface macromolecules. // - 2004. – V. 37. – № 14. - P. 5389 - 5396
42. McAllister K., Sazani P., Adam M., Cho M.J., Rubinstein M., Samulski R.J., DeSimone J.M. / Polymeric nanogels produced via inverse microemulsion polymerization as potential gene and antisense delivery agents. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. - № 51. - P. 15198 - 15207
43. Oh J.K., Tang C., Gao H., Tsarevsky N.V., Matyjaszewski K. / Inverse miniemulsion ATRP: a new method for synthesis and of well-defined watersoluble/cross-linked polymeric particles. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. - № 16. – P. 5578 – 5584
44. Oh J.K., Siegwart D.J., Lee H.J., Sherwood G., Peteanu L., Hollinger J.O., Kataoka K., Matyjaszewski K. / Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as

- potential drug delivery carriers: synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V. 129. - № 18. – P. 5939 - 5945
45. Averick S.E., Paredes E., Irastorza A., Shrivats A. R., Srinivasan A., Siegwart D.J., Magenau A. J., Cho H.Y., Hsu E., Averick A.A., Kim J., Liu S., Hollinger J.O., Das S.R., Matyjaszewski K. / Preparation of cationic nanogels for nucleic acid delivery. // *Biomacromolecules.* – 2012. – V. 13. - № 11. – P. 3445 – 3449
46. Lee H., Mok H., Lee S., Oh Y.-K., Park T.G. / Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels. // *J. Control. Release.* - 2007. – V. 119. - № 2. – P. 245 – 252
47. Gota C., Okabe K., Funatsu T., Harada Y., Uchiyama S. / Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. - № 8. – P. 2766 – 2767
48. Zhang J., Xu S., Kumacheva E. / Polymer microgels: reactors for semiconductor metal, and magnetic nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. - V. 126. - № 25. – P. 7908 - 7914
49. Zhang J., Xu S., Kumacheva E. / Photogeneration of fluorescent silver nanoclusters in polymer microgels. // *Adv. Mater.* – 2005. – V. 17. – P. 2336 – 2340
50. Wong J.E., Gaharwar A.K., Müller-Schulte D., Bahadur D., Richtering W. / Dual-stimuli responsive PNIPAM microgel achieved via layer-by-layer assembly: magnetic and thermoresponsive. // *J. Colloid. Interface Sci.* – 2008. – V. 324. - № 1-2. – P. 47 - 54
51. Okeyoshi K., Suzuki D., Yoshida R. / Effect of nanointegration on photoinduced hydrogen-generating nanogel systems. // *Langmuir.* – 2012. – V. 28. - № 2. – P. 1539–1540
52. Blanco A., López C., Mayoral R., Míguez H., Meseguer F., Mifsud A., Herrero J. / CdS photoluminescence inhibition by a photonic structure. // *Appl. Phys. Lett.* – 1998.- V. 73. – P. 1781 - 1783
53. Vlasov Yu. A., Luterova K., Pelant I., Hönerlage B., Astratov V. N. / Enhancement of optical gain of semiconductors embedded in three-dimensional photonic crystals // *Appl. Phys. Lett.* – 1997. V. 71. – P. 1616 - 1618
- 54 Абакумова Е.Г., Левашов А.В., Березин И.В., Мартинек К. / Универсальный ферментный катализатор для реакции в воде и в органическом растворителе. Каталитическая активность и

- стабильность  $\alpha$ -химотрипсина, включенного в частицы сшитого полиакриламида коллоидных размеров. // Докл. Акад. Наук РАН. – 1985. – Т. 283. - № 1. – С. 136 – 139
55. Tischer W., Wedekind F. / Immobilized enzymes: methods and applications. // Top Curr Chem. – 1999. – V. 200. – P. 95 – 126
56. Liu H.A., Webster Y.J. / Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. // Biomaterials. – 2004. – V. 28. - № 2. – P. 354 - 369
57. Sekine Y., Moritani Y., Fukazawa T.I., Sasaki Y., Akiyoshi K. / A hybrid hydrogel biomaterial by nanogel engineering: bottom-up design with nanogel and liposome building blocks to develop a multidrug delivery system. // Adv. Healthcare Mater. – 2012. – V. 1. - № 6. – P. 722 – 728
58. Jia X., Yeo Y., Clifton R.J., Jiao T., Kohane D.S., Kobler J.B., Zeitels S.M., Langer R. / Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration. // Biomacromolecules. – 2006. – V. 7. – № 12. - P. 3336 - 3344
59. Saunders J.M., Tong, T., Le Maitre C.L., Freemont T.J., Saunders B.R. / A study of pH-responsive microgel dispersions: from fluid-to-gel transitions to mechanical property restoration for load-bearing tissue. // Soft Matter. – 2007. – V. 3. – № 4. - P. 486 – 494
60. Lally S., Mackenzie P., LeMaitre C.L., Freemont T.J., Saunders B.R. / Microgel particles containing methacrylic acid: pH-triggered swelling behaviour and potential for biomaterial application. // J. Colloid. Interface. Sci. – 2007. – V. 316. - № 2. – P. 367 - 375
61. Shi M.L., Khondee S., Linz T.H., Berkland C. / Poly(N-vinylformamide) nanogels capable of pH-sensitive protein release. // Macromolecules. – 2008. – V. 41. - № 17. – P. 6546 - 6554
62. Chacko R.T., Ventura J., Zhuang J., Thayumanavan S. / Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform. // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2012. - V. 64. - № 9. – P. 836 – 851
63. Bailey A.M., Arcidiacono J., Benton K.A., Taraporewala Z., Winitsky S. / United states food and drug administration regulation of gene and cell therapies. // Adv. Exp. Med. Biol. – 2015. – V. 871. – P. 1 - 29
64. Mintzer M.A., Simanek E E. / Nonviral vectors for gene delivery. // Chem. Rev. – 2009. - V. 109. - № 2. - P. 259 - 302
65. Beloqui A., Solinís M.Á., Rodríguez-Gascón A., Almeida A.J., Prétat V. / Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. // Nanomedicine. – 2015. – V. 15. – P. 00178 - 00181

66. Garnett M.C. / Gene-delivery systems using cationic polymers. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* – 1999. – V. 16. - № 2. – P. 147 - 207
67. Read M.L., Logan A., Seymour L.W. / Barriers to gene delivery using synthetic vectors. // *Adv. Genet.* – 2005. – V. 53. – P. 19 - 46
68. Cho Y.W., Kim J.-D., Park K. / Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2003. - V. 55. - № 6. - P. 721 - 734
69. Behr J.P. / The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. // *Chimia.* – 1997. – V. 51. - № 1–2. – P. 34 – 36
70. Sonawane N.D., Szoka F.C.Jr., Verkman A.S. / Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. // *J. Biol. Chem.* – 2003. - V. 278. - № 45. – P. 44826 – 44831
71. Ouyang D., Zhang H., Parekh H.S., Smith S.C. / The effect of pH on PAMAM dendrimer-siRNA complexation — endosomal considerations as determined by molecular dynamics simulation. // *Biophysical Chemistry.* – 2011. – V. 158. – № 2 – 3. - P. 126 – 133
72. Kono K., Akiyama H., Takahashi T., Takagishi T., Harada A. / Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery. // *Bioconjugate Chem.* – 2005. – V. 16. – P. 208 - 214
73. Midoux P., Kichler A., Boutin V., Maurizot J.C., Monsigny M. / Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. // *Bioconjug. Chem.* – 1998. – V. 9. - № 2. – P. 260 – 267
74. Midoux P., Monsigny M. / Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. // *Bioconjug. Chem.* – 1999. - V. 10. - № 3. – P. 406 – 411
75. Midoux P., Pichon C., Yaouanc J.J., Jaffres P.A. / Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. // *Brit. J. Pharmacol.* – 2009. - V. 157. - № 2. – P. 166 – 178
76. Ihm C.J.-E., Han K.-O, Han I.-K, Ahn K.-D., Han D.-K., Cho C.-S. / High transfection efficiency of poly(4-vinylimidazole) as a new gene carrier. // *Bioconjugate Chem.* – 2003. – V. 14. – № 4. - P. 707 - 708
77. Pack D.W., Putnam D., Langer R. / Design of imidazole-containing endosomolytic biopolymers for gene delivery. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2000.- V. 67. - № 2. – P. 217 – 223

78. Akin A., Thomas M., Klibanov A.M., Langer R. / Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. // *J. Gene Med.* – 2005. – V. 7. – № 5. – P. 657 – 663
79. Ke J.-H., Young T.-H. / Multilayered polyplexes with the endosomal buffering polycation in the core and the cell uptake-favorable polycation in the outer layer for enhanced gene delivery. // *Biomaterials.* – 2010. – V. 31. – № 35. – P. 9366 - 9372
80. Creusat G., Rinaldi A.-S., Weiss E., Elbaghdadi R., Remy J.-S., Mulherkar R., Zuber G. / Proton sponge trick for pH-sensitive disassembly of polyethylenimine-based siRNA delivery systems. // *Bioconjugate Chem.* – 2010. – V. 21. – № 5. – P. 994 – 1002
81. Kabanov A.V., Kabanov V.A. / DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. // *Bioconjug. Chem.* – 1995. – V. 6. – № 1. – P. 7 - 20
82. Зезин А.Б., Кабанов В.А. / Новая форма водорастворимых полиэлектролитных комплексов. // *Успехи химии.* – 1982. – Т. 51. – № 9. – С. 1447 – 1483.
83. Manning G.S. / Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. // *Acc. Chem. Res.* – 1979. – V. 12. – P. 443 - 449
84. Schatz C., Lucas J.-M., Viton C., Domard A., Pichot C., Delair T. / Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. // *Langmuir.* – 2004. – V. 20. – № 18. – P. 7766 - 7778
85. Raspaud E., Toma A.C., Livolant F., Rädler J. / Interaction of DNA with cationic polymers. // *DNA interactions with polymers and surfactants.* Ed. Dias R. S., Lindman B. – New Jersey: J. Wiley and Sons. – 2008. – P. 119 - 129
86. Bertin A. / Polyelectrolyte complexes of DNA and polycations as gene delivery vectors. // *Adv. Polymer Sci.* – 2014. – V. 256. – P. 103 - 195
87. Jorge A.F., Dias R.S., Pereira J.C., Pais A.A. / DNA condensation by pH-responsive polycations. // *Biomacromolecules.* – 2010. – V. 11. – № 9. – P. 2399 – 2406
88. Minagawa K., Matsuzawa Y., Yoshikawa K., Matsumoto M. / Direct observation of the biphasic conformational change of DNA induced by cationic polymers. // *FEBS Lett.* – 1991. – V. 295. – № 1-3. – P. 67 – 69
89. Takahashi M., Yoshikawa K., Vasilevskaya V.V., Khokhlov A.R. / Discrete coil-globule transition of single duplex DNAs induced by polyamines. // *J. Phys. Chem. B.* – 1997. – V. 101. – № 45. – P. 9396 – 9401

90. Khan M.O., Mel'nikov S.M., Jönsson B. / Anomalous salt effect on DNA conformation: Experiment and theory. // *Macromolecules*. – 1999. – V. 32. - № 26. – P. 8836 – 8840
91. Manning G.S. / Thermodynamic stability theory for DNA doughnut shapes induced by charge neutralization. // *Biopolymers*. – 1980. - V. 19. - № 1. - P. 37 - 59
92. Allen M.J., Bradbury E M., Balhorn R. / AFM analysis of DNA–protamine complexes bound to mica. // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. - № 11. – P. 2221 – 2226
93. Conwell C.C., Vilfan I.D., Hud N.V. / Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2003. – V. 100 - № 16. – P. 9296 - 9301
94. Ahn H.H., Lee M.S., Cho M.H., Shin Y.N., Lee J.H., Kim K.S., Kim M.S., Khang G., Hwang K. C., Lee I.W., Diamond S.L., Lee H.B. / DNA/PEI nano-particles for gene delivery of rat bone marrow stem cells. // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. – 2008. – V. 313 – 314. – P. 116 – 120
95. Mann R., Ganguli R.M. / DNA condensation by poly-L-lysine at the single molecule level: Role of DNA concentration and polymer length // *J.Control. Release*. – 2008 – V. 125. - № 3. – P. 252 – 262
96. Liu L., Yang Y.-L., Wang C., Yao Y., Ma Y.-Z., Hou S., Feng X.-Z. / Polymeric effects on DNA condensation by cationic polymers observed by atomic force microscopy. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – V. 75. - № 1. – P. 230 – 238
97. Sukhishvili S.A., Obol'ski O.L., Astaf'eva I.V., Kabanov A.V., Yaroslavov A.A. / DNA-containing interpolyelectrolyte complexes: interaction with liposomes. // *Polymer Sci.* – 1993. - V. 35. – № 11. - 1895 - 1899
98. Cherng J.Y., van de Wetering P., Talsma H., Hennink W.E., Crommelin D. / Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. // *J. Pharm. Res.* – 1996. - V. 13. - № 7. - P. 1038 - 1042
99. Tang M., Szoka F.C. / The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. // *Gene Therapy*. – 1997. - V. 4. - № 8. - P. 823 - 832



100. Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V. / Stability of DNA-containing interpolyelectrolyte complexes in water-salt solutions. // *Macromol. Chem. Phys.* – 1999. - V. 200. - № 11. – P. 2533 - 2540
101. Пергушов Д.В., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. / Влияние низкомолекулярных солей на поведение водорастворимых нестехиометричных полиэлектrolитных комплексов. // *Высокомогл. Соединения сер. А.* – 1993. - Т. 35. - С. 844 - 849
102. Izumrudov V.A, Zhiryakova M.V., Kudaibergenov S.E. / Controllable stability of DNA-containing polyelectrolyte complexes in water-salt solutions. // *Biopolymers.* - 1999. - V. 52. - № 2.– P. 94 - 108
103. San Juan A., Letourneur D., Izumrudov V.A. / Quaternized poly(4-vinylpyridine)s as model gene delivery polycations: Structure-function study by modification of side chain hydrophobicity and degree of alkylation. // *Bioconjug. Chem.* – 2007. - V. 18. - № 3. - P. 922 - 928
104. Trukhanova E.S., Izumrudov V.A., Litmanovich A.A., Zelikin A.N. / Recognition and selective binding of DNA by ionenes of different charge density. // *Biomacromolecules.* – 2005. – V. 6. - № 6. - P. 3198 - 3201
105. Jager M., Schubert S., Ochrimenko S., Fischer D., Schubert U.S. / Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. – V. 41. – № 13. - P. 4755 - 4767
106. Parka M.R., Hanb K.O., Hanb I.K., Choa M.H., Nahd J.W., Choia Y.J., Choa C.S. / Degradable polyethylenimine-alt-poly(ethylene glycol) copolymers as novel gene carriers. // *J. Control. Release.* – 2005. - V. 105. – № 3. - 367–380
107. Teo P.Y. , Yang C. , Hedrick J.L., Engler A.C., Coady D.J., Ghaem-Maghami S., George A.J., Yang Y.Y. / Hydrophobic modification of low molecular weight polyethylenimine for improved genetransfection. // *Biomaterials.*- 2013. – V. 34. - № 32. – P. 7971 - 7979
108. Jones R.A., Poniris M.H., Wilson M.R. / pDMAEMA is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes. // *J. Control. Release.* – 2004. – V. 96. - № 3. – P. 379 - 391
- 109 Funhoff A.M., van Nostrum C.F., Koning G.A., Schuurmans-Nieuwenbroek N.M.E., Crommellin D.J.A., Hennink W.E. / Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. // *Biomacromolecules.* - 2004. – V. 5. - № 1. – P. 32 – 39

110. Xu D.-M., Yao S.-D., Liu Y.-B., Sheng K.-L., Hong J., Gong P. - J., Dong L. / Size-dependent properties of M-PEIs nanogels for gene delivery in cancer cells. // *Int. J. Pharm.* – 2007. – V. 338 - № 1 – 2. – P. 291 - 296
111. Dong L., Xu H., Liu Y.-B., Lu B., Xu D.-M., Li B.-H., Gao J., Wu M., Yao S.-D., Zhao J., Guo Y.-J. / M-PEIs nanogels: potential nonviral vector for systemic plasmid delivery to tumor cells. // *Cancer Gene Therapy.* – 2009. – V. 16 – № 7. - P. 561 – 566
112. Oishi M., Hayashi H., Itaka K., Kataoka K., Nagasaki Y. / pH-Responsive PEGylated nanogels as targetable and low invasive endosomolytic agents to induce the enhanced transfection efficiency of nonviral gene vectors. // *Colloid. Polym. Sci.* – 2007. – V. 285. - № 9. – 1055 – 1060
113. Fujii H., Shin-Ya M., Takeda S., Hashimoto Y., Mukai S., Sawada S., Adachi T., Akiyoshi K., Miki T., Mazda O. / Cycloamylose-nanogel drug delivery system mediated intratumor silencing of the vascular endothelial growth factor regulates neovascularization in tumor microenvironment // *Cancer Sci.* – 2014. – V. 105. - № 12. – P. 1616 – 1625
114. Newland B., Tai H., Zheng Y., Velasco D., Di Luca A., Howdle S.M., Alexander C., Wang W.; Pandit A. / A highly effective gene delivery vector--hyperbranched poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) from in situ deactivation enhanced ATRP. // *Chem. Commun. (Camb).* – 2010. – V. 46. - №. 26. – P. 4698 - 4700
115. Zhao T., Zhang H., Newland B., Aied A., Zhou D., Wang W. / Significance of branching for transfection: synthesis of highly branched degradable functional poly(dimethylaminoethyl methacrylate) by vinyl oligomer combination. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2014. – V. 53. – № 24. - P. 6095 - 6100
116. Elder R.M., Emrick T., Jayaraman A. / Understanding the effect of polylysine architecture on DNA binding using molecular dynamics simulations. // *Biomacromolecules.* – 2011. – V. 12. - № 11. – P. 3870 - 3879
117. Kadlecova Z., Rajendra Y., Matasci M., Baldi L., Hacker D.L., Wurm F.M., Klok H.A. / DNA delivery with hyperbranched polylysine: a comparative study with linear and dendritic polylysine. // *J. Control. Release.* - 2013 – V. 169. - № 3. - P. 276 - 288
118. Dai Z., Gjetting T., Matthebjerg M.A., Wu C., Andresen T.L. / Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through a mechanistic study of linear and branched PEI. // *Biomaterials.* 2011. – V. 32 - № 33. – P. 8626 - 8634

119. Wightman L., Kircheis R., Rössler V., Carotta S., Ruzicka R., Kursa M., Wagner E. / Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. // *J. Gene Med.* - 2001 - V. 3. - № 4. – P. 362 - 372
120. Wiseman J.W., Goddard C.A., McLelland D., Colledge W.H. / A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene deliver to epithelial cells in vitro and in vivo. // *Gene Therapy.* – 2003. – V. 10. - № 19. – P. 1654 – 1662
121. Lai W.F., Green D.W., Jung, H.S. / Linear poly(ethylenimine) cross-linked by methyl- $\beta$ -cyclodextrin for gene delivery. // *Curr. Gene Ther.* – 2014. – V. 14. – № 4. - P. 258 - 268
122. Sun Y.-X., Zhang X.-Z., Cheng H., Cheng S.-X., Zhuo R.-X. / A low-toxic and efficient gene vector: Carboxymethyl dextran-graft-polyethylenimine. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* - 2008 – V. 84. - № 4. – P. 1102 - 1110
123. Bitko V., Barik S. / Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. // *BMC Microbiol.* – 2001. – V. 1. - № 34. - Epub 2001 Dec 20.
124. Litmanovich E.A., Zakharchenko S.O., Stoichev G.V. / Influence of chain charge and complexation on the overlap and entanglements formation in poly(acrylic acid) salt-containing aqueous solutions. // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. - V. 111. - № 29. - P. 8567 - 8571
125. Kean T., Roth S., Thanou M. / Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. // *J. Control. Release.* – 2005. – V. 103. - № 3. – P. 643 - 653
126. de Wet J.R., Wood K.V., DeLuca M., Helinski D.R., Subramani S. / Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. // *Mol. Cell Biol.* – 1987. – V. 7. - № 2. – P. 725 – 737.
127. Dementieva E., Fedorchuk E.A., Brovko L.Y., Savitskii A.P., Ugarova N.N. / Fluorescent properties of firefly luciferases and their complexes with luciferin. // *Bioscience Reports.* – 2000. - V. 20. - № 1. – P. 21 - 30
128. Pawley J. / *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* // New-York.: Springer Science & Business Media. - 2006

129. Tseng C.-L., Peng C.-L., Huang J.-Y., Chen J.-C., Lin F.-H. / Gelatin nanoparticles as gene carriers for transgenic chicken applications. // *J. Biomater. Appl.* - 2013. - V. 27. - № 8. - P. 1055 - 1065
130. Филипович Ю.Б. / Основы биохимии: учебник для хим. и биол. спец. пед. ун-тов и инт-ов // М.: Агар. - 1999
131. Eicke H.F., Rehak J. / On the formation of water/oil microemulsions // *Heir. Chim. Acta.* - 1976. - V. 59. - № 8. - P. 2883 - 2891.
132. Дехант И., Данц Р., Киммер В., Шмольке Р. / Инфракрасная спектроскопия полимеров. // М.: Химия. - 1976
133. Chern Ch. - Sh. / Principles and Applications of Emulsion Polymerization. // New Jersey: J. Wiley and Sons Inc. - 2008
134. Pristiniski D., Kozlovskaya V., Sukhishvili S.A. / Fluorescence correlation spectroscopy studies of diffusion of a weak polyelectrolyte in aqueous solutions // *J. Chem. Phys.* - 2005. - V. 122. - № 1. - P. 14907 - 14915
135. Layman J.M. / Structure-Property-Transfection Relationships in Polycation-mediated Non-viral DNA Delivery. // Dissertation in partial fulfillment of the requirements for the degree of PhD in Material Science and Engineering. - Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute, 2008
136. Mengarelli V., Auvray L., Pastré D., Zeghal M. / Charge inversion, condensation and decondensation of DNA and polystyrene sulfonate by polyethylenimine. // *Eur. Phys. J. E.* - 2011. - V. 34. - № 11. - P. 127 - 137
137. Petzold G., Nebel A., Buchhammer H.-M., Lunkwitz K. / Preparation and characterization of different polyelectrolyte complexes and their application as flocculants. // *Colloid. Polym. Sci.* - 1998. - V. 276. - № 11. - P. 125 - 130
138. Buchhammer H.M., Kramer G., Lunkwitz K. / Interaction of colloidal dispersions of non-stoichiometric polyelectrolyte complexes and silica particles. // *Colloid Surf. A* - 1994. - V. 95. - № 2 - 3. - P. 299 - 304
139. Kekkonen J., Lattu H., Stenius P. / Adsorption Kinetics of Complexes Formed by Oppositely Charged Polyelectrolytes. // *J. Colloid. Interface Sci.* - 2001. - V. 234. - P. 384 - 392.

140. Lee H., Venable R.M., MacKerell A.D., Pastor R.W.Jr. / Molecular dynamics studies of polyethylene oxide and polyethylene glycol: hydrodynamic radius and shape anisotropy. // *Biophys. J.* – 2008. – V. 95. - № 4. - P. 1590 – 1599
141. Shifrina Z.B., Kuchkina N.V., Rutkevich P.N., Vlasik T.N., Sushko A.D., Izumrudov V.A. / Water-soluble cationic aromatic dendrimers and their complexation with DNA. // *Macromolecules.* – 2009. -V. 42. - № 24. - P. 9548 – 9560
142. Стогов С.В., Изумрудов В.А., Муронец В.И. / Структурные изменения в белке связанном с полиэлектролитом зависят от гидрофобности и степени полимеризации полиэлектролита. // *Биохимия.* – 2010. -Т. 75. - № 4. - С. 437 - 442
143. Shalova I.N., Naletova I.N., Saso L., Muronetz V.I., Izumrudov V.A.. / Interaction of polyelectrolytes with proteins. 3. Influence of complexing polycations on the thermoaggregation of oligomeric enzymes. // *Macromol. Biosci.* – 2007. - V.7. - № 7. - С. 929-939
144. Остерман Л.А. / Хроматография белков и нуклеиновых кислот. // М.: Наука. - 1985
145. Post C.B. / Excluded volume of an intermediate-molecular-weight DNA. A Monte Carlo analysis. // *Biopolymers.* – 1983. -V. 22.- № 4. - P. 1087 - 1096
146. Павлов Г.М., Зайцева И.И., Губарев А.С., Гаврилова И.И., Панарин Е.Ф. / Диффузионно-вискозиметрический анализ молекул полистиролсульфоната натрия и его молекулярно-конформационные характеристики. // *Ж. Прикл. химии.* - 2006. - Т. 79. - № 9.- С. 1506 - 1509
147. Жирякова М.В., Изумрудов В.А. / Преимущества и перспективы флуоресцентного метода исследования полиэлектролитных комплексов ДНК, основанного на конкурентном вытеснении интеркалированного красителя. // *Высокомолек. соед., сер. А.* - 2007. - Т. 49. - № 12. - С. 2092 - 2106
148. Goldstein L., Levin Y., Katchalski E. / A water-insoluble polyanionic derivative of trypsin. II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behaviour. / *Biochemistry.* – 1964. - V. 3. - № 12. - P. 1913 - 1919
149. Izumrudov V.A. / Polyelectrolyte complexes as smart nanoengineered systems for biotechnology and gene delivery. // *Advances in Regenerative Medicine: Role of Nanotechnology, and Engineering* Ed. Shastri V. P., Altankov G., Lendlein A. – Varna: Springer. – 2010. – P. 379 - 405.

150. Horvath A.T., Horvath A.E., Lindström T., Wågberg L. / Diffusion of Cationic Polyelectrolytes into Cellulosic Fibers. // *Langmuir*. – 2008. - V. 24. - P. 10797 - 10806
151. Bysell H., Malmsten M. / Visualizing the Interaction between Poly-L-lysine and Poly(acrylic acid) Microgels Using Microscopy Techniques: Effect of Electrostatics and Peptide Size. // *Langmuir*. – 2006. - V. 22. - P. 5476 - 5484
152. Wågberg L., Hägglund R. / Kinetics of Polyelectrolyte Adsorption on Cellulosic Fibers. // *Langmuir*. – 2001. - V. 17 - № 4. - P. 1096 – 1103
153. Kabanov V.A., Zezin A.B., Rogacheva V.B., Prevish V.A. / Active transport of linear polyions in oppositely charged swollen polyelectrolyte networks. // *Makromol. Chem.* – 1989. - V. 190. - № 9. - P. 2211 - 2216
154. Kabanov V.A., Zezin A.B., Izumrudov V.A., Bronich T.K., Bakeev K.N. / Cooperative interpolyelectrolyte reactions. // *Makromol. Chem.* – 1985. – V. 13. - № 13. – P. 137 – 155
155. Кучкина Н.В., Лаптинская Т.В., Цветков Н.В., Русанов А.Л., Изумрудова В.А., Шифрина З.Б. / Образование растворимых комплексов катионных полипиридилфениленовых дендримеров с ДНК. // *Высокомолек. Соед. Сер. С* – 2010. – Т. 52. - № 1. - P. 105 – 110
156. Müller M., Keßler B., Fröhlich J., Poeschla S., Torger B. / Polyelectrolyte complex nanoparticles of poly(ethyleneimine) and poly(acrylic acid): preparation and applications. // *Polymers*. – 2011. – V. 3. – № 2. - P. 762 - 778
157. Mullen P.M., Lollo C. P., Phan Q.C., Amini A., Banaszczyk M.G., Fabrycki J.M., Wu D.P., Carlo A.T., Pezzoli P., Coffin C.C., Carlo D.J. / Strength of conjugate binding to plasmid DNA affects degradation rate and expression level in vivo. // *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* – 2000. – V. 1523. – P. 103 – 110
158. Sharma R., Lee J.-S., Bettencourt R.C., Xiao C., Konieczny S.F., Won Y.-Y. / Effects of the incorporation of a hydrophobic middle block into a PEG-polycation diblock copolymer on the physicochemical and cell interaction properties of the polymer-DNA complexes. // *Biomacromolecules*. – 2008. – V. 9. - № 11. - P. 3294 – 3307
159. Tamkovich S. N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V., Rykova E.Y., Pyshnyi D.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. / Circulating DNA and DNase activity in human blood. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2006. - V. 1075. - P. 191 – 196

160. Hunter A.C. / Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2006. - V. 58. - № 14. - P. 1523 - 1531
161. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. / Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. // *Nature*. – 1998. - V. 391 - № 6669. - P. 806 - 811
162. Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. / RNA Interference: biology, mechanism, and applications. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – V. 67. - № 4. – P. 657 – 685
163. Iijima A., Hachisu R., Kobayashi H., Hashimoto K., Asano D., Kikuchi H. / Establishment of evaluation method for siRNA delivery using stable cell line carrying the luciferase reporter gene. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2007. - V. 30. - P. 1844 - 1850
164. Lee H., Son S.H., Sharma R., Won Y.Y. / A Discussion of the pH-dependent protonation behaviors of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA) and poly(ethylenimine-*ran*-2-ethyl-2-oxazoline) (P(EI-*r*-EOz)). // *J. Phys. Chem. B* – 2011. - V. 115. - № 5. - P. 844 - 860
165. van de Wetering P., Moret E.E., Schuurmans-Nieuwenbroek N.M., van Steenbergen M.J., Hennink W.E. / Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. // *Bioconjug Chem.* – 1999. – V. 10. – № 4. – P. 589 - 597
166. Freeman E.C., Weiland L.M., Meng W.S. / Modeling the proton sponge hypothesis: examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2013. – V. 24. – № 4. – P. 398 – 416.
167. Kopatz I., Remy J.S., Behr J.P. / A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. // *J. Gene Med.* – 2004. – V. 6. – № 7. – P. 769 - 776