

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

на правах рукописи

ДУРЫМАНОВ МИХАИЛ ОЛЕГОВИЧ

Исследование процессов адресной доставки генетического
материала в раковые клетки и в опухоли меланомы

Специальность 03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена
Российской академии наук и на биологическом факультете Московского
государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Соболев Александр Сергеевич

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится ... года в ... часов на заседании
диссертационного совета ... на базе Московского государственного университета
имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского государственного
университета имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан ... года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Страховская М.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Нуклеиновые кислоты являются очень привлекательными с точки зрения терапии молекулами, поскольку способны воздействовать на саму причину заболевания в случае непосредственной доставки к клеткам-мишеням. Кроме того, генно-терапевтические препараты могут быть адаптированы для лечения многих нарушений, как врождённых, так и приобретённых (в том числе рака), путём изменения последовательности переносимого генетического материала [Yousefi et al., 2013].

Тем не менее, клиническое применение нуклеиновых кислот ограничено отсутствием эффективных и безопасных систем их адресной доставки. В настоящее время большинство клинических испытаний проводятся с использованием вирусных систем доставки, главным образом, аденовирусов. Основным преимуществом вирусных векторов является высокая эффективность трансфекции, то есть доставки ДНК в ядра клеток-мишеней. Однако их применение встречает целый ряд ограничений, к которым относятся малая ёмкость переносимого генетического материала, свойственная вирусам собственная клеточная специфичность, способность реверсии к дикому типу в результате рекомбинации или мутаций, иммуногенность и другие. Разрабатываемые в качестве альтернативы невирусные системы доставки генетического материала лишены большей части этих недостатков, но в то же время демонстрируют, как правило, более низкую трансфицирующую способность, многие из них токсичны, а потому неприменимы для клинического использования [Park et al., 2006]. При создании такого рода конструкций одной из основных задач является оптимизация их состава и физико-химических свойств, от которых зависит эффективность доставки нуклеиновых кислот.

Полиплексы представляются одними из наиболее перспективных вариантов невирусных систем доставки генетического материала благодаря низкой токсичности, простоте синтеза и возможности модификации различными функциональными молекулами. Одной из часто используемых модификаций полиплексов для направленной доставки является включение в их состав специфического лиганда к рецепторам, сверхэкспрессированным на поверхности раковых клеток [Holgado et al., 2012, Mehra et al., 2013]. Данный подход применялся для доставки генетического материала с помощью полиплексов путём включения в их состав лигандных молекул к $\alpha(v)\beta(3)$ -интегриновым рецепторам [Ng et al., 2009], рецепторам эпидермального фактора роста [de Bruin et al., 2007], трансферрина [Kursa et al., 2003], фолата [Cheng et al., 2009] и других, в зависимости от типа опухоли. В частности, в случае опухоли меланомы на роль такого лиганда может претендовать синтетический MC1SP-пептид, являющийся агонистом меланокортиновых рецепторов первого типа [Szardenings et al., 2000], которые

сверхэкспрессированы на поверхности меланомных клеток в подавляющем большинстве случаев [Salazar-Onfray et al., 2002]. Возможность включения лиганда к меланокортиновым рецепторам в состав полиплексов позволит придать им дополнительный уровень специфичности при доставке в клетки опухоли меланомы, а, следовательно, более выраженный терапевтический эффект.

Кроме того, с целью повышения эффективности доставки ДНК в раковые клетки *in vivo* с помощью такого рода конструкций актуальной задачей является также изучение транспорта полиплексов на пути в ядра меланомных клеток. При внутривенном введении наночастицам полиплексов нужно преодолеть, во-первых, сосудистый барьер в опухоли, а, во-вторых, внутриклеточные мембранные барьеры, включающие внешний мембранный, эндосомальный и ядерный мембранный барьеры, что является необходимым условием успешной экспрессии переносимого терапевтического гена. Следует отметить, что в настоящее время отсутствуют работы, связанные с комплексным изучением транспорта ДНК в составе наночастиц полиплексов на всём их пути с момента введения в кровь вплоть до переноса в ядра клеток-мишеней, а также сведения о влиянии включения лиганда в состав полиплексов на процессы их транспорта. Комплексные исследования, включающие анализ физико-химических свойств частиц полиплексов и изучение их поведения в организме, крайне необходимы при поиске новых подходов для увеличения эффективности доставки генетического материала.

Цель и задачи исследования. В рамках настоящей работы была поставлена **цель исследовать процессы транспорта и эффективность доставки генетического материала с помощью полиплексов с лигандом к меланокортиновым рецепторам первого типа в раковые клетки и в опухоли меланомы.**

Для достижения цели работы был поставлен следующий ряд **задач**:

- Получить полиплексы с лигандом к меланокортиновым рецепторам 1 типа и контрольные полиплексы без лиганда, а также оценить их физико-химические свойства.
- Исследовать процессы внутриклеточного транспорта данных полиплексов и эффективности доставки с их помощью генов в раковые клетки меланомы *in vitro*.
- Проанализировать процессы накопления и микрораспределения полиплексов в опухоли меланомы и в нормальной подкожной соединительной ткани в качестве контроля.
- Оценить на уровне целого организма эффективность доставки генов в составе лигандированных и контрольных (безлигандных) полиплексов.

Научная новизна и практическая значимость. Настоящая работа посвящена изучению влияния внеклеточных и внутриклеточных барьеров на процесс доставки полиплексов на модели мышинной опухоли меланомы с использованием полиплексов на основе блок-сополимера полиэтиленimina с полиэтиленгликолем (ПЭИ-ПЭГ) и пептидным лигандом MC1SP к меланокортиновым рецепторам 1 типа, сверхэкспрессированным на поверхности подавляющего большинства меланом человека и мыши.

В рамках данной работы впервые были получены полиплексы с лигандом, обладающие специфичностью к раковым клеткам меланомы. Такого рода полиплексы продемонстрировали более высокую эффективность доставки различных генов по сравнению с контрольными полиплексами без лиганда, что может быть связано с более высокой скоростью поступления лигандированных полиплексов в клетки меланомы.

Впервые были детально изучены процессы накопления и микрораспределения полиплексов в опухоли и в нормальной подкожной соединительной ткани в качестве контроля. Данный процесс включает несколько стадий: связывание с поверхностью кровеносных сосудов, выход из сосудов в ткань и дальнейшую диффузию в межклеточном матриксе. Сосудистый барьер является серьезным препятствием на пути полиплексов, несмотря на гораздо более высокую скорость его преодоления в опухолевых сосудах по сравнению с нормальными капиллярами, что было показано с помощью математического моделирования. Согласно полученным данным, присутствие лиганда в составе полиплексов не влияет на процессы их накопления и микрораспределения в опухоли, но в то же время увеличивает эффективность доставки генов, что, скорее всего, связано с различиями в транспорте на внутриклеточном этапе.

Полученные данные важны не только с точки зрения разработки невирусных векторов на основе поликатионов, но и для других наноразмерных систем доставки генетического материала, включая вирусные векторы, поскольку как вне-, так и внутриклеточные барьеры являются для них общими.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на конференциях: 1) 2nd International School “Nanomaterials and Nanotechnologies in Living Systems. Safety and Nanomedicine”, September, 19-24, 2011, Moscow region, Russia; 2) IV съезд биофизиков России, 20-26 августа, 2012, Нижний Новгород, Россия; 3) 4th International Congress “Nanotechnology, Medicine & Biology”, March, 13-15, 2013, Krems, Austria; 4) 21st International Symposium “Nanostructures: Physics and Technology”, June, 24-28, 2013, St.-Petersburg, Russia; 5) 25th European Conference on Biomaterials, September, 8-12, 2013, Madrid, Spain.

Публикации. По материалам работы опубликовано 10 печатных работ. Из них 4 статьи в международных рецензируемых журналах и 6 тезисов докладов и материалов конференций.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на ... страницах, включает 2 таблицы, 39 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего ... источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение полиплексов и анализ их физико-химических свойств.

Для приготовления полиплексов использовали плазмидную ДНК и синтезированные ранее блок-сополимеры полиэтиленimina и полиэтиленгликоля с пептидным лигандом MC1SP, являющимся агонистом меланокортиновых рецепторов первого типа (MC1R) [Szardenings et al., 2000], сверхэкспрессированных на поверхности клеток большинства меланом [Salazar-Onfray et al., 2002]. В качестве контроля были использованы полиплексы на основе нелигандированных блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ.

На первом этапе были определены физико-химические характеристики полученных полиплексов, так как от них сильно зависит способность полиплексов, как и любых других наноразмерных частиц, диффундировать в ткани и проникать в клетки-мишени [Porovic et al., 2010; Dellian et al., 2000]. Измеренные с помощью метода динамического светорассеяния ζ -потенциалы полученных полиплексов изменялись в интервале от + 10 до + 20 мВ, возрастая с увеличением соотношения поликатион/ДНК. Наличие положительного заряда на поверхности комплекса позволяет им эффективнее взаимодействовать с отрицательно заряженными компонентами мембраны клеток-мишеней [De Smedt et al., 2005]. Полиплексы с лигандом показали сравнительно бóльший поверхностный потенциал, чем контрольные полиплексы (Рис. 1). Данный факт косвенно указывает [Ogris et al., 2003] на то, что в составе лигандированных полиплексов положительно заряженный MC1SP-пептид экспонирован на поверхности комплекса. Подобное строение полиплекса позволяет молекулам ПЭГ минимизировать неспецифическое взаимодействие полиплексов с компонентами крови, а лигандному пептиду – обеспечивать взаимодействие с рецепторами на клетках.

Результаты измерения размеров полиплексов методом динамического светорассеяния показали, что в растворе полиплексов присутствуют две фракции: преобладающая по числу частиц (> 99.9 %) фракция полиплексов имеет размеры в среднем около 45 нм, а минорная (< 0.01 %) – 120-150 нм (Рис. 2А). При этом не было

выявлено достоверных различий в размерах для контрольных и лигандированных полиплексов для разных соотношений поликатион/ДНК (от N/P 10 до 40) (Рис. 2Б). Такие размеры частиц препятствуют их выходу из нормальных сосудов, где ширина промежутков между клетками эндотелия составляет 5-12 нм, а также быстрому узнаванию и поглощению клетками ретикуло-эндотелиальной системы, которое наблюдается для частиц, размеры которых превышают 200 нм [Hillaireau et al., 2009], что может привести к их быстрому выведению из кровотока и существенному уменьшению эффективности доставки генов [Smrekar et al., 2003]. Кроме того, полиплексы такого размера способны проникать в клетки по клатрин-зависимому пути эндоцитоза, условием реализации которого является размер поглощаемых частиц менее 150 нм [Grayson et al., 2006].

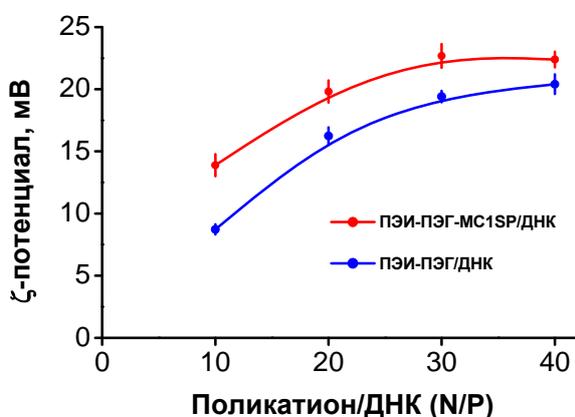


Рис. 1. Измеренные с помощью метода динамического светорассеяния ζ -потенциалы лигандированных (ПЭИ-ПЭГ-МС1SP/ДНК) и контрольных (ПЭИ-ПЭГ/ДНК) полиплексов, приготовленных при разных соотношениях поликатион/ДНК или азот/фосфат N/P (Б). Значения даны в виде среднего \pm ст. ош. [совместно с Ю.В.Храмцовым]

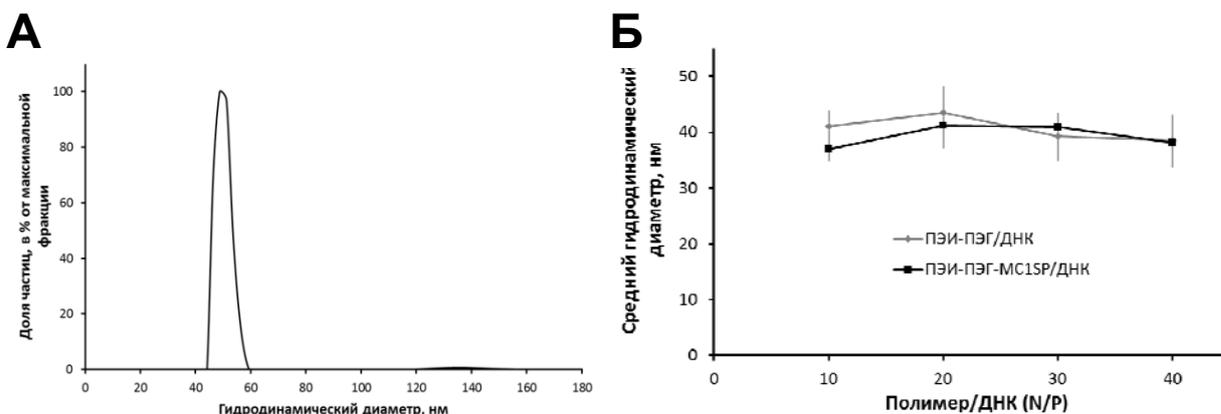


Рис. 2. Измеренные с помощью метода динамического светорассеяния гидродинамические диаметры полиплексов. Распределение по размерам (А) и гидродинамические диаметры преобладающей фракции лигандированных (ПЭИ-ПЭГ-МС1SP/ДНК) и контрольных (ПЭИ-ПЭГ/ДНК) полиплексов, приготовленных при разных соотношениях поликатион/ДНК или азот/фосфат N/P (Б). Значения даны в виде среднего \pm ст. откл.

2. Анализ эффективности доставки генов в раковые клетки меланомы *in vitro* с помощью контрольных и лигандированных полиплексов, а также процессов их внутриклеточного транспорта.

Как показала оценка эффективности доставки генов, полиплексы с лигандом продемонстрировали в два раза более высокую эффективность доставки генов, чем контрольные полиплексы (Рис. 3А).

Для понимания этого явления нами были проанализированы механизмы поступления полиплексов внутрь меланомных клеток М-3, а также кинетика их внутриклеточного транспорта и распаковки. Было показано, что присутствие в клеточной среде альфа меланоцит-стимулирующего гормона (α MSH), естественного агониста MC1R, сильно снижает скорость поглощения полиплексов с лигандом (Рис. 3Б), а также эффективность их трансфекции до уровня, демонстрируемого контрольными полиплексами (Рис. 3А). На эффективность трансфекции клеток линии почки эмбриона человека НЕК293, не имеющих на своей поверхности MCR1 и часто используемых в качестве контроля, не влияло ни присутствие свободного α MSH, ни наличие лиганда в составе полиплексов (Рис. 3А). Все это говорит о высокой степени влияния присутствия лигандного пептида MC1SP в составе полиплексов на эффективность доставки переносимой ими ДНК в ядра клеток-мишеней.

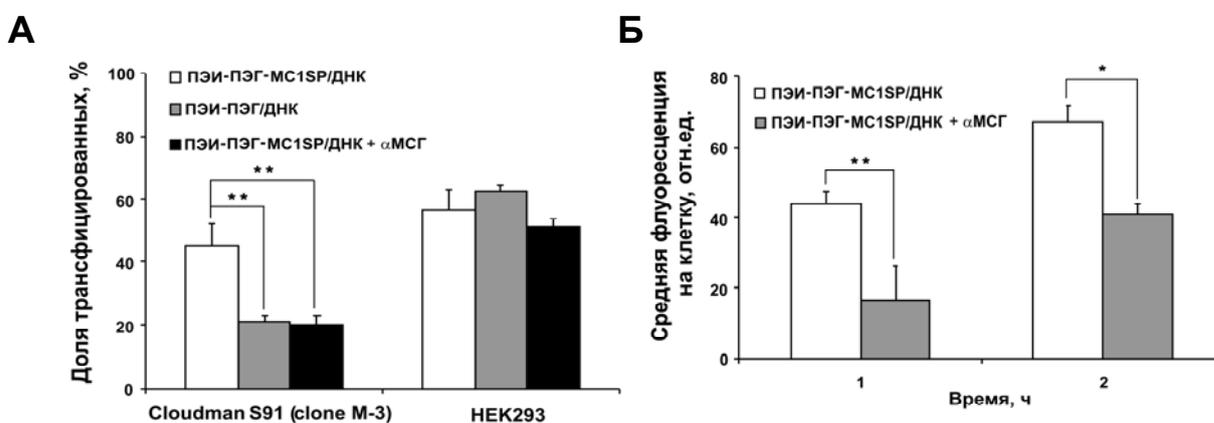


Рис. 3. Эффективность трансфекции клеток линий М-3 и НЕК293 с помощью контрольных (ПЭИ-ПЭГ/ДНК) и лигандированных (ПЭИ-ПЭГ-МС1SP/ДНК) полиплексов (А), а также влияние свободного α МСГ (1 мкМ) в среде на эффективность трансфекции и поглощение клетками М-3 полиплексов с лигандом (Б). Ген *EGFP* был выбран в качестве репортерного гена для оценки эффективности трансфекции. Уровень поглощения меченных квантовыми точками полиплексов определяли с помощью проточной цитометрии. Полиплексы добавляли в количестве 0.5 мкг/мл по ДНК. Значения даны в виде среднего \pm ст. ош. * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим апостериорным t-тестом Даннета).

С помощью ингибиторного анализа эндоцитоза выяснилось, что лигандированные полиплексы накапливаются в клетках меланомы преимущественно путём более быстрого клатрин-зависимого эндоцитоза, в то время как контрольные – с помощью рафт-зависимого неспецифического эндоцитоза (Рис. 4).

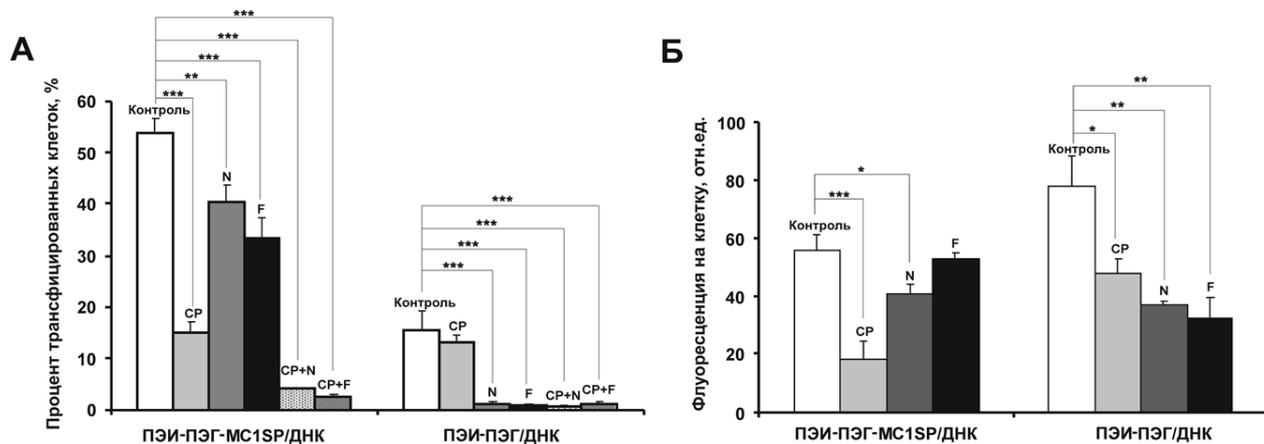


Рис. 4. Эффективность трансфекции (А) и поглощения (Б) контрольных (ПЭИ-ПЭГ/ДНК) и лигандированных (ПЭИ-ПЭГ-МС1SP/ДНК) полиплексов клетками М-3 в присутствии ингибиторов эндоцитоза: хлорпромазина (СР), нистатина (N), филипина III (F) или их совместного присутствия. Ген *EGFP* был выбран в качестве репортерного гена для оценки эффективности трансфекции. Уровень поглощения меченных квантовыми точками полиплексов определяли с помощью проточной цитометрии. Полиплексы добавляли в количестве 0.5 мкг/мл по ДНК. Хлорпромазин, нистатин и филипин III добавляли к клеткам в конечных концентрациях 15, 25 и 1 мкМ соответственно. Значения даны в виде среднего \pm ст. ош. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим апостериорным t-тестом Даннета).

С помощью метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) был проведён сравнительный анализ кинетики внутриклеточного транспорта лигандированных и контрольных полиплексов. Применение технологии резонансного переноса энергии по Фёрстеру (FRET) позволило оценить кинетику распаковки данных частиц в клетках. ДНК в составе полиплексов была помечена квантовыми точками QD605 (донор), а блок-сополимер – красителем Alexa647 (акцептор) (Рис. 5А). Предварительно в буферном растворе с помощью КЛСМ при возбуждении донора были измерены спектры флуоресценции полиплексов, в составе которых была помечена ДНК, либо ДНК и блок-сополимер (Рис. 5Б). Во втором варианте помимо пика на 605 нм, соответствующего флуоресценции квантовых точек (донора), наблюдался также пик на 647 нм, соответствующий красителю Alexa647 (акцептору), что свидетельствует о наличии безызлучательного резонансного переноса энергии по Фёрстеру между донором и акцептором.

Для визуализации ядер и закисляемых компартментов (эндо/лизосом) использовали красители Hoechst 33258 и LysoTracker Green соответственно. Регистрацию изображений

клеток М-3 проводили спустя 2, 4, 6 и 8 ч после добавления полиплексов в режиме Z-stack, регистрируя сигнал в четырёх каналах (Рис. 6).

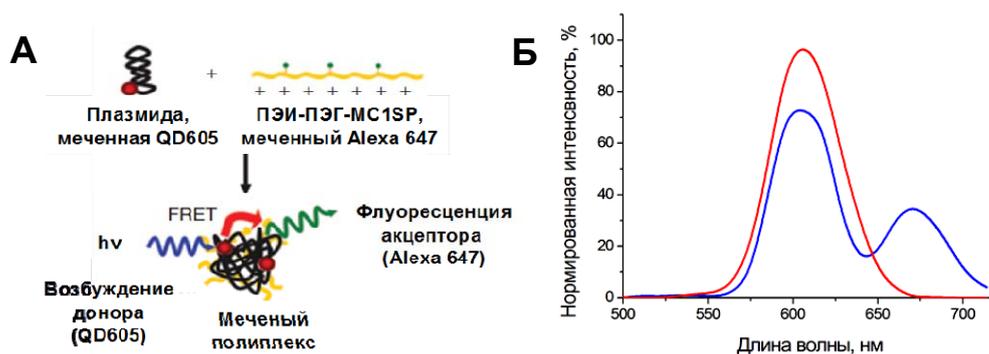


Рис. 5. Схема двойного мечения компонентов полиплексов: ДНК помечена квантовыми точками QD605 (донор), а поликатион ПЭИ-ПЭГ-МС1SP – красителем Alexa647 (акцептор) (А) и спектры флуоресценции полиплексов с двойным мечением (синяя линия), а также полиплексов, в составе которых помечена только ДНК (красная линия), при возбуждении донора ($\lambda = 458$ нм) (Б).

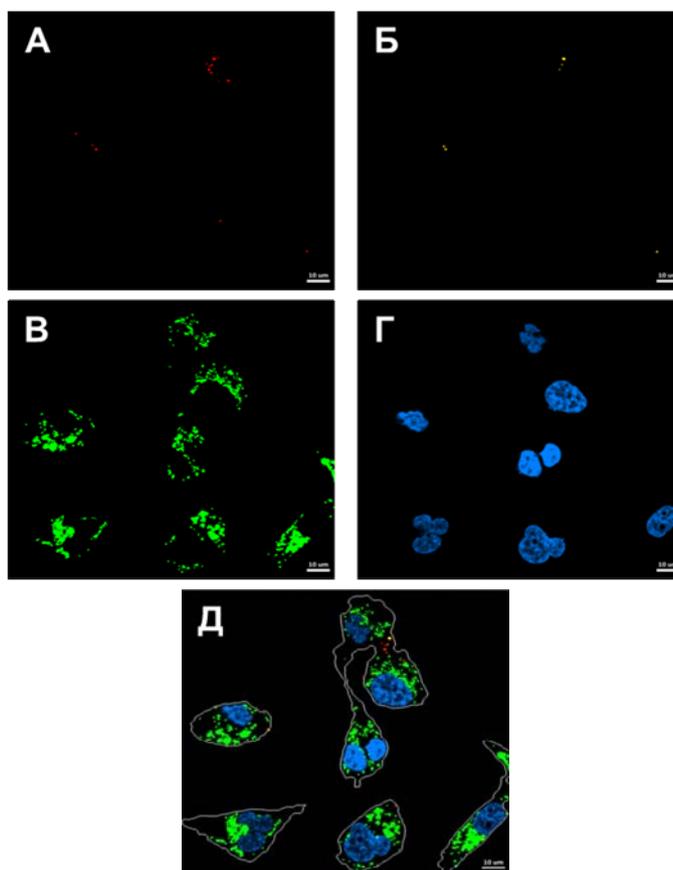


Рис. 6. Типичное изображение клеток М-3 для анализа транспорта и распаковки полиплексов, полученное путём регистрации флуоресцентного сигнала в четырёх каналах: квантовых точек QD605 (распакованные и нераспакованные полиплексы) (А); канал сигнала FRET от Qdot605 к Alexa647 (нераспакованные полиплексы) (Б); канал LysoTracker Green (окрашивает закисляемые компартменты – эндо/лизосомы) (В); канал Hoechst 33258 (окрашивает ядра клеток) (Г); наложение каналов А – Г (Д). Масштабная чёрточка соответствует 10 мкм.

Для количественного анализа накопления полиплексов в клетке был определён объём поглощенных полиплексов, Q , как воксельный объём сигнала квантовых точек в расчёте на одну клетку. Данная характеристика соответствует количеству поглощённой клеткой ДНК [Akita et al., 2004], и такое приближение может быть использовано для количественных оценок. Количество нераспакованных полиплексов, обладающих сигналом FRET, определяли как воксельный объём сигнала AlexaFluor647, возникающего в результате безызлучательного переноса энергии с QD605.

Для оценки скоростей поглощения и распаковки полиплексов внутри клеток были использованы математические модели (Рис. 7).

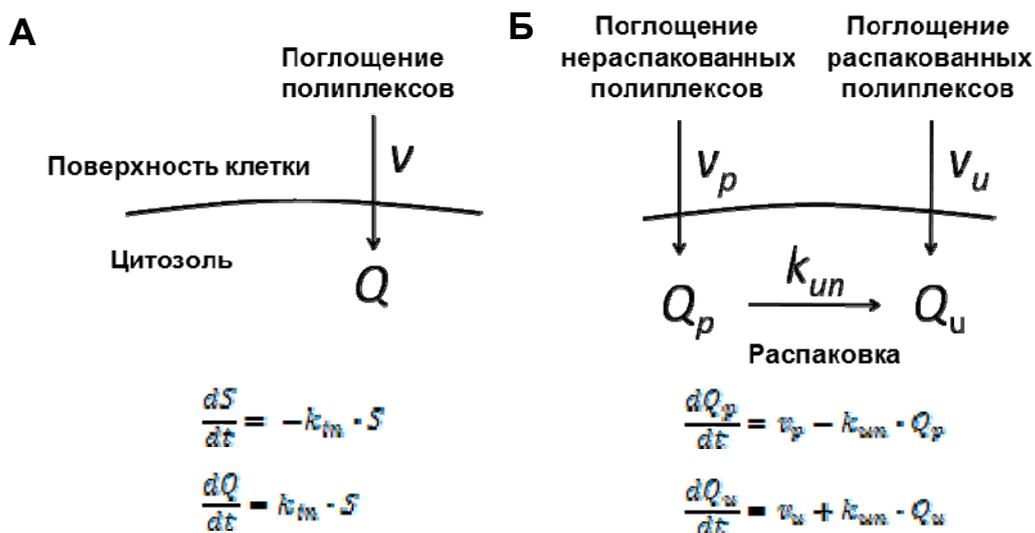


Рис. 7. Математические модели, описывающие общее накопление полиплексов в клетках (А), а также общее накопление нераспакованных и распакованных полиплексов и кинетику процесса распаковки (Б). S – эффективная концентрация полиплексов на клеточной поверхности; Q – объём сигнала квантовых точек в расчёте на одну клетку; k_{in} – константа входа полиплексов в клетку. Общее количество поступивших внутрь клетки полиплексов, Q , можно представить в виде суммы нераспакованных полиплексов Q_p (наблюдался сигнал FRET, обусловленный переносом энергии) и распакованных – Q_u (сигнал FRET отсутствовал). v_p и v_u – скорости входа нераспакованных и распакованных полиплексов, соответственно, и k_{un} – константа распаковки полиплексов в клетке.

Первая модель описывает общее накопление полиплексов в клетках (Рис. 7А), а вторая – общее накопление нераспакованных и распакованных полиплексов, а также кинетику процесса распаковки (Рис. 7Б). Как показали расчёты, скорость накопления нераспакованных полиплексов с лигандом значительно превышает скорость накопления распакованных (Табл. 1). Полиплексы без лиганда поступают в клетки с временной задержкой, что, по-видимому, приводит к их распаковке на клеточной поверхности и обуславливает преимущественное накопление в распакованном состоянии (как следует из полученных констант скоростей), что, возможно, негативно сказывается на эффективности трансфекции из-за большей вероятности деградации ДНК в

распакованном состоянии. Кроме того, лигандированные полиплексы быстрее накапливаются в клеточном ядре, что существенно для обеспечения эффективной доставки генов.

Таким образом, лигандированные полиплексы быстро поглощаются клетками меланомы путем рецептор-опосредованного клатрин-зависимого эндоцитоза, в результате чего они практически не претерпевают распаковки на поверхности клеток в отличие от контрольных полиплексов, что, возможно, позволяет им избежать деградации ДНК в закисляемых компартментах.

Табл. 1. Кинетические характеристики накопления полиплексов в клетках и процесса их распаковки.

	<i>ПЭИ-ПЭГ-МСISP/ДНК</i>	<i>ПЭИ-ПЭГ/ДНК</i>
v (вокс./час)	10.56 ± 0.40	10.76 ± 0.40
v_p (вокс./час)	9.01 ± 1.54	1.73 ± 0.31
v_u (вокс./час)	0*	9.03 ± 0.51
k_{un} (час ⁻¹)	0.27 ± 0.08	0*

* – значение неотличимо от нуля.

3. Изучение кинетики накопления и микрораспределения полиплексов в опухоли и в нормальной подкожной соединительной ткани в качестве контроля с помощью прижизненной микроскопии.

Изучение кинетики накопления и микрораспределения полиплексов проводили с использованием дорзальной накожной камеры методом прижизненной КЛСМ. Концентрацию полиплексов с меченой квантовыми точками ДНК в ткани определяли как суммарный воксельный объём сигнала квантовых точек QD605 на 1 мм³ ткани. Предварительно вычитали фоновый уровень сигнала в данном канале, который измеряли до введения меченых полиплексов в кровь. Кинетику накопления полиплексов оценивали в опухоли, а также в подкожной соединительной ткани, содержащей нормальные кровеносные сосуды (в отличие от опухоли), а потому используемой в качестве контроля.

Как в опухоли, так и в контрольной соединительной ткани (включая кровеносные сосуды) наблюдалось быстрое накопление полиплексов, а затем снижение их общей концентрации на 75 % от 15 мин до 4 часов после внутривенного введения (Рис. 8).

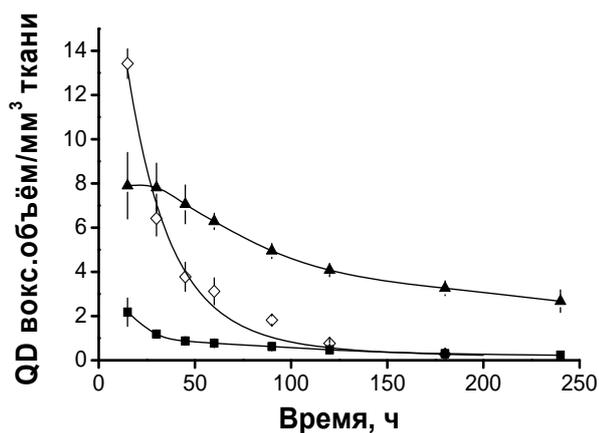


Рис. 8. Кинетики изменения концентрации лигандированных полиплексов в крови (◇), опухоли (▲) и в нормальной подкожной соединительной ткани (■), выраженной в единицах волюмов в канале QD605 на мм³ ткани. Полиплексы (80 мкг по ДНК) с меченой QD605 ДНК вводили внутривенно. Значения даны в виде среднего ± ст. откл.

Анализ колокализации меченных квантовыми точками полиплексов с окрашенными с помощью FITC-декстрана кровеносными сосудами показал, что бóльшая часть накопившихся в опухоли полиплексов образует скопления на поверхности выстилающего сосуда эндотелия (Рис. 9). На поверхности капилляров в нормальной подкожной соединительной ткани размеры и количество агрегатов полиплексов было значительно меньше (Рис. 9). Механизмы, объясняющие селективное связывание положительно заряженных частиц с поверхностью эндотелия опухоли, до сих пор остаются в значительной мере гипотетическими. Причиной такой разницы в накоплении могут быть сильные структурные и функциональные различия в строении опухолевых и нормальных капилляров. Нормальные капилляры покрыты слоем клеток эндотелия и перицитов и подлежащей под ними базальной мембраной, содержащей в своём составе отрицательно заряженные полисахариды, в особенности гиалуронан [Gao et al., 2005]. В стенках сосудов опухоли имеются широкие промежутки между клетками эндотелия, где матрикс базальной мембраны может контактировать с кровью [Hashizume et al., 2000]. Взаимодействие гиалуронана или других отрицательно заряженных компонентов матрикса базальной мембраны с положительно заряженными полиплексами, возможно, обуславливает большее связывание и агрегирование полиплексов на поверхности сосудов опухоли в отличие от нормальных капилляров, где базальная мембрана изолирована от крови слоем эндотелия с небольшими промежутками между клетками. Другой возможной причиной селективной задержки катионных наночастиц на поверхности сосудов опухоли может быть отличающийся состав гликокаликса эндотелия в опухоли по сравнению с нормальными сосудами [Schmitt-Sody et al., 2003]. Ещё одной вероятной причиной может

быть наличие участков сосудов с мозаичной структурой в опухоли, где раковые клетки непосредственно экспонированы в просвет сосуда [Chang et al., 2000]. Так как на поверхности раковых клеток меланомы зачастую наблюдается сверхэкспрессия отрицательно заряженного протеогликана синдекана-2 [Chung et al., 2012], то на участках с мозаичной структурой также за счёт зарядовых взаимодействий может наблюдаться усиленное связывание с частицами полиплексов. В любом случае, эти предположения о возможных механизмах требуют дальнейших исследований.

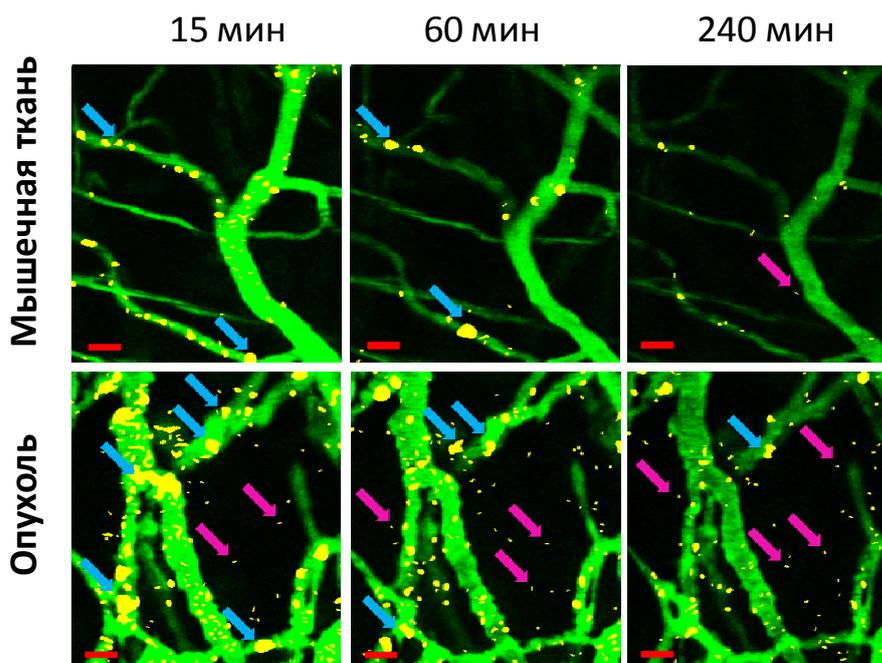


Рис. 9. Микрораспределение лигандированных полиплексов в контрольной соединительной ткани (верхняя панель) и в ткани опухоли (нижняя панель) спустя 15, 60 и 240 мин после внутривенного введения. Кровеносные сосуды были окрашены с помощью введённого 150 кД FITC-декстрана перед введением полиплексов (80 мкг по ДНК) с меченной QD605 ДНК. Голубые стрелки показывают на большие агрегаты полиплексов на поверхности эндотелия, пурпурные – на вышедшие из сосудов частицы. Масштабная чёрточка соответствует 20 мкм.

Наблюдаемое впоследствии вымывание полиплексов и их агрегатов с поверхности стенок сосудов происходит как в опухоли (Рис. 9, 10Б), так и в контрольной соединительной ткани (Рис. 9, 10А). Возможно, это является результатом распаковки полиплексов при взаимодействии с отрицательно заряженным гликокаликсом на поверхности эндотелия с последующим поступлением освободившейся меченой ДНК обратно в кровь. Другой возможной причиной данного явления может быть взаимодействие ПЭИ в составе полиплексов с белками плазмы крови [Zhong et al., 2013; Owens et al., 2006], что приводит к их опсонизации и поглощению клетками врождённого иммунитета [Owens et al., 2006]. Наконец, выход полиплексов обратно в кровь может быть

связан с процессами рециркуляции [Gonçalves et al., 2004; Mickler et al., 2011; Barua et al., 2010] из клеток эндотелия после поглощения путём эндоцитоза.

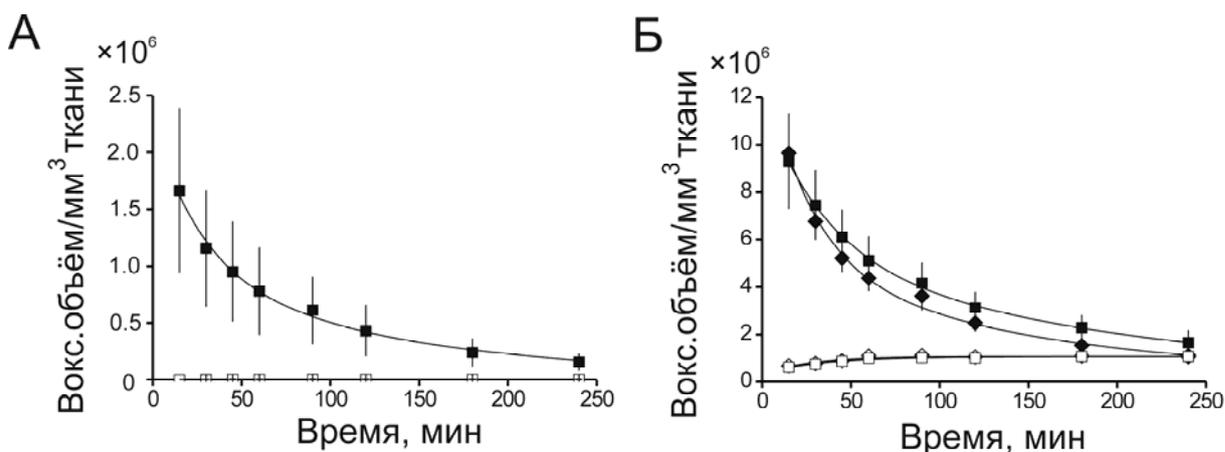


Рис. 10. Кинетика микрораспределения полиплексов с лигандом в нормальной подкожной соединительной ткани (А) и в опухоли (Б), выраженная в единицах воксельных объёмов в канале QD605 на 1 мм^3 ткани. Полиплексы (80 мкг по ДНК) с меченной QD605 ДНК вводили внутривенно. Кровеносные сосуды были окрашены с помощью внутривенно введённого 150 кД ФИТС-декстрана. Анализ микрораспределения выявил на связавшихся с поверхностью сосудов лигандированные (■) и контрольные (◆) полиплексы и вышедшие из сосудов в ткань лигандированные (□) и контрольные (◇) полиплексы. Значения даны в виде среднего \pm ст. ош.

Оценка эффективности выхода полиплексов из сосудов в ткань опухоли показала, что спустя 4 часа после только небольшая доля от изначально накопившегося количества полиплексов проникает в ткань. При этом 60 % от этого количества выходят из сосудов в течение первых 15 минут. Ограниченный выход полиплексов из сосудов в ткань связан, скорее всего, с наличием сосудистого барьера в опухоли, вызванного высокой плотностью клеток и межклеточного матрикса, а также высоким внутриопухолевым давлением. Тем не менее, в контрольной соединительной ткани доля проникших в ткань полиплексов составила 0.2 % от первоначально накопившихся, что в 400 раз меньше, чем в опухоли (Рис. 10). Это доказывает наличие в опухоли так называемого эффекта “повышенной проницаемости и удерживания” — “enhanced permeability and retention” (EPR) [Iyer et al., 2006], который связан с неспецифическим накоплением наночастиц в опухоли, где наблюдается замедленный ток крови из-за неправильной формы кровеносных сосудов, а также дефекты в строении эндотелия, который имеет достаточно широкие промежутки между клетками (до 600 нм и более) [Yuan et al., 1995; Hashizume et al., 2000], в то время как в большинстве нормальных тканей размер щелей между клетками выстилающего сосуда эндотелия не превышает 5-12 нм [Sarin et al., 2010].

Для оценки эффективности проникновения полиплексов вглубь ткани были построены количественные распределения (в воксельных объёмах на 1 мм^3) в зависимости

от расстояния от сосудов и времени после введения (Рис. 11). Согласно полученным данным, максимальная глубина проникновения полиплексов вглубь ткани опухоли составила 20 мкм (Рис. 11А, Б). В отличие от опухоли, в нормальной подкожной соединительной ткани полиплексы не распространялись дальше 5 мкм от границы капилляров (Рис. 11В).

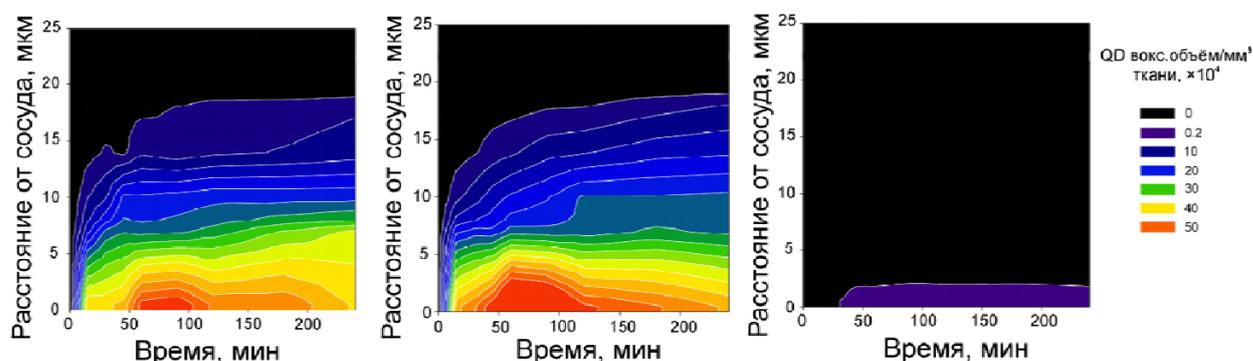
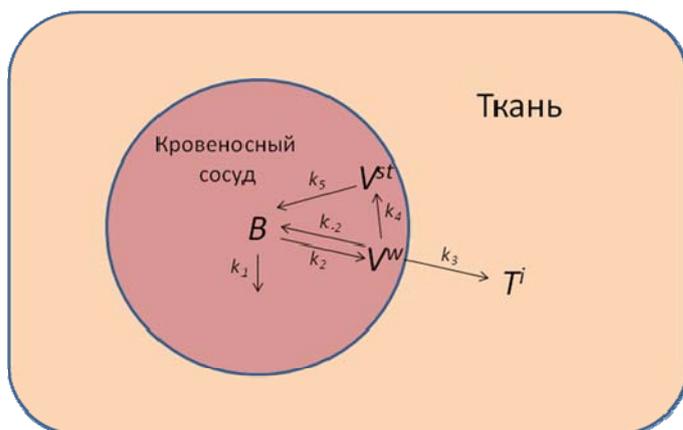


Рис. 11. Кинетика микрораспределения в ткани опухоли (А, Б) и в нормальной подкожной соединительной ткани (В) вышедших из сосудов лигандированных (А, В) и контрольных (Б) полиплексов, выраженная в единицах воксельных объёмов в канале QD605 на 1 мм³ ткани. Полиплексы (80 мкг по ДНК) с меченной QD605 ДНК вводили внутривенно. Кровеносные сосуды были окрашены с помощью внутривенно введённого 150 кД FITC-декстрана. Последующий анализ микрораспределения позволил выявить вышедшие из сосудов полиплексы на различном расстоянии от сосуда.

Для оценки и сравнения кинетических параметров процессов накопления и микрораспределения полиплексов в опухоли и в нормальной подкожной соединительной ткани, нами была разработана математическая модель (Рис. 12), описывающая данные процессы.

Модель описывает кинетику изменения концентрации полиплексов в крови, адгезию на поверхности сосудов и выход в ткань. На первом этапе полиплексы из крови (В) связываются с поверхностью кровеносных сосудов (V^w) за счёт электростатических взаимодействий между положительно заряженными частицами полиплексов и отрицательно заряженным гликокаликсом на клетках эндотелия [van den Berg et al., 2006] с константой скорости k_2 , которая спустя 15 мин после введения полиплексов становится близкой к нулю. Согласно нашему предположению, слабо связавшиеся частицы (V^w) могут диссоциировать обратно в кровь с константой k_{-2} , выходить в ткань (I^t) с константой k_3 , либо поглощаться путём клатрин-зависимого эндоцитоза эндотелиальными клетками (V^{st}) [Mennesson et al., 2005] с константой скорости k_4 . Последние (V^{st}) представляют собой вторую группу удерживаемых на поверхности сосудов полиплексов, которые также могут поступать обратно в русло сосуда с константой скорости k_5 за счёт процесса рециркуляции после их эндоцитоза, наблюдаемом на многих клеточных линиях

[Gonçalves et al., 2004; Mickler et al., 2011; Barua et al., 2010]. Данная математическая модель наилучшим образом описывает экспериментальные данные.



$$\frac{dB}{dt} = -(k_1 + k_2) \cdot B + k_{-2} \cdot V^w + k_5 \cdot V^{st}$$

$$\frac{dV^w}{dt} = k_2 \cdot B - (k_{-2} + k_3 + k_4) \cdot V^w$$

$$\frac{dV^{st}}{dt} = k_4 \cdot V^w - k_5 \cdot V^{st}$$

$$\frac{dT^i}{dt} = k_3 \cdot V^w$$

Рис. 12. Модель, описывающая распределение полиплексов в ткани. B – концентрация полиплексов в крови; V – концентрация полиплексов на поверхности стенки сосудов, включающая связывающиеся с поверхностью эндотелия V^w , или поглощенные эндотелиальными клетками частицы, V^{st} ; T^i – концентрация вышедших из сосудов в ткань полиплексов. k_1 – константа скорости выведения полиплексов из крови; k_2 – константа скорости связывания полиплексов со стенками сосудов; k_{-2} – константа скорости диссоциации адсорбированных на поверхности сосудов полиплексов; k_3 – константа выхода полиплексов в ткань k_4 – константа скорости эндоцитоза полиплексов эндотелиальными клетками; k_5 – константа скорости экзоцитоза полиплексов клетками эндотелия (детали см. в описании модели). Эффективная концентрация полиплексов выражена как воксельный объем сигнала в канале квантовых точек QD605 на мм^3 ткани.

Вычисления на основе модели показали, что константа скорости связывания полиплексов с поверхностью сосудов в опухоли на порядок выше, чем для нормальных капилляров (Табл. 2), что подтверждает наше предположение о структурных различиях опухолевых и нормальных капилляров, в результате чего полиплексы связываются с ними с разным сродством. Рассчитанные константы диссоциации связавшихся с поверхностью сосудов полиплексов как в опухоли, так и в контрольной соединительной ткани оказались практически одинаковыми (Табл. 2). Это свидетельствует о схожести механизмов данных процессов в том и в другом случае. Кроме того, математическое моделирование показало, что полиплексы выходят из опухолевых сосудов в ткань на два порядка быстрее, чем из нормальных капилляров (Табл. 2). Таким образом, структурные аномалии сосудов опухоли обеспечивают более быстрое связывание и проникновение частиц полиплексов в ткань, чем в здоровой подкожной соединительной ткани.

Табл. 2. Полученные из экспериментальных данных с помощью математического моделирования константы скоростей накопления и микрораспределения полиплексов в опухоли и в нормальной подкожной соединительной ткани.

Константа скорости, мин ⁻¹	Нормальная подкожная соединительная ткань	Опухоль
k_1	0.041 ± 0.002	0.053 ± 0.004
k_2 (до 15 мин)	≥ 0.006	≥ 0.03
k_2 (после 15 мин)	0*	0*
$k_{.2}$	0.024 ± 0.007	0.017 ± 0.002
k_3	$(5.5 \pm 1.0) \times 10^{-5}$	$(2.0 \pm 0.6) \times 10^{-3}$
k_4	0.012 ± 0.001	0.013 ± 0.004
k_5	0.0072 ± 0.0012	0.0055 ± 0.0009

* – значение неотлично от нуля

Сравнение накопления и кинетики выхода из сосудов контрольных и лигандированных полиплексов в опухоли не выявило существенных различий. Скорее всего, это связано с преимущественным вкладом пассивного транспорта и накопления полиплексов в результате упомянутого выше эффекта EPR. Похожие результаты были получены и для других наночастиц после включения в их состав лиганда, специфичного к рецепторам на поверхности раковых клеток [Kirpotin et al., 2006; Lee et al., 2010]. Тем не менее, подобная модификация может привести к усилению захвата наночастиц клетками опухоли [Kwon et al., 2012]. В частности, было показано, что присоединение к полиплексам лиганда к рецепторам эпидермального фактора роста [von Gersdorff et al., 2005] привело к их более быстрому поглощению клетками в культуре путём рецептор-опосредованного эндоцитоза и усилению эффективности трансфекции. Следовательно, более быстрое поглощение клетками является важным условием для успешной доставки генов.

Нами не было найдено различий в накоплении (Рис. 10Б), а также в микрораспределении вышедших из сосудов лигандированных и контрольных полиплексов (Рис. 11А, Б). Как известно из литературных данных, в условиях *in vivo* модификация макромолекул или наночастиц лигандом может привести к появлению так называемого эффекта “барьерного связывания” [Lammers et al., 2012]. Это явление обусловлено сильным связыванием содержащих лиганд макромолекул и наночастиц с клетками-мишенями, что препятствует их дальнейшему распространению по опухоли, в то время как немодифицированные частицы глубже проникают в ткань опухоли. Эффект “барьерного связывания” полимерных наночастиц наблюдался в том случае, если их размер не превышал 25 нм [Lee et al., 2010], что свидетельствует о зависимости глубины

проникновения данных частиц в ткань опухоли не только от наличия в их составе лиганда, но и от их размеров. При сравнении распределения лигандированных и контрольных полиплексов мы не наблюдали эффекта “барьерного связывания” (Рис. 11), что может быть связано с их относительно большими размерами (Рис. 2), существенно ограничивающими диффузию такого рода частиц. Ещё одним фактором, ограничивающим диффузию макромолекул и наночастиц, является отрицательно заряженный внеклеточный матрикс [Wiig et al., 2008]. Согласно литературным данным, межклеточное вещество большинства солидных опухолей имеет повышенное содержание глюкозаминогликанов и гиалуронана [Rønnov-Jessen et al., 1996, Toole, 2004]. Используемые нами лигандированные и контрольные полиплексы имеют положительные ζ -потенциалы (Рис. 1), что также снижает подвижность полиплексов, а, следовательно, их проникновение вглубь ткани опухоли [Krasnici et al., 2003].

4. Оценка эффективности доставки гена натрий-йодид симпортёра (*НИС*) в опухоли меланомы с помощью контрольных и лигандированных полиплексов.

Оценку эффективности доставки гена *НИС* в опухоли меланомы с помощью контрольных и лигандированных полиплексов проводили с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ). На первом этапе необходимо было оценить экспрессию доставленного с помощью полиплексов гена *НИС* в опухоли во времени. Согласно полученным данным, максимальный уровень накопленного в опухоли ^{123}I , вызванного экспрессией гена *НИС*, наблюдался спустя 24 ч после введения полиплексов с лигандом и составил 6.8 ± 1.1 % введённой дозы на грамм ткани (Рис. 13А). Похожая кинетика экспрессии была получена при использовании в качестве векторов полиплексов на основе дендримеров полипропиленимина [Chisholm et al., 2009]. Таким образом, эти данные наряду с нашими результатами подтверждают временную природу экспрессии трансгена в результате доставки с помощью векторов на основе катионных полимеров. Как показала обработка реконструированных 3D проекций, достигнутого уровня поглощения йодида оказалось достаточно, чтобы визуализировать опухоль (Рис. 13Б, В). Кроме того, накопление йодида наблюдалось также в органах с естественной экспрессией *НИС* (в частности, в щитовидной железе, желудке, слюнных железах) и в моче, содержащейся в мочевом пузыре (Рис. 13Б, В).

Несмотря на отсутствие различий в накоплении и микрораспределении контрольных и лигандированных полиплексов в опухоли, мы наблюдали в 2 раза большее накопление ^{123}I в опухоли после введения лигандированных полиплексов, несущих ген *НИС*, чем при введении контрольных (Рис. 13Г). Возможно, этот эффект можно объяснить

различиями в механизмах поступления, внутриклеточного транспорта и распаковки данных полиплексов в раковых клетках, которые в свою очередь определяют эффективность доставки переносимого генетического материала в ядра клеток. Как было показано в экспериментах на клетках М-3, различия в эффективности доставки ДНК между лигандированными и контрольными полиплексами были связаны с разницей в скоростях поглощения нераспакованных полиплексов между данными типами частиц. Согласно литературным данным [Strømhaug et al., 1997], рецептор-опосредованный эндоцитоз происходит гораздо быстрее, чем неспецифический адсорбтивный. Эксперименты по ингибиторному анализу путей эндоцитоза подтвердили существенный вклад клатрин-зависимого рецептор-опосредованного эндоцитоза для интернализации лигандированных полиплексов, что обеспечивает их быстрое накопление в клетках меланомы и, по-видимому, благодаря этому предотвращает взаимодействие полиплексов с протеогликанами на поверхности клеток, которое может привести к их распаковке [Hanzlíková et al., 2011] и дальнейшей деградации в эндо- и лизосомах. Кроме того, увеличение скорости поглощения полиплексов за счёт присоединения специфического лиганда позволяет обойти проблему, известную под названием “ПЭГ-дилеммы” [Zhang et al., 2012], которая связана с ослаблением взаимодействия покрытых ПЭГ полиплексов с клетками-мишенями, в результате чего частицы хуже поглощаются и быстрее деградируют в эндо-/лизосомах, а, следовательно, уменьшается эффективность трансфекции. Суммируя все эти доводы, можно заключить, что увеличение скорости поглощения полиплексов благодаря наличию в их составе лиганда к рецепторам на поверхности клеток-мишеней способствует повышению эффективности доставки генов.

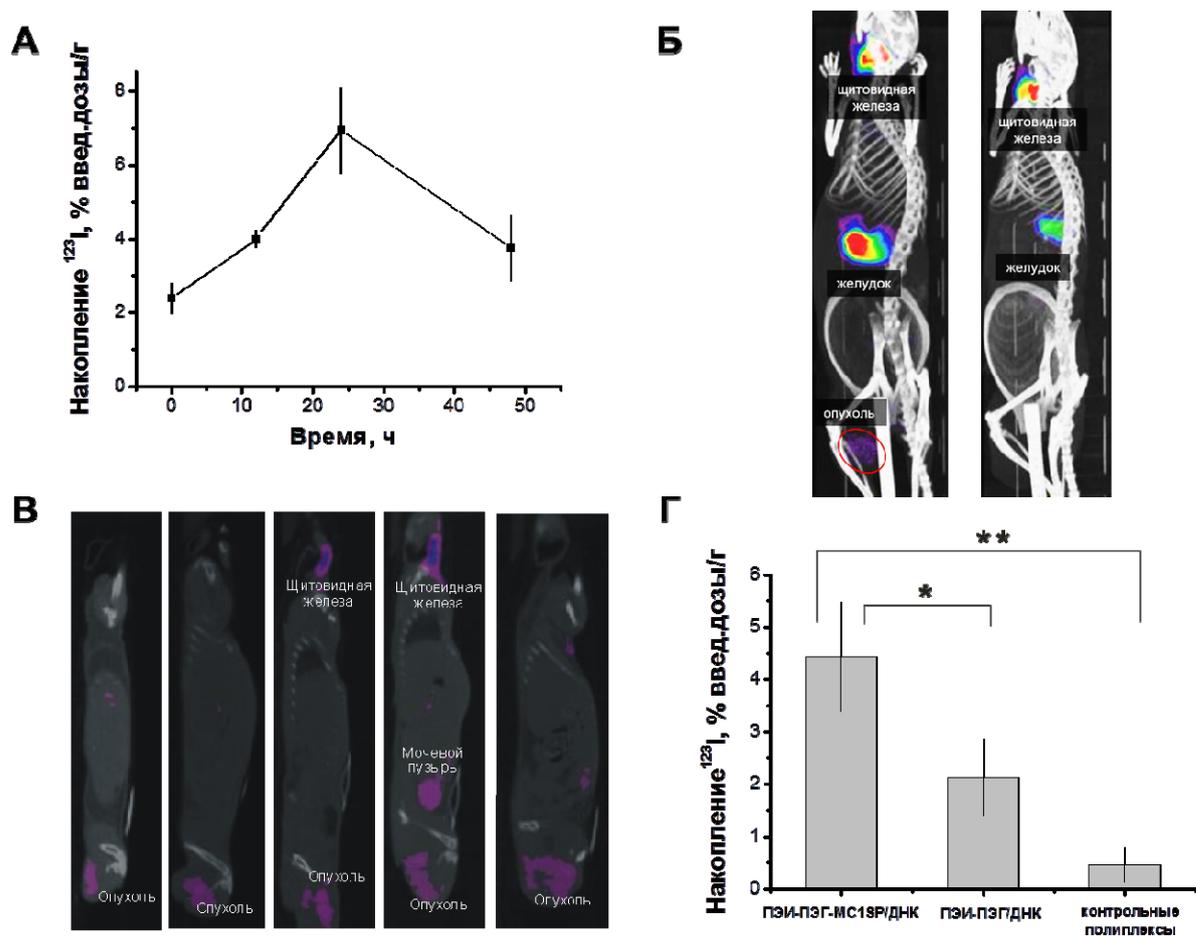


Рис. 13. Выявление накопления ^{123}I в опухоли мышинной меланомы М-3 после доставки гена *НИС* с помощью ОФЭКТ/КТ томографии. Кинетика изменения экспрессии гена *НИС* в опухоли, измеренная по накоплению ^{123}I , доставленного с помощью лигандированных полиплексов (80 мкг по ДНК) (А). Реконструированные 3D-проекции мышей спустя 24 ч после введения полиплексов с лигандом, несущих плазмиду с геном *НИС* (слева), либо те же полиплексы, несущие беспромоторную плазмиду в качестве контроля (справа) (Б). Реконструированные изображения пяти сагитальных срезов, проходящих через область опухоли разных мышей спустя 24 ч после введения полиплексов с лигандом, несущих плазмиду с геном *НИС* (В). Накопление ^{123}I в опухоли спустя 24 ч после введения полиплексов с лигандом, несущих плазмиду с геном *НИС* (ПЭИ-ПЭГ-МС1SP/ДНК), полиплексов без лиганда, несущих плазмиду с геном *НИС* (ПЭИ-ПЭГ/ДНК), либо полиплексов с лигандом, несущих беспромоторную плазмиду (контрольные полиплексы) (Г). Уровень накопления ^{123}I в опухоли нетрансфицированного контроля (2.4 ± 0.4 % ID/г) был вычтен в случае (Г). 18.5 МБк ^{123}I вводили внутривенно для визуализации экспрессии гена *НИС* с помощью ОФЭКТ/КТ томографии. Значения даны в виде среднего \pm ст. откл. % ID/г. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим апостериорным t-тестом Даннета).

Как уже отмечалось выше, с помощью введения полиплексов с лигандом, доставляющих ген *НИС*, нам удалось добиться уровня экспрессии симпортёра, достаточным для визуализации опухоли и составляющим 6.8 ± 1.1 % от введённой дозы на грамм ткани. При этом максимально достижимый уровень захвата йодида в опухоли, наблюдаемый на меланоме М-3 NIS, стабильно трансфицированной геном *НИС*, составил

24.3 ± 3.5 % от введённой дозы на грамм ткани. Вероятнее всего, причиной такой разницы является сосудистый барьер, препятствующий выходу полиплексов в ткань, а также ограниченная диффузия полиплексов в самой ткани опухоли, затрудняющая их продвижение вглубь ткани. Не исключено, что при доставке терапевтического гена с помощью полиплексов трансфицированными оказываются преимущественно клетки областей ткани опухоли, непосредственно прилегающие к кровеносным сосудам, что было продемонстрировано для невирусных систем доставки siRNA на основе катионных липидов [Li et al., 2012].

Таким образом, в работе было показано, что полиплексы с лигандом к меланокортиновым рецепторам первого типа оказались гораздо более эффективными для доставки генов в раковые клетки меланомы в культуре и в опухоли меланомы на мышинной модели по сравнению с нелигандированными аналогами. В то же время сосудистый барьер является существенным препятствием, ограничивающим проникновение полиплексов в ткань опухоли, что требует поиска новых подходов для его преодоления. Совокупность полученных результатов говорит о перспективности использования полиплексов для доставки генов и целесообразности дальнейшего улучшения их свойств.

ВЫВОДЫ:

- Впервые получены полиплексы с лигандом к меланокортиновым рецепторам первого типа и проведена оценка их физико-химических свойств.
- Полиплексы с лигандом продемонстрировали в 2 раза более высокую эффективность трансфекции клеток меланомы М-3 в культуре по сравнению с нелигандированными аналогами.
- Лигандированные полиплексы поступают в клетки меланомы без задержки преимущественно путём рецептор-опосредованного клатрин-зависимого эндоцитоза и практически не претерпевают распаковки на поверхности клеток в отличие от нелигандированных, что, возможно, позволяет им избегать деградации ДНК в закисляемых компартментах.
- Полиплексы накапливаются в ткани опухоли в 400 раз эффективнее, чем в контрольной подкожной соединительной ткани, однако присутствие лиганда в их составе не оказывает влияния на их накопление и распределение в опухоли.
- Лигандированные полиплексы продемонстрировали более высокую эффективность трансфекции опухолей меланомы геном *НИС* при внутривенном введении, чем нелигандированные аналоги (6.8 ± 1.1 % против 4.5 ± 0.8 % введённой дозы ^{123}I на грамм ткани), что позволило визуализировать опухоль с помощью ОФЭКТ/КТ томографии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Трусов Г.А., Уласов А.В., Белецкая Е.А., Храмов Ю.В., Дурыманов М.О., Розенкранц А.А., Сverdlov E.D., Соболев А.С. Исследование влияния механизмов транспорта и распаковки полиплексов на эффективность трансфекции различных клеточных линий//Докл. Акад. Наук РФ – 2011. – Т.437(2). – С.226-228.
2. Durymanov M.O., Beletkaia E.A., Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rodichenko N.S., Slastnikova T.A., Vinogradova T.V., Uspenskaya N.Y., Kopantsev E.P., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Subcellular trafficking and transfection efficacy of polyethylenimine-polyethylene glycol polyplex nanoparticles with a ligand to melanocortin receptor-1//J. Control. Release – 2012. – V.163 – P.211-219.
3. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Kuzmich A.I., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Egorov S.Y., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Microdistribution of MC1R-targeted polyplexes in murine melanoma tumor tissue.//Biomaterials – 2013. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.076 (in press).

4. Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Дурьманов М.О., Соболев А.С. Меланокортиновые рецепторы первого типа и меланома. //Биохимия – 2013. – Т.78(11) – DOI: 10.1134/S0006297913110035 (в печати).

Тезисы конференций:

1. Durymanov M.O., Ulasov A.V., Beletskaya E.A., Rodichenko N.S., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Targeted polyplex nanoparticles for gene delivery into melanoma cells. — 2nd International School “Nanomaterials and Nanotechnologies in Living Systems. Safety and Nanomedicine”, September, 19-24, 2011, Moscow region, Russia, p.170.
2. Розенкранц А.А., Дурьманов М.О., Слостникова Т.А., Кузьмич А.И., Свердлов Е.Д., Соболев А.С. Использование однофотонной эмиссионной компьютерной томографии для определения эффективности доставки генов при помощи наночастиц и диагностики опухолей. — IV съезд биофизиков России, 20-26 августа, 2012, Нижний Новгород, «Новые тенденции и методы в биофизике», стр.79.
3. Дурьманов М.О., Уласов А.В., Белецкая Т.А., Родиченко Н.С., Храмов Ю.В., Розенкранц А.А., Соболев А.С. Наночастицы полиплексов с лигандом для доставки генов в раковые клетки меланомы. — IV съезд биофизиков России, 20-26 августа, 2012, Нижний Новгород, «Физика — медицине и экологии», стр.80.
4. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Kuzmich A.I., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Specific polyplexes for intravital targeting of murine melanoma tumors. — 4th International Congress “Nanotechnology, Medicine & Biology”, March, 13-15, 2013, Krems, Austria, P25.
5. Durymanov M.O., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Slastnikova T.A., Alekseenko I.V., Kuzmich A.I., Bezborodova O.A., Nemtsova E.R., Yakubovskaya R.I., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Polyplex nanoparticles for cancer gene therapy. — 21st International Symposium “Nanostructures: Physics and Technology”, June, 24-28, 2013, St.-Petersburg, Russia, p.113.
6. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Kuzmich A.I., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Distribution of targeted PEI-PEG-based polyplexes in melanoma tumor tissue. — 25th European Conference on Biomaterials, September, 8-12, 2013, Madrid, Spain, OPO048.