



# ТРАНСПОРТНАЯ НАНОСИСТЕМА ДЛЯ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ФУНКЦИИ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭНДОМЕТРИОЗЕ

Е.Парфенюк\*, к.х.н., Н.Алешина\*, Ю.Анциферова\*\*, д.б.н., Н.Сотникова\*\*, д.м.н. / evr@isc-ras.ru

**Н**аряду с созданием новых лекарственных препаратов конструируются наносистемы, способные доставлять лекарство непосредственно к органам и клеткам-мишеням. Использование таких систем имеет ряд преимуществ по сравнению с препаратами в свободном состоянии: повышается растворимость гидрофобных лекарственных средств (ЛС), улучшаются кинетика и эффективность их проникновения сквозь клеточные мембраны. Это обеспечивает повышение уровня биодоступности ЛС, снижение его дозы и побочного влияния.

В качестве носителей предлагаются различные материалы, в том числе ксеро- и аэрогели, полимеры, липосомы, дендримеры. Особое внимание уделяется синтезу частиц на основе диоксида кремния – кремнезема. Это связано со свойствами такого материала (биологическая и токсикологическая инертность, однородная структура, возможность легкого изменения поверхности и варьирования размером частиц).

Высокодисперсный кремнезем широко используется в клинической практике [1]. Его наночастицы предлагается также применять для доставки лекарств к сердечной мышце при ишемии миокарда [2], в качестве носителей ДНК [3], антибиотиков [4]. С учетом данного обстоятельства наноразмерный диоксид кремния был выбран для разработки транспортной системы, переносимой иммуномодулирующий препарат – глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП).

## ОБЪЕКТ ВОЗДЕЙСТВИЯ – ПЕРИТОНЕАЛЬНЫЕ МАКРОФАГИ

Значительно расширилась сфера применения лекарственных препаратов с иммуномодулирующим действием, поскольку иммунные нарушения встречаются при различных заболеваниях, даже когда патогенез не связан с функционированием

иммунной системы в целом. В число таких патологий входит, например, эндометриоз, встречающийся у 5–10% женщин репродуктивного возраста [5] и часто являющийся причиной бесплодия.

Рост очагов эндометриоза возможен вследствие нарушения активности макрофагов, которые содержатся в перитонеальной жидкости. Одна из их основных функций – удаление клеточного дебриса и "умирающих" клеток [6]. Эту функцию

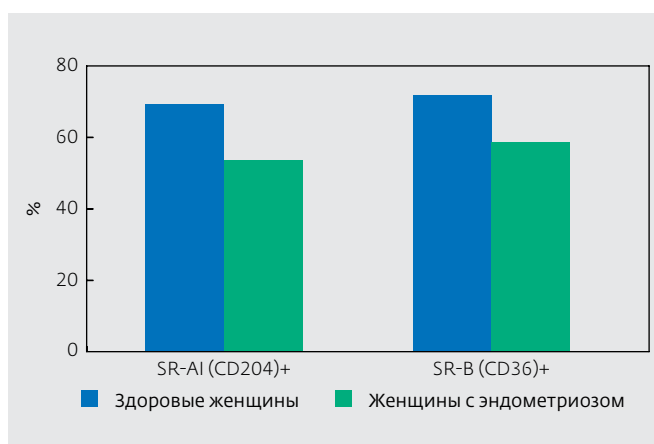


Рис.1. Снижение относительного содержания макрофагов, имеющих на поверхности "рецепторы-мусорщики" SR-AI и SR-B в перитонеальной жидкости больных эндометриозом женщин по сравнению со здоровыми

\* Институт химии растворов им. Г.А.Крестова Российской академии наук.

\*\*+ ФГБУ "Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н.Городкова".



макрофаги осуществляют через специфические мембранные "рецепторы-мусорщики". Распознавая эндометриальные клетки, макрофаги должны удалять их из перитонеальной полости, однако у женщин с эндометриозом этого не происходит.

Можно предположить, что в основе подобной неполноценности макрофагов лежит нарушение их функции как "клеток-мусорщиков". Для проверки гипотезы был оценен уровень экспрессии таких рецепторов – SR-AI- и SR-B-молекул на поверхности перитонеальных макрофагов у пациенток с эндометриозом. Результаты свидетельствуют, что в их перитонеальной жидкости по сравнению с аналогичными показателями для здоровых женщин содержится значительно меньше макрофагов, имеющих на клеточной мембране такие молекулы [7] (рис.1).

Можно предположить, что коррекция функции "клеток-мусорщиков" у макрофагов будет способствовать удалению ими эндометриальных клеток из перитонеальной полости.

Стимулирующее действие на фагоцитарные клетки оказывают иммуномодулирующие препараты бактериального происхождения, в частности, пептиды клеточной стенки бактерий. Все бактерии в клеточной стенке содержат мурамилдипептид (МДП), который распознается специфическими сигнальными рецепторами фагоцитарных клеток и запускает внутриклеточные реакции их активации [8].

В представленном исследовании использовался ГМДП – активное вещество ряда препаратов иммуномодулирующего действия, в частности, ликопида. У пациенток с эндометриозом оценивалось влияние ГМДП на экспрессию "рецепторов-мусорщиков" перитонеальными макрофагами. Для этого обогащенная популяция макрофагов культивировалась в специальной среде RPMI 1640, разработанной в Roswell Park Memorial Institute, с концентрацией ГМДП 1 мг/мл, что соответствует содержанию этого вещества в крови после соответствующей дозы ликопида. Установлено, что после инкубации с ГМДП происходило увеличение количества макрофагов, имеющих на поверхностной клеточной мембране "рецепторы-мусорщики" (рис.2) [7].

Таким образом, ГМДП эффективен при лечении эндометриоза: он значительно усиливает способность макрофагов реагировать с чужеродными агентами посредством повышения уровня экспрессии на их клеточной мембране "рецепторов-мусорщиков".

Следует отметить, что для большинства лекарственных препаратов, в том числе

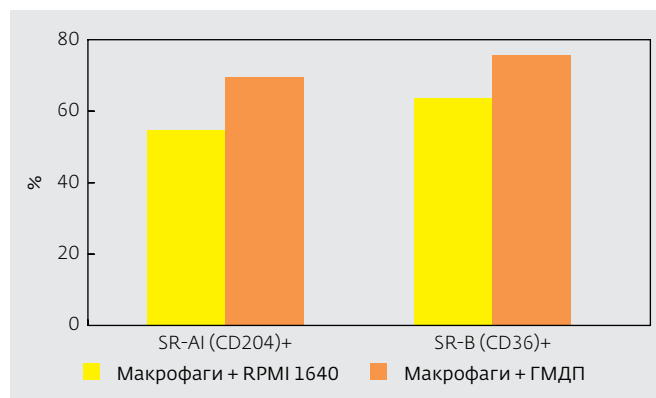


Рис.2. Увеличение экспрессии "рецепторов-мусорщиков" на поверхности перитонеальных макрофагов у пациенток с эндометриозом после воздействия ГМДП

иммуномодуляторов бактериального происхождения, характерна относительно невысокая биодоступность. Для ликопида она составляет 7-13%, причем многие препараты плохо проникают сквозь клеточную мембрану. Один из путей преодоления этого недостатка – доставка лечебных средств с помощью наночастиц непосредственно в клетки-мишени.

### НАНОНОСИТЕЛЬ ДЛЯ ГМДП

В качестве потенциальных носителей иммуномодулятора ГМДП были синтезированы пористые частицы диоксида кремния с различными функциональными группами на поверхности [9]. Синтез проводился золь-гель методом. В присутствии воды и катализатора (кислота или основание) происходит гидролиз прекурсора диоксида кремния – тетраэтоксисилана и его конденсация с образованием полисилоксановых структур. Присоединение к поверхности частиц функциональных групп было обеспечено добавлением модифицирующих агентов: метилтриэтоксисилана – МТЭС, аминопропилтриэтоксисилана – АПТЭС, полиэтиленimina – ПЭИ, что подтверждено данными ИК-спектроскопии и элементного анализа (см. таблицу).

Низкотемпературная адсорбция/десорбция азота показала, что за исключением непористого ПЭИ модифицированного остальные синтезированные материалы – мезопористые образования с диаметром пор в диапазоне 2–50 нм. Важно отметить, что носитель ГМДП должен адсорбировать наибольшее количество лекарственного средства и достаточно прочно удерживать его на поверхности, не вызывая необратимых изменений



## Данные элементного анализа

Образец диоксида кремния	Азот (N), %	Углерод (C), %	Кислород (O), %	Водород (H), %
Немодифицированный	0,008	0,185	0,362	0,178
АПТЭС модифицированный	2,976	9,474	5,772	2,684
ПЭИ модифицированный	8,942	17,486	14,825	4,471
МТЭС модифицированный	0,000	3,393	5,139	0,983

структуры препарата и не оказывая негативного влияния на жизнеспособность и функциональность иммунных клеток. По этой причине использованные в работе синтезированные материалы исследовались на наличие указанных свойств. Кроме того, поскольку ГМДП довольно дорог, его адсорбционные свойства изучались на модельном соединении – сывороточном альбумине.

Исследования свидетельствуют, что адсорбционная способность материалов ( $\text{мг/м}^2$ ) возрастает в ряду МТЭС модифицированный, АПЭС модифицированный – немодифицированный – ПЭИ модифицированный [9].

Калориметрически измеренные изменения энтальпии адсорбции ( $\Delta_{\text{адс}}H$ ) показали, что наиболее сильное взаимодействие модельного

соединения с поверхностью частиц наблюдается для АПТЭС и ПЭИ модифицированного диоксида кремния [10]. На основании полученных результатов сделан вывод о том, что  $\text{SiO}_2$ , модифицированный ПЭИ и АПТЭС – наиболее перспективные носители для лекарственных препаратов белковой природы.

Для выяснения влияния модифицированных частиц  $\text{SiO}_2$  на жизнеспособность макрофагов и определения возможности взаимодействия с ними были приготовлены суспензии этих частиц со средним диаметром 100 и 200 нм в изотоническом растворе. Размеры их определялись из спектров мутности [11, 12] и методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Важно было установить, может ли выбранный тип модифицированных частиц проникать в макрофаги и насколько специфично такое взаимодействие. Проанализирована интенсивность взаимодействия обработанных наночастиц кремнезема с двумя основными типами клеток иммунной системы – лимфоцитами и макрофагами. Выявлено, что их жизнеспособность после суточной инкубации с частицами  $\text{SiO}_2$  (200 и 100 нм), модифицированного АПТЭС, достаточно высока

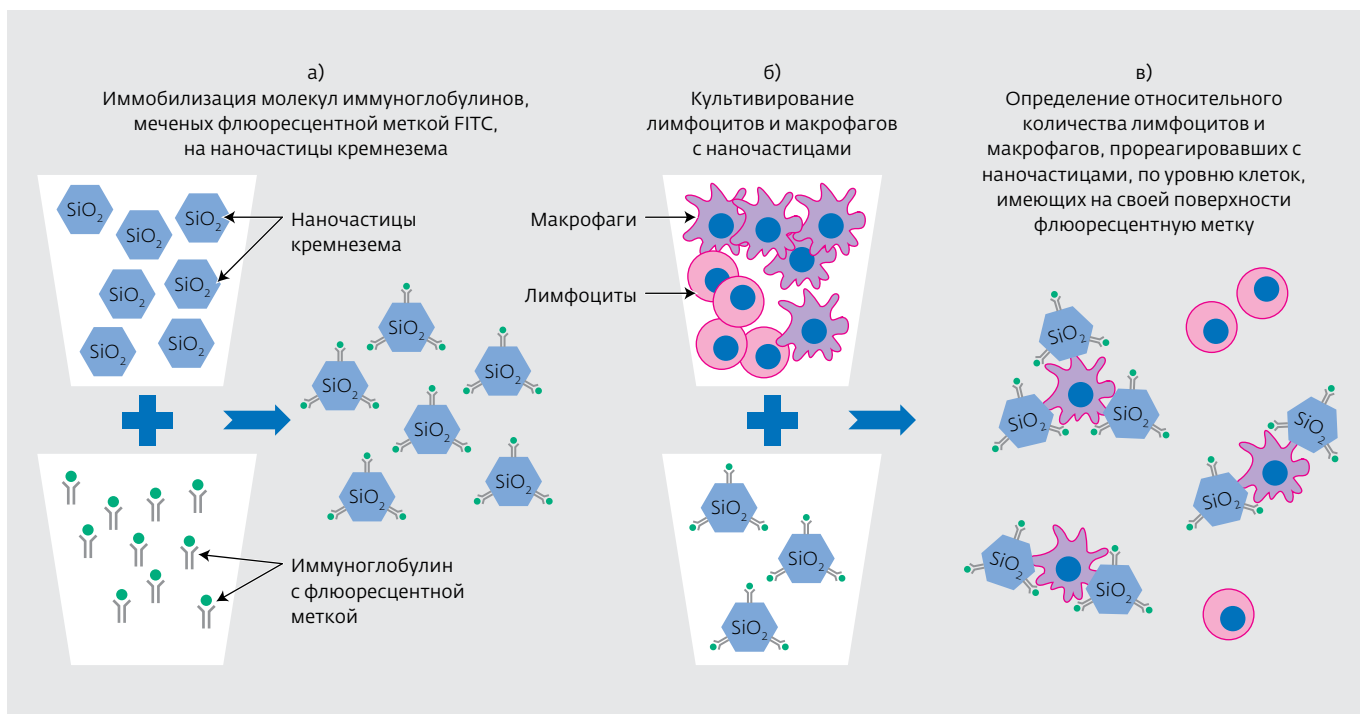


Рис.3. Изучение спонтанного взаимодействия лимфоцитов и макрофагов с частицами  $\text{SiO}_2$



и достигала 80–95% [13]. Вместе с тем частицы ПЭИ-модифицированного диоксида кремния негативно влияли на изучаемые клетки: после 24-часовой инкубации в их присутствии жизнеспособность лимфоцитов и макрофагов составила менее 25%. С учетом выраженного цитотоксического воздействия модифицированные ПЭИ частицы  $\text{SiO}_2$  из дальнейших исследований были исключены.

Для определения уровня спонтанного связывания лимфоцитов и макрофагов с АПТЭС-модифицированными частицами они снабжались флюоресцирующими метками – иммуноглобулинами, конъюгированными с флюороцеинизотицианатом (рис.3).

Наночастицы кремнезема с флюоресцирующими метками добавлялись к суспензии макрофагов или лимфоцитов, инкубировались в течение одного или 24 ч. С помощью проточной цитометрии на FACScan оценивалось количество клеток, имеющих на мембране флюоресцирующие метки – количество прореагировавших с диоксидом кремния макрофагов и лимфоцитов. Уровень лимфоцитов в крови, взаимодействующих с указанными частицами, оказался очень низким (3–10%). Возможно, это объясняется тем, что рецепторы, связывающие частицы диоксида кремния, на поверхности мембраны лимфоцитов отсутствуют. Напротив, макрофаги активно взаимодействовали с АПТЭС-модифицированными частицами  $\text{SiO}_2$ .

Результаты связывания макрофагами частиц диаметром 100 нм представлены на рис.6. После инкубации в течение одного часа присутствие частиц на поверхностной мембране или

во внутриклеточном пространстве зарегистрировано у 60–70% макрофагов. После инкубации в течение 24 ч – более 80% макрофагов имели на мембране светящиеся наночастицы АПТЭС модифицированного кремнезема [13].

Результаты свидетельствуют о том, что такие частицы способны активно связываться с макрофагами, не влияя на их жизнеспособность. Однако для создания транспортной наносистемы очень важно, чтобы носитель был инертен в отношении клетки-мишени и не оказывал влияния на ее функции, так как его основная задача – прицельно доставить лекарственный препарат в нужное место.

Была изучена возможность влияния наночастиц АПТЭС модифицированного кремнезема на функциональное состояние перитонеальных макрофагов, инкубировавшихся в присутствии частиц различного размера. Проверялось также изменение уровня активации макрофагов после инкубации. Установлено, что совместная инкубация с наночастицами диаметром 200 нм приводит к заметному увеличению количества макрофагов, имеющих на поверхности функциональные молекулы HLA-DR и SR-A. Это свидетельствует об активации макрофагов при воздействии частиц такого размера, что крайне нежелательно при их использовании в качестве потенциального наноносителя. Подобный эффект для частиц размером 100 нм не наблюдался, а заметных изменений в активации макрофагов после их инкубации на частицах меньшего размера не происходило вообще. Таким образом, можно заключить, что АПТЭС модифицированные

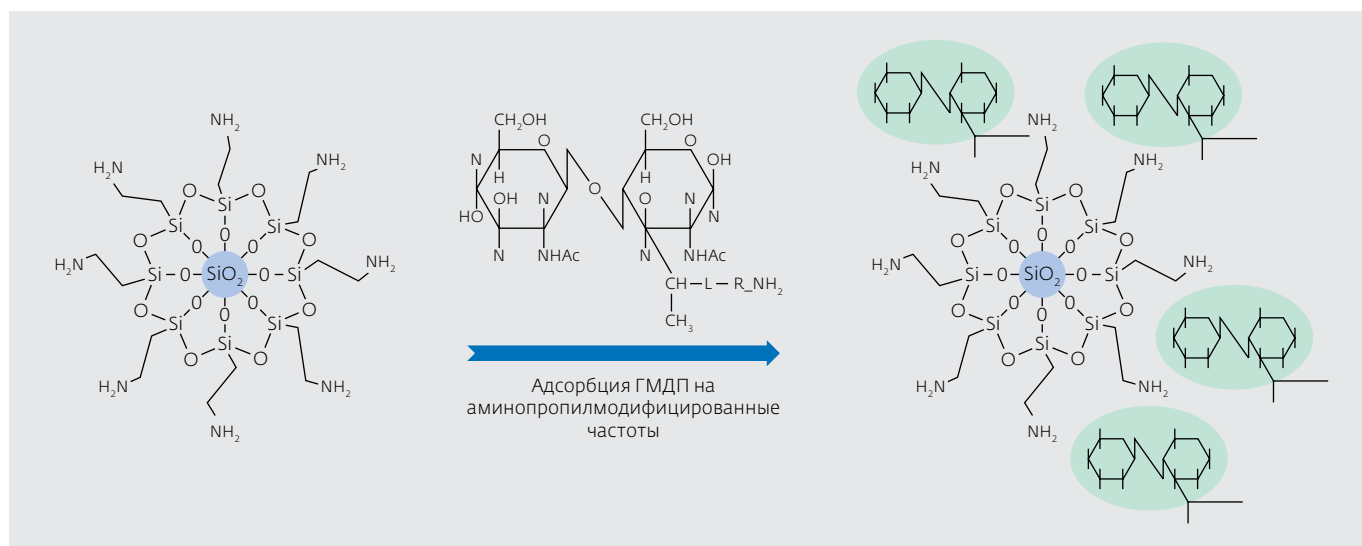


Рис.4. Схема синтеза транспортной системы для препарата ликопид



частицы диоксида кремния диаметром 100 нм не оказывают заметного влияния на жизнеспособность и функциональную активность перитонеальных макрофагов и могут быть использованы в качестве носителя ГМДП.

### СИНТЕЗ ТРАНСПОРТНОЙ НАНОСИСТЕМЫ ГМДП

Иммобилизация ГМДП на наночастицы АПТЭС модифицированного SiO<sub>2</sub> диаметром 100 нм проводилась методом адсорбции из изотонического раствора (рис.4). К суспензии наночастиц в изотоническом растворе (1,5·10<sup>-10</sup> М) добавлялся раствор лекарственного средства ликопад. Молярное соотношение наночастиц к нему составило 1:10. Иммобилизация препарата на наночастицах подтверждена результатами ИК-спектроскопии.

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГМДП В НАНОСИСТЕМЕ И В СВОБОДНОМ СОСТОЯНИИ

Изучена эффективность воздействия на состояние перитонеальных макрофагов пациенток с наружным генитальным эндометриозом чистого препарата ГМДП и в составе разработанной транспортной наносистемы. Макрофаги инкубировались в течение 24 ч в стандартных условиях культивирования клеток в среде RPMI 1640, содержащей чистый препарат ГМДП в концентрации 2 мкг/мл, либо наноразмерные частицы АПТЭС модифицированного кремнезема с иммобилизованным

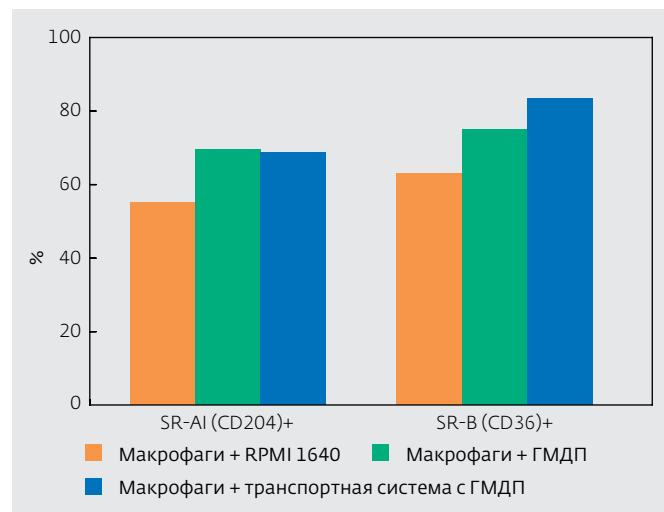


Рис.5. Диаграмма экспрессии "рецепторов- мусорщиков" перитонеальными макрофагами пациенток с наружным генитальным эндометриозом при воздействии препарата ГМДП в свободном состоянии и в транспортной системе





ГМДП, в газопроточном термостате при температуре 37°C и концентрации CO<sub>2</sub> 5%, поскольку именно эти условия наиболее благоприятны для выживания клеток вне организма. Затем проточной цитометрией определялся уровень экспрессии "рецепторов-мусорщиков" (CD36- и CD204-молекул) на поверхности макрофагов. В качестве контрольных значений служили показатели для инкубировавшихся в тех же условиях макрофагов.

Из диаграммы (рис.5) видно, что добавление к перитонеальным макрофагам пациенток с эндометриозом как чистого ГМДП, так и лекарственной транспортной наносистемы с ГМДП приводило к усилению экспрессии "рецепторов-мусорщиков" по сравнению с контрольным экспериментом. Следует отметить, что транспортная наносистема с ГМДП оказывала гораздо более выраженное влияние на экспрессию CD36-молекул перитонеальными макрофагами чем свободный препарат.

Впервые показано, что действие транспортной наносистемы с ГМДП превышает влияние этого препарата в чистом виде. Таким образом, доставка препарата в перитонеальные макрофаги с помощью транспортной системы на основе модифицированного кремнезема позволяет добиться максимального эффекта. Результат может служить основой для создания наносомальной формы иммуномодулятора ГМДП для эффективного лечения эндометриоза, причем разработка таких форм для применяющихся в клинической практике лекарственных средств – реальная альтернатива новым препаратам в чистом виде.

*Работа "Золь-гель синтез гибридных наноматериалов на основе кремнезема и исследование их фундаментальных и функциональных свойств с целью создания транспортных лекарственных систем для лечения эндометриоза" выполнена при поддержке РФФИ 09-03-07513 р\_центр\_а.*

## Литература

1. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. Под ред. А.А.Чуйко. – Киев, Наукова Думка, 2003.
2. Галагудза М.М., Королев Д.В., Сонин Д.Л., Александров И.В., Постнов В.Н., Папаян Г.В., Шляхто Е.В. Пассивная направленная доставка лекарственных препаратов в ишемизированный миокард с использованием наночастиц кремнезема. – Российские нанотехнологии, 2010, №11-12.
3. D.J.Bharali, I.Klejbor, E.K.Stachowiak, P.Dutta, I.Roy, N.Kaur, E.J.Bergey, P.N.Prasad, and M.IK.Stachowiak. Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. – PNAS, 2005, v.102, №32, p.11539-11544.
4. T.Lebold, Ch.Jung, J.Michaelis, and Ch.Braüchle. Nanostructured Silica Materials As Drug-Delivery Systems for Doxorubicin: Single Molecule and Cellular Studies. – Nano Lett., 2009, v.9, №8, p. 2877-2883.
5. M.Larosa, F.Facchini, G.Pozzoli, M.Leone, M.Grande, and B.Monica. Endometriosis: aetio-pathogenetic basis. – Urologia, 2010, v.77, №17, p.1-11.
6. N.Sidell, S.W.Han, and S.Parthasarathy. Regulation and modulation of abnormal immune responses in endometriosis. – Annals New York Academy of Sciences, 2002, v.955, p.159-173.
7. Анциферова Ю.С., Парфенюк Е.В., Красильникова А.К., Елисеева М.А., Куликова Г.А. Экспериментальное обоснование возможности регуляции липоидом экспрессии "рецепторов-мусорщиков" на поверхности перитонеальных макрофагов у женщин с наружным генитальным эндометриозом. – Вестник Уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по аллергологии и иммунологии, 2010, № 2/1 (29), с.241.
8. J.H.Meer, M.G.Netea, and C.A.Dinarello. Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components. – Clin. Exp.Immunol., 2009, v.156, №3, p.428-433.
9. Куликова Г.А., Парфенюк Е.В. Поверхностные свойства модифицированных наноразмерных кремнезёмов и их влияние на иммобилизацию человеческого сывороточного альбумина. – Физикохимия поверхности и защита материалов, 2010, т.46, №5, с.473-477.
10. G.A.Kulikova, I.V.Ryabinina, S.S.Guseynov, E.V.Parfenyuk. Calorimetric study of adsorption of human serum albumin onto silica powders. – Thermochimica Acta, 2010, v.503-504, p.65-69.
11. M.L.Wallach, W.Heller. Theoretical investigations on the light scattering of colloidal spheres. XII. The determination of size distribution curves from turbidity spectra. – J. Chem. Phys., 1961, v.34, p.1796-1802.
12. B.N.Khlebtsov, V.A.Khanadeev, N.G.Khlebtsov. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra. – Langmuir, 2008, v.24, p.8964-8970.
13. G.A.Kulikova, E.V.Parfenyuk, I.V.Ryabinina, Yu.S.Antsiferova, N.Yu.Sotnikova, L.V.Posiseeva, M.A.Eliseeva. In vitro studies of interaction of modified silica nanoparticles with different types of immunocompetent cells. – J. Biomed. Mater. Res., 2010, v.95A, №2, p.434-439.