

## Синтез и характеристика наночастиц на основе лигнин-подобных полимеров

<sup>1</sup>Смирнов И.В., <sup>2</sup>Лисов А.В., <sup>3</sup>Казаков А.С., <sup>2</sup>Звонарев А.Н., <sup>2</sup>Земскова М.Ю.

<sup>1</sup>Биотехнологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов ФИЦ ПНЦБИ РАН

<sup>3</sup>Институт биологического приборостроения ФИЦ ПНЦБИ РАН; [ivan\\_cmirnov\\_98@mail.ru](mailto:ivan_cmirnov_98@mail.ru)

Традиционные варианты лечения рака фармакологическими препаратами имеют определенные ограничения, включая низкую селективность действия, недостаточную концентрацию лекарственного средства при достижении опухолевых тканей, цитотоксичность для здоровых клеток. Наночастицы как новые средства доставки лекарств в клетки опухоли целевым образом в настоящее время рассматриваются как одни из важнейших вариантов решения этих проблем.

В последние годы активно развиваются способы получения лигниновых наночастиц. Недавно были получены и охарактеризованы биоразлагаемые наночастицы на основе лигнина [1]. Опубликованы работы, в которых данные частицы были использованы для успешной доставки лекарственных препаратов в раковые клетки [2, 3]. Схожими по строению с лигнином являются лигнин-подобные полимеры. Такие биополимеры могут быть получены с использованием ферментативного синтеза из фенольных мономеров в результате действия лакказы, полученной из грибов базидиомицетов [4]. Также возможен химический синтез полимеров путем окисления фенольной части мономера. Эти полимеры, по сравнению с натуральным лигнином, обладают рядом преимуществ: предсказуемость и определенность молекулярной структуры, дешевизна получения и возможность внесения модификаций в химический состав соединений в ходе синтеза.

Целью данной работы являлось получение стабильных наночастиц на основе лигнин-подобных полимеров, синтезированных ферментативным и химическим путем, и оценка их физико-химических свойств.

В задачи данного исследования входило: (1) выделение индуцированной  $\text{Cu}^{2+}$  лакказы из гриба *Cerrena unicolor* (ВКМ F-3196) методами высаливания 90%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , гель-фильтрации (Superdex™ 200) и ионообменной хроматографии (Тоурpearl DEAE-650 и UNO-Q); (2) синтез полимеров из 12 фенольных мономеров с использованием полученного фермента и с помощью окислительного химического синтеза с  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (3) образование наночастиц посредством диализа водонерастворимых полимеров против Milli-Q воды, оценка размеров сформированных наночастиц ( $Z$ -average), индекса полидисперсности (PDI) и стабильности в Milli-Q воде и фосфатном буфере (PBS, pH 7.2) посредством измерения дзета-потенциалов частиц с использованием метода динамического светорассеяния (DLS) на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS; (4) оценка эффективности проникновения в клетки человека наночастиц, загруженными прижизненным флуоресцентным красителем Vybrant CFDA SE и инкубированные с клетками рака груди MDA-MB-231. Визуализация проникновения и компартиментализация наночастиц несущих флуоресцентный краситель опухолевыми клетками осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа.

По результатам работы было показано, что наиболее оптимальным размером (100-150 нм) и физико-химическими свойствами обладают наночастицы, синтезированные ферментативным путем из полиферуловой, полигентиизиновой кислот и их гетерополимеров (3:1, феруловая и гентиизиновая кислоты соответственно, Таблица 1). Наночастицы, сформированные из полимеров, полученных в результате химического синтеза с применением  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , имеют большую вариабельность по размеру. Наночастицы из полимеров гентиизиновой и феруловой кислот при инкубировании в PBS

стабильны, в отличие от гетерополимерных частиц, которые увеличиваются в размере почти в 10 раз.

При исследовании интернализации наночастиц в опухолевые клетки было показано, что частицы перед проникновением адсорбируются на мембране клеток, а после 6- часового инкубирования проходят через клеточную мембрану и концентрируются в определенных компартментах клетки, предположительно в аппарате Гольджи.

Полученные данные свидетельствуют о преимуществах использования лакказы в качестве катализатора полимерных соединений, которые возможно использовать для образования эффективных и стабильных наночастиц. На основе предлагаемых средств доставки противораковых агентов возможна разработка новых подходов к противоопухолевой терапии, таких как: комплексная терапия с использованием смесей наночастиц, несущих разные фармакологические соединения, целевая доставка лекарств исключительно в клетки опухоли, когда наночастицы будут модифицированы для проникновения в определенный тип клеток.

Табл. 1. Физико-химические свойства наночастиц

Полимеры, полученные ферментативным синтезом и использованные для формирования наночастиц	Стабильность наночастиц (Дзета-потенциал, мВ)	Диаметр (Z-average, нм) и распределение по размеру (PDI) наночастиц в Milli-Q воде		в PBS			
				5 минут		60 минут	
		Z-average, d нм	PDI	Z-average, d нм	PDI	Z-average, d нм	PDI
феруловый полимер (15мМ+0,36 Е/мл)	-32,2±0,4	107,79±4,95	0,094±0,033	145,50	0,257	188,10	0,367
гентициновый полимер (40 мМ+0,06 Е/мл)	-25,9±3,6	131,10±13,55	0,259±0,071	193,30	0,432	128,42	0,272
3:1 гетерополимер (15 мМ+0,06 Е/мл)	-30,4±8,8	75,92±9,32	0,376±0,127	386,00	0,268	701,00	0,272

#### Литература

1. Frangville C, Rutkevičius M, Richter AP, Velev OD, Stoyanov SD, Paunov VN. Fabrication of environmentally biodegradable lignin nanoparticles. *Chemphyschem.*, 2012, 13(18), 4235-43.
2. Figueiredo P, Lintinen K, Kiriazis A, Hynninen V, Liu Z, Bauleth-Ramos T, Rahikkala A, Correia A, Kohout T, Sarmiento B, Yli-Kauhaluoma J, Hirvonen J, Ikkala O, Kostianen MA, Santos HA. In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells. *Biomaterials*, 2017, 121, 97-108.
3. Figueiredo P, Sipponen H, Lintinen K, Correia A. Preparation and characterization of dentin phosphophoryn derived peptide-functionalized lignin nanoparticles for enhanced cellular uptake. *Small*, 2019, 1901427.
4. Su J, Fu J, Wang Q, Silva C, Cavaco-Paulo A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of polyphenols. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2018, 38(2), 294-307.