

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Яременко Алексей Владимирович

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОДЕГРАДАЦИИ И ТОКСИЧНОСТИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В
ПРОЦЕССАХ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ОРГАНИЗМОМ

Специальность: 1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Зелепукин Иван Владимирович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Пятаев Николай Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии, руководитель сектора «Медико- биолого- химические материалы и препараты» Национального исследовательского Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева.

Попова Нелли Рустамовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории изотопных исследований Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт экспериментальной медицины.

Защита состоится «18» января 2023 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » _____ 20__ года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Направленная доставка лекарств при помощи наночастиц является развитием тераностического подхода в современной медицине и шагом в осуществлении высокотехнологичной и безопасной медицины будущего. Понимание фармакокинетики наночастиц является важным звеном в этих исследованиях, поскольку определяет не только эффективность, но и безопасность такой терапии.

Данная работа является исследованием, относящимся к области нанобиотехнологий. Ввиду того, что данная область была долгое время технически недоступна для детальных исследований, к настоящему времени накопилось множество вопросов, решение которых необходимо для правильного понимания и анализа экспериментальных данных. Одним из наиболее бурно развивающихся направлений в нанобиотехнологии является синтез различных типов наночастиц как для исследовательских целей, так и для применения в клинической практике. В настоящее время наночастицы используются как средства целевой доставки различных типов лекарственных молекул, в качестве сенсоров для оценки состояния биологических маркеров, *in vivo* как средства детекции широкого круга биологических молекул, вспомогательные контрастирующие элементы в МРТ, КТ и рентгеноскопических исследованиях, средства манипуляции клетками и др.

Однако, несмотря на столь широкий круг применения наночастиц в живых организмах, механизмы взаимодействия наночастиц как с различными типами клеток, так и с целыми органами к настоящему времени изучены мало ввиду сложности проведения экспериментов *in vivo* и возможности неоднозначной интерпретации полученных экспериментальных данных.

В литературе имеется большой массив данных о том, что большая часть вводимых наночастиц за короткие промежутки времени аккумулируется в печени и впоследствии выводится из организма. Данное явление получило широкое применение в исследованиях, направленных на понимание механизмов работы печени и лечения ассоциированных с ней заболеваний. С помощью различных модификаций наночастиц возможно добиться их специфического захвата гепатоцитами, а не только клетками Купфера, чему сильно способствует общая предрасположенность клеток печени к распознаванию инородных тел. Механизмы такого специфического захвата широко изучены и довольно подробно описаны в литературе.

В случае же применения наночастиц для исследования или лечения других органов и тканей, способность печени к быстрому неспецифическому захвату инородных тел накладывает серьезные ограничения на применение методов, связанных с использованием наночастиц.

Известно, что, попадая в кровотоки, наночастицы практически моментально связываются с различными биологическими молекулами, которые потом могут сильно влиять на скорость их неспецифического захвата клетками печени. Предполагается, что наибольший вклад в распознавание макрофагами печени наночастиц вносят опсонины – специфичный класс гликопротеинов. Таким образом, зная структуру, механизмы связывания и роль различных опсонинов в фагоцитозе, можно было бы модифицировать наночастицы с целью повышения времени их циркуляции в крови и более эффективного использования.

Однако вопросы о механизмах опсонизации, поглощении наночастиц и их последующей биодеградации остаются слабо изученными. Описаны лишь интегральные исследования, дающие понятие о том, какие молекулы способны связываться с наночастицами, но не раскрывающие роли отдельных типов молекул в фагоцитозе. В литературе не существует экспериментально подтвержденного однозначного мнения о влиянии отдельных типов биологических молекул на кинетику поглощения наночастиц клетками Купфера.

В первой части данной работы предлагается простая и удобная перфузионная модель для изучения фармакокинетики магнитных наночастиц в печени лабораторных животных, которая в значительной мере лишена недостатков традиционной модели за счет использования нового

метода Magnetic Particle Quantification (MPQ). Сочетая в себе высокую чувствительность, бесконтактный характер измерений и способность их проведения практически в любых средах, MPQ является удобным инструментом исследования в масштабе реального времени и значительно расширяет возможности перфузионной модели. В работе показывается, что данная модель хорошо описывает качественное поведение наночастиц с различными коллоидно-химическими свойствами в печени лабораторных животных и может быть использована для дальнейших количественных исследований фармакокинетики наночастиц.

Далее, в работе было изучено как небелковые компоненты крови, в частности, эритроциты способны влиять на фармакокинетику наночастиц. В работе был продемонстрирован способ продления циркуляции и изменения биораспределения наночастиц по органам, основанный на транспортировке наночастиц по кровеносному руслу путем их сорбции на клеточные мембраны. Такой подход основан на использовании различных клеток, преимущественно крови, в качестве естественных транспортеров наночастиц в организме. Этот метод был вдохновлен исследованиями по продлению циркуляции в крови бактериальных патогенов, встраивающихся в различные клетки крови. Тем не менее, несмотря на то, что эритроциты и являются наиболее часто используемым носителем, эта область сильно развивается, и для повышения специфичности доставки частиц к пораженным тканям как клетки-носители к настоящему времени уже были использованы другие клетки-носители: лейкоциты, тромбоциты и стволовые клетки.

Интересно, что хотя потенциально связывание частиц с поверхностью клеток крови является универсальным методом для улучшения их фармакокинетики, большинство работ показывают его существенно более низкую эффективность для малых частиц менее 200-нм. В то же время, малый размер частиц оказывается необходимым свойством для многих терапевтических и диагностических наноагентов, т.к., например, иначе они имеют пониженную проницаемость и диффузию в опухоль. В данной работе показана эффективность связывания различных типов наночастиц размером менее 200 нм с поверхностью эритроцитов, продление их циркуляции и эффективность доставки в легкие.

Магнитные наночастицы являются многообещающими агентами, которые уже применяются в клинической практике для МРТ-диагностики и гипертермии. Критический параметр, необходимый для продвижения *in vivo* новых магнитных наноагентов является понимание их долговременной судьбы в организме. Далее в данной работе описываются результаты для анализа деградации магнитных наночастиц в организме с помощью MPQ метода. Неинвазивность данного метода, широкий линейный диапазон и его нечувствительность к биогенным формам железа позволила впервые провести широкое сравнительное исследование долговременной судьбы 17 типов частиц в организме.

Так было обнаружено существенное ускорение деградации частиц при уменьшении их гидродинамического размера, замедление биотрансформации при увеличении вводимой дозы наноагента и зависимость разложения от типа полимера, образующего покрытие частицы. В частности, среди ряда из 6 гидрофильных полимеров, самую медленную деградацию обеспечивало покрытие из полиэтиленгликоля (время полураспада магнитных частиц составило 32 дня), а самую быструю – покрытие из полимера глюконовой кислоты (время полураспада магнитных частиц составило 14 дней). Наиболее сильное различие в скорости деградации обеспечивало внутреннее строение, так покрытие частиц сплошным 10 нм слоем труднорастворимого полистирола замедляло скорость полураспада магнитных ядер с 40 дней до 1 года.

Старение этих наноматериалов *in vivo* может привести к постепенному снижению их контрастных свойств и индуцированию токсичности. В данной работе также описано наблюдение полного жизненного цикла 50-нм магнитных частиц от их введения до полной

деградации *in vivo* и связанного с этим воздействия на организм. Так было обнаружено, что через 2 часа наночастицы были выведены из кровотока, но их первоначальное биораспределение со временем менялось. Через 1 неделю большая часть наночастиц была перенесена в печень и селезенку, где они деградировали с периодом полураспада в 21 день. МРТ и магнитный спектральный подход выявили сохранение контраста в этих органах более 1 месяца. Деградация частиц привела к увеличению количества эритроцитов и уровня гемоглобина в крови из-за высвобождения железа, не вызывая никакой токсичности в тканях. Кроме того, наблюдалось увеличение уровня экспрессии генов Fe-ассоциированных белков, таких как трансферрин, DMT1 и ферропортин в печени в ответ на деградацию частиц железа. Более глубокое понимание реакции организма на деградацию частиц может принести новые направления в область проектирования контрастных веществ МРТ.

Постановка задачи

Целью данной работы является определение биодеградации и токсичности магнитных наночастиц, а также исследование биологических процессов их взаимодействия с компонентами крови и органами ретикулоэндотелиальной системы.

В рамках данной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. На основе перфузионной модели печени и метода МРQ разработать *ex vivo* способ изучения влияния белковых компонентов крови на поведение наночастиц в сосудистом русле печени.
2. Исследовать влияние физико-химических свойств магнитных наночастиц на эффективность их взаимодействия с эритроцитами.
3. Исследовать влияние параметров связывания магнитных наночастиц с эритроцитами на длительность их дальнейшей циркуляции в кровотоке и биораспределение.
4. Изучить влияние физико-химических параметров наночастиц на процессы их старения и биодеградации в условиях *in vivo*.
5. Оценить влияние процессов биодеградации магнитных наночастиц и продуктов их метаболизма на живой организм.

Научная новизна работы

Предложен новый способ исследования в реальном времени печеночного клиренса наночастиц в изолированной перфузируемой печени, основанный на чрезвычайно точном методе магнитометрической регистрации. Также впервые исследовано влияние различных белковых компонентов крови на выведение магнитных наночастиц из сосудистого русла печени. Наконец, метод был применен для выявления интересного эффекта кратковременного снижения активности макрофагов печени после первого взаимодействия с небольшими количествами наночастиц.

Впервые проведено масштабное исследование взаимодействия библиотеки магнитных наночастиц с эритроцитами. Показана зависимость эффективности связывания магнитных наночастиц с поверхностью эритроцитов от физико-химических свойств частиц. Также впервые продемонстрировано, что долгая циркуляция частиц в кровотоке и изменение их биораспределения при доставке наночастиц на поверхности эритроцитов могут быть независимыми процессами. В то время, как значительное продление циркуляции наблюдалось только у частиц с высокой адгезией к поверхности эритроцитов, увеличение доставки частиц в легкие работало даже для наноагентов с коротким временем жизни в кровотоке.

Впервые проведено широкое сравнительное исследование долговременной судьбы 17 типов магнитных наночастиц в организме. Показано влияние внутренней структуры, размера, поверхностных полимеров и поверхностного заряда наночастиц на время их деградации в модельном организме.

Впервые описано наблюдение полного жизненного цикла магнитных частиц от их введения до полной деградации *in vivo* и связанного с этим воздействия на организм. Впервые показано, что деградация магнитных частиц может приводить к увеличению количества эритроцитов и уровня гемоглобина в крови из-за высвобождения железа, не вызывая видимой токсичности в тканях. Кроме того, впервые продемонстрировано увеличение уровня экспрессии генов Fe-ассоциированных белков, таких как трансферрин, DMT1 и ферропортин в печени в ответ на деградацию железосодержащих частиц.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанный способ изучения циркуляции наночастиц в изолированной печени, основанный на высокопроизводительной магнитометрии, может быть использован для поиска новых механизмов связывания и выведения наночастиц из кровотока, а также для разработки новых наноагентов, обладающих длительным временем циркуляции.

Результаты исследования взаимодействия наночастиц с эритроцитами демонстрируют высокий терапевтический потенциал подхода транспорта малоразмерных частиц на клетках крови для создания терапии агрессивных и мелкоклеточных типов рака, и облегчения течения ряда других острых и хронических заболеваний легких. Возможными применениями данного метода являются доставка лекарств и генетических конструкций для терапии легочного фиброза и других обструктивных заболеваний легких, бактериальных и вирусных инфекций, особенно связанных с повреждением эндотелиальных клеток или развитием воспалительных процессов. Такой род быстрой, направленной доставки частиц может не только облегчить течение заболевания, но и существенно снизить неспецифическую токсичность лекарств для других органов.

Полученные данные о биодеградации магнитных наночастиц могут быть применимы для теоретической оценки биодеградации и биобезопасности целого ряда магнитных наночастиц на основе ядер магнетита, широко используемых в настоящее время как в клинике, так и в научных исследованиях. Более глубокое понимание реакции организма на деградацию частиц может принести новые направления в область проектирования контрастных веществ МРТ. Также данные об изменении экспрессии железосодержащих белков в ответ на биоразложение частиц из оксидов железа могут быть использованы для разработки новых способов управления метаболизмом железа, в частности, для разработки новых высокоэффективных и безопасных способов лечения железо-дефицитных анемий.

Положения, выносимые на защиту

1. Предложен метод изучения влияния компонентов крови на скорость выведения магнитных наночастиц в организме, основанный на объединении перфузионной модели печени мыши и метода МРQ, осуществляющего детекцию магнитных наночастиц.
2. Продемонстрировано, что данный подход позволяет корректно описать сравнительную динамику выведения наночастиц различного размера, дозы и химии поверхности, а также динамику выведения НЧ в средах с различной активностью опсоинов. Установлены общие принципы выведения наночастиц из кровотока в условиях *in vivo* и *ex vivo*.
3. Произведено сравнительное исследование взаимодействия магнитных наночастиц с эритроцитами мыши в различных условиях. Показано, что положительный заряд и способность частиц образовывать кластеры на поверхности клеток увеличивает стабильность комплексов частиц с клетками крови, в то время как наличие белков сыворотки в среде – приводит к диссоциации комплексов.
4. В экспериментах *in vivo* исследован потенциал технологии доставки магнитных наночастиц с размером менее 200 нм на поверхности эритроцитов. Впервые показано, что доставка

- наночастиц на эритроцитах к легким может осуществляться даже без продления циркуляции наночастиц в кровотоке.
5. Всесторонне изучена биотрансформация суперапарамагнитных 100-нм наночастиц FluidMAG-ARA в живом организме. Определена скорость деградации наночастиц, а также обнаружен эффект транспорта железа между различными популяциями клеток и органами *in vivo* в процессе биоразложения наноагентов. Показано, что высвобождение железа в ходе деградации может приводить к изменению уровня экспрессии белков, ассоциированных с транспортом и хранением железа. Определена токсичность биодеградации наночастиц, в частности обнаружено влияние деградации наночастиц на увеличение количества клеток Купфера в печени и на рост гематокрита и количества эритроцитов в крови.

Апробация работы

Основные результаты данной диссертации были представлены на следующих конференциях: 4th International Symposium and School for Young Scientists on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine (Москва, Россия, 2019); 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Копенгаген, Дания, 2018); XXXII Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», (Москва, Россия, 2020); International Conference Laser Optics (ICLO) (Санкт-Петербург, Россия, 2018); 62-я Всероссийская научная конференция МФТИ (Долгопрудный, Россия, 2019). По материалам работы было опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах и 6 тезисов конференций.

Структура и объем работы

Представленная диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, а также списка литературы, включающего 173 источника. Работа изложена на 127 страницах, содержит 53 рисунка и 4 таблицы.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ РАБОТЫ

Для исследования влияния отдельных белковых компонентов крови на поведение магнитных наночастиц в сосудистом русле печени, как основного органа, отвечающего за их выведение, в данной работе была предложена усовершенствованная перфузионная модель печени. Для того чтобы преодолеть основные ограничения перфузионной модели, использовался метод MPQ, который ранее успешно применялся для решения биоаналитических и цитологических задач.

В экспериментах был использован модифицированный протокол перфузии печени. Все эксперименты проводились при температуре 20°C, показавшей наилучшую выживаемость и функциональность печени при длительной перфузии. Схема эксперимента представлена на Рис. 1а.

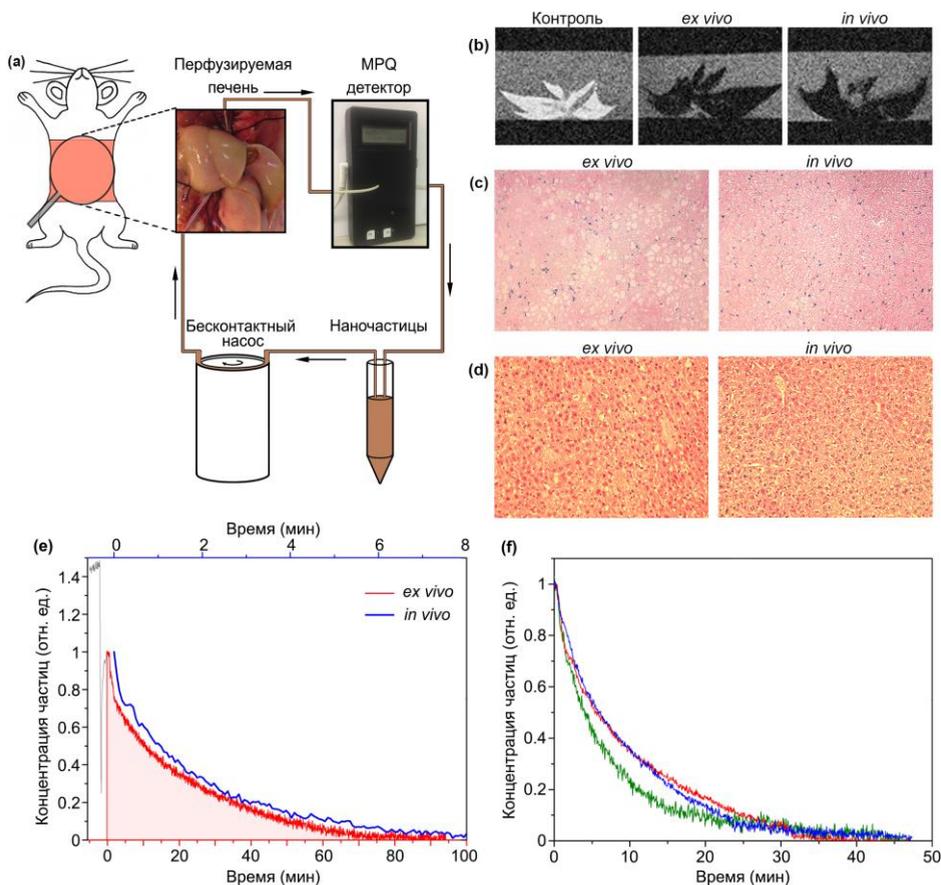


Рис. 1. Результаты исследований ткани печени мыши на перфузионной модели. (а) - Схема реализации перфузионной модели печени. Раствор с наночастицами вводился в печень через воротную вену, выводился из нее через заднюю полую вену с последующим анализом в магнитометре и отправлялся на следующий цикл. (b) – Результаты MPT исследований: слева – срез печени без наночастиц (контроль): частицы не наблюдаются; центр, справа – срезы печени с наночастицами: наблюдается равномерное распределение наночастиц по всему объему печени; (c),(d) – Результаты гистологических исследований: (c) окраска по Перлсу: обнаруживается большое содержание агрегатов наночастиц, фагоцитированных в основном клетками Купфера и в меньшей степени эндотелием капилляров, венул и лимфатических сосудов; (d) - окраска ГЭ: Структура печени не изменена, процессов некроза не наблюдается. Увеличение $\times 200$. (e),(f) - Результаты MPQ исследований процесса выведения SPION FluidMag-ARA наночастиц: (e) вид типичных кривых выведения в *in vivo* и *ex vivo* условиях; (f) сравнение кривых выведения, полученных для трех различных животных.

В качестве стандартного объекта изучения были выбраны 100 нм суперпарамагнитные наночастицы маггемита FluidMag-ARA (Chemicell GmbH, Germany). Обладая высокой

стабильностью в физиологических средах в сочетании с малым размером и отрицательным поверхностным зарядом, такие частицы свободно проходили даже через мелкие кровеносные сосуды и проявляли низкий уровень неспецифического взаимодействия с клетками. Так, МРТ исследования печени как после одного прохода частиц, так и после полного их выведения показали, что МЧ при перфузии распространяются равномерно по всему доступному объему органа и в печени отсутствуют тромбированные сосуды, недоступные для частиц (Рис. 1b). Эти наблюдения согласуются с результатами гистологического исследования срезов печени: *ex vivo* распределение частиц по ткани не отличалась от их *in vivo* распределения (Рис. 1c,d).

При окраске по Перлсу во всех изученных зонах гистологического образца печеночной ткани четко определялось большое количество агрегатов наночастиц, фагоцитированных преимущественно купферовскими клетками (Рис. 1c). Также скопления наночастиц обнаруживаются в эндотелии кровеносных и лимфатических капилляров и, по-видимому, в мелких желчных протоках.

На протяжении всего эксперимента общая структура печени сохранялась, не было выявлено явных признаков токсичности и гибели клеток (Рис. 1d), что косвенно свидетельствует об адекватности перфузионной модели исследования и ее способности корректно описывать процессы элиминирования частиц.

Использование суперпарамагнитных наночастиц FluidMag-ARA в сочетании с магнитометрическим методом их регистрации в реальном времени позволили неинвазивно изучить кинетику выведения частиц. Как видно из рисунка (Рис. 1e), стандартный вид кинетики выведения частиц имеет три характерных участка. Первый участок характеризуется постоянным максимальным магнитным сигналом и соответствует прохождению всего объема введенных МЧ через измерительную катушку MPQ ридера. Второй участок кривой начинается с момента резкого падения магнитного сигнала, соответствующего началу прохождения через MPQ катушку фронта рабочего буфера, вытесняемого из печени током МЧ. По мере прохождения этого фронта и начала подмешивания к нему проходящих через печень МЧ, наблюдается постепенное увеличение магнитного сигнала, вплоть до достижения им второго максимума, примерно соответствующего окончанию полного цикла перфузии. Начиная с этого момента, наблюдалось экспоненциальное падение сигнала от МЧ на третьем участке кривой, происходящее вследствие захвата частиц макрофагами и выведения их из потока. Следует отметить, что форма кривой *ex vivo* выведения наночастиц была хорошо воспроизводима (Рис. 1f) и качественно похожа на кинетику циркуляции *in vivo* тех же частиц, когда все органы, а не только печень, участвуют в их выведении (Рис. 1e).

Одной из сильных сторон перфузионной модели является возможность не только избежать искажения результатов наблюдений из-за влияния других органов и изучать процесс взаимодействия частиц с печенью в невозмущенном состоянии, но и контролировать другие факторы, например состав перфузируемого раствора. Так, в работе был проведен сравнительный анализ изменения кинетики циркуляции частиц при перфузии печени растворами цельной сыворотки мыши, содержащего полный набор опсоинов, аллогенного мышинного и ксеногенного бычьего альбуминов (Рис. 2a). В качестве параметра оценки и сравнения скоростей выведения, была выбрана часто используемая для этих целей величина интеграла функции кривой выведения (AUC) во временном периоде от момента достижения максимального сигнала до момента выхода кривой на насыщение (прекращения выведения МЧ из перфузата).

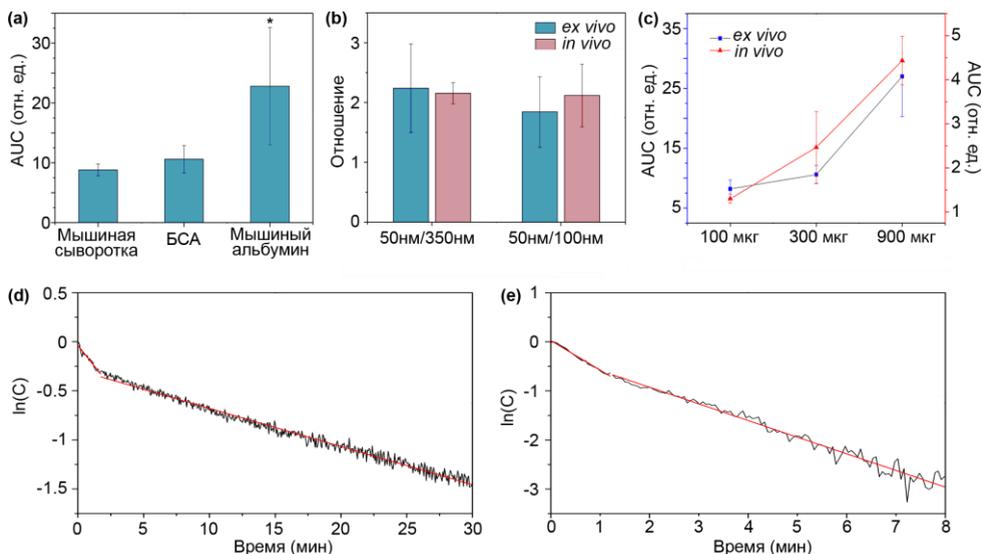


Рис. 2. Сравнение скорости выведения наночастиц из перфузата печенью мыши в зависимости от условий эксперимента. (a),(b),(c) – сравнение отношений величин AUC для кривых выведения FluidMag-ARA наночастиц в зависимости: (a) от состава перфузата (диаметр МЧ 100 nm, доза 300 мкг/мышь); (b) от размера наночастиц в *in vivo* и *ex vivo* условиях (доза 300 мкг/мышь, р-р BSA); (c) от величин дозы инъекции наночастиц в *in vivo* и *ex vivo* условиях. (d),(e) - сравнение показателей экспоненты функции выведения наночастиц от времени для *ex vivo* (d) и *in vivo* (e) условий. Погрешности соответствуют стандартной ошибке измерения, * обозначает статистически различимые значения ($p < 0.05$, критерий Стьюдента).

Как видно из полученных данных, в отличие от цельной сыворотки, использование такого относительно слабого опсонина как аллогенный мышинный альбумин приводит к существенному замедлению скорости выведения частиц. В то же время, кинетика циркуляции при использовании бычьего альбумина статистически не отличалась от чистой мышинной сыворотки по времени полного выведения частиц, что свидетельствует, по-видимому, о высоких иммуногенных свойствах этого белка. Поэтому для дальнейших экспериментов, использовали бычий альбумин, как ксеногенный белок, распознаваемый макрофагами так же хорошо, как и опсонины крови, но обладающего значительно лучшей доступностью.

Далее, используя отработанную модель, была проведена проверка насколько правильно данная перфузионная система отражает известные зависимости для циркуляции частиц *in vivo*. Для этого сравнили кинетики выведения МЧ (ARA) одинакового состава поверхностного слоя (карбоксиметилдекстран), но обладающих разными размерами: 50 nm, 100 nm и 350 nm и введенные в разных дозах: 100 мкг, 300 мкг и 900 мкг на мышь. Как видно из полученных данных (Рис. 2b,c), в случае использования перфузионной модели наблюдалось заметное ускорение выведения МЧ из кровотока при увеличении их размера с 50 до 350 nm. Данный вид зависимости совпадал с хорошо известными *in vivo* данными, при этом отношения AUC этих трех типов частиц *ex vivo* и *in vivo* совпадали в пределах погрешности.

Кроме того, в отличие от *in vivo* экспериментов, *ex vivo* изменение AUC в зависимости от дозы введенных МЧ имело нелинейный характер (Рис. 2c) и при дозе выше 300 мкг/мышь

наблюдалось существенное увеличение времени их циркуляции за счет, по-видимому, возникновения эффекта блокировки макрофагов магнитными частицами.

Интересно, что хотя кинетика выведения МЧ имела, в целом, экспоненциальный характер вида $C=e^{\beta t}$, в ходе первого-второго циклов перфузии наблюдалось достаточно резкое падение скорости поглощения частиц макрофагами не зависимо от размеров частиц. Так, например, на Рис. 2d представлена зависимость показателя экспоненты β от времени проведения эксперимента для МЧ диаметром 350 нм и дозе 300 мг/мышь. Очевидно, что в случае идеальной экспоненциальной зависимости данный график должен аппроксимироваться прямой, с увеличением разброса значений последних экспериментальных точек вследствие существенного падения чувствительности метода, а следовательно – и точности приближения.

Данную зависимость наблюдали и для *in vivo* экспериментов с использованием МЧ 350 нм (Рис. 2е), однако в перфузионной модели падение скорости выведения частиц после 1-го цикла перфузии было заметно более выраженным. Такое преобладание данного эффекта в условиях *ex vivo* было зарегистрировано во всех экспериментах. Это объясняется, по-видимому, тем, что *in vivo* места детекции и поглощения частиц сильно разобщены, а сами частицы поглощаются в разных органах с разными скоростями, что усредняет их концентрацию и значительно ослабляет эффект.

Изучение взаимодействия частиц с клетками крови

Связывание наночастиц с эритроцитами приводит как минимум к двум эффектам изменения фармакокинетики частиц: продлению их циркуляции в кровотоке и изменению их биораспределения. Оба этих процесса должны зависеть от силы первичного взаимодействия частиц с поверхностью эритроцитов и от константы их связывания в среде кровотока. Поэтому прежде всего в работе был проведен скрининг магнитных частиц с разными полимерными покрытиями, зарядами и размерами менее 200 нм, на их эффективность связывания с клетками крови.

Всего было протестировано 9 типов частиц с различными покрытиями и было обнаружено, что часть частиц, такие как Chitosan-покрытые МЧ, хорошо связываются и плохо десорбируются с поверхности клеток, другая часть, например, покрытые карбоксиметилдекстраном (СМХ), глюкуроновой кислотой (АРА) или и непокрытые отрицательно заряженные частицы (UC/A) имеют плохое связывание, хотя существовали и промежуточные варианты (Рис. 3).

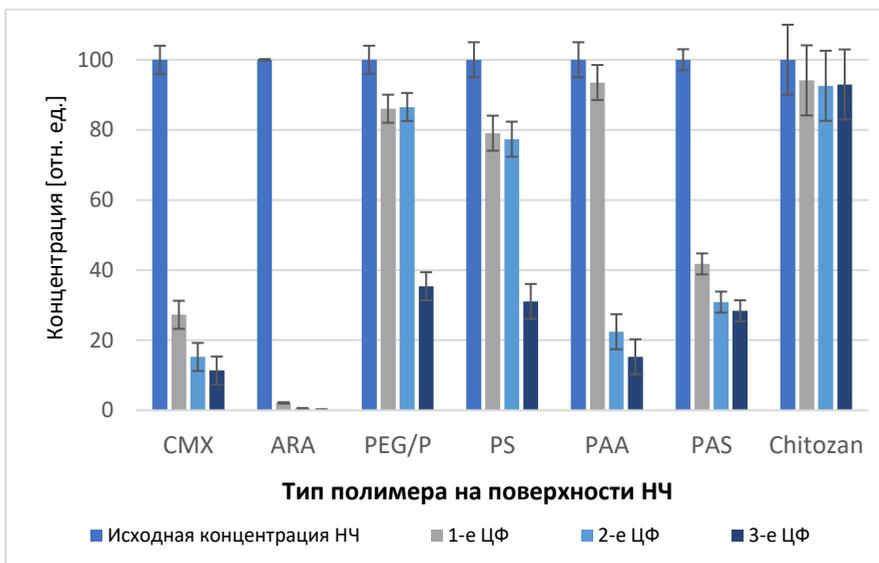


Рис. 3. Зависимость стабильности комплексов наночастиц с эритроцитами от типа полимерного покрытия для НЧ размером 100 нм. CMX – карбоксиметилдекстран, ARA – полимер глюконовой кислоты, PEG/P – полиэтиленгликоль α - ω -дифосфат, PS – полистеринсульфонат, PAA – полиаспартазная кислота, PAS – полиакриловая кислота, Chitosan – хитозан

Связывание частиц существенно более сильно зависело от типа полимера, чем от их размера в диапазоне 50-200 нм. Тем не менее, на примере 50, 100 и 200 нм частиц PAS было показано, что эффективность связывания возрастает с ростом размера наночастиц. Тем не менее сильнее всего влиял поверхностный Дзета-потенциал. Так, все частицы, которые хорошо связывались и не десорбировались с поверхности клеток при отмывках, имели ζ -потенциал более +40 мВ, в то время как гидрофильные частицы с отрицательным потенциалом были склонны к постепенной десорбции.

Повышенное связывание наночастиц PEG/P с эритроцитами по сравнению с другими отрицательно-заряженными частицами можно объяснить доминированием гидрофобных взаимодействий, приводящих к закориванию частиц на мембране.

Также одной из причин образования стабильных связей может быть потеря стабильности частиц, приводящая к их агрегации и преобразованию мультикластеров, которые могут удерживаться на эритроцитах за счет мультивзаимодействий. Так, два исследуемых типа частиц UC/A и UC/C не имели полимерного покрытия, и для этих частиц наблюдалась сильная агрегация в физиологических условиях.

Интересно, что связывание частиц с эритроцитами является редким событием при прямом введении частиц в кровяной поток, вне зависимости от их свойств. Это может быть связано с быстрым формированием белковой короны вокруг наночастиц. Этот процесс занимает крайне быстрое время (порядка мкс) и способен нейтрализовать или даже перезарядить наночастицы и мешать их связыванию с клетками крови. Например, в *in vitro* экспериментах, даже для наиболее крепко удерживаемых частиц FluidMAG-Chitosan наблюдалось существенное

уменьшение стабильности образующихся комплексов при добавлении сывороточных белков на стадиях инкубации и отмывки (Рис. 4)

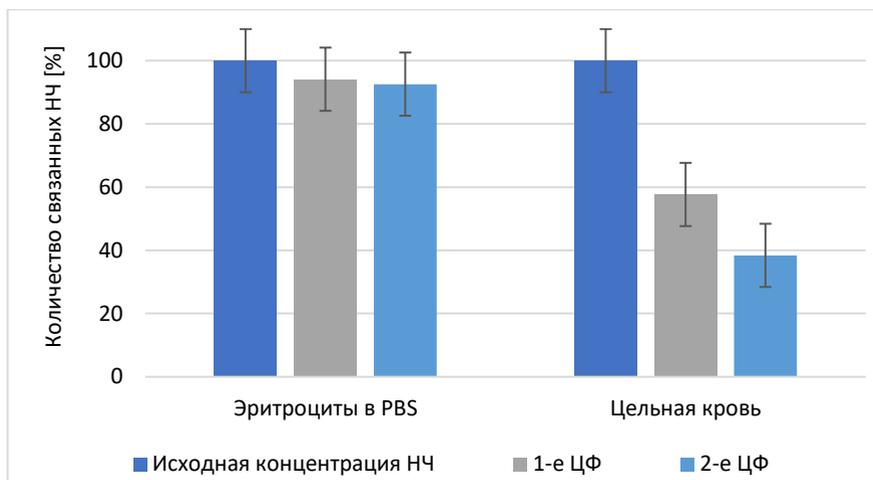


Рис. 4. Зависимость стабильности образующихся комплексов наночастиц с эритроцитами от наличия в среде сывороточных белков на стадии инкубации.

Электронная микроскопия комплексов частиц с клетками крови

Покрытые и непокрытые частицы проявляют в физиологических условиях кардинально разные свойства, связанные с их коллоидной стабильностью, жесткостью поверхности и т.д. Поэтому для дальнейших исследований были выбраны два образца 100-нм частиц с полимерным покрытием: положительные заряженные с покрытием из хитозана, которые хорошо связывались и удерживались на поверхности частиц, и отрицательно заряженные, покрытые полиглюкуроновой кислотой (ARA), которые проявляли противоположные свойства. Взаимодействие данных частиц с эритроцитами было визуализировано с помощью сканирующей электронной микроскопии (Рис. 5).

Можно было видеть, что наночастицы, покрытые полиглюкуроновой кислотой, связываются единичными частицами и после 1 отмывки почти полностью десорбируются с поверхности, в то же время покрытые хитозаном частицы кластеризуются и кластеры визуально сохраняются при отмывках (Рис. 5).

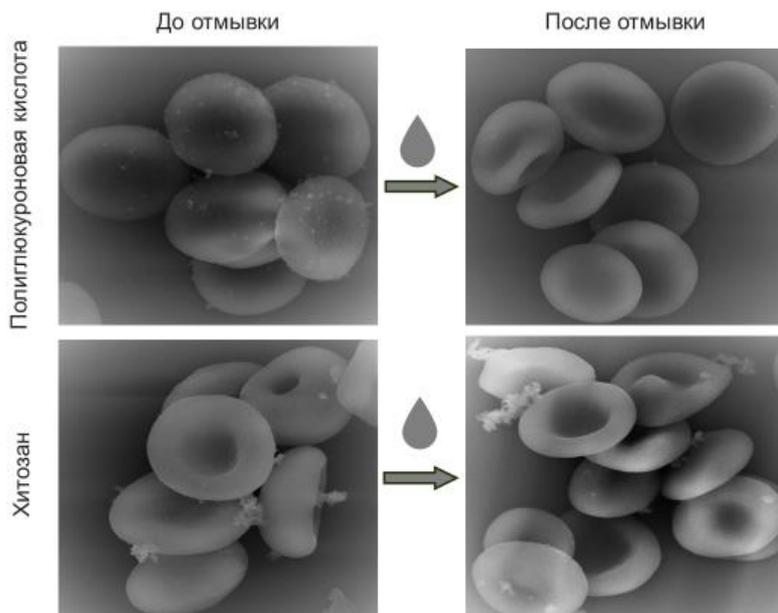


Рис. 5. Зависимость стабильности комплексов эритроцитов с наночастицами от типа поверхности НЧ. Для частиц покрытых полиглюкуроновой кислотой наблюдается десорбция НЧ после отмывки, для частиц покрытых хитозаном наблюдается кластеризация.

Изучение циркуляции и биodeградации

Известно, что наночастицы выводятся из кровотока клетками мононуклеарной фагоцитарной системы (MPS), например, в печени клетками Купфера, остаточными макрофагами селезенки, макрофагами альвеол легких и т.д. Печень и селезенка являются основными органами для поглощения неспецифических наночастиц, что обусловлено большим присутствием в них фагоцитов, активным кровоснабжением (до 25% сердечного выброса для печени) и повышенной поглощенной активностью их макрофагов по сравнению с другими клетками.

В работе было проведено исследование выведения из кровотока и биораспределение наночастиц магнетита с цитратным покрытием методами МРQ и МРТ. Согласно полученным измерениям МРQ, 93% введенной дозы (ID) наночастиц были обнаружены в печени и в 15 раз меньше – в селезенке (Рис. 6а). Исследование МРТ качественно подтвердило это наблюдение (Рис. 6б). Наночастицы оксида железа действовали как отрицательный контраст для МРТ, поэтому более темный цвет соответствует более высокой концентрации частиц. Значительные контрастные изменения наблюдались в селезенке и печени через 2 ч после инъекции наночастиц, в то время как контраст других крупных органов и тканей оставался практически постоянным. Согласно данным МРQ, в других органах накапливалось менее 2% введенной дозы частиц. Кроме того, большинство частиц, используемых в данной работе, показали аналогичную картину биораспределения: 85-98% поглощения ID в печени и 2-6% накопления ID в селезенке. Таким образом, печень и селезенка играют ключевую роль в метаболическом разрушении МЧ, поэтому дальнейший анализ биodeградации наночастиц был проведен на этих органах.

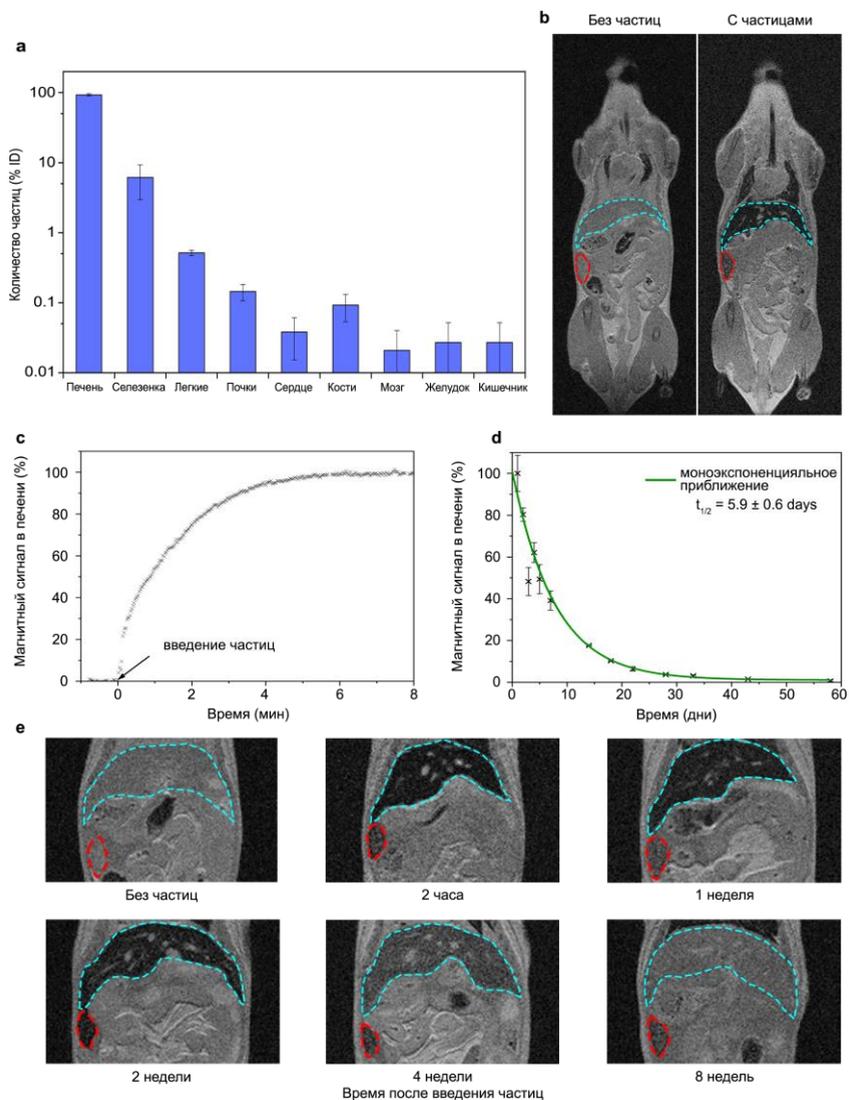


Рис. 6. Исследование биodeградации наночастиц *in vivo*: (a, b) Результаты МРQ (a) и МРТ (b) измерения биораспределения наночастиц магнетита с цитратным покрытием. Голубые и красные линии указывают на расположение печени и селезенки, соответственно, $n = 3$ мышей; (c, d) МРQ данные репрезентативной кинетики накопления (c) и деградации (d) в печени 100 мкг стабилизированных цитратом МЧ, $n = 3$ мыши; (e) Репрезентативные данные МРТ 2-месячных исследований эволюции 100 мкг цитрат-стабилизированных МЧ в печени и селезенке. Голубые и красные линии указывают на расположение печени и селезенки, соответственно, $n = 3$ мыши на каждую временную точку.

Кроме того, в данной работе изучили возможность неинвазивного анализа накопления частиц в печени и их деградации с помощью МРQ. Для изучения кинетики накопления частиц в печени мыши, животное анестезировалось, после чего фиксировалась на столике с встроенной в его дно детектирующей катушкой. Центр катушки располагался под областью печени животного, образцы цитрат-покрытые наночастицы магнетита вводились внутривенно. С использованием МРQ в реальном времени проводилась регистрация роста сигнала от магнитных частиц (Рис. 6б). Стабилизация количества поглощенных частиц в печени и селезенке наблюдалась в течение первых нескольких минут, что соответствовало времени их полного выведения из кровотока (Рис. 7).

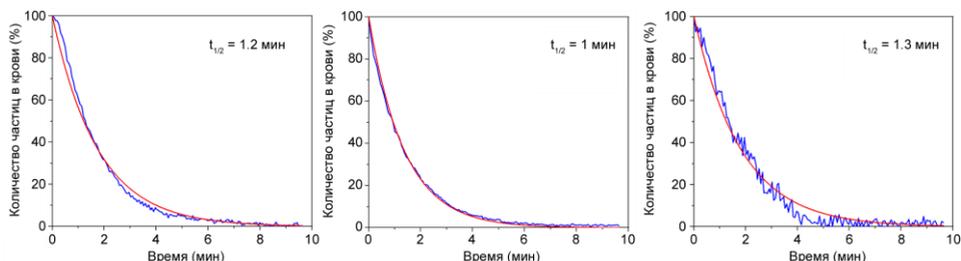


Рис. 7. Кинетики выведения из кровотока наночастиц магнетита с цитратным покрытием. Сплошная красная линия показывает моноэкспоненциальную кривую аппроксимации, $n = 3$ мыши.

Во избежание периодического стресса у животных, вызванного инъекциями, для измерения деградации частиц мышей не подвергали анестезии. Мышь фиксировалась в руке и катушкой производилось сканирование области печени животного для поиска максимума сигнала. Одно измерение концентрации частиц занимало не более 10 секунд. На Рис. 6д,е показаны временные *in vivo* МРQ динамики биоразложения 300 мкг цитратных частиц, а также МРТ-визуализация данного процесса. При этом наблюдаемая кинетика деградации может быть приближена с высокой точностью моноэкспоненциальной кривой (Рис. 6д).

Измеренные данные МРQ были качественно коррелированы с изменением контраста МРТ, генерируемого частицами (Рис. 6е). Контраст частиц МРТ в печени постепенно уменьшался со временем и через 8 недель был сопоставим с контрастом мышей без наночастиц. Это подтверждает данные МРQ, где 99% наночастиц, обнаруженных в печени и селезенке, деградировали через 2 месяца после инъекции МЧ.

Факторы, влияющие на деградацию МЧ *in vivo*

Возможность проведения неинвазивных измерений *in vivo* позволила провести в данной работе первое масштабное сравнительное исследование деградации магнитных частиц в печени мышей. Для этого использовали как синтезированные цитрат-покрытые частицы магнетита, так и широкий ряд коммерчески-доступных наноагентов. Анализ деградации проводили в течение одного года с измерением концентрации частиц один раз в неделю.

Влияние дозы МЧ наночастиц на деградацию

Магнетит-цитратные наночастицы внутривенно вводились в мышей в различных дозах от 50 мкг до 3 мг на мыш (что эквивалентно 2.5 – 150 мкг/г ткани). Деградация частиц во всех дозах можно описать моноэкспоненциальной кривой (см. линейное приближение в логарифмической шкале на Рис. 8а). При этом с увеличением дозы частиц в 60 раз росло время их деградации в организме от 4.9 ± 0.7 дней до 40.8 ± 0.7 дней. При этом замедление скорости деградации частиц нелинейно зависело от вводимой дозы (Рис. 8б). Для проведения всех

дальнейших экспериментов была выбрана средняя доза (15 мкг/г), при котором уже было высокое соотношение сигнал/шум, но при этом деградация материала происходила сравнительно быстро.

Полученные данные по поведению дозозависимой деградации частично соотносятся с опубликованными работами. Так, ранее уже было показано, что 8-нм маггемит, покрытый гидрофильными производными глюкозы в дозе 50 nmol/g распался с периодом полураспада ~ 1 неделя, а для дозы 1000 нмоль/г – более 44 дней. Также, было показано, что малые дозы НЧ с димеркаптоантарным кислотным покрытием (2.5 мкг/г) разлагаются до ферритина в течение всего одних суток. Однако, в меру наших знаний, не было показано нелинейности в зависимости скорости метаболизма от дозы частиц. По данным, для высоких доз может существовать предельная скорость деградации, определяемая физиологическими процессами в печени. Так, для магнетит-цитратных НЧ аппроксимация дает $t_{1/2}$ насыщения составляла приблизительно 43 дня. Такое поведение можно объяснить следующими фактами: при малых дозах скорость разложения может определяться средним количеством частиц в одной лизосоме, доступностью хелатообразующих агентов, количеством ферритина и других железосодержащих белков участвующих в метаболизме и др. При высоких дозах влияние большинства этих факторов нивелируется, так как железа в одной лизосоме становится многократно больше и скорость уже может определяться лишь скоростью естественного процесса поверхностной коррозии частиц в лизосомальных условиях. Также частично зависимость может объясняться усилением биохимических процессов переработки железа. Так метаболизм железа зависит от ряда белков, таких как ферритин, ферропортин, DMТ1 и других. Их экспрессия может увеличиваться при поглощении высоких доз железосодержащих НЧ и ускорять их деградацию. Определение точного механизма требует дальнейшего изучения.

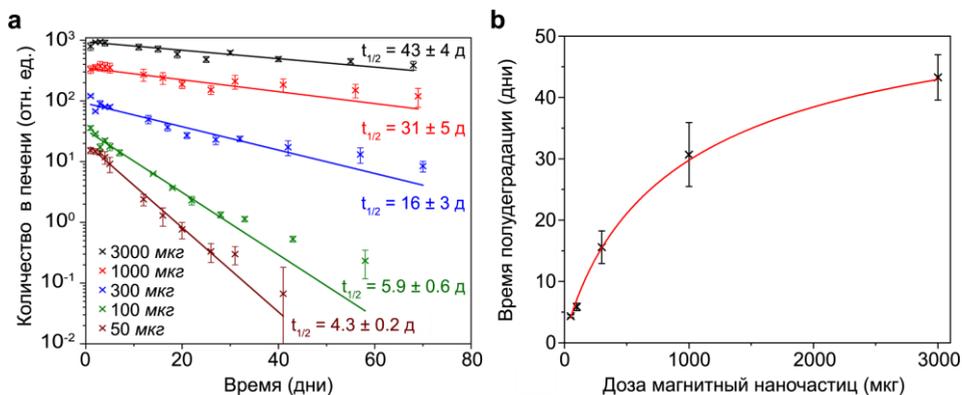


Рис. 8. Зависимость скорости деградации магнитных частиц от вводимой дозы наноагента: (а) кинетики деградации цитрат-покрытых частиц и (б) среднее время полужизни различных доз НЧ.

Влияние гидродинамического размера МЧ на деградацию

Для изучения влияния размера магнитных наночастиц на время их биодеградации были проведены три серии экспериментов с использованием 50, 100 и 200 нм магнитных наночастиц, покрытых полимерами глюкоурановой кислоты (ARA), карбоксиметилдекстраном (СМХ) или полиакриловой кислоты (PAS). Для всех трех типов частиц наблюдалось увеличение скорости деградации частиц с уменьшением их гидродинамического размера (Рис.

9а-с). Время полудеградации 50-, 100- и 200-нм частицы 6.6, 14.2, 13.6 дней для АРА; 7.2, 24.7, 31.6 дней для СМХ и 20.3, 25.1, 97.4 дней для PAS, соответственно. Интересно, что 100-нм и 200-нм FluidMAG-ARA частицы деградировали одинаковое время. Чтобы пояснить этот феномен было изучено изменение размера FluidMAG-ARA частиц в условиях лизосом (рН 4.8). Так, было обнаружено, что из-за процесса агрегации, разница в гидродинамическом размере между 100- и 200 нм частицами оказывалась существенно меньше, чем между 50нм и 100 нм. Таким образом, увеличение удельной площади поверхности, доступной для растворения ведет к ускорению метаболизма частиц и важно учитывать их агрегационную стабильность как в крови, так и в условиях лизосом.

Влияние заряда поверхности наночастиц на их биодegradацию

Другим параметром, который возможно оказывает влияние на скорость биодegradации наночастиц, может быть, заряд их поверхности. Так как истинный заряд наночастиц тяжело определим, часто в качестве аналога используют понятие ζ -потенциала – электрического потенциала кинетического слоя наночастиц. Наночастицы с различными ζ -потенциалом могут проявлять разную агрегационную стабильность в условиях крови и лизосом в ходе метаболизма, что скажется на скорости биоразложения.

Для изучения влияния потенциала частиц на их биодegradацию было проведен сравнительный анализ кинетик разложения двух идентичных по структуре 1-мкм частиц (Spherotech), в которых магнитные частицы покрывали снаружи полистирольный матрикс (Рис. 9d). Данные частицы имели одинаковый физический размер и строение и отличались между собой только зарядами поверхности (Рис. 9h). ζ -потенциал был (7 ± 5 mV) и (-32 ± 7 mV) для аминированных и карбоксилированных частиц, соответственно. Положительно-заряженные частицы практически в два раза дольше деградировали в организме, чем отрицательно-заряженные (Рис. 9f). Интересно, что обычно в сыворотке наночастицы быстро покрываются белковой короной, которая практически уравнивает ζ -потенциал любых частиц.

В модели растворения наночастиц магнетита с цитратным покрытием в различных буферах *in vitro*, были получены данные, свидетельствующие о том, что оксиды железа быстрее деградировали в кислотных условиях (рН 3-4). Это объясняется тем, что обычно положительно заряженные частицы с первичными и вторичными аминами в их структуре имеют их в протонированном состоянии. Таким образом, они могут выполнять функцию слабых протонных губок, вывода протоны из окружения, одновременно притягивать гидроксил ионы положительным зарядом, следовательно повышая локальный рН около наночастиц. В то же время отрицательно-заряженные частицы также могут притягивать протоны противоположным зарядом, что в их случае понижает локальный рН около них и приводит к более быстрому разложению.

Влияние внутренней структуры наночастиц на их деградацию

Существенное влияние на скорость растворения частиц может оказывать пористость частиц и расположение магнитных ядер внутри полимерного матрикса. Площадь доступной для эрозии поверхности магнитных ядер, в частицах с пористым матриксом многократно выше, что должно ускорять их деградацию. Чтобы показать влияние этого фактора в данной работе сравнили деградацию двух типов 220-нм частицы Estarog, одни из которых имели магнитные ядра, распределенные по пористому полистирольному матриксу (Рис. 9d), а вторые были покрыты сплошным покрытием из полистирола с средней шириной 39 ± 17 нм (Рис. 9e). Размер магнитных ядер у обеих частиц был одинаковым и составлял 152 ± 27 нм и 146 ± 24 нм, для пористых и солидных частиц, соответственно.

Кинетики биоразложения наночастиц в организме после их внутривенного введения различались кардинально. В то время как пористые частицы имели стандартную

моноэкспоненциальную кривую падению со средним временем полужизни 40 дней (Рис. 9f), солидные частицы имели время полудеградации приблизительно 1 год. Более того, в первые 2 месяца анализа деградации существенного падения магнитного сигнала для солидных частиц не наблюдалось, что может объясняться медленной биодеградацией труднорастворимого полистирола.

Такое же поведение с задержкой растворения на 20 дней наблюдалось для 500-нм частиц покрытых SiO₂ (SiMAG-Carboxyl). Непористый оксид кремния также является труднорастворимым соединением в организме, и магнитные частицы, покрытые кремниевой оболочкой имели время полудеградации около 100 дней. Более того, для данных наночастиц кинетика метаболизма отклонялась от моноэкспоненциальности.

Влияние состава покрытия МЧ на их биодеградацию

Покрытие способно влиять на скорость разложения ядер частиц оксида железа не только само по себе, ограничивая к ним доступ, но и вторичными факторами. Например, наночастицы с разными покрытиями способны формировать немного разную белковую корону частиц, приводя к различному распределению наноагентов по органам и субтипам клеток. Покрытие также может менять агрегационную стабильность частиц в крови, и, следовательно, среднюю концентрацию частиц в одной лизосоме. Также, для некоторых покрытий была описана повышенная вероятность перехода наночастиц в гепатоциты в печени, где возможно осуществление их экскреции с желчью без разложения.

Сравнение ряда 50-, 100- и 200-нм частиц с покрытиями из ARA, CMX and PAS показало, что вне зависимости от размера скорость деградации напрямую зависела от их покрытия и для трех исследованных размеров частиц замедлялась в ряду ARA; CMX; PAS. Далее в работе сравнили только 100-нм магнитные частицы с различными полимерными покрытиями. Время их полужизни в организме увеличивалось в ряду покрытий: полиглюкуроновая кислота < хитозан < карбоксиметилдекстран \approx полистиролсульфонат \approx полиакриловая кислота < полиэтиленгликоль α -, ω -дифосфат (Рис. 9j). Интересно, что медленнее всего разлагались именно полиэтиленгликоль-покрытые частицы, ведь это покрытие часто используется для улучшения доставки наночастиц в ткани с патологическими повреждениями. Для частиц с различными полимерными покрытиями четкой корреляции между гидрофобностью полимера и скоростью разложения магнитного материала в их составе обнаружено не было.

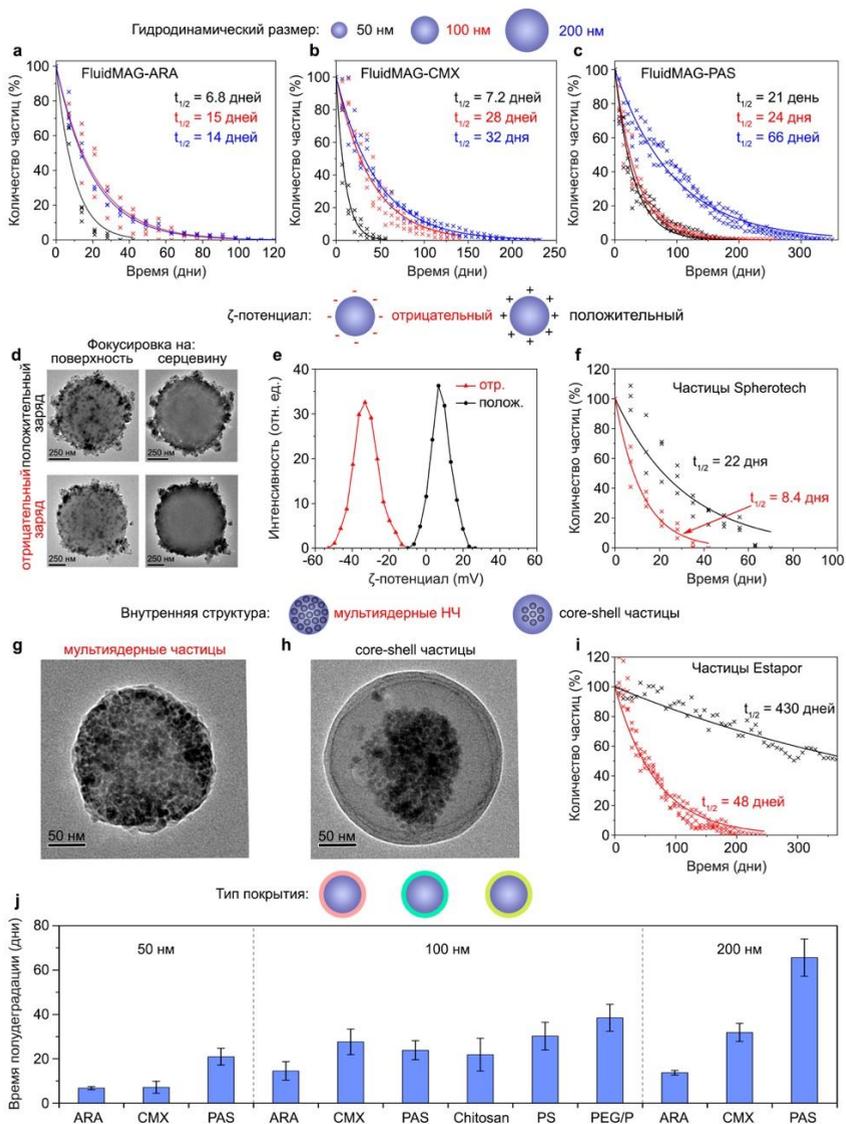


Рис. 9. Биодegradация МЧ с различными свойствами в печени мыши. (а-с) Зависимость кинетики деградации от размера частиц: 50, 100, 200 нм NP покрытых глюкуроновой кислотой (а), карбоксиметилдекстраном (b), полиакриловой кислотой (с); (d-f) Влияние ζ-потенциала на кинетику деградации частиц: электронные микрофотографии частиц (d), распределение частиц по заряду (e) и кинетики их биодegradации (f); (g-i) Влияние пористости на деградацию частиц: электронные микрофотографии пористых (g) и solidных (h) частиц и кинетики деградации этих частиц (i); (e) Зависимость времени полудеградации магнитных частиц от типа их покрытия и размера наноагентов.

Биологические аспекты деградации МЧ *in vivo*

Снижение сигнала МРQ со временем свидетельствует об уменьшении количества нелинейных магнитных материалов в исследуемых органах (преимущественно в печени и селезенке). Этот процесс может происходить в силу различных причин: растворения частиц, их выведения в желчь или мочу без деградации, превращения кристаллов нелинейного магнитного материала в парамагнитную (неопределяемую) форму железа и т.д.

Чтобы получить более глубокое понимание деградации частиц *in vivo*, на следующем этапе с использованием различных аналитических методов изучалось влияние печени и селезенки на биологические и магнитные свойства наночастиц магнетита, покрытых цитратом, во время их деградации. В частности, наночастицы вводили внутривенно мышам, а затем печень, селезенку, фекалии, желчь и мочу собирали для анализа. Концентрация железа в тканях анализировалась методом ICP-MS, магнитные свойства органов с использованием МРQ и SQUID DC-намагниченности, количество железоположительных клеток, а также расположение железа внутри ткани – гистологически с окрашиванием по Перлсу.

Измерения МРQ показали, что деградация частиц в печени и селезенке происходила с разной скоростью (Рис. 10а). Так, через месяц после инъекции частиц их интегральное количество в печени и селезенке уменьшилось в среднем на 27% и 54% соответственно. Данные масс-спектрометрии, однако, показали различный временной профиль распределения железа для каждого из органов (Рис. 10b). В печени концентрация железа в 1 день увеличивалась со 160 ± 10 до 840 ± 90 мкг/г ткани, при этом в течение месяца концентрация железа значительно снижалась до 500 ± 20 мкг/г ткани. В селезенке количество железа после инъекции частиц увеличилось с 580 ± 90 до 880 ± 40 мкг/г ткани, а затем варьировалось в этом диапазоне в течение месяца. Несоответствие между МРQ и ICP-MS можно объяснить процессами биогенного транспорта железа из печени в селезенку.

Для изучения возможных путей экскреции железа были проведены исследования МРQ и ICP-MS мочи и кала мышей (Рис. 10с-ф). Оба метода показали, что ни частицы, ни растворимые формы железа не выводились с мочой. Это также подтверждается данными биораспределения, в которых менее 0,15% введенной дозы частиц было обнаружено в почках (Рис. 6а). В то же время наблюдалось увеличение сигнала МРQ в фекалиях на 1 и 7 день после инъекции частиц (Рис. 10е).

Анализ намагниченности SQUID показал, что до инъекции частиц печень имела петлю гистерезиса с низкой намагниченностью насыщения (Рис. 10g). Нелинейная зависимость намагниченности может быть отнесена к присутствию антиферромагнитного ферритина в органе, в то время как присутствие коэрцитивной силы может происходить из остаточных или смещенных полей в магнитных катушках SQUID, чего трудно избежать. В то же время при амплитуде магнитного поля 60 Ое, т.е. в типичных условиях измерений МРQ, намагниченность печени увеличилась в 73 раза. Затем, через 7, 14 и 28 дней после инъекции частиц, намагниченность при 60 Ое уменьшилась на 4, 30 и 46 % соответственно. Это соответствовало снижению сигнала МРQ на 3,5, 23 и 42 % для тех же образцов печени.

Также в работе было проведено гистологическое исследование тканей печени и селезенки, окрашенных либо гематоксилин-эозином, либо по Перлсу прусским синим и эозином (Рис. 10h,i). Выраженных воспалительных, дистрофических или некротических изменений в печени в течение месяца после инъекции частиц обнаружено не было. С первых суток наблюдалась повышенная популяция клеток Купфера (Рис. 10j), которая возвращалась к нормальному значению только через 21 день после инъекции. Около 60% клеток Купфера в первый день содержали коричневые гранулы в цитоплазме, что свидетельствует об эндоцитозе частиц. Количество этих частиц содержащих макрофагов снизилось на 42% на 28-й день после инъекции МЧ (Рис. 10j). Окрашивание тканей по Перлсу прусским синим подтвердило эти

наблюдения. Большая часть железа была поглощена клетками Купфера, и только на 1-й день наблюдалось небольшое количество частиц в сосудах печени. После первой недели все частицы оставались в макрофагах, и количество железоположительных клеток со временем уменьшалось (Рис. 10i).

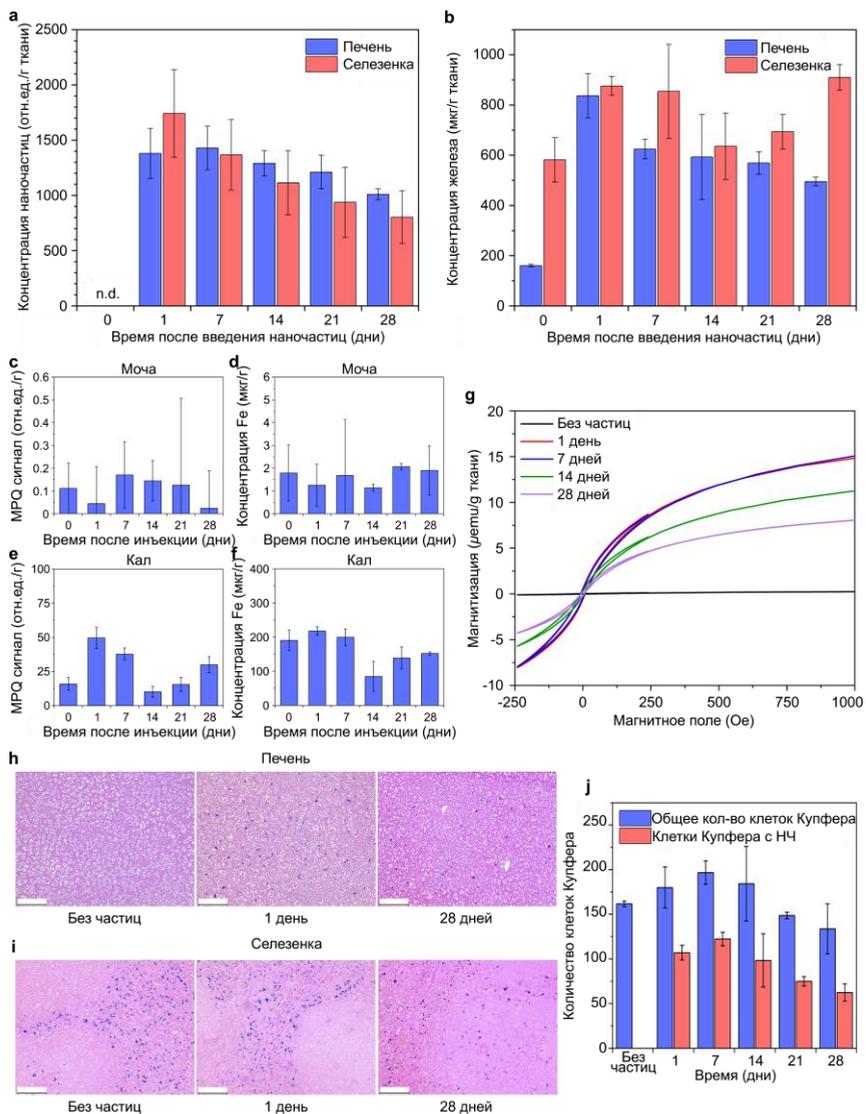


Рис. 10. Магнитная и биологическая оценка биодegradации наночастиц магнетита с цитратным покрытием у мышей: анализ *ex vivo* сигнала МРQ (a) и концентрации железа в печени и селезенке в разное время после инъекции наночастиц (b), n.d. – не обнаружено. n = 3 мыши

для каждой точки данных. (c-f) Анализ содержания магнитных частиц (c, e) или железа (d, f) в моче (c, d) и фекалиях (e, f), n = 3 образца для каждой точки данных. Нулевая временная точка показывает момент перед инъекцией наночастиц. (g) SQUID-анализ намагниченности тканей печени в различные моменты времени после инъекции наночастиц, n = 3 образца печени были усреднены для каждой кривой. (h, i) Репрезентативные гистологические изображения печени (h) и селезенки (i) в различные моменты времени после инъекции наночастиц. Места локализации железа выглядят в виде синих точек из-за реакции Перлса. Шкала соответствует 100 мкм. (j) Анализ железоположительных и общего количества клеток Купфера в печени. Данные усреднялись по площади слайда, увеличение x200, n = 3 образца, используемых для анализа.

Гистологический анализ селезенки показал, что до инъекции МЧ она содержала сидерофаги с железом в красной пульпе. Затем введение частиц вызывало увеличение содержания мегакариоцитов и сидерофагов в селезенке, при этом их количество оставалось высоким в течение месяца. Кроме того, наблюдалась незначительная гиперплазия лимфоидных фолликулов с активацией зародышевых центров, которая была особенно выражена через 7 дней после инъекции частиц. Каких-либо других токсических эффектов в селезенке выявлено не было. Окрашивание по Перлсу показало, что в первые сутки внутри макрофагов в красной пульпе и краевой зоне было обнаружено большое количество железа. Затем было обнаружено перераспределение железа по ткани: в течение первой недели локализация железа вблизи лимфоидных фолликулов уменьшилась, а на 28-й день наблюдались железоположительные клетки внутри белой пульпы (Рис. 10j). Количество железоположительных клеток оставалось высоким в течение месяца исследования.

Влияние деградации МЧ на экспрессию железосодержащих белков

Железо является одним из наиболее важных металлов в организме. Его хранение и транспортировка осуществляется целым рядом белков. Поэтому далее исследовали влияние железа, высвобождаемого в процессе биодеградации МЧ, на экспрессию железосодержащих белков. Для этого в печени после введения частиц в течение 28 дней анализировался уровень экспрессии основных железосодержащих белков таких как трансферрин, DMT1 (с IRE доменом и без), ферропортин и ферритин (легкая и тяжелая цепь) (Рис. 11a-f). Интересно отметить, что уровень экспрессии продуцируемого преимущественно в печени трансферрина отвечающего за связывание Fe^{3+} ионов вырос почти в 2 раза уже через 24 часа после введения наночастиц и оставался высоким как через 2 недели, так и через 4 недели (Рис. 11a). Наблюдаемый эффект, предположительно, обусловлен высоким уровнем вовлеченности трансферрина в транспортировку железа через плазму крови, которая обеспечивает перераспределение биогенного железа, высвобождаемого при деградации наночастиц.

Похожая картина изменения экспрессии наблюдалась и у ассоциированного с транспортом и хранением Fe^{2+} ионов белка DMT1 (также известен как естественный резистентно-ассоциированный белок макрофагов 2) (Рис. 11b-c). Его экспрессия значительно выросла и через 2 недели после инъекции наночастиц была более чем в 2.5 раз больше, чем у контроля, однако за последующие 14 дней она упала и к 28 дню уже не была статистически отличима от начальной. Такая зависимость может быть обусловлена высокой концентрацией высвобождаемого железа в течение первых 2-х недель деградации наночастиц однако, когда впоследствии к 4-й неделе скорость высвобождения железа падает, это в свою очередь может приводить к понижению экспрессии высокоэффективного переносчика железа DMT1 что может говорить об обратимости данного процесса.

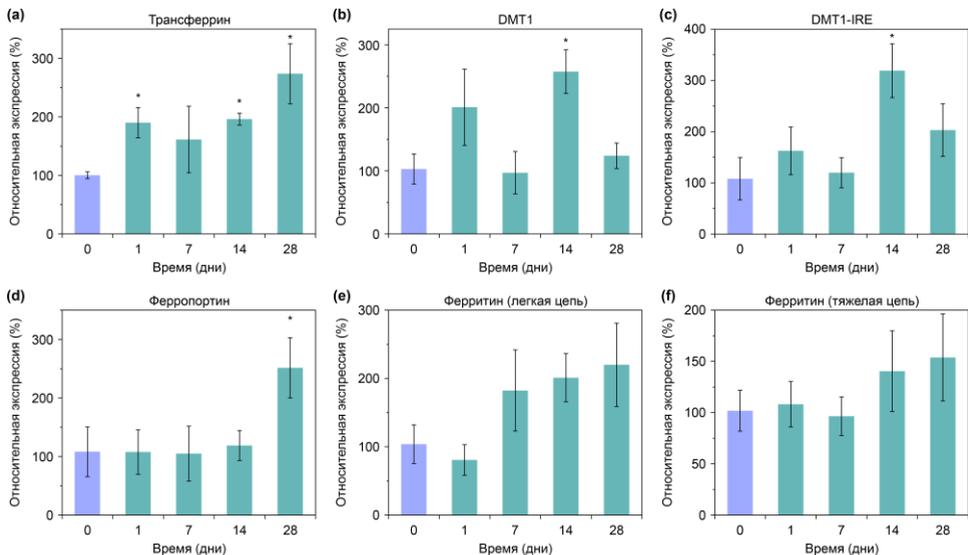


Рис. 11. Экспрессия генов железосодержащих белков и гематологический анализ крови. (a-f) Уровни экспрессии железосодержащих белков в печени в течение одного месяца после введения наночастиц: трансферрин, DMT1, железочувствительный элемент DMT1 (DMT1-IRE), ферропортин, легкие и тяжелые цепи ферритина (Ferritin_L и Ferritin_H соответственно). Звездочки указывают на существенное отличие от контрольной группы (фиолетовый столбик на каждом графике): тест Уэлча, * - $p < 0,05$.

Также через 28 дней была зафиксировано значительное увеличение уровня экспрессии экспортера внутриклеточного железа ферропортина (Рис. 11d). Интересно заметить, что в течение первых 2-х недель уровень его экспрессии практически не изменялся, однако за последующие 2 недели он резко вырос более чем в 2.5 раза. Наблюдаемые изменения, могут быть связаны не с быстрым высвобождением железа и его незамедлительной транспортировкой при деградации, а с более медленными процессами дальнейшего перераспределения и использования железа в организме, а также с процессами формирования биогенных железосодержащих кластеров с целью его долгосрочного хранения.

В дополнение к этому, был поведен исследование уровня экспрессии ферритина (Рис. 11e-f) как одного из основных внутриклеточных белков для хранения железа. Уровень его экспрессии в печени также имел тенденцию на увеличение, однако данное увеличение не было статистически значимым. Отсутствие существенных изменений в экспрессии ферритина может быть связано с тем, что основным депо для хранения железа является не печень, а селезенка, о чем косвенно свидетельствуют незначительные колебания экспрессии данного белка в печени.

Таким образом, деградация наночастиц сопровождается сложным многоступенчатым процессом транспортировки и хранения высвобождаемого железа, в ходе которого наблюдаются изменения уровней экспрессии ряда белков ответственных за транспортировку железа не только в пределах клетки, но и между органами через кровь.

ВЫВОДЫ

1. Предложен метод изучения циркуляции наночастиц на основе ранее предложенной перфузионной модели изолированной печени и магнитометрического метода МРQ. С помощью данного метода исследованы параметры выведения наночастиц из кровеносного русла печени в зависимости от физико-химических свойств наночастиц и состава перфузата.
2. Изучены процессы взаимодействия ряда магнитных наночастиц с эритроцитами в сыворотке и безбелковом буфере. Показано, что отрицательно заряженные частицы или частицы с инертной поверхностью не образуют стабильных комплексов с эритроцитами, в то время как положительно заряженные частицы способны образовывать долговременные стабильные комплексы с эритроцитами.
3. Исследован потенциал технологии доставки наночастиц на поверхности эритроцитов для наночастиц с размером менее 200 нм. С помощью данного подхода продемонстрировано 120-ти кратное увеличение доставки наночастиц в легкие (до 40% от введенной дозы).
4. Проведено первое обширное долгосрочное *in vivo* исследование деградации магнитных наночастиц. Показано, что увеличение размера, наличие положительного заряда, использование инертных покрытий и увеличение вводимой дозы замедляют разложение наночастиц в организме, в то время как наличие пор, биodeградируемые полимеры на поверхности, отрицательный поверхностный заряд и уменьшение размера приводят к ускорению биоразложения магнитных наночастиц.
5. Показано, что биоразложение магнитных наночастиц является малотоксичным процессом, однако может временно вызывать увеличение количества клеток Купфера, количества эритроцитов в крови и увеличивать экспрессию железосодержащих белков

БЛАГОДАРНОСТИ

Соискатель выражает глубокую благодарность своему научному руководителю Зелепукину Ивану Владимировичу за неоценимый вклад в подготовку данной диссертации. Также за помощь в проведении исследований и подготовке к защите данной диссертации автор благодарит заведующего лабораторией молекулярной иммунологии ИБХ РАН Деева Сергея Михайловича и Миркасымова Азиза Бахтияровича. Автор глубоко признателен своим коллегам в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН и в лаборатории нанобиотехнологий МФТИ за помощь в проведении исследований. Кроме того, автор искренне благодарен за помощь в проведении исследований и плодотворные дискуссии своим соавторам Рынгач Алине, Печниковой Надежде Александровне, Черкасову Владимиру Рюриковичу, Соколову Илье Леонидовичу, Шевченко Константину Георгиевичу, Бабенышеву Андрею Владимировичу и Петерсен Елене Владимировне. Также автор благодарит своих родственников и друзей за поддержку во время подготовки данной диссертации и в процессе всего процесса обучения. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. I.V. Zelepukin*, **A.V. Yaremenko***, M.V. Yuryev, I.N. Ivanov, V.R. Cherkasov, S.M. Deyev, P.I. Nikitin, M.P. Nikitin Long-Term Fate of Magnetic Particles in Mice: A Comprehensive Study // ACS Nano. 2021. Т. 15, № 7. С. 11341–11357. (* - равный вклад авторов)
2. I.V. Zelepukin*, **A.V. Yaremenko***, M.V. Yuryev, A.B. Mirkasymov, I.L. Sokolov, S.M. Deyev, P.I. Nikitin, M.P. Nikitin Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study // Journal of Controlled Release. 2020. Т. 326. С. 181-191. (* - равный вклад авторов)
3. I. V. Zelepukin*, **A. V. Yaremenko***, V. O. Shipunova, A. V. Babenyshev, I. V. Balalaeva, P. I. Nikitin, S. M. Deyev and M. P. Nikitin Nanoparticle-based drug delivery via RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth // Nanoscale. 2019. Т. 11. № 4. С. 1636-1646. (* - равный вклад авторов)
4. I. V. Zelepukin*, **A. V. Yaremenko***, E. V. Petersen, S. M. Deyev, V. R. Cherkasov, P. I. Nikitin and M. P. Nikitin Magnetometry based method for investigation of nanoparticle clearance from circulation in a liver perfusion model // Nanotechnology. 2019. Т. 30, № 10. С. 105101. (* - равный вклад авторов)

Другие публикации

1. A.V. Yaremenko, I.V. Zelepukin, I.N. Ivanov, R.O. Melikov, N.A. Pechnikova, D.S. Dzhililova, A.B. Mirkasymov, V.A. Bragina, M.P. Nikitin, S.M. Deyev and P.I. Nikitin Influence of Magnetic Nanoparticle Biotransformation on Contrasting Efficiency and Iron Metabolism // Research Square, 2022, препринт, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1946508/v1>
2. A.V. Yaremenko, I.V. Zelepukin, V.R. Cherkasov, A. Ringaci, E.V. Petersen, T.V. Yaremenko, A.A. Sizikov, A.V. Yaremenko, A.N. Kozyrina, P.I. Nikitin, S.M. Deyev, M.P. Nikitin, Analysis of nanoparticle uptake in liver by magnetic methods. 4th International Symposium and School for Young Scientists on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine, 2019
3. А.В. Яременко, И.В. Зелепукин, А.В. Бабеньшев, Т.В. Яременко, П.И. Никитин, С.М. Деев, М.П. Никитин, Доставка наночастиц на поверхность эритроцитов для терапии онкообразований в легких. Сборник тезисов XXXII Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2020.
4. A.V. Yaremenko, A. Ringaci, S.D. Zvereva, T.V. Yaremenko, A.A. Tamgin, D.A. Lifanov, V.R. Cherkasov, M.P. Nikitin, Multifunctional magnetic particle-based nanocarriers with easily modifiable surface for *in vivo* transfection. ICLO, IEEE, 2020
5. А.Г. Кочарян, А.В. Яременко, А.В. Лунин, М.П. Никитин, Получение новых многофункциональных наноагентов для биомедицины и исследование их физико-химических свойств. Сборник тезисов XXXII Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2020.
6. I. L. Sokolov, A. V. Yaremenko, V. R. Cherkasov, V. A. Bragina, A. V. Vasilyeva, A. A. Tregubov, M. P. Nikitin, Magnetic metal-organic framework nanoparticles and ferrihydrite nanoagents for MRI-contrasting and drug delivery. International Conference on the Scientific and Clinical Applications Of Magnetic Carriers, 2018.
7. А.Г. Кочарян, А.В. Яременко, А.В. Лунин, М.П. Никитин, Получение мультифункциональных наноагентов на основе оксигидроксидов железа с включением ионов кобальта и изучение их коллоидно-химических и физических свойств. Труды 62-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 2019.