

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ В ЖИВОМ ОРГАНИЗМЕ С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО МАРКЕРА

Бродовская Е.П.¹, Минаева О.В.¹, Куликов О.А.¹, Семенова Е.В.¹, Горбунова К.А.¹, Сураева Е.Ю.¹, Кузнецова А.В.¹, Гечас А.А.¹, Кеняйкина А.Г.¹, Кокорев А.В.², Пятаев Н.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: kitten-777@mail.ru;

²ИАТЭ НИЯУ МИФИ, Обнинск

В статье рассматривается метод прижизненной визуализации распределения наночастиц в организме с помощью флуоресцентной метки на основе конъюгата бычьего сывороточного альбумина (BSA) и красителя цианинового 7 (Cy7). Для оптимизации свойств флуоресцентного маркера проведен подбор условий синтеза (температуры и pH среды). Установлено, что максимальный процент включения красителя в конъюгат Cy7-BSA достигается при температуре +4°C и pH 8,3–8,4. В качестве модели наночастиц были выбраны липосомальные везикулы: получены липосомы из лецитина и холестерина с включением полученного конъюгата Cy7-BSA. С помощью системы визуализации IVIS Lumina II установлены особенности органного распределения липосом с флуоресцентным конъюгатом в живом организме, а также изучена фармакокинетика красителя Cy7, конъюгата Cy7-BSA и липосом, содержащих конъюгат Cy7-BSA, после внутривенного введения мышам. По сравнению с введением Cy7 при введении липосом и конъюгата BSA-Cy7 наблюдалось увеличение AUC и периода полувыведения красителя. Визуально в то же время (через 24 часа) отмечалось накопление липосом в области печени и селезенки. На основе сопоставления данных системной кинетики и визуальных данных можно сделать вывод о перспективности применения флуоресцентного маркера на основе бычьего сывороточного альбумина и красителя цианинового 7 для визуализации распределения органических и полимерных наночастиц в живом организме.

Ключевые слова: флуоресцентный маркер, визуализация in vivo, липосомы, конъюгат Cy7-BSA

DEVELOPMENT OF THE METHOD OF THE NANOPARTICLES DISTRIBUTION VISUALISATION BY FLUORESCENT MARKER IN VIVO

Brodovskaya E.P.¹, Minaeva O.V.¹, Kulikov O.A.¹, Semenova E.V.¹, Gorbunova K.A.¹, Suraeva E.U.¹, Kuznetsova A.V.¹, Gechas A.A.¹, Kenyaikina A.G.¹, Kokorev A.V.², Pyataev N.A.¹

¹National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: kiten-777@mail.ru;

²National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk

In the article is considered the method of in vivo nanoparticles distribution visualization in the body using a fluorescent tag based on bovine serum albumin (BSA) conjugate and cyanine dye 7 (Cy7). The optimal conditions (temperature and pH) for synthesis of the fluorescent marker were found. The maximum amount of the dye incorporation in the Cy7-BSA conjugate was achieved at a temperature of 4°C and a pH of 8.3-8.4. Liposomal vesicles were chosen as a model of nanoparticles: the liposomes were obtained from lecithin and cholesterol with the Cy7-BSA conjugate incorporation. The pharmacokinetics of Cy7 dye, Cy7-BSA conjugate and liposomes containing Cy7-BSA conjugate was studied after IV administration in mice. The specific features of distribution of the liposomes with a fluorescent conjugate were established in vivo by IVIS Lumina II Imaging System. We found increased exposure (AUC) and elimination half-time of liposomes and the BSA – Cy7 conjugate in compare to free Cy7. At the same time was observed an increasing of the liposome accumulation in the liver and spleen regions in 24 hours. Based on a comparison of pharmacokinetics and visual data it can be concluded that a fluorescent marker containing the bovine serum albumin and Cy7 can be successfully used for visualization of the organic and polymeric nanoparticles distribution in vivo.

Keywords: fluorescent marker, visualization in vivo, liposomes, Cy7-BSA conjugate

В настоящее время исследования структур нанодиапазона занимают одно из лидирующих мест во всех отраслях науки, в том числе и медицине. Наночастицы применяются как для диагностики, так и для конструирования систем направленной

доставки лекарств. Наночастицы могут быть использованы как универсальные средства для таргетной терапии. Синтезировано много различных эффективных таргетных систем на основе наноматериалов, однако не все из них дошли до клинического применения. Их практическое применение во многом ограничено дефицитом данных и сложностью исследования биологических свойств наноматериалов. После введения наночастиц в живой организм мы можем оценивать результаты их воздействия только по внешним косвенным признакам: поведению животного, изменению в анализах крови, посмертных морфологических изменениях в органах и т.д. Существенной проблемой является прижизненное исследование биокинетики и распределения частиц нанодиапазона, так как закономерности их распределения во многом отличаются в зависимости от характера наночастиц, их морфологии, размера, заряда и других свойств, что затрудняет экстраполяцию данных на другие наноматериалы. Кроме того, большинство доступных литературных данных по фармакокинетике наноматериалов базируются на экспериментах *ex vivo*, что сопровождается гибелью большого количества экспериментальных животных и не согласуется с принципами биоэтики.

Множество современных исследований направлено на поиск новых методов визуализации наночастиц непосредственно в живом организме и в режиме реального времени. При этом, если для визуализации металлических (ферромагнитных) материалов стало стандартом использование рентгеновской и магнитно-резонансной томографии, то органические и полимерные наноструктуры (например, липосомальные везикулы, микрокапсулы из биополимеров и т.д.) по-прежнему сложны для изучения биокинетики *in vivo*. Большинство современных исследований предлагают использование оптических методов визуализации [1, 2]. Известно, что большинство органических веществ в клетках не поглощают электромагнитное излучение в ближней инфракрасной области, поэтому область 650–1350 нм получила название «окно прозрачности» биологических объектов и может быть использована для визуализации каких-либо маркеров *in vivo*. В качестве маркеров используют различные вещества – флуоресцентные маркеры, обладающие свойством флуоресценции в ближней ИК-области. С помощью флуоресцентных меток можно изучить распределение меченых белков в организме или получить изображение биомолекул, меченых органелл внутри клетки, рецепторов на поверхности клеток, в том числе опухолевых [1]. Многие флуоресцентные вещества – низкомолекулярные и водорастворимые, поэтому их сложно инкапсулировать, часто происходит необратимая потеря флюорофора в процессе синтеза (утечка) или потеря его активности («выгорание») [2]. Пришивание флуоресцентно-меченых антител к поверхности наночастиц технически дорого, трудоемко и не обеспечивает необходимой концентрации флуоресцентного маркера,

а, следовательно, и приемлемого уровня свечения наночастиц в органах и тканях – визуализация возможна только в мазках или срезах под микроскопом [3]. Поэтому для *in vivo* исследований наиболее перспективной будет разработка флюоресцентного маркера на основе макромолекулы (например, белка).

Целью нашей работы стали оптимизация метода синтеза флюоресцентного маркера на основе бычьего сывороточного альбумина и цианинового 7 и исследование распределения меченых наночастиц в живом организме.

Материалы и методы исследования

В работе использовались краситель цианиновый 7 (Cy7) фирмы «Lumiprobe Co» и бычий сывороточный альбумин (BSA) Sigma Aldrich (США). За основу синтеза была взята реакция конъюгации BSA и активированного эфира Cy7. Были рассчитаны основные объемы и соотношения реагентов согласно протоколу конъюгации, аналогичному работе [4]. Белок растворяли в фосфатном буфере, а краситель NHS-Cy7 – в диметилсульфоксиде (ДМСО). Растворенный краситель приливали к белку, смесь тщательно перемешивали на магнитной мешалке, далее проводилась инкубация в различных условиях в течение 24 ч.

Очистку полученного конъюгата BSA-Cy7 осуществляли с помощью диализа с диаметром пор 12–14 кДа. Диализ проводился деионизированной водой при различной температуре и постоянном помешивании. Воду меняли каждые 24 часа до достижения визуально чистого раствора.

Для оптимизации методики исследовано влияние условий синтеза (температуры и pH) на эффективность включения красителя в конъюгат. Для подбора температурного режима нами было синтезировано несколько конъюгатов при заданной температуре. Затем проведена серия экспериментов по подбору оптимального уровня pH для синтеза конъюгата BSA-Cy7. Для оценки эффективности включения определяли процент не включившегося в ходе реакции красителя и рассчитывали степень включения. Концентрацию невключившегося красителя определяли в диализующем растворе спектрофотокolorиметрически по предварительно построенному калибровочному графику. Процент невключившегося красителя определяли по формуле: $(m - m_1)/m \times 100\%$, где m – масса исходная красителя, m_1 – масса невключившегося красителя.

После оптимизации методики была исследована кинетика красителя Cy7 в свободной, конъюгированной с белком и липосомальной форме. Липосомы были выбраны в качестве модели частиц нанодиапазона как наиболее изученные и потенциально нетоксичные [5]. Липосомы синтезировали методом «обращения фаз» из лецитина и холестерина на роторном испарителе Laborota 4000 eco (Heidolph, Германия) аналогично работе [6]. Полученные липосомы имели средний размер 292 ± 14 нм, количество Cy 7 составляло 98%.

Исследование кинетики выполнено на лабораторных мышах массой 18–22 г. Было выполнено 2 серии экспериментов. В первой серии изучена системная кинетика красителя. Во второй серии сравнивалось его органное распределение методом full body imaging.

Для исследования системной кинетики были сформированы 3 группы животных по 6 особей в каждой. Мышам в хвостовую вену вводили 5 мкг красителя в 0,2 мл изотонического раствора, причем в первой группе использовался свободный Cy7 в виде активированного эфира, во второй – конъюгат BSA-Cy7 в эквивалентной дозе красителя, в третьей – суспензия липосом с конъюгатом. Через 5, 15, 30 минут, 1, 3, 6, 12 и 24 часа у мышей отбирали по 20 мкл крови путем скарификации кожи подошвенной поверхности лапок. Кровь вносили в ячейки плоскодонных стрипов для ИФА-анализа с диаметром ячейки 5 мм, и непосредственно после забора проводили регистрацию люминесценции с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Xenogen). Параметры регистрации люминесценции: длина волны возбуждения 650–690 нм, длина волны эмиссии 700–740 нм. Расчет концентрации красителя в крови проводили по предварительно построенному калибровочному графику. Фармакокинетическое моделирование и сопоставление реальных и модельных кривых проводились с помощью программы PKSolver.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования влияния температурного режима на эффективность включения красителя в белок представлены в таблице 1.

Таблица 1

Зависимость степени включения Cy7 от температуры

Температура	+4°C	+18°C	+25°C	+37°C
Конц. красителя, мг/мл	0,29±0,01	0,26±0,03	0,22±0,004	0,17±0,001
Степень включения красителя, %	99	90	76	60

Оптимальной для инкубации была температура +4°C. Поэтому дальнейшую инкубацию проводили при данной температуре в холодильнике на магнитной мешалке.

Результаты экспериментов по подбору оптимальных условий pH для синтеза флуоресцентного маркера BSA-Cy7 представлены в таблице 2.

Таблица 2

Зависимость степени включения Cy7 от pH

pH	7,0–7,5	7,6–8,2	8,3–8,4	8,5–8,6	8,7–9,0

Конц. красителя, мг/мл	0,15±0,02	0,26±0,03	0,29±0,001	0,28±0,002	0,16,5±0,001
Степень включения красителя, %	52	90	99	98	61

Известно, что реакция активированных эфиров с аминами проявляет существенную зависимость от рН [7]. При низких значениях рН происходит протонирование аминогрупп, в результате чего снижается эффективность реакции. При высоких значениях существенным становится процесс гидролиза активированного эфира. Из таблицы 2 видно, что наибольшая степень включения красителя была при значении рН 8,3–8,6. Выше и ниже данных значений степень включения была значительно ниже. Таким образом, можно сделать вывод, что оптимальным значением рН для модификации является 8,3–8,6.

Исследование кинетики свободного красителя и флюоресцентного маркера

Кинетические константы Су7 при введении в различных формах представлены в таблице 3.

Таблица 3

Особенности фармакокинетики различных форм Су7

Показатель	Значения показателей для различных форм препарата		
	Свободный Су7	Конъюгат Су7-BSA	Липосомы с конъюгатом Су7 - BSA
C_{max} , нг/мл	139,6	137,3	385,2
k , мин ⁻¹	0,0141	0,0083	0,0027
$T_{1/2}$, мин	48,94	83,13	249,34
Cl_{tot} , мл/мин	2,93	3,11	1,33
$AUC_{(0-24)}$, нг/мл*ч	1565	1845	3751
k_{α} , мин ⁻¹	–	0,0181	0,0097
k_{β} , мин ⁻¹	–	0,0019	0,0006
$T_{1/2}(\alpha)$, мин	–	38,30	71,13
$T_{1/2}(\beta)$, мин	–	364,8	1150,0

Примечание: C_{max} – пиковая концентрация, k – константа элиминации, $T_{1/2}$, – период полувыведения, Cl_{tot} – общий клиренс, $AUC_{(0-180)}$, – площадь под фармакокинетической кривой в интервале 0–24 ч.

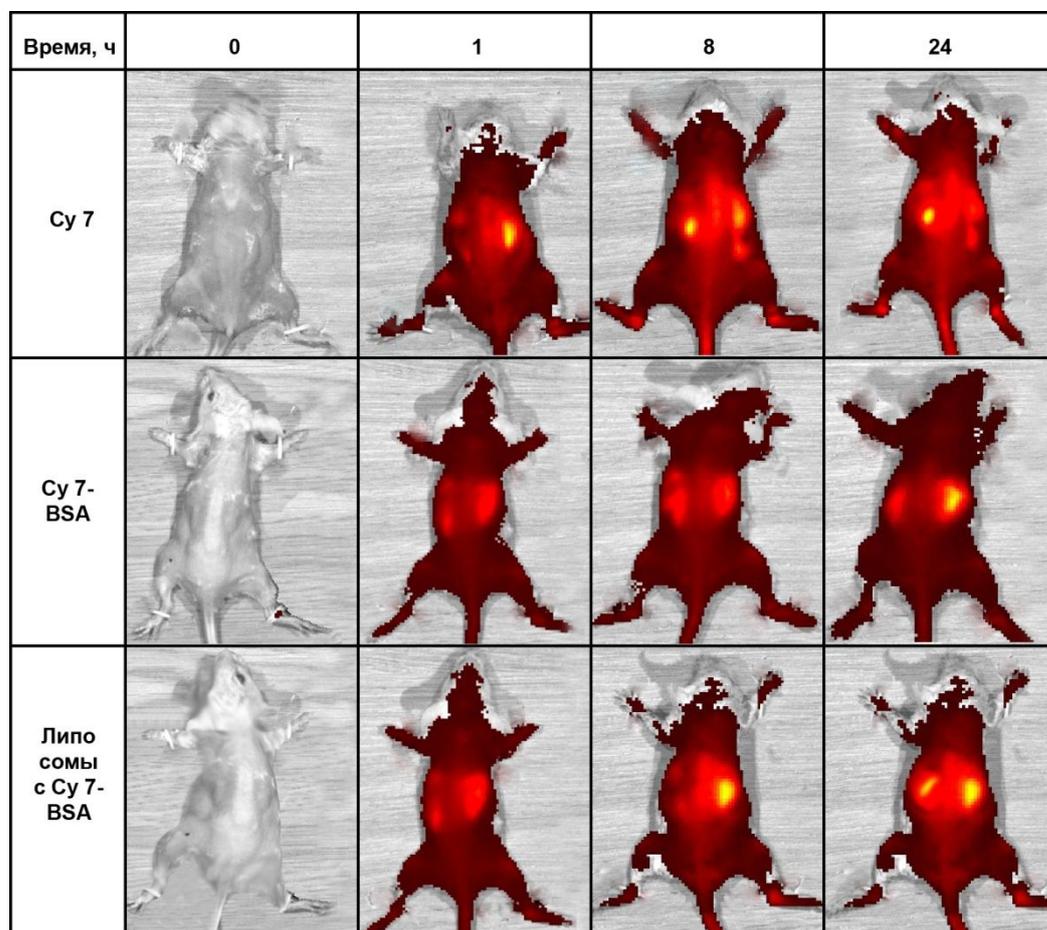
Мы можем видеть, что пиковые концентрации Су7 в крови были сопоставимы в первой и второй группах и практически в 3 раза выше в группе с липосомальной формой красителя. Однако скорость элиминации была меньше в случае использования конъюгата с BSA и минимальной в липосомальной форме, что свидетельствует о пролонгировании

циркуляции конъюгированной и липосомальной формы красителя по сравнению со свободным Cy7. Длительная циркуляция в крови приводила к значительному повышению AUC 0-24 для Cy7-BSA и липосом на его основе. Фармакокинетика свободного красителя удовлетворительно описывалась однокамерной моделью ($R_{\text{корр}}=0,996$). Кинетика конъюгата Cy7 BSA и его липосомальной формы соответствовали биэкспоненциальной кривой ($R_{\text{корр}}=0,999$ и $R_{\text{корр}}=0,991$ соответственно). От 20 до 45% введенной дозы элиминировалось в течение первой фазы (38 и 70 минут для конъюгата и его липосомальной формы соответственно). Вторая фаза, на которую приходилось от 55 до 80% дозы для конъюгата и его липосомальной формы, характеризовалась периодом полуэлиминации в 6 и 12 часов соответственно. Появление дополнительной «медленной» экспоненты на фармакокинетической кривой свидетельствует о наличии «депо» препарата, скорость освобождения из которого значительно меньше скорости естественной элиминации. В нашем случае в качестве такого депо могут выступать молекулы BSA, с которыми конъюгированы Cy7 и липосомальные везикулы. Хорошая биологическая совместимость и стабильность в крови пролонгируют время их циркуляции и создают в крови пул депонированного красителя. Кроме того, кинетика липосом, не обработанных полиэтиленгликолем, характеризуется их депонированием в органах РЭС (в печени и селезенке), которые в этом случае также выступают в роли депо красителя.

Основной целью второй серии эксперимента было исследование распределения наночастиц (липосом), помеченных флюоресцентным конъюгатом Cy7-BSA *in vivo*. Оценка органного распределения красителя проведена в трех группах мышей (по 5 особей в каждой) на вышеописанной установке IVIS Lumina II в режиме full body imaging. Под внутрибрюшинным наркозом удаляли волосяной покров, после чего в хвостовую вену вводились исследуемые вещества в дозировке, аналогичной таковой в первой группе (5 мкг/животное). Затем животное помещалось в камеру анализатора, и регистрировали индуцированную люминесценцию всего тела. Параметры регистрации были аналогичны таковым в первой серии. Результаты сравнения люминесценции мышей приведены на рисунке.

Анализируя серию последовательных снимков животного, которому был введен Cy7 в дозе 5 мкг (1-й ряд), мы можем видеть, что краситель Cy7 распределялся во всех органах и тканях. На ранних этапах (30 мин) регистрируется люминесценция печени, на поздних – почек. При введении равной дозы конъюгата (2-й ряд) также наблюдалось свечение печени и почек, однако интенсивность люминесценции была меньше. При этом максимум интенсивности свечения печени был сдвинут в область более позднего времени наблюдения (24 часа), а интенсивность свечения почек была меньшей. Эти данные согласуются с

данными, полученными при изучении системной кинетики, и свидетельствуют о том, что при введении конъюгата доля свободной фракции красителя, выводимой почками, была меньше, а время циркуляции в крови пролонгировалось.



Результаты сравнения люминесценции мышей

При введении липосом на основе конъюгата Су7-BSA в ранние сроки (30 мин) также наблюдалось уменьшение интенсивности свечения органов, однако к 8-му часу хорошо контрастировалась печень, а к 24 часам отмечалась интенсивная флюоресценция печени и селезенки. Наблюдаемые визуальные изменения согласуются с данными системной кинетики и данными литературы [5, 8]. Как известно, липосомальные везикулы, не защищенные ПЭГ, элиминируются из кровотока фагоцитами и транспортируются в органы РЭС, где подвергаются депонированию и медленному метаболизму. Эти изменения скорее всего объясняют и флюоресценцию области печени и селезенки, и появление длительной второй фазы выведения липосом на основе конъюгата Су7-BSA. Таким образом, прижизненный анализ органного распределения флюоресцентного маркера и липосом, содержащих маркер на основе белка и красителя цианинового 7, позволил выявить особенности

фармакокинетики частиц нанодиапазона (липосомы и белковый конъюгат) и показал, что данные достаточно хорошо согласуются с параметрами системной кинетики *ex vivo*.

Выводы. Для разработки метода визуализации распределения наночастиц в живом организме была использована флуоресцентная метка на основе бычьего сывороточного альбумина и красителя цианинового 7. Опытным путем были подобраны оптимальные значения pH и температуры для конъюгации белка (бычьего сывороточного альбумина) с активированным эфиром цианинового 7. Установлен процент включения красителя в полученном конъюгате. В качестве модели наночастиц были выбраны липосомальные везикулы: получены липосомы из лецитина и холестерина с включением полученного конъюгата Cy7-BSA. Установлены особенности кинетики распределения липосом с флуоресцентным конъюгатом в живом организме методом *full body imaging*, а также проведено сравнение с кинетикой красителя Cy7 в свободной и конъюгированной с белком форме. На основе сопоставления данных системной кинетики и визуальных данных можно сделать вывод о перспективности применения флуоресцентного маркера на основе бычьего сывороточного альбумина и красителя цианинового 7 для визуализации распределения органических и полимерных наночастиц в живом организме.

Список литературы

1. Alamudi S.H., Chang Y.T. Advances in the design of cell-permeable fluorescent probes for applications in live cell imaging. *Chem Commun (Camb)*. 2018. Vol. 54. no 97. P. 13641-13653.
2. Ueno T., Nagano, T. Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nature Methods*. 2011. Vol. 8. P. 642-645.
3. Corrêa I.R. Jr. Considerations and protocols for the synthesis of custom protein labeling probes. *Methods Mol. Biol.* 2015. no 1266. P. 55-79.
4. Yoshimura T., Kurogi K., Liu M.-C., Suiko M., Sakakibara Y. A proteomic approach for the analysis of S-nitrosylated proteins using a fluorescence labeling technique. *Journal of Electrophoresis*. 2016. Vol 60. no 1. P. 5-14.
5. Пятаев Н.А., Минаева О.В., Кокорев А.В. Заборовский А.В., Гуревич К.Г. Липосомы в современной противоопухолевой терапии // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2017. Т. 16. № 1. С. 8-14.
6. Куликов О.А., Агеев В.П., Инчина В.И. Поиск эффективного метода включения флуоресцентной метки в состав липосом // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018. Т. 21. № 4. С. 52-55.
7. Ингольд К. Теоретические основы органической химии. М.: Мир, 1973. 1056 с.

8. Smits E.A.W., Soetekouw J.A., Pieters E.H.E., Smits C.J.P., de Wijs-Rot N., Vromans H. The availability of drug by liposomal drug delivery: Individual kinetics and tissue distribution of encapsulated and released drug in mice after administration of PEGylated liposomal prednisolone phosphate. *Invest New Drugs*. 2018. Dec 13. DOI: 10.1007/s10637-018-0708-4.