

ОЦЕНКА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ МАГНИТОЛИПОСОМ В ОПУХОЛИ И ОРГАНАХ МЫШЕЙ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

© 2020 г. Н.А. Марнаутов*, В.А. Сerezhenkov**, Л.Х. Комиссарова*, Н.А. Ткачев**, А.С. Татиколов*, А.Н. Голощапов*, А.Ф. Ванин**

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, ул. Косыгина, 4

**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: serezhnikov@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.04.2020 г.

После доработки 07.04.2020 г.

Принята к публикации 17.04.2020 г.

Методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса впервые изучено биораспределение магнитолипосом, полученных на основе наночастиц магнетита (Fe_3O_4), в опухоли и органах мышечной системы с карциномой Льюис в отсутствие и в присутствии магнитного поля. Животных в опытной группе после внутривенного введения магнитолипосом в дозе 7.56 мг Fe/кг в зоне опухоли подвергали воздействию внешнего магнитного поля (0.6 Тл). На основании анализа спектров электронного парамагнитного резонанса образцов органов и тканей мышечной системы обнаружено, что воздействие магнитного поля приводит к двукратному возрастанию концентрации наночастиц магнетита в опухоли ($p < 0.05$) по сравнению с контролем, что дает основание рекомендовать полученные магнитолипосомы для использования в качестве магнитоуправляемого носителя для адресной доставки противоопухолевых средств. Высокая концентрация суперапарамагнитных наночастиц магнетита обнаружена в печени в отсутствие и в присутствии внешнего магнитного поля. Отличия в накоплении Fe_3O_4 в легких и печени в присутствии магнитного поля статистически незначимы.

Ключевые слова: ЭПР, наночастицы магнетита, SPIONs, МЛП, магнитное поле, биораспределение, карцинома Льюис.

DOI: 10.31857/S0006302920040195

С развитием нанотехнологий возрастает интерес к наноразмерным материалам. Особое внимание уделяется применению суперапарамагнитных наночастиц магнетита (SPIONs) на основе оксидов железа для биомедицины: магнитного концентрирования и сепарации клеток, иммунологического анализа, сверхвысокочастотной гипертермии опухолей [1, 2]. Представляет интерес использование SPIONs в качестве контрастирующих агентов в магниторезонансной томографии для визуализации опухолей и в качестве магнитоуправляемых носителей [3, 4] для адресной доставки лекарственных средств. Целевая доставка лекарственных средств позволяет создать депо препарата в клетках опухоли и существенно понизить негативное влияние на организм за счет уменьшения вводимой дозы. Возможность применения SPIONs в клинике обусловлена их низ-

кой токсичностью, более того, SPIONs на основе наночастиц магнетита (Fe_3O_4) являются единственными магнитными наночастицами, разрешенными для клинического применения [5]. Инкапсулирование наночастиц Fe_3O_4 в липосомы — эффективное средство предотвращения их агрегации, способствует доставке лекарственных средств в клетки-мишени. Имеется и другой немаловажный аспект: в составе магнитолипосом (МЛП) наночастицы Fe_3O_4 сохраняют свои магнитные свойства. Работ по изучению биораспределения МЛП на основе наночастиц магнетита у животных-опухоленосителей методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) практически нет. Из исследований в этом направлении представляет интерес работа [6], в которой методом ЭПР обнаружено увеличение накопления наночастиц магнетита в глиобластоме у мышечной системы после воздействия на опухоль внешнего магнитного поля (МП) индукцией 0.4 Тл, а также работа [7], в которой под действием внешнего магнитного по-

Сокращения: SPIONs — суперапарамагнитные наночастицы магнетита, МЛП — магнитолипосомы, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, МП — магнитное поле.

ля обнаружено повышение концентрации магнитоллипосомального доксорубина в остеосаркоме у хомячков.

Целью данной работы является исследование количественного биораспределения МЛП, полученных на основе наночастиц магнетита, в опухоли и органах мышей с карциномой Льюис методом ЭПР в присутствии и в отсутствие воздействия на опухоль внешнего магнитного поля для оценки возможности их использования в качестве магнитоуправляемых переносчиков для адресной доставки противоопухолевых средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез наночастиц магнетита. Наночастицы Fe_3O_4 синтезировали высокотемпературным разложением ацетилацетоната железа (III) $Fe(AcAc)_3$ в триэтиленгликоле [8]. Размер частиц в зависимости от условий синтеза находится в диапазоне от 3 до 9 нм.

Синтез магнитолипосом на основе наночастиц магнетита. МЛП получали модификацией метода регидратации тонких фосфолипидных пленок [9], состоящего в проведении трехкратной процедуры оттаивания—озвучивания—замораживания, с включением наночастиц Fe_3O_4 во внутренний объем МЛП. Очистку МЛП от липосом, не содержащих наночастицы, осуществляли с помощью магнитной сепарации на постоянном магните с индукцией 0.6 Тл, ($t = 4$ ч, $T = 4^\circ C$). Невключенные наночастицы Fe_3O_4 удаляли центрифугированием (1500 g, $t = 15$ мин, $T = 4^\circ C$). Концентрацию железа в образце определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии после растворения аликвоты анализируемого образца в концентрированной соляной кислоте (37%). Эффективность инкапсуляции наночастиц Fe_3O_4 в МЛП составила $24.2 \pm 2.8\%$. Размер МЛП составил 158.7 ± 24.9 нм.

Трансплантация карциномы. Трансплантацию карциномы Льюис осуществляли путем внутримышечной инокуляции опухолевых клеток в бедро правой лапы, каждой мышце вводили по 0.2 мл 20%-й взвеси опухолевых клеток в среде 199.

ЭПР-спектры. Для определения концентрации МЛП в образцах биологических тканей предварительно строили калибровочную прямую зависимости интегральной интенсивности сигнала ЭПР при $g = 2.21$ от концентрации МЛП в пересчете на железо. Концентрацию суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 в тканях рассчитывали по калибровочной прямой, используя метод двойного интегрирования спектров ЭПР. Сигна-

лы ЭПР образцов регистрировали на спектрометре ECS-106 (Brucker, Германия) при 77 К [10]. Условия регистрации ЭПР спектров: усиление $5 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^4$, центр поля 3300 Гс, развертка поля 6500 Гс, амплитуда модуляции 11.4 Гс.

Опыты на мышцах-опухоленосителях. Магнитоллипосомальную композицию вводили половозрелым мышам самцам линии C57Bl/6 массой 20–22 г с внутримышечно привитой карциномой Льюис в хвостовую вену в дозе 7.56 мг Fe/кг спустя 10 суток после трансплантации опухоли. Через 60 мин после введения животных декапитировали; образцы легких, печени и опухолевой ткани замораживали и хранили в жидком азоте. Полученные образцы органов и тканей мышей анализировали методом ЭПР.

Опухоли мышей в первой группе с магнитоллипосомальной композицией не подвергали воздействию магнитного поля (контроль), во второй группе мышей (опыт) сразу после введения препарата область локализации опухоли подвергали воздействию магнитного поля с использованием постоянного магнита индукцией 0.6 Тл в течение 60 мин.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения Open Office, SciDaVis, R и Statistica. Опыты проводили с трехкратным повтором, в каждой группе было три-пять мышей. Для оценки различий между группами использовали *U*-тест Манна–Уитни–Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1а представлена электронная микрофотография наночастиц Fe_3O_4 , на врезках приведены электронная дифрактограмма и размерное распределение наночастиц, полученное методом динамического светорассеяния; на рис. 1б представлено размерное распределение МЛП на основе Fe_3O_4 , на врезке — электронная микрофотография МЛП на их основе.

Полученные наночастицы имеют форму, близкую к сферической, с диаметром частиц 7.26 ± 1.17 нм. Средний размер наночастиц, измеренный методом динамического светорассеяния, составил 14.5 ± 2.9 нм (рис. 1а). Размер МЛП на их основе, определенный методом динамического светорассеяния, составил 158.7 ± 24.9 нм (рис. 1б).

Для оценки биораспределения МЛП в опухоли и органах мышечных-опухоленосителей использовали спектры ЭПР образцов биологических тканей. На рис. 2 представлены примеры ЭПР-спектров

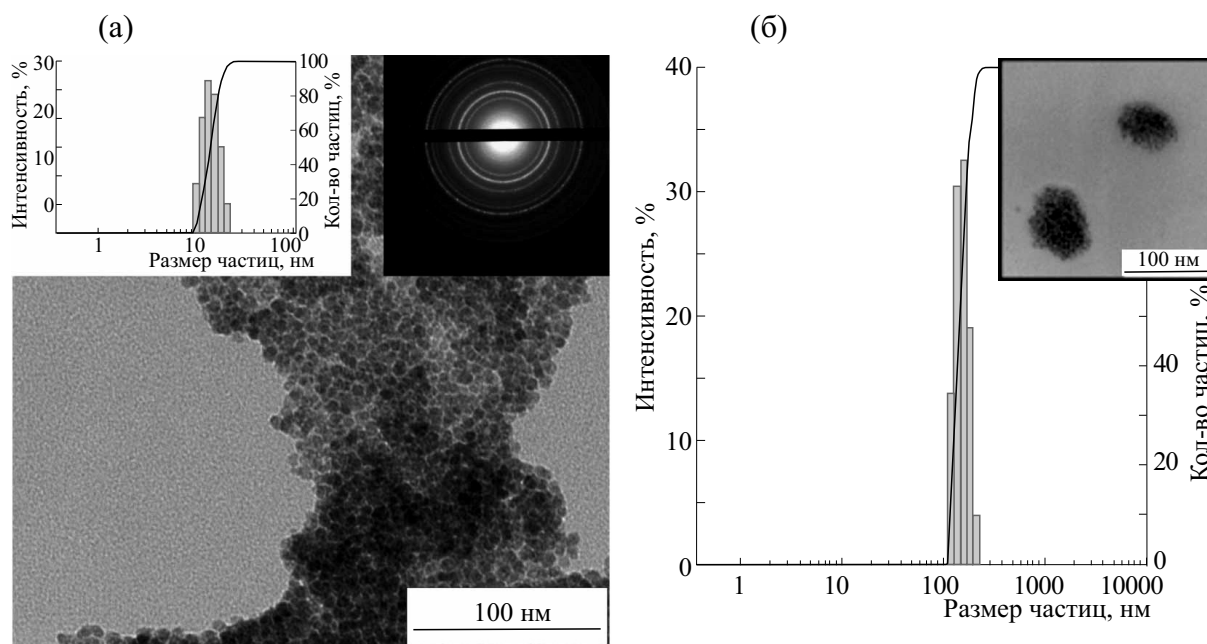


Рис. 1. (а) – Микрофотография наночастиц Fe₃O₄ ($d = 7.26 \pm 1.17$ нм) и их размерное распределение; (б) – размерное распределение и микрофотографии магнитолипосом, синтезированных на основе наночастиц Fe₃O₄.

печени и опухолевой ткани после внутривенного введения МЛП.

На основании полученных ЭПР-спектров опухолевой ткани и печени (рис. 2), а также других органов были рассчитаны концентрации МЛП (в пересчете на железо) в опухоли и органах (таблица).

Максимальная концентрация Fe₃O₄ после внутривенного введения МЛП обнаружена в печени как в отсутствие, так и в присутствии внешнего магнитного поля (таблица). Накопление МЛП в печени характерно для наноразмерных липосомальных структур [11]. После воздействия

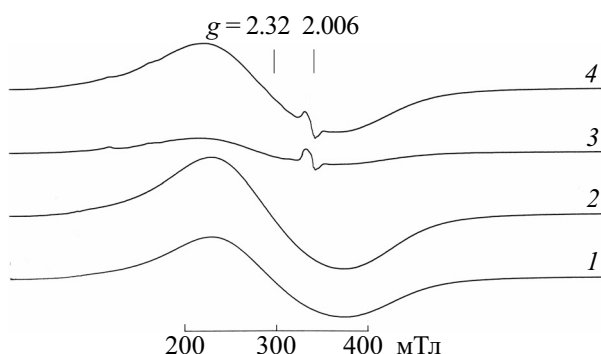


Рис. 2. ЭПР-спектры ($T = 77$ К) печени (1 и 2) и опухолевой ткани (3 и 4) через 60 мин после внутривенного введения магнитолипосом: 1 – печень без магнита, 2 – печень с магнитом, 3 – опухоль без магнита, 4 – опухоль с магнитом.

МЛП концентрация Fe₃O₄ в опухоли возрастает не менее чем в два раза по сравнению с концентрацией в отсутствие поля ($p < 0.05$). Отличия в накоплении Fe₃O₄ в легких и печени в присутствии МЛП статистически незначимы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе методом ЭПР впервые изучено количественное биораспределение МЛП на основе суперпарамагнитных наночастиц Fe₃O₄, в опухоли и органах мышей с карциномой Льюис после внутривенного введения. Показано, что воздействие внешнего магнитного поля (0.6 Тл) на зону опухоли приводит к двукратному возрастанию концентрации наночастиц Fe₃O₄ МЛП в опухоли ($p < 0.05$), что дает основание рекомендовать полученные МЛП в качестве магнитоуправляемых переносчиков для адресной доставки противоопухолевых средств.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме Государственного задания № 44.2 (№ гос. регистрации 001201253311).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов при написании данной статьи.

Концентрации МЛП (в пересчете на железо) в печени, опухоли и легких мышей с карциномой Льюис через 60 мин после внутривенного введения МЛП

	Концентрация МЛП, мкМ (среднее \pm ст. откл.)		
	печень	опухоль	легкие
Внутривенное введение	1891 \pm 300	66 \pm 12	57 \pm 9
Внутривенное введение + внешнее МП (0.6 Тл)	2121 \pm 393	140 \pm 22	66 \pm 8

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными осуществляли в строгом соответствии с Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1997).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- J. Gao, H. Gu, and B. Xu, *Accounts Chem. Res.* **42** (8), 1097 (2009). DOI: 10.1021/ar9000026
- L. Mohammed, H. Goma, D. Ragab, et al., *Particuology* **30**, 1 (2017). DOI: 10.1016/j.partic.2016.06.001
- K. Ulbrich, K. Holá, V. Šubr, et al., *Chem. Rev.* **116** (9), 5338 (2016). DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00589
- J. Estelrich, M. J. Sánchez-Martín, and M. A. Busquets, *Int. J. Nanomed.* **10**, 1727 (2015). DOI:10.2147/ijn.s76501
- A. C. Anselmo and S. Mitragotri, *AAPS J.* **17** (5), 1041 (2015). DOI: 10.1208/s12248-015-9780-2
- H. Marie, L. Lemaire, F. Franconi, et al., *Adv. Function. Mat.* **25** (8), 1258 (2015). DOI:10.1002/adfm.201402289
- H. Nobuto, T. Sugita, T. Kubo, et al., *Int. J. Cancer* **109** (4), 627 (2004). DOI:10.1002/ijc.20035
- Л. Х. Комиссарова, Н. А. Марнаутов, А. С. Татиколов и др., *Технологии живых систем* **14** (4), 51 (2017).
- C. Kirby and G. Gregoriadis, *Nat. Biotechnol.* **2** (11), 979 (1984). DOI: 10.1038/nbt1184-979
- T. S. Kavetsky, V. A. Serezhenkov, et al., in *Advanced Nanotechnologies for Detection and Defence against CBRN Agents* (Springer, Dordrecht, 2018), pp. 487–492.
- M. J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, et al., *J. Controlled Release* **172** (3), 782 (2013). DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.09.013

Evaluation of the Biodistribution of Magnetoliposomes in Murine Tumor and Mice Organs Using Electron Spin Resonance

N.A. Marnautov*, V.A. Serezhenkov**, L.Kh. Komissarova*, N.A. Tkachev**, A.S. Tatikolov*, A.N. Goloshchapov*, and A.F. Vanin**

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

Electron spin resonance spectroscopy has been applied for the first time to study the biodistribution of magnetoliposomes, formed with the use of magnetite nanoparticles (Fe_3O_4), in a murine tumor and the organs of Lewis carcinoma-bearing mice in the absence and presence of an external magnetic field. Animals from the experimental group after intravenous injection of 7.56 mg/kg of magnetoliposomes the tumor area were subjected to an external magnetic field with a flux density of 0.6 T. Electron spin resonance spectra analysis of mice organs and tissues samples has shown that exposure to a magnetic field results in a two-fold increase in Fe_3O_4 accumulation within the tumor ($p < 0.05$) as compared to control. These findings suggest that magnetoliposomes can be used as a magnetic-targeted carriers for antitumor drug delivery. SPIONs a high concentration was found in the liver in the absence and presence of the external magnetic field. Differences in the accumulation of Fe_3O in the lung and liver tissues in the presence of a magnetic field are not statistically significant.

Keywords: ESR, magnetite nanoparticles, SPIONs, MLP, magnetic field, biodistribution, Lewis carcinoma