

УДК 541.64 57.083 535.015

НАНОКРИСТАЛЛЫ С АНТИСТОКСОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЕЙ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИСИАЛОВОЙ КИСЛОТОЙ, ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ *IN VIVO*

© 2021 г. П. А. Демина^{1,2,*}, Н. В. Шолина^{2,3}, Р. А. Акасов^{1,2,3}, Д. А. Хоченков⁴, А. В. Нечаев⁵, И. В. Балалаева⁶, Е. В. Хайдуков^{1,2,3}, А. Н. Генералова^{1,2}, академик РАН С. М. Деев¹

Поступило 13.10.2020 г.

После доработки 30.11.2020 г.

Принято к публикации 30.11.2020 г.

Нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией (НАФ) являются перспективной платформой для создания биореагентов при *in vivo* визуализации под действием ближнего инфракрасного излучения, способного проникать глубоко в биоткани, сохраняя высокое соотношение сигнал/шум. В случае визуализации солидных опухолей необходима биофункционализация поверхности НАФ, обеспечивающая длительное время циркуляции наночастиц наряду с биосовместимостью, нетоксичностью. Это определяет эффективное накопление НАФ в опухоли за счет нарушенной архитектуры сосудистой сетки и лимфодренажа. В данной работе впервые представлен подход к биофункционализации НАФ с использованием эндогенной полисиаловой кислоты и создания реагентов, отвечающих требованиям для *in vivo* исследований. Реагенты характеризовались низким уровнем неспецифической адсорбции белков и захвата макрофагами, что позволило увеличить время циркуляции в кровотоке малых животных до 3 ч и регистрировать интенсивный фотолюминесцентный сигнал в опухоли.

Ключевые слова: апконвертирующие нанофосфоры, биовизуализация, функционализация поверхности, полисиаловая кислота

DOI: 10.31857/S2686738921020062

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время основные тенденции развития медицины связаны с разработкой персонализированного подхода к диагностике и терапии. Для решения этих задач значительные перспективы имеют методы, основанные на применении наночастиц, выступающих в качестве наноформы для создания мультимодальных реаген-

тов. В качестве таких наночастиц большой интерес представляют неорганические нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией (НАФ), для активации которой используют ближний ИК-свет, что позволяет реализовать визуализацию солидных опухолей [1]. При этом биофункционализация поверхности НАФ отвечает за формат проведения биоанализа, например, в виде пассивной, адресной или магнитоуправляемой (в случае функционализации магнитными наночастицами) доставки [2]. Для эффективного накопления НАФ в солидных опухолях необходимо решить задачу их длительной циркуляции в кровотоке, что связано с созданием биосовместимой нетоксичной поверхности, предотвращающей агрегацию наночастиц, в частности, протекающую через образование комплексов с белками крови, а также не вызывающей иммунного ответа. В этом случае НАФ могут быть доставлены в опухоль за счет пассивного механизма, основанного на эффекте повышенной проницаемости и удержания наночастиц в сосудах (EPR-эффекта), связанного с гиперваскуляризацией и нарушением лимфодренажа в опухоли [3]. Такая биофункционализация поверхности НАФ может быть реализована

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

² ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России, Москва, Россия

⁵ РТУ МИРЭА; Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ ФГАОУ ВО “Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского”, Нижний Новгород, Россия

*e-mail: Polidemina1207@yandex.ru

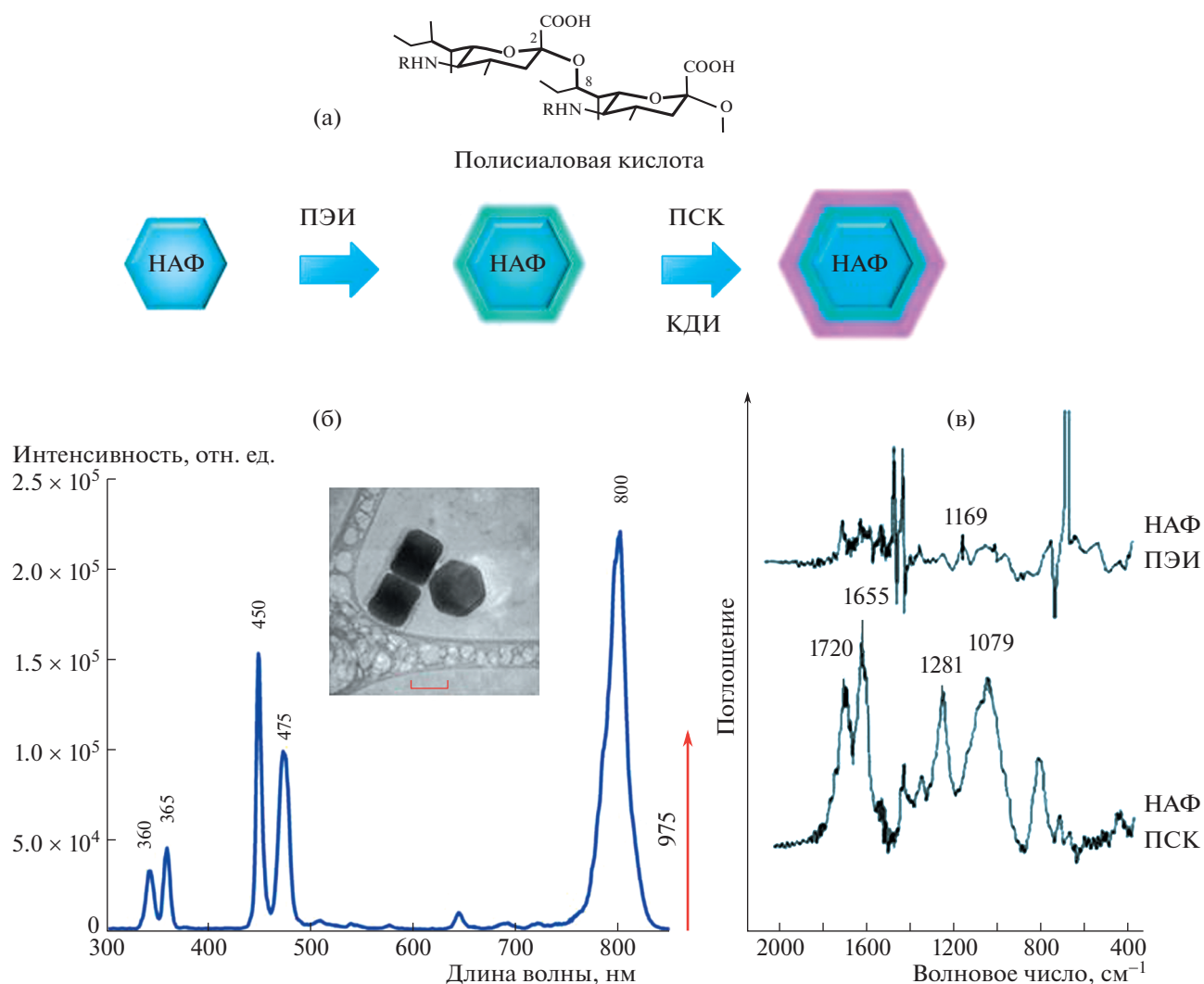


Рис. 1. (а) Структурная формула полисиаловой кислоты и схема модификации НАФ с использованием ПСК; (б) Спектр фотолюминесценции НАФ при длине волны возбуждения 975 нм и НАФ, шкала 50 нм; (в) ИК-Фурье спектры после модификации НАФ ПЭИ (сверху) и ПСК (снизу).

при использовании эндогенного полимера, в качестве которого в данной работе выбрали полисиаловую кислоту (ПСК). ПСК представляет собой высокогидрофильный неиммуногенный, нетоксичный гомополимер α -2,8 5-N-ацетилнейраминной кислоты, деградирующий под действием нейраминидазы до биосовместимой сиаловой кислоты [4]. В водной среде ПСК существует в виде ассоциатов с молекулами воды, что существенно снижает адсорбцию белков крови и, как результат, увеличивает время циркуляции наночастиц в кровеносной системе [5]. Например, получение конъюгатов ПСК с белками позволило получить препараты с улучшенной фармакокинетикой, что было продемонстрировано в работе [6].

Целью данной работы является разработка метода биофункционализации НАФ с использованием ПСК, обеспечивающего создание фотолю-

минесцентных биореагентов для визуализации солидных опухолей *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

НАФ со структурой ядро/оболочка ($\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}@\text{NaYF}_4$), имеющие средний размер 90 ± 6 нм, были синтезированы при использовании описанного ранее сольвотермического метода [7]. Гидрофобную поверхность НАФ модифицировали ПСК в две стадии. Сначала гидрофилизировали поверхность при участии полиэтиленimina (ПЭИ) с использованием метода замены растворителя. Для этого НАФ, диспергированные в хлороформе, смешивали с раствором ПЭИ в том же растворителе. Смесь выдерживали при перемешивании в течение часа для адсорбции полимера на поверхности, после чего по каплям добавляли

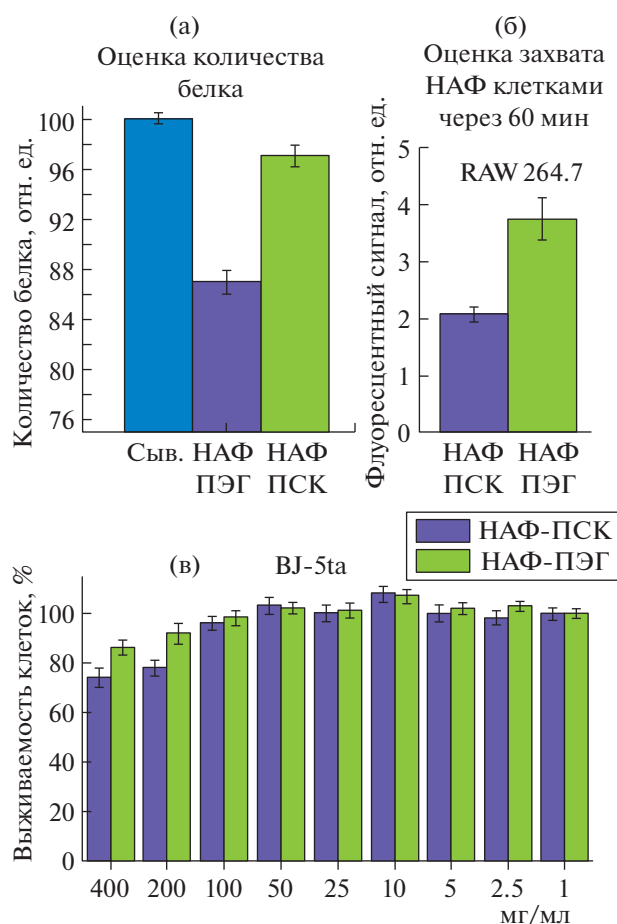


Рис. 2. (а) Количество белка в надосадочной жидкости после инкубации образцов НАФ в сыворотке: НАФ-ПЭГ, НАФ-ПСК, контроль – чистая сыворотка; (б) Нормированный флуоресцентный сигнал НАФ-ПСК и НАФ-ПЭГ, накопленных в клетках макрофагов мыши RAW 264.7; (в) Выживаемость фибробластов кожи человека BJ-5ta после 72 ч инкубации с наночастицами НАФ-ПЭГ и НАФ-ПСК.

в воду при ультразвуковой обработке. После испарения растворителя получали водную дисперсию наночастиц, модифицированных ПЭИ с аминогруппами на поверхности и имеющих дзета-потенциал +42 мВ [8]. На втором этапе проводили модификацию НАФ полисиаловой кислотой за счет формирования ковалентной связи между аминогруппой ПЭИ и карбоксильной группой кислоты с использованием метода карбодиимидной активации (рис. 1а). В результате модификации получали коллоидно-стабильные в буферных растворах наноконплексы НАФ-ПСК (дзета-потенциал –32 мВ), сохраняющие агрегативную устойчивость в течение 2 мес. Наличие ПСК на поверхности НАФ было подтверждено ИК-Фурье спектроскопией по появлению основных характеристических пиков ПСА в области 1079, 1281, 1655, 1720 см⁻¹ (рис. 1в).

Эффективное накопление НАФ в солидной опухоли зависит от времени их циркуляции в кровотоке, что непосредственно связано с адсорбцией белков крови. Неспецифическую адсорбцию оценивали по содержанию белков в надосадочной жидкости (по методу Брэдфорда) после центрифугирования образцов, предварительно проинкубированных в растворе сыворотки крови мыши (1 ч, 37°C). Высокая концентрация белка в надосадочной жидкости свидетельствовала о незначительном количестве белка, адсорбированного на поверхности НАФ (рис. 2а).

Это позволило сделать вывод, что покрытие из ПСК в сравнении с полиэтиленгликолем (ПЭГ), признанным лидером среди полимеров-модификаторов для *in vivo* исследований [9], в значительной мере предохраняет от образования “белковой короны”, которая может приводить к агрегации НАФ и их быстрому выводу из кровотока.

При получении реагентов для *in vivo* исследований необходимо также, чтобы НАФ были “невидимы” для клеток в кровотоке, в частности, не вызывали фагоцитарной активности. Оценка уровня захвата НАФ-ПСА клетками проводили на линии макрофагов мыши RAW 264.7 в сравнении с НАФ, модифицированных ПЭГ (рис. 2б), с помощью проточной цитометрии, предварительно включив краситель родамин В в состав наноконплексов. Следует отметить, что НАФ-ПСК в меньшей степени накапливаются в клетках, т.е. их уровень захвата фагоцитами ниже.

Оценка хронической токсичности НАФ-ПСК показала, что начиная от концентрации 100 мг/мл, наблюдается почти 100% выживаемость фибробластов кожи человека BJ-5ta после 72 ч инкубации (рис. 2в), что сравнимо с цитотоксическими свойствами НАФ-ПЭГ.

Был проведен анализ времени циркуляции НАФ-ПСК в сравнении с НАФ-ПЭГ после внутривенной инъекции мышам Balb/c путем подсчета наночастиц в пробах крови (рис 3а, б). Полученные данные позволяют сделать вывод о почти трехкратном увеличении продолжительности циркуляции по сравнению с ПЭГ–модифицированными НАФ, для которых время циркуляции не превышает 1 ч.

Значительное увеличение времени циркуляции наночастиц в кровотоке способствует эффективному накоплению наночастиц в солидной опухоли за счет EPR-эффекта. Распределение сигнала от НАФ-ПСК в организме мыши с перивитой карциномой легкого Льюиса после введения НАФ-ПСК в ретроорбитальный синус мыши регистрировалось системой эпилюминесцентной визуализации, разработанной во ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН [10]. Фотолуминесцентный сигнал в опухоли появлялся через 1 мин после инъекции, через 2–4 мин наблюда-

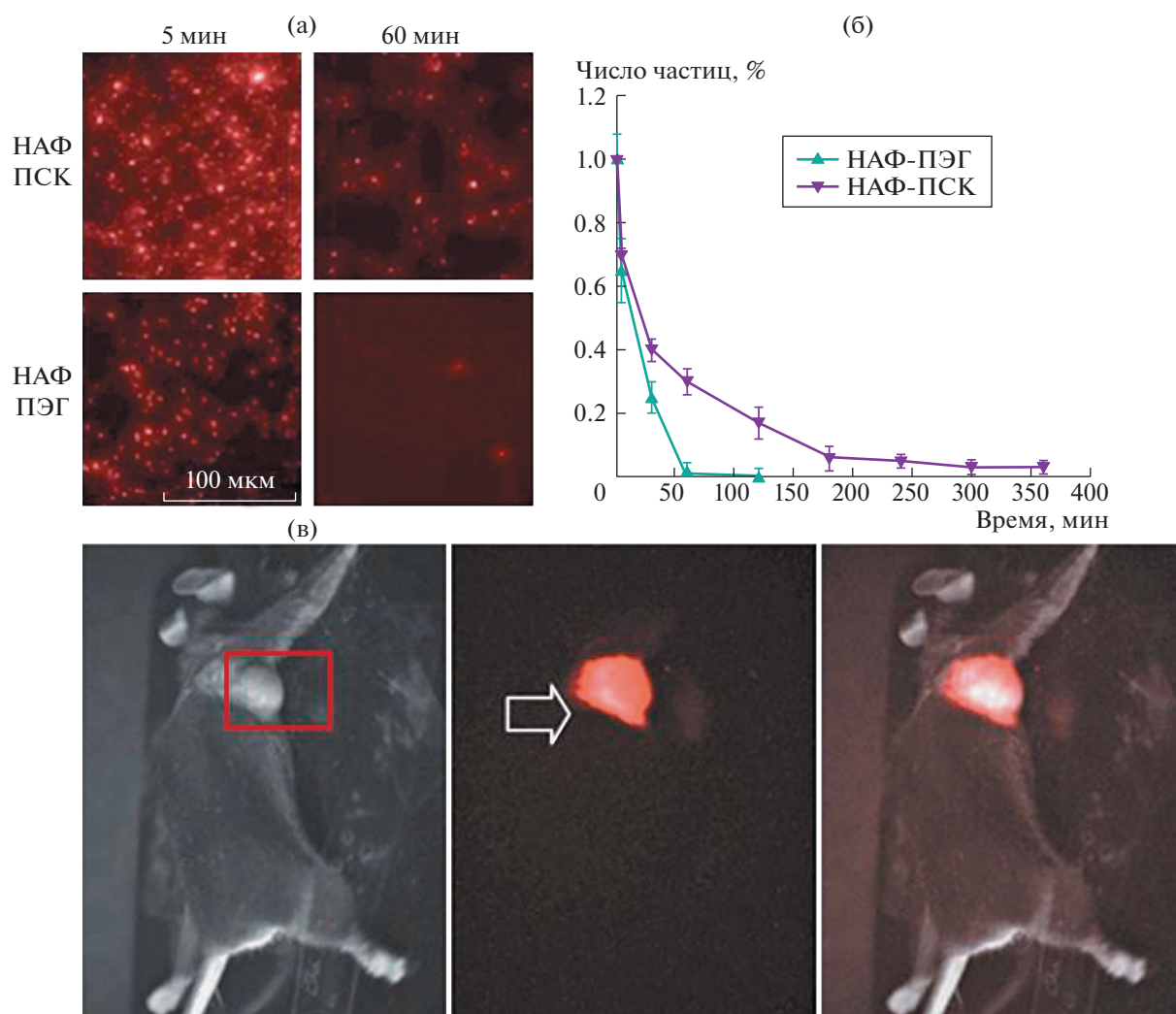


Рис. 3. (а) Фотолюминесцентные изображения образцов крови мыши, взятых с интервалами времени 5 и 60 мин после внутривенной инъекции НАФ-ПЭГ и НАФ-ПСК; (б) Зависимость количества НАФ-ПЭГ и НАФ-ПСК в кровотоке от времени циркуляции наночастиц; (в) *In vivo* изображения мыши Balb/c через 1 ч после введения НАФ-ПСК: левое – светлопольное, центральное – флуоресцентное и правое – наложение изображений.

лось небольшое ослабление сигнала, что связано с частичным выведением наночастиц из кровотока и перераспределением НАФ-ПСК в органах. Максимальный сигнал был достигнут через 1 ч после введения (рис. 3в). Фотолюминесценция НАФ-ПСК в опухоли сохранялась в течение 10 дней.

ВЫВОДЫ

Разработан метод биофункционализации НАФ с использованием полисиаловой кислоты, который позволил получить биореагенты, характеризующиеся низкой адсорбцией белков крови, незначительным захватом макрофагами и низкой цитотоксичностью. Применение ПСК для биофункционализации НАФ привело к увеличению времени циркуляции полученных биореагентов в кровеносной системе до 3 ч, что лежит в основе

эффективной доставки и накопления НАФ в опухоли за счет EPR-эффекта. Таким образом, наноконструкции НАФ-ПСК имеют большой потенциал для использования в качестве агентов биовизуализации, а также носителей для доставки лекарственных препаратов. Предлагаемый метод биофункционализации поверхности с использованием полисиаловой кислоты может быть реализован для различных наночастиц, таких как квантовые точки, магнитные, плазмонные и т.д., для биовизуализации, доставки лекарств и фотосенсибилизаторов в опухоль.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00122 КОМФИ (17-00-00118, 17-00-00119, 17-00-00121).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen G. et al.* Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics // *Chemical Reviews*. 2014. V. 114. P. 5161–5214. <https://doi.org/10.1021/cr400425h>
2. *Generalova A.N., Chichkov B.N., Khaydukov E. V.* Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017. V. 245. P. 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.006>
3. *Matsumura Y., Maeda H.* A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs // *Cancer Research*. 1986. V. 46. P. 6387 – 6392.
4. *Gregoriadis G. et al.* Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids. // *International Journal of Pharmaceutics*. 2005. V. 300. P. 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.06.007>
5. *Rutishauser U.* Polysialic acid at the cell surface: Biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity // *Journal of Cellular Biochemistry*. 1998. V. 70. P. 304–312. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19980901\)70:3<304::AID-JCB3>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19980901)70:3<304::AID-JCB3>3.0.CO;2-R)
6. *Ilyushin D.G. et al.* Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. V. 110. P. 1243–1248. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211181110>
7. *Alyatkin S. et al.* The influence of energy migration on luminescence kinetics parameters in upconversion nanoparticles. // *Nanotechnology*. 2017. V. 28. P. 035401. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/28/3/035401>
8. *Demina P.A. et al.* A versatile platform for bioimaging based on colominic acid-decorated upconversion nanoparticles // *Biomaterials science*. 2020. V. 8. P. 4570–4580. <https://doi.org/10.1039/D0BM00876A>
9. *Alexis F. et al.* Factors affecting the clearance and bio-distribution of polymeric nanoparticles. // *Molecular Pharmaceutics*. 2008. V. 5. P. 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
10. *Khaydukov E. V et al.* Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. P. 35103. <https://doi.org/10.1038/srep35103>

UPCONVERSION NANOPARTICLES DECORATED WITH POLYSIALIC ACID, FOR SOLID TUMORS VISUALIZATION *IN VIVO*

P. A. Demina^{a,c,#}, N. V. Sholina^{b,c}, R. A. Akasov^{a,b,c}, D. A. Khochenkov^d, A. V. Nechaev^e, I. V. Balalaeva^f, E. V. Khaydukov^c, A. N. Generalova^{a,c}, and Academician of the RAS S. M. Deev^a

^a Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

^c Federal Scientific Research Center “Crystallography and Photonics” Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d FSBSI “N.N. Blokhin National medical research center for oncology” of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^e MTU Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russian Federation

^f Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

[#]e-mail: polidemina1207@yandex.ru

Upconversion nanoparticles (UCNPs) are a promising nanopatform for bioreagents formation for *in vivo* imaging which emit UV and blue light under the action of near-infrared radiation, providing deep tissues penetration and maintaining a high signal-to-noise ratio. In the case of solid tumors visualization, the UCNP surface functionalization is required to ensure a long circulation time, biocompatibility, non-toxicity. The effective UCNP accumulation in the solid tumors is determined by the disturbed architecture of the vascular network and lymphatic drainage. This work demonstrates an approach for the UCNP biofunctionalization with endogenous polysialic acid for *in vivo* bioreagent formation. Bioreagents possess a low level of nonspecific protein adsorption and macrophage uptake, which allow the prolongation of the circulation time in the bloodstream up to 3 hours. This leads to an intense photoluminescent signal in the tumor.

Keywords: upconversion nanoparticles, biovisualization, surface functionalization, polysialic acid