

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ МАГНЕТИТ, С ЭРИТРОЦИТАМИ И ЛИМФОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

**Е. В. Шилова¹, И. А. Колтаков¹, О. В. Путинцева¹, М. А. Наквасина¹,
Л. С. Свекло², Л. О. Соколова¹, В. Г. Артюхов¹**

1. ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

2. Филиал БСМП ВО «Воронежская областная станция переливания крови»

Поступила в редакцию 11.01.2023 г.

Аннотация. Развитие биомедицинской науки и биотехнологий привело к разработке новых средств упаковки и доставки лекарственных веществ, например, липосом, и других нанокапсул. Липосомальные системы широко применяются в медицине, фармацевтике и косметологии в качестве систем доставки путём трансдермального, перорального, парентерального введения в организм некоторых лекарственных препаратов. Липосомы, содержащие магнитовосприимчивые компоненты, являются перспективным средством тераностики, которые могут использоваться одновременно для адресной доставки лекарственных веществ и как контрастирующее вещество при проведении магнитно-резонансной томографии. В качестве магнитоуправляемого компонента перспективным являются соединения на основе железа, так как они обладают большой магнитовосприимчивостью и низкой токсичностью. В ходе данной работы было исследовано взаимодействие синтезированных магнетита (Fe_3O_4) и липосом, содержащих магнетит в своём составе, с клетками крови человека. С помощью метода динамического рассеяния света было показано, что синтезированные магнитоллипосомы имели размер 170.3 ± 44.7 нм. Эритроциты и лимфоциты крови человека инкубировали с наночастицами магнетита (1 мг нч на 2 млн клеток) и магнитоллипосомами (100 липосом на клетку) в течение 1 часа. Были получены изображения эритроцитов после взаимодействия с магнетитом и липосомами, содержащими магнетит, с помощью просвечивающей электронной и световой микроскопии. Было показано, что инкубация с наночастицами вызывает изменение цитоархитектоники клеток, что проявляется в появлении деформируемых форм эритроцитов. Исследования на лимфоцитах проводили с использованием красителя MitoTracker RED. Было показано, что магнетит в применяемой концентрации приводит к деполяризации митохондриальной мембраны, а при воздействии магнитоллипосом данный эффект не обнаруживается. Таким образом, инкапсуляция магнетита в липосомы способствует снижению рисков его повреждающего действия на биообъекты.

Ключевые слова: эритроциты, лимфоциты, магнетит, магнитоллипосомы, наночастицы

Липосомальные частицы обладают рядом преимуществ, такими как биосовместимость, пониженная токсичность и стабильность, что делает возможным их использование для инкапсуляции магнитных наночастиц [1]. Такие структуры, названные магнитоллипосомами, были впервые описаны в 1980-х годах Kiwada et al. (1986) [2] и с тех пор активно изучались как транспортная система для агентов, используемых как в диагностике, так и в терапии. В качестве носителей лекарственных препаратов магнитоллипосомы обладают превосходной биосовместимостью и амфифильными свойствами: при изменении условий их синтеза легко до-

биться желаемого изменения размера частиц. Потенциальные сферы применения магнитоллипосом довольно обширны. Например, магнитоллипосомы можно модифицировать для связывания с иммуноглобулинами G и E и использовать для диагностики реакций гиперчувствительности у пациентов с респираторными аллергиями. Они часто используются в качестве контрастных веществ в МРТ [3]. Для повышения специфичности их обрабатывают антителами против лигандов, экспрессируемых на поверхности клеток-мишеней, которые не экспрессируются на здоровых клетках. Чтобы продлить циркуляцию в крови и избежать поглощения ретикулоэндотелиальной системой, магнитоллипосомы покрывают полиэтиленгликолем, чтобы предотвратить опсонизацию и элиминацию макрофагами,

© Шилова Е. В., Колтаков И. А., Путинцева О. В., Наквасина М. А., Свекло Л. С., Соколова Л. О., Артюхов В. Г., 2023

что делает их своего рода липосомами-невидимками (Stealth – липосомы). Экструдированные магнитолипосомы предпочтительны для транспорта полярных препаратов, которые легко инкапсулируются в их водной полости. Одним из преимуществ магнитолипосом как транспортных систем является их способность накапливаться в тканях, как пассивно, так и под воздействием внешних магнитных полей к месту-мишени [4, 5]. В качестве магнитоуправляемого компонента магнитовосприимчивых липосом наиболее перспективным является магнетит (Fe_3O_4). Ферромагнитные наночастицы оксида железа, используемые при изготовлении магнитолипосом, имеют диаметр менее 50 нм и должны быть покрыты пептидами или другими молекулами, чтобы избежать их агрегации и получить устойчивые водные суспензии [6 - 12].

Вопрос о взаимодействии частиц магнетита с эритроцитами до конца не изучен. Они могут поступать внутрь эритроцитов за счет пассивной диффузии или опосредованного рецепторами эндоцитоза [13, 14]. В исследовании [15] во всех обработанных образцах крови авторы наблюдали наночастицы, встроенные в мембрану и наночастицы в строении эритроцитов, что свидетельствует о том, что механизм взаимодействия наночастиц с эритроцитами включает жидкофазный эндоцитоз. Исследования, касающиеся понимания параметров, управляющих этим процессом поглощения наночастиц, в настоящее время получают дальнейшее развитие.

Наночастицы как средства адресной доставки лекарств предполагают преимущественно парентеральный путь их введения (минуя желудочно-кишечный тракт), при этом наиболее часто используется внутрисосудистый способ введения наночастиц в организм [16, 17]. В случае предполагаемого внутрисосудистого введения МНЧ необходимо всесторонне исследовать на уровне *in vitro* механизмы их взаимодействия с системой крови, а также их влияние на функциональную активность эндотелия.

Целью данной работы явилось выявление основных эффектов, оказываемых магнитовосприимчивыми липосомами на эритроциты и лимфоциты крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения эритроцитов кровь смешивали с физиологическим раствором в соотношении 1:1 и осаждали клетки на центрифуге MPW-340 в течение 10 минут при 3000 об/мин. Плазму и верхний слой лейкоцитов собирали. Эритроциты трижды промывали физиологическим раствором.

Для синтеза липосом использовали раствор липидов в этиловом спирте [18]. Раствор фосфатидилхолина (Sigma) (0.5%) и холестерина (Sigma) (0.5%) выпаривали на роторном испарителе IKA Control. В результате на дне колбы получали пленку липидов. Далее к липидной пленке добавляли 0.1 М натрий – фосфатный буфер, содержащий в своем составе наночастицы магнетита (в конц. 1 мг/мл), покрытые цетилтриметиламмония бромидом. Перемешивали в течение минуты, осуществляя самосборку липосом. Стандартизацию размеров липосом проводили с помощью ультразвукового дезинтегратора Q Sonica Sonicators (22 кГц, 15 минут, 10 секундный импульс с перерывом 3 секунды).

Размеры синтезированных липосом измеряли с помощью метода динамического рассеяния света на анализаторе размеров частиц Zetasizer Nano ZSP.

Выделенные эритроциты инкубировали с наночастицами магнетита (1 мг нч на 2 млн клеток) и магнитолипосомами (100 липосом на клетку) в течение 1 часа. Затем осаждали эритроциты и готовили образцы для сканирующей электронной микроскопии.

Поверхностную архитектуру эритроцитов крови доноров изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380 LV JEOL (Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

Лимфоциты выделяли из цельной крови на градиенте плотности фикоколл-урографина ($\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$). Выделенные лимфоциты инкубировали с частицами в тех же соотношениях, что и в эксперименте с эритроцитами. После этого клетки окрашивали флуоресцентным красителем Mitotracker Red, выделяли митохондрии. Регистрировали спектр флуоресценции красителя на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 в диапазоне 600-700 нм с возбуждением при 577 нм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью Microsoft Excel 2010. Результаты исследований представлены в виде среднеарифметического и стандартного отклонения ($M \pm Sd$). Достоверность различий контрольных и опытных величин устанавливали с использованием t-критерия Стьюдента ($p < 0.05$) [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом динамического рассеяния света было установлено, что гидродинамический диаметр липосомальных частиц, содержащих в своём составе магнетит, составил $170.3 \pm 44.7 \text{ нм}$ (Рис. 1).

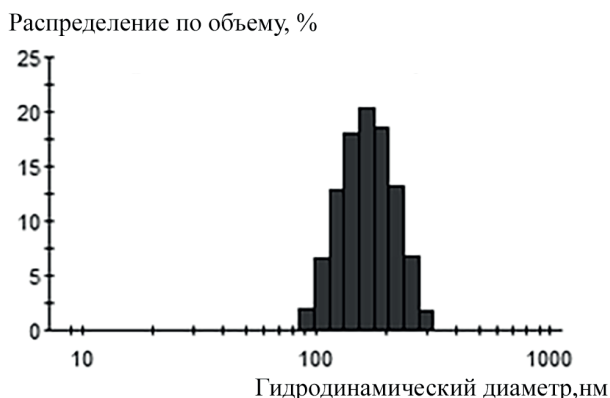


Рис. 1. Распределение синтезированных липосом по размеру

В условиях применения магнитолипосом могут происходить нарушения структурного состояния плазматических мембран клеток. В этой связи были исследованы изменения поверхностной архитектуры эритроцитов, модифицированных магнетитом и магнитолипосомами. На рисунке 2 приведены изображения эритроцитов после воздействия наночастиц, полученные с помощью методов просвечивающей электронной и световой микроскопии.

На микрофотографиях видно, что в образцах немодифицированных эритроцитов наблюдаются клетки двояковогнутой формы. После воздействия наночастиц на эритроциты (рис. 2) в течение 30 минут в исследуемых образцах, согласно классификации Г.И. Козинца и соавт. [20], выявляются как нормальные, так и измененные формы клеток: отдельные дискоциты, отдельные эхиноциты («шиповидные» клетки) и, в основном, необратимо деформированные сфероциты.

Воздействие на клеточную мембрану может приводить к ряду каскадных реакций, конечным звеном которых могут являться различные структуры, в том числе митохондрии. В связи с этим нами были проведены исследования по изучению возможной деполяризации митохондриальной мембраны с помощью флуоресцентного метода. Флуоресцентный краситель хлорметил-*X*-розамин (MitoTracker RED) относится к органическим красителям, пик флуоресценции у которых находится в красной области спектра аналогично флуорохромам TRITC или Alexa Fluor 568. Данный краситель способен проходить через клеточную мембрану и специфически накапливается в митохондриях в зависимости от потенциала на их внутренней мембране (Poot, Zhangetal. 1996) (Agnello, Moricietal. 2008). Такой механизм накопления позволяет использовать этот краситель в качестве индикатора деполяризации митохондриальной мембраны, так

как деполяризация приводит к снижению накопления красителя и, соответственно, снижению интенсивности флуоресценции.

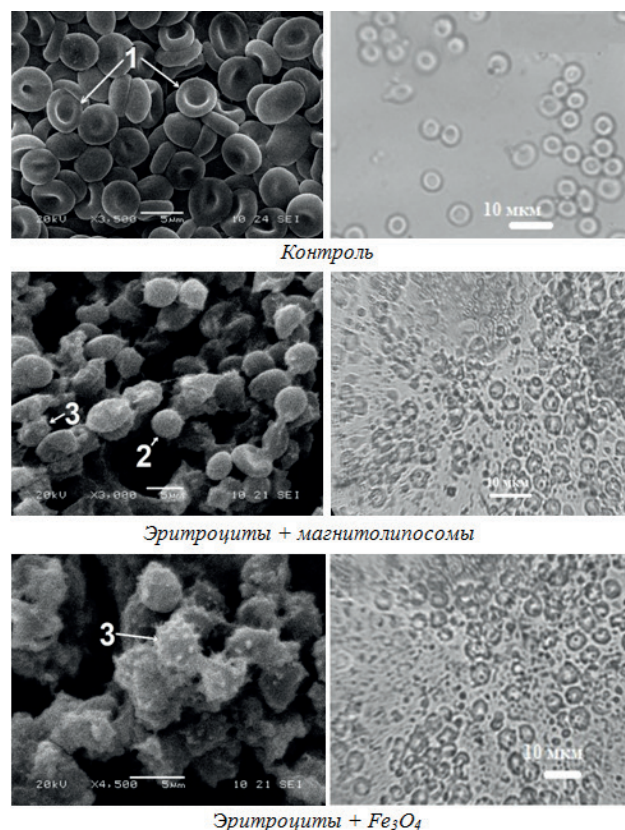


Рис. 2. Изображения эритроцитов, полученные с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (левый столбец) и световой микроскопии (правый столбец); 1 - дискоцит, 2 - сфероцит, 3 - эхиноцит

Интенсивность флуоресценции митохондрий нативных лимфоцитов составила 5.9 ± 0.4 отн.ед., митохондрий после инкубации клеток с магнетитом – 4.5 ± 0.5 отн.ед., после инкубации магнитолипосом – 5.3 ± 0.2 отн.ед. (рис. 3). Таким образом, из полученных данных следует, что мишенью частиц магнетита также могут быть митохондрии клеток крови. Имобилизация магнетита в состав липосомальных частиц приводит к нивелированию данного воздействия.

Таким образом, нами были зарегистрированы некоторые эффекты воздействия магнетита и содержащих его липосом на эритроциты и лимфоциты крови человека. Было установлено, что магнетит влияет на мембраны эритроцитарных клеток, способствуя образованию сфероцитов и эхиноцитов. Также в результате воздействия магнетита происходит снижение накопления красителя MitoTracker RED в митохондриях, что, вероятно, говорит о деполяризации мембран митохондрий

лимфоцитов; данный эффект не наблюдается в случае инкапсуляции магнетита в липосомы.

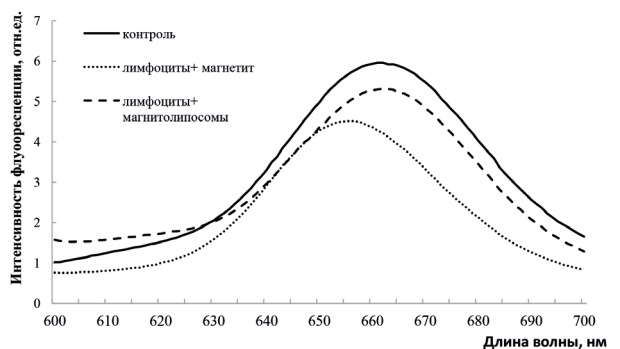


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции красителя MitoTracker RED в присутствии митохондрией лимфоцитов крови человека

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование воздействия наночастиц магнетита на различных уровнях в организме и выявление мишеней данного воздействия являются предметом нашего дальнейшего активного изучения и необходимым этапом при разработке систем для медицинского применения на их основе.

Работа выполнена за счет Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Garcia-Pinel B., Jabalera Y., Ortiz R., Cabeza L., Jimenez-Lopez C., Melguizo C., Prados J. // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. P. 589.
- Kiwada H., Sato J., Yamada S., Kato Y. // *Chem. Pharm. Bull.* 1986. V. 34. P. 4253–4258.
- Lorenzato C., Cernicanu A., Meyre M.-E., Germain M., Pottier A., Levy L., de Senneville B.D., Bos C., Moonen C., Smirnov P. // *Contrast Media Mol. Imaging*. 2013. V. 8. P. 185–192
- Rong Fu, Yuying Yan, Clive Roberts, Zeyu Liu and Yiyi Chen // *Scientific reports*. 2018 V. 8., № 4704. P. 1–10.

Воронежский государственный университет
Шилова Е.В., к.б.н., ассистент кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: zinkovae@list.ru

Колтаков И.А., к.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

5. Saxena S. K. et al. // *NanoBioMedicine*. 2020. P. 3-16.

6. Ahamed M., Alhadlaq H. A., Khan M. A., Karupiah P., Al-Dhabi N. A., Nanomater J. // *ACM DL*. 2014. P. 1-4.

7. Easo S. L., Mohanan P.V. // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 509. P. 28.

8. Ganapathe L. S. et al. // *Magnetochemistry*. 2020. V. 6. №. 4. P. 68.

9. Hasany F., Abdurahman H., Sunarti R., Jose R. // *Current nanoscience*. 2013. V. 9., P.561-575.

10. Lu A.H, Salabas E.L, Schuth A. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 1222-1244.

11. Rausch K., Reuter A., Fischer K., Schmidt M. // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11. P. 2836–2839.

12. Sashko N., Vaitulevich E., Yurmazova T. // *Key Engineering Materials: Scientific Journal*. 2016. V. 712. P. 282–287.

13. Мильто И.В., Михайлов Г.А., Ратькин А.В., Магаева А.А. // *Бюллетень сибирской медицины*. 2008. Вып. 1. С.32-36.

14. Плескова С.Н., Горностаева Е.Е., Крюков Р.Н., Боряков А.В., Зубков С.Ю. // *Цитология*. 2017. Т. 59. № 12, С. 874-880.

15. Soler M.A., Bao S.N., Alcantara G.B., et al. // *J Nanosci Nanotechnol*. 2007. V. 7(3). P. 1069-1071.

16. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles // *Small-journal*. 2008. V.4. P. 26–49

17. Ulbrich A. Z., Angarten V. G., Netto A. S., Sties S. W., Bundchen D. C., L. S. de Mara, Cornelissen V. A., de Carvalho T. // *Science in Cardiology*. 2016. V. 13. P. 21-28

18. Шилова Е.В., Колтаков И.А., Канькин С.В., Артюхов В.Г. // *Биофизика*. 2022. №1. С. 549-554

19. Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и образовании Учебник. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. 284 с.

20. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А., Боев С.Ф., Сазонов В.В. Клетки крови. Современные технологии их анализа. М.: Триада-Фарм, 2002. 200 с

Voronezh State University
Shilova E.V., PhD, assistant of Biophysics and biotechnology department
E-mail: zinkovae@list.ru

Koltakov I.A., PhD, Associate Professor of Biophysics and biotechnology department
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Шилова Е. В., Колтаков И. А., Путинцева О. В., Наквасина М. А., Свекло Л. С., Соколова Л. О., Артюхов В. Г.

Путинцева О.В., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, д.б.н.
E-mail: o.v.putintseva@gmail.com

Putintseva O.V., DSci., Full Professor of Biophysics and biotechnology department
E-mail: o.v.putintseva@gmail.com

Наквасина М.А., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, д.б.н.
E-mail: nakvasina_ma@mail.ru

Nakvasina M.A, DSci., Full Professor of Biophysics and biotechnology department
E-mail: nakvasina_ma@mail.ru

Соколова Л.О., аспирант кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Sokolova L.O., Postgraduate Student of Biophysics and biotechnology department
E-mail: lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Артюхов В.Г., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov V.G., DSci., Full Professor; Head of Biophysics and biotechnology department
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Воронежская областная станция переливания крови
Свекло Л.С., заведующая филиалом БСМП ВО
E-mail: sveklo@mail.ru

Voronezh Regional Blood Transfusion Station
Sveklo L.S., Head of the branch of the BSMP VO
E-mail: sveklo@mail.ru

INTERACTION OF LIPOSOMES CONTAINING MAGNETITE WITH HUMAN ERYTHROCYTES AND LYMPHOCYTES

E. V. Shilova¹, I. A. Koltakov¹, O. V. Putintseva¹, M. A. Nakvasina¹, L. S. Sveklo², L. O. Sokolova¹, V. G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University

²Branch of BSMP VO "Voronezh Regional Blood Transfusion Station"

Abstract. The development of biomedical science and biotechnology is developing new means of packaging and drug delivery, such as liposomes and other nanocapsules. Liposomal systems are widely used in medicine, pharmaceuticals and cosmetology as delivery systems through transdermal, oral, parenteral administration of certain drugs. Liposomes, which are part of the magnetically susceptible components, are a promising application of theranostics, which are identifying substances in the presence of magnetic resonance imaging. As a magnetically controlled component, promising compounds are the basis of iron, since they have magnetoacceptance and low toxicity. In the course of this work, the interaction of synthesized magnetite (Fe_3O_4) and liposomes containing magnetite in their composition with human blood cells was studied. Using the method of dynamic light scattering, it was shown that the synthesized magnetoliposomes have a size of 170.3 ± 44.7 nm. Human erythrocytes and lymphocytes are incubated with magnetite nanoparticles (1 mg NP per 2 million cells) and magnetoliposomes (100 liposomes per cell) for 1 hour. Images of erythrocytes were obtained after interaction with magnetite and liposomes, detection of magnetite, using transmission electron and light microscopy. It was found that incubation with nanoparticles causes a change in the cytoarchitectonics of cells, which manifests itself in a pronounced deformable formed erythrocytes. Lymphocyte studies were performed using the MitoTracker RED dye. It was found that magnetite causes suspicion of depolarization of the mitochondrial membrane, and under the action of magnetoliposomes, a non-detection effect occurs. Thus, the encapsulation of magnetite in its liposomes shows a significant risk of a damaging effect on biological objects.

Keywords: erythrocytes, lymphocytes, magnetite, magnetoliposomes, nanoparticles

REFERENCES

1. Garcia-Pinel B., Jabalera Y., Ortiz R., Cabeza L., Jimenez-Lopez C., Melguizo C., Prados J., *Pharmaceutics*, 2020, V. 12, P. 589.
2. Kiwada H., Sato J., Yamada S., Kato Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 1986, V. 34, P. 4253–4258.
3. Lorenzato C., Cernicanu A., Meyre M.-E., Germain M., Pottier A., Levy L., de Senneville B.D., Bos C., Moonen C., Smirnov P., *Contrast Media Mol. Imaging*, 2013, V. 8, P. 185–192
4. Rong Fu, Yuying Yan, Clive Roberts, Zeyu Liu and Yiyi Chen, *Scientific reports*, 2018, V. 8, № 4704, P. 1–10.
5. Saxena S. K. et al. , *NanoBioMedicine*, 2020, P. 3-16.
6. Ahamed M., Alhadlaq H. A., Khan M. A., Karuppiyah P., Al –Dhabi N. A., *Nanomater J., ACM DL*, 2014, P. 1-4.
7. Easo S. L., Mohanan P.V. , *Int. J. Pharm.*, 2016, Vol, 509, P. 28.
8. Ganapathe L. S. et al., *Magnetochemistry*, 2020, V. 6, №. 4, P. 68.
9. Hasany F., Abdurahman H., Sunarti R., Jose R., *Current nanoscience*, 2013, V. 9., P.561-575.
10. Lu A.H, Salabas E.L, Schuth A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, V. 46, P. 1222-1244.
11. Rausch K., Reuter A., Fischer K., Schmidt M., *Biomacromolecules*, 2010, V. 11, P. 2836–2839.
12. Sashko N., Vaitulevich E., Yurmazova T., *Key Engineering Materials: Scientific Journal*, 2016, V. 712, P. 282–287.
13. Мильто И. В., Михайлов Г. А., Раткин А. В., Магаева А. А., *Бюллетень сибирской медицины*, 2008, Вып. 1, С. 32-36.
14. Плескова С.Н., Горностаева Е.Е., Крюков Р.Н., Боряков А.В., Зубков С.Ю., *Цитология*, 2017, Т. 59, № 12, С. 874-880.
15. Soler M.A., Bão S.N., Alcântara G.B., et al., *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, V. 7(3), P. 1069-1071.
16. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles, *Small-journal*, 2008, V.4. P. 26 – 49
17. Ulbrich A. Z., Angarten V. G., Netto A. S., Sties S. W., Bündchen D. C., L. S. de Mara, Cornelissen V. A., de Carvalho T., *Science in Cardiology*, 2016, V. 13, P. 21-28
18. Shilova E.V., Koltakov I.A., Kannykin S.V., Artyuhov V.G., *Biofizika*, 2022, №1, P. 549-554
19. Kalaeva E.A., Artyuhov V.G., Kalaev V.N. *Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primeneniye matematicheskoy statistiki v biologicheskikh issledovaniyakh i obrazovanii Uchebnik. Voronezh: Izdatel'skij dom VGU*, 2016, 284 s.
20. Kozinec G.I., Pogorelov V.M., Shmarov D.A., Boev S.F., Sazonov V.V. *Kletki krovi. Sovremennyye tekhnologii ih analiza. M.: Triada-Farm*, 2002, 200 s