

ШАНВАР САМАХ

**Влияние покрытия альбумином на долговременную
коллоидную стабильность и цитотоксичность антистоксовых
нанофосфоров**

03.01.02 — Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2021

Работа выполнена на кафедре биофизики Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Гурьев Евгений Леонидович

Консультант: доктор физико-математических наук
Звягин Андрей Васильевич

Официальные оппоненты: **Кочубей Вячеслав Иванович**
доктор физико-математических наук
профессор кафедры оптики и биофотоники
института физики ФГБОУ ВО «Саратовский
национальный исследовательский государственный
университет им. Н.Г. Чернышевского»

Орлова Анна Геннадьевна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник лаборатории
биофотоники отдела радиофизических методов в
медицине ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр Институт прикладной физики Российской
академии наук»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО "Национальный исследовательский
Мордовский государственный университет
им. Н. П. Огарёва"

Защита диссертации состоится «__»_____2021 года в__ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.21 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2021/1120/diss-Shanvar-1120.pdf>

Автореферат разослан «__»_____2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Изучение возможности применения наночастиц в качестве тераностических агентов в настоящее время является активно развивающимся направлением биомедицины. Наночастицы представляют собой один из наиболее перспективных инструментов для диагностики, доставки лекарств и мониторинга терапевтического ответа. Наносистемы стремятся объединить достоинства наночастиц и эффективных фармацевтических препаратов, чтобы преодолеть их индивидуальные ограничения в биомедицинских применениях. Следовательно, эффективный комплекс на основе наночастиц должен быть биосовместимым, биоразлагаемым, невидимым для иммунной системы, коллоидно стабильным в биологических жидкостях и иметь длительное время циркуляции в кровотоке. Среди множества наночастиц, пригодных для применения в тераностике, антистоксовые нанофосфоры (НАФ) привлекают значительное внимание исследователей в течение последних двух десятилетий благодаря своим уникальным оптическим свойствам [Fan et al., 2016].

НАФ, получившие распространение в 1990-х годах, имеют широкие перспективы для имиджинга и доставки препаратов. Помимо нанометрового размера и биосовместимости, НАФ обладают уникальными оптическими свойствами, такими как возбуждение и эмиссия фотолюминесценции (ФЛ) в ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне, что обеспечивает глубокую визуализацию тканей и длительное время жизни ФЛ (0,1 – 1 мс), позволяющее избежать влияния автофлуоресценции тканей [Zheng et al., 2016]. За короткое время НАФ стали наиболее часто используемыми среди наночастиц для тераностических применений. Синтезированные НАФ проявляют липофильные свойства, склонность к агрегации делает их нестабильными в коллоидных растворах и затрудняет их применение. НАФ могут приобретать гидрофильность после модификации поверхности, например, с помощью методов обмена лигандов и покрытия полимерами.

При попадании наночастиц в биологические среды, на их поверхности быстро адсорбируются белки, формирующие динамический слой – так называемую белковую корону (БК). При этом изменяются физико-химические свойства наночастиц, такие как размер, заряд, склонность к агрегации и соответственно меняется взаимодействие наночастиц с биологическими объектами [Dominguez-Medina et al., 2016]. В последнее время появляются данные о возможности использования БК для стабилизации наночастиц, в частности БК, состоящей из молекул альбумина.

Альбумин является наиболее распространенным белковым компонентом крови человека. Покрытие наночастиц оболочкой из альбумина способствует сохранению их монодисперсности и коллоидной стабильности. В отличие от многих полимеров, альбумин является биосовместимым, биоразлагаемым, нетоксичным, неиммуногенным и способен к длительной циркуляции в кровотоке. Свойства альбумина делают его потенциальным стабилизатором для НАФ, так как он адсорбируется на поверхности наночастиц и формирует жесткую БК, прочно связанную с поверхностью наночастиц с помощью электростатических связей [An et al., 2017].

Таким образом, понимание взаимодействия наночастиц с биологическими системами является ключевым для их эффективного и безопасного применения. Исследование покрытия НАФ оболочкой из альбумина актуально с точки зрения создания стабильных и биосовместимых коллоидов. Не менее важно оценить влияние

оболочки из альбумина на формирование БК в крови и взаимодействие подобных комплексов с клетками организма.

Цели и задачи исследования

Целью работы было изучение формирования белковой короны на поверхности антистоксовых нанофосфоров и выявление ключевых факторов, определяющих формирование стабильных комплексов, покрытых белковой короной.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Исследовать формирование белковой короны из бычьего сывороточного альбумина (БСА) и термически денатурированного БСА (дБСА) вокруг НАФ, определить оптимальные концентрации БСА и дБСА для образования стабильной короны.
2. Исследовать долговременную коллоидную стабильность НАФ, покрытых тетрафторборатом нитрозония (НАФ-NOBF₄) и белковой короной из дБСА в различных буферах и биологических средах.
3. Изучить влияние белковой короны на эффективность адсорбции белков сыворотки на поверхности комплексов дБСА-НАФ-NOBF₄.
4. Исследовать цитотоксичность дБСА-НАФ-NOBF₄ в отношении клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3.

Научная новизна

Впервые показано, что белковая корона из термически денатурированного БСА (дБСА) обеспечивает лучшую дисперсность коллоидов по сравнению с нативным БСА.

Впервые исследована зависимость образования стабильной белковой короны от концентрации белка; оптимальные концентрации БСА и дБСА для образования стабильной белковой короны вокруг НАФ-NOBF₄ определены как 100 мкМ и 10 мкМ, соответственно.

Предложена новая методика стабилизации НАФ-NOBF₄ с помощью покрытия альбумином и лиофилизации, позволяющая получать комплексы, сохраняющие стабильность при их последующей солиubilизации в различных растворителях, в том числе в присутствии белков сыворотки.

Показано, что исходно сформированная белковая корона из дБСА на поверхности НАФ-NOBF₄ снижает дальнейшую нежелательную адсорбцию белков сыворотки и позволяет сохранить размер и коллоидную устойчивость комплексов.

Научно-практическая значимость

Полученные НАФ, покрытые NOBF₄, перспективны для биомедицинских применений благодаря их небольшому размеру, уникальным оптическим свойствам и биосовместимости. Определение оптимальных концентраций нативного и денатурированного БСА, позволяющих формировать стабильную белковую корону, дополняет текущее понимание феномена белковой короны и способствует разработке технологий получения стабилизированных белком наночастиц для биомедицинских применений. Предложенная новая технология, с использованием метода лиофилизации, позволяет получать стабильные коллоиды НАФ-NOBF₄, покрытых термически денатурированным БСА, которые представляются перспективной основой для создания тераностических агентов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Белковая корона из термически денатурированного БСА обеспечивает лучшую дисперсность коллоидов по сравнению с нативным БСА.

2. Для получения стабильных комплексов необходимо определение оптимальной концентрации белка в процессе образования белковой короны.
3. Проведение лиофилизации после формирования белковой короны из дБСА на поверхности наночастиц позволяет получать стабильные комплексы, устойчивые в сложных биологических средах.
4. Искусственно сформированная белковая корона препятствует адсорбции белков из биологической среды на поверхности наночастиц.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию полученных результатов. Совместно с соавторами автор принимал участие в подготовке научных статей и докладов на семинарах и конференциях.

Апробация

Основные результаты работы представлялись на международных и российских мероприятиях: Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Н. Новгород, 2018, 2019, 2020); Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века" (Пушино, 2019, 2020); Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические науки) (Н. Новгород, 2019); XIII Международной научно-практической конференции «PTSCIENCE» (Санкт-Петербург, 2020).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, включая 5 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список ВАК.

Структура и объем работы

Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, цитируемой литературы, списка сокращений. Объем составляет 114 страниц машинописного текста, иллюстрированного 46 рисунками и 6 таблицами. Список литературы включает 117 источников, в том числе 111 работ иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам: физико-химические свойства НАФ и их особенности в биологических применениях, введение наночастиц в организм и феномен белковой короны, доставка наночастиц в целевые ткани и эффект повышенной проницаемости и удержания (EPR-эффект), физико-химические свойства альбумина и его использование для стабилизации наночастиц.

В **главе 2** перечислены использованные в данной работе материалы и оборудование, описаны процедуры и методики исследований.

1. Материалы и клеточные культуры

Исследование проводилось на НАФ структуры ядро/оболочка состава $\text{NaY}_{0,794}\text{F}_4\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,006}/\text{NaYF}_4$ (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва), покрытых олеиновой кислотой (ОК) и NOBF_4 (Рис. 1А) (Sigma-Aldrich, США). Для формирования белковой короны был использован БСА (Sigma-Aldrich, США) (Рис. 1Б). Исследование цитотоксичности НАФ проводили с использованием культуры клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 (АТСС НТВ-77) (Рис. 2).

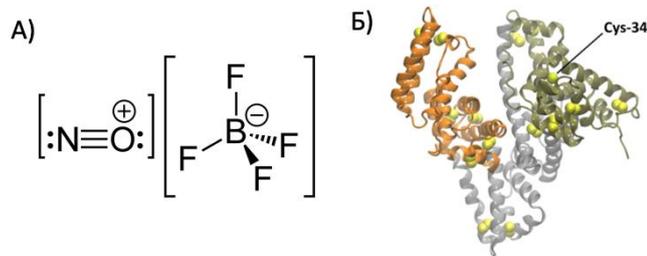


Рис. 1. А) Формула тетрафторбората нитрозония (NOBF₄); Б) Структура бычьего сывороточного альбумина (BSA).

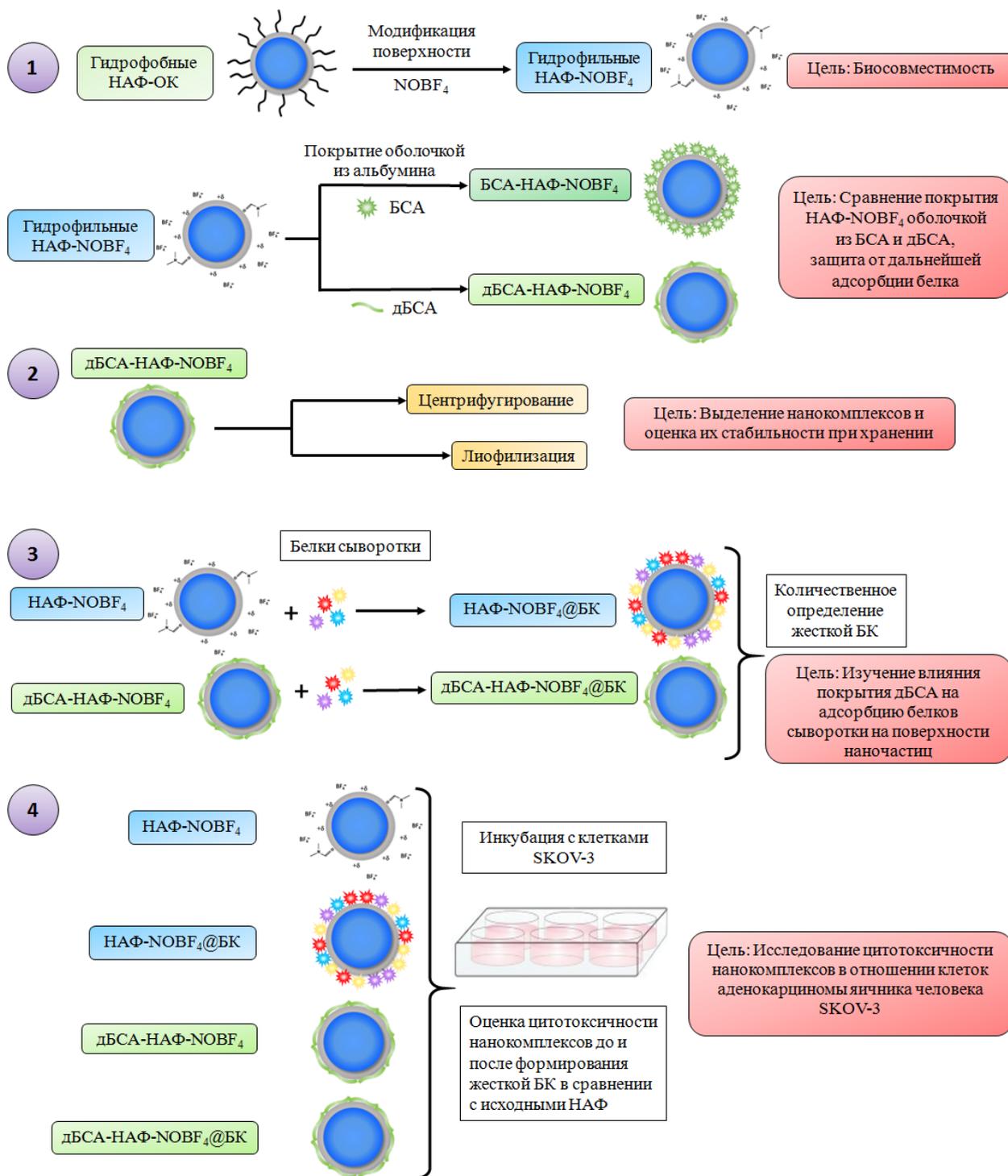


Рис. 2. Схема последовательного решения задач исследования.

2. Синтез и характеристика НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄

Гидрофобные НАФ-ОК синтезировали методом сольватотермического разложения. Затем проводили покрытие НАФ молекулами NOBF₄ методом обмена лигандов (Рис. 3). Полученные гидрофильные НАФ-NOBF₄ ресуспендировали в деионизированной воде.

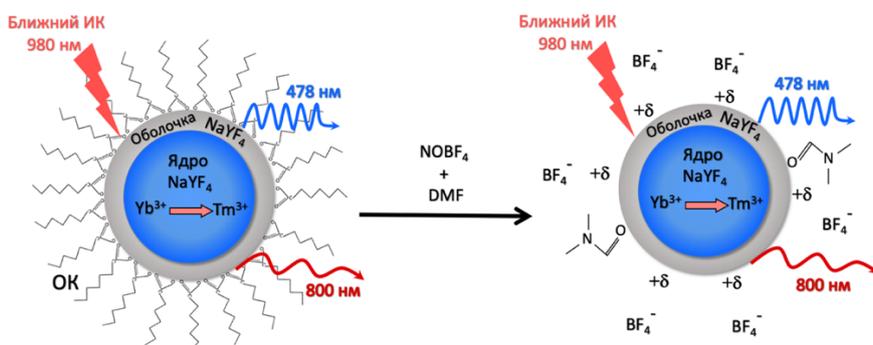


Рис. 3. Схема получения НАФ-NOBF₄ методом обмена лигандов.

Размер и форму частиц НАФ-ОК определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием микроскопа LEO-912 ABOMEGA (Carl Zeiss, Германия).

Измерение гидродинамического диаметра и определение ζ -потенциала НАФ проводили методом динамического рассеяния света (DLS) и электрофоретического рассеяния света (ELS) соответственно, с помощью системы Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) согласно рекомендациям производителя.

ФЛ свойства НАФ исследовали с использованием спектрофлуориметра SM 2203 (SOLAR, Беларусь) и внешнего полупроводникового лазерного модуля ATC-C4000-200AMF-980-5-F200 с длиной волны 980 нм (Полупроводниковые приборы, Россия). Измерения спектров эмиссии ФЛ проводили в диапазоне от 400 до 850 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см.

Инфракрасные спектры поглощения (FTIR) регистрировали с использованием инфракрасного спектрофотометра с преобразованием Фурье IRPrestige-21 (Shimadzu, Япония).

3. Оптимизация концентрации альбумина для формирования стабильной БК на поверхности НАФ-NOBF₄

Исходный раствор БСА готовили в деионизированной воде с последующей фильтрацией через мембранный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм) для удаления кластеризованных белков. Раствор дБСА, получали инкубацией раствора БСА в течение 30 мин при 70°C. Суспензию НАФ-NOBF₄ в деионизированной воде добавляли по каплям к раствору БСА и дБСА и перемешивали встряхиванием. Смеси инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре (25°C). Конечная концентрация НАФ-NOBF₄ составляла 0,25 мг/мл, концентрация БСА – 25 – 120 мкМ, концентрация дБСА – 5 – 50 мкМ (Рис. 4). Размер и ζ -потенциал каждого образца измеряли после 15 мин и 4 ч инкубации методами DLS и ELS, соответственно.

4. Осаждение дБСА-НАФ-NOBF₄ и оценка их коллоидной стабильности

После формирования БК для осаждения дБСА-НАФ-NOBF₄ использовали два подхода. Первый подход включал в себя центрифугирование при 10000 g в течение 7 мин, удаление супернатанта и ресуспендирование дБСА-НАФ-NOBF₄ в деионизированной воде. Коллоидную стабильность оценивали методами DLS и ELS.

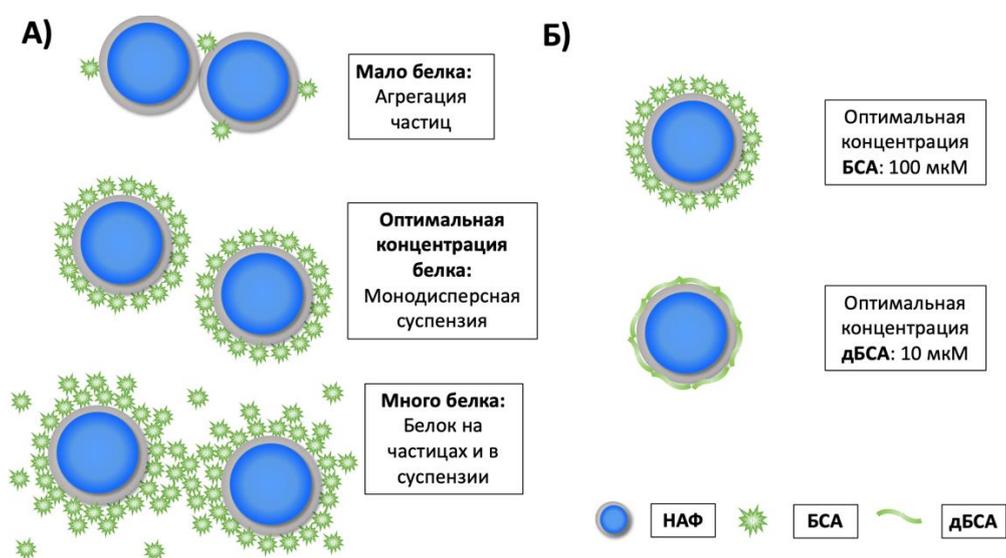


Рис. 4. А) Схема определения оптимальной концентрации альбумина для формирования стабильной БК на поверхности НАФ; Б) Предполагаемая структура стабильной БК из БСА и дБСА.

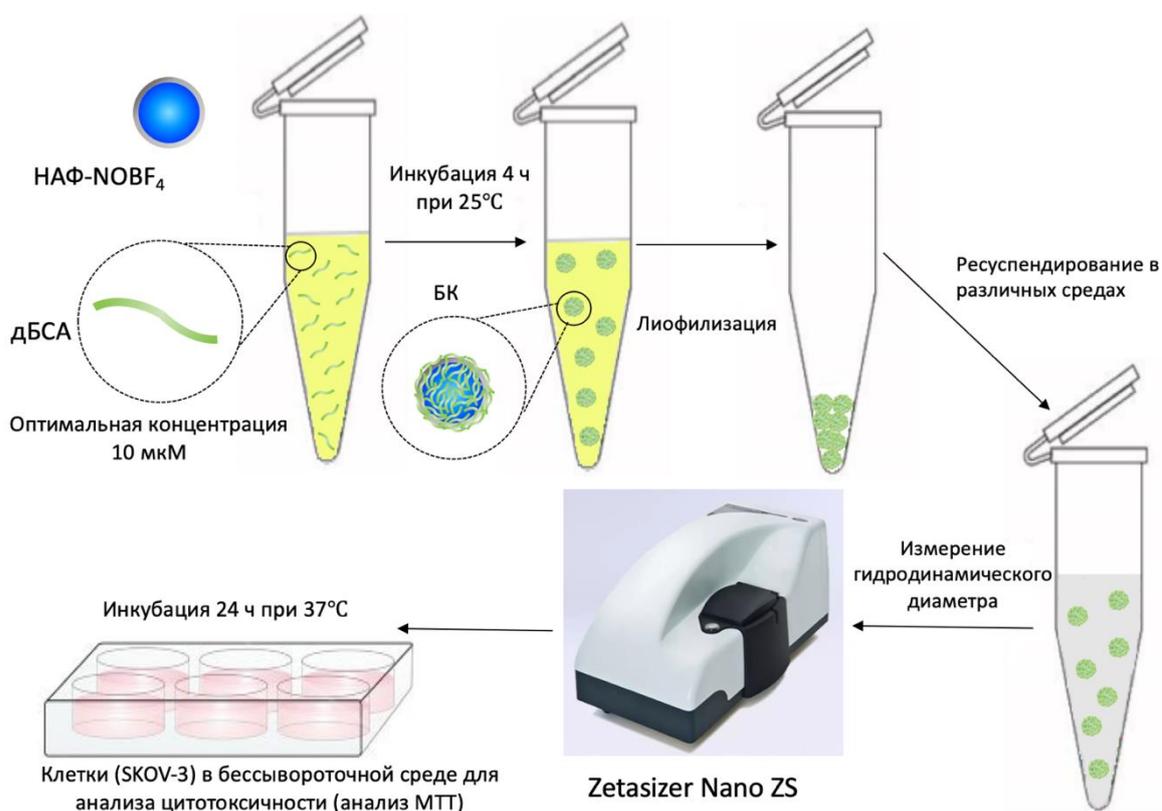


Рис. 5. Схема метода оценки коллоидной стабильности и цитотоксичности лиофилизованных дБСА-НАФ-NOBF₄.

При втором подходе дБСА-НАФ-NOBF₄ лиофилизовали с помощью установки FreeZone 6L (Labconco, США) и хранили при температуре 4°C (Рис. 5). Образцы ресуспендировали в различных буферах и клеточных культуральных средах с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США) (деионизированная вода, фосфатно-солевой буфер (PBS), DMEM (Панэко, Россия) с 10% FBS, McCoy's 5A (HyClone, США) с 10% FBS). Суспензии обрабатывали

ультразвуком в течение 5 мин и проводили измерения гидродинамического диаметра методом DLS через одну неделю, шесть месяцев и один год после лиофилизации.

5. Формирование жесткой БК на поверхности НАФ

Формирование жесткой БК на поверхности НАФ проводили путём инкубации наночастиц в среде для клеточных культур с добавлением 10% FBS в течение 4 ч при 25°C при перемешивании (Рис. 6). НАФ@БК осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 7 мин и ресуспендировали в деионизированной воде. Концентрацию белка определяли методом с бигинхониновой кислотой с помощью набора Pierce™ micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

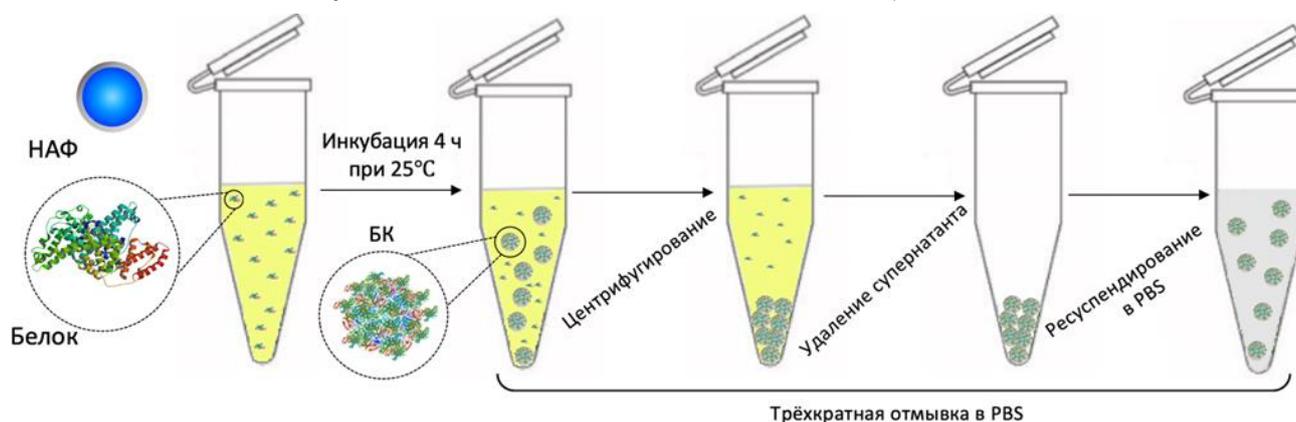


Рис. 6. Схема формирования жесткой БК на НАФ и отделение комплексов НАФ@БК от не связавшихся белков.

6. Анализ цитотоксичности НАФ и НАФ@БК

Исследовали цитотоксичность лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄ относительно НАФ-NOBF₄ в отсутствии и присутствии БК. Клетки линии SKOV-3 культивировали в среде McCoу's 5A с добавлением и 10% FBS при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки инкубировали с НАФ-NOBF₄ /дБСА-НАФ-NOBF₄ и НАФ-NOBF₄@БК /дБСА-НАФ-NOBF₄@БК в концентрации 25 – 200 мкг/мл в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Жизнеспособность клеток анализировали с помощью МТТ-теста [Фрешни, 2010]. Оптическую плотность раствора в лунках планшета измеряли с помощью планшетного спектрофотометра Synergy MX (BioTek, США) на длине волны 570 нм.

В главе 3 представлены и обсуждены результаты исследования.

1. Синтез и характеристика НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄

НАФ-ОК со строго контролируемым размером и формой были синтезированы методом сольватотермического разложения. Легирование матрицы NaYF₄ ионами трехвалентных лантаноидов Yb³⁺ и Tm³⁺ позволяет получать НАФ с максимумами эмиссии ФЛ в синей и ИК областях. Предшественники лантаноидов и фтора нагревали в бескислородной среде и затем стабилизировали в растворе ОК, в результате чего были получены кубические наноразмерные кристаллы НАФ (α-фаза). Для получения более стабильных гексагональных кристаллов НАФ (β-фаза) была применена дополнительная термообработка. Переход от α- к β-фазе и последующее формирование инертной оболочки NaYF₄ значительно увеличивают яркость ФЛ НАФ, что позволяет повысить эффективность их применения для биоимиджинга.

Размер НАФ-ОК по данным ПЭМ составил $35 \pm 2,8$ нм (Рис. 7А). Гидродинамический диаметр НАФ-ОК и индекс полидисперсности (PDI) говорят о стабильности и средней полидисперсности суспензии в гексане (Рис. 7Д) и (Табл. 1). НАФ-ОК являются гидрофобными из-за присутствия олеиновой кислоты на их поверхности и неподходящими для биологических применений, поэтому для придания им биосовместимости требуется модификации поверхности. Поверхность НАФ была модифицирована неорганическим соединением NOBF_4 методом обмена лигандов. В результате были получены гидрофильные НАФ со стабильным распределением по размерам и умеренной полидисперсностью в водном растворе (Рис. 7Д, Табл. 1). Значения PDI в Таблице 1 были ниже 0,3, что указывает на однородность размера и небольшой уровень агрегации. НАФ- NOBF_4 имели положительный ζ -потенциал, так как они окружены ионами NO^+ на поверхности и BF_4^- в качестве противоионов (Рис. 1). Их ζ -потенциал составлял $+57,2 \pm 2,04$ мВ при pH 7,0 что говорит о высокой коллоидной стабильности в водной суспензии, поскольку электростатическое отталкивание между положительно заряженными частицами превосходит Ван-дер-Ваальсовы силы притяжения, что уменьшает возможность образования агрегатов.

Пики эмиссии ФЛ НАФ-ОК и НАФ- NOBF_4 находятся в синей (478 нм) и ближней ИК (800 нм) областях, соответствующих переходам $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$ и $^3\text{H}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$ ионов Tm^{3+} , соответственно, при возбуждении светом с длиной волны 980 (рис. 7Б,Г). Высокий пик излучения этих наночастиц на 800 нм в ближней ИК области спектра, попадающий в окно прозрачности биоткани (700 – 1100 нм), делает их эффективными агентами для биоимиджинга. Интенсивность ФЛ НАФ- NOBF_4 в воде снижается относительно НАФ-ОК в гексане, но остаётся достаточно высокой для целей биоимиджинга.

Данные FTIR спектроскопии также подтверждают удаление остатков ОК с поверхности НАФ и присоединение NOBF_4 (Рис. 7В). Появление пиков 2933 см^{-1} и 2850 см^{-1} соответствует асимметричным и симметричным валентным колебаниям групп $-\text{CH}_2$ олеиновой кислоты, соответственно. Пики 1560 и 1466 см^{-1} относятся к асимметричному и симметричному участку COO^- олеиновой кислоты соответственно. Обработка НАФ молекулами NOBF_4 вызвала уменьшение интенсивности пиков при 2933 и 2850 см^{-1} и появление новой полосы при 1085 см^{-1} , связанной с анионами BF_4^- .

Табл. 1.

Гидродинамический диаметр НАФ-ОК и НАФ- NOBF_4 .		
	Гидродинамический диаметр (нм)	PDI
НАФ-ОК	$67,94 \pm 0,38$	$0,254 \pm 0,011$
НАФ- NOBF_4	$93,91 \pm 1,03$	$0,171 \pm 0,020$

2. Определение оптимальной концентрации альбумина для формирования стабильной БК на НАФ- NOBF_4

Ряд исследований показали способность БСА повышать стабильность наночастиц и уменьшать образование БК в физиологических условиях. Полученные нами результаты продемонстрировали увеличение гидродинамического диаметра и снижение ζ -потенциала БСА после денатурации (Рис. 8), что способствует усилению электростатического взаимодействия между дБСА и положительно заряженными НАФ- NOBF_4 .

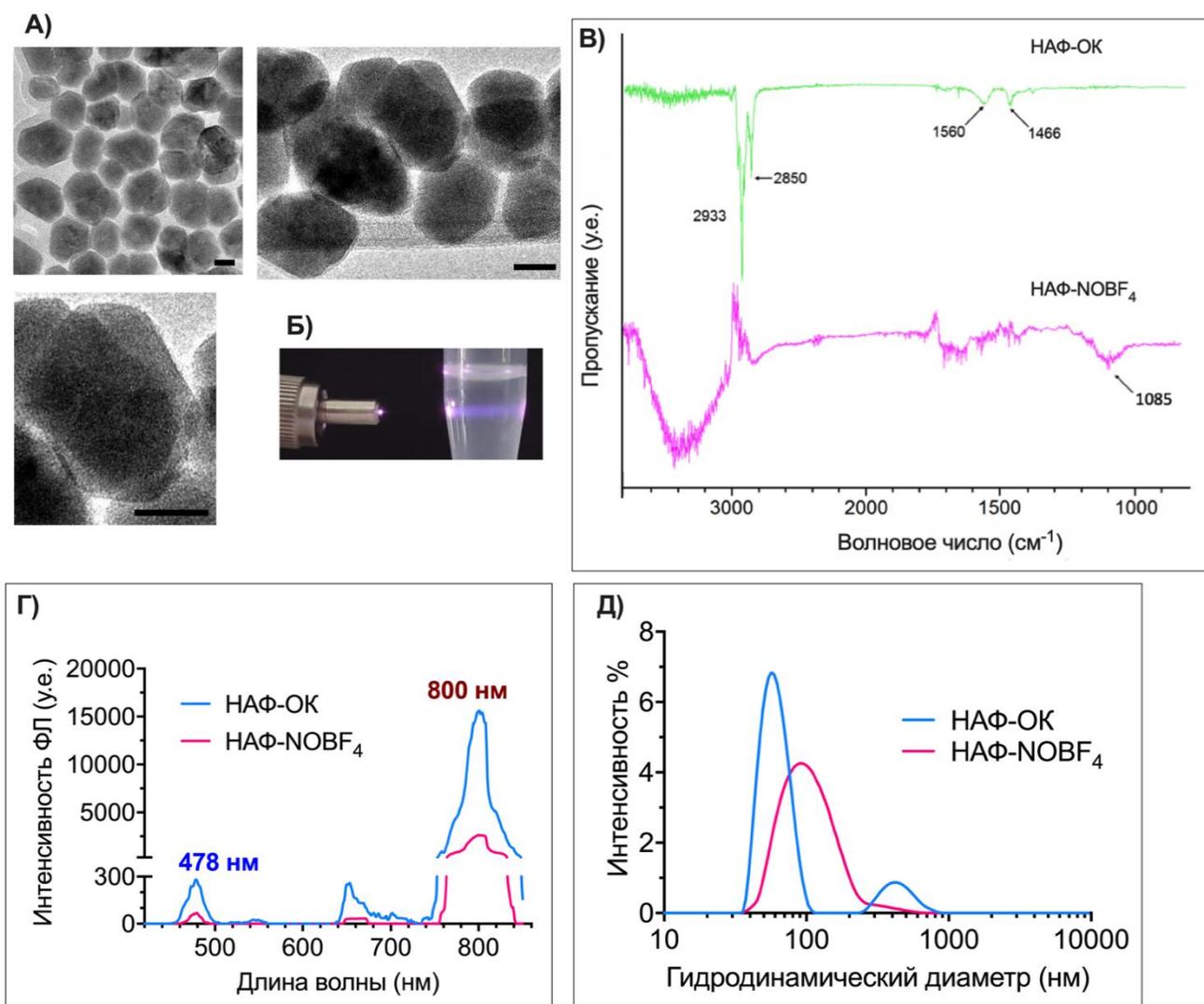


Рис. 7. Характеризация НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄: А) ПЭМ изображение НАФ-ОК состава NaY_{0,794}F₄Yb_{0,2}Tm_{0,006}/NaYF₄, масштабный отрезок 20 нм; Б) НАФ-NOBF₄ в суспензии, освещенные лазером с длиной волны 980 нм; В) Спектры поглощения FTIR НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄; Г) Спектр эмиссии ФЛ НАФ при возбуждении светом с длиной волны 980 нм; Д) Гидродинамический диаметр НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄ в гексане и деионизированной воде, соответственно.

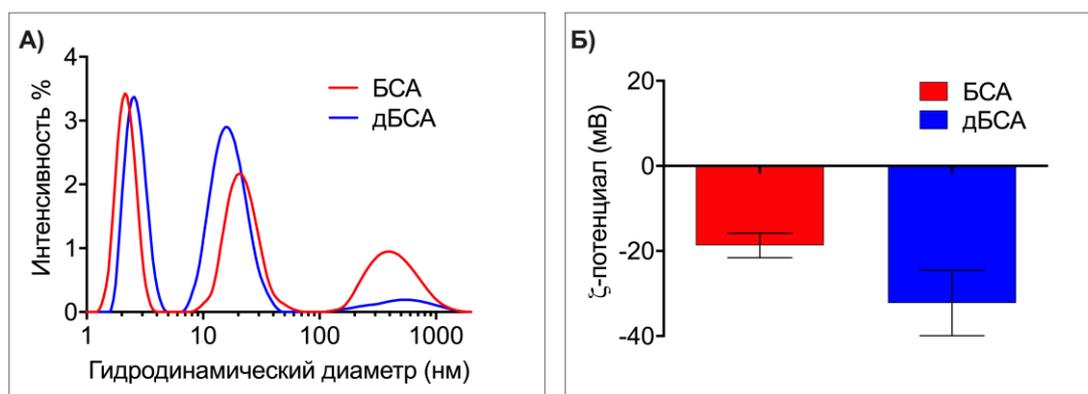


Рис. 8. А) Гидродинамический диаметр БСА и дБСА; Б) ζ-потенциала БСА и дБСА.

Процесс формирования БК на поверхности НАФ при их инкубации с альбумином зависит от ряда факторов. Альбумин может быть использован для блокирования образования нежелательной БК вокруг НАФ, что помогает повысить их стабильность и увеличить время циркуляции в кровотоке [An et al., 2017]. Для стабилизации полученных НАФ-NOBF₄ необходимо было определить оптимальное соотношение концентраций альбумина и наночастиц.

Цель состояла в том, чтобы получить стабильный слой БК из альбумина, сформированный вокруг наночастиц, добиться отсутствия их агрегации и избытка белка в суспензии (Рис. 4). Формирование БК зависит от фактора концентрации, который некоторое время игнорировался, но был недавно установлен [Zhang et al., 2017]. Результаты подбора оптимального соотношения концентраций альбумина и наночастиц суммированы на рисунках 9 и 10 и в таблицах 2 и 3. На рисунках 9А и 10А видно, что низкие концентрации БСА/дБСА вызывают относительно высокую агрегацию наночастиц, тогда как высокие концентрации БСА/дБСА приводят к сохранению избытка несвязанных белковых молекул. В рисунках 9Д и 10Д также видно, как ζ -потенциал возрастает по абсолютной величине при увеличении концентрации альбумина до достижения насыщения. Размер, ζ -потенциал и коллоидная стабильность НАФ инкубированных с альбумином в суспензии при всех концентрациях сохранялись при комнатной температуре (25°C) в течение 4 ч (Рис. 9 Б,Г,Д, 10 Б,Г,Д), демонстрируя стабильность и целостность наноконструкта с течением времени. Концентрации БСА 100 мкМ и дБСА 10 мкМ для НАФ-NOBF₄ позволили зарегистрировать единственный пик распределения гидродинамического диаметра частиц с умеренной полидисперсностью в относительно стабильном состоянии в коллоидных суспензиях (Рис. 9В, 10В, Табл. 2,3).

Табл. 2.

Гидродинамический диаметр НАФ-NOBF₄, инкубированных с БСА

Концентрация БСА, мкМ	Гидродинамический диаметр (нм)	PDI
Время инкубации: 15 мин		
25	116,5 ± 1,4	0,271 ± 0,009
50	120,6 ± 1,0	0,420 ± 0,006
75	121,7 ± 5,6	0,342 ± 0,046
100	119,9 ± 0,8	0,322 ± 0,004
120	108,7 ± 2,9	0,423 ± 0,071
Время инкубации: 4 ч		
25	118,5 ± 1,9	0,279 ± 0,012
50	119,4 ± 2,3	0,435 ± 0,012
75	131,6 ± 8,9	0,413 ± 0,026
100	123,9 ± 1,6	0,369 ± 0,055
120	108,9 ± 2,0	0,488 ± 0,006

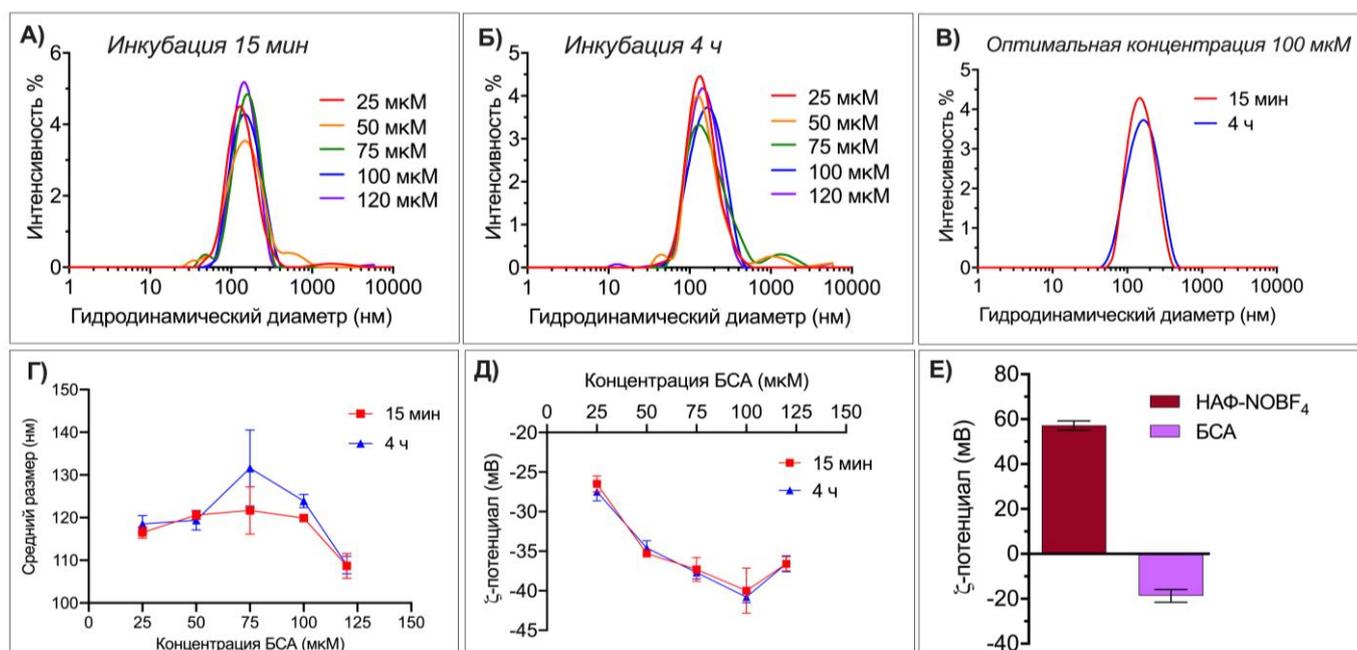


Рис. 9. Определение оптимальной концентрации БСА для формирования стабильной БК на НАФ-NOBF₄: А и Б) гидродинамический диаметр БСА-НАФ-NOBF₄ после инкубации НАФ-NOBF₄ с БСА в разных концентрациях в течение 15 мин и 4 ч, соответственно; В) гидродинамический диаметр БСА-НАФ-NOBF₄ после инкубации с БСА в оптимальной концентрации (100 мкМ); Г) Среднее значение гидродинамического диаметра БСА-НАФ-NOBF₄ при различных концентрациях БСА в течение 15 мин и 4 ч; Д) ζ-потенциал БСА-НАФ-NOBF₄ при различных концентрациях БСА в течение 15 мин и 4 ч; Е) ζ-потенциал НАФ-NOBF₄ и БСА.

Табл. 3.

Гидродинамический диаметр НАФ-NOBF₄, инкубированных с дБСА

Концентрация дБСА, мкМ	Гидродинамический диаметр (нм)	PDI
Время инкубации: 15 мин		
5	4755,0 ± 786,6	0,281 ± 0,159
10	176,2 ± 2,9	0,127 ± 0,006
25	112,3 ± 5,0	0,375 ± 0,071
50	80,3 ± 0,7	0,56 ± 0,008
Время инкубации: 4 ч		
5	7721,0 ± 383,9	0,13 ± 0,024
10	247,0 ± 5,9	0,139 ± 0,016
25	116,3 ± 2,5	0,333 ± 0,003
50	78,8 ± 0,9	0,569 ± 0,005

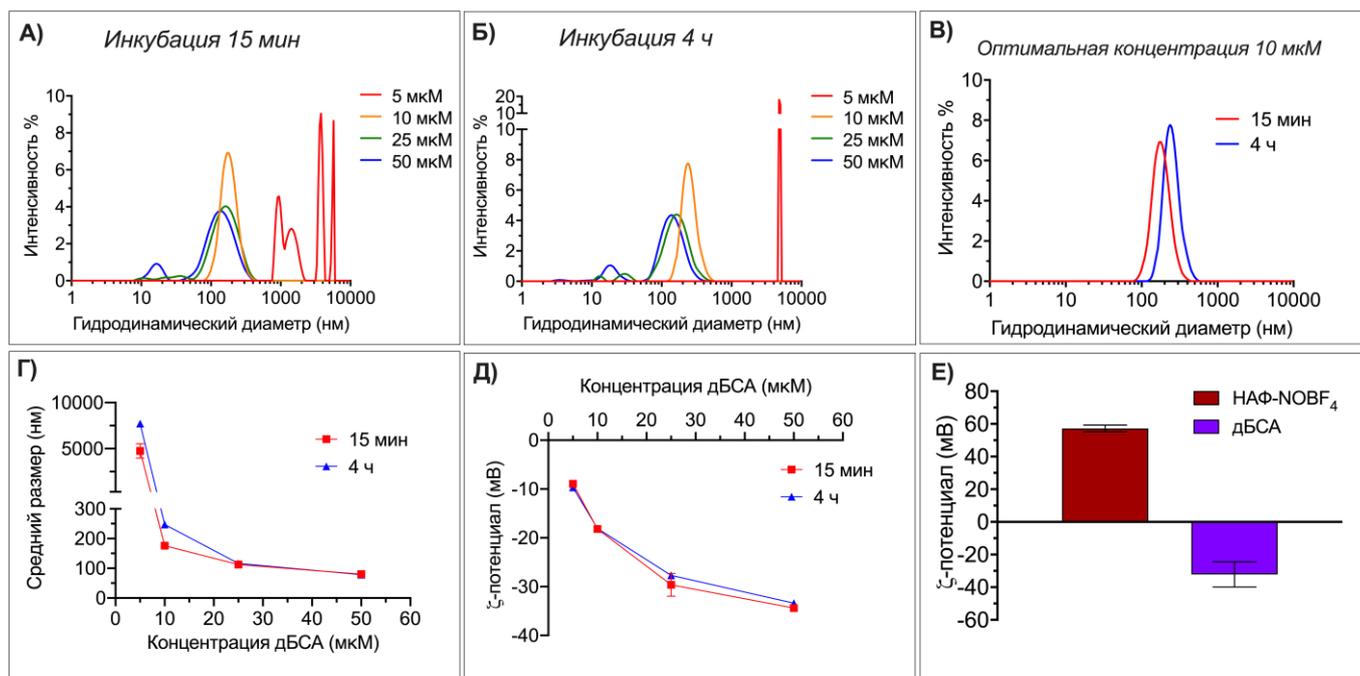


Рис. 10. Определение оптимальной концентрации дБСА для формирования стабильной БК на НАФ-NOBF₄: А и Б) гидродинамический диаметр дБСА-НАФ-NOBF₄ после инкубации НАФ-NOBF₄ с дБСА в разных концентрациях в течение 15 мин и 4 ч, соответственно; В) гидродинамический диаметр дБСА-НАФ-NOBF₄ после инкубации с дБСА в оптимальной концентрации (10 мкМ); Г) Среднее значение гидродинамического диаметра дБСА-НАФ-NOBF₄ при различных концентрациях дБСА в течение 15 мин и 4 ч; Д) ζ-потенциал БСА-НАФ-NOBF₄ при различных концентрациях БСА в течение 15 мин и 4 ч; Е) ζ-потенциал НАФ-NOBF₄ и дБСА.

3. Оценка коллоидной стабильности дБСА-НАФ-NOBF₄, осажженных центрифугированием

Центрифугирование как метод осаждения полученных наноконплексов оказалось неэффективным, поскольку оно способствовало высокому уровню агрегации и седиментации в деионизированной воде. Гидродинамический диаметр дБСА-НАФ-NOBF₄ составлял ~750 нм (Табл. 4, Рис. 11). Большая часть дБСА была удалена центрифугированием, а оставшаяся часть альбумина вызвала отклонение значения ζ-потенциала от не покрытых НАФ (Табл. 4) и сделала коллоиды склонными к агрегации.

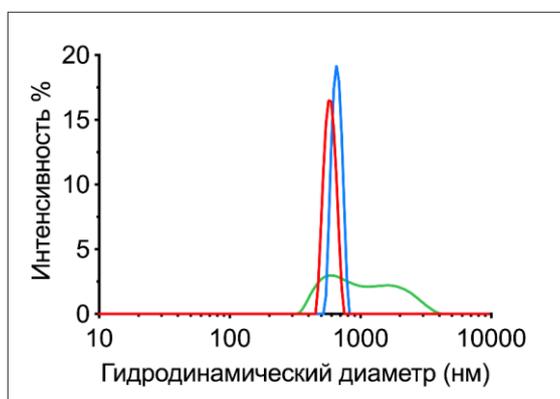


Рис. 11. Гидродинамический диаметр дБСА-НАФ-NOBF₄, осажженных центрифугированием, по результатам трех измерений (показаны синим, красным и зелёным).

Табл. 4.

Характеристики дБСА-НАФ-NOBF₄, осажденных центрифугированием.

Гидродинамический диаметр (нм)	PDI	ζ-потенциал, мВ
747,5 ± 76,7	0,292 ± 0,015	+6,74 ± 1,21

4. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄

В качестве альтернативного подхода к осаждению дБСА-НАФ-NOBF₄ использовали лиофилизацию. Затем образцы ресуспендировали при обработке ультразвуком в течение 5 мин в деионизированной воде, PBS и средах для культивирования клеток содержащих 10% FBS. Лиофилизация обеспечивала сохранение целостности и стабильности полученных дБСА-НАФ-NOBF₄. Эмиссия ФЛ НАФ-NOBF₄ не подавлялась покрытием дБСА, напротив, наблюдалось небольшое увеличение сигнала ФЛ после покрытия дБСА. Дополнительный слой дБСА может снизить эффект тушения ФЛ молекулами воды, что приводит к более высокому сигналу ФЛ (Рис. 12А). Гидродинамический диаметр подтверждает образование БК из альбумина вокруг наночастиц, поскольку диаграмма смещается в сторону большего размера (Рис. 12Б). Появление небольшого пика, соответствующего размеру молекул дБСА (около 10 нм) является следствием лиофилизации и обработки ультразвуком. FTIR-спектр лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄ показывает уменьшение пика 1085 см⁻¹, соответствующего анионам BF₄⁻; изменение полосы при 1397 см⁻¹, относится к амиду III дБСА, растяжению связи C≡N и изгибу связи N–H (Рис. 12В). Эти данные свидетельствуют о блокировании сигнала BF₄⁻ и взаимодействии между альбумином и наночастицами, что говорит об их успешном покрытии дБСА.

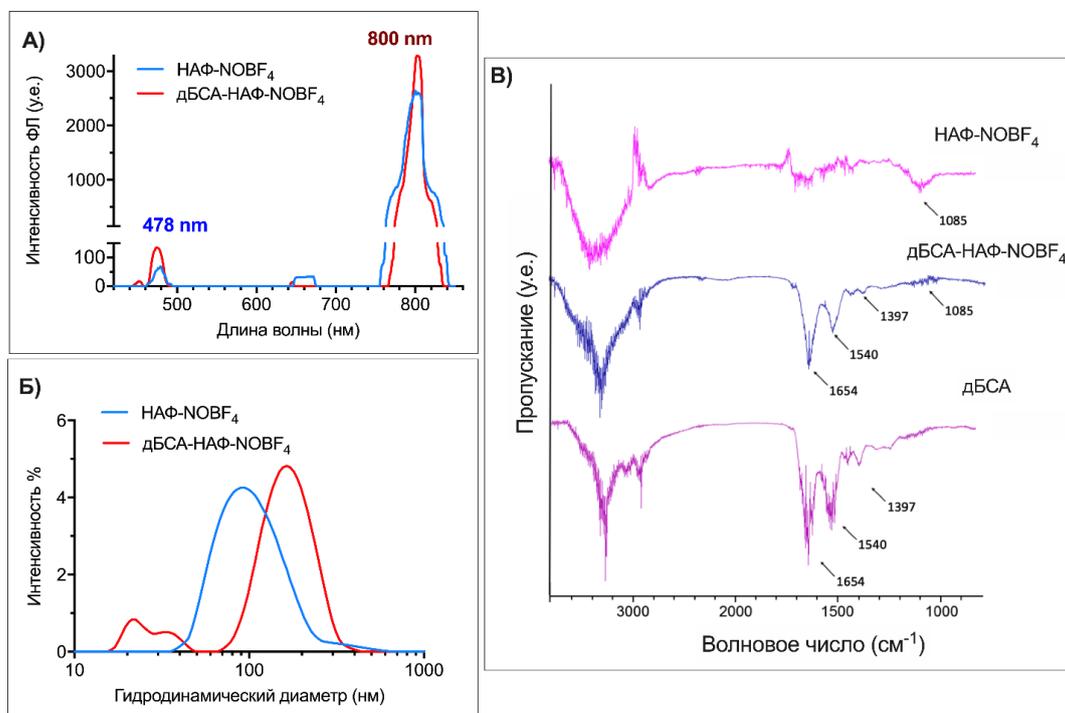


Рис. 12. Характеризация НАФ-NOBF₄ и лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄: А) спектр эмиссии ФЛ НАФ-NOBF₄ и лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄ при возбуждении светом с длиной волны 980 нм; Б) Гидродинамический диаметр НАФ-NOBF₄ и лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄; В) Спектры поглощения FTIR НАФ-NOBF₄ и лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄.

дБСА-НАФ-NOBF₄ демонстрировали высокую стабильность в деионизированной воде, PBS и средах DMEM и McCoy's 5A с добавлением 10% FBS по результатам трех повторных измерений методом DLS (Рис. 13). Пики малого размера (меньше 100 нм) (Рис. 13А,Б) соответствуют небольшому уровню отслоения и агрегации дБСА в результате лиофилизации и обработки ультразвуком. Множественные пики (ниже 100 нм) на (Рис. 13В,Г) объясняются соответствующим сигналом белков сыворотки и агрегатов белков с гидродинамическим диаметром около 10 – 60 нм в присутствии 10% FBS. Пики более 300 нм относятся к небольшому количеству агрегатов частиц (Рис. 13А,Г), составляющих менее 0,5% от общего количества. Значения гидродинамического диаметра дБСА-НАФ-NOBF₄ во всех случаях находились в диапазоне 100 – 300 нм.

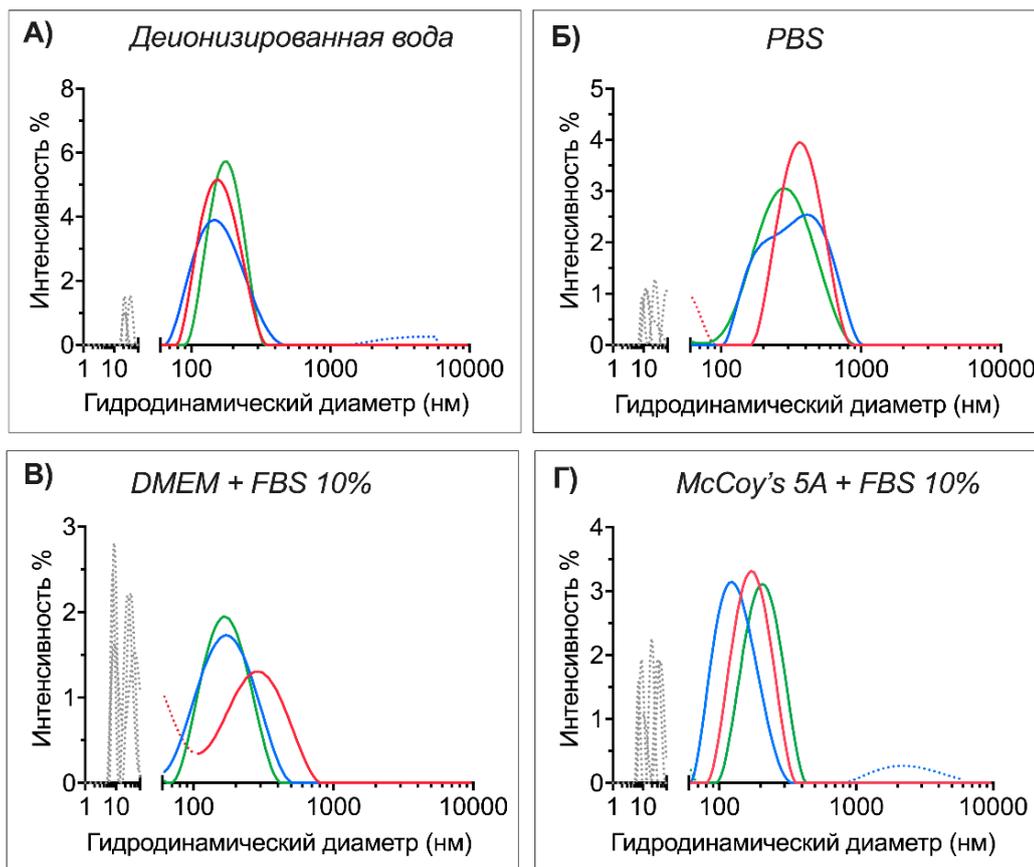


Рис. 13. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄ в разных буферах, ресуспендированных встряхиванием с последующей обработкой ультразвуком в течение 5 мин в течение недели после лиофилизации по результатам трех повторных измерений (показаны синим, красным и зелёным): А) в деионизированной воде; Б) в PBS; В и Г) в средах для культивирования клеток DMEM и McCoy's 5A с добавлением 10% FBS, соответственно. Серые и/или пунктирные линии ниже 100 нм соответствуют молекулам белков и агрегатов белков; пунктирные линии более 300 нм – агрегатам НАФ.

Таким образом, в сравнении с подходом центрифугирования (Рис. 11), лиофилизация показала себя эффективной в поддержании стабильности НАФ-NOBF₄, покрытых дБСА в присутствии белков сыворотки, что подтверждает лиопротекторные свойства альбумина.

5. Оценка долговременной коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄

Исследование наноконплексов проводили повторно через шесть месяцев после лиофилизации, при этом образцы ресуспендировали встряхиванием без обработки ультразвуком. Результаты согласуются с полученными ранее данными (Рис. 13) и подтверждают коллоидную стабильность дБСА-НАФ-NOBF₄. Лиофилизация сама по себе приводила к некоторому отслоению дБСА от наночастиц (Рис. 14), в то время как обработка ультразвуком не влияла ни на коллоидную стабильность наноконплексов, ни на их целостность, но без ультразвуковой обработки уровень агрегации частиц (кластеры более 300 нм) несколько увеличивался в различных буферах (Рис. 14).

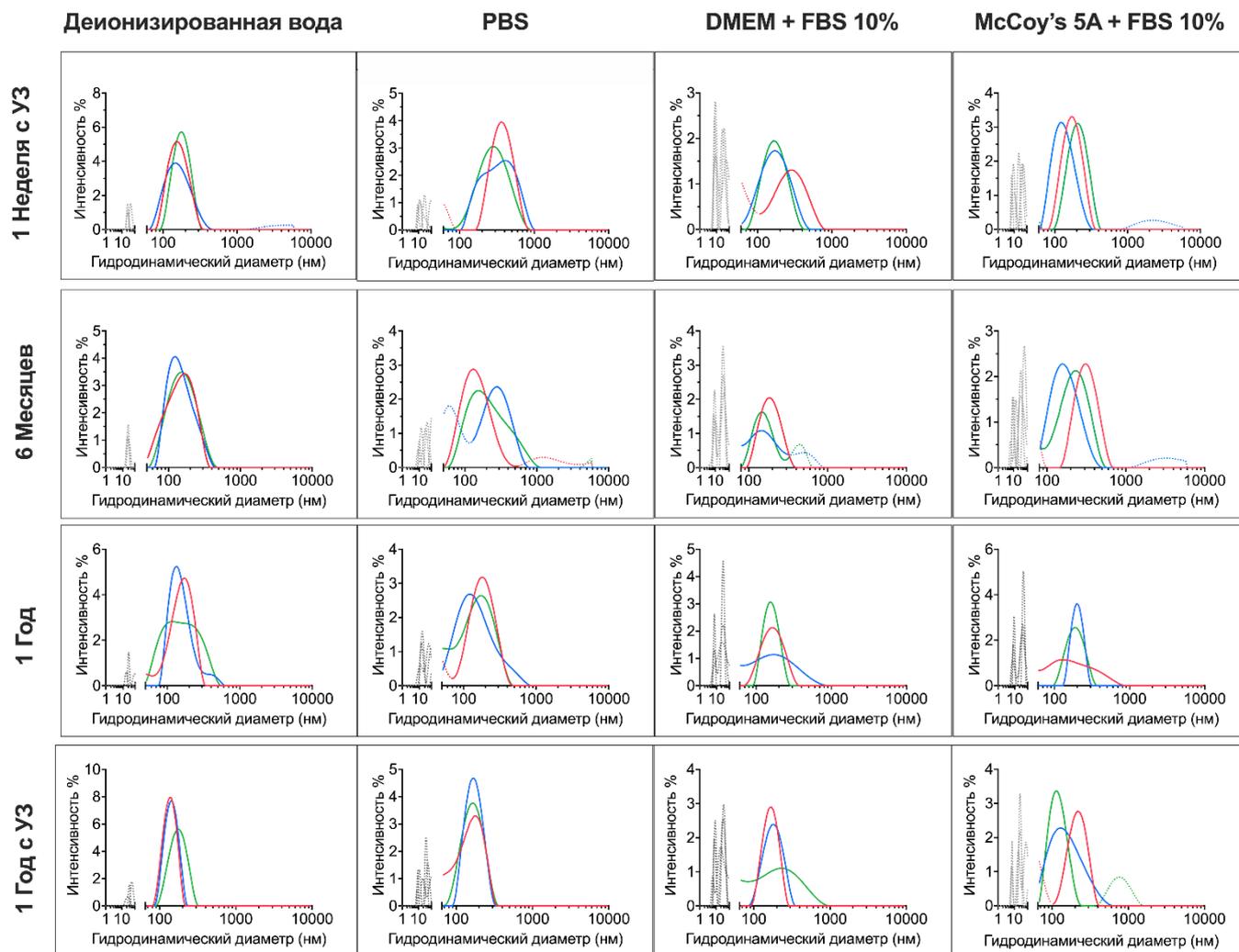


Рис. 14. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄, ресуспендированных встряхиванием с последующей обработкой ультразвуком в течение 5 мин в разных буферах, в течение разных периодов времени после лиофилизации по результатам трех повторных измерений (показаны синим, красным и зелёным). УЗ – обработка ультразвуком в течение 5 мин. Серые и/или пунктирные линии ниже 100 нм соответствуют молекулам белков и агрегатов белков; пунктирные линии более 300 нм – агрегатам НАФ.

По прошествии года хранения лиофилизированных наноконплексов при 4°C их коллоидная стабильность была повторно исследована как описано выше, до и после обработки ультразвуком (Рис. 14). В обоих случаях результаты были аналогичны таковым после 1 недели и 6 месяцев хранения (Рис. 13,14). Сохранение свойств

наноконплексов открывает возможности для дальнейших исследований и применения их как визуализирующих агентов. Ультразвуковая обработка снижает уровень агрегации частиц, но не является необходимым этапом для процедуры ресуспендирования наноконплексов.

Средние результаты всех четырех наборов данных оценки стабильности в совокупности показывают, что соответствующие пики дБСА-НАФ-NOBF₄ (100 – 300 нм) перекрываются во всех буферах (Рис. 15). Анализ данных на всех трех контрольных точках дает одинаковый вывод: лиофилизация и дальнейшее хранение при 4°C в течение года не влияют на уровень отслоения дБСА, целостность или коллоидную стабильность полученных конплексов. Кроме того, гидродинамический диаметр НАФ незначительно отличался в отсутствии и присутствии сыворотки, что свидетельствует о способности покрытия альбумином снижать дальнейшую адсорбцию белков на поверхности частиц.

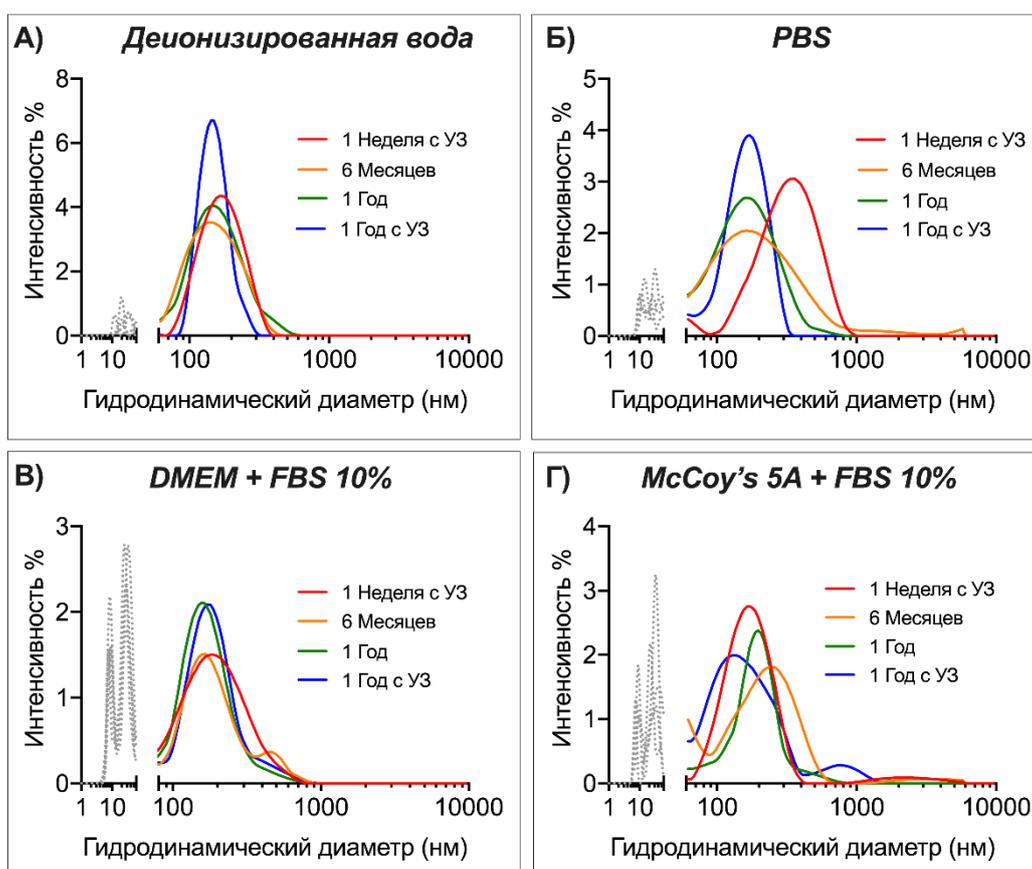


Рис. 15. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄ в разных буферах, в трех временных точках на основе средних результатов трех повторных измерений гидродинамического диаметра: А) в деионизированной воде; Б) в PBS; В) в среде для культивирования клеток DMEM с добавлением 10% FBS; Г) в среде для культивирования клеток McCoy's 5A с добавлением 10% FBS; Серые и/или пунктирные линии ниже 100 нм соответствуют молекулам белков и агрегатов белков.

6. Оценка способности покрытия дБСА ингибировать формирование жесткой БК на НАФ-NOBF₄

Было исследовано влияние покрытия НАФ-NOBF₄ дБСА на адсорбцию белков в средах для культивирования клеток. Исходная концентрация дБСА в каждом лиофилизированном образце составляла 10 мкМ, а концентрация дБСА после трех

циклов промывки PBS составляла ~ 7 мкг/мл. Измерения показали значительное снижение адсорбции белка на поверхности НАФ-NOBF₄, покрытых дБСА, по сравнению с исходными НАФ-NOBF₄ при инкубации в двух разных средах для культивирования клеток (Рис. 16).

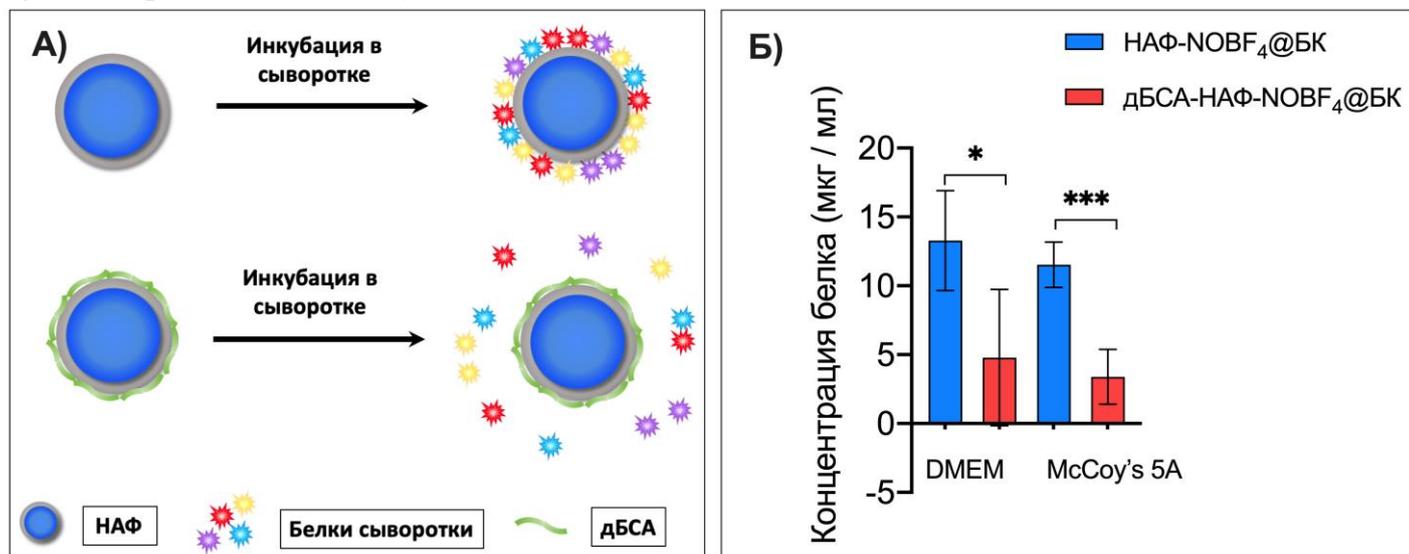


Рис. 16. А) Схема процесса адсорбции белков на поверхности НАФ-NOBF₄ и дБСА-НАФ-NOBF₄; Б) Количественное определение жесткой БК с помощью анализа micro BCA. Для дБСА-НАФ-NOBF₄ приведены значения концентрации белка за вычетом концентрации дБСА. Результаты анализировали с помощью непарного t-критерия (n = 5; *: p < 0.05, ***: p < 0.001).

7. Анализ цитотоксичности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄

Для исследования влияния покрытия дБСА на цитотоксичность НАФ-NOBF₄ использовали клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3. Эта клеточная линия была выбрана как возможная модель будущих исследований действия тераностических комплексов на основе НАФ. Предварительное исследование показало, что отсутствие в среде сыворотки (FBS) не оказывает статистически значимого влияния на жизнеспособность клеток. НАФ-NOBF₄ в концентрациях до 250 мкг/мл также не вызывали цитотоксического эффекта.

Клетки инкубировали в бессывороточной среде McCoy's 5A в присутствии НАФ-NOBF₄, дБСА-НАФ-NOBF₄, НАФ-NOBF₄@БК и дБСА-НАФ-NOBF₄@БК в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью метода МТТ (Рис. 17). Наблюдалось некоторое увеличение жизнеспособности клеток в присутствии частиц с БК, которое может объясняться действием белков сыворотки, которые защищают клетки от стрессового воздействия бессывороточной среды и цитотоксического действия НЧ. Наблюдаемое небольшое снижение жизнеспособности клеток в присутствии дБСА-НАФ-NOBF₄ может объясняться усилением поглощения клетками частиц, покрытых дБСА. Наблюдалось небольшое снижение жизнеспособности клеток в присутствии наноконструкций в наибольших концентрациях. Сравнение средних значений жизнеспособности клеток по группам с использованием критерия Даннета не показало статистически значимого влияния наноконструкций и наночастиц всех типов на жизнеспособность клеток SKOV-3 при концентрациях до 200 мкг/мл.

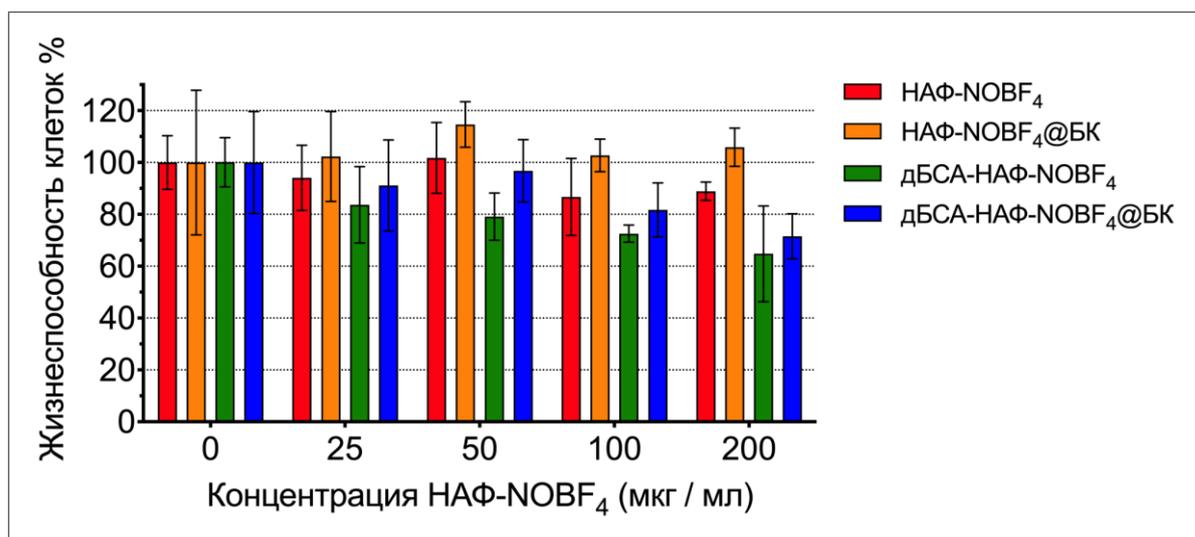


Рис. 17. Зависимость жизнеспособности клеток SKOV-3 от концентрации наночастиц HAФ-NOBF₄ в среде в сравнении с наночастицами покрытыми альбумином, до и после формирования жесткой БК. Время инкубации 24 ч. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением. Статистический анализ с использованием критерия Даннета (n=3; p >0.05)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние два десятилетия разработки в области нанобиомедицины прошли долгий путь, тем не менее множество задач остаются не решенными. Разработка терапевтических агентов на основе наноматериалов, в частности, HAФ, и создание эффективных тераностических наносистем являются актуальными потребностями современной онкологии.

В ходе настоящего исследования были получены гидрофильные HAФ, покрытые оболочкой из неорганического соединения NOBF₄. Малый размер и положительный заряд молекул NOBF₄ позволяют получить монодисперсную суспензию HAФ, обладающую высоким ζ-потенциалом и коллоидной устойчивостью. Исследование формирования белковой короны из нативного и термически денатурированного БСА показало, что дБСА позволяет получить более монодисперсные суспензии комплексов. Анализ полученных данных с позиций биофизики позволяет интерпретировать их как результат взаимодействия большего количества отрицательно заряженных аминокислот в расплетённой цепи дБСА с положительно заряженной поверхностью HAФ-NOBF₄, а также взаимным притяжением гидрофобных участков аминокислотной цепи молекул дБСА, оказавшихся доступными после потери третичной и вторичной структуры белка. Результатом этого может быть образование более тонкой и стабильной белковой короны вокруг HAФ по сравнению с нативным БСА. Существующие биофизические модели, рассматривающие аффинность белка к поверхности наночастиц, подтверждают полученные результаты. Добавление этапа лиофилизации в процесс формирования белковой короны способствует ещё большему уплотнению слоя дБСА за счет удаления молекул воды, что способствует сохранению размера и коллоидной стабильности комплексов при последующей сольubilизации и снижает нежелательную адсорбцию белков, содержащихся в среде. Результаты настоящего исследования вносят вклад в развитие подходов к получению коллоидно-стабильных биосовместимых комплексов на основе HAФ, что способствует повышению эффективности создаваемых на их основе тераностических агентов.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано формирование белковой короны из бычьего сывороточного альбумина (БСА) вокруг положительно заряженных НАФ-NOBF₄; показано, что белковая корона из термически денатурированного БСА (дБСА) обеспечивает лучшую дисперсность коллоидов по сравнению с нативным БСА; показано, что оптимальными концентрациями БСА и дБСА для образования стабильной белковой короны вокруг НАФ-NOBF₄ являются концентрации 100 мкМ и 10 мкМ, соответственно.
2. Добавление этапа лиофилизации в процесс формирования белковой короны из дБСА на поверхности НАФ-NOBF₄ позволяет получать комплексы, сохраняющие стабильность при их последующей солубилизации в присутствии белков сыворотки.
3. Наличие исходно сформированной белковой короны из дБСА на поверхности НАФ-NOBF₄ препятствует адсорбции белков, находящихся в среде, позволяет сохранить размер и коллоидную устойчивость комплексов, что потенциально увеличивает их эффективность как таргетных агентов.
4. НАФ-NOBF₄, покрытые стабильной белковой короной из дБСА, обладают низкой цитотоксичностью что делает возможным их использование для создания визуализирующих агентов и систем доставки.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список ВАК:

1. Гурьев Е.Л., Смышляева А.С., Шилягина Н.Ю., **Шанвар С.**, Костюк А.Б., Шульга А.А., Коновалова Е.В., Звягин А.В., Деев С.М., Петров Р.В. Мультифункциональные комплексы на основе наночастиц с антистоксовой фотолюминесценцией для тераностики HER2-положительных опухолей // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 491 No 1. С. 137-140. [Guryev E.L., Smyshlyaeva A.S., Shilyagina N.Y., Shanwar S., Kostyuk A.B., Shulga A.A., Konovalova E.V., Zvyagin A.V., Deyev S.M., Petrov R.V. Multifunctional Complexes Based on Photoluminescent Upconversion Nanoparticles for Theranostics of the HER2-Positive Tumors // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2020. Vol. 491, P. 73–76.]
2. Guryev E.L., Smyshlyaeva A.S., Shilyagina N.Y., Sokolova E.A., **Shanwar S.**, Kostyuk A.B., Schulga A.A., Konovalova E.V., Balalaeva I.V., Deyev S.M., Zvyagin A.V. UCNP-based photoluminescent nanomedicines for diagnosis and targeted therapy of cancer // Molecules. 2020. Vol. 25 No 18. P. 4302.
3. Гурьев Е.Л., **Шанвар С.**, Звягин А.В., Деев С.М., Балалаева И.В. Фотолюминесцентные наноматериалы для биомедицинских применений: современное состояние и перспективы // Acta Naturae. 2021. Том 13, № 2, В печати.
4. **Shanwar S.**, Liang L., Nechaev A.V., Balalaeva I.V., Vodeneev V.A., Zvyagin A.V., Guryev E.L. The assembly of a photoluminescent nanocomplex based on upconversion nanoparticles // Opera Medica et Physiologica. 2020. Vol. 7 No 4. P. 42–48.
5. **Shanwar S.**, Liang L., Nechaev A.V., Bausheva D.K., Balalaeva I.V., Vodeneev V.A., Roy I., Zvyagin A.V., Guryev E.L. Controlled Formation of a Protein Corona Composed of Denatured BSA on Upconversion Nanoparticles Improves Their Colloidal Stability // Materials. 2021. Vol. 14. No.7. P. 1657.

Материалы конференций:

6. Сенча Л.М., Воловецкий А.Б., Гурьев Е.Л., Костюк А.Б., Шилягина Н.Ю., **Шанвар С.**, Звягин А.В., Балалаева И.В. Исследование распределения направленных фотолюминесцентных комплексов НАФ-DARPin в организме животных // Тезисы докладов 71-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Н.Новгород. 2018. С. 204.
7. **Шанвар С.**, Сенча Л.М., Гурьев Е.Л., Костюк А.Б., Смышляева А.С., Альзейбак Р., Балалаева И.В., Воденеев В.А., Звягин А.В. Влияние короны из сывороточного альбумина на размер антистоксовых нанофосфоров и их взаимодействие с клетками в культуре // Тезисы докладов 71-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Н.Новгород. 2018. С. 246.
8. **Шанвар С.**, Лианг Л., Звягин А.В. Стабилизация антистоксовых нанофосфоров покрытых альбумином путем лиофилизации // Сборник тезисов 23-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века", Пущино. 2019. С. 431.
9. **Шанвар С.**, Лианг Л., Звягин А.В. Влияние покрытия альбумином на коллоидную стабильность антистоксовых нанофосфоров // Тезисы докладов 72-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Н.Новгород. 2019. С. 248.
10. **Шанвар С.**, Лианг Л., Звягин А.В. Потенциал покрытия альбумином антистоксовых нанофосфоров в блокировании образования белковой короны // 24 Нижегородская сессия молодых ученых (Технические, естественные и математические науки), Н.Новгород. 2019. С. 61.
11. **Шанвар С.**, Лианг Л., Гурьев Е.Л., Аксёнова Д., Звягин А.В. Влияние покрытия антистоксовых нанофосфоров альбумином на формирование белковой короны // Сборник тезисов 24-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология- наука XXI века", Пущино. 2020. С. 303.
12. **Шанвар С.**, Лианг Л., Звягин А.В. Способность покрытия альбумином стабилизировать антистоксовые нанофосфоры и блокировать образование белковой короны // Сборник докладов XIII Международной научно-практической конференции «PTSCIENCE», Роснаука, г. Санкт-Петербург. 2020. С. 16.
13. **Шанвар С.**, Лианг Л., Аксенова Д.К., Гурьев Е.Л., Звягин А.В. Влияние покрытия альбумином на коллоидную стабильность и цитотоксичность антистоксовых нанофосфоров // Тезисы докладов 73-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Н.Новгород. 2020. С. 223.