

НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СТРАТЕГИИ ПО СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

DOI: 10.17691/stm2024.16.3.04

УДК 616.36–003.93:53.086

Поступила 9.11.2023 г.

© **С.А. Родимова**, младший научный сотрудник научной лаборатории регенеративной медицины и научной лаборатории молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

Д.С. Козлов, лаборант научной лаборатории молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹; студент²;

Д.П. Крылов, лаборант научной лаборатории молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹; студент²;

Л.В. Михайлова, инженер физического факультета³;

В.А. Козлова, студент²;

А.И. Гаврина, младший научный сотрудник научной лаборатории молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

А.М. Можеров, младший научный сотрудник научной лаборатории оптической спектроскопии и микроскопии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

В.В. Елагин, к.б.н., научный сотрудник научной лаборатории оптической спектроскопии и микроскопии и научной лаборатории молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

Д.С. Кузнецова, к.б.н., зав. научной лабораторией молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, 603005;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603022;

³Национальный исследовательский университет ИТМО, Кронверкский пр., 49, лит. А, Санкт-Петербург, 197101

В настоящее время существует необходимость в разработке новых подходов для стимуляции регенерации печени, которые повысили бы эффективность ее восстановления после резекционных вмешательств. Перспективным подходом представляется применение наночастиц, нагруженных малыми биоактивными молекулами, с их таргетной доставкой в печень.

Цель исследования — изучение взаимодействия наночастиц с различными типами клеток печени на моделях тканевых печеночных эксплантатов и первичной культуры клеток печени методами мультифотонной микроскопии с возможностью детекции времени жизни флуоресценции.

Материалы и методы. Наночастицы синтезировали из полилактида (PLA), золота (Au) и кремния (SiO₂), затем охарактеризовывали с помощью сканирующей и просветной электронной микроскопии. Все три типа наночастиц модифицировали флуоресцентной меткой Су5 для их визуализации. В качестве моделей для биологического тестирования наночастиц использовали тканевые печеночные эксплантаты и первичную культуру гепатоцитов. Проводили оценку биораспределения наночастиц в ткани и клетках, их цитотоксичности, а также влияния на клеточный метаболизм методами оптического биоимиджинга.

Результаты. Наночастицы кремния преимущественно захватываются макрофагами, которые в большом количестве генерируют активные формы кислорода, а также нарушают нативный метаболический статус гепатоцитов. Наночастицы золота накапливаются во всех типах клеток печени, однако обладают выраженным токсическим эффектом, на что указывает появление некротических и апоптотических клеток, а также резкое изменение метаболического статуса гепатоцитов. Наночастицы полилактида наиболее эффективно накапливаются в клетках печени, преимущественно в гепатоцитах, не изменяют их нативный метаболический статус, что делает данный тип наночастиц наиболее перспективным для создания систем доставки биоактивных молекул с целью стимуляции регенерации печени.

Ключевые слова: наночастицы; биораспределение; FLIM; тканевые эксплантаты печени; культура клеток печени; регенерация печени.

Как цитировать: Rodimova S.A., Kozlov D.S., Krylov D.P., Mikhailova L.V., Kozlova V.A., Gavrina A.I., Mozherov A.M., Elagin V.V., Kuznetsova D.S. Nanoparticles for creating a strategy to stimulate liver regeneration. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(3): 31, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.3.04>

Для контактов: Родимова Светлана Алексеевна, e-mail: srodimova123@gmail.com

Nanoparticles for Creating a Strategy to Stimulate Liver Regeneration

S.A. Rodimova, Junior Researcher, Research Laboratory of Regenerative Medicine; Research Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

D.S. Kozlov, Laboratory Assistant, Research Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹; Student²;

D.P. Krylov, Laboratory Assistant, Research Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹; Student²;

L.V. Mikhailova, Engineer, Department of Physics³;

V.A. Kozlova, Student²;

A.I. Gavrina, Junior Researcher, Research Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

A.M. Mozherov, Junior Researcher, Research Laboratory of Optical Spectroscopy and Microscopy, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

V.V. Elagin, PhD, Researcher, Research Laboratory of Optical Spectroscopy and Microscopy; Research Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

D.S. Kuznetsova, PhD, Head of the Research Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603022, Russia;

³ITMO University (Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics), 49 Kronverksky Pr., Saint Petersburg, 197101, Russia

Presently, there is a need in the developing new approaches to stimulate liver regeneration, which would make its recovery more effective after resection. Application of nanoparticles, loaded with small bioactive molecules, with their targeted delivery into the liver is a promising approach.

The aim of the investigation is to study the interaction of nanoparticles with various types of hepatic cells on the models of liver slices and primary hepatic cell cultures using the methods of multiphoton microscopy with fluorescence lifetime imaging.

Materials and Methods. Nanoparticles have been synthesized from polylactide (PLA), gold (Au), and silicon (SiO₂), and characterized using scanning and transmission electron microscopy. These types of particles were labeled with a fluorescent Cy5 dye for their visualization. Liver slices and a primary hepatocyte culture were used as models for biological testing of nanoparticles. Biodistribution of the nanoparticles in the tissue and cells, their cytotoxicity, and the effect on the cell metabolism were assessed using optical bioimaging methods.

Results. The silicon nanoparticles are accumulated mainly by macrophages, which generate reactive oxygen species in a large amount and impair the native metabolic state of hepatocytes. The gold nanoparticles accumulate in all types of the liver cells but possess a marked toxic effect, which is indicated by the appearance of necrotic and apoptotic cells and a sharp change in the hepatocyte metabolic state. The polylactide nanoparticles accumulate most effectively in the liver cells, preferably in hepatocytes, do not change their native metabolic state, making this type of nanoparticles most promising for creating the bioactive molecule delivery systems to stimulate liver regeneration.

Key words: nanoparticles; biodistribution; FLIM; liver slices; liver cell culture; liver regeneration.

Введение

В настоящее время серьезной проблемой остается высокий риск развития послеоперационной печеночной недостаточности у пациентов с сопутствующей печеночной патологией при проведении обширных резекционных вмешательств. Известно, что более 50% пациентов, перенесших резекцию печени, и 25% доноров для трансплантации печени имеют ту или

иную степень стеатоза и фиброза [1], что значительно снижает регенераторный потенциал органа. Таким образом, необходима разработка нового подхода для стимуляции регенерации печени, который позволил бы повысить эффективность ее восстановления после резекции.

Перспективным подходом представляется стимуляция печеночной регенерации с применением различных малых биоактивных молекул, которые действуют

как на молекулярном уровне, так и на уровне целого органа [2,3]. Однако, несмотря на достигнутые на данный момент многообещающие результаты, проблема доставки биомолекул с контролируемым временем их высвобождения, накопления и выведения остается актуальной. Многочисленные исследования показали, что наночастицы (НЧ) способны эффективно транспортировать к мишеням различные биоактивные молекулы, в частности микроРНК [4, 5].

На сегодняшний день в биомедицинских исследованиях широко используются три типа НЧ: кремниевые (SiO_2), полилактидные (PLA) и золотые (Au). НЧ с высоким соотношением площади поверхности к объему обеспечивают простую конъюгацию с терапевтическими молекулами [6, 7]. Кроме того, изменяя размер и форму НЧ, можно управлять их свойствами, такими как скорость высвобождения биоактивных молекул, время накопления и выхода НЧ из клеток. Особенно важно, что для доставки НЧ к целевым клеткам, а именно к гепатоцитам, не требуется сложных модификаций поверхности благодаря способности большинства типов НЧ пассивно накапливаться в клетках печени.

В целом физико-химические свойства данных НЧ хорошо изучены, однако их биологический эффект во многом остается неясным. Кроме того, не установлено, какие именно клетки печени поглощают определенный тип НЧ. Наиболее предпочтительными для накопления биоактивных комплексов являются гепатоциты, которые ответственны за большинство метаболических процессов печени и всего организма, а также звездчатые клетки печени, способные переходить в миофибробласты, синтезирующие и секретирующие белки внеклеточного матрикса при остром или хроническом повреждении данного органа [8, 9]. Оба типа клеток подходят в качестве мишени для стимуляции восстановления печени и/или терапии сопутствующей патологии печени.

Чувствительным маркером состояния клеток является их метаболический статус. В настоящее время в биомедицинских исследованиях активно применяются методы мультифотонной микроскопии для изучения метаболической активности клеток по интенсивности флуоресценции энергетического кофактора никотинамидадениндинуклеотида (НАДН). Кроме того, время-разрешенная FLIM-микроскопия (FLIM — fluorescence lifetime imaging) позволяет получить данные о временах жизни флуоресценции и вкладах свободной и связанной форм кофактора НАДН, которые вовлечены в основные энергетические метаболические пути клетки — гликолиз и окислительное фосфорилирование [10].

Таким образом, данная работа направлена на изучение взаимодействия НЧ PLA, SiO_2 и Au с различными типами клеток печени на моделях тканевых печеночных эксплантатов и первичной культуры клеток печени с помощью мультифотонной микроскопии с возможностью детекции времени жизни флуоресценции.

Материалы и методы

Синтез наночастиц. Для синтеза носителей использовали следующие материалы: НЧ SiO_2 — раствор гидроксида аммония (NH_4OH , 27%), тетраэтилоксисиликат (тетраэтоксисилан, TEOS, 99%), этанол (EtOH, 99,9%; Merck, США); НЧ PLA — полилактид (PLA, MW=60 000; Goodfellow, Англия), дихлорметан (0,08 мас.% этанола; «Экос-1», Россия), ацетон (99,5%; PanReac AppliChem, США); НЧ Au — борогидрид натрия (NaBH_4), тетрахлоороаурат (III) водорода (HAuCl_4), цетилтриметиламмония бромид (cetyltrimethylammonium bromide — СТАВ).

Наночастицы SiO_2 синтезировали методом золь-гель по стандартной методике Штобера [11]. Для получения НЧ PLA использовали модифицированный метод нанопреципитации по известной методике [12]. Полученные НЧ были охарактеризованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) высокого разрешения (Merlin, Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 0,02–30,0 кВ. Перед измерениями по 1,5 мкл каждого вида НЧ, диспергированных в воде, наносили на покровное стекло и оставляли высыхать на 30 мин. Сухие образцы были визуализированы с помощью СЭМ.

Для прецизионных измерений высокого разрешения использовали просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) высокого разрешения Zeiss Libra 200F (Carl Zeiss, Германия) с ускоряющим напряжением 120–200 кВ, оснащенный автоэммиттером и энергетическим фильтром OMEGA (OMEGA AIR), Словения.

Получение тканевых эксплантатов печени. Тканевые эксплантаты печени получали из свежих образцов ткани размером 0,5×0,5 см с помощью вибрационного микротома 7000smz2 (Campden Instruments Ltd., Великобритания) с использованием следующих настроек: частота — 80 Гц, амплитуда колебаний — 2 мм, скорость лезвия — 0,4 мм/с, размер шага (толщина тканевого эксплантата) — 400 мкм. Предварительно образцы фиксировали на столике вибрационного микротомата. Сразу после получения каждый тканевой эксплантат помещали в буфер PBS на льду. Далее свежеприготовленные тканевые эксплантаты индивидуально переносили в ячейку 12-луночного планшета с 2 мл стандартной культуральной среды для проведения преинкубирования в течение 1 ч. Состав стандартной культуральной среды: DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% FBS (Gibco, США) (обеспечивает формирование «короны» из поверхностных биомолекул [13]), 4 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия), 0,1 мкМ дексаметазона (StemCells Technologies, США) и антибиотика-антимикотика, состоящего из 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл Fungizone (Gibco, США).

После преинкубации среду заменяли на свежую. Дальнейшее культивирование проводили в течение

3 ч. Затем среду снова заменяли на свежую стандартную и продолжали инкубирование для всех тканевых эксплантатов печени в течение 24 и 48 ч с начала культивирования в стандартных условиях CO₂-инкубатора.

Получение первичной культуры клеток печени. Первичную культуру клеток печени получали по модифицированному протоколу, описанному в работе V. Kegel с соавт. [14], с использованием коллагеназы II типа (Sigma, США) для удаления межклеточного вещества и с добавлением раствора лизирующего буфера в концентрации ×10 для удаления эритроцитов из клеточной суспензии. Полученные в результате две отдельные фракции гепатоцитов и непаренхиматозных клеток были очищены от клеточного дебриса и помещены в лунки 12-луночного планшета (10⁴ гепатоцитов на 2 мл стандартной культуральной среды). Дальнейшее культивирование проводили в стандартных условиях CO₂-инкубатора.

Оценка биораспределения наночастиц в первичной культуре клеток. Все три типа НЧ были модифицированы флуоресцентной меткой Cy5 (возбуждение на длине волны — 633 нм, эмиссия на длине волны — 670 нм) по методу, описанному в работе [15]. Все красители использованы в форме активированного эфира NHSester для связывания с BSA (бычий сывороточный альбумин). Для оценки биораспределения НЧ, меченных Cy5, в клетках печени проводили окрашивание клеточных ядер (Хекст; «ПанЭко», Россия; возбуждение — 405 нм, эмиссия — 457 нм) и лизосом (LysoTracker Yellow HCK-123; Invitrogen, США; возбуждение — 465 нм, эмиссия — 535 нм) в соответствии с протоколами производителей.

Оценка жизнеспособности клеток печени на модели тканевых эксплантатов и первичной культуры клеток. Жизнеспособность полученных тканевых эксплантатов печени и первичной культуры клеток печени подтверждали с применением окрашивания кальцеином и пропидием йодидом в соответствии с протоколом производителя (Live/Dead Cell Double Staining Kit; Thermo Fisher Scientific, США), окраску ядер клеток проводили с использованием красителя Хекст. Микроскопическое исследование выполняли на лазерном сканирующем микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Получали изображения с разрешением 1024×1024 пикселя и усреднением по двум сканам. Кальцеин: возбуждение на длине волны — 488 нм и регистрация сигнала в диапазоне 500–570 нм; пропидий йодид: возбуждение на длине волны — 543 нм и регистрация сигнала в диапазоне 600–700 нм; Хекст: возбуждение на длине волны — 405 нм и регистрация сигнала в диапазоне 457 нм. Для каждого образца были получены изображения 10 полей зрения.

Исследование печени с помощью мультифотонной микроскопии проводили в канале регистрации аутофлуоресценции НАД(Ф)Н. Для этого использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп

LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенный FLIM-приставкой SPC 150 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия), фемтосекундным лазером Mai Tai HP (Spectra-Physics, США) и масляно-иммерсионным объективом C-Apochromat W Korr (Carl Zeiss, Германия) с 40× увеличением и числовой апертурой 1,3. Размер поля зрения составлял 213×213 (1024×1024 пикселя). Возбуждающее излучение осуществляли с помощью Ti:Sa короткоимпульсного фемтосекундного лазера с частотой импульсов 80 МГц и длительностью 140±20 фс. НАД(Ф)Н: длина волны возбуждения — 750 нм, регистрация сигнала в диапазоне 450–490 нм. Мощность возбуждающего излучения составляла 6 мВт.

Статистический анализ. Для каждой временной точки эксперимента на модели тканевых эксплантатов и первичной культуры печени получали 8–10 полей зрения и для каждого поля зрения определяли параметры FLIM для 20–30 гепатоцитов. Статистический анализ проводили с применением программного обеспечения R-Studio. Статистические различия определяли с использованием процедуры попарного множественного сравнения. Различия в средних значениях между экспериментальными группами считали статистически значимыми при p≤0,05. Нормальность распределения определяли с применением теста Шапиро–Уилка, равенство дисперсии — с помощью критерия Фишера, для парного сравнения был использован парный t-критерий с поправкой Бонферрони.

Результаты

Оценка стабильности синтезированных наночастиц. В качестве материалов для получения НЧ были выбраны диоксид кремния SiO₂, PLA и Au. Микроскопические изображения всех типов НЧ представлены на рис. 1.

Главным критерием, определяющим размер синтезируемых НЧ, являлась их способность проходить через фенестрации сосудов печени и задерживаться в клетках на протяжении суток [16]. В связи с этим оптимальный размер НЧ должен быть порядка 100 нм. Размер синтезированных НЧ SiO₂ составил 100±10 нм, PLA — 100±5 нм и Au — 110±5 нм.

Оценка биораспределения наночастиц в клетках печени на модели тканевых печеночных эксплантатов и первичной культуры клеток печени. На основе литературных данных и результатов предварительных серий экспериментов нами были выбраны две концентрации НЧ, при которых происходило их накопление в клетках с минимальным повреждением. Для НЧ PLA были выбраны концентрации — 50 и 100 мкг на 1 мл культуральной среды (мкг/мл), для НЧ SiO₂ 50 и 100 мкг/мл, для НЧ Au — 25 и 50 мкг/мл (низкие концентрации Au были выбраны в связи с их выявленной токсичностью). Все дальнейшие серии экспериментов проводили с использованием подобранных концентраций НЧ.

Рис. 1. Микроскопическая визуализация полученных наночастиц. Просвечивающая электронная микроскопия PLA и Au; сканирующая электронная микроскопия — SiO₂

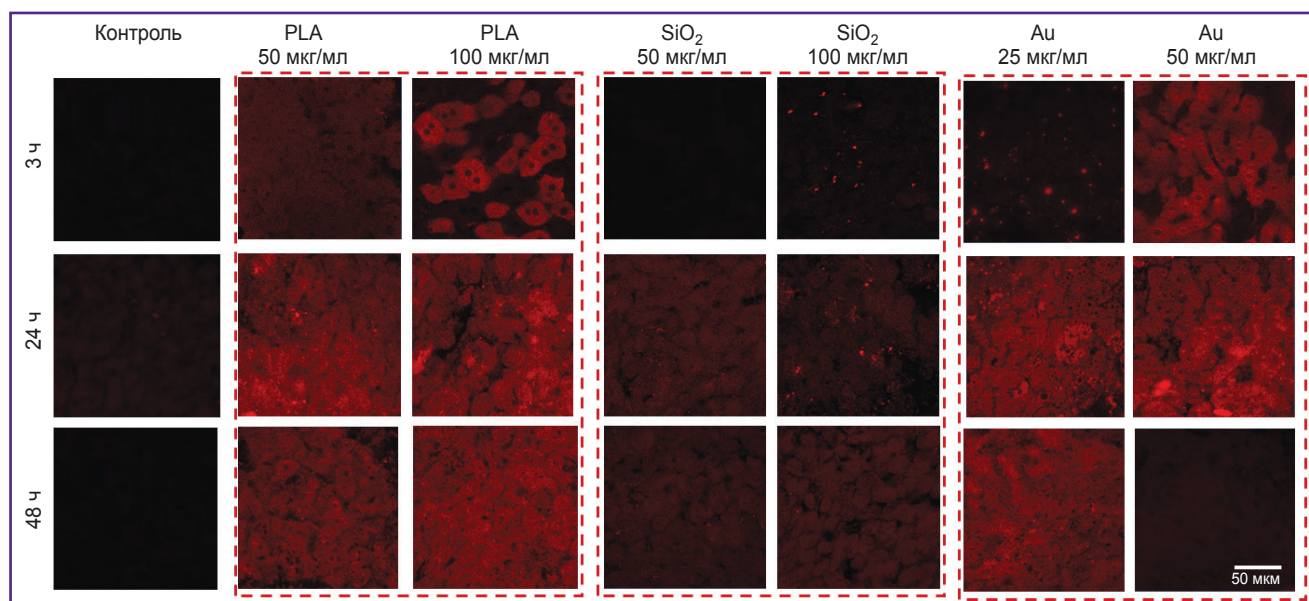
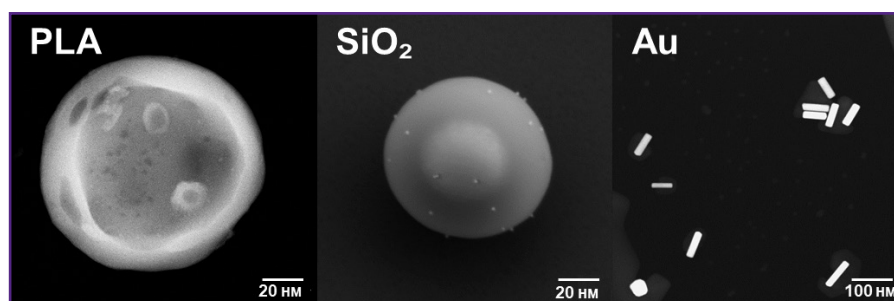


Рис. 2. Биораспределение наночастиц, меченных Cy5, в тканевых эксплантатах печени. Возбуждение Cy5 на длине волны 633 нм

Модель тканевых эксплантатов позволяет учесть влияние взаимодействия разных типов печеночных клеток на биораспределение НЧ. Модель первичной культуры клеток печени дает возможность более точно определить конкретный тип клеток, в которых накапливаются разные типы НЧ, а также оценить эффективность их высвобождения из лизосом.

Для обеих моделей все три типа НЧ, меченные Cy5, легко визуализировались без использования дополнительного окрашивания мембран.

На модели тканевых эксплантатов было показано, что именно НЧ PLA наиболее эффективно накапливаются в клетках печени, преимущественно в гепатоцитах. НЧ SiO₂ практически не проникали в клетки даже при использовании высокой концентрации (100 мкг/мл), значимое накопление наблюдалось только через 48 ч. НЧ Au также эффективно накапливались во всех типах клеток печени, однако при концентрации 50 мкг/мл было обнаружено резкое снижение интенсивности сигнала Cy5 через 48 ч культивирования, что может быть связано с токсическим воздействием НЧ. Результаты оценки биораспределения НЧ, меченных Cy5, представлены на рис. 2.

Наночастицы PLA эффективно накапливались в

клетках, преимущественно в гепатоцитах; в макрофагах их концентрация была ниже. Гепатоциты являются наиболее подходящей локализацией для накопления НЧ, так как именно эти клетки вносят наибольший вклад в регенераторный процесс печени. НЧ SiO₂ незначительно накапливались в клетках, в основном в макрофагах, что является неблагоприятной локализацией в связи с высокой литической активностью данных клеток. НЧ Au практически не обнаруживались в клетках печени. Вероятно, они вымывались из клеток при пробоподготовке для их визуализации. Убрать данный этап пробоподготовки не представляется возможным, что делает модель первичной культуры клеток печени непригодной для анализа биораспределения НЧ Au. Результаты биораспределения НЧ в первичной культуре клеток печени представлены на рис. 3.

Метаболический имиджинг тканевых эксплантатов печени и первичной культуры печени при воздействии трех типов наночастиц. При воздействии SiO₂ (50 и 100 мкг/мл) и PLA (50 и 100 мкг/мл) на тканевые эксплантаты структура клеток не нарушалась, при этом значения интенсивности аутофлуоресценции НАДФН практически не отличались от контроля (без воздействия НЧ). После воздействия

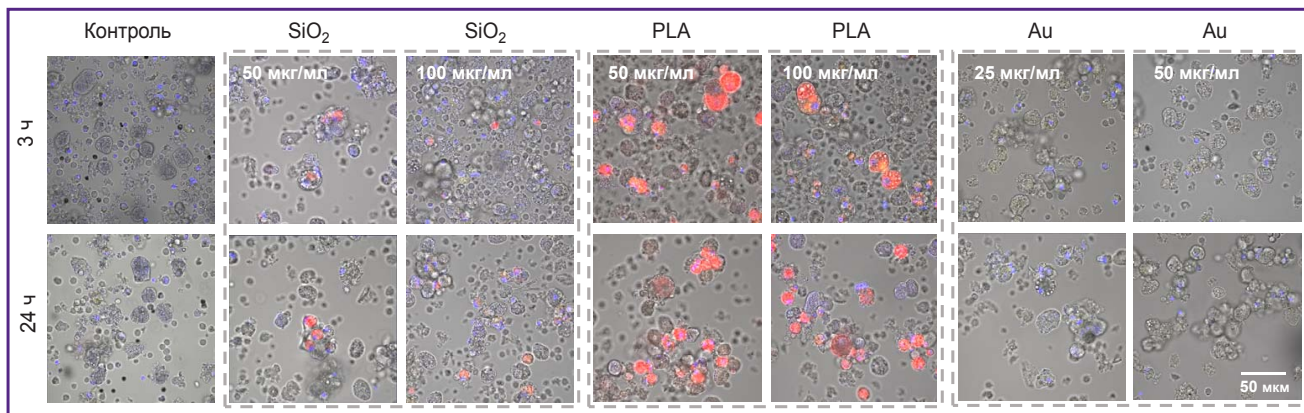


Рис. 3. Биораспределение наночастиц, меченных Cy5, в первичной культуре клеток печени

Наночастицы, меченные Cy5 (красный): возбуждение — 750 нм, эмиссия — 455–500 нм; лизотрекер LisoYellow, окрашивание лизосом (желтый): возбуждение — 800 нм, эмиссия — 371–421 нм; Хекст, окрашивание клеточных ядер (синий): возбуждение — 405 нм, эмиссия — 457 нм

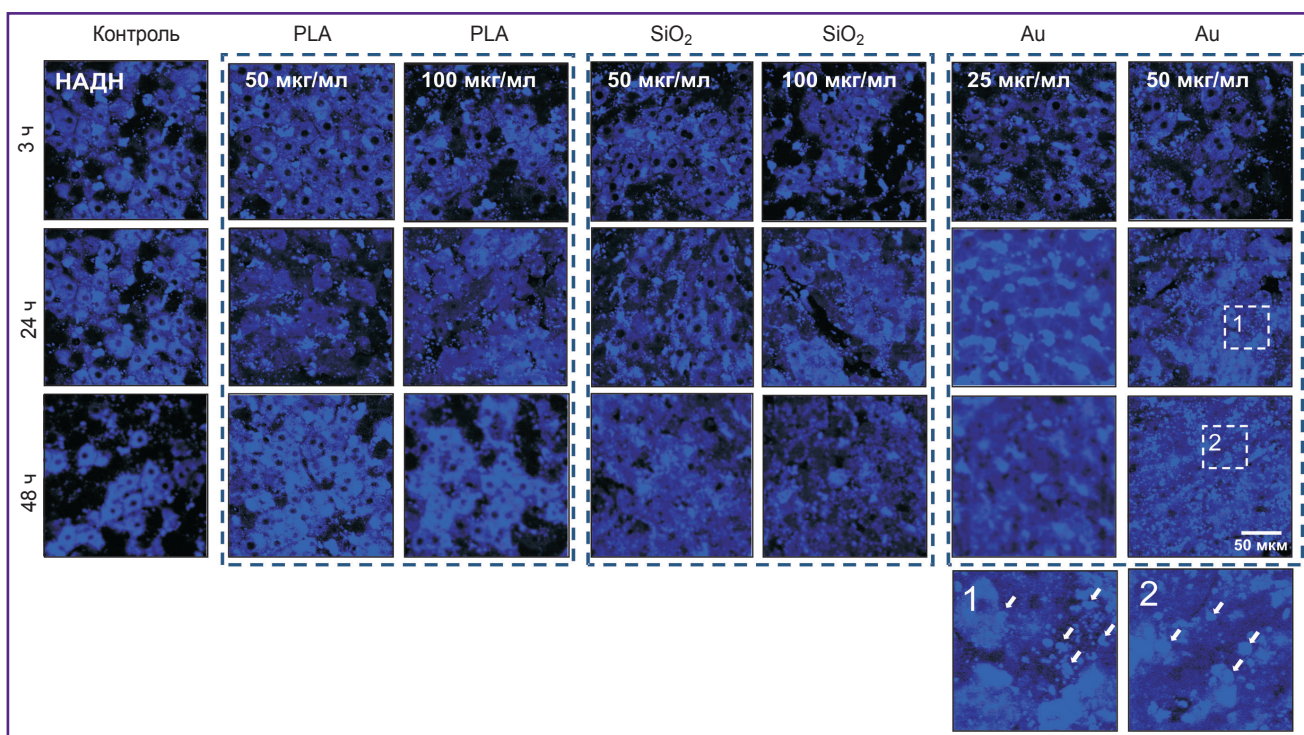


Рис. 4. Интенсивность аутофлуоресценции клеток печени тканевых эксплантов в канале НАДН при воздействии наночастиц без флуоресцентной метки

Возбуждение НАДН проводили на длине волны 750 нм. Белыми стрелками обозначены внутриклеточные везикулы

Au в концентрациях 25 и 50 мкг/мл были обнаружены апоптотические клетки (клетки со множеством везикул). Результаты мультифотонной микроскопии тканевых эксплантов в канале аутофлуоресценции НАДН представлены на рис. 4.

Проведена оценка FLIM-параметров в тканевых эксплантатах при воздействии разных типов НЧ. При воздействии НЧ PLA значения всех исследуемых FLIM-параметров (t_m , a_1 и a_2) практически не отли-

чались от соответствующих значений в контрольных образцах, что подтверждает безопасность данного типа НЧ для клеток печени (это особенно важно для гепатоцитов). При воздействии НЧ SiO₂ также не выявлено значимых изменений FLIM-параметров, однако в данном случае такой результат связан с неэффективным накоплением НЧ в клетках. Наконец, при воздействии НЧ Au при обеих исследуемых концентрациях была выявлена гетерогенность ткани печени по

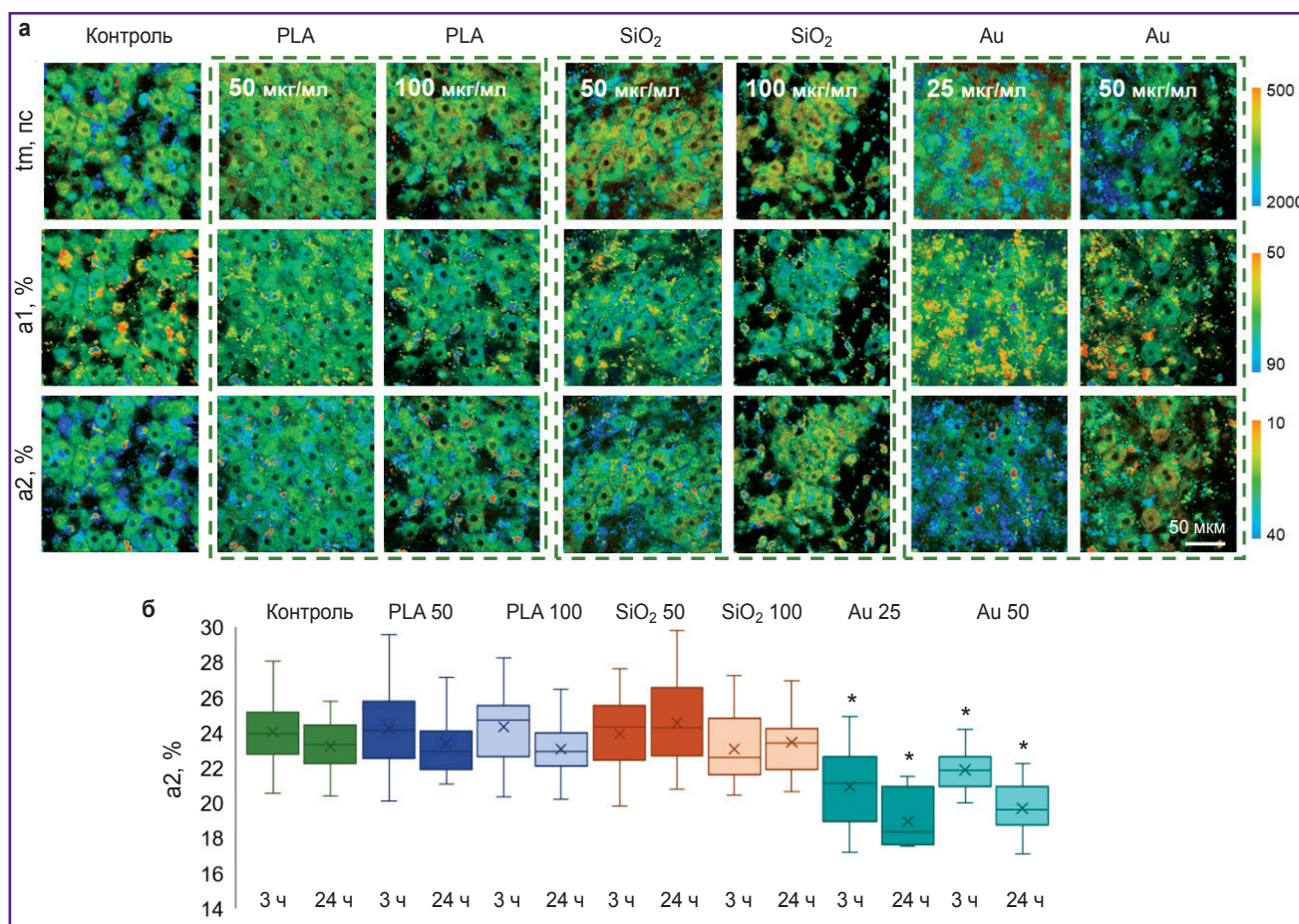


Рис. 5. Метаболический имиджинг тканевых эксплантатов печени при воздействии наночастиц без флуоресцентной метки:

а — псевдоокрашенные FLIM-изображения срезов печени через 3 ч культивирования; **б** — гистограммы распределения значений вкладов времен жизни флуоресценции связанной формы НАДН; * статистически значимое отличие от соответствующей временной точки в контроле ($p \leq 0,05$)

метаболическому статусу клеток, что свидетельствует о токсическом влиянии НЧ на отдельные клетки. Так, значения параметра a_2 значительно уменьшились через 24 и 48 ч культивирования с НЧ Au (рис. 5, б), что указывает на резкое снижение интенсивности окислительного фосфорилирования в клетках печени (основного метаболического пути гепатоцитов). Это является препятствием для дальнейшего применения НЧ Au в разработке стратегии стимуляции регенерации печени. Результаты FLIM-анализа тканевых эксплантатов печени при воздействии всех типов НЧ представлены на рис. 5.

В первичной культуре клеток при воздействии SiO₂ (50 и 100 мкг/мл) и PLA (50 и 100 мкг/мл) структура клеток не нарушается, значения интенсивности аутофлуоресценции НАДН не отличаются от контроля (без воздействия НЧ). В процессе воздействия Au при обеих концентрациях (25 и 50 мкг/мл) обнаружены апоптотические клетки. Результаты мультифотонной микроскопии в канале НАДН первичной культуры

клеток при воздействии всех типов НЧ представлены на рис. 6.

При воздействии НЧ PLA значения всех исследуемых FLIM-параметров (t_m , a_1 и a_2) в первичной культуре клеток печени незначительно отличались от соответствующих значений в контроле, однако обнаруживались единичные клетки с измененным метаболическим статусом (поврежденные гепатоциты). При воздействии НЧ SiO₂ в концентрации 50 мкг/мл отмечали значимое снижение a_2 (начальные этапы повреждения гепатоцитов), при этом для концентрации 100 мкг/мл через 3 ч культивирования наблюдали резкое увеличение значений a_2 в сравнении с контролем, что может свидетельствовать о повреждении гепатоцитов, так как аналогичные изменения происходят при токсическом воздействии парацетамола [17]. Через 24 ч культивирования значения a_2 снижаются, появляются некротические гепатоциты, что подтверждает токсический эффект данных НЧ. При воздействии НЧ Au отмечали значимое уменьшение значений a_2 для обеих

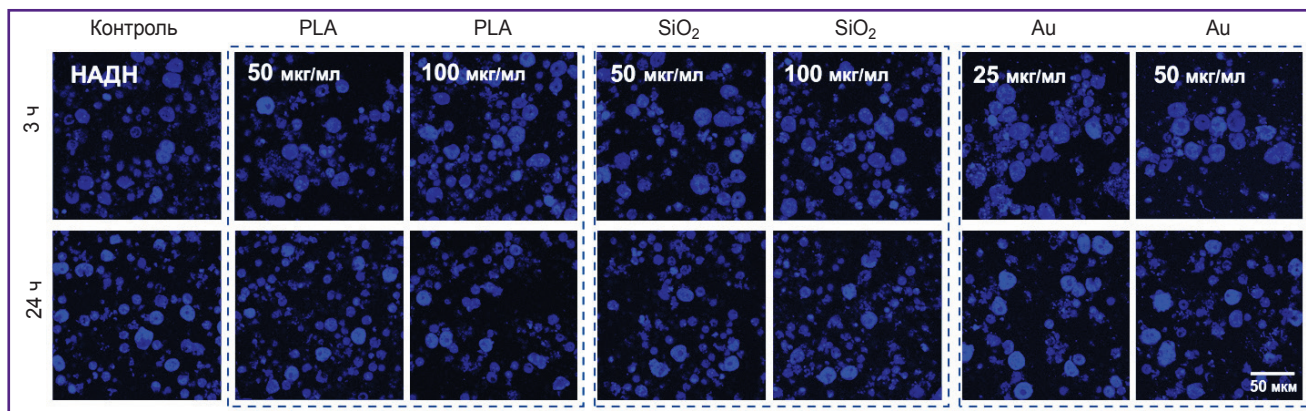


Рис. 6. Интенсивность аутофлуоресценции клеток печени первичной культуры в канале НАДН при воздействии наночастиц без флуоресцентной метки
Возбуждение НАДН проводили на длине волны 750 нм

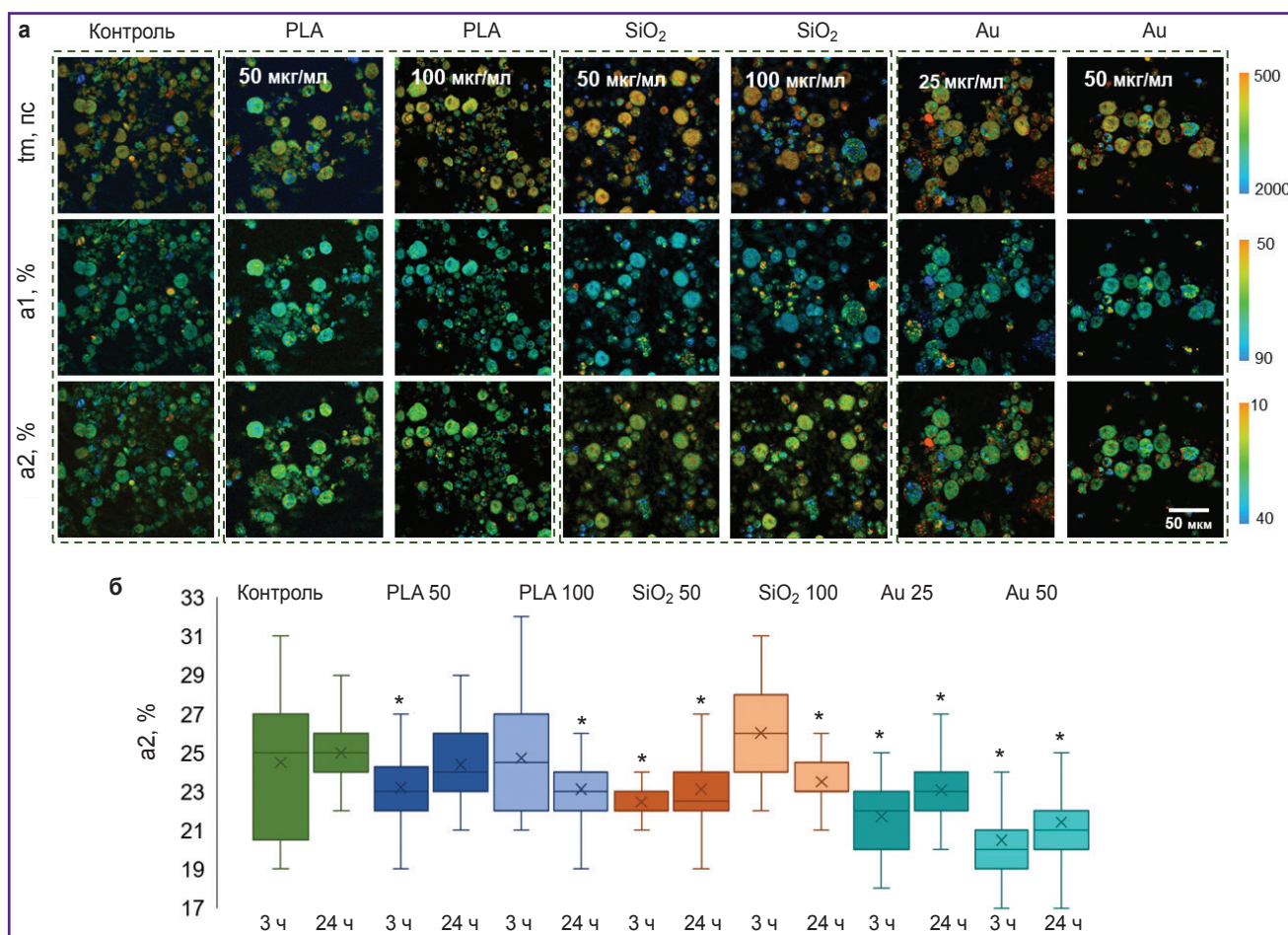


Рис. 7. Метаболический имиджинг первичной культуры клеток печени при воздействии наночастиц без флуоресцентной метки:

а — псевдоокрашенные FLIM-изображения срезов печени через 3 ч культивирования; б — гистограммы распределения значений вкладов времен жизни флуоресценции связанной формы НАДН; * статистически значимые отличия от соответствующей временной точки в контроле ($p < 0,05$)

концентраций, в поле зрения присутствовали некротические гепатоциты (менее 20% от общего количества клеток в поле зрения), что также указывает на значи-

тельный токсический эффект НЧ Au. Результаты FLIM-анализа первичной культуры клеток печени при воздействии всех типов НЧ представлены на рис. 7.

В целом можно сделать вывод, что только НЧ-PLA эффективно накапливаются в гепатоцитах и при этом не изменяют метаболический статус гепатоцитов.

Оценка цитотоксичности трех типов наночастиц на модели тканевых эксплантатов и первичной культуры клеток печени. Результаты оценки жизнеспособности клеток печени на модели тканевых эксплантатов представлены на рис. 8.

Полилактид и SiO₂ не оказывали токсического воздействия на тканевые эксплантаты. При воздействии

Au появлялось до 10–20% мертвых клеток уже через 3 ч культивирования.

Результаты оценки жизнеспособности клеток на модели первичной культуры представлены на рис. 9.

В первичной культуре клеток печени даже в контроле отмечено около 2% мертвых клеток через 3 ч культивирования. Меньше всего мертвых клеток наблюдалось при воздействии НЧ PLA, тогда как наибольший процент был при воздействии НЧ Au, в особенности в концентрации 50 мкг/мл.

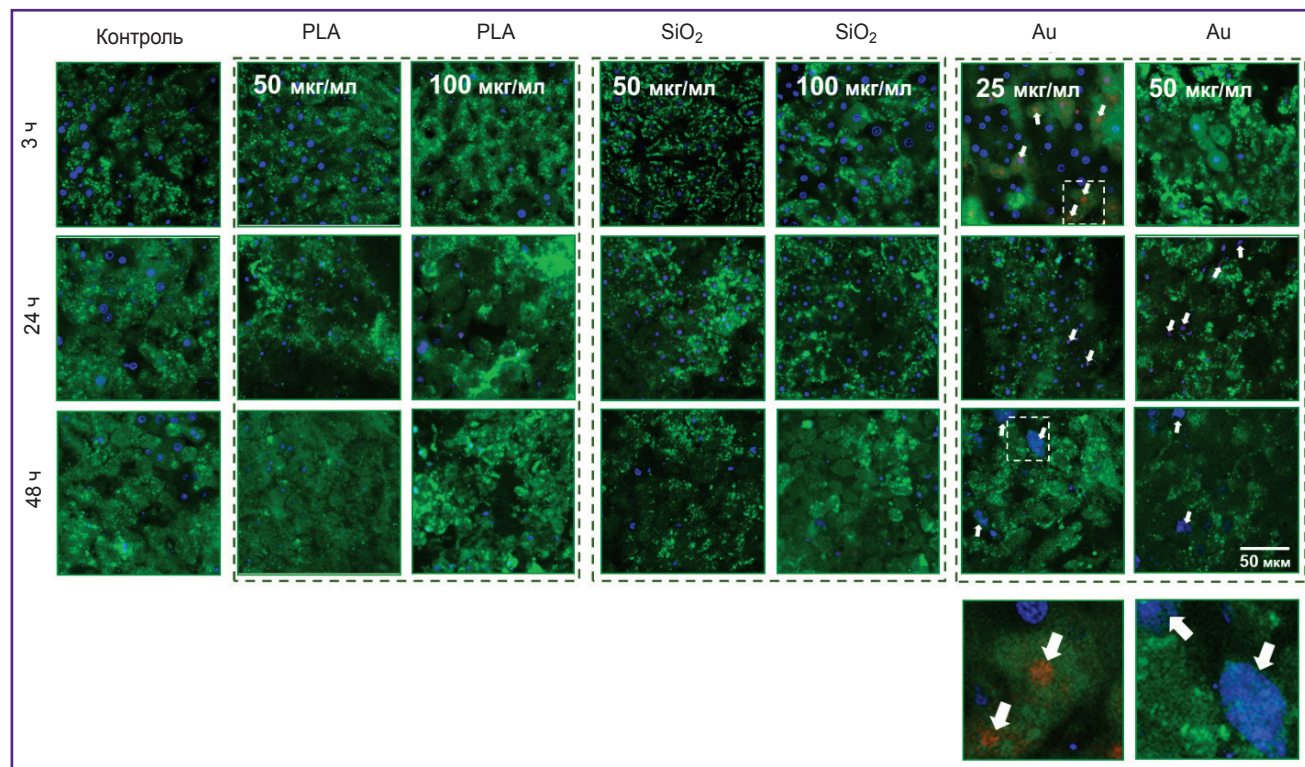


Рис. 8. Жизнеспособность клеток в тканевых эксплантатах печени при воздействии наночастиц

Окрашивание кальцеином (зеленый, живые клетки) и пропидием йодидом (красный, мертвые клетки); клеточные ядра — окраска Хекст (синий)

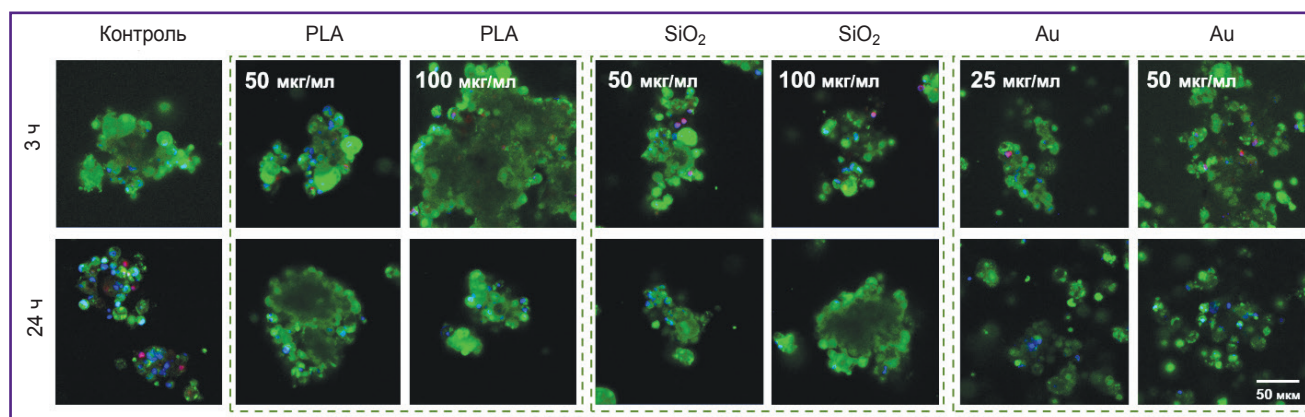


Рис. 9. Жизнеспособность клеток печени в первичной культуре при воздействии наночастиц

Окрашивание кальцеином (зеленый, живые клетки) и пропидием йодидом (красный, мертвые клетки), клеточные ядра — окраска Хекст (синий)

Обсуждение

Разработка систем для стимуляции регенерации печени на основе малых биоактивных молекул, в особенности микроРНК, является активно развивающимся направлением научных исследований. Одним из наиболее перспективных носителей для данных молекул считаются НЧ. Однако ряд вопросов, касающихся создания таких комплексов, до сих пор остаются нерешенными. В частности, не выявлен определенный тип НЧ, способный эффективно накапливаться в клетках печени. Изучение особенностей биораспределения наноматериалов имеет существенное значение для оценки возможности их применения для биомедицинских целей [1–7]. При этом наноматериалы должны быть разработаны так, чтобы не допускать их длительного захвата лизосомами клеток. Базовое понимание особенностей захвата и накопления клетками различных типов НЧ позволит выявить мишени для биоактивных молекул, регулирующих различные сигнальные пути, ассоциированные с регенерацией печени [18, 19].

Печень действует как система биологической фильтрации, которая изолирует 30–99% введенных НЧ из кровотока, что значительно упрощает процедуру создания наноконтейнеров в связи с отсутствием необходимости дополнительных модификаций для таргетной доставки.

В настоящей работе изучено три типа НЧ, которые представляются наиболее перспективными носителями для малых биоактивных молекул — PLA, SiO₂ и Au [5].

На данный момент НЧ SiO₂ широко применяются для доставки различных биоактивных веществ. Они обладают рядом достоинств — являются биоразлагаемыми и биосовместимыми. Кроме того, эти НЧ имеют универсальные физико-химические свойства поверхности, а процедура синтеза позволяет легко контролировать размер частиц и их пор, благодаря чему НЧ SiO₂ могут достаточно эффективно загружаться различными типами молекул. Уже сейчас кремниевые НЧ применяют с целью доставки химиопрепаратов для терапии рака [20], оптимизации доставки иммуностимулирующих молекул [21] и агентов для усиления проницаемости инсулина через клетки кишечника [22], а также при доставке предсердного натрийуретического пептида для терапии сердечной недостаточности [23]. Более того, было показано, что введение даже «голых» НЧ SiO₂ повышает защиту печени от окислительного повреждения [24], способствует снижению фиброза [25]. Однако крупные НЧ SiO₂ размером порядка 100–200 нм вызывают воспалительную реакцию в печени у мышей уже через 12 ч после их введения в системный кровоток [26]. Целью нашей работы была оценка особенностей биораспределения НЧ SiO₂, но не их терапевтических свойств. Была показана низкая эффективность накопления НЧ SiO₂ в клетках печени, в связи с чем мы полагаем, что данный тип частиц не

подходит для создания комплексов с биоактивными молекулами.

Наночастицы Au на протяжении нескольких десятилетий используют для доставки разного рода молекул [27, 28]. Однако в нашей работе был показан выраженный токсический эффект НЧ Au, что согласуется с работами других авторов. Известно, что форма и размер НЧ Au влияют на их токсичность. НЧ Au размером менее 30 нм вызывают наибольший токсический эффект, так как способны проникать в ядро и повреждать ДНК в результате непрямого окислительного стресса. Были выявлены основные метаболические изменения, которые ведут к повреждению клеток печени по пути апоптоза, включая запуск перекисного окисления липидов [29], стремительное истощение цитозольного глутатиона с одновременным увеличением выработки активных форм кислорода, деполяризацию трансмембранного потенциала митохондрий [30]. Такой выраженный эффект НЧ Au на окислительный статус гепатоцитов является дозозависимым, [31] что делает НЧ Au непригодными для создания комплексов с биоактивными молекулами.

Наночастицы PLA представляет собой биосовместимый и биоразлагаемый сополимер, который на данный момент является наиболее эффективным полимерным носителем для доставки лекарств и разного рода молекул. Что особенно важно, PLA разрешен для клинического применения [32, 33]. В нашей работе показано, что НЧ PLA максимально накапливаются в гепатоцитах уже через 24 ч после их добавления в культуральную среду. Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов. Так, в работе S. Poilil Surendran с соавт. на моделях мышей с фиброзом, индуцированным CCl₄, было установлено, что НЧ PLA накапливаются в разных типах клеток печени и подходят для пассивной и таргетной доставки лекарств при лечении фиброза печени [33]. В работе M.E. El-Naggar с соавт. [34] была продемонстрирована эффективность таргетной доставки антиоксидантных молекул в клетки печени для снижения окислительного стресса в случае развития воспаления при сахарном диабете 1-го типа.

Наиболее предпочтительным типом клеток для накопления НЧ являются гепатоциты, так как восстановление печени в первую очередь происходит за счет их деления. Кроме того, поглощение гепатоцитами увеличивается для НЧ с положительным зета-потенциалом в отличие от макрофагов, которые преимущественно поглощают отрицательно заряженные НЧ [35]. В нашей работе мы учитывали данный аспект, в связи с чем НЧ дополнительно покрывали молекулами полиэтиленгликоля, который создает слабо положительный зета-потенциал для НЧ [36].

Заключение

Проведено исследование особенности биораспределения трех наночастиц (PLA, SiO₂ и Au) в

клетках печени на моделях тканевых эксплантатов печени и первичной культуры клеток печени. Наночастицы SiO₂ преимущественно захватываются макрофагами, которые в большом количестве генерируют активные формы кислорода, что способствует разрушению биоактивных молекул. Более того, наночастицы SiO₂ нарушают нативный метаболический статус гепатоцитов. Наночастицы Au эффективно накапливаются во всех типах клеток печени, однако обладают выраженным токсическим эффектом, на что указывает появление некротических и апоптотических клеток, а также резкое изменение метаболического статуса гепатоцитов. Наконец, наночастицы PLA наиболее эффективно накапливаются в клетках печени, преимущественно в гепатоцитах, не изменяют их нативный метаболический статус, что делает данный тип наночастиц максимально перспективным для создания систем доставки биоактивных молекул с целью стимуляции регенерации печени.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда №19-15-00263п (метаболический имиджинг тканевых эксплантатов и первичной культуры гепатоцитов) и №23-15-00421 (синтез и характеристика наночастиц).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Quek J., Chan K.E., Wong Z.Y., Tan C., Tan B., Lim W.H., Tan D.J.H., Tang A.S.P., Tay P., Xiao J., Yong J.N., Zeng R.W., Chew N.W.S., Nah B., Kulkarni A., Siddiqui M.S., Dan Y.Y., Wong V.W., Sanyal A.J., Nouredin M., Muthiah M., Ng C.H. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2023; 8(1): 20–30, [https://doi.org/10.1016/s2468-1253\(22\)00317-x](https://doi.org/10.1016/s2468-1253(22)00317-x).
2. Yi P.S., Zhang M., Xu M.Q. Role of microRNA in liver regeneration. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2016; 15(2): 141–146, [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(15\)60036-4](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(15)60036-4).
3. Zhao Z., Lin C.Y., Cheng K. siRNA- and miRNA-based therapeutics for liver fibrosis. *Transl Res* 2019; 214: 17–29, <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.07.007>.
4. Wu P., Luo X., Wu H., Zhang Q., Dai Y., Sun M. Efficient and targeted chemo-gene delivery with self-assembled fluoro-nanoparticles for liver fibrosis therapy and recurrence. *Biomaterials* 2020; 261: 120311, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120311>.
5. Lee S.W.L., Paoletti C., Campisi M., Osaki T., Adriani G., Kamm R.D., Mattu C., Chiono V. MicroRNA delivery through nanoparticles. *J Control Release* 2019; 313: 80–95, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.007>.
6. Taghizadeh S., Alimardani V., Roudbali P.L., Ghasemi Y., Kaviani E. Gold nanoparticles application in liver cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019; 25: 389–400, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.027>.
7. de Carvalho T.G., Garcia V.B., de Araújo A.A., da Silva Gasparotto L.H., Silva H., Guerra G.C.B., de Castro Miguel E., de Carvalho Leitão R.F., da Silva Costa D.V., Cruz L.J., Chan A.B., de Araújo Júnior R.F. Spherical neutral gold nanoparticles improve anti-inflammatory response, oxidative stress and fibrosis in alcohol-methamphetamine-induced liver injury in rats. *Int J Pharm* 2018; 548(1): 1–14, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.008>.
8. Hyun J., Wang S., Kim J., Rao K.M., Park S.Y., Chung I., Ha C.S., Kim S.W., Yun Y.H., Jung Y. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression. *Nat Commun* 2016; 7(1): 10993, <https://doi.org/10.1038/ncomms10993>.
9. Kumar V., Mahato R.I. Delivery and targeting of miRNAs for treating liver fibrosis. *Pharm Res* 2015; 32(2): 341–361, <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1497-x>.
10. Caldez M.J., Van Hul N., Koh H.W.L., Teo X.Q., Fan J.J., Tan P.Y., Dewhurst M.R., Too P.G., Talib S.Z.A., Chiang B.E., Stünkel W., Yu H., Lee P., Fuhrer T., Choi H., Björklund M., Kaldis P. Metabolic remodeling during liver regeneration. *Dev Cell* 2018; 47(4): 425–438.e5, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.020>.
11. Stöber W., Fink A., Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci* 1968; 26(1): 62–69, [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).
12. Chorny M., Fishbein I., Danenberg H.D., Golomb G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *J Control Release* 2002; 83(3): 389–400, [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00211-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00211-0).
13. Bartucci R., Åberg C., Melgert B.N., Boersma Y.L., Olinga P., Salvati A. Time-resolved quantification of nanoparticle uptake, distribution, and impact in precision-cut liver slices. *Small* 2020;16(21): 1906523, <https://doi.org/10.1002/sml.201906523>.
14. Kegel V., Deharde D., Pfeiffer E., Zeilinger K., Seehofer D., Damm G. Protocol for isolation of primary human hepatocytes and corresponding major populations of non-parenchymal liver cells. *J Vis Exp* 2016; 109: e53069, <https://doi.org/10.3791/53069>.
15. Zyuzin M.V., Antuganov D., Tarakanichikova Y.V., Karpov T.E., Mashel T.V., Gerasimova E.N., Peltek O.O., Alexandre N., Bruyere S., Kondratenko Y.A., Muslimov A.R., Timin A.S. Radiolabeling strategies of micron- and submicron-sized core-shell carriers for in vivo studies. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020; 12(28): 31137–31147, <https://doi.org/10.1021/acsami.0c06996>.
16. Zhang Y.N., Poon W., Tavares A.J., McGilvray I.D., Chan W.C.W. Nanoparticle-liver interactions: cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release* 2016; 240: 332–348, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.020>.
17. Rodimova S., Mozherov A., Elagin V., Karabut M., Shchekhin I., Kozlov D., Krylov D., Gavrina A., Bobrov N., Zagaynov V., Zagaynova E., Kuznetsova D. Label-free imaging techniques to evaluate metabolic changes caused by toxic liver injury in PCLS. *Int J Mol Sci* 2023; 24(11): 9195, <https://doi.org/10.3390/ijms24119195>.
18. Chen X., Zhao Y., Wang F., Bei Y., Xiao J., Yang C. MicroRNAs in liver regeneration. *Cell Physiol Biochem* 2015; 37(2): 615–628, <https://doi.org/10.1159/000430381>.
19. Forbes S.J., Newsome P.N. Liver regeneration — mechanisms and models to clinical application. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13(8): 473–485, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.97>.

20. Liu J., Chen Q., Feng L., Liu Z. Nanomedicine for tumor microenvironment modulation and cancer treatment enhancement. *Nano Today* 2018; 21: 55–73, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.06.008>.
21. Shahbazi M.A., Fernández T.D., Mäkilä E.M., Le Guével X., Mayorga C., Kaasalainen M.H., Salonen J.J., Hirvonen J.T., Santos H.A. Surface chemistry dependent immunostimulative potential of porous silicon nanoplatforms. *Biomaterials* 2014; 35(33): 9224–9235, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.050>.
22. Shrestha N., Araujo F., Shahbazi M.A., Mäkilä E., Gomes M.J., Herranz-Blanco B., Lindgren R., Granroth S., Kukk E., Salonen J., Hirvonen J., Santos H.A. Thiolation and cell-penetrating peptide surface functionalization of porous silicon nanoparticles for oral delivery of insulin. *Adv Funct Mater* 2016; 26(20): 3405–3416, <https://doi.org/10.1002/adfm.201505252>.
23. Ferreira M.P., Ranjan S., Correia A.M., Mäkilä E.M., Kinnunen S.M., Zhang H., Shahbazi M.A., Almeida P.V., Salonen J.J., Ruskoaho H.J., Airaksinen A.J., Hirvonen J.T., Santos H.A. In vitro and in vivo assessment of heart-homing porous silicon nanoparticles. *Biomaterials* 2016; 94: 93–104, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.046>.
24. Liu Z., Li Y., Li W., Xiao C., Liu D., Dong C., Zhang M., Mäkilä E., Kemell M., Salonen J., Hirvonen J.T., Zhang H., Zhou D., Deng X., Santos H.A. Multifunctional nanohybrid based on porous silicon nanoparticles, gold nanoparticles, and acetalated dextran for liver regeneration and acute liver failure theranostics. *Adv Mater* 2018; 30(24): e1703393, <https://doi.org/10.1002/adma.201703393>.
25. Peng F., Tee J.K., Setyawati M.I., Ding X., Yeo H.L.A., Tan Y.L., Leong D.T., Ho H.K. Inorganic nanomaterials as highly efficient inhibitors of cellular hepatic fibrosis. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018; 10(38): 31938–31946, <https://doi.org/10.1021/acsami.8b10527>.
26. Boey A., Ho H.K. All roads lead to the liver: metal nanoparticles and their implications for liver health. *Small* 2020; 16(21): e2000153, <https://doi.org/10.1002/sml.202000153>.
27. Siddique S., Chow J.C.L. Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. *Appl Sci* 2020; 10(11): 3824, <https://doi.org/10.3390/app10113824>.
28. Amina S.J., Guo B. A review on the synthesis and functionalization of gold nanoparticles as a drug delivery vehicle. *Int J Nanomedicine* 2020; 15: 9823–9857, <https://doi.org/10.2147/ijn.s279094>.
29. Khan H.A., Abdelhalim M.A., Alhomida A.S., Al-Ayed M.S. Effects of naked gold nanoparticles on proinflammatory cytokines mRNA expression in rat liver and kidney. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 590730, <https://doi.org/10.1155/2013/590730>.
30. Gao W., Xu K., Ji L., Tang B. Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicol Lett* 2011; 205(1): 86–95, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.1018>.
31. Sani A., Cao C., Cui D. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): a review. *Biochem Biophys Res* 2021; 26: 100991, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100991>.
32. Devulapally R., Foygel K., Sekar T.V., Willmann J.K., Paulmurugan R. Gemcitabine and antisense-microRNA co-encapsulated PLGA-PEG polymer nanoparticles for hepatocellular carcinoma therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016; 8(49): 33412–33422, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b08153>.
33. Poilil Surendran S., George Thomas R., Moon M.J., Jeong Y.Y. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 6997–7006, <https://doi.org/10.2147/ijn.s145951>.
34. El-Naggat M.E., Al-Joufi F., Anwar M., Attia M.F., El-Bana M.A. Curcumin-loaded PLA-PEG copolymer nanoparticles for treatment of liver inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019; 177: 389–398, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.024>.
35. Wang H., Thorling C.A., Liang X., Bridle K.R., Grice J.E., Zhu Y., Crawford D.H.G., Xu Z.P., Liu X., Roberts M.S. Diagnostic imaging and therapeutic application of nanoparticles targeting the liver. *J Mater Chem B* 2015; 3(6): 939–958, <https://doi.org/10.1039/c4tb01611d>.
36. Cornu R., Béduneau A., Martin H. Influence of nanoparticles on liver tissue and hepatic functions: a review. *Toxicology* 2020; 430: 152344, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152344>.