

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ КРЫСАМ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА С РАЗЛИЧНЫМИ ОБОЛОЧКАМИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ И МОРФОЛОГИЮ ЭНДОТЕЛИЯ И НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС

Торопова Я. Г.¹, Моторина Д. С.², Горшкова М. Н.², Гареев К. Г.³,
Королев Д. В.¹, Мужикян А. А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург,
Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им.
В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Торопова Яна Геннадьевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
пр. Пархоменко, д. 15, Санкт-Петербург,
Россия, 194156.
Email: toropova_yag@almazovcentre.ru

*Статья поступила в редакцию 30.01.2020
и принята к печати 06.04.2020.*

Резюме

Актуальность. На сегодняшний день активно ведутся разработки наночастиц для таргетной доставки лекарственных препаратов. Отдельное место занимают магнитные наночастицы (МНЧ) на основе оксидов железа ввиду их химической стабильности, относительно высокой биосовместимости и сравнительной легкости получения. Немодифицированные МНЧ могут легко окисляться, что, вероятно, приведет к токсическим эффектам и потере магнитной и коллоидной устойчивости, во избежание данных эффектов необходимо нанесение покрытия на их поверхность с последующим исследованием их влияния на эндотелий сосудов и антиоксидантный статус. **Цель работы.** Изучение влияния внутривенного введения крысам МНЧ на основе оксида железа с различными оболочками на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус. **Материалы и методы.** В данной работе использованы коллоидные растворы наночастиц магнетита, покрытые оболочками из альбумина (МНЧ + альбумин), полилактида (МНЧ + полилактид) и полисахарида (МНЧ + полисахарид), в 0,9 %-ом растворе NaCl. Исследование проводили на крысах-самцах стока Wistar SPF-категории. МНЧ вводились однократно в латеральную хвостовую вену крыс. Гистологическими методами была изучена морфология сосудов. Для исследования функциональной активности эндотелия использовали метод проволоочной миографии. Оценивались концентрации оксида азота и продуктов перекисного окисления липидов. Методом люминол-активированной хемилюминисценции оценены общая антиоксидантная активность и общая антиоксидантная емкость плазмы крови, полученной после введения МНЧ. **Результаты.** Однократное внутривенное введение крысам МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ + полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению. Исследуемые виды магнитных наночастиц не влияют на метаболическую активность эндотелия и морфологию сосудов. Установлено,

что введение исследуемых агентов обуславливает снижение уровня перекисного окисления липидов. МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид при их однократном внутривенном введении обеспечивают схожий по выраженности, но разный по механизмам реализации эффект на антиоксидантный статус. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые виды МНЧ обладают равнозначной биосовместимостью при их однократном внутривенном введении крысам.

Ключевые слова: антиоксидантный статус, биосовместимость, магнитные наночастицы, проволоочная миография, хемилюминесценция, эндотелий.

Для цитирования: Торопова Я.Г., Моторина Д.С., Горшкова М.Н. и др. Влияние внутривенного введения крысам наночастиц магнетита с различными оболочками на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус. *Трансляционная медицина.* 2020;7(2): 52–64. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-52-64.

THE EFFECT OF INTRAVENOUS ADMINISTRATION TO RATS OF MAGNETITE NANOPARTICLES WITH VARIOUS SHELLS ON THE FUNCTIONAL STATE AND MORPHOLOGY OF THE ENDOTHELIUM AND ON ANTIOXIDANT STATUS

Toropova Y. G.¹, Motorina D. S.², Gorshkova M. N.², Gareev K. G.³, Korolev D. V.¹, Muzhikyan A. A.¹

Corresponding author:

Toropova Yana G.
Almazov National Medical Research Centre
Parkhomenko str. 15-B,
Saint Petersburg, Russia, 194156
Email: toropova_yag@almazovcentre.ru

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University,
Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint Petersburg,
Russia

Received 30 January 2020; accepted 06 April 2020.

Abstract

Background. Today, the development of nanoparticles for targeted drug delivery is underway. A separate place is occupied by magnetic nanoparticles based on iron oxides (MNPs) due to their chemical stability, relatively high biocompatibility, and comparative ease of preparation. Unmodified MNPs can easily be oxidized, that can lead to toxic effects and a loss of magnetic and colloidal stability, in order to avoid these effects, it is necessary to coat their surface, then to study of their effect on vascular endothelium and antioxidant status. **Objective.** The aim of the work was to study the effect of intravenous injection to rats of magnetic nanoparticles of iron oxide with various shells on the functional condition and morphology of the endothelium and on antioxidant status. **Design and methods.** In this work, we used colloidal solutions of magnetite nanoparticles (MNP) in a 0.9 % NaCl solution. MNPs were coated with albumin (MNP + albumin), polylactide (MNP + polylactide) and polysaccharide (MNP + polysaccharide). The study was performed on male rats of the Wistar SPF-category. MNP were injected once into the lateral tail vein of rats. Vascular morphology was studied by histological methods. The functional activity of the endothelium was studied by wire myography method. The concentration of nitric oxide and the concentration of lipid peroxidation products were evaluated by enzyme immunoassay. Total antioxidant activity and total antioxidant capacity of plasma were evaluated by using the method of luminol-activated chemiluminescence. **Results.** A single intravenous injection to rats of MNP + albumin and MNP + polylactide does not provide changes in vascular reactivity, however, the introduction of MNP + polysaccharide

causes a decrease in endothelium-dependent relaxation while maintaining the ability to reduce. The studied types of magnetic nanoparticles do not affect the metabolic activity of the endothelium and vascular morphology. It was found that the introduction of the studied agents causes a decrease in the level of lipid peroxidation. MNP + albumin, MNP + polylactide, and MNP + polysaccharide, when it injected once intravenously, provide a similar effect, but different mechanisms of realization on the antioxidant status. **Conclusion.** The obtained data indicate that the studied species of MNPs have equal biocompatibility when they are once administered intravenously to rats.

Key words: antioxidant status, biocompatibility, chemiluminescence, endothelium, magnetic nanoparticles, wire myography.

For citation: Toropova Y.G., Motorina D.S., Gorshkova M.N. et al. The effect of intravenous administration to rats of magnetite nanoparticles with various shells on the functional state and morphology of the endothelium and on antioxidant status. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(2): 52–64. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-52-64.

Список сокращений:

АБАП — 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, АО — антиоксидант, АОА — антиоксидантная активность, АОЕ — антиоксидантная емкость, АХ — ацетилхолин, ИФА — иммуноферментный анализ, МНЧ — магнитные наночастицы, МНЧ + альбумин — магнитные наночастицы, покрытые оболочкой из альбумина, МНЧ + полилактид — магнитные наночастицы, покрытые оболочкой из полилактида, МНЧ + полисахарид — магнитные наночастицы, покрытые оболочкой из полисахарида, ФЭ — фенилэфрин, ХЛ — люминол-активированная хемилюминесценция, E_{\max} — значение максимальной величины ответа сосудов, ΔI — прирост интенсивности хемилюминесценции после выхода сигнала на плато, $\log EC_{50}$ — логарифм концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа, S — площадь «провала», или область подавления свечения после внесения плазмы в кювету, $\operatorname{tg} \alpha$ — тангенс угла наклона кривой во время нарастания интенсивности хемилюминесценции после ингибирования свечения.

Введение

На сегодняшний день активно ведутся разработки наночастиц для биомедицинских применений. Отдельное место в широком спектре наночастиц (липосомы, неорганические и полимерные наночастицы, наностержни и т. д.) занимают магнитные наночастицы (МНЧ) на основе оксидов железа ввиду их химической стабильности, относительно высокой биосовместимости и сравнительной легкости получения наночастиц магнетита и маггемита ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), а также возможности придания различных свойств посредством поверхностной модификации. МНЧ могут использоваться для адресной доставки лекарственных препаратов [1–3] в качестве

теплогенерирующих систем для гипертермического воздействия [4], в качестве контрастных агентов для магнитной резонансной томографии (МРТ) [3]. Перспективной областью применения МНЧ является создание чувствительных биосенсоров [5]. К недостаткам немодифицированных наночастиц можно отнести их способность легко окисляться в условиях окружающей среды (что, в свою очередь, может обуславливать токсические эффекты), а также потерю магнитной и коллоидной устойчивости [6]. Кроме того, агрегация наночастиц приводит к их быстрому обнаружению иммунной системой и, как следствие, уменьшению времени нахождения в кровотоке. Для обеспечения высокой коллоидной стабильности и преодоления тенденции к агрегации, повышения биосовместимости, а также для увеличения времени циркуляции наночастиц в кровотоке необходимо нанесение покрытия на их поверхность [7–8]. В качестве оболочек для МНЧ могут использоваться биосовместимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль, полисахариды (декстран, крахмал и хитозан), полилактид [9] и др. Также естественным веществом для формирования биodeградируемой оболочки является альбумин — белок, содержащийся в плазме крови и формирующий «белковую корону» на поверхности необработанных наночастиц при введении в кровоток [10]. Известно, что наличие оболочки и ее качественный состав в значительной степени определяют механизм биологического действия и оказываемые эффекты [11]. Ранее авторами было подтверждено активное взаимодействие непокрытых наночастиц с эндотелием при их внутривенном введении [10, 12]. Данный факт обуславливает необходимость при модификации поверхности МНЧ проведения исследований, направленных на изучение эффектов взаимодействия МНЧ (при их внутривенном введении) с эндотелием сосудов.

Кроме того, необходимо учитывать при этом реализацию основного классического механизма, лежащего в основе токсического эффекта МНЧ — окислительного стресса.

Таким образом, целью исследования явилось сравнительное изучение влияния внутривенного введения крысам МНЧ на основе оксида железа с различными оболочками на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус.

Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах-самцах стока Wistar SPF-категории массой $250 \text{ г} \pm 10 \%$, содержащихся на полном пищевом рационе соответственно суточным нормативам питания для данного вида животных, при стандартном суточном свето-темновом режиме. Эксперимент проводили, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В постановке опытов руководствовались требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Синтез исследуемых агентов

В данной работе использованы МНЧ на основе магнетита с различными оболочками: МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид.

Синтез наночастиц магнетита. Раствор, объемом 1000 мл, содержащий смесь сульфатов железа (II), железа (III) и оксалата аммония в мольном соотношении 2:1:0.1, постоянно перемешивали со скоростью 4 мл/мин при добавлении 50 %-го раствора гидроксида аммония. МНЧ синтезировали до фиксации насыщенно черной окраски и установления значения pH 8–9. При помощи дискового неодимового магнита полученную суспензию подвергали осаждению, а затем промывали 4 раза дистиллированной водой. Для подготовки сухой пробы полученные МНЧ подвергались лиофильной сушке при температуре $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ и давлении 3 Па в течение 7 суток.

Для синтеза был использован модифицированный реактор идеального смешения периодического действия емкостью резервуара 2000 мл (YNCHEM, Китай).

Получение опытных образцов МНЧ с различными оболочками:

Оболочка на основе полилактида. К 200 мг МНЧ добавляли 2 мл раствора PLA-D,L в хло-

роформе концентрацией 0,1 г/мл и 2 мл раствора карбоплатина в диметилсульфоксиде. Затем полученную суспензию с использованием шейкера LS-220 (LOIP, Россия) перемешивали 30 минут с частотой 300 мин^{-1} . После чего три раза промывали с магнитной сепарацией. В качестве растворителя на первой и второй промывке использовали хлороформ или изопропиловый спирт. В случае использования изопропилового спирта добавление его в суспензию производили при постоянном ультразвуковом воздействии длительностью 5–10 минут с использованием ультразвукового диспергатора УЗД-2 (ФГУП НИИ ТВЧ, Россия). После третьей промывки изопропиловым спиртом полученный осадок редиспергировали в дистиллированной воде, замораживали и лиофилизировали при температуре $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ и давлении 30 Па в течение 48 часов на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США).

Оболочка из полисахаридов. Оболочку из полисахаридов наносили гидротермальным методом. Суспензию МНЧ обрабатывали насыщенным водным раствором глюкозы с добавлением карбоплатина при повышенном давлении до 50 МПа в течение 24 часов. К 50 мг МНЧ добавляли 1 мл водного раствора карбоплатина концентрацией 5 мг/мл и 200 мг глюкозы. После этого производили перемешивание суспензии с использованием шейкера LS-220 (LOIP, Россия) в течение 30 минут с частотой 300 мин^{-1} . Затем доводили объем образца до 15 мл добавлением дистиллированной воды и загружали в стальной мини-автоклав с вкладышем из политетрафторэтилена КН-25 (КНР). После остывания реактора естественным образом до комнатной температуры полученные МНЧ, промывали водой трехкратно с магнитной сепарацией. Затем осадок замораживали и лиофилизировали при температуре $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ и давлении 30 Па в течение 48 часов на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США).

Оболочка из альбумина. К 50 мг МНЧ добавляли 1 мл раствора альбумина человека в воде концентрацией 0,2 г/мл и 1 мл раствора карбоплатина в воде концентрацией 5 мг/мл. Полученную суспензию перемешивали с использованием шейкера LS-220 (LOIP, Россия) в течение 30 минут с частотой 300 мин^{-1} . Затем осадок промывали водой трехкратно с магнитной сепарацией, замораживали и лиофилизировали при температуре $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ и давлении 30 Па в течение 48 часов на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США).

Протокол исследования

Осуществляли однократное введение исследуемых агентов в латеральную хвостовую вену крыс в объеме, не превышающем максимально допустимые значения для лабораторных животных (2 мл).

Доза введенных наночастиц составляла 1,4 мг, что не превышает максимальных переносимых доз для данного металла [13]. Группы формировались в соответствии с введенными агентами (МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид). Животные контрольной группы получали инъекцию 0,9 % NaCl в эквивалентном объеме.

Через 1 час после введения [10, 14] исследуемых агентов животных наркотизировали (изофлюран), после чего производили взятие крови методом прокола задней полой вены для дальнейшего хемилюминесцентного и иммуноферментного анализа, а также выделение брыжейки тонкого кишечника для проведения миографии ($n = 9$ в каждой группе) и образцов сосудов брыжейки, срезов кишки и сальника для гистологических исследований.

Образцы крови, полученной от животных всех исследуемых групп, центрифугировали, полученную плазму аликвотировали и хранили при -80 °C до момента проведения иммуноферментного анализа (ИФА) и хемилюминесцентного анализа. ИФА анализ (уровень NO, содержание перекисей) проводили на автоматическом биохимическом и ИФА-анализаторе ChemWell 2910 (Combi) (AwarenessTechnology, США) с помощью коммерческих наборов.

Оценка функциональной активности эндотелия

Функциональную активность эндотелия оценивали с помощью проведения проволочной миографии изолированных сосудов брыжейки (*ex vivo*), а также на основании определения уровня оксида азота (NO), как основного маркера сохранности эндотелия. Выделенную брыжейку помещали в охлажденный раствор Кребса–Хензеляйта следующего состава (мМ): NaCl 119; KCl 4,7; 1,17; 1,6; 1,2; 25; глюкоза 5,5; ЭДТА 0,03. Для исследования функциональной активности использовали артериолы брыжейки 3-го порядка длиной 3 мм. Эксперимент проводили в многокамерном миографе DMТ620М (Дания) согласно описанной методике [15]. Сосуды монтировали в камере миографа при помощи стальных проволок (40 мкм). В течение всего эксперимента производили подогрев до 37 °C и аэрацию карбогеном рабочего раствора. Для исследования функциональной активности использовали кумулятивные кривые «концентрация–ответ» для фенилэфрина (ФЭ) и ацетилхолина (АХ). Для исследования сократительной функции сосудов инкубировали в растворах с концентрацией ФЭ от 0,1 до 10 мкМ (10^{-7} – 10^{-5} М). Для исследования расслабления сосудов предварительно сокращали фенилэфрином на 60% от максимального сокраще-

ния, а затем производили инкубацию в растворах с концентрацией АХ от 0,1 до 10 мкМ. Регистрацию данных производили с помощью программы LabChart 8.

Оценка антиоксидантного статуса

Антиоксидантный статус оценивали с помощью люминол-активированной хемилюминесценции [с определением общей антиоксидантной активности (АОА) и антиоксидантной емкости (АОЕ) плазмы]. Также определяли уровни перекисного окисления липидов (по содержанию перекисей, образующихся при свободнорадикальном окислении липидов клеточной мембраны).

Оценку антиоксидантной активности и антиоксидантной емкости производили с помощью методики люминол-активированной хемилюминесценции (ХЛ) [16] на 12-кюветном хемилюминометре «Lum-1200» (ДИСофт, Россия) в термостатированных условиях при 37 °C. В качестве реагентов использовали: генератор свободных радикалов 50 мМ раствор АБАП (2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид) (Fluka, Германия) [17]; 1 мМ раствор люминола (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион), (Fluka, Германия); калий-фосфатный буфер pH 7.4. Для записи и визуализации сигнала использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3. Оценивали изменение интенсивности свечения после добавления антиоксиданта (АО) в систему АБАП + люминол. Для проведения исследования в кювету вносили 920 мкл буфера, 20 мкл раствора люминола и 50 мкл раствора АБАП, инкубировали в течение 5 минут до стабилизации сигнала, затем добавляли 10 мкл плазмы, предварительно разбавленной в 10 раз, после чего дожидались выхода сигнала на плато. Общий объем пробы в кювете составлял 1 мл. Интенсивность ХЛ регистрировали в вольтах. В контрольные кюветы вместо плазмы вносили эквивалентный объем буфера.

Общий антиоксидантный статус образца оценивали на основе следующих показателей (рис. 1): S — площадь «провала», или область подавления свечения; ΔI — прирост интенсивности ХЛ после выхода сигнала на плато; $tg\alpha$ — тангенс угла наклона кривой во время нарастания интенсивности ХЛ после ингибирования свечения. На хемилюминесцентной кривой после добавления плазмы выделяли следующие фазы: фаза 1 — подавление хемилюминесценции, фаза 2 — нарастание после ингибирования свечения, фаза 3 — область стационарного свечения. Рассчитывали площади фазы 1, являющейся мерой АОЕ плазмы, фазы 2, отображающей АОА белков плазмы, а также фазы 3, связанной с количеством альбумина (как важнейшего

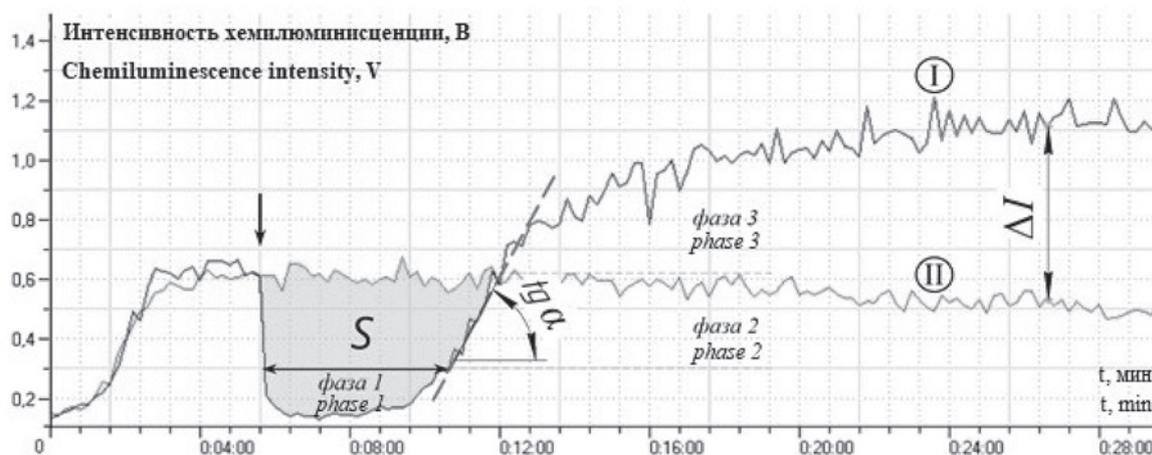


Рис. 1. Кривая развития ХЛ в системе АБАП + люминол + плазма: I — ХЛ в кювете с образцом плазмы; II — ХЛ в контрольной кювете

компонента антиоксидантной системы организма) и степенью его окисленности.

Оценка морфологических изменений сосудов

Производили оценку морфологических изменений фрагментов тонкой кишки, сальника и сосудов животных, как наиболее распространенных и хорошо изученных объектов исследований в аспекте физиологических изменений и нарушений состояния микроциркуляторного русла [18–19]. Материал для гистологического исследования фиксировали в 10 %-ом растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, после чего по общепринятой методике заливали в парафин [20]. Затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Также образцы окрашивали по Перлсу с целью выявления трехвалентного железа [21]. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводилось при помощи светооптического микроскопа CarlZeissPrimoStar при увеличении 10 и 40. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры TourCam и программного обеспечения TourView.

Статистическая обработка данных

Для обработки результатов проволоочной миографии использовали программы MicrosoftExcel и GraphPadPrism 6. Данные подвергали нормализации, а затем применяли методы нелинейного регрессионного анализа. За критический уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$. Вычисляли значение логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа ($\log EC_{50}$), характеризующее

чувствительность сосудов, и значение максимальной величины ответа (E_{max}), характеризующее интенсивность реакции сосудов.

Полученные результаты ХЛ и ИФА обрабатывались с помощью программы GraphPadPrism 6. Для оценки достоверности различий между несопряженными совокупностями применялся U-критерий (Манна–Уитни). Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование функциональной активности эндотелия

Исследование активности эндотелия в условиях ex vivo

Значения $\log EC_{50}$ и E_{max} для АХ и ФЭ в исследуемых группах представлены в таблице 1. Кривые зависимостей «концентрация–ответ» при воздействии фенилэфрина представлены на рисунке 2А. В условиях введения всех видов наночастиц сократительная активность изолированных сосудов не отличалась от таковой в группе контроля ($p > 0,05$). Значения $\log EC_{50}$ для ФЭ во всех исследуемых группах статистически не различались ($p > 0,05$), что являлось свидетельством сохранности чувствительности сосудов к агонисту в условиях воздействия всех видов МНЧ.

В условиях введения МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид характер расслабления сосудов не отличался от такового в группе контроля. В то же время на фоне введения МНЧ + полисахарид отмечалось достоверное снижение ответа на АХ в диапазоне концентраций 1,3; 1,5; 3 (мкМ) (в логарифмическом масштабе соответственно: $-5,9$; $-5,8$; $-5,5$ (М), $p < 0,05$

по сравнению с контролем), с приближением релаксации к контрольному уровню, с увеличением концентрации агониста от 3 до 10 мкМ (табл. 1, рис. 2Б).

Таким образом, однократное внутривенное введение крысам МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ + полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению.

Исследование содержания оксида азота

Концентрация оксида азота в образцах плазмы крови животных всех исследуемых групп статистически не различалась ($p > 0,05$). Значения концентраций NO в исследуемых группах представлены на рисунке 3.

В условиях однократного внутривенного введения крысам всех видов наночастиц уровень оксида азота соответствовал таковому в группе контроля.

Таким образом, однократное внутривенное введение всех исследуемых видов МНЧ не обеспечивает изменения уровня оксида азота.

Исследование антиоксидантного статуса плазмы крови

Исследование антиоксидантной активности и антиоксидантной емкости

Наибольшая площадь ингибирования свечения наблюдалась у образцов плазмы, полученной от крыс после введения МНЧ + полилактид ($p < 0,05$ по сравнению с МНЧ + полисахарид и МНЧ + альбумин, контроль), тогда как наимень-

Таблица 1. Значения $\log EC_{50}$ в молях ($M \pm SEM$) и E_{max} в процентах ($M \pm SEM$) для фенилэфрина (ФЭ) и ацетилхолина (АХ) в экспериментальных группах с введением МНЧ с различными оболочками

Агонист	Показатель	Контрольная группа	МНЧ + альбумин	МНЧ + полисахарид	МНЧ + полилактид
ФЭ	$\log EC_{50}$, М	$-5,88 \pm 0,07$	$-5,87 \pm 0,056$	$-5,96 \pm 0,06$	$-5,76 \pm 0,28$
	E_{max} , %	$124,02 \pm 11,21$	$130,39 \pm 7,13$	$121,17 \pm 7,37$	$124,41 \pm 7,58$
АХ	$\log EC_{50}$, М	$-6,69 \pm 0,05$	$-6,94 \pm 0,15$	$-6,72 \pm 0,14$	$-6,82 \pm 0,08$
	E_{max} , %	$93,19 \pm 2,66$	$82,45 \pm 6,76$	$80,26 \pm 7,93^*$	$94,67 \pm 1,92$

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

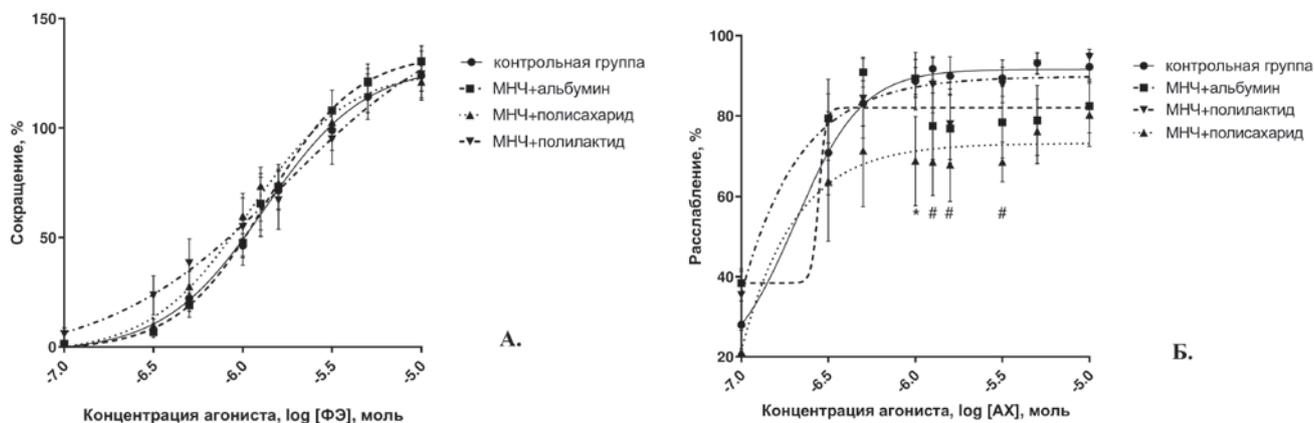


Рис. 2. Дозозависимое сокращение (А) и расслабление (Б) сосудов брыжейки крыс при внутривенном однократном введении МНЧ с различными оболочками.

По оси х: концентрация агониста в логарифмическом масштабе в молях. По оси у: интенсивность ответа в процентах ($M \pm SEM$). # — $p < 0,05$, контроль по сравнению с МНЧ + полисахарид; * — $p < 0,05$, МНЧ + альбумин по сравнению с МНЧ + полисахарид

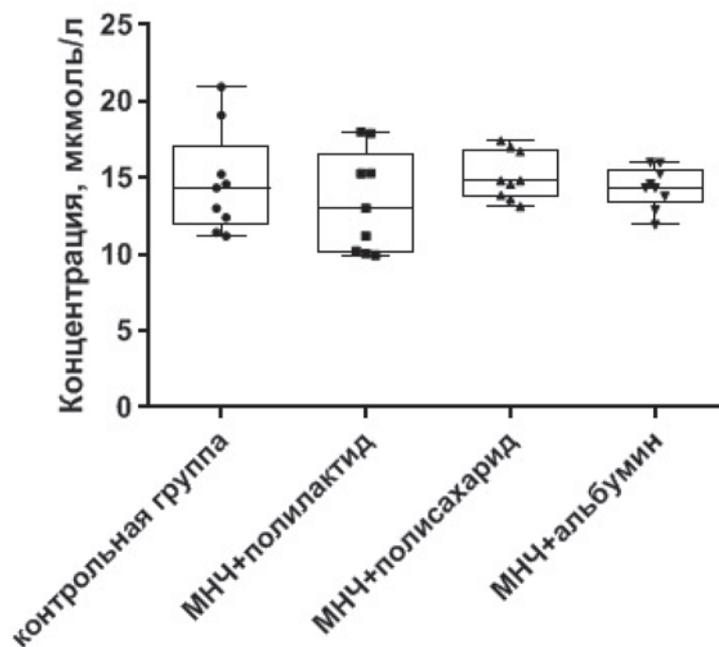


Рис. 3. Уровни NO (мкмоль/л) в плазме крови крыс на фоне внутривенного введения магнитных наночастиц с различными оболочками

шая площадь ингибирования свечения оказалась у группы животных после введения МНЧ + альбумин ($p < 0,05$ по сравнению с контролем и группой МНЧ + полилактид) (рис. 4).

Значение тангенса угла наклона кривой во время нарастания интенсивности ХЛ после ингибирования свечения оказалось максимальным в образцах плазмы, полученной от животных с введением МНЧ + альбумин ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, МНЧ + полисахарид и МНЧ + полилактид) (рис. 5).

Минимальный прирост уровня стационарного свечения наблюдался в образцах плазмы крови, полученной от крыс с введением МНЧ + альбумин ($p < 0,05$ по сравнению с контролем) (рис. 6).

Таким образом, образцы из группы МНЧ + полилактид обладали наибольшей площадью ингибирования свечения и соответственно наибольшей АОЕ. Показатели тангенса угла наклона касательной к кривой возрастания интенсивности и прироста уровня стационарного свечения для данной группы не отличались от контроля. Образцы из группы МНЧ + полисахарид отличались наименьшим tga , причем данный показатель статистически значимо не отличался от контроля, только от группы МНЧ + полилактид. Таким образом, скорость взаимодействия (АОА) белков плазмы из группы МНЧ + полисахарид со свободными радикалами была наименьшей, но значимо не отличалась от контроля. Показатели S и ΔI для плазмы, полученной после введения магнитных наночастиц

с оболочкой из полисахарида, не отличались от показателей контрольной группы.

По всем тем показателям от контрольной группы отличались образцы из группы МНЧ + альбумин. Количество антиоксидантов (АОЕ) в данной системе оказалось наименьшим, а tga (скорость взаимодействия АО со свободными радикалами) — наибольшим по сравнению со всеми исследуемыми группами. Изменение интенсивности свечения ΔI также оказалось наименьшим.

Таким образом, МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид при их однократном внутривенном введении обеспечивают схожий по выраженности, но разный по механизмам реализации эффект на антиоксидантный статус.

Исследование концентрации перекисей

Концентрация продуктов перекисного окисления липидов в контрольных образцах была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в образцах плазмы крови крыс с введением МНЧ + полисахарид, МНЧ + полилактид и МНЧ + альбумин. Уровни концентраций перекисей для всех исследуемых групп представлены на рисунке 7.

Однократное внутривенное введение крысам МНЧ с оболочками из полилактоида, альбумина и полисахарида обеспечивает равнозначное снижение уровня перекисей в плазме крови.

Результаты гистологического исследования

Кровеносные сосуды во всех исследованных образцах имели типичное гистологическое строение.

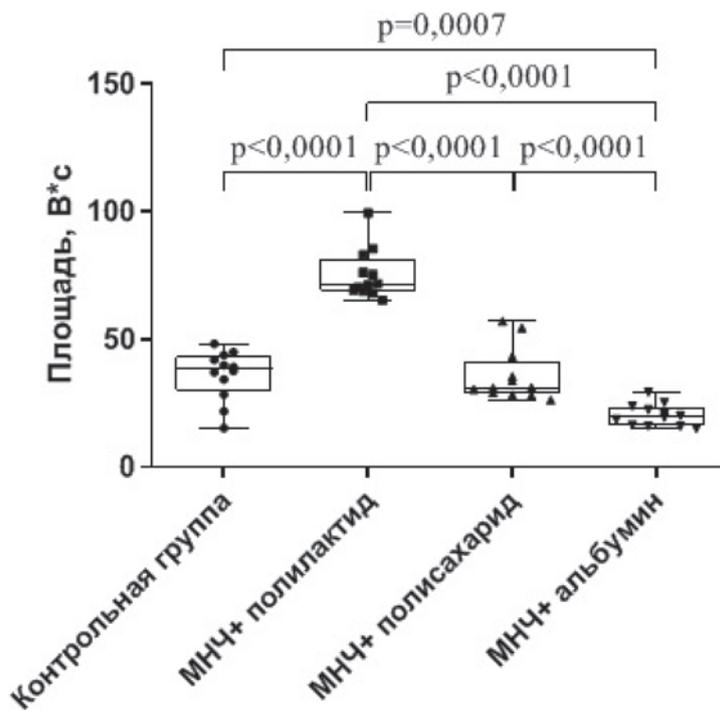


Рис. 4. Площадь ингибирования ХЛ после добавления плазмы в систему АБАП + люминол (В×с) наночастиц с различными оболочками

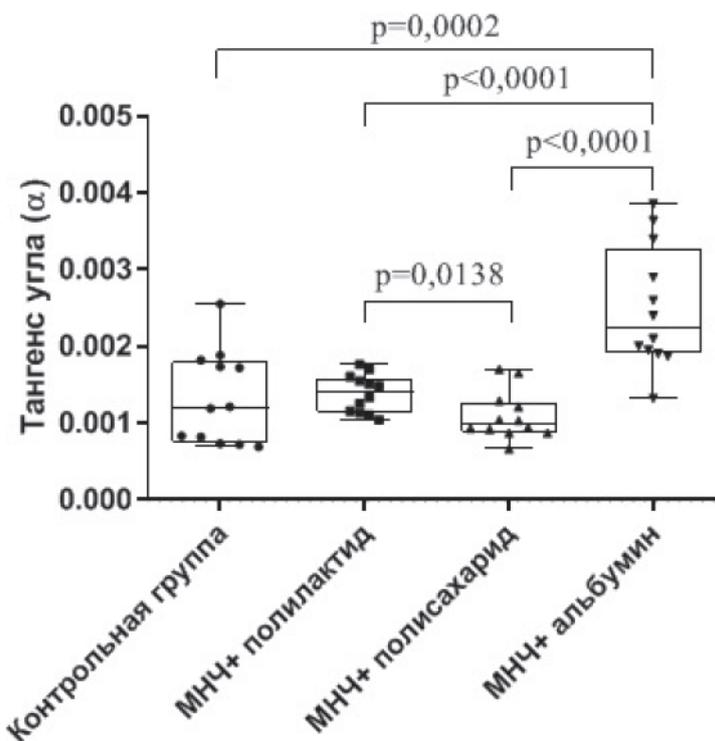


Рис. 5. Тангенс угла наклона касательной к кривой возрастания интенсивности ХЛ

Внутренняя оболочка была представлена эндотелиальным слоем, образованным уплощенными эндотелиоцитами вытянутой формы, и субэндотелиальным слоем из элементов рыхлой соединительной ткани. В интиме артерий определялась внутренняя

эластическая мембрана. Средняя оболочка была образована гладкими миоцитами, клетками фибробластического ряда и эластическими элементами (эластические волокна и мембраны в артериях). Адвентиция сосудов была образована рыхлой сое-

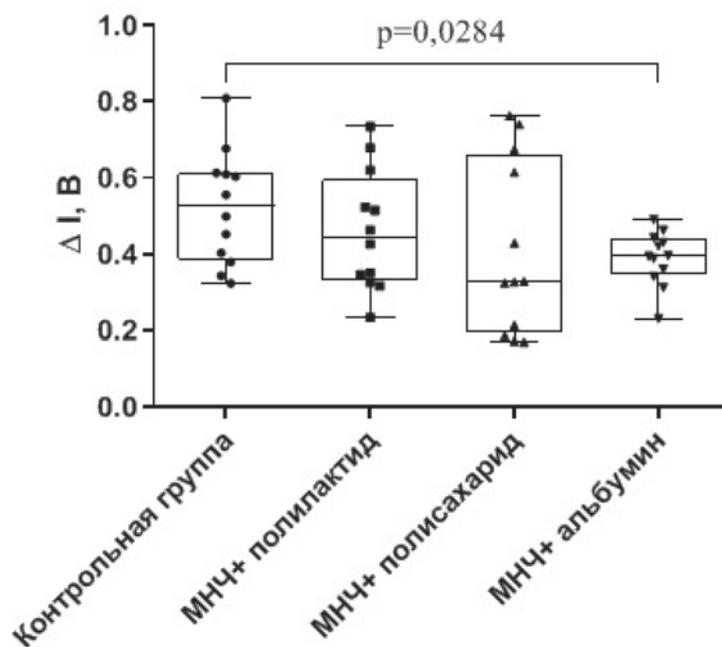


Рис. 6. Изменение интенсивности свечения (B) после окончания фазы ингибирования (прирост уровня стационарного свечения)

динительной тканью. Сосуды микроциркуляторного русла были представлены артериолами, прекапиллярами, капиллярами, посткапиллярами и венулами. Гистологическое строение сосудов микроциркуляторного русла в исследованных образцах также соответствовало норме. Эндотелиальные клетки были без выраженных повреждений, имели характерную полярность, сохраняли межклеточную связь, обеспечивая непрерывность эндотелия во всех исследованных сосудах. Гистохимическая окраска по Перлсу показала отсутствие в исследованных образцах соединений трехвалентного железа.

Обсуждение

В настоящем исследовании проводилось изучение влияния однократного внутривенного введения крысам МНЧ, различающихся качественным составом оболочки (из альбумина, полисахарида, полилактита), на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус.

На основании результатов, полученных в ходе изучения функциональной активности эндотелия, установлено, что однократное внутривенное введение крысам МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ + полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению. Следует отметить при этом сохранность метаболической активности и морфологического строения эндотелия в условиях

воздействия всех используемых видов наночастиц. Ранее авторами было показано активное взаимодействие непокрытых наночастиц магнетита с клетками эндотелия в условиях *in vitro*, проявляющееся в виде снижения пролиферативной активности и жизнеспособности эндотелиоцитов, интернализации наночастиц в эндотелиальные клетки и, как следствие, изменении их морфологии [12]. Также в экспериментах *in vivo* с однократным внутривенным введением крысам наночастиц магнетита при отсутствии оболочки было продемонстрировано изменение в условиях их воздействия сократительной активности сосудов с сохранением эндотелий-зависимого расслабления [10]. Предположительно, наличие оболочки на поверхности наночастиц магнетита обуславливает изменение механизма взаимодействия наночастиц с эндотелием. Вероятно, наличие оболочки вне зависимости от ее качественного состава замедляет или нивелирует возможность поглощения наночастиц эндотелиальными клетками, о чем косвенно свидетельствует гистохимический и гистологический анализ. Не исключено, что данный факт находит свое отражение в виде отсутствия влияния внутривенного введения МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид на функциональную активность сосудов. При этом снижение релаксации сосудов в условиях воздействия МНЧ + полисахарид может быть обусловлено повреждающим действием свободных радикалов в условиях наименьшего (по сравнению с МНЧ + альбумин и МНЧ

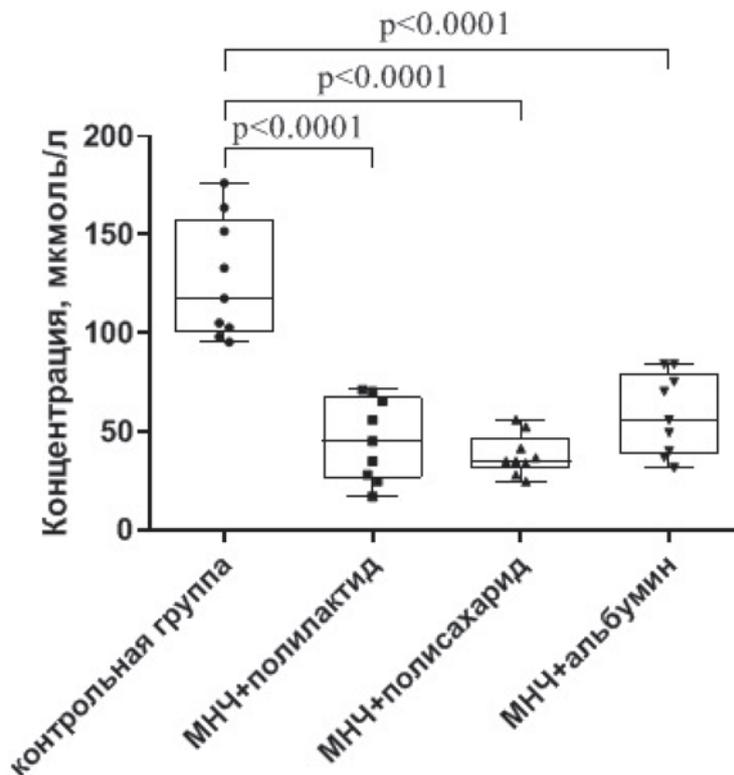


Рис. 7. Уровни оксистата (мкмоль/л) в плазме крови крыс на фоне внутривенного однократного введения магнитных наночастиц с различными оболочками

+ полилактид) воздействия на антиоксидантный статус.

Тенденция к снижению концентрации альбумина прослеживалась для всех исследуемых групп, что может быть связано с формированием «белковой короны» из альбумина на поверхности магнитных наночастиц при введении их в кровоток [10]. Значение концентрации продуктов перекисного окисления липидов для всех групп оказалось значимо меньше значения оксистата в контрольной группе. Это может быть обусловлено снижением генерации активных форм кислорода после введения исследуемых агентов. Также нельзя исключить и вероятность связывания наночастицами свободных радикалов [14].

Заключение

1. Однократное внутривенное введение крысам МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ + полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению.

2. Однократное внутривенное введение всех исследуемых видов магнитных наночастиц не влияет на метаболическую активность эндотелия,

а также не обуславливает морфологических изменений сосудов.

3. Однократное внутривенное введение крысам магнитных наночастиц с оболочками из полилактида, полисахарида, альбумина обуславливает снижение уровня перекисного окисления липидов. По выраженности данного эффекта исследуемые виды наночастиц можно расположить в ряду (в порядке убывания эффекта): МНЧ + полилактид, МНЧ + полисахарид, МНЧ + альбумин.

4. Таким образом, МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид при их однократном внутривенном введении обеспечивают схожий по выраженности, но разный по механизмам реализации эффект на антиоксидантный статус.

5. МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид обладают равнозначной биосовместимостью при их однократном внутривенном введении крысам.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Reddy L, Arias J, Nicolas J, et al. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical Reviews*. 2012; 112(11):5818–5878.
2. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Development Research*. 2006; 67:55–60.
3. Sun C, Lee J, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60(11):1252–1265.
4. Liu X, Choo E, Ahmed A, et al. Magnetic nanoparticle-loaded polymer nanospheres as magnetic hyperthermia agents. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014; 2(1):120–128.
5. Haun JB, Yoon T-J, Lee H, Weissleder R. Magnetic nanoparticle biosensors. *WIREs: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2010; 2(3):291–304.
6. Gupta AK, Curtis AS. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials*. 2004; 25(15): 3029–3040.
7. Sun S, Zeng H, Robinson DB, et al. Monodisperse MFe₂O₄ (M=Fe, Co, Mn) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 126(1):273–279.
8. Mandal S, Chaudhuri K. A simple method for the synthesis of ultrafine carbon nanoparticles and its interaction with bovine serum albumin. *Advanced Science Letters*. 2012; 5(1):139–143.
9. Van Sliedregt A, Radder AM, de Groot K, van Blitterswijk CA. In vitro biocompatibility testing of polylactides Part I Proliferation of different cell types. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1992;3:365–370.
10. Toropova YaG, Zelinskaya IA, Markitanova AC, et al. The influence of magnetite nanoparticles and FemOn-SiO₂ colloidal particles on endothelium functional statement after intravenous injection in rats. *Russian Journal of physiology = Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2017; 103 (12):1416–1424. In Russian [Торопова Я.Г., Зелинская И.А., Маркитанова А.С. и соавт. Влияние наночастиц магнетита и коллоидных частиц FemO-SiO₂ на функциональное состояние эндотелия при внутривенном введении крысам. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017; 103 (12):1416–1424].
11. Mandal S, Chaudhuri K. Magnetic core-shell nanoparticles for biomedical applications. In: Sharma S, (eds) *Complex Magnetic Nanostructures*. Cham: Springer International Publishing AG, 2017:425–453.
12. Toropova YaG, Golovkin AS, Malashicheva AB, et al. In vitro toxicity of FemOn, FemOn-SiO₂ composite, and SiO₂-FemOn core-shell magnetic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2017; 12: 593–603.
13. Waynforth HB, Flecknell PA. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. 2nd ed. London: Academic Press, 1992: p. 382.
14. Toropova YaG, Pechnikova NA, Zelinskaya IA, et al. Hemocompatibility of magnetic magnetite nanoparticles and magnetite-silica composites in vitro. *Bulletin of Siberian Medicine = Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2018; 17(3):157–167. In Russian [Торопова Я.Г., Печникова Н.А., Зелинская И. А. и соавт. Изучение гемосовместимости магнитных наночастиц магнетита и композитных частиц магнетита-кремнезема in vitro. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (3):157–167].
15. Zelinskaya IA, Toropova YaG. Wire myography in modern scientific researches: methodical aspects. *Regional blood circulation and microcirculation = Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2018;17(1):83–89. In Russian [Зелинская И.А., Торопова Я.Г. Проволочная миография в современных научных исследованиях: методические аспекты. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2018; 17(1): 83–89].
16. Vladimirov YuA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. *Advances in biological chemistry = Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2009; 49: 341–388. In Russian [Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*. 2009; 49: 341–388].
17. Uotila J, Kirkkola AL, Rorarius M, et al. The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;16(5):581–590.
18. Petrenko VM. The reticular structure of the microcirculatory. *University proceedings. Volga region. Medical sciences = Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki*. 2010; 13(1): 37–46. In Russian [Петренко В.М. Сетевидная конструкция микроциркуляторного русла. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2010; 13(1): 37–46].
19. Tybinka AM, Paladiychuk ER. Characteristic of the blood vessels of the intestine and its mesentery. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies = Naukovyj visnyk LNUVMBT imeni S.Z. G'zhyuc'kogo*. 2015; 17 (2): 232–240. In Russian [Тыбинка А.М., Паладийчук Е.Р. Характеристика кровеносных сосудов кишечника и его брыжейки. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2015; 17 (2): 232–240].
20. Junqueira L, Carneiro J. *Junqueira's basic histology. Text and atlas*. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2005. p. 544.
21. Korzhevskiy DE, Kolos EA, Karpenko MN, et al. Histochemical determination of metals. SPb: SpetsLit, 2016. p. 63. In Russian [Коржевский Д.Э., Колос Е.А., Карпенко М.Н. и др. Гистохимическое определение металлов. СПб: СпецЛит, 2016. с 63].

Информация об авторах:

Торопова Яна Геннадьевна, к.б.н., заведующий НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Моторина Дарья Сергеевна, лаборант-исследователь НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Горшкова Мария Николаевна, лаборант-исследователь НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института

та экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гареев Камилъ Газинурович, к.т.н., ассистент СПб-ГЭТУ «ЛЭТИ»;

Королев Дмитрий Владимирович, к.т.н., доцент, заведующий НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мужикян Арман Артушович, к.ветеринар.н., лаборант-исследователь вивария № 1 питомника лабораторных животных с вивариями Центра доклинических и трансляционных исследований Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Toropova Yana G., PhD, Associate Professor, Head of Bioprosthesis and Cardioprotection Research Lab, Almazov National Medical Research Centre;

Motorina Darya S., Research Assistant, Almazov National Medical Research Centre;

Gorshkova Mariya N., Research Assistant, Bioprosthesis and Cardioprotection Research Lab, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg;

Gareev Kamil G., PhD, Assistant Professor, Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Korolev Dmitriy V., PhD, Associate Professor, Head of Nanotechnology Research Lab, Almazov National Medical Research Centre;

Muzhikyan Arman A., PhD, Research Assistant, Vivarium, Centre of Doclinical Studies, Almazov National Medical Research Centre.