

УДК 577.112.384:612.815.1

ВЗАЄМОДІЯ НАНОЧАСТИНОК МАГНЕТИТУ, ПОКРИТИХ ПОЛІМЕРАМИ, З НЕРВОВИМИ ТЕРМІНАЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ТА ТРОМБОЦИТАМИ КРОВІ

Т. О. Борисова¹Н. О. Дудченко²О. Б. Брик²Л. О. Касаткіна^{1,3}Р. В. Сівко¹О. Ю. Чуніхін¹Н. В. Крисанова¹¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ²Інститут геохімії, мінералогії та рудоутворення ім. М. П. Семененка НАН України, Київ³Навчально-науковий центр «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка*E-mail: tborisov@biochem.kiev.ua*

З погляду нанонейротехнології використання магнітних наночастинок є надзвичайно перспективним для транспортування біологічно активних речовин і ліків до клітин-мішеней у разі зовнішнього маніпулювання та в протипухлинній терапії. Підібрано умови взаємодії синтезованих наночастинок магнетиту, покритих декстраном, гідроксіетилкромалем, окисненим гідроксіетилкромалем, хітозаном та кремнеземом, з нервовими терміналями головного мозку та тромбоцитами крові (як периферичною моделлю пресинапсу). Методами фотонної кореляційної спектроскопії та проточної цитометрії показано зв'язування наночастинок з нервовими терміналями та тромбоцитами. Проаналізовано потенціал плазматичної мембрани нервових терміналей та тромбоцитів з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда родаміну 6G та показано відсутність впливу наночастинок на цей показник. Із застосуванням рН-чутливого флуоресцентного зонда акридинового оранжевого встановлено, що закислення синаптичних везикул нервових терміналей та секреторних гранул тромбоцитів не змінюється у присутності наночастинок.

Ключові слова: наночастинок магнетиту, синаптосоми, тромбоцити.

Надзвичайно перспективним напрямом нанобіотехнології є використання магнітних наночастинок для спрямованого транспортування лікарських засобів до клітин-мішеней, візуалізації та контрастування об'єктів, у протипухлинній терапії. Найчастіше застосовують залізо або оксид заліза, рідше — кобальт та нікель. Наночастинок оксиду заліза є біосумісними, можуть бути введені в організм шляхом ін'єкції, здатні адсорбувати та зв'язувати гідрофільні й гідрофобні фармакологічні препарати. Такі наночастинок швидко захоплюються макрофагами і накопичуються переважно у печінці та селезінці, тому їх використовують для візуалізації цих органів на МРТ [1]. У роботі [2] запропоновано унікальний підхід для трансфекції клітин із застосуванням магнітних ліпосом, асоційованих з плазмідним вектором, і селекцію трансфікованих клітин магнітним полем. Показано, що магнітоліпосоми можуть порушувати структуру актинового цитоскелета та проліфе-

рацію клітин, що свідчить про довготривалий ефект залізних наночастинок [3, 4]. Запропоновано нові методи використання наночастинок в діагностиці [5, 6] та терапії [7] онкологічних захворювань. Було розроблено маленький, але надзвичайно чутливий магнітний сенсор для реєстрації пухлин, які захопили магнітні наночастинок.

Варто зазначити, що нанорозмірні частинки здатні легко долати гематоенцефалічний бар'єр, що робить мозок органом, доступним для терапевтичних маніпуляцій. Окрім того, показано, що в організмі наночастинок транспортуються вздовж сенсорних аксонів до центральної нервової системи. Вивчення процесу агрегації протеїну амілоїду показало, що створення протеїнових агрегатів суттєво знижується в присутності наночастинок оксиду заліза. Наночастинок не тільки інгібують агрегацію лізозиму-амілоїду, але й індують деполімеризацію агрегатів [8]. Слід наголосити, що не існує ефективних підходів, які

запобігають формуванню протеїнових агрегатів, тому використання наночастинок оксиду заліза в цьому аспекті може бути надзвичайно перспективним.

Розвиток нанонейротехнологій із застосуванням наночастинок оксиду заліза неможливий без детального аналізу взаємодії їх з нервовими клітинами та оцінки потенційного нейротоксичного ризику використання. На сьогодні такі дані майже відсутні. У цій роботі було використано синаптосоми — ізольовані нервові терміналі головного мозку щурів. Синаптосомам притаманні всі характеристики інтактного нервового закінчення, зокрема мембранний потенціал, здатність накопичувати та вивільнювати нейромедіатор при деполаризації плазматичної мембрани [9–13]. Іншим об'єктом, який використовували у дослідженнях, були тромбоцити крові кроля. Тромбоцити містять нейрональні високоафінні Na^+ -залежні глутаматні транспортери, NMDA- та AMPA-рецептори на плазматичній мембрані, а також подібні нейрональним везикулярні глутаматні транспортери на секреторних гранулах. Завдяки здатності тромбоцитів до акумуляції глутамату вони можуть брати участь у підтриманні гомеостазу позаклітинного глутамату в ЦНС і слугувати периферичним маркером для аналізу порушень у функціонуванні глутаматних транспортерів мозку [14, 15]. Тому дослідження впливу наночастинок на функціональний стан тромбоцитів також становить безсумнівний інтерес з погляду нанонейротехнології.

Матеріали і методи

Виділення синаптосом з головного мозку щурів

Щурів-самців Wistar масою 100–120 г декапітували, великі півкулі головного мозку швидко переносили в розчин, що містив 0,32 М сахарозу, 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) та 0,2 мМ етилендіамінтетрацтову кислоту (ЕДТА). Усі операції проводили при 4 °С. Синаптосоми виділяли з гомогенату мозку диференційним центрифугуванням і центрифугуванням в градієнті щільності фіколу, застосовуючи метод Котмана [16] у такій модифікації: розчин сахарози для приготування градієнта фіколу містив 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) і 0,2 мМ ЕДТА. Синаптосомальну фракцію, отриману під час центрифугування гомогенату головного мозку в градієнті щільності фіколу, розводили 10 об'ємами 0,32 М сахарози, 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4)

і 0,2 мМ ЕДТА та центрифугували при 20 000 g упродовж 20 хв. Отриманий осад повільно суспендували в 4 мл стандартного оксигенованого холодного середовища, що містило (мМ): NaCl — 126, KCl — 5, MgCl_2 — 1,4, NaN_2PO_4 — 1,0, Hepes — 20, CaCl_2 — 2, D-глюкозу — 10 (pH 7,4). При цьому кінцева концентрація протеїну становила 4 мг/мл. Синаптосоми використовували в експериментах упродовж 2–4 год після одержання. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона та співавт. [17].

Виділення тромбоцитів з крові кроля

Кров відбирали з вухної вени кроля у пластикові пробірки з антикоагулянтном АСД (85 мМ цитрату натрію, 70 мМ лимонної кислоти та 110 мМ глюкози). Тромбоцити виділяли диференційним центрифугуванням, застосовуючи метод Мангано та Шварца [18]. Отриманий осад повільно ресуспендували в холодному середовищі, що містило (мМ): NaCl — 126, KCl — 5, MgCl_2 — 1,4, NaN_2PO_4 — 1,0, HEPEs — 20, ЕДТА — 2, D-глюкозу — 10 (pH 7,4). Пробу тромбоцитів одержували при +4 °С. Тромбоцити використовували в експериментах упродовж 2 год після отримання. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона та співавт. [17].

Визначення розміру синаптосом і тромбоцитів методом фотонної кореляційної спектроскопії

Розмір наночастинок, синаптосом та тромбоцитів визначали методом фотонної кореляційної спектроскопії на лазерному кореляційному спектрометрі ZetaSizer-3 (Malvern Instrument, Великобританія), обладнаного He-Ne лазером ЛГН-111 (P = 25 мВт, $\lambda = 633$ нм). Діапазон вимірювання приладу — від 1 нм до 20 мкм. Робота цього спектрометра ґрунтується на аналізі кореляційних характеристик флуктуації інтенсивності динамічно розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище. Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла й інтегральної інтенсивності розсіювання дає змогу визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних частинок в рідинах і за рівнянням Стокса–Ейнштейна встановити розподіл наночастинок в рідинах за розміром. Коефіцієнт трансляційної дифузії D частинок пов'язаний з тривалістю кореляції τ_c співвідношенням:

$$Dq^2 = 1/\tau_c. \quad (2.1)$$

Хвильовий вектор флуктуації концентрації q описується співвідношенням:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (2.2)$$

де n — показник заломлення середовища (рідини);

λ_0 — довжина хвилі випромінювання;

θ — кут розсіювання.

Використовуючи формулу Стокса–Ейнштейна, яка пов'язує розмір частинок з їх коефіцієнтом трансляційної дифузії і в'язкістю рідини, можна вирахувати гідродинамічний діаметр сферичних частинок:

$$d(H) = \frac{k_B \cdot T}{3\pi\eta D}, \quad (2.3)$$

де k_B — стала Больцмана;

T — абсолютна температура, К;

η — динамічна в'язкість середовища, в якому суспендовано частинки;

D — коефіцієнт трансляційної дифузії.

Досліджувану суспензію в кількості 1 мл вносили до кварцової циліндричної оптичної кювети діаметром 10 мм, яку вводили в термостатовану лунку лазерного кореляційного спектрометра. Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної ($n = 1,33$) суспензії наночастинок, здійснювали багаторазово протягом 120 с за температури $+22$ °С під кутом розсіювання 90° .

Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61. Лазерний кореляційний спектрометр обладнано корелятором multi computing correlator type 7032 се.

Аналіз тромбоцитів методом проточної цитометрії

Аналіз проб тромбоцитів проводили на проточному цитометрі COULTER EPICS XL. Тромбоцити (0,2 мг/мл) суспендували в стандартному буфері, який містив (мМ): NaCl — 126,0, KCl — 4,0, MgCl₂ — 1,4, NaH₂PO — 1,0, Hepes — 20,0, рН 7,4, ЕГТА — 2,0, D-глюкозу — 10,0, далі інкубували при 30 °С впродовж 10 хв перед вимірюванням. Для аналізу взаємодії наночастинок магнетиту (з органічним покриттям) з тромбоцитами застосовували проточний цитометр. Розмір частинок у препаратах визначали за прямим (FS), а цитоплазматичну гранулярність — за бічним (SS) світлорозсіюванням.

Вимірювання потенціалу плазматичної мембрани синапсом та тромбоцитів

Оцінювання потенціалу плазматичної мембрани синапсом та тромбоцитів здійс-

нювали з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонду родаміну 6G. Суспензію синапсом або тромбоцитів преінкубували в кальцієвмісному (2мМ CaCl₂) або безкальцієвому (2мМ EGTA) середовищі, відповідно, що містило (мМ): NaCl — 126, KCl — 5, MgCl₂ — 1,4, NaH₂PO₄ — 1,0, Hepes — 20, D-глюкозу — 10 (рН 7,4), упродовж 10 хв при 37 °С, а потім вносили в кварцову кювету для вимірювання флуоресценції, що містила родамін 6G (0,5 мкМ). Флуоресценцію реєстрували за постійного перемішування суспензії синапсом та тромбоцитів при 37 °С (кінцева концентрація протеїну — 0,15 мг/мл).

Потенціал плазматичної мембрани синапсом та тромбоцитів оцінювали за інтенсивністю флуоресценції родаміну 6G згідно з формулою:

$$F = F_t/F_0,$$

де F_0 — інтенсивність флуоресценції родаміну 6G за відсутності синапсом та тромбоцитів у кюветі, F_t — інтенсивність флуоресценції родаміну 6G у присутності синапсом та тромбоцитів у кюветі. Інтенсивність флуоресценції родаміну 6G визначали на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 (Японія). При цьому довжина хвилі збудження становила 528 нм, а емісії — 551 нм (спектральна ширина щілин — 5 нм).

Визначення рівня закислення синаптичних везикул

Для дослідження закислення синаптичних везикул синапсом та секреторних гранул тромбоцитів було використано рН-чутливий флуоресцентний зонд акридиновий оранжевий, який селективно накопичується у внутрішньоклітинних компартментах з кислим рН [19]. Акридиновий оранжевий є ліпофільним аміном, непротонована форма якого вільно проникає в мембрану. Він стає мембранонепроникним після протонування в кислому середовищі органел, що мають всередині позитивний заряд. Таким чином, флуоресценція акумульованого акридинового оранжевого пропорційна рН середовища органели. Зміни інтенсивності флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 (Японія). При цьому довжина хвилі збудження становила 490 нм, а емісії — 530 нм (спектральна ширина щілини — 5 нм). Накопичення акридинового оранжевого реєстрували після його додавання (кінцева концентрація 5 мкМ) до суспензії синапсом або тромбоцитів (кінцева концентрація протеїну 0,2 мг/мл) за постійного перемішування та після преінкубації

суспензії протягом 10 хв при 37 °С. Закислення синаптичних везикул в синаптосомах та секреторних гранул тромбоцитів визначали за інтенсивністю флуоресценції зонду згідно з формулою:

$$F = F_t / F_0,$$

де F_0 — інтенсивність флуоресценції акридинового оранжевого за відсутності синаптосом або тромбоцитів у кюветі, F_t — інтенсивність флуоресценції зонду в присутності синаптосом або тромбоцитів у кюветі.

Синтез наночастинок магнетиту

Для синтезу наночастинок використовували такі матеріали: соляну кислоту концентровану, розчин аміаку у воді («Хімлабор-реактив»), сульфат заліза (II) семиводний $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, сульфат заліза (II) чотириводний $FeSO_4 \cdot 4H_2O$, хлорид заліза (III) шестиводний $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, декстран, хітозан, льодяну оцтову кислоту, нітрат калію KNO_3 , гідроксид калію КОН, епіхлоргідрин, перйодат натрію $NaIO_4$, сечовину, гідроксіетилкрохмаль $(C_{22}H_{44}O_{17})_n$, тетрагідроборат натрію $NaBH_4$, γ -амінопропілтриетоксисилан (γ -АПС) (Sigma-Aldrich), етанол. Усі розчини готували на бідистильованій воді.

Синтез магнітних наночастинок оксиду заліза, покритих декстраном

Зразок було отримано методом гідротермічного осадження двовалентного заліза у водному середовищі в присутності слабого окисника. Усі маніпуляції проводили в боксі в безкисневій атмосфері. Розчини реагентів (1400 мл бідистильованої води, 200 мл розчину 2,5М КОН, 200 мл розчину 1М KNO_3 , 200 мл розчину 1М $FeSO_4$) швидко змішували, температуру реакційної суміші доводили до 90 °С. Час реакції — 2 год після встановлення необхідної температури. Після закінчення реакції утворені наночастинок магнетиту відмивали лугом (0,05М КОН) з використанням методу магнітної сепарації. Одразу ж після отримання магнітних наночастинок до суспензії додавали 100 мл 10% -го розчину декстрану в 1М КОН. Після інкубації протягом 2 год до реакційної суміші додавали 100 мг $NaBH_4$, температуру суміші підвищували до 50 °С та інкубували при цій температурі ще протягом 2 год. Після цього краплями додавали 2,5 мл епіхлоргідрину та інкубували упродовж 10 год за температури 50 °С. Таким чином отримали магнітні наночастинок, вкриті зшитим декстраном.

Синтез магнітних наночастинок оксиду заліза, покритих гідроксіетилкрохмалем

Зразок було одержано методом гідротермічного осадження двовалентного заліза у водному середовищі в присутності слабого окисника. Усі маніпуляції проводили в боксі в безкисневій атмосфері. Розчини реагентів (1400 мл бідистильованої води, 200 мл розчину 2,5М КОН, 200 мл розчину 2М KNO_3 та 200 мл розчину 1М $FeSO_4$) швидко змішували в реакційній посудині, температуру реакційної суміші доводили до 90 °С. Час реакції — 4 год після встановлення потрібної температури. Після цього утворені наночастинок магнетиту відмивали лугом (0,05М КОН) з використанням методу магнітної сепарації. Одразу ж після отримання наночастинок до їх суспензії в 0,05М КОН додавали 100 мл 10% -го розчину гідроксіетилкрохмалю в 1М КОН і піддавали суміш ультразвуковій обробці протягом 2 год. Після інкубації до реакційної суміші додавали 100 мг $NaBH_4$, температуру підвищували до 50 °С та інкубували при цій температурі ще протягом 2 год. Після цього краплями додавали 2,5 мл епіхлоргідрину й інкубували упродовж 10 год за температури 50 °С. Після закінчення реакції утворені наночастинок магнетиту відмивали бідистильованою водою з використанням методу магнітної сепарації. Таким чином отримали магнітні наночастинок, вкриті зшитим гідроксіетилкрохмалем.

Синтез магнітних наночастинок оксиду заліза, покритих окисненим гідроксіетилкрохмалем

Зразок одержували методом гідротермічного осадження двовалентного заліза у водному середовищі в присутності слабого окисника. Усі маніпуляції проводили в боксі в безкисневій атмосфері. Розчини реагентів (1400 мл бідистильованої води, 200 мл 1,5М КОН, 200 мл 2М KNO_3 та 200 мл 1М $FeSO_4$) швидко змішували в реакційній посудині, температуру реакційної суміші доводили до 90 °С. Час реакції — 2,5 год після досягнення необхідної температури. Далі утворені наночастинок магнетиту відмивали лугом (0,05М КОН) з використанням методу магнітної сепарації. Одразу ж після отримання наночастинок до їх суспензії в 0,05М КОН додавали 100 мл 2% -го розчину γ -амінопропілтриетоксисилану в 0,05М КОН, вміщували суміш у термостат за 90 °С та інкубували протягом 2,5 год при 90 °С. Утворені наночастинок магнетиту відмивали лугом (0,05М КОН) з використанням ме-

тоду магнітної сепарації. Потім утворені магнітні наночастинки змішували з 50 мл бідистильованої води. Для утворення покриття готували суміш модифікованого крохмалю. Для цього 14 мл 0,4М розчину NaIO_4 додавали до 100 мл 10%-го розчину гідроксіетилкрохмалю у воді. Перемішували протягом 2 год за кімнатної температури. Отриману суміш модифікованого крохмалю додавали до 100 мл розчину модифікованих γ -амінопропілтриетоксисиланом магнітних наночастинок, суспензію обробляли ультразвуком та витримували при температурі 60 °С протягом 4 годин. Одержаний продукт промивали бідистильованою водою з використанням методу магнітної сепарації. Таким чином отримали магнітні наночастинки, вкриті окисленим гідроксіетилкрохмалем.

Синтез магнітних наночастинок оксиду заліза, покритих хітозаном

Зразок отримували методом співосадження солей дво- та тривалентного заліза за допомогою аміаку. Розчини реагентів (4 мл 1М розчину FeCl_3 в 1М соляній кислоті та 1 мл 2М розчину FeSO_4 в 1М соляній кислоті) швидко змішували в реакційній посудині і додавали краплинами до реакційної суміші 50 мл розчину аміаку за повільного механічного перемішування. Після завершення реакції магнетитові частинки диспергували за допомогою ультразвукового диспергатора, тричі промивали деіонізованою водою для видалення залишкових сурфактантів та реагентів, які не прореагували, і додавали 25 мл бідистильованої води. Потім до реакційної суміші додавали 0,1 г хітозану в 1% -й оцтовій кислоті та 8,25 г сечовини й нагрівали при 95 °С протягом 2 год. Після охолодження осад тричі промили деіонізованою водою для видалення залишкових сурфактантів та реагентів, які не прореагували. Таким чином одержали магнітні наночастинки, вкриті хітозаном.

Синтез магнітних наночастинок оксиду заліза, покритих кремнеземом

Зразок отримували методом співосадження солей дво- та тривалентного заліза за допомогою аміаку. Розчини реагентів (4 мл 1М розчину FeCl_3 в 1М соляній кислоті та 1 мл 2М розчину FeSO_4 в 1М соляній кислоті) швидко змішували в реакційній посудині та швидко додавали 50 мл розчину аміаку за механічного перемішування. Одержану суміш вміщували в термостат при 80 °С та інкубувати за такої температури

протягом 1 год. Після завершення реакції магнетитові частинки диспергували за допомогою ультразвукового диспергатора, тричі промивали 0,05М КОН для видалення залишкових сурфактантів та реагентів, які не прореагували. Одразу ж після отримання наночастинок до їх суспензії в 0,05М КОН додавали 25 мл 2%-го розчину γ -амінопропілтриетоксисилану в 0,05М КОН, вміщували суміш у термостат при 90 °С та інкубували впродовж 2,5 год за 90 °С. Утворені наночастинки магнетиту відмивали лугом (0,05М КОН), застосовуючи метод магнітної сепарації. Таким чином одержали магнітні наночастинки, вкриті γ -амінопропілтриетоксисиланом (кремнеземом).

Результати та обговорення

У роботі було використано наночастинки магнетиту Fe_3O_4 розміром близько 10 нм, синтезовані методом осадження солей дво- та тривалентного заліза за допомогою аміаку (див. розділ Матеріали та методи). Функцію розподілу частинок за розміром вивчали за допомогою лазерного кореляційного спектрометра ZetaSizer-3 Malvern Instrument (Великобританія). Суспензія таких наночастинок в стандартному сольовому розчині (рис. 1), а також у присутності синапсом та тромбоцитів була нестабільною.

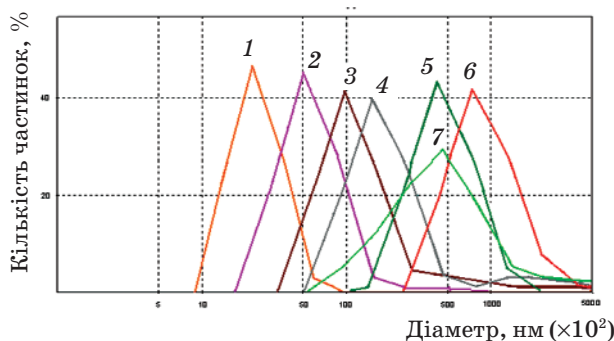


Рис. 1. Аналіз розміру наночастинок магнетиту без покриття у стандартному сольовому розчині (5 мг/мл) методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв та (пронумеровано цифрою над піком).

Дослідження взаємодії синапсом з наночастинками магнетиту з різними типами органічного покриття методом фотонної кореляційної спектроскопії

Відомо, що різноманітні покриття на поверхні наночастинок оксиду заліза забезпечують їхню стабільність. Стабільність наночастинок оксиду заліза у біологічних

середовищах і під дією магнітного поля визначають як рівновагу між процесами агрегації (зумовленої магнітними біполярними силами притягання та силами Ван-дер-Ваальса) і відштовхування наночастинок (електростатичного та стеричного). З метою запобігання агрегації наночастинок застосовують різноманітні неорганічні (кремнезем, золото, гадоліній), мономерні (карбоксилати, фосфати) та полімерні (декстран, ПАГ, полівініловий спирт тощо) покриття [20].

У цій роботі було використано наночастинки магнетиту Fe_3O_4 з нанесеним на їхню поверхню покриттям із декстрану, гідроксіетилкрохмалю, окисненого гідроксіетилкрохмалю, хітозану та кремнезему (розмір наночастинок з покриттям — близько 50 нм) (рис. 2).

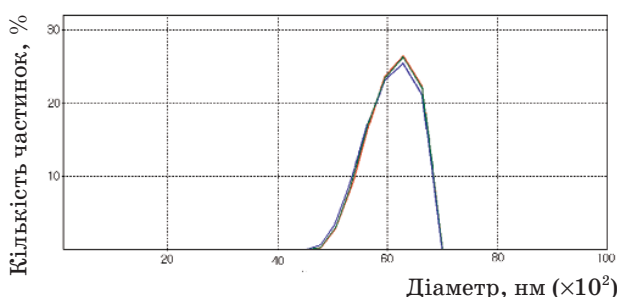


Рис. 2. Аналіз розміру наночастинок магнетиту, покритих кремнеземом (5 мг/мл), методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв: червона лінія — перше, блакитна лінія — друге, зелена лінія — третє вимірювання

У першій серії експериментів було оцінено розмір ізольованих нервових терміналей *per se* та його зміни в присутності наночастинок магнетиту з різними типами органічного покриття. Методом фотонної кореляційної спектроскопії встановлено, що середній діаметр синапсосом дорівнює $3,24 \pm 0,10$ мкм (рис. 3).

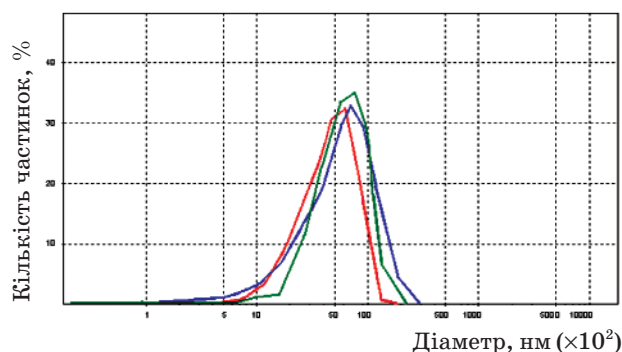


Рис. 3. Аналіз препарату синапсосом методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв: червона лінія — перше, блакитна лінія — друге, зелена лінія — третє вимірювання

Діаметр синапсосом (концентрація протеїну 0,5 мг/мл) збільшувався до $3,94 \pm 0,10$ мкм після додавання наночастинок магнетиту, покритих декстраном (рис. 4). Аналогічно, діаметр синапсосом становив $3,96 \pm 0,10$ мкм у присутності наночастинок магнетиту, покритих гідроксіетилкрохмалем (рис. 5); $3,97 \pm 0,10$ мкм — окисненим гідроксіетилкрохмалем; $3,98 \pm 0,09$ мкм — хітозаном; $3,97 \pm 0,10$ мкм — кремнеземом (дані не наведено). Збільшення середнього діаметра синапсосом після додавання наночастинок свідчить про зв'язування наночастинок з нервовими терміналами.

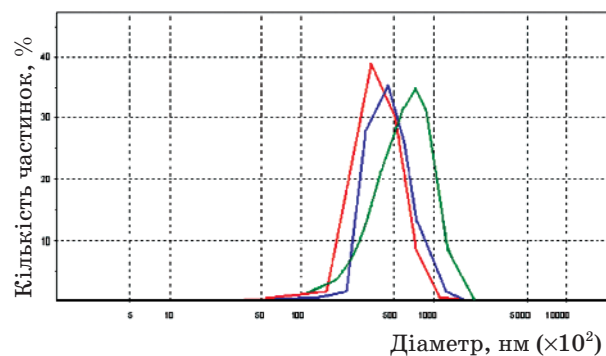


Рис. 4. Аналіз розміру синапсосом (концентрація протеїну 0,5 мг/мл) у присутності наночастинок магнетиту, покритих декстраном (5 мг/мл), методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв. Червона лінія — синапсосом в контролі після інкубації впродовж 5 хв, блакитна лінія — синапсосом в присутності наночастинок після інкубації протягом 5 хв, зелена лінія — синапсосом в присутності наночастинок після інкубації впродовж 2 хв

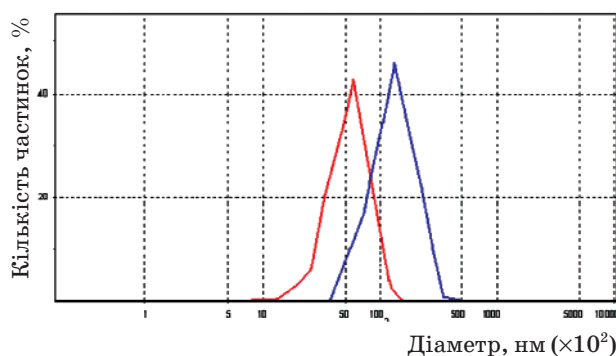


Рис. 5. Аналіз розміру синапсосом (концентрація протеїну 0,5 мг/мл) у присутності наночастинок магнетиту, покритих гідроксіетилкрохмалем (5 мг/мл), методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв. Червона лінія — синапсосом в контролі після інкубації впродовж 5 хв, блакитна лінія — синапсосом в присутності наночастинок після інкубації протягом 5 хв

Аналіз взаємодії наночастинок магнетиту, на поверхню яких нанесено різні типи органічного покриття, з тромбоцитами методом фотонної кореляційної спектроскопії

Аналогічні експерименти було проведено на тромбоцитах, виділених із крові кроля. Показано, що середній діаметр тромбоцитів становить $2,50 \pm 0,09$ мкм (рис. 6). Після додавання наночастинок магнетиту до тромбоцитів їхній діаметр збільшувався до $2,9 \pm 0,10$ мкм за аплікації наночастинок магнетиту, покритих декстраном (рис. 7), $2,94 \pm 0,10$ мкм — гідроксіетилкрохмалем (рис. 8), $2,95 \pm 0,09$ мкм — окисненим гідроксіетилкрохмалем, $2,94 \pm 0,10$ мкм — хітозаном, $2,98 \pm 0,10$ мкм — кремнеземом (рис. 9). Таким чином, було показано зв'язування наночастинок з тромбоцитами, про що свідчить збільшення середнього діаметра тромбоцитів у присутності наночастинок.

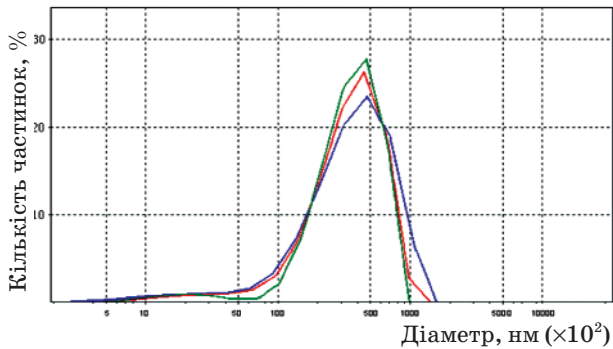


Рис. 6. Аналіз розміру тромбоцитів (концентрація протеїну 0,5 мг/мл) методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв: червона лінія — перше, блакитна лінія — друге, зелена лінія — третє вимірювання

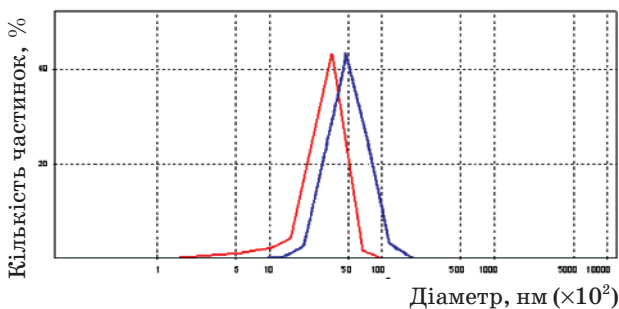


Рис. 7. Аналіз розміру тромбоцитів (концентрація протеїну 0,5 мг/мл) у контролі та в присутності наночастинок магнетиту, покритих декстраном (5 мг/мл), методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв. Червона лінія — тромбоцити в контролі після інкубації впродовж 5 хв, блакитна лінія — тромбоцити в присутності наночастинок після інкубації протягом 5 хв

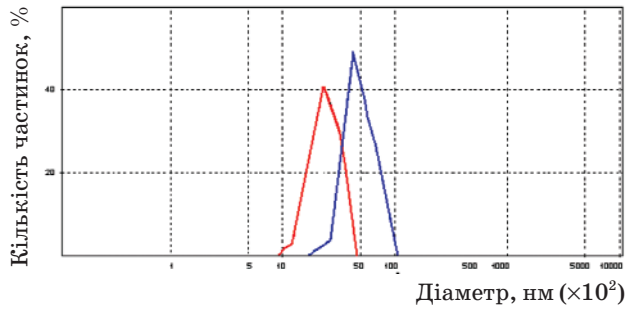


Рис. 8. Аналіз розміру тромбоцитів (концентрація протеїну 0,5 мг/мл) у контролі та присутності наночастинок магнетиту, покритих гідроксіетилкрохмалем (5 мг/мл), методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв. Червона лінія — тромбоцити в контролі після інкубації впродовж 5 хв, блакитна лінія — тромбоцити в присутності наночастинок після інкубації протягом 5 хв

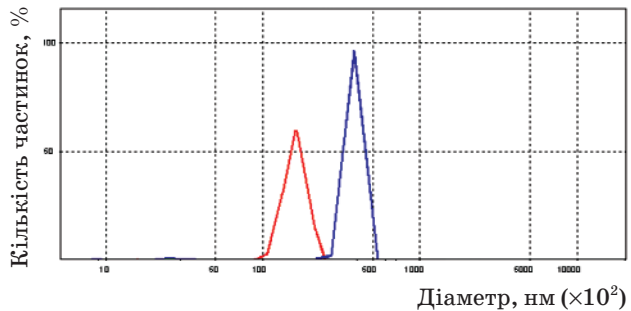


Рис. 9. Аналіз розміру тромбоцитів (концентрація протеїну 0,5 мг/мл) у контролі та в присутності наночастинок магнетиту, покритих кремнеземом (5 мг/мл), методом фотонної кореляційної спектроскопії.

Кожне вимірювання проводили протягом 2 хв. Червона лінія — тромбоцити в контролі після інкубації впродовж 5 хв, блакитна лінія — тромбоцити в присутності наночастинок після інкубації протягом 5 хв

Аналіз взаємодії наночастинок магнетиту, покритих різними полімерами, з тромбоцитами методом проточної цитометрії

Цитометричні дослідження свідчать про наявність зсуву характерного положення плями тромбоцитів у системі координат FS LOG/SS LOG у разі додавання наночастинок (рис. 10). Таким чином, дані щодо взаємодії тромбоцитів з наночастинами магнетиту, отримані методом фотонної кореляційної спектроскопії, було підтверджено з використанням методу проточної цитометрії.

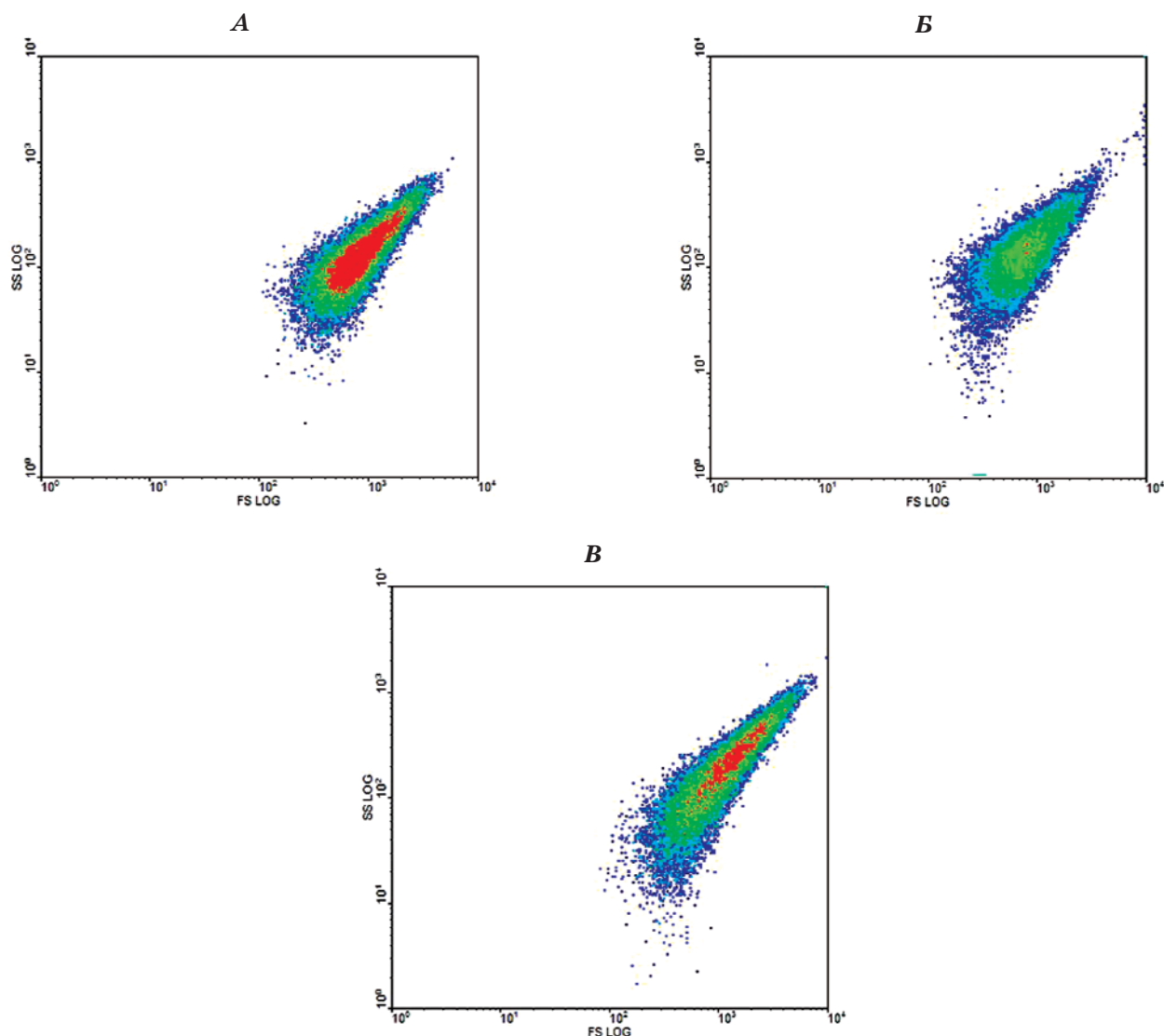


Рис. 10. Аналіз препарату тромбоцитів (концентрація протеїну 0,25 мг/мл) методом проточної цитометрії в контролі (А), у присутності наночастинок магнетиту (5 мг/мл), покритих кремнеземом (В) та гідроксіетилкрохмалем (В).

Регстрацію було проведено після преінкубації контрольних тромбоцитів або тромбоцитів у присутності наночастинок оксиду заліза впродовж 10 хв

Отримані експериментальні дані свідчать про зв'язування наночастинок магнетиту з покриттям із плазматичними мембранами синапсом та тромбоцитів, тому вважали за доцільне проаналізувати, як впливає це зв'язування на таку важливу характеристику, як мембранний потенціал.

Оцінка мембранного потенціалу синапсом та тромбоцитів за присутності наночастинок магнетиту з різними типами покриття

Методом спектрофлуориметрії з використанням потенціалчутливого флуоресце-

нтного зонда родаміну 6G було здійснено аналіз мембранного потенціалу синапсом та тромбоцитів у присутності наночастинок магнетиту з різними типами покриття. Встановлено, що наночастинки магнетиту без покриття та з нанесеним покриттям з декстрану (1), гідроксіетилкрохмалю (2), окисненого гідроксіетилкрохмалю (3), хітозану (4) та кремнезему (5) (рис. 11, А) не змінюють рівноважний рівень флуоресценції родаміну 6G в синапсомах та тромбоцитах (рис. 11, В), що свідчить про відсутність впливу наночастинок різних типів на таку важливу характеристику досліджуваних об'єктів, як мембранний потенціал.

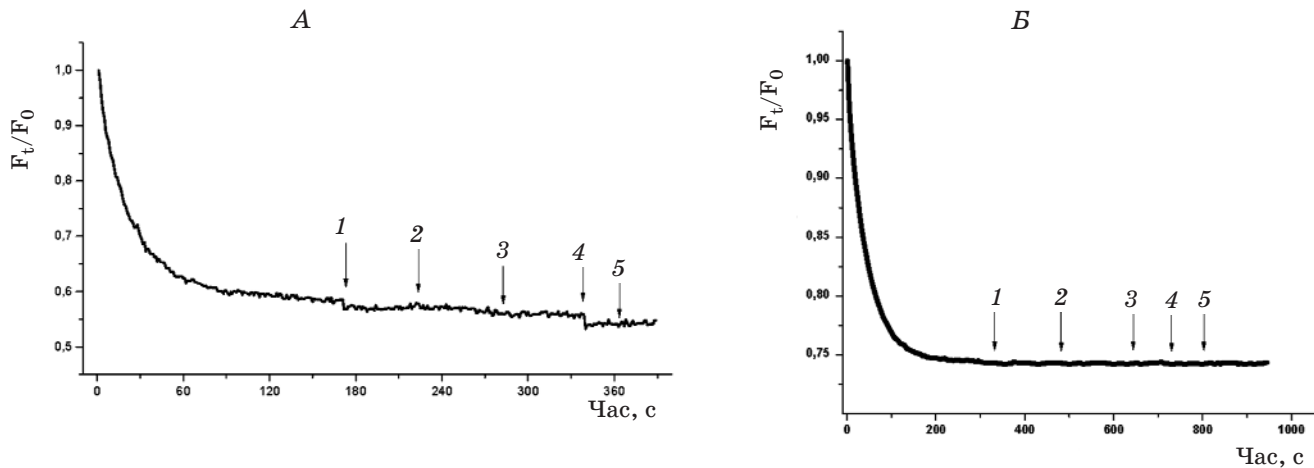


Рис. 11. Оцінка мембранного потенціалу синапсом (А) та тромбоцитів (Б) за умов присутності наночастинок магнетиту з різними типами покриття.

Експерименти проведено з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонду родаміну 6G. Стрілка показує момент додавання наночастинок. Дані наведено згідно з вимірюваннями, проведеними в чотирьох незалежних експериментах

Оцінювання закислення синаптичних везикул синапсом та секреторних гранул тромбоцитів за присутності наночастинок магнетиту з різними типами покриття

Одним з ключових етапів синаптичної передачі є екзоцитоз — стимульоване деполаризацією вивільнення нейромедіаторів із синаптичних везикул шляхом злиття останніх з плазматичною мембраною нервових закінчень. Накопичення нейромедіаторів у синаптичних везикулах здійснюється спеціальними везикулярними транспортерами нейромедіаторів. Ці транспортери використовують протонний градієнт на мембрані синаптичних везикул як рушійну силу процесу накопичення в них нейромедіатора. Порушення протонного градієнта синаптичних везикул може призвести до зниження концентрації нейромедіатора у везикулах. Унаслідок цього зменшується кількість нейромедіатора, що вивільняється шляхом екзоцитозу при деполаризації плазматичної мембрани нервових терміналей. Слід зазначити, що протонний градієнт на мембрані секреторних гранул тромбоцитів є рушійною силою процесу накопичення в них таких речовин, як глутамат, серотонін, кальцій та ін. Порушення протонного градієнта секреторних гранул тромбоцитів може призвести до змін у функціонуванні тромбоцитів та в системі гемостазу загалом.

Оцінювали закислення синаптичних везикул синапсом та секреторних гранул тромбоцитів за присутності наночастинок магнетиту з різними типами покриття мето-

дом спектрофлуориметрії з використанням рН-чутливого флуоресцентного зонду акридинового оранжевого. Додавання суспензії синапсом та тромбоцитів до розчину акридинового оранжевого супроводжується частковим зменшенням флуоресценції внаслідок входу зонду в органели з кислим значенням рН [19]. Акумуляція акридинового оранжевого не є швидким процесом, стабілізація рівня флуоресцентного сигналу відбувалась упродовж декількох хвилин (рис. 12). Додавання наночастинок магнетиту без покриття та з нанесеними покриттями: декстрану (1), гідроксіетилкрохмалю (2), окисненого гідроксіетилкрохмалю (3), хітозану (4) або кремнезему (5) не призводило до змін рівноважного рівня флуоресценції акридинового оранжевого в синапсом (рис. 12, А) та тромбоцитах (рис. 12, Б). Це свідчить про відсутність впливу наночастинок різних типів на таку важливу характеристику, як закислення синаптичних везикул в синапсом та секреторних гранул у тромбоцитах.

Таким чином, підібрано умови взаємодії синтезованих наночастинок магнетиту з різними типами органічного покриття з нервовими терміналами головного мозку та тромбоцитами як периферичною моделлю пресинапсу. Методами фотонної кореляційної спектроскопії та проточної цитометрії показано зв'язування наночастинок з нервовими терміналами головного мозку та тромбоцитами. Однак питання про те, чи супроводжується це зв'язування проникненням

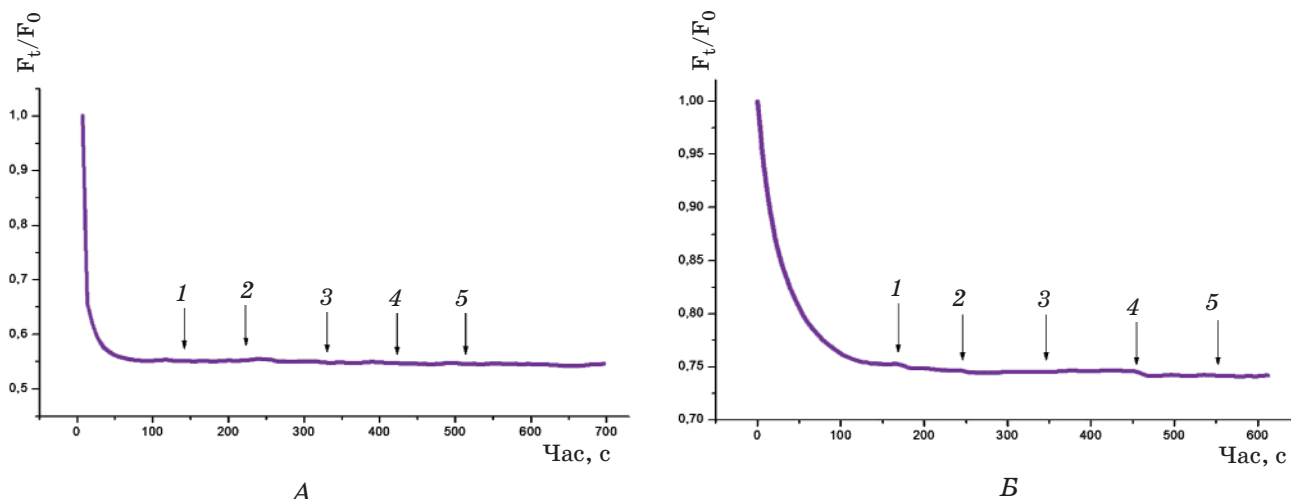


Рис. 12. Оцінка закиснення синаптичних везикул синапсом (А) та секреторних гранул тромбоцитів (Б) за умов присутності наночастинок магнетиту з різними типами покриття.

Експерименти проведено з використанням рН-чутливого флуоресцентного зонду акридинового оранжевого. Стрілка показує момент додавання наночастинок.

Дані наведено згідно з вимірюваннями, проведеними в чотирьох незалежних експериментах

наночастинок через плазматичну мембрану у внутрішньоклітинне середовище, потребує подальшого вивчення. За даними літератури пропонується декілька механізмів взаємодії наночастинок заліза з різними типами покриття із клітинами, включаючи пасивну дифузію, клатрин- і кавеолінзалежний та клатрин- і кавеоліннезалежний ендоцитоз. Після інтерналізації наночастинки магнетиту можуть розпадатися до іонів у лізосомах.

Зв'язування покритих полімерами наночастинок магнетиту з нервовими терміналами головного мозку свідчить про те, що ці частинки можуть бути використані в нанонейротехнології під час лікування методом гіпертермії. Відомо, що гіпертермія є одним з перспективних підходів у протиопухлинній терапії. Основною проблемою є складність локального нагріву зони пухлини без ушкодження здорових тканин. Магнітна гіпертермія — це підвищення температури, спри-

чинене зовнішнім магнітним полем, яке діє на наночастинки магнетиту в певній ділянці. Ця методика ґрунтується на здатності суспензії наночастинок магнетиту поглинати енергію змінного магнітного поля з певною частотою і перетворювати її на тепло. Головною перевагою використання наночастинок магнетиту над загальноприйнятими методами є локальна дія гіпертермічного впливу та мінімальне ушкодження прилеглих тканин [7]. Важливими результатами цього дослідження є доказ відсутності впливу наночастинок магнетиту з різними типами органічного покриття на мембранний потенціал, а також на закиснення внутрішніх компартментів нервових терміналей та тромбоцитів.

Частину досліджень проведено за науково-технічною програмою «Нанотехнології та наноматеріали», грант № 5.18.5.27.

ЛІТЕРАТУРА

1. Karabulut N., Elmas N. Contrast agents used in MR imaging of the liver // *Diagn. Interv. Radiol.* — 2006. — V. 12. — P. 22–30.
2. Nagatani N., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. Development of a new transformation method using magnetite cationic liposomes and magnetic selection of transformed cells // *Biotechnol. Let.* — 2000. — V. 22. — P. 999–1002.
3. Soenen S. J., Nuytten N., De Meyer S. F. et al. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling // *Small.* — 2010. — V. 6. — P. 832–842.
4. Soenen S. J., Illyes E., Vercauteren D. et al. The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes // *Biomaterials.* — 2009. — V. 30. — P. 6803–6813.
5. Shinkai M., Ohshima A., Yanase M. et al. Development of novel magnetic sensing for brain lesion using functional magnetic particles // *Kagaku Kougaku Ronbunshu.* — 1998. — V. 24. — P. 174–178.
6. Uchiyama T., Mohri K., Shinkai M. et al. Basic study for brain tumor position sensing using amorphous wire MI micro magnetic sensor // *Trans. IEE, Jpn.* — 1999. — V. 119-C. — P. 545–553.
7. Goya G. F., Grazu V., Ibarra M. R. Magnetic nanoparticles for cancer therapy // *Cell. Biol. Int.* — 2008. — V. 32, N 8. — P. 1001–1005.
8. Bellova A., Bystrenova E., Koneracka M. et al. Effect of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation // *Nanotechnology.* — 2010. — V. 21. — P. 065103.
9. Danbolt N. Glutamate uptake // *Prog. Neurobiol.* — 2001. — V. 65. — P. 1–105.
10. Borisova T., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. Diverse presynaptic mechanisms underlying methyl-beta-cyclodextrin — mediated changes in glutamate transport // *Cell. Mol. Neurobiol.* — 2010. — V. 30, N 7. — P. 1013–1023.
11. Borisova T., Krisanova N., Sivko R., Borysov A. Cholesterol depletion attenuates tonic release but increases the ambient level of glutamate in rat brain synaptosomes // *Neurochem. Int.* — 2010. — V. 56. — P. 466–478.
12. Пат. 38155 UA, МПК(2006)C07D277/00. Сполука 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(2-гідроксіетил)тіазолій хлорид, яка має інгібуючий ефект на процес натрій-залежного накопичення глутамату ізольованими нервовими закінченнями головного мозку щурів / Т. О. Борисова, Н. В. Крисанова, Р. В. Сівко, О. В. Романенко, А. І. Вовк. — Заявл. 17.07.2008; Опубл. 25.12.2008, Бюл. № 24.
13. Пат. 45941 UA, МПК(2009)C07D277/00. Застосування сполуки 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(2-гідроксіетил)тіазолій хлорид як сполуки, яка викликає деполаризацію плазматичної мембрани ізольованих нервових закінчень головного мозку щурів / Т. О. Борисова, О. В. Романенко, Л. І. Остапченко, Л. О. Касаткіна, А. А. Борисов, Н. В. Крисанова, А. І. Вовк. — Заявл. 23.09.2009; Опубл. 25.11.2009, Бюл. № 22.
14. Kasatkina L., Borisova T. Impaired Na⁺-dependent glutamate uptake in platelets during depolarization of their plasma membrane // *Neurochem. Int.* — 2010. — V. 56. — P. 711–719.
15. Пат. 48769 UA, МПК(2009)C07D277/00. Застосування сполуки 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(2-гідроксіетил)тіазолій хлорид як сполуки, яка викликає деполаризацію плазматичної мембрани тромбоцитів крові кроля / Т. О. Борисова, О. В. Романенко, Л. О. Касаткіна, А. А. Борисов, А. І. Вовк. — Заявл. 24.12.2009; Опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6.
16. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Meth. Enzymol.* — 1974. — V. 31. — P. 445–452.
17. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.* — 1986. — V. 155. — P. 243–248.
18. Mangano R., Schwarcz R. The human platelets as a model for the glutamatergic neuron: platelet uptake of L-glutamate // *J. Neurochem.* — 1981. — V. 36. — P. 1067–1076.
19. Zoccarato F., Cavallini L., Alexandre A. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes // *Ibid.* — 1999. — V. 72. — P. 625–633.
20. Laurent S., Forge D., Port M. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications // *Chem. Rev.* — 2008. — V. 108, N 6. — P. 2064–2110.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ
МАГНЕТИТА, ПОКРЫТЫХ ПОЛИМЕРАМИ,
С НЕРВНЫМИ ТЕРМИНАЛЯМИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА
И ТРОМБОЦИТАМИ КРОВИ**

*Т. А. Борисова¹
Н. А. Дудченко²
А. Б. Брик²
Л. А. Касаткина^{1,3}
Р. В. Сивко¹
А. Ю. Чунихин¹
Н. В. Крысанова¹*

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

²Институт геохимии, минералогии
и рудообразования им. М. П. Семененко
НАН Украины, Киев

³Образовательно-научный центр
«Институт биологии»,
Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

E-mail: tborisov@biochem.kiev.ua

С точки зрения нанонейротехнологии использование магнитных наночастиц является чрезвычайно перспективным для транспортировки биологически активных веществ и лекарств к клеткам-мишеням при наружном манипулировании и в противоопухолевой терапии. Подобраны условия взаимодействия синтезированных наночастиц магнетита, покрытых декстраном, гидроксипропилоккрахмалом, окисленным гидроксипропилоккрахмалом, хитозаном и кремнеземом, с нервными терминалями головного мозга и тромбоцитами крови (как периферической моделью пресинапса). Методами фотонной корреляционной спектроскопии и проточной цитометрии показано связывание наночастиц с нервными терминалями и тромбоцитами. Проанализирован потенциал плазматической мембраны нервных терминалей и тромбоцитов с использованием потенциальночувствительного флуоресцентного зонда родамина 6 G и показано отсутствие влияния наночастиц на этот показатель. С применением рН-чувствительного флуоресцентного зонда акридинового оранжевого установлено, что закисление синаптических везикул нервных терминалей и секреторных гранул тромбоцитов не изменяется в присутствии наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы магнетита, синапсосомы, тромбоциты.

**INTERACTION OF POLIMER-COVERED
NANOPARTICLES OF MAGNETITE
WITH BRAIN NERVE TERMINALS
AND BLOOD PLATELETS**

*T. O. Borisova¹
N. O. Dudchenko²
O. B. Brik²
L. O. Kasatkina^{1,3}
R. V. Sivko¹
O. Yu. Chunikhin¹
N. V. Krisanova¹*

¹Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Semenenko Institute of Geochemistry,
Mineralogy and Ore Formation of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

³Educational and Scientific Center «Institute
of Biology», Taras Shevchenko National
University

E-mail: tborisov@biochem.kiev.ua

In nanoneurotechnology, usage of magnetic nanoparticles is a very perspective way for transport of active substances and drugs to target cells in response to external manipulation and anticancer therapy. Interaction of synthesized nanoparticles of magnetite covered with dextrane, hydroxyethyl starch, oxidized hydroxyethyl starch, chitozan and silica with brain nerve terminals and blood platelets (as peripheral model of presynapse) was analyzed. The binding of nanoparticles with nerve terminals and platelets was demonstrated using photon correlation spectroscopy and flow cytometry. Using potential-sensitive fluorescent dye rhodamine 6 G, we showed that nanoparticles did not influence the potential of the plasma membrane of nerve terminals and platelets. Acidification of synaptic vesicles of nerve terminals and secretory granules of platelets was not changed in the presence of nanoparticles that was revealed with pH-sensitive fluorescent dye acridine orange.

Key words: magnetic nanoparticles, synaptosomes, blood platelets.