

DOI: 10.7868/S0869813918060059

**ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОЛИЛИЗИНОВЫХ  
ДЕНДРИМЕРОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ  
ТКАНЯХ КРЫС**

© И. А. Журавин,<sup>1</sup> Н. М. Дубровская,<sup>1</sup> Н. Л. Туманова,<sup>1</sup> Д. С. Васильев,<sup>1</sup>  
И. И. Тарасенко,<sup>2</sup> И. М. Неелов,<sup>2</sup> Н. Н. Наливаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Университет информационных технологий, механики и оптики,  
Санкт-Петербург, Россия

E-mail: i-zhur@mail.ru; zhuravin@iephb.ru

В рамках настоящей работы с помощью метода конфокальной микроскопии впервые проведено сопоставление эффективности способов доставки полилизинных дендримеров 3-го и 5-го поколений в ткань головного мозга крыс при различных способах их введения в организм: путем внутрибрюшинных или интраназальных инъекций, а также микроинъекций в желудочки мозга. Исследованные дендримеры размером менее 2 нм образованы разветвленными полипептидными цепями на основе аминокислоты лизина с регулярной сферической структурой и большим числом терминальных групп, несущих положительный заряд. Показано, что полилизинные дендримеры имеют высокую способность к проникновению в клетки нервной ткани, однако обладают недостаточной способностью к широкому распространению в ткани головного мозга. Результаты исследования свидетельствуют об эффективности введений в желудочки мозга дендримеров для их доставки к клеткам головного мозга. Вместе с тем выявлена низкая эффективность внутрибрюшинных и интраназальных введений данного класса дендримеров для доставки в ткань мозга, возможно, из-за трудностей в преодолении гематоэнцефалического барьера.

*Ключевые слова:* головной мозг, крыса, полилизинные дендримеры, наночастицы, конфокальная микроскопия.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 647—653. 2018

*I. A. Zhuravin,<sup>1</sup> N. M. Dubrovskaya,<sup>1</sup> N. L. Tumanova,<sup>1</sup> D. S. Vasilev,<sup>1</sup> I. I. Tarasenko,<sup>2</sup> I. M. Neelov,<sup>2</sup> N. N. Nalivaeva.* ANALYSIS OF POLYLYSINE DENDRIMER DISTRIBUTION IN THE BRAIN AND PERIPHERAL TISSUES OF RAT. <sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup> ITMO University, St. Petersburg, Russia, e-mail: i-zhur@mail.ru; zhuravin@iephb.ru.

In this study for the first time the efficacy of delivery into the brain of polylysine dendrimers of the third and fifth generations via different routes of administration (intraperitoneal injections — *i. p.*, into the ventricles of the brain — *i. v.* or intranasally) has been compared by confocal microscopy. The intensity of distribution of dendrimers in brain tissue after *i. v.* administration has also been evaluated. The studied dendrimers formed by the polypeptide branches of the amino acid lysine had a size less than 2 nm, regular spherical structure and a large number of terminal

groups bearing a positive charge. It was found that polylysine dendrimers have a high ability to penetrate into brain cells, but the insufficient distribution area in the brain tissue. The results of this study testify to the effectiveness of *i. v.* dendrimer injections, but low efficacy of *i. p.* and intranasal administration of these dendrimer classes due to their low ability to penetrate through the blood-brain barrier.

*Key words:* brain, rat, polylysine dendrimers, nanoparticles, confocal microscopy.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 647—653. 2018

Дендримеры представляют собой класс синтетических разветвленных полимеров с регулярной сферической структурой и большим числом терминальных групп. Дендример первого поколения (первой генерации) имеет одну точку ветвления в каждой ветви, второго поколения — две точки ветвления и т. д., что достигается в ходе многоступенчатого процесса их синтеза (рис. 1, А) [3, 9]. Гибридные дендримеры с различными концевыми группами используются во многих биомедицинских приложениях для доставки к органам и тканям лекарственных препаратов, ДНК и пептидов [9]. Физико-химические свойства дендримеров и их биологическая активность интенсивно изучаются [1, 4], однако в литературе сведения об особенностях транспорта полилизиновых дендримеров в головной мозг отсутствуют, а данные об их взаимодействии с клетками нервной ткани весьма малочисленны. Вместе с тем эти сведения необходимы для эффективного применения дендримеров в экспериментах на животных, а также в терапевтических целях. Целью настоящей работы была оценка эффективности транспорта полилизиновых дендримеров 3-го и 5-го поколений в ткань головного мозга при различных способах введения в организм: внутривенно, интраназально, в желудочки мозга, а также анализ особенностей их распространения в нервной ткани.

#### МЕТОДИКА

Для работы были использованы дендримеры 3-го (D3) и 5-го (D5) поколений с регулярной структурой и размером менее 2 нм на основе лизина (рис. 1, А), конъюгированные с флуоресцентным красителем FITC [6]. Процесс синтеза и структура использованных в работе дендримеров описаны ранее [2, 5–7, 9]. В ходе настоящего исследования был изучен характер распространения дендримеров в ткани мозга взрослых самцов крыс линии Вистар при их однократном введении в желудочки одного из полушарий, а также при интраназальном или внутривенном введении. Наличие флуоресцентного сигнала в интересующих нас областях мозга и тканях организма проверяли через 50 и 180 мин после введения дендримеров.

Все опыты проводились в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86 / 609 for the Care of Laboratory Animals).

*Введения в желудочки мозга.* Наркотизированным золитилом (70 мг/кг) взрослым крысам ( $n = 6$ ) с помощью шприца Гамильтона (Aldrich Chemical Company, США) проводили однократное введение 1.2 мкл раствора дендримеров в физиологическом растворе ( $10^{-2}$ М) в правый желудочек мозга (рис. 1, Б) по координатам (мм): Bregma +0.20; L = 3.5; H = 0.5 [8]. Место прохождения иглы через теменную кору контролировали методом световой микроскопии.

*Интраназальные введения.* При однократном интраназальном введении раствор дендримеров ( $10^{-2}$ М) впрыскивали через наружные носовые проходы пипеткой-дозатором по 5 мкл в каждую ноздрю. В ходе дальнейшего микроскопического исследования контролировали попадание меченых дендримеров в обонятельные луковицы и полушария головного мозга.

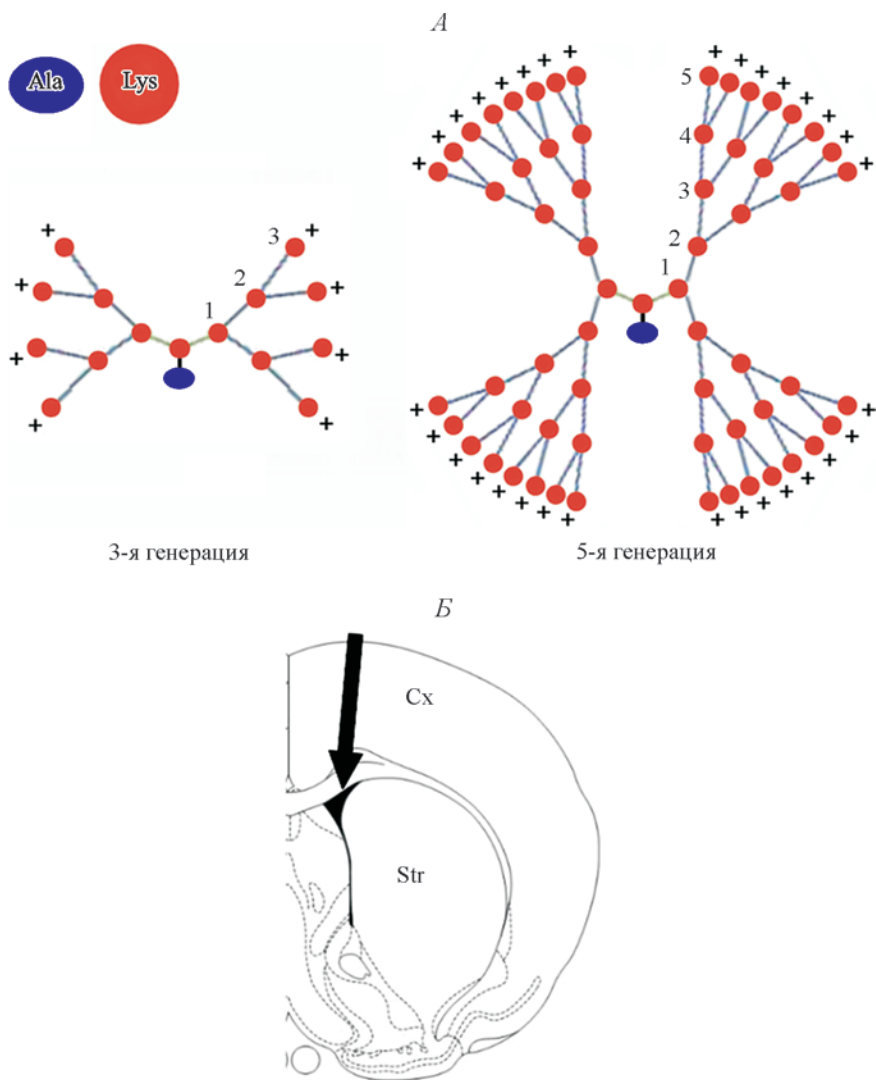
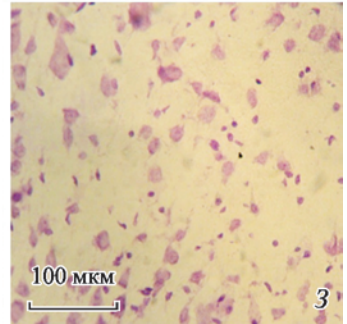
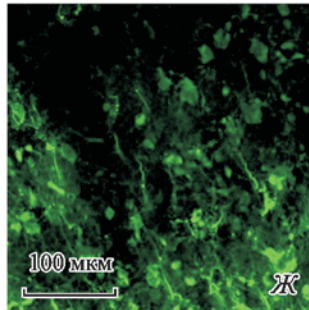
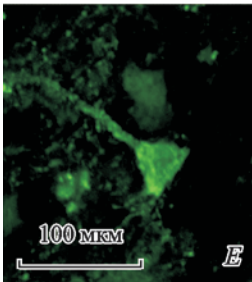
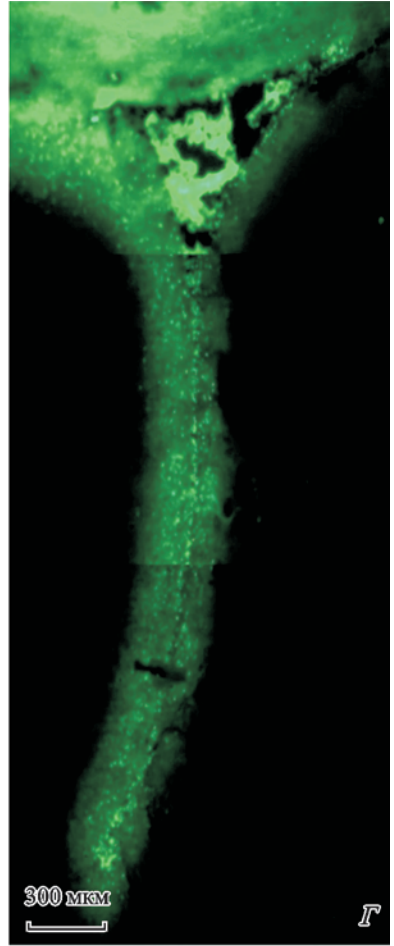
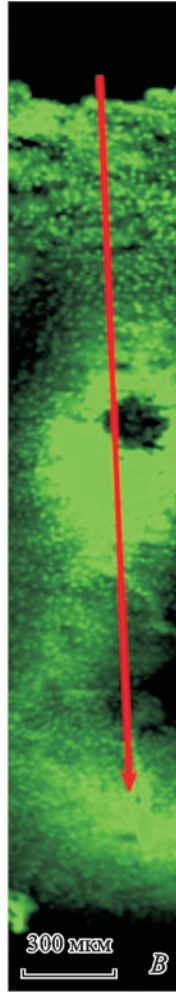
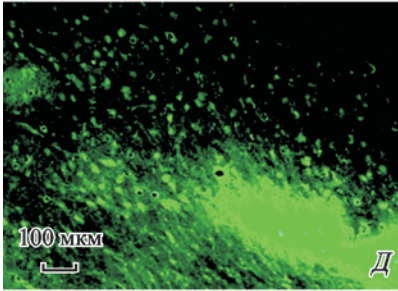
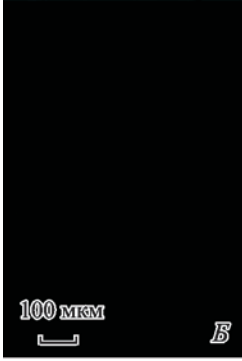
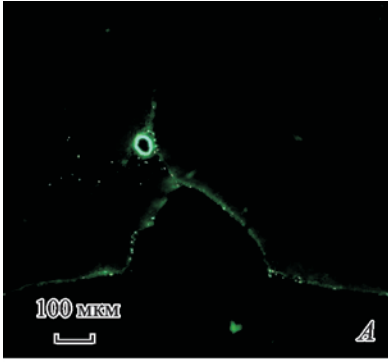


Рис. 1. Схемы структурной организации используемых полилизинных дендримеров (А) и схема их введения в мозг (Б).

А — строение дендримеров 3-го и 5-го поколений. Начальной точкой бифуркации является остаток аминокислоты лизина (Lys), связанный с аланином (Ala). Далее располагаются дихотомически ветвящиеся полипептидные цепи из полимеризованных остатков аминокислоты лизина. Количество таких звеньев определяет генерацию (поколение) дендримера (указано цифрами 1—3 и 1—5). Концевые положительно заряженные аминогруппы остатков лизина последней генерации придают наночастице электростатический заряд и способны образовывать ионные и водородные связи; Б — схема введения дендримеров в желудочки мозга крысы (Bregma +0.20 мм; L = 3.5 мм; H = 2.5 мм). Стрелкой на фронтальном срезе показан трек прохождения иглы инъектора через теменную кору. Str — стриатум, Cx — новая кора. Модифицировано из [8].

*Внутрибрюшинные введения.* При однократном внутрибрюшинном введении использовали раствор дендримеров в дозировке 16 мг/кг массы животного в 0.5 мл. Кроме ткани головного мозга наличие флуоресцентной метки проверяли в тканях почек и печени как возможных местах накопления дендримеров, различных по организму кровотоком.



*Изготовление препаратов ткани.* Полушария конечного мозга фиксировали методом погружения в 10%-ный раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере (pH 7.4), затем изготавливали серию фронтальных срезов мозга на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Аналогичным образом исследовали ткань почек (полный срез в дорсолатеральной плоскости, включающей почечную лоханку и мочеточник) и печени (фронтальный срез).

*Исследование распределения свечения конъюгированного с дендримером флуорохрома FITC* выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение FITC индуцировали светом Ar/He лазера при длине волны 488 нм, а флуоресценцию наблюдали в диапазоне 496—537 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что через 50 мин после однократной унилатеральной инъекции D3 в желудочек мозга флуоресцентная метка визуализировалась на расстоянии, не превышающем 500 мкм от трека и проникла не далее чем 300—500 мкм от стенки желудочка (рис. 2, *В, Г*). При введении более крупных молекул D5 область распространения флуоресцентной метки была в 1.5—2 раза меньше, чем при введении D3, при этом более явно наблюдалось постепенное ослабление яркости свечения при удалении от области введения (рис. 2, *Д*). Так, через 50 мин после введения D5 свечение наблюдалось в области, не превышающей 300 мкм от трека введения или стенки желудочка. Через 180 мин после введения дендримеров D3 или D5 картина распределения флуоресцентного сигнала в ткани, окружающей место введения, не менялась: область свечения FITC не увеличивалась, яркость свечения не уменьшалась, что свидетельствует о распространении данных соединений в нервной ткани только в течение первого часа. Обнаружено, что оба типа полилизиновых дендримеров захватывались клетками и были локализованы как в цитоплазме клеток, так и вблизи наружной клеточной мембраны, а также в отростках клеток (рис. 2, *Е*). Полученные данные свидетельствуют о быстром захвате дендримеров нервными клетками и глией (рис. 2, *Е, Ж*), что согласуется с полученными нами ранее данными о поведении дендримеров в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y [6]. Концевые положительно заряженные аминокислотные остатки лизина последней генерации придают наночастице электростатический заряд и способны образовывать ионные и водородные связи. Можно предположить,

---

Рис. 2. Распределение флуоресцентной метки в нервной ткани крыс после внутрибрюшинного (*А*), интраназального (*Б*) и внутрижелудочкового (*В—Ж*) введения полилизиновых дендримеров D3 (*А—Г, Е*) и D5 (*Д, Ж*), конъюгированных с FITC.

*А* — внутрибрюшинное введение FITC-конъюгированных дендримеров D3. Выявляется локализация дендримеров на стенках крупного сосуда коры мозга, однако в нервной ткани флуоресцентный сигнал отсутствует. Масштаб: 100 мкм; *Б* — интраназальное введение FITC-конъюгированных дендримеров D3. Отсутствие флуоресцентного сигнала в ткани фронтальной коры мозга крысы. Масштаб: 100 мкм; *В* — распределение FITC-конъюгированных дендримеров D3 вокруг трека после введения в желудочек мозга (показан красной стрелкой). Масштаб: 300 мкм; *Г* — распределение FITC-конъюгированных дендримеров D3 вокруг стенок желудочка при введении в желудочек мозга. Масштаб: 300 мкм. СС — волокна мозолистого тела, вдоль которых распространяется меченый дендример; *Д* — распределение FITC-конъюгированных дендримеров D5 вокруг трека после введения в желудочек мозга. Видно свечение FITC в телах клеток. Масштаб: 100 мкм; *Е* — свечение FITC, конъюгированного с дендримером D3, в примембранной области цитоплазмы пирамидного нейрона коры мозга вблизи места введения в желудочек мозга. Масштаб: 100 мкм; *Ж* — свечение FITC, конъюгированного с дендримером D5, в цитоплазме и отростках пирамидных нейронов коры мозга вблизи места введения в желудочек мозга. Масштаб: 100 мкм; *З* — микрофотография ткани теменной коры мозга крысы через 180 мин после введения дендримера D3 в желудочек мозга. Заметные нейродегенеративные изменения вблизи места введения дендримера не наблюдаются. Окраска по Ниссию. Масштаб: 100 мкм.

что наличие положительно заряженных групп на поверхности дендримеров способствует их связыванию с клеточной мембраной, облегчая дальнейшее проникновение этих соединений в клетку. При этом нейродегенеративных изменений пирамидных нейронов в области распространения дендримеров через 50 и 180 мин после введения не отмечалось (рис. 2, 3).

Эксперименты по изучению распространения дендримеров 3-го и 5-го поколений при внутрибрюшинном и интраназальном введении с последующим определением флуоресценции в ткани головного мозга, печени и почек крыс через 50 и 180 мин после введения показали, что после внутрибрюшинного введения флуоресценция FITC обнаруживается в капиллярных клубочках почек и кровеносных сосудах печени, сосудистой оболочке, желудочков и ткани головного мозга (рис. 2, А). Однако в самой ткани головного мозга флуоресценция отсутствовала. Результаты внутрибрюшинных введений свидетельствуют о том, что исследуемые дендримеры свободно распространяются с кровотоком, оседают в капиллярных клубочках почек, на стенках кровеносных сосудов, но неспособны проникать сквозь стенки сосудов и через гематоэнцефалический барьер. При интраназальном введении D3 и D5 флуоресценция FITC в ткани обонятельных луковиц и полушарий головного мозга (рис. 2, Б) также отсутствовала. Это свидетельствует о связывании либо поглощении дендримеров эпителиальной тканью слизистых оболочек, что препятствует доставке этих соединений в ткань мозга.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что положительно заряженные полилизинные дендримеры 3-го и 5-го поколений обладают низкой способностью к распространению в ткани головного мозга, поскольку их физико-химические свойства обеспечивают высокую способность концентрироваться у поверхности нервных, глиальных и иных типов клеток. С другой стороны, эта особенность обеспечивает проникновение данного типа дендримеров в клетки, что может быть использовано на практике. Полученные результаты также свидетельствуют о низкой эффективности внутрибрюшинных и интраназальных введений этих дендримеров для их доставки в ткань головного мозга.

Работа проведена по государственному заданию (АААА-А18-118012290373-7) в ИЭФБ РАН. Конфокальная микроскопия выполнена на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН. Дендримеры синтезированы в Университете ИТМО и предоставлены для исследования И. И. Тарасенко и И. М. Нееловым. И. М. Неелов благодарен за финансовую поддержку гранту 08-08 правительства Российской Федерации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Abbasi E., Aval S. F., Akbarzadeh A., Milani M., Nasrabadi H. T., Joo S. W., Hanifehpour Y., Nejati-Koshki K., Pashaei-Asl R.* Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* 9(1): 247. 2014.
- [2] *Falkovich S., Markelov D., Neelov I., Darinskii A.* Are structural properties of dendrimers sensitive to the symmetry of branching? Computer simulation of lysine dendrimers. *J. Chem. Phys.* 139: 064903. 2013.
- [3] *Kalomiraki M., Thermos K., Chaniotakis N. A.* Dendrimers as tunable vectors of drug delivery systems and biomedical and ocular applications. *Int. J. Nanomedicine.* 11: 1—12. 2015.
- [4] *Klajnert B., Cladera J., Bryszewska M.* Molecular interactions of dendrimers with amyloid peptides: pH dependence. *Biomacromolecules.* 7(7): 2186—2191. 2006.
- [5] *Markelov D. A., Falkovich S., Neelov I., Plyash M. Y., Matveev V., Lahderanta E., Ingman P., Darinskii A.* Molecular dynamics simulation of spin-lattice NMR relaxation in poly-1-ly-

sine dendrimers. Manifestation of the semiflexibility. *Physical Chemistry Chemical Physics* 17: 3214—3226. 2015.

[6] *Neelov I. M., Janaszewska A., Klajnert B., Bryszewska M., Makova N. Z., Hicks D., Pearson H. A., Vlasov G. P., Ilyash M. Y., Vasilev D. S., Dubrovskaya N. M., Tumanova N. L., Zhuravin I. A., Turner A. J., Nalivaeva N. N.* Molecular properties of lysine dendrimers and their interactions with A $\beta$ -peptides and neuronal cells. *Curr. Med. Chem.* 20(1): 134—143. 2013.

[7] *Neelov I., Markelov D., Falkovich S., Ilyash M., Okrugin B., Darinskii A.* Mathematical modeling of lysine dendrimers: temperature dependencies. *Polymer Science. Ser. 55:* 154—161. 2013.

[8] *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition. Elsevier Inc. 2007.

[9] *Vlasov G. P., Korol'kov V. I., Pankova G. A., Tarasenko I. I., Baranov A. N., Glazkov P. B., Kiselev A. V., Ostapenko O. V., Lesina E. A., Baranov V. S.* Lysine dendrimers and their starburst polymer derivatives: possible application for DNA compaction and in vitro delivery of genetic constructs. *Russian J. Bioorg. Chem.* 30: 12—20. 2004.

Поступила 19 IV 2018