КОЛОНКА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

ЭВОЛЮЦИЯ КОНЦЕПЦИИ БЕЛКОВОЙ КОРОНЫ НАНОЧАСТИЦ

Наночастицы – объекты, имеющие чёткую границу с окружающей средой, размеры которых не превышают 100 нм. Различаясь по своей природе и физико-химических свойствам, они представляют собой важный материал в разработке наноустройств, которые получают всё большее применение в биологии и медицине. При введении в организм человека и животных они взаимодействуют с многочисленными компонентами и подвергаются быстрой модификации, наиболее изученными из которых являются взаимодействия с различными белками крови. Такого рода взаимодействия приводят к связыванию биомолекул на поверхности наночастиц и модификации свойств последних. При этом поверхностная биотрансформация наночастиц непредсказуемым образом изменяет их общий фармакологический и токсикологический профиль, а также их потенциальную терапевтическую или диагностическую функциональность. Особенно важно подчеркнуть, что несмотря на различные способы уменьшения адсорбции белка посредством функционализации поверхности наночастиц высокомолекулярными гидрофильными группами (например, путём пегилирования или гликозилирования), стратегии, способной полностью исключить образование белковой короны в настоящее время не существует [1, 2].

Термин “белковая корона” был предложен в 2007 году для описания спонтанной самосборки и наслоения белков на поверхность наночастиц [3]. Однако сама по себе концепция белковой короны возникла в 50-60-х годах прошлого века, благодаря двум новаторским работам по “адсорбции белков” [4, 5], в которых впервые удалось показать, что адсорбция белков играет важную роль во многих биологических процессах, взаимодействиях и реакциях на поверхностях и материалах. В последующие годы внимание главным образом было сфокусировано на изучению липосом и полимерных наночастиц (таблица). Исследования тех лет были направлены на создание адсорбционно-устойчивых поверхностей и наноматериалов для предотвращения их распознавания, опсонизации клетками, а в случае внутривенного введения, для увеличения периода их полураспада в кровотоке. Крупным прорывом в этой области стала ранняя работа по адсорбции белков, особое внимание в которой уделялось вопросам биосовместимости, фармакологии и фармакокинетики поверхности наночастиц [6]. Учёными был синтезирован и испытан *in vivo* поверхностный слой наночастиц, покрытый гидрофильным полимером полиэтиленгликолем (ПЭГ), придающим стерическую стабилизацию и уменьшающим взаимодействие наночастиц с белками крови.

Исследования последних лет, выполненные преимущественно *ex vivo* с использованием различных компонентов плазмы крови, были сосредоточены на характеристике адсорбированных слоев белка (см., например, [1, 6]). Множество усилий было также [7] направлено на определение различных факторов, влияющих на формирование белковой короны и её корреляцию с химическим составом и физико-химическими свойствами наночастиц [8].

Несмотря на то, что в ходе этих работ был выявлен ряд общих принципов, некоторые фундаментальные вопросы требуют дальнейших исследований. К ним в первую очередь относятся обратимость адсорбции и перемещение молекул между адсорбированными слоями белка, кинетика образования белковой короны, а также предсказание её состава на основе типа и свойств используемых наночастиц. Многослойная адсорбция белков на поверхности наночастиц и различие между “твёрдой” и “мягкой короной” стали одними из самых спорных вопросов, поднимавшихся в исследованиях по этой теме [9, 10].

Согласно основополагающей гипотезе, белковая корона состоит из двух слоёв: внутреннего и внешнего. Внутренний слой, так называемая “твёрдая корона” (*англ.* hard corona), включает плотно связанные молекулы белка, а внешний слой – “мягкая корона” (*англ.* soft corona) – представлен белками, находящимися в динамическом равновесии с раствором.

Таблица. Эволюция концепции белковой короны поверхностного слоя и направления исследований в этой области

Этапы исследований	**60-е года XX века**	**Первое десятилетие XXI века**	**Второе десятилетие XXI века**
Доминирующая концепция	Абсорбция белков	Белковая корона	Биомолекулярная корона
Тип наночастиц (НЧ)	Липосомы и полимерные НЧ	Липидные, углеродные НЧ, НЧ на основе металлов	Липидные, углеродные НЧ, НЧ на основе металлов
Тип исследований	*Ex vivo* и *in vivo* исследования	*Ex vivo* и *in vivo* исследования	*Ex vivo* и *in vivo* исследования
Метод анализа	**Качественный анализ:** Гель электрофорез	**Анализ белков:** Масс-спектрометрия	**Анализ молекул:** Масс-спектрометрия Геномика Липидомика Метаболомика
Цели исследований	**Фармакология НЧ:** Функционализация (пегилировние) Опсонизация Период полураспада НЧ в кровотоке	**Биологические эффекты:** Цитотоксичность Клеточная интернализация Направленное воздействие	**Применение в биомедицине:** Направленное воздействие Диагностика заболеваний Доставка лекарственных препаратов

Предполагается, что белковые молекулы твёрдой короны взаимодействуют непосредственно с поверхностью наноматериала, в то время как белки мягкой короны связываются с белками твёрдой короны при помощи слабых белок-белковых взаимодействий [11]. Недавно был исследован механизм взаимодействия покрытых декстраном суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (англ. super paramagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs), с белками комплемента плазмы человека *ex vivo* [12]. Полученные результаты показали, что белки системы комплемента, в частности компонент комплемента C3, образовывали ковалентную связь с белками твёрдой короны (а не с поверхностью используемого наноматериала), что ускоряло сборку других компонентов альтернативного пути активации системы комплемента. Присоединение компонента C3 к белкам, адсорбированным на поверхности наноматериала, а не к исходной, нативной поверхности наночастиц подтверждает существование слабо связанных белков и подчёркивает необходимость разработки комплемент-модулирующих стратегий [12].

Поскольку большая часть этих исследований выполнена *ex vivo* (при инкубации наночастиц с плазмой крови), полученные результаты (и выводы, сделанные на их основе) сильно зависят от условий инкубации и экспериментальных подходов, использованных для определения характеристик белковой короны. Тем не менее, данный подход может улучшить наше понимание процесса формирования белковой короны, хотя экстраполяцию данных подобных исследований для прогнозирования поведения наночастиц и их иммунотоксического действия в физиологических условиях следует проводить с особой осторожностью.

В контексте рассматриваемой работы [12] следует отметить, что её авторы также предприняли попытки изучения динамических характеристик белковой короны *in vivo*. С этой целью ультрапарамагнитные наночастицы оксида железа, покрытые декстраном, предварительно инкубировали в плазме, содержащей флуоресцентно-меченные белки. Наночастицы, покрытые белковой короной, образовавшейся в условиях *ex vivo* эксперимента затем внутривенно вводили мышам. Последующие исследования выявили значительную потерю ассоциированных с наночастицами флуоресцентно-меченных белков, что свидетельствует о кинетически нестабильной белковой короне. Использование *in vivo* модели для всестороннего изучения процессов образования и динамических свойств белковой короны *ex vivo* служит наглядным примером дальнейшей эволюции исследований этой области науки.

На сегодняшний день существует не так много исследований, в которых охарактеризовано поведение белковой короны, образовавшейся на поверхности наночастиц *in vivo*. Показано, например, что *in vivo* и *ex vivo* белковые короны, формирующиеся на внутривенно введённых и восстановленных из кровотока липосомах, отличаются по составу и морфологии [13]. Несмотря на то, что общее количество белка, присоединявшегося к циркулирующим в крови липосомам коррелировало с количеством белка, наблюдаемым при *ex vivo* инкубации липосом в плазме крови, разнообразие биомолекул, вовлечённых в формирование белковой короны *in vivo*, было значительно шире. В условиях эксперимента *ex vivo* очень сложно имитировать такие факторы, как динамику кровотока, взаимодействие с циркулирующими и эндотелиальными клетками, выстилающими кровеносные сосуды, или иммунные реакции, инициированные введением наночастиц. Исследования белковой короны *in vivo* более точно отражают истинную, с присущей ей сложностью биологическую среду, в которую попадают наночастицы; однако они несомненно более трудоёмки и ограничены количеством полученных после введения наночастиц. Кроме того, мониторинг изменений, происходящих в белковой короне, сформировавшейся в условиях *in vivo* эксперимента на клинически используемых пегилированных липосомах показал, что адсорбция белков является высоко динамичным процессом [1]. Было обнаружено, что с течением времени состав белковой короны меняется, что указывает на наличие конкурентной адсорбции. Эти наблюдения ясно указывают на существование важные различия между белковыми коронами, образующимися на поверхности наночастиц в искусственно-созданных условиях и в биологической среде (рис. 1). В другом исследовании возможность формирования белковой короны *in vivo* было продемонстрировано в исследовании на пациентках с карциномой яичника (ovarian carcinoma) при внутривенном введении пегилированных липосом с инкапсулированным доксорубицином [14].

Подход, при котором возможен одновременный анализ различных типов биомолекул – липидов, углеводов, нуклеиновых кислот, гормонов, метаболитов – самособирающихся на поверхности наночастиц при взаимодействии с биологическими жидкостями *in vivo*, связан с некоторыми экспериментальными трудностями, однако должен рассматриваться как следующий рубеж в изучении биомолекулярной короны. Многие скептически относятся к проблеме осуществления контроля над составом “биомолекулярной короны” в сложных физиологических средах *in vivo*. Для более чёткого понимания и достоверного определения общей молекулярной идентичности биомолекул, адсорбирующихся на поверхности наночастиц после их введения внутрь живого организма, очевидно, необходимы дальнейшие исследования *in vivo*.

Ключевой вопрос заключается в определении общего воздействия “биомолекулярной короны” на молекулярное узнавание и её влиянии на различные биологические процессы а, следовательно, изучение потенциальных возможностей применения белковой короны в биомедицине, схематически показанных на рисунке 2. В настоящее время становится всё более очевидным, что адсорбирующиеся на поверхности наноматериала биомолекулы оказывают значительное влияние на взаимодействие наночастиц с клетками, а также на прогнозируемые или случайные реакции клеток на это воздействие [6]. Проведённое *ex vivo* исследование показало, что специфичность связывания наночастиц значительно снижалась в присутствии белков плазмы [15]. Эта работа дала толчок целому ряду исследований, направленных на изучение механизмов влияния образования белковой короны на клеточную интернализацию, направленное воздействие на рецепторы, цитотоксичность и иммунотоксичность наночастиц (см. обзоры [1, 6]).

Предприняты попытки использования биомолекулярной короны в качестве инструмента воздействия на специфические клетки [16]. Такая модификация наночастиц биологическими лигандами, взаимодействующими со специфическими белками плазмы, будет инициировать направленное рецептор-опосредованное связывание с клетками-мишенями

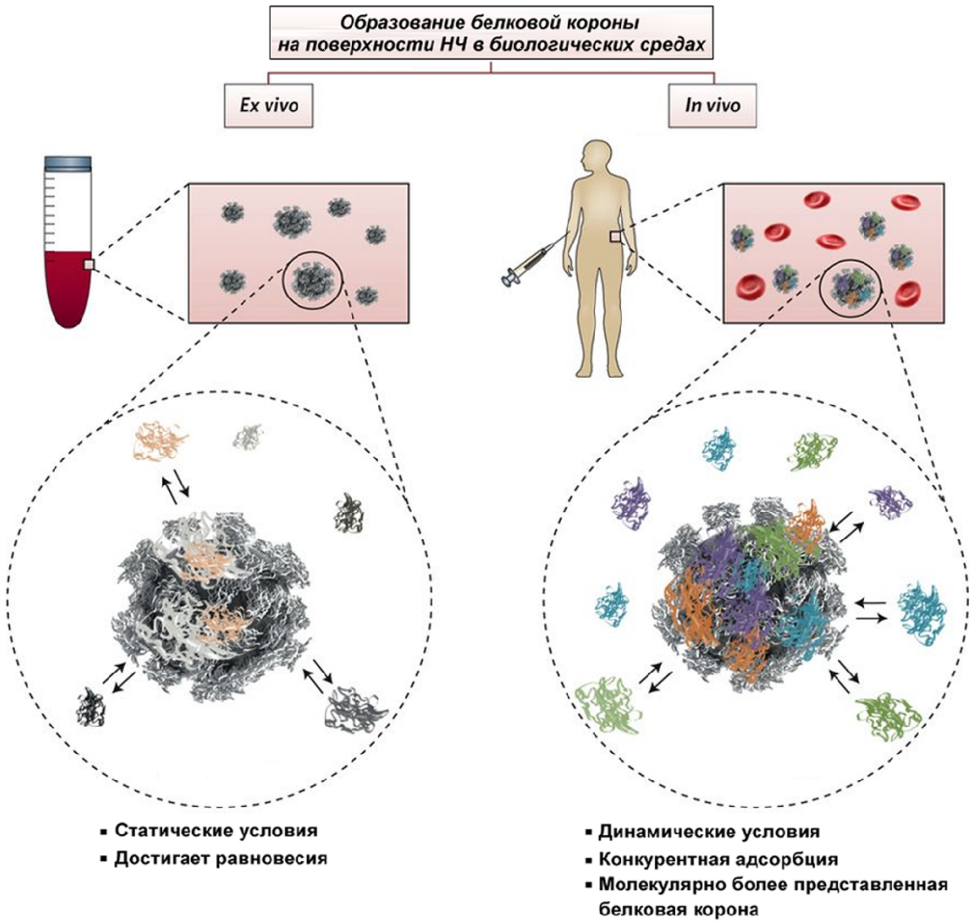

Рисунок 1. Основные различия между белковыми коронами, образующимися на поверхности наночастиц после их инкубации в плазме крови или после введения в живой организм. В статической среде, белковая корона *ex vivo* быстро адсорбируется на поверхности наночастиц и достигает равновесия. В экспериментах *in vivo*, молекулярно более представленная белковая корона формируется в непрерывно изменяющихся условиях (внутри кровотока), и с течением времени меняет свой состав посредством динамического замещения белков (адаптировано из [1]).

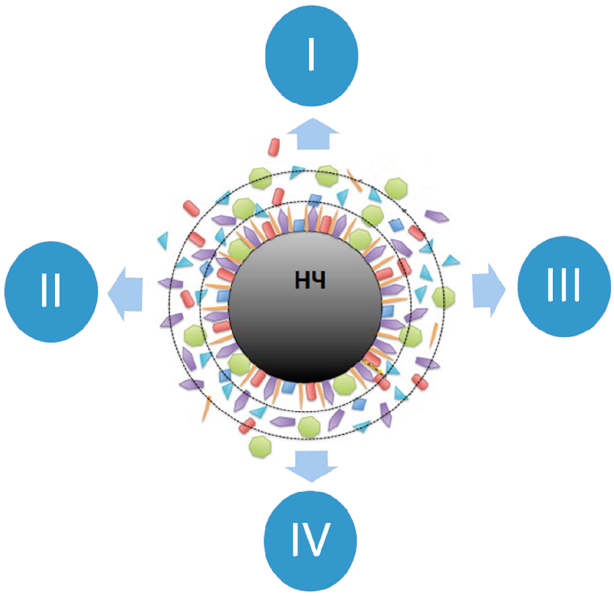

Рисунок 2. Схема, иллюстрирующая потенциальные возможности биомедицинского применения биомолекулярной короны, образованной *in vivo* на поверхности наночастиц (НЧ). Они включают: (I) повышение биосовместимости и снижение токсичности наночастиц; (II) избирательное воздействие на клетки-мишени; (III) увеличения лекарственной нагрузки наночастиц; (IV) диагностику заболеваний.

и интернализацию наночастиц. Несомненно, такая стратегия будет эффективна только в отношении клеток-мишеней, характеризующихся сверхэкспрессией рецепторов, специфичных для образующих корону молекул. Создание биомолекулярной короны может способствовать снижению цитотоксичности наночастиц [17].

Высказанное недавно предположение о возможности использования стратегии молекулярного фингерпринтинга биомолекулярной короны для раннего выявления заболеваний, пока остаётся теоретически привлекательным но практически неизученным и экспериментально недоказанным подходом.

Всё это свидетельствует о существенных изменениях, произошедших за последнее время в вопросе осознания важности белковой короны. Первоначально считавшаяся препятствием, мешающим достижению желаемых свойств наноматериалов, биомолекулярная корона постепенно стала расцениваться как инструмент модификации поверхности наночастиц, приводящий к увеличению из терапевтических и диагностических возможностей. И, тем не менее, необходимы дальнейшие, систематические исследования в физиологически значимых условиях *in vivo* для более полного и глубокого понимания всех реальных и потенциальных возможностей, которые дают исследователям и клиницистам наночастицы и их белковые короны.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hadjidemetriou M., Kostarelos K.* (2017) Nat. Nanotechnol., **12**, 288-290
2. *Setyawati M.I., Tay C.Y., Docter D., Stauber R.H., Leong D.T.* (2015) Chem. Soc. Rev., **44**, 8174.
3. *Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggård T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K.A., Linse S.* (2007) Proc. Natl Acad. Sci. USA, **104**, 2050-2055.
4. *Bangham A.D., Pethica B.A., Seaman G.V.* (1958) Biochem. J., **69**, 12-19.
5. *Vroman L.* (1962) Nature, **196**, 476-477.
6. *Cai R., Chen C.* (2018) Adv. Mater., **2018**, 1805740.
7. *Allen T.M., Hansen C., Martin F., Redemann C., Yau-Young A.* (1991) Biochim. Biophys. Acta, **1066**, 29-36.
8. *Walkey C.D., Olsen J.B., Song F., Liu R., Guo H., Olsen D.W., Cohen Y., Emili A., Chan W.C.* (2014) ACS Nano, **8**, 2439-2455.
9. *Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G.J., Puntes V.* (2010) ACS Nano, **4**, 3623-3632.
10. *Docter D., Westmeier D., Markiewicz M., Stolte S., Knauer S.K., Stauber R.H.* (2015) Chem. Soc. Rev., **44**, 6094-6121.
11. *Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K.A.* (2008) Proc. Natl Acad. Sci. USA, **105**, 14265-14270.
12. *Chen F., Wang G., Griffin J.I., Brenneman B., Banda N.K., Holers V.M., Backos D.S., Wu L., Moghimi S.M., Simberg D.* (2017) Nat. Nanotech., **12**, 387-393.
13. *Hadjidemetriou M., Al-Ahmady Z., Mazza M., Collins R.F., Dawson K., Kostarelos K.* (2015) ACS Nano, **9**, 8142-8156.
14. *Hadjidemetriou M., McAdam S., Garner G., Thackeray C., Knight D., Dmith D., Al-Ahmady Z., Mazza M., Rogan J., Clamp A., Kostarelos K.* (2019) Adv. Mater., **31**(4), e1803335.
15. *Salvati A., Pitek A.S., Monopoli M.P., Prapainop K., Bombelli F.B., Hristov D.R., Kelly P.M., Aberg C., Mahon E., Dawson K.A.* (2013) Nat. Nanotech., **8**, 137-143.
16. *Zhang Z., Wang C., Zha Y., Hu W., Gao Z., Zang Y., Chen J., Zhang J., Dong L.* (2015) ACS Nano, **9**, 2405-2419.
17. *Hu W., Peng C., Lv M., Li X., Zhang Y., Chen N., Fan C., Huang Q.* (2011) ACS Nano, **5**, 3693-3700.

Editorial

EVOLUTION OF THE CONCEPT OF PROTEIN CORONA OF NANOPARTICLES