

Tạo ảnh *In Vivo* huỳnh quang hạt nano đã được đánh dấu trên chuột mang khối u bằng NightOWL LB 983

Fluorescence In Vivo Imaging of labeled nanoparticles in tumour bearing mice with NightOWL LB 983

Tristan Montier¹, Bettina Felletschin²

Tóm tắt

Abstract

Đối với các cơ quan mà thuốc không thể tiếp cận được bằng đường tiêm dưới da, hệ thống đưa thuốc toàn cơ thể đóng vai trò quan trọng trong điều trị trị liệu. Trong nghiên cứu này, mục tiêu của chúng tôi là phát triển một công thức tổng hợp không độc hại và ổn định nhằm phân phối vật liệu gen ngoại lai tới tế bào đích, ví dụ như tế bào ung thư. Chúng tôi tiến hành tạo ảnh phát huỳnh quang *in vivo* để quan sát sự tích tụ của khối u trong phức hệ. Công thức đã được phát triển cho phép tấn công gián tiếp tế bào ung thư mà không gây ra bất cứ phản ứng phụ nào. Đây có thể là một ứng cử viên xuất sắc hỗ trợ cho quá trình tải nạp *in vivo* một cách hiệu quả.

Systemic delivery systems are needed for therapeutic application to organs that are inaccessible by percutaneous administration. In the present study, the main objective was to develop a stable and non-toxic synthetic formulation that can deliver foreign genetic material to target cells, such as tumour cells. To visualize the tumour accumulation of the complexes, in vivo fluorescence imaging was performed. The developed formulation allowed passive targeting without causing any side effects and seems to be an excellent candidate for an efficient in vivo transfection.

¹SynNanoVect Platform – INSERM U613, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, Tristan.Montier@univ-brest.fr

²BERTHOLD TECHNOLOGIES, Bad Wildbad, Germany, Bettina.Felletschin@Berthold.com

Giới thiệu

Introduction

Phát triển một liệu pháp phân phối thuốc qua đường tĩnh mạch ổn định và đặc hiệu là yếu tố cần thiết trong điều trị các khối u di căn hay những cơ quan mà thuốc không tiếp cận được.

Tuy nhiên, việc tấn công chúng trên phương diện toàn hệ thống là một thử thách lớn do protein huyết thanh và độc tính hay do quá trình đào thải gây ra bởi hệ thống thực bào đơn nhân (MPS).

Các hạt nano lipid phát triển trong những công trình nghiên cứu trước mang lại các kết quả khả quan như: hoạt hóa bổ thể yếu và ít bị bắt giữ bởi đại thực bào (Heurtault et al., Pharm Res, 2002). Công thức bào chế vi nang nano này được điều chỉnh phù hợp để tạo ra hạt nano DNA (DNA LNPs).

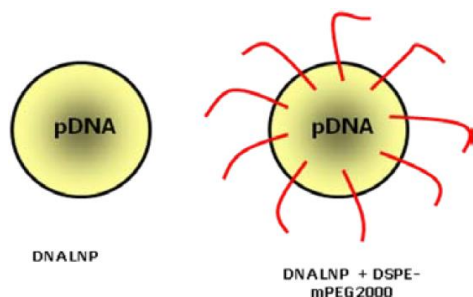
Nhờ việc thay Lipoid® bằng oleic Plurol® trong công thức mà nhân lipid có thể giữ phân tử DNA plasmid bằng phức hợp lipoplexes. Do vậy, DNA LNPs có kích thước rất nhỏ (117 ± 10 nm), thích hợp để đưa thuốc vào cơ thể qua đường tiêm tĩnh mạch. Tuy nhiên, vật liệu này vẫn có độ bền in vivo và thời gian bán thải thấp.

For the treatment of unreachable organs and disseminated or metastatic cancer, it is now essential to develop stable and specific intravenous forms of therapy.

However, systemic targeting remains a real challenge because of complexation with serum proteins and toxicity or clearance by the mononuclear phagocyte system (MPS).

In previous works, lipid nanoparticles were developed leading to really weak complement activation and low macrophage uptake (Heurtault et al., Pharm Res, 2002). The formulation of these nanocapsules was adapted to obtain DNA nanoparticles (DNA LNPs).

Thanks to the use of oleic Plurol® instead of Lipoid® in their formulation, the lipid core allowed the entrapment of plasmid DNA molecules via the formation of lipoplexes. Thus, DNA LNPs were small (117 ± 10 nm), suitable for an intravenous injection, but in vivo stability and blood half-life remained low.



DNALNP

DNALNP + DSPE-
mPEG2000

Hình 1. Giản đồ mô phỏng DNA LNPs

Figure 1. Schematic representation of DNA LNPs

detect and identify

Nhằm kéo dài thời gian thuốc tuần hoàn trong cơ thể và có xác suất tấn công tế bào ung thư chính xác (Maeda et al., J Control Release, 2000), các nhà nghiên cứu đã lựa chọn biến đổi bề mặt hệ thống phân phối gen bằng cách đặt một chuỗi PEG (poly ethylene glycol) dài giữa bề mặt DNA LNPs và chuỗi PEG660 dày đặc đã có sẵn trước đó. Thao tác này được tiến hành bằng cách sử dụng hai loại polyme lưỡng phần và linh hoạt (Vonarbourg et al., Biomaterials, 2009).

Chúng tôi nghiên cứu khả năng mà các hạt nano khác nhau có thể trốn thoát khỏi bổ thể đã được hoạt hóa và việc bị bắt giữ bởi đại thực bào THP-1. Chúng tôi cũng đánh giá khả năng lưu giữ tuần hoàn của thuốc trong thời gian dài sau khi tiêm dưới tĩnh mạch và tích lũy trong khối u ở chuột bằng hệ tạo ảnh phát huỳnh quang gần hồng ngoại. Song hành với đó, chúng tôi thu thập các mẫu máu để đo ảnh hưởng do thương tổn ở gan gây ra bởi các công thức khác nhau trước và sau khi tiêm.

To allow an extended circulation time, and consequently higher tumour selectivity (Maeda et al., J Control Release, 2000), authors choosed to modify the surface of our gene delivery systems, by inserting longer PEG (Poly ethylene glycol) chains at the surface of DNA LNPs between the already-existing, dense PEG660 chains. This was carried out through the use of two kinds of amphiphilic and flexible polymers (Vonarbourg et al., Biomaterials, 2009).

The ability of the different particles to escape complement activation and uptake by THP-1 macrophages was investigated. Then the long circulating properties of these particles in vivo after intravenous injection in mice and their tumour accumulation ability by NIR fluorescence imaging system were evaluated. In parallel, blood samples were harvested to measure the hepatotoxic impact of the different formulations before and after injection.

Thao tác thí nghiệm

Experimental procedure

Hình thành cấu trúc vận chuyển nano ổn định với kích thước bên trong lên đến 130 nm nhờ hạt nano DNA được bao gói và không được bao gói. Quy trình bao gói này được thực hiện bằng cách đóng gói DNA trong các hạt nano lipid (LNPs). Chúng tôi chọn lọc các lớp vỏ bọc polyme lưỡng phần và linh hoạt ở các nồng độ khác nhau để tạo ra DNA LNCs có khả năng vượt qua các chướng ngại vật của cơ thể tốt (Morille et al., Biomaterials, 2010).

Nghiên cứu về độc tế bào, nhiễm độc gan và động lực máu được tiến hành trước thí nghiệm tạo hình in vivo (Morille et al., Biomaterials, 2010).

Chuột mang khối u được chuẩn bị bằng cách tiêm dưới da sườn phải của chuột trĩu lông không có tuyến ức (chuột cái 6 tuần tuổi, nặng 20-24 g) một hỗn hợp huyền phù 1×10^6 dòng u tế bào thần kinh đệm ác tính U87MG trong 150 mL dung dịch Hanks Balanced Saline Solution (HBSS).

Để theo dõi sự phân phối của DNA LNPs được bao gói và không được bao gói trong cơ thể chuột mang khối u, LNPs được đánh dấu bằng đầu dò DiD. DiD là một fluorophore gần hồng ngoại (NIR).

Sau 21 ngày, chúng tôi tiêm 150 mL hạt nano vào tĩnh mạch đuôi những con chuột mang khối u trên mạn sườn phải.

Coated and uncoated DNA nanoparticles were developed by encapsulating DNA into lipid nanoparticles (LNPs) leading to the formation of stable nanocarriers with a size inferior to 130 nm. Amphiphilic and flexible polymer coatings at different concentrations were selected to make DNA LNCs stealthy (Morille et al., Biomaterials, 2010).

Cytotoxicity, hepatotoxicity and blood kinetic studies were performed prior in vivo imaging. (Morille et al., Biomaterials, 2010).

Tumour bearing mice were prepared by injecting subcutaneously a suspension of 1×10^6 U87MG glioma cell line in 150 mL of Hanks Balanced Saline Solution (HBSS) into the right flank of athymic nude mice (6 weeks old females, 20–24 g)

In order to evaluate the biodistribution of coated DNA LNPs and uncoated DNA LNPs in tumour bearing mice, LNPs were labeled with DiD probe, a near-infrared (NIR) fluorophore.

After 21 days, 150 mL of nanoparticles were injected via the tail vein of the mice presenting tumours on their right flank.

Tạo ảnh phát huỳnh quang không can thiệp được tiến hành 3h, 5h, 24h và 48h sau tiêm sử dụng hệ tạo ảnh phát huỳnh quang sinh học NightOWL II được trang bị với máy ảnh CCD có tính năng làm lạnh quá trình quét chậm. Chúng tôi lựa chọn kính lọc kích thích 590 nm và kính lọc phát xạ 655 nm vì nhãn huỳnh quang DiD được sử dụng để xác định vị trí các hạt nano. Song hành với đó, thiết bị chiếu sáng dạng vòng epi rất phù hợp trong việc duy trì tia sáng ổn định ở mỗi phép đo huỳnh quang. Vòng sáng được đặt ở một độ cao cố định nhằm đảm bảo rằng năng lượng kích thích lên mẫu luôn không không đổi.

Chuột được gây mê bằng 4% hỗn hợp khí và isofluran. Tuy nhiên chỉ cần 2% hỗn hợp khí isofluran cần phải duy trì xuyên suốt thí nghiệm một khi chuột đã được đặt vào khoang thu ảnh.

Với hệ tạo ảnh NightOWL, thời gian thu ảnh phát huỳnh quang chỉ mất 2 giây. Tín hiệu huỳnh quang sau đó được đặt khớp lên ảnh đen trắng của chuột.

Non-invasive fluorescent imaging was then performed 3 h, 5 h, 24 h and 48 h post-injection using the biofluorescence imaging (BFI) system LB 983 NightOWL II equipped with cooled slow scan CCD camera. As DiD fluorescent tag was used to localize the nanoparticles, the 590 nm excitation filter and the 655 nm emission filter were selected. In parallel, the light beam was kept constant for each fluorescent measurement, which was ideal with the ringlight epi illumination. The ringlight was always set at the same height, to ensure that the excitation energy on the sample would be always the same.

Each mouse was anesthetized with a 4% air-isofluran blend. Once laid in the acquisition chamber, the anesthesia of the mice was maintained with a 2% air-isoflurane mixture all along the experiment.

With the NightOWL system, the fluorescent acquisition time was 2 seconds, the fluorescent signal was then overlaid on a black-white picture of the mice.

Máy ảnh CCD thu ánh sáng phát ra từ lớp da con vật mà không biết trước thông tin về độ sâu của nguồn sáng. Tuy nhiên, quang tử kích thích và phát xạ dùng trong thí nghiệm này có đường đi trung bình trước khi hấp thụ dài 1-2 cm. Đặc điểm này phụ thuộc vào tính chất quang học đặc trưng của từng mô. Vì vậy, nếu quang tử có thể đi xuyên trong cơ thể con vật tới 2 cm, chỉ nguồn sáng ở dưới da 2 cm mới quan sát được. Do đó, để xác định rõ ràng vị trí chất nhuộm huỳnh quang tích tụ ở một vị trí giải phẫu nhất định, chúng tôi cần tiến hành nghiên cứu sâu hơn.

Máy NightOWL NightOWL

NightOWL là hệ tạo ảnh phát quang sinh học (BLI) và phát huỳnh quang sinh học (BFI) in vivo tích hợp cùng máy ảnh CCD cực nhạy (làm lạnh lên tới -80°C).

Rất nhiều sự lựa chọn khiến cho thao tác các ứng dụng khác nhau trên máy trở nên thật dễ dàng. Toàn bộ cơ thể động vật, thậm chí là thực vật, dấu blots, gels, khay vi thể, khay và mảng nuôi cấy tế bào đều có thể được tạo ảnh.

The CCD camera collects light coming out from the skin of the animal without any a priori information regarding the deepness of the sources. However, excitation and emission photons employed in these experiments have a mean path before absorption of 1–2 cm, and this property depends on the optical characteristic of tissues themselves. Thus, since the photons can pass up to 2 cm through the animal body, sources located up to 2 cm below the skin can be visualized. However, in order to unambiguously localize the fluorescent dye accumulated in specific anatomical areas, a much more detailed study should be performed.

The NightOWL is an in vivo bioluminescence (BLI) and biofluorescence (BFI) imaging system equipped with extreme sensitive CCD cameras (cooled to -80°C).

A variety of options makes easy adaption to different applications possible. Whole animals and even plants can be imaged as well as blots, gels, microplates, cell culture dishes and arrays.



Hình 2. Hệ tạo ảnh in vivo NightOWL II

Figure 2. NightOWL II in vivo imaging system

Kết quả

Results

Để ước tính khả năng đào thải phụ thuộc vào thời gian và khả năng tích lũy trong khối u của LNPs được bao gói mang thời gian lưu giữ lâu nhất trong mạch máu, hỗn hợp huyền phù này được tiêm dưới tĩnh mạch đuôi chuột mang khối u để so sánh với DNA LNPs không bao gói. Khả năng phân phối trên mô được đánh giá nhờ hệ tạo ảnh phát huỳnh quang sinh học (BFI) NIR.

Trước tiên, tín hiệu huỳnh quang sớm phát ra mạnh hơn đối với sau khi tiêm DNA LNPs được bao gói so với loại hạt không được bao gói. Nếu xét tới DNA LNPs không được bao gói, cường độ huỳnh quang bắt đầu tăng 3h sau khi tiêm cho tới 24h tiếp theo tại vùng gan. Trong khi đó, chúng tôi không quan sát thấy DNA LNPs bao gói bởi DSPE-mPEG2000 tại bất kỳ thời điểm nào ở vùng này (Hình 3). Song hành với đó, phát xạ huỳnh quang được quan sát thấy ở thời điểm 3h, 5h, 24h và 48h sau khi tiêm DNA LNPs trên vùng thận. Quan sát này giúp chúng tôi đưa ra giả thuyết đào thải của DNA LNPs thông qua hệ bài tiết. Vào thời điểm 24h và 48h sau khi tiêm, DNA LNPs được bao gói bởi DSPE-mPEG2000 thể hiện cường độ huỳnh quang rất mạnh ở khối u và vùng kế cận nó so với hạt nano DNA không được bao gói.

To estimate time dependant excretion profile and tumour accumulation of the coated LNPs exposing the greatest residence time in bloodstream, these suspensions were intravenously injected in the tail vein of tumour bearing mice and compared to non-coated DNA LNPs. Tissue distribution was evaluated thanks to NIR biofluorescence imaging (BFI).

First of all, the early fluorescence signals were much more intense after injection of coated DNA LNPs than after the administration of uncoated particles. When regarding non-covered DNA LNPs, the fluorescence intensity increased in the liver area from 3 h after injection up to 24 h, whereas no accumulation in this anatomical area was observed with DSPE-mPEG2000-coated DNA LNPs at any time (Fig. 3). In parallel, a fluorescence emission was observed 3 h, 5 h, 24 h, and 48 h after DNA LNPs injection on the kidney area, which could therefore let think to an elimination of DNA LNCs via urinary system. At 24 h and 48 h after injection, DSPE-mPEG2000-covered DNA LNPs displayed stronger fluorescence intensity in the tumour and in its vicinity, compared to non-coated DNA nanoparticles.

Kết luận

Conclusion

Chúng tôi phát triển DNA LNP được bao gói bởi DSPE-mPEG2000 có khả năng tuần hoàn trong mạch máu và tích lũy trong khối u mà không bị phân hủy hay bắt giữ bởi cơ chế phòng vệ tế bào. Với hệ tạo ảnh NightOWL, kiểm soát khối u bằng huỳnh quang sinh học có thể được tiến hành một cách dễ dàng.

Cấu trúc vận chuyển nano của chúng tôi đã vượt qua hàng rào ngoại bào, tuy nhiên còn rất nhiều hàng rào tế bào khác đòi hỏi các nghiên cứu chuyên sâu để cải thiện vector này. Nhưng hệ thống phân phối DNA vẫn là một ứng viên xuất sắc đóng góp cho quá trình tải nạp in vivo một cách hiệu quả.

Vật liệu

Materials

- Dòng u tế bào thần kinh đệm ác tính U87MG (ATCC, Manassas, VA, USA)
- Dung dịch Hanks Balanced Saline (HBSS)
- Chuột trụi lông không có tuyến ức (chuột cái 6 tuần tuổi, nặng 20-24 g, Charles Rivers, Wilmington, MA)
- Đầu dò DiD (Invitrogen)
- NightOWL LB 983 (Berthold Technologies)
- Kính lọc kích thích ở 590/20 nm (#37989) (Berthold Technologies)
- Kính lọc phát xạ ở 655/20 nm (#51332) (Berthold Technologies)
- Khí gây mê Isoflurane (Abott)
- U87MG glioma cell line (ATCC, Manassas, VA, USA)
- Hanks Balanced Saline Solution (HBSS)
- Athymic nude mice (6 weeks old females, 20–24 g, Charles Rivers, Wilmington, MA)
- DiD probe (Invitrogen)
- NightOWL LB 983 (Berthold Technologies)
- 590/20 nm excitation filter (#37989) (Berthold Technologies)
- 655/20 nm emission filter (#51332) (Berthold Technologies)
- Isoflurane for anesthesia (Abott)

Tài liệu tham khảo

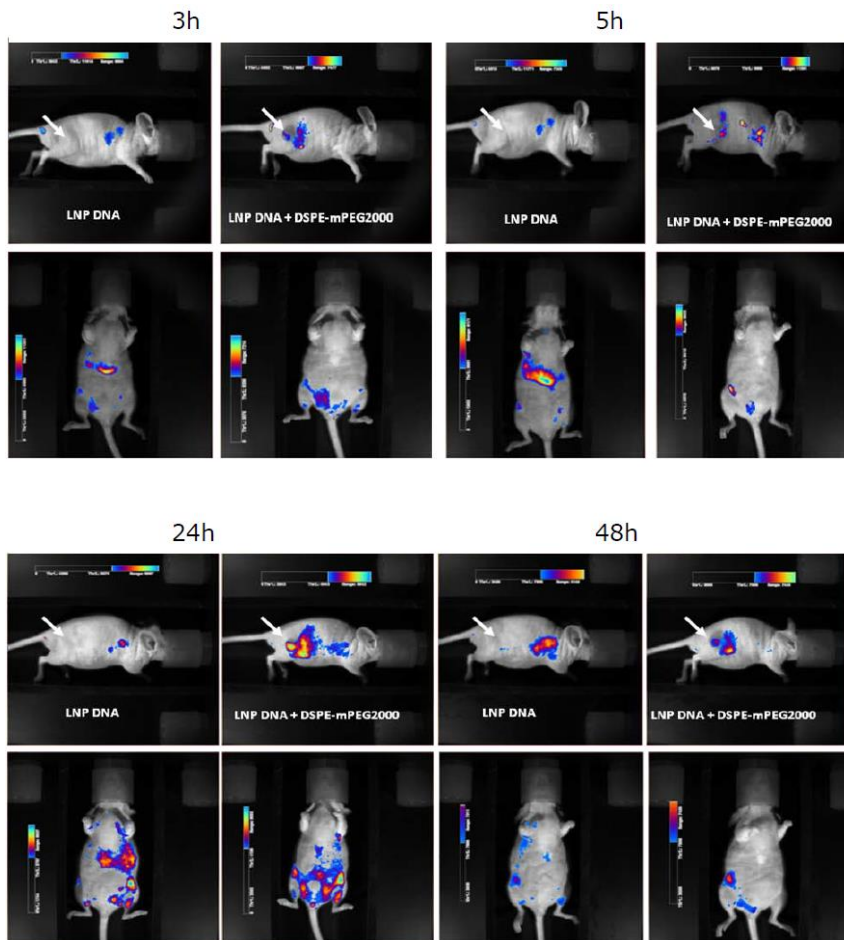
Literature

Morille M, Montier T, Legras P, Carmoy N, Brodin P, Pitard B, Benoît JP, Passirani C., Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumour targeting, *Biomaterials* 2010; 31(2):321-9.

Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nano-carriers. *Pharm Res* 2002; 19(6):875–80

Vonarbourg A, Passirani C, Desigaux L, Allard E, Saulnier P, Lambert O, et al. The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules. *Biomaterials* 2009; 30 (18):3197–204

Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000;65(1–2):271–84



Hình 3. Ảnh phát huỳnh quang in vivo trên chuột trụi lông không có tuyến ức mang khối u U87MG sau khi tiêm DNA LNPs hoặc DNA LNPs được bao gói bởi DSPE-mPEG2000. Ảnh quang học chụp chuột trụi lông mang lượng DNA LNPs hoặc DNA LNPs được bao gói bởi DSPE-mPEG2000 với nồng độ tiêm tĩnh mạch trên đuôi là 152 mg/mL (tương ứng với 46 mg pDNA trên mỗi con). Thanh màu phía trái hoặc bên trên bức ảnh thể hiện hiệu suất tín hiệu phát xạ huỳnh quang từ chuột. Mũi tên màu trắng chỉ vào vị trí của khối u.

Figure 3. In vivo fluorescence imaging of athymic nude mice bearing U87MG tumors after intravenous injection of DNA LNPs or DSPE-mPEG2000-coated DNA LNPs. Optical images of nude mice with 152 mg/mL tail vein injection of DNA LNPs or DSPE-mPEG2000-coated DNA LNPs (representing 46 mg of pDNA per mice). Coloured bar on the left or upper part of the picture indicates the signal efficient of the fluorescence emission coming out from the animal. The tumour location is specified with a white arrow.

Một số kỹ thuật tiến hành trên các chủ thể sinh học đã được cấp bằng sáng chế và có thể phải yêu cầu giấy phép từ bên thứ ba.

Người dùng được khuyến cáo rằng họ phải là người chủ động quyết định xem các thao tác tiến hành của mình có xâm phạm tới bất cứ bằng sáng chế hợp lệ nào không.

Some techniques for generating and/or detecting light in biological subjects are patented and may require licences from third parties.

Users are advised to independently determine for themselves whether their activities infringe any valid patent.