

*Т.Р. Султанова^{1,3}, М.О. Тонкушина¹,
М.В. Улитко^{1,2}, И.Г. Данилова^{1,3}*

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

¹ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

²ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет
им. Первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

³ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Введение

В настоящее время наночастицы, обладающие различной структурой, физико-химическими и биологическими свойствами, являются объектом перспективных прикладных исследований в стратегии развития технологий адресной доставки лекарственных веществ и разработке противоопухолевых препаратов. При переходе в наноразмерное состояние происходит изменение ряда фундаментальных свойств вещества, что часто является непреодолимым препятствием для их использования в биомедицине. Так, установлено, что ряд наноматериалов может вызывать оксидативный стресс, образование аддуктов ДНК, что ведет к мутациям, изменению экспрессии генов и нарушению транскрипции. Соединяясь с белками мембранных и цитоплазматических структур клетки, наночастицы изменяют транспорт веществ, функционирование отдельных органелл и метаболические реакции клетки. Для исследования были выбраны железомолибденовые пористые ($\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}$) и молибденовые сфери-

ческие (Mo_{132}) нанокластерные полиоксометаллаты (ПОМ) со структурой кеплерата. ПОМ способны к активному перемещению в постоянном электрическом поле, могут связывать органические соединения как во внешней сфере своей структуры, так и путем взаимодействия за счет имеющихся пор, поскольку обладают внутренней полостью, что делает их перспективными наноматериалами для разработки средств адресной доставки лекарственных веществ, в том числе и противоопухолевых препаратов.

Наночастицы диоксида церия обладают уникальной биологической активностью, связанной с участием диоксида церия в окислительно-восстановительных реакциях в клетке. Установлено, что наночастицы диоксида церия инактивируют активные формы кислорода, блокируя свободно-радикальные реакции в клетке. Антиоксидантные свойства наночастиц диоксида церия проявляются неодинаково у нормальных и опухолевых клеток.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилась оценка цитотоксичности, биосовместимости, а также дифференцированного действия двух видов ПОМ ($\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}$, Mo_{132}) и наночастиц диоксида церия на морфофункциональное состояние и жизнеспособность нормальных и опухолевых клеток.

В ходе работы оценивали изменения морфологии, жизнеспособности нормальных и трансформированных клеток, возникшие под влиянием наночастиц.

Методика исследования

Нанокластерные молибденсодержащие и железо-молибденовые полиоксометаллаты, полученные и аттестованные по ранее описанным методикам [1-2]. В рамках данной работы были изучены 2 кластера: $\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}$ и Mo_{132} . Кристаллографический размер ПОМ составляет 2,5 нм и 2,9 нм, соответственно.

Мезопористый нанопорошок диоксида церия был получен испарением импульсным электронным пучком в газе низкого давления на установке НАНОБИМ-2 в ИЭФ УрО РАН. Синте-

зированные нанопорошки имеют размер зерен от 3 до 5 нм и высокую удельную поверхность до 190 м²/г [3].

Исследование цитотоксического действия ПОМ проводилось на линии трансформированных фибробластов крысы К-22, полученной из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, и культуре дермальных фибробластов человека (ДФЧ), выделенных из биоптата кожи в Институте медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург.

Изучение цитотоксичности наночастиц диоксида церия проводилось на культуре дермальных фибробластов человека (Институт медицинских клеточных технологий), а также на трех типах опухолевых клеточных линий человека: карциномы шейки матки, сублинии HeLa-v, карциномы легкого A-549 и эмбриональной рабдомиосаркомы RD, полученных из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург. Все операции, связанные с инкубированием клеток и приготовлением растворов, проводились в стерильных условиях в ламинарном боксе БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 LORICA. Клетки культивировали до образования монослоя в CO₂ инкубаторе Sanyo (Panasonic) MCO-18AC при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂, 95% влажности с использованием питательной среды Игла DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и пенициллин-стрептомицина.

Для оценки жизнеспособности клеток использовался МТТ-тест. Метод основан на способности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы живых клеток восстанавливать МТТ-реагент (3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолий бромид) до фиолетовых кристаллов формаза, который экстрагируется из клеток диметилсульфоксидом. Оптическую плотность раствора формаза измеряли на автоматическом спектрофотометрическом планшетном сканере Tecan Infinite M200 PRO при длине волны 570 нм. Для морфологического исследования клетки после инкубации с наночастицами фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Морфофункциональное состояние клеточных культур оценивали с помощью светового микроскопа

Leica DM 5000 B (Microsystems, Германия) при увеличении в 1000 раз.

Статистическую обработку результатов проводили, используя компьютерные программы «Microsoft Excel» и «Statistica 10». Результаты экспериментов представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего. Для оценки значимости различий между группами использовался критерий Манна-Уитни. При вероятности ошибки $p < 0,05$ различия между средними значениями считались достоверными.

Результаты исследования

Через 24 часа после воздействия кластера $\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}$ на клеточные культуры, жизнеспособность первичных дермальных фибробластов человека и трансформированных фибробластов крысы линии К-22 не изменилась, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического эффекта исследуемого кластера на данные типы клеток. Кластер Mo_{132} при концентрациях молибдена $5,5 \times 10^{-4}$; $1,4 \times 10^{-2}$; $6,9 \times 10^{-2}$ мг/мл через 24 часа оказал цитотоксическое действие на нормальные фибробласты, а также на трансформированные клетки К-22 в максимальной концентрации (рисунок 1).

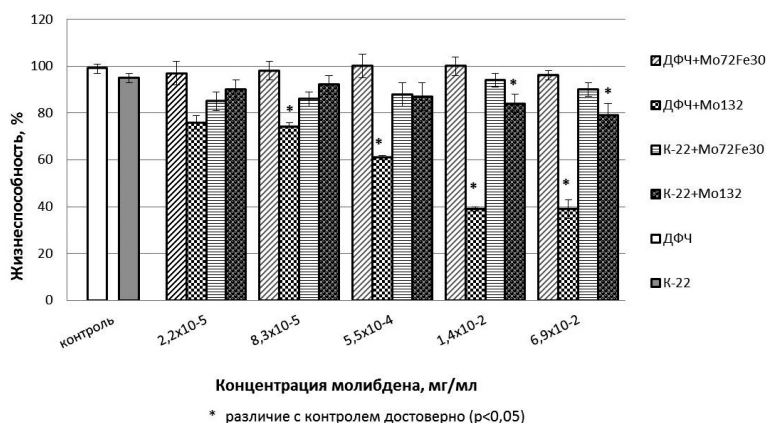


Рисунок 1. Воздействие кластеров $\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}$ и Mo_{132} на жизнеспособность культур клеток ДФЧ и К-22 (* различие с контролем достоверно ($p < 0,05$))

В цитограмме нормальных фибробластов через 24 часа после воздействия кластера $\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}$ по сравнению с контролем наблюдается повышение клеточности культуры. Преобладают клетки бластных форм, округлые с увеличенным ядром, определяются единичные митозы. При цитологическом исследовании трансформированных фибробластов, через 24 часа после воздействия $\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}$ на фоне снижения клеточности культуры появляются клетки с неконтурированной клеточной мембраной и темно-синими включениями в цитоплазме с диффузным распределением или признаками адгезии включений между собой с формированием конгломератов.

При внесении наночастиц диоксида церия в культуру дермальных фибробластов человека не наблюдается достоверного изменения жизнеспособности клеток, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического эффекта на эту культуру клеток. При этом отсутствие повышения жизнеспособности также говорит о том, что на данных концентрациях наночастицы диоксида церия не проявили антиоксидантного действия.

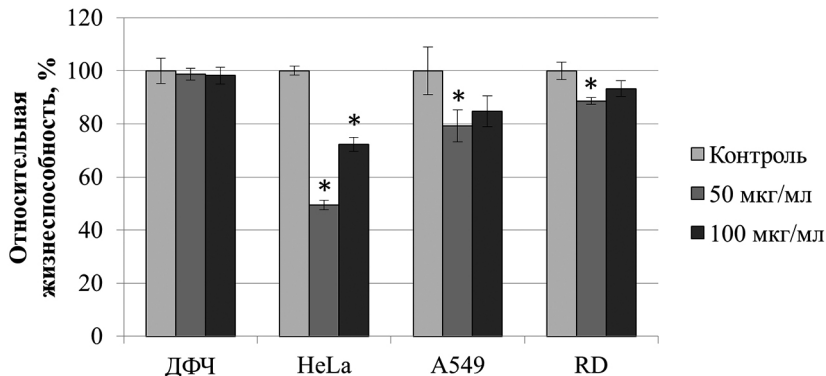


Рисунок 2. Воздействие НДЦ на жизнеспособность культур клеток ДФЧ, HeLa, A549, SK-MEL-2, RD (* различие с контролем достоверно ($p < 0,05$))

При внесении наночастиц диоксида церия в концентрации 50 мкг/мл у всех опухолевых культур наблюдалось снижение жизнеспособности клеток, что свидетельствует об их цитотоксическом действии. В случае культуры HeLa жизнеспособность

снижалась также на концентрации в 100 мкг/мл (рис. 2).

При внесении наночастиц диоксида церия в культуру дермальных фибробластов отмечалось изменение морфологических параметров клетки, вследствие накопления частиц в цитоплазме.

При добавлении наночастиц в культуру A549 наблюдалось увеличение площади ядер и цитоплазмы, для остальных исследуемых опухолевых культур не наблюдалось статистически значимых отклонений морфологических параметров от контроля. Стоит отметить, что в случае культуры HeLa наблюдали появление мелких вакуолей в цитоплазме и ядре при добавлении наночастиц. Возможно, это связано с накоплением наночастиц или с происходящим в клетках апоптозом.

Выводы

1. Нанокластер $\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}$ не токсичен для нормальных фибробластов, а кластер Mo_{132} проявляет токсичность как к нормальным, так и к трансформированным фибробластам, причем его повреждающее действие на трансформированные фибробласты выражено сильнее.

2. Исследуемые наночастицы диоксида церия не влияют на жизнеспособность дермальных фибробластов человека, однако оказывают цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеточных культур HeLa, A549 и RD.

ЛИТЕРАТУРА

1. Müller A., Sarkar S., Shah S.Q.N. et al. Archimedian Synthesis and Magic Numbers: “Sizing” Giant Molybdenum – Oxide Based Molecular Spheres of the Keplerate Type // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1999. V.38. P. 3238.

2. Danilova I.G., Gette I.F., Medvedeva S.Yu., Mukhlynina E.A., Tonkushina M.O., Ostroushko A.A. Changing the content of histone proteins and heat-shock proteins in the blood and liver of rats after the single and repeated administration of nanocluster iron-molybdenum polyoxometalates // *Nanotechnologies in Russia*. 2015. V. 10. № 9-10. P. 820.

3. Ulitko M. V., Naumova A. S., Sultanova T. R., Vazirov R. A., Agdantseva E. N., Olshvang O. Yu., and Sokovnin S. Yu. Investigation of the effect of cerium dioxide nanoparticles on the radiosensitivity of various cell types// AIP Conference Proceedings. 2020. P. 080031. DOI 10.1063/5.0032878.