

20. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing / I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, F. Mattoussi // Nature Materials. – 2005. – Vol. 4, № 6. – P. 435–446.

Сведения об авторах

О.А. Баваров – Оператор научной роты
В.А. Вирко* – Младший научный сотрудник
А.Д. Беседин – Старший оператор научной роты
Е.Н. Кравцов – Оператор научной роты

Information about the authors

O.A. Bavarov – Scientific operator
V.A. Virko* – Researcher
A.D. Besedin – Senior scientific operator
E.N. Kravtsov – Scientific operator

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author)

virko-viktor@mail.ru

УДК: 620.3

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ МАГГЕМИТА (γ -Fe₂O₃) НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК IN VITRO

Бугаёва Антонина Владимировна¹, Фадеев Фёдор Алексеевич^{1,2}, Бляхман Феликс Абрамович^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

³ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Работа выполнена в контексте разработки перспективных наукоемких технологий с использованием препаратов на основе аутогенных дендритных клеток (ДК) пациента для противоопухолевой иммунотерапии. Эффективность ДК-иммунотерапии может быть существенно увеличена за счет адресной доставки клеток к лимфатическим узлам. Для этого рассматривается возможность бесконтактного управления миграцией ДК, предварительно загруженных магнитными наночастицами (МНЧ), с помощью внешнего магнитного поля. В этой связи вопрос о влиянии МНЧ соответствующей природы на жизнеспособность ДК является первостепенным.

Цель исследования – оценить цитотоксический эффект МНЧ маггемита по результатам МТТ-теста. **Материал и методы.** Были использованы сферические МНЧ маггемита (γ -Fe₂O₃) с характерным диаметром 13 нм, полученные методом лазерного испарения мишени (ЛИМ). Выделенные из венозной крови доноров фракции мононуклеарных клеток ресуспендировали в дифференцировочной среде и распределяли по лункам 48-луночного планшета с плотностью посева 1-2 миллиона клеток на 1 см² адгезивной поверхности. После этого в лунки вносили соответствующие разведения суспензии МНЧ в дифференцировочной среде в объеме 50 мкл. Итоговые концентрации МНЧ в лунках составляли от 1 мкг/см² до 125 мкг/см². Дифференцировка моноцитов в ДК происходила в течение четырех суток в СО₂-инкубаторе, после чего с полученными ДК проводили колориметрический МТТ-тест. **Результаты.** При низких концентрациях МНЧ (до 8 мкг/см²) биохимическая активность клеток не отличалась от контроля. Статистически достоверный цитотоксический эффект МНЧ начинал проявляться лишь при высоких концентрациях частиц (от 64 мкг/см²). **Выводы.** Низкий уровень цитотоксичности использованных МНЧ в отношении ДК делает принципиально возможной нагрузку клеток ЛИМ-наночастицами с перспективой создания на их основе магнитоуправляемых конструкторов, положение которых в пространстве можно определять и контролировать.

Ключевые слова: иммунотерапия, дендритные клетки, магнитные наночастицы, цитотоксичность, наукоемкие технологии.

EFFECT OF MAGNETIC NANOPARTICLES OF MAGHEMITE (γ -Fe₂O₃) ON THE VIABILITY OF DENDRITIC CELLS IN VITRO

Bugayova Antonina Vladimirovna¹, Fadeyev Fedor Alekseyevich^{1,2}, Blyakhman Felix Abramovich^{1,3}

¹Ural State Medical University

²Institute of Medical Cell Technologies

³Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. This work is the element of researches focused on development of cellular products for cancer therapy. These cell therapy products are based on autologous dendritic cells (DCs) of patient. The efficacy of DC-based immunotherapy can be improved by controlled guidance of cells to lymph nodes. For this purpose, we now study the ability to control of migration of DCs loaded with magnetic nanoparticles (MNPs) under external magnetic field. The primary step of these researches is the evaluation of the effect of MNPs on the viability of DCs. **The aim of the study** is to estimate the cytotoxic effect of maghemite MNPs by MTT-test. **Material and methods.** Spheroid maghemite MNPs ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) with average diameter of ~13 nm were obtained by laser target evaporation (LTE) method. Mononuclear cells, isolated from donors' blood, were resuspended in differentiation medium and dispensed into wells of 48-well plate with the seeding density $1\text{-}2 \times 10^6$ cells per 1 cm^2 on adhesive surface. After that 50 μL of MNPs suspension in appropriate concentrations were added into wells. The final concentrations of MNPs in plate wells ranged from 1 to $125\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Monocytes were differentiating to DCs for 4 days, and the viability of cells was estimated by MTT-test. **Results.** At low concentrations (up to $8\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$) the biochemical activity of cells did not differ from control. The statistically significant cytotoxic effect of MNPs appeared at concentrations from $64\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and higher. **Conclusions.** The low cytotoxic effect of MNPs makes possible loading of DCs with LTE-nanoparticles. Obtained results opens up prospects for development of magnetic-controlled constructs, which can be tracked and guided by external magnetic field.

Keywords: immunotherapy, dendritic cells, magnetic nanoparticles, cytotoxicity, science-intensive technologies.

ВВЕДЕНИЕ

Работа выполнена в контексте разработки перспективных наукоемких технологий для лечения онкологических заболеваний, в частности, метода лечения с использованием препаратов на основе аутогенных дендритных клеток (ДК) пациента для противоопухолевой иммунотерапии. Дендритные клетки являются основной популяцией антигенпрезентирующих клеток, функция которых состоит в акцепции антигенов, их переработке и представлении их эпитопов Т-клеткам. Ключевая роль ДК в запуске иммунного ответа позволяет их рассматривать как перспективное средство для проведения клеточной иммунотерапии [1].

Эффективность ДК-иммунотерапии может быть существенно увеличена за счет адресной доставки клеток к лимфатическим узлам. Для этого рассматривается возможность бесконтактного управления миграцией ДК, предварительно загруженных магнитными наночастицами (МНЧ), с помощью внешнего магнитного поля [2].

В настоящее время МНЧ находят все более широкое применение в области практической медицины. Принципиально важно, что МНЧ оксидов железа обладают хорошей биосовместимостью и активно акцептируются клетками, и это позволяет использовать их в клеточных технологиях. В частности, известны работы, в которых продемонстрирована хорошая интернализация МНЧ в дендритные клетки [2, 3]. Авторы этих исследований использовали МНЧ в качестве МРТ-маркеров для визуализации миграции ДК в лимфатические узлы.

Наночастицы оксидов железа могут быть получены различными химическими и/или физическими методами. Среди прочих, электрофизический метод лазерного испарения мишени (ЛИМ) представляет большой интерес для биомедицинских приложений. Данный подход был разработан в Институте электрофизики УрО РАН, и обеспечивает получение МНЧ сферической формы в узком наноразмерном диапазоне [4]. Кроме того, метод обеспечивает приготовление крупных партий МНЧ (сотни грамм) с одинаковыми свойствами, что является важным условием для использования этого материала в практической медицине.

Ранее, в экспериментах *in vitro* нами была продемонстрирована хорошая биосовместимость ЛИМ-наночастиц с различными клетками (фибробласты, хондроциты и др.) [5]. В этой работе рассматривается влияние МНЧ на жизнеспособность ДК. Данный аспект является неотъемлемой частью разработки технологии магнитоуправляемой ДК-иммунотерапии.

Цель исследования – оценить цитотоксический эффект ЛИМ-наночастиц маггемита по результатам МТТ-теста.

МТТ-тест характеризует суммарную жизнеспособность клеток по их биохимической активности. Тест предполагает инкубацию клеток с субстратом, который восстанавливается под воздействием содержащихся в жизнеспособных клетках ферментов, изменяя при этом окраску. Методом колориметрии мы покажем, что жизнеспособность ДК достоверно снижается при инкубации их в среде с концентрацией МНЧ свыше 64 мкг на см^2 .

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Получение ДК из моноцитов периферической крови.

Для эксперимента использовали венозную кровь доноров-добровольцев после получения от них информированного согласия. Кровь из вакутейнеров смешивали с раствором Версена в объемном соотношении 1:1. Фракцию мононуклеарных клеток (МоНК) выделяли методом центрифугирования на растворе Lympholyte-H (Cedarlane, Канада) с плотностью 1,077 г/мл. Полученную фракцию МоНК отмывали два раза раствором Версена, после чего ресуспендировали в среде RPMI-1640 и распределяли по лункам культуральных планшетов или флаконов с обработанной для адгезии клеток поверхностью.

Планшеты с клеточной суспензией инкубировали в течение двух часов при 37°C, после чего поверхность пластика три раза отмывали от неадгезировавшихся клеток. Обладающие высокими адгезивными свойствами моноциты оставались на пластике, тогда как неадгезивные (преимущественно лимфоциты) удалялись при отмывке. Оставшиеся на пластике моноциты заливали дифференцировочной средой: AIM-V (Gibco, Великобритания) с добавлением GM-CSF (80 нг/мл) и IL-4 (25 нг/мл). Дифференцировка моноцитов в ДК происходила в течение четырех суток в CO₂-инкубаторе в атмосфере 37°C, 5% CO₂ и при 100% относительной влажности. Аутентичность полученных из моноцитов ДК была подтверждена по их иммунофенотипу методом проточной цитофлуориметрии (данные не представлены).

Рис. 1 иллюстрирует внешний вид ДК после дифференцировки моноцитов. Адгезированные на пластике ДК имели форму, от близкой к сферической с многочисленными мелкими короткими отростками, до неправильной с удлинненными отростками.

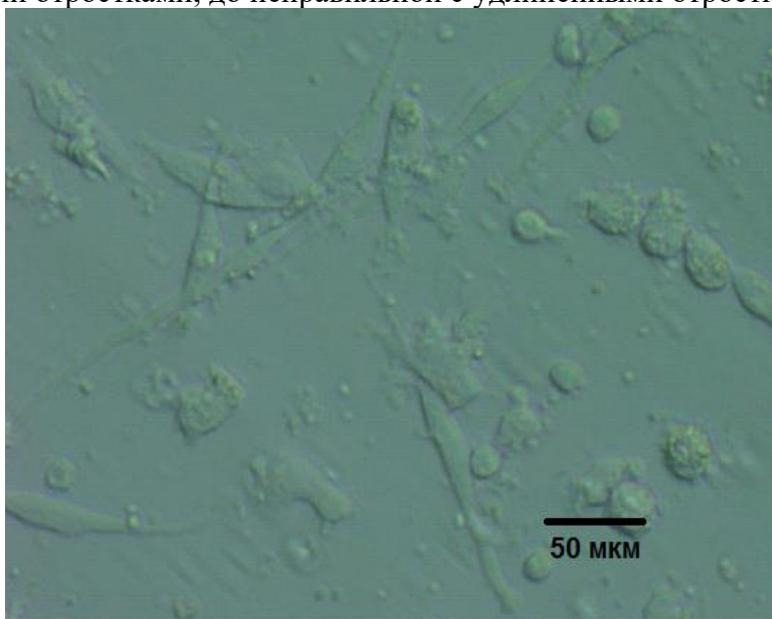


Рис. 1. Пример визуализации дендритных клеток. Световая микроскопия, увеличение $\times 40$

Магнитные наночастицы. Были использованы МНЧ маггемита, полученные методом ЛИМ в Институте Электрофизики УрО РАН (Екатеринбург). Частицы имели сферическую форму, с характерным диаметром 13 нм. Свойства МНЧ и суспензии на их основе для биологических экспериментов были описаны ранее [6].

Общая схема эксперимента. Выделенные из крови доноров отмывые МоНК ресуспендировали в дифференцировочной среде и распределяли по лункам 48-луночного планшета с адгезивной поверхностью по 170 мкл суспензии на лунку с плотностью посева в пределах 1-2 миллиона клеток на 1 см² адгезивной поверхности. После этого в лунки вносили соответствующие разведения суспензии МНЧ в дифференцировочной среде в объеме 50 мкл (суммарный объем суспензии в лунке составлял 220 мкл). Итоговые концентрации МНЧ в лунках составляли от 1 мкг/см² до 125 мкг/см² (в пересчете на объем среды – от 4 до 500 мкг/мл). Пересчет количества МНЧ на площадь объясняется тем, что МНЧ в ходе инкубации оседают на поверхность лунки. Планшеты инкубировали четверо суток в CO₂-инкубаторе, на

вторые сутки в дифференцировочную среду добавляли свежие порции цитокинов (GM-CSF и IL-4). По завершении инкубации с полученными ДК проводили МТТ-тест.

МТТ-тест. Из лунок планшета удаляли ростовую среду, отмывали лунки от МНЧ. В лунки вносили по 100 мкл раствора Эрла с тетразолиевым красителем (1 мкг/мл). Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 3 часов. По завершении инкубации раствор Эрла с красителем удаляли, накопившиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО), после чего по 150 мкл раствора формазана переносили в лунки 96-луночного планшета. Перенос раствора формазана в новый планшет позволял избежать искажений оптической плотности раствора от оставшихся в лунке с клетками МНЧ. Оптическую плотность растворов в лунках оценивали на ИФА-анализаторе (iMark, Bio-rad, США) на длине волны 490 нм.

Статистика. Эксперимент выполнялся с использованием крови четырех доноров, эксперимент с кровью каждого донора проводился отдельно, делалось по четыре технических повтора для каждого образца. Полученные данные по оптической плотности для разных концентраций МНЧ нормировали к оптической плотности в контроле без добавления МНЧ (принятой за 100%). Достоверность отличий полученных значений оценивали по критерию Даннетта. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 приведены результаты МТТ-тестов, отражающие влияние МНЧ на жизнеспособность клеток во время дифференцировки моноцитов в ДК после четырех суток инкубации.

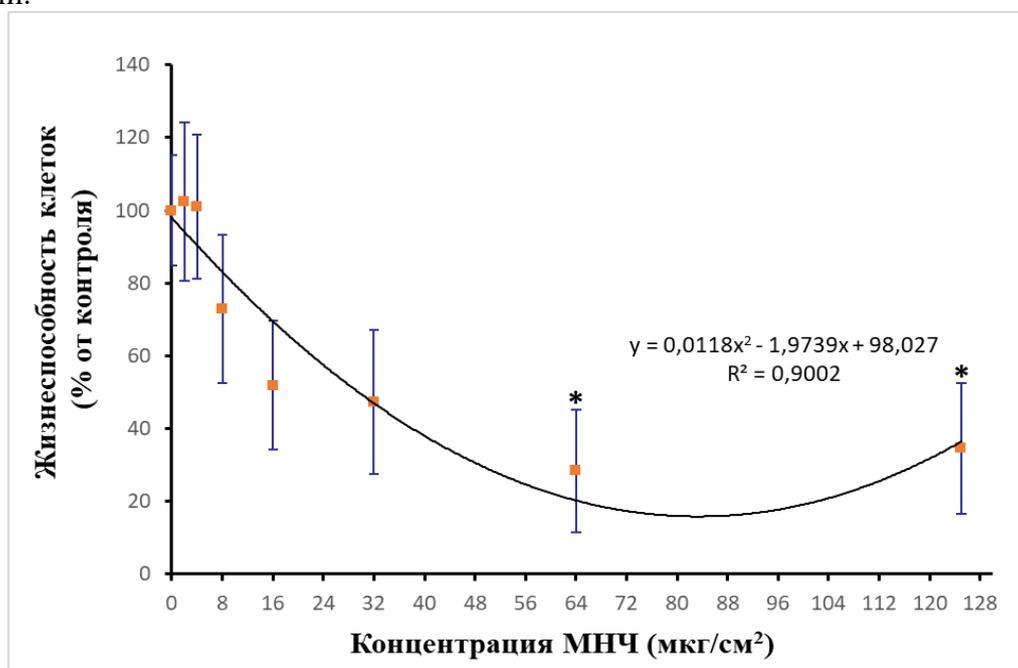


Рис. 2. График зависимости показателя относительной жизнеспособности ДК от концентрации МНЧ в ростовой среде. За 100% принято значение оптической плотности в МТТ-тесте в контроле (концентрация МНЧ – 0%).

Скобки соответствуют границам стандартного отклонения ошибки средней величины. Звездочки отражают достоверное отличие показателя от контроля при $p < 0,05$

Согласно представленным на графике данным следует, что МНЧ в диапазоне концентраций от 0 до 8 мкг/см² не оказывали влияния на жизнеспособность клеток. При увеличении концентрации частиц наблюдалась тенденция к снижению биохимической активности ДК, хотя значение показателя достоверно не отличалось от контрольной величины. При возрастании концентрации МНЧ больше 64 мкг/см² наблюдался четкий цитотоксический эффект частиц.

Полученная зависимость достаточно хорошо аппроксимируется полиномом второй степени. Уравнение, описывающее установленный тренд, приведено на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе была оценена цитотоксичность МНЧ во время дифференцировки моноцитов в ДК. Для оценки цитотоксичности МНЧ в отношении ДК был использован колориметрический МТТ-тест, позволяющий оценить биохимические свойства клеток. Тест основан на косвенной оценке активности клеточных НАД(Ф)-зависимых оксиредуктаз, способных восстанавливать МТТ-краситель до формазана.

В целом, можно отметить низкий уровень цитотоксичности МНЧ в отношении ДК. При малых концентрациях наночастиц (до 8 мкг/см²) биохимическая активность клеток не отличалась от контроля, статистически достоверный цитотоксический эффект МНЧ начинал проявляться лишь при больших концентрациях (от 64 мкг/см²).

Механизм токсического эффекта МНЧ в отношении ДК не ясен. Известно, что возможны несколько механизмов токсического действия МНЧ на клетки, основным из которых является генерация активных форм кислорода (ROS) в клетках с акцептированными МНЧ [7]. В то же время, не исключено, что МНЧ могут механически повреждать клетки, вызывая их гибель и отделение от адгезивной поверхности. Данное предположение косвенно подтверждается тем, что при высоких концентрациях МНЧ количество ДК на пластике после четырех дней инкубации оказывалось меньше, чем в контроле или при низких концентрациях наночастиц.

ВЫВОДЫ

Полученный результат делает принципиально возможной нагрузку клеток ЛИМ-наночастицами с перспективой создания на их основе магнитоуправляемых конструкторов, положение которых в пространстве можно определять и контролировать. Ожидается, что создание таких конструкторов позволит повысить эффективность клеточной терапии онкологических заболеваний с использованием ДК. В то же время, необходимо проведение дальнейших исследований, оценивающих влияние МНЧ на процесс дифференцировки и созревания ДК, на акцепцию ими антигенов и на их взаимодействие с Т-лимфоцитами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 25-24-00175, <https://rscf.ru/project/25-24-00175/>

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Recent advances in experimental dendritic cell vaccines for cancer / I.Y. Filin, K.V. Kitaeva, C.S. Rutland [et al.] // *Frontiers in oncology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 730824.
2. Engineering Energy-Responsive Magnetic Nanomaterials to Improve the Efficacy of Dendritic Cell-Based Immunotherapy / C. Liu, B. Yan, N. Wen [et al.] // *Advanced Therapeutics*. – 2023. – Vol. 6, № 1. – P. 2200234.
3. Effects of magnetic nanoparticles on the functional activity of human monocytes and dendritic cells / M. Donini, F. Pettinella, G. Zanella [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 2. – P. 1358–1376.
4. Kotov, Y.A. Electric explosion of wires as a method for preparation of nanopowders / Y.A. Kotov // *Journal of nanoparticle research*. – 2003. – Vol. 5. – P. 539–550.
5. Biological impact of γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles obtained by laser target evaporation: Focus on magnetic biosensor applications / F.A. Fadeyev, F.A. Blyakhman; A.P. Safronov [et al.] // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 12, № 8. – P. 627.
6. Determination of Limits for Evaluating the Degree of Internalization of γ -Fe₂O₃ Nanoparticles by Cultures of Human Mesenchymal Stomal Cells / E.A. Burban, F.A. Fadeyev, A.P. Safronov [et al.] // *Colloid Journal*. – 2024. – Vol. 86, № 6. – P. 836–847.
7. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, metabolism, and cellular behavior in biomedicine applications / H. Wei, Y. Hu, J. Wang [et al.] // *International journal of nanomedicine*. – 2021. – Vol. 16. – P. 6097–6113.

Сведения об авторах

А.В. Бугаёва* – ассистент

Ф.А. Фадеев – кандидат биологических наук, доцент

Ф.А. Бляхман – доктор биологических наук, профессор

Information about the authors

A.V. Bugayova* – Assistant Professor

F.A. Fadeyev – Candidate of Sciences (Biology), Associate Professor

F.A. Blyakhman – Doctor of Sciences (Biology), Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

antonina.v.bugayova@mail.ru