

**В.В. Киروشка¹, И.И. Самченко¹, В.М. Надутов²,
А.Е. Перекос², В.З. Войнаш², Т.П. Бондаренко¹**

¹ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

² Институт металлофизики им. Курдюмова НАН Украины, Киев

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА С КУЛЬТУРОЙ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ БЕЛКА



Проведен сравнительный анализ взаимодействия наночастиц магнетита (Fe_3O_4) в концентрационном интервале 0,06÷1,8 мг/мл с культурой альвеолярных макрофагов в присутствии 10 и 20 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Установлено, что увеличение содержания белка в среде инкубации приводило к увеличению количества наночастиц, которые взаимодействовали с клетками.

Ключевые слова: наночастицы магнетита (Fe_3O_4), цитотоксичность, культура клеток.

В медицине в настоящее время есть потенциальная возможность применения нанопорошков для направленной доставки терапевтических агентов, что позволяет создать оптимальную концентрацию лекарства в зоне реализации лечебного эффекта и существенно снизить системную токсичность как за счет уменьшения общей дозы, так и за счет более продолжительного удержания лечебного препарата в очаге поражения [1]. В большинстве случаев применение наноматериалов как носителей лекарственных веществ предполагает парентеральный путь их введения в организм человека, т.е. в виде внутривенной, внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции [2, 3]. При этом наночастицы с лекарством попадают в кровяное русло, где происходит адсорбция белков плазмы на их

поверхности, приводящая к изменению их физико-химических свойств [4]. Этот эффект в свою очередь будет определять характер взаимодействия наночастиц с иммунокомпетентными клетками крови (лейкоцитами, моноцитами, дендритными клетками) и тканей (купферовскими клетками в печени, макрофагами в легких и т.д.). Способность иммунокомпетентных клеток взаимодействовать с наночастицами и мигрировать в разные места воспаления делает их привлекательными для возможности доставки диагностических агентов или лекарств как терапевтических «контейнеров» [5]. Несмотря на указанные выше перспективы применения наноматериалов, до сих пор остаются открытыми вопросы, связанные с механизмом их взаимодействия с биологическими объектами и возможными негативными последствиями. Одним из наиболее широко исследуемых и применяемых наноматериалов в настоящее время являются нанопо-

рошки на основе магнетита, поскольку они обладают относительно низкой токсичностью. Однако данных о механизме взаимодействия наночастиц магнетита с биологическими объектами недостаточно.

Цель данной работы — исследовать характер взаимодействия наночастиц магнетита с иммунокомпетентными клетками, а также их цитотоксическое действие на культуру альвеолярных макрофагов (АМ) в зависимости от концентрации белкового компонента в среде инкубации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наночастицы магнетита получали полиол-синтезом по методике, описанной в [6]. Рентгеноструктурные исследования, проведенные с использованием рентгеновского дифрактометра ДРОН-3.0 в кобальтовом излучении, показали, что синтезированный порошок имеет структуру шпинели с параметром решетки 0,8393 нм. Это совпадает с табличными данными для магнетита. По уширению линий методом Селякова—Шеррера [7] определили средний размер частиц, который в нашем случае составил приблизительно 6 нм.

Объектом исследования являлась культура АМ, полученная из легких морских свинок [8]. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и иной научной целью» (г. Страсбург, 1985) и были одобрены Комитетом по биоэтике ИПКиК НАН Украины [9]. Эвтаназию лабораторных животных проводили под эфирным наркозом. Легкие промывали через выделенную и заканиюлированную трахею средой 199, содержащей в 100 мл среды 25 МЕ гепарина и антибиотиков (пенициллин 500 ед./мл и каномидин 500 ед./мл). Собранную суспензию клеток центрифугировали 5 мин со скоростью 1000 об./мин, после чего клетки ресуспендировали в среде 199 с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и антибиотиками (пенициллин 250 ед./мл и каномидин 250 ед./мл).

Концентрация клеток для культивирования составляла $1 \cdot 10^6$ в 1 мл. Макрофаги отделяли от других альвеолярных клеток, используя их прилипание к пластиковой поверхности чашек при помещении в термостат (37 °С), заполненный 5 % CO_2 . Через 60 мин не прилипшие к пластику клетки смывали средой культивирования, а к осевшим клеткам добавляли по 2 мл среды 199 с 10 % ЭТС или 2 мл среды 199 с 20 % ЭТС и снова помещали в термостат с 5 % CO_2 на 24 ч.

Для определения содержания наночастиц в культуре клеток использовали метод цитохимического окрашивания железа в синий цвет специфическим красителем железисто-синеродистым калием («берлинская лазурь») [8, 10]. Наночастицы, предварительно «озвученные» в среде 199 с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-2 в течение 3 мин, добавляли в культуру клеток в диапазоне концентраций 0,06÷1,8 мг/мл. Время инкубации культуры АМ с наночастицами составляло 24 часа. После экспозиции клетки были отмыты средой 199 от наночастиц, зафиксированы метанолом в течение 60 мин и высушены на воздухе. Далее клетки помещали в равные количества 2%-го раствора железисто-синеродистого калия (берлинская лазурь) и 2%-го раствора 0,1н HCl при температуре 50–56 °С на 15 мин, промывали в проточной воде 10 мин и докрашивали 0,1%-ым раствором эозина в течение 5 мин при комнатной температуре.

Для количественной оценки взаимодействия клеток с наночастицами использовали принцип Астальди, основанный на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски [10]. В зависимости от результата исследуемые клетки делили на 3 группы: *неокрашенные, частично окрашенные и полностью окрашенные*. Для количественного выражения результатов подсчитывали 100 клеток определенного вида, дифференцируя их по указанному принципу. Результаты экспериментов выражали в процентах относительно полностью окрашенных образцов.

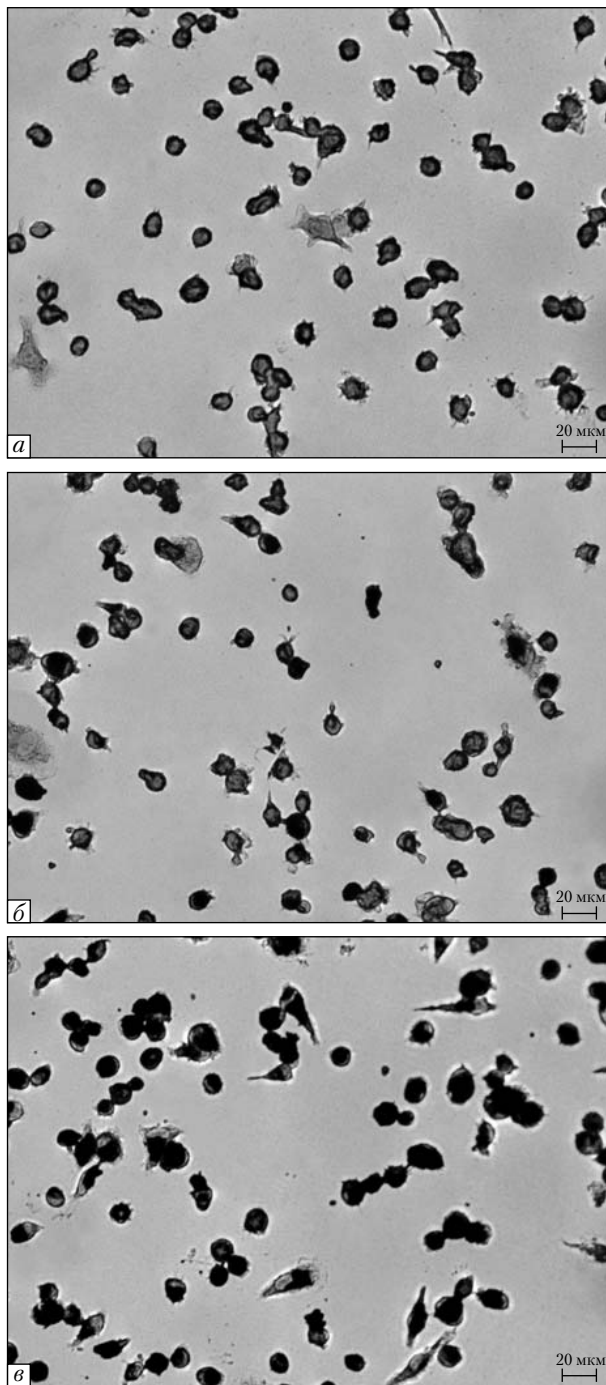


Рис. 1. Культура клеток АМ после 24-часового взаимодействия с наночастицами в присутствии 10 % ЭТС. Окрашивание железисто-синеродистым калием: *а* — контрольный экземпляр; *б* и *в* — при экспозиции с наночастицами магнетита (концентрация 0,06 мг/мл и 1,8 мг/мл соответственно)

Определение цитотоксичности наноматериала производили с помощью МТТ-теста [11], основанного на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри жизнеспособной клетки. В каждую чашку Петри с АМ добавляли МТТ (0,5 мг/мл) и инкубировали 4 ч при 37 °С в присутствии 5 % CO₂. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли с помощью диметилсульфоксида (ДМСО). Показания оптической плотности измеряли при длине волны 540 нм на фотокolorиметре КФК-2-УХЛ-4.2. Результаты эксперимента выражали в процентах к контролю. Жизнеспособность клеток ($Ж_k$) рассчитывалась по формуле: $Ж_k = (ОП_a / ОП_k) \times 100 \%$, где ОП_а — оптическая плотность клеток, инкубированных с наночастицами; ОП_к — средняя оптическая плотность контрольных клеток, инкубированных без наночастиц. Интенсивность окраски пропорциональна количеству жизнеспособных клеток в суспензии.

Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) проводили во внеклеточной среде кинетическим методом с помощью стандартного тест-набора ЛДГ «СпЛ» Pyruvate [11]. Принцип метода основан на способности данного фермента восстанавливать лактат в пируват, превращая при этом NAD⁺ в NADH/H⁺. Активность ЛДГ определили спектрофотометрическим методом на СФ-4 при $\lambda = 343$ нм и выражали в процентах по отношению к активности ЛДГ в растворе, полученном при обработке культуры клеток 0,1%-ым раствором тритона X-100 (100%-ый лизат клеток).

Все эксперименты были проведены не менее 5-и раз в двух параллельных пробах. Статистическую обработку результатов проводили с применением критериев Стьюдента (*t*-критерий).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены данные взаимодействия ферромагнитных наночастиц Fe₃O₄ в ин-

тервале $0,06 \div 1,8$ мг/мл с клетками культуры АМ в зависимости от концентрации ЭТС в среде культивирования. Так, при использовании $1,8$ мг/мл Fe_3O_4 мы наблюдали высокую плотность взаимодействия наночастиц с АМ, в результате чего все клетки в культуре были окрашены в темно-синий цвет железисто-синеродистым калием (рис. 1, в). Снижение концентрации наночастиц до $0,06$ мг/мл приводило к уменьшению числа окрашенных клеток (рис. 1, б). Следует отметить, что визуально не наблюдалось количественных и качественных отличий в характере окрашивания при использовании одинаковых концентраций наночастиц клеток в присутствии как 10, так и 20 % ЭТС в культуральной среде.

На рис. 2 представлена количественная зависимость цитохимического окрашивания АМ при взаимодействии с наночастицами магнетита в концентрации $0,06 \div 1,8$ мг/мл в присутствии 10 и 20 % ЭТС.

Максимальные различия в проценте окрашенных клеток отмечены при концентрации наночастиц $0,3$ мг/мл и составляли 49,8 и 76,2 % в присутствии 10 и 20 % ЭТС соответственно. Видно (рис. 2), что полное «насыщение» наночастицами всех клеток в среде инкубации происходит, начиная с концентрации $0,45$ мг/мл Fe_3O_4 в присутствии 20 % ЭТС и $0,6$ мг/мл Fe_3O_4 при наличии 10 % ЭТС. При минимальной концентрации Fe_3O_4 ($0,06$ мг/мл) не наблюдалось зависимости окрашенных клеток от концентрации белкового компонента, что, по всей видимости, связано с недостаточным количеством наночастиц в среде инкубации.

Следовательно, можно сделать вывод, что увеличение концентрации белка в культуральной среде приводит к увеличению количества наноматериала, который взаимодействует с клетками, т.е. белки являются активаторами взаимодействия наночастиц магнетита с АМ. Этот факт, по всей видимости, можно объяснить тем, что при добавлении наночастиц в среду культивирования происходит адсорбция белков на их поверхности за счет гидро-

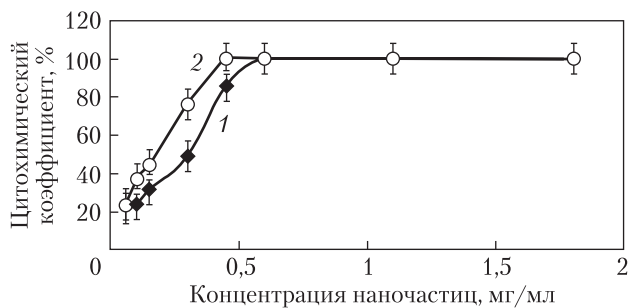


Рис. 2. Цитохимическое окрашивание (%) клеток культуры АМ при взаимодействии с наночастицами в зависимости от концентрации магнетита в присутствии: 1 – 10 % ЭТС; 2 – 20 % ЭТС

фобных и электростатических взаимодействий [12]. В работах [13, 14] показано, что адсорбция белков плазмы крови на поверхности наночастиц определяется как комплекс событий, когда белки, которые адсорбировались на поверхности наноматериала в первый момент времени, замещаются впоследствии другими белками, обладающими более высокой степенью сродства к поверхности наноматериала. Однако детали процесса обмена белков на поверхности наночастиц и кинетика этого процесса остаются невыясненными до настоящего времени. Предполагается, что основную роль при этом играет структура химической поверхности наноматериала, с одной стороны, и качественный и количественный состав белковых молекул в среде инкубации – с другой.

В последующей серии экспериментов нами был проведен анализ цитотоксического действия наноматериала на культуру АМ в зависимости от его концентрации и количества белкового компонента среды эквilibрации. Цитотоксическое воздействие нанопорошков оценивали по МТТ-тесту, основанному на изменении активности митохондриальных ферментов (рис. 3, а), и по выходу цитозольного фермента ЛДГ во внеклеточную среду, характеризующего повреждение цитоплазматической мембраны клеток (рис. 3, б).

Видно (рис. 3, а), что в диапазоне $0,15 \div 0,6$ мг/мл концентраций наночастиц наблюда-

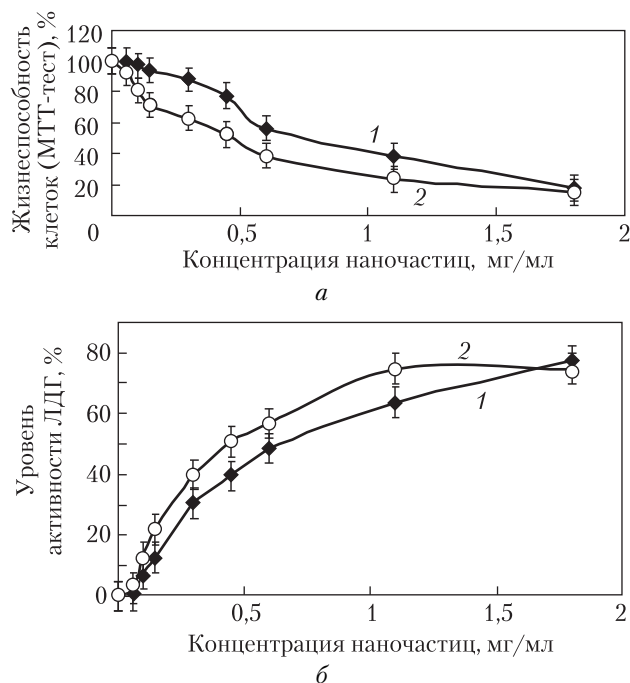


Рис. 3. Жизнеспособность клеток культуры АМ (МТТ-тест (а) и уровень активности ЛДГ (б) в зависимости от и концентрации магнетита в присутствии: 1 – 10 % ЭТС; 2 – 20 % ЭТС

ется достоверная разница жизнеспособности клеток (МТТ-тест) в зависимости от концентрации белка в среде культивирования. В присутствии 20 % ЭТС отмечается более выраженное цитотоксическое действие наночастиц на клетки. Так, при концентрации 0,45 мг/мл Fe_3O_4 жизнеспособность клеток составляла 77,4 % при 10 % ЭТС и 52,3 % при 20 % ЭТС соответственно. При использовании как минимальных концентрации 0,06 и 0,1 мг/мл Fe_3O_4 , так и максимальных 1,2 и 1,8 мг/мл Fe_3O_4 повреждение клеток не зависело от концентрации ЭТС в среде экспозиции. Изучение цитотоксического действия наночастиц по выходу цитозольного фермента ЛДГ не выявило достоверных отличий в зависимости от количества ЭТС в среде инкубации (см. рис. 3, б). Повреждение цитоплазматической мембраны клеток определялось по концентрации наночастиц в среде. Известно [11], что ранним сигналом токсического действия различных веществ яв-

ляется ингибирование митохондриального дыхания, образование радикалов, повреждение митохондриальных компонентов, приводящих впоследствии к гибели клеток. В представленных выше экспериментальных данных показано (рис. 3, а и б), что митохондрии являются более чувствительными к повреждающему действию наночастиц магнетита. Данный факт, по всей видимости, можно объяснить тем, что повышение содержания белкового компонента в среде экспозиции приводит к увеличению проникновения наночастиц внутрь клеток, взаимодействию их с внутриклеточными компонентами, что проявляется в снижении активности митохондриальных дегидрогеназ (МТТ-тест (рис. 3, а)). Согласно данным [12, 14, 15], наночастицы способны адсорбировать на своей поверхности белки, образуя так называемую *белковую корону*. Впоследствии адсорбированные белки могут изменять физико-химические свойства наночастиц, такие, как поверхностный заряд и растворимость, что и будет определять их коллоидальную стабильность и биологическую активность, т.е. способность проникать в клетку и взаимодействовать с ее структурными компонентами. Показано [12], что наночастицы с положительно заряженной поверхностью обладают более высокой способностью взаимодействовать с клетками при помощи специфического и неспецифического механизмов. При специфическом взаимодействии происходит связывание «белковой короны» с рецепторами мембраны, при неспецифическом – это случайное взаимодействие наночастиц с растворенными в среде белками и поверхностью клетки. В обоих случаях стабильность связывания белковой молекулы с наночастицами будет играть ключевую роль во взаимодействии с клетками [4, 5, 14]. Таким образом, можно предположить, что одним из основных факторов, определяющим цитотоксическое действие наночастиц Fe_3O_4 , их взаимодействие и проникновение в клетки является количественный и качественный состав белковых молекул среды инкубации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Першина А.Г., Сазонов А.Э., Мильто И.В.* Использование магнитных наночастиц в биомедицине // Бюллетень сибирской медицины. — 2008. — № 2. — С. 70–77.
2. *Pinto-Alphandary H., Andremont A., Couvreur P.* Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles : research and applications // Int. J. Antimicrob Agents. — 2000. — № 13. — P. 155–168.
3. *Васильев А.Е.* Наночастицы лекарственных веществ // Новая аптека. — 2003. — № 1. — С. 64–67.
4. *Aggarwal P., Hall J.B., McLeland Ch.B. et al.* Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy // Adv. Drug Deliv. Rev. — 2009. — № 61. — P. 428–437.
5. *Dobrovolskaia M., Aggarwal P., Hall J. et al.* Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution // Mol. Pharm. — 2008. — Vol. 5, № 4. — P. 487–495.
6. *Caruntu D., Caruntu G., Chen Y. et al.* Synthesis of variable-sized nanocrystals of Fe_3O_4 with high surface reactivity // Chemistry of materials. — 2004. — Vol. 16, № 25. — P. 5527–5534.
7. *Иверонова В. И., Ревкевич Г. П.* Теория рассеяния рентгеновских лучей. — М.: Изд-во МГУ, 1972. — 246 с.
8. *Beduneau Ar., Ma Zhiya. et al.* Facilitated monocyte–macrophage uptake and tissue distribution of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles // Nanoparticles and Monocytes PLoS O. — 2009. — Vol. 4, № 2. — P. 342–354.
9. *Protocol of Amendment to the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for the Experimentation and other Scientific Purposes.* Strasbourg. 1998.
10. *Меньшиков В.В.* Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. — М.: Медицина, 1987. — 365 с.
11. *Fotakis G., Timbrell J. A.* In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride // Toxicology Letters. — 2006. — № 160. — С. 171–177.
12. *Ehrenberg M., Friedman A., Finkelstein N. et al.* The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells // Biomaterials. — 2009. — № 30. — P. 603–610.
13. *Alberola A. P., Rädler J.O.* The defined presentation of nanoparticles to cells and their surface controlled uptake // Biomaterials. — 2009. — № 30. — P. 3766–3770.
14. *Lundqvist M., Johannes Stigler, Giuliano Elia et al.* Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts // PNAS. — 2008. — Vol. 105, № 38. — P. 14265–14270.
15. *Kooten Th. G., Hetty T. Spijker, Henk J. Busscher* Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell–biomaterial interactions // Biomaterials. — 2004. — № 25. — P. 1735–1747.

*В.В. Кірошка, І.І. Самченко, В.М. Надутов,
А.Е. Перекос, В.З. Войнаш, Т.П. Бондаренко*

**ВЗАЄМОДІЯ НАНОЧАСТОК МАГНЕТИТУ
З КУЛЬТУРОЮ АЛЬВЕОЛЯРНИХ МАКРОФАГІВ
ПРИ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ БІЛКУ**

Проведено порівняльний аналіз взаємодії наночастинок магнетиту (Fe_3O_4) у концентраційному інтервалі $0,06 \div 1,8$ мг/мл з культурою альвеолярних макрофагів у присутності 10 і 20 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС). Установлено, що збільшення вмісту білка у середовищі інкубування призводило до збільшення кількості наночастинок, здатних взаємодіяти з клітинами.

Ключові слова: наночастишки магнетиту (Fe_3O_4), цитотоксичність, культура клітин.

*V.V. Kiroshka, I.I. Samchenko, V.M. Nadutov,
A.E. Perekos, V.Z. Voynash, T.P. Bondarenko*

**INTERACTION OF MAGNETITE NANOPARTICLES
WITH CULTURE OF ALVEOLAR MACROPHAGES
AT DIFFERENT PROTEIN CONCENTRATIONS**

The interactions of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles within the concentration range $0,06 \div 1,8$ mg/ml with the culture of alveolar macrophages in presence of 10 and 20 % FBS were comparatively analyzed. It has been established that the rise in protein content in incubation medium resulted in increase of nanoparticle number able to interact with cells.

Key words: magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles, cytotoxicity, cell culture.

Стаття надійшла до редакції 14.04.11