

УДК 576.08

**ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ Fe_3O_4 С
РАЗЛИЧНЫМИ ПОКРЫТИЯМИ НА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ HSF**

Шарафуллин Ф.Р.

Лаборант,

*Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук,
Москва, Россия*

Пичкур П.А.

Лаборант,

*Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук,
Москва, Россия*

Аннотация

В работе исследовано воздействие стабилизированных цитратом и полиакриламидом наночастиц оксида железа (TSC-IONP и PAA-IONP, размером 10 нм и 100 нм, в диапазоне концентраций $3 \cdot 10^{11} - 10^{14}$ частиц/мл и $3 \cdot 10^6 - 10^9$ частиц/мл соответственно) на культуру фибробластов селезенки человека (HSF) методом МТТ-теста. Показано, что граница цитотоксичности для 10 нм наночастиц находится при концентрации $\geq 10^{13}$ мл⁻¹, в то время как для 100 нм наночастиц $>10^9$ мл⁻¹. Однако, при пересчете на массовую концентрацию значения ЕС₅₀ (концентрация, при которой жизнеспособность клеток снижается на 50% по сравнению с контролем) для обоих типов частиц оказываются сопоставимыми, что указывает на определяющую роль массовой концентрации независимо от размера и покрытия наночастиц. Исследование влияния температуры показало, что повышенная температура (44-46°C) не вызывает

значительного изменения значений EC_{50} для TSC-IONP, что может свидетельствовать об индукции экспрессии белков теплового шока и повышении устойчивости клеток к наночастицам.

Ключевые слова: наночастицы Fe_3O_4 , полиакриламидное и цитратное покрытия, цитотоксичность, клеточная культура HSF, метилтетразолиевый тест.

ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF Fe_3O_4 NANOPARTICLES WITH VARIOUS COATINGS ON HSF CELL CULTURE

Sharafullin P.R.

Laboratory assistant,

Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

Pichkur P.A.

Laboratory assistant,

Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

Abstract

The effect of citrate- and polyacrylamide-stabilized iron oxide nanoparticles (TSC-IONP and PAA-IONP, 10 nm and 100 nm in size, in the concentration range of 3×10^{11} - 10^{14} particles/ml and 3×10^6 – 10^9 particles/ml, respectively) on human spleen fibroblast culture (HSF) by MTT-the test. It has been shown that the cytotoxicity limit for 10 nm nanoparticles is at a concentration of $\geq 10^{13}$ ml⁻¹, while for 100 nm nanoparticles $>10^9$

ml⁻¹. However, when converted to mass concentration, the EC₅₀ values (the concentration at which cell viability decreases by 50% compared to the control) for both types of particles turn out to be comparable, which indicates the determining role of mass concentration regardless of the size and coating of the nanoparticles. A study of the effect of temperature showed that elevated temperature (44-46°C) does not significantly change the EC₅₀ values for TSC-IONP, which may indicate induction of heat shock protein expression and increased cell resistance to nanoparticles.

Keywords: Fe₃O₄ nanoparticles, polyacrylamide and citrate coatings, cytotoxicity, HSF cell culture, methyltetrazole test.

Введение

Наночастицы оксида железа (IONP) благодаря своим магнитным свойствам и перспективам применения в таргетированной доставке лекарств часто используются в качестве наноматериалов для биомедицины [2]. Однако их широкое клиническое применение ограничено возможной цитотоксичностью [7]. Для уменьшения цитотоксичности и стабилизации наночастицы покрывают различными материалами. Использование различных стабилизирующих покрытий, таких как цитрат натрия и полиакриламид, позволяет не только улучшить коллоидную стабильность наночастиц, но и существенно повлиять на их биораспределение и цитотоксичность [1]. При этом механизмы воздействия функционализированных IONP на клеточные системы остаются недостаточно изученными.

Магнитные наночастицы часто используются для гипертермии клеток [3]. При повышении температуры их цитотоксичность может меняться, поскольку температурные условия могут существенно влиять на клеточный метаболизм и,

соответственно, на восприимчивость клеток к воздействию наночастиц [8]. В данной работе помимо непосредственно цитотоксичности наночастиц изучается влияние температуры в диапазоне 37–46°C на цитотоксические эффекты наночастиц оксида железа.

Часто для оценки цитотоксичности обычно используется МТТ-тест, основанный на определении метаболической активности клеток [5]. В данной работе также был выбран МТТ-тест с использованием 24-луночных планшетов, что позволило быстро и эффективно оценить метаболическую активность клеток под воздействием наночастиц различных концентраций и при разной температуре.

Материалы и методы исследования

Культура клеток

Исследование проводилось на культуре фибробластов селезенки человека (HSF) Клеточную культуру высевали в 24-луночные планшеты, внося в каждую лунку по 100 мкл суспензии, содержащей 10^5 клеток в полной питательной среде DMEM/F-12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут для адгезии клеток, после чего в лунки вносили исследуемые образцы наночастиц в заданных концентрациях и продолжали инкубацию при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 100% влажности в течение 48 часов.

Исследование температурной зависимости.

Для изучения влияния температурного фактора на цитотоксичность наночастиц были подготовлены три параллельные серии планшетов с идентичным посевом клеток. Планшеты подвергали предварительной температурной обработке в течение 1 часа при 37°C, 44°C и 46°C соответственно

с последующей 48-часовой инкубацией при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂).

MTT-тест

Принцип метода основан на способности живых клеток восстанавливать неокрашенный тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (MTT) в нерастворимый пурпурный формазан. После инкубации планшет с клетками извлекался из инкубатора, из каждой лунки отбирали всю среду культивирования и добавляли по 300 мкл рабочего раствора, содержащего 0,5 мг/мл MTT в среде DMEM/F-12, в каждую ячейку. Планшет возвращался в инкубатор на 4 часа. Далее планшет с клетками инкубировали при тех же условиях. По истечению времени инкубации клетки лизируются: в каждую ячейку планшета добавляли 900 мкл ДМСО (соотношение ДМСО:MTT-раствор 3:1) и перемешивали полученную смесь на шейкере PST-100HL в течение 15 минут при 400 об/мин и комнатной температуре для полного растворения кристаллов формазана.

Изменение окраски образцов используется для оценки метаболической активности клеток с помощью измерения оптической плотности суспензии формазана. Величина оптической плотности растворённого формазана отражает количество жизнеспособных (метаболически активных) клеток в культуре. Оптическую плотность при 555 нм (OD₅₅₅) регистрировали в каждой ячейке с помощью планшетного ридера Feyond-A400 (Allsheng, Китай). Полученные значения OD сравнивались с контрольной группой для определения процента жизнеспособности клеток. Это позволяет оценить влияние тестируемых веществ на клеточную жизнеспособность.

-Получение наночастиц

В работе использовали два типа наночастиц оксида железа с различными поверхностными покрытиями. Наночастицы, стабилизированные цитратом натрия (TSC-IONP), диаметром 10 нм были получены методом соосаждения в водной среде [7]. Вкратце, к водному раствору солей железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в молярном соотношении 1:2 при интенсивном перемешивании и контролируемой температуре добавляли раствор аммиака до достижения щелочной среды ($\text{pH} \approx 11$). Образующийся магнетит (Fe_3O_4) осаждали с помощью магнитного сепаратора, промывали и повторно диспергировали в водном растворе цитрата натрия. Цитрат-ионы хелатировали поверхность частиц, обеспечивая их коллоидную стабильность в водных растворах. Гидродинамический диаметр и стабильность полученных частиц подтверждали методом динамического светорассеяния (DLS), а их суперпарамагнитные свойства — с помощью вибрационной магнитометрии (VSM).

Наночастицы с полиакриламидным покрытием (PAA-IONP) были синтезированы по методу, основанному на модификации поверхности коммерчески доступных или синтезированных наночастиц магнетита биосовместимым полиакриламидом (ПАА). Аналогичные частицы размера 100 нм были использованы в работе [6]. Покрытие формировалось в результате адсорбции полимера на поверхности частиц в водной среде, что приводило к образованию стабильной стерически стабилизированной коллоидной системы. Ключевым преимуществом данного подхода является создание плотного полимерного слоя, который эффективно предотвращает агрегацию частиц в физиологических условиях и обеспечивает их устойчивость в широком диапазоне pH.

Результаты и их обсуждение

Исследование цитотоксичности наночастиц оксида железа, стабилизированных цитратом натрия (TSC-IONP), показало, что жизнеспособность клеток закономерно снижается с увеличением концентрации наночастиц. Как видно из рис. 1, полученная зависимость демонстрирует классическую сигмовидную форму. Концентрация, при которой жизнеспособность клеток снижается на 50% (EC_{50}) по сравнению с контролем, составила $\sim 5 \cdot 10^{12}$ частиц/мл. Это значение свидетельствует об умеренной цитотоксичности TSC-IONP.

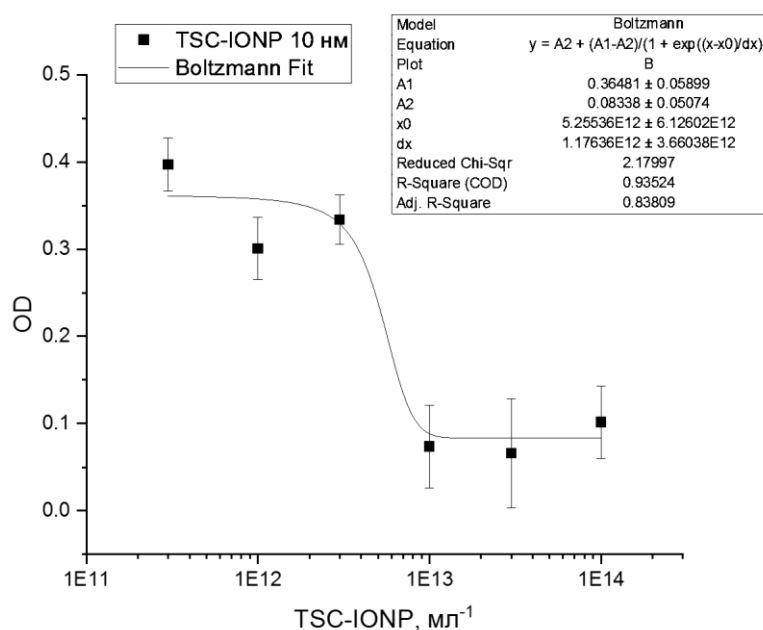


Рис.1. График зависимости поглощения растворенного формазана в зависимости от начальной концентрации наночастиц оксида железа, покрытых цитратом натрия. – изображение создано автором статьи

При исследовании наночастиц с полиакриламидным покрытием (PAA-IONP, рис. 2) значение EC_{50} составило $8 \cdot 10^8$ частиц/мл. Для сравнения токсичности были проведены расчеты массовых концентраций и суммарной

площади поверхности частиц при значениях EC_{50} с учетом различий в размерах частиц (TSC-IONP 10 нм, PAA-IONP 100 нм).

Сравнительные характеристики при EC_{50} :

TSC-IONP (10 нм): массовая концентрация 1.36 мг/мл, суммарная площадь поверхности $1.57 \cdot 10^{-3}$ м²/мл

PAA-IONP (100 нм): массовая концентрация 2.18 мг/мл, суммарная площадь поверхности $2.51 \cdot 10^{-7}$ м²/мл

Полученные данные демонстрируют, что при выражении через концентрацию частиц PAA-IONP проявляют значительно более высокую токсичность (EC_{50} на 4 порядка ниже). Однако при пересчете на массовую концентрацию разница нивелируется - значения EC_{50} для обоих типов частиц оказываются сопоставимыми (1.36 и 2.18 мг/мл). Это свидетельствует о том, что основной вклад в наблюдаемую разницу в цитотоксичности вносит различие в размерах частиц, а не природа поверхностного покрытия. Более крупные PAA-IONP (100 нм) доставляют в клетку большее количество железа на одну частицу, что и объясняет их более высокую эффективность при сравнении по концентрации частиц.

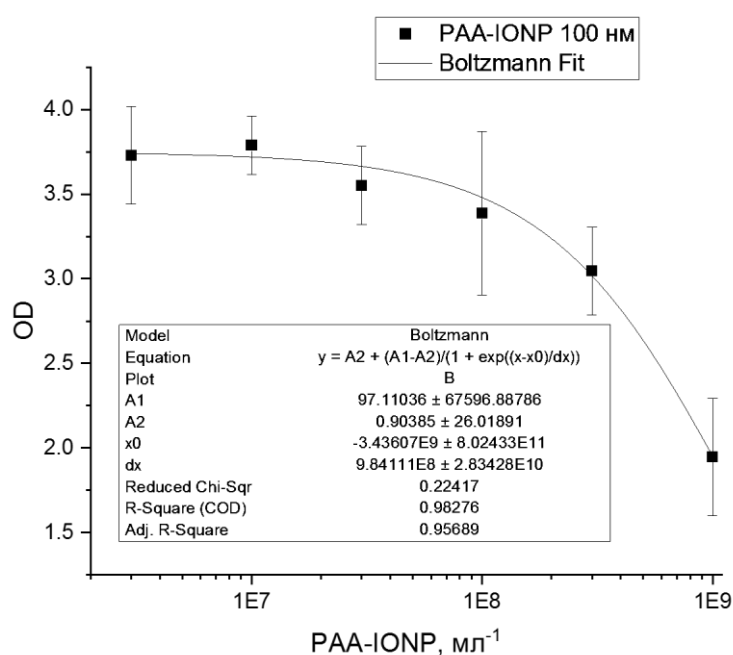


Рис.2. График зависимости поглощения растворенного формазана в зависимости от начальной концентрации наночастиц оксида железа, покрытых полиакриламидом. – изображение создано автором статьи

Исследовано влияние предварительной температурной обработки на цитотоксичность наночастиц. Как показано на рис. 3, кратковременная (1 час) инкубация клеток при повышенных температурах (44°C и 46°C) не привела к изменению значений EC_{50} по сравнению с контролем (37°C). Для представления данных и для расчёта EC_{50} на рисунке (рис. 3) использовали аппроксимацию β -spline, так как распределение Больцмана давало слишком сильные разбросы из-за крайних точек.

Таблица 1 - цитотоксичности наночастиц оксида железа в зависимости от температур

T, °C	EC50
37 °C	$6.1 \cdot 10^{12}$

44 °C	$6.6 \cdot 10^{12}$
46 °C	$6.7 \cdot 10^{12}$

Однако наблюдалось заметное изменение крутизны сигмовидных кривых, особенно выраженное при 46°C.

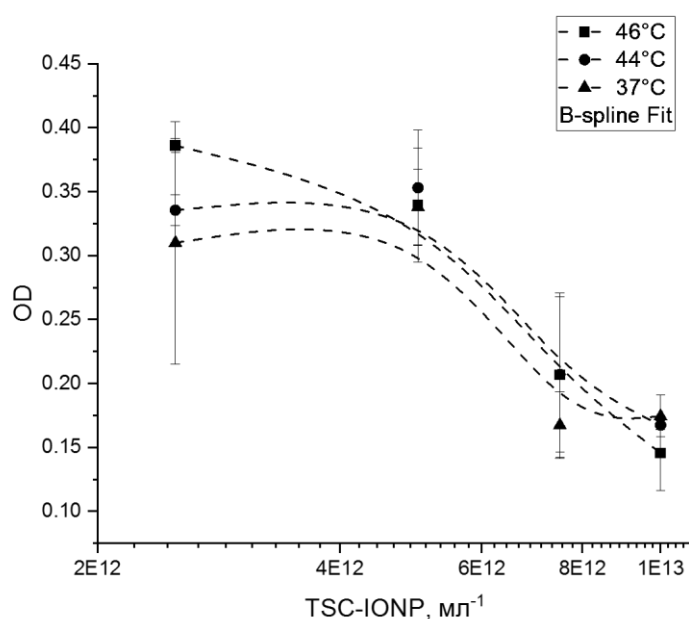


Рис. 3. График зависимости поглощения растворенного формазана в зависимости от начальной концентрации наночастиц, распределение по температурам. – изображение создано автором статьи

Незначительный сдвиг в значениях EC_{50} , наблюдаемый при повышении температуры, вероятно, является следствием противодействия двух процессов. С одной стороны, повышение температуры могло индуцировать защитные механизмы клеток, повышая их устойчивость. С другой стороны, тепловое повреждение мембран могло облегчить проникновение наночастиц, усиливая токсический эффект. Компенсация этих разнонаправленных воздействий

привела к относительно стабильным значениям EC_{50} с небольшим увеличением EC_{50} при высоких температурах (44-46°C).

Выводы

Проведено исследование цитотоксичности наночастиц Fe_3O_4 с различными покрытиями на культуре фибробластов селезенки человека (HSF) методом МТТ-теста. Показано, что токсическое действие наночастиц зависит от их размерных характеристик и типа поверхностного покрытия. При сравнении по концентрации частиц наночастицы с полиакриламидным покрытием (PAA-IONP) демонстрируют значение EC_{50} $8 \cdot 10^8$ частиц/мл, что на четыре порядка ниже, чем для частиц с цитратным покрытием (TSC-IONP) с EC_{50} $5 \cdot 10^{12}$ частиц/мл. Однако при пересчете на массовую концентрацию значения EC_{50} для обоих типов частиц оказываются сопоставимыми (2.18 мг/мл и 1.36 мг/мл соответственно), что указывает на определяющую концентрацию вне зависимости от размера и покрытия наночастиц. Установлено, что повышенная температура (44-46°C) не сильно сдвигает концентрацию наночастиц в область больших значений ($\sim 10^{-12}$ нч/мл для TSC-IONP), при которой жизнеспособность клеток снижается на 50%. Это, скорее всего свидетельствует об индцировании экспрессии белков теплового шока, повышая устойчивость клеток к наночастицам.

Библиографический список

1. Ву В., Ву З., Ю Т., Цзян Ц., Ким В.С. Современные достижения в области магнитных наночастиц оксида железа: синтез, стратегии поверхностной функционализации и биомедицинские применения // Наука и технология перспективных материалов. – 2015. – Т. 16, № 2. – С. 023501.

2. Гупта А.К., Гупта М. Синтез и модификация поверхности наночастиц оксида железа для биомедицинских применений // Биоматериалы. – 2005. – Т. 26, № 18. – С. 3995-4021.
3. Иванов А.В., Петров С.А., Сидоров Д.К. Применение магнитных наночастиц в гипертермии раковых клеток // Российский нанотехнологический журнал. – 2021. – Т. 16, № 3. – С. 45-58.
4. Кузнецов А.А., Попова Е.В., Иванова О.С. Структурные и магнитные свойства стабилизированных цитратом наночастиц оксида железа // Наноматериалы. – 2022. – Т. 12, № 22. – С. 3960.
5. Мосманн Т. Быстрый колориметрический метод для оценки роста и выживаемости клеток: применение в тестах пролиферации и цитотоксичности // Журнал иммунологических методов. – 1983. – Т. 65, № 1-2. – С. 55-63.
6. Никитин П.А., Ветошько П.М., Никитин М.П. Количественный иммуноанализ на основе магнитных наночастиц: синтез и характеристика реагентов // Сенсоры и актуаторы В: Химические. – 2023. – Т. 374. – С. 132847.
7. Сингх Н. и др. Нанотоксичность: проблема для биомедицинского применения магнитных наночастиц // Журнал нанонауки и нанотехнологии. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 1-15.
8. Хильдебрандт Б., Вуст П., Алерс О. и др. Клеточная и молекулярная основа гипертермии // Критические обзоры по онкологии/гематологии. – 2002. – Т. 43, № 1. – С. 33-56.

Оригинальность 81%