

На правах рукописи



Разум Кристина Владимировна

**«Взаимодействие наночастиц золота и палладия
с эукариотическими клетками *in vitro* и *in vivo*»**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск - 2015

Работа выполнена в группе микроскопических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ФГБУ ИХБФМ СО РАН), г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Рябчикова Елена Ивановна**
профессор,
доктор биологических наук,
зав. группы микроскопических исследований
ФГБУ ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Герлинская Людмила Алексеевна**
доктор биологических наук,
вед. науч. сотр. лаб. молекулярных
технологий ФГБУ ИЦиГ СО РАН,
г. Новосибирск

Айдагулова Светлана Владимировна
доктор биологических наук, зав. лаб.
клеточной биологии и фундаментальных
основ репродукции ГБОУ ВПО НГМУ
Минздрава России, г. Новосибирск

Ведущая организация: ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск

Защита состоится: «___» _____ 2015 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-363-90-45) Тел: +7- 952-916-7858. e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН www.mcb.nsc.ru Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. Б. Кокоза

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. С развитием нанобиотехнологии и нанобиомедины связывают перспективы создания принципиально новых лекарственных и диагностических препаратов (Menon et al. 2013; Mieszawska et al. 2013; Kumar et al. 2013; Schröfel et al. 2014; Shah et al. 2014). Количество публикаций, сообщающих о создании наночастиц (НЧ) для медицинских целей, постоянно растет, однако, сообщения о внедрении нанопрепаратов в медицинскую практику единичны, что связано, в том числе, с отсутствием знаний о фундаментальных аспектах взаимодействия НЧ с клетками и что определяет актуальность данной работы.

Внедрение наноматериалов во все сферы жизнедеятельности человека приводит к увеличению контактов людей и животных с наноразмерными объектами, которые могут обладать мутагенными, канцерогенными и другими негативными свойствами (Спутницкий 2013; Khlebtsov and Dykman 2011; Maurer-Jones et al. 2013). В окружающей среде нарастает содержание НЧ металлов, являющихся результатом деятельности человека (Whiteley and Murray 2003; Buzea et al. 2007; Leopold et al. 2008; Roy et al. 2014). Существенный вклад в этот процесс вносят НЧ, выделяемые при работе автомобильных двигателей. Известно, что вдыхание загрязненного воздуха, содержащего микро- и наночастицы металлов, оказывает вредное действие на здоровье людей (Kampa and Castanas 2008). Механизмы воздействия на клетки антропогенных НЧ неизвестны, что делает данную работу актуальной.

Размеры НЧ сопоставимы с размерами макромолекул и клеточных структур, что определяет принципиально иной характер взаимодействия НЧ с клетками, отличный от взаимодействия с ними микро- и макрообъектов. В настоящее время идет накопление знаний о том, какие НЧ способны проникать в клетки и каким образом, какое действие они оказывают на клетки, как изменяются НЧ внутри клеток и с какими клеточными структурами они взаимодействуют. Изучение взаимодействия НЧ с клетками на нано-уровне, который обеспечивает электронная микроскопия, необходимо, поскольку без понимания того, как ведут себя НЧ в клетках, невозможно найти пути управления этим поведением, оценить возможные риски применения НЧ и их потенциальные позитивные эффекты.

Цель исследования. Целью данной работы явилось изучение взаимодействия НЧ золота и палладия с макрофагальными, эпителиальными, фибробластоидными и опухолевыми клетками.

Задачи.

1. Изучить структурные и физико-химические параметры препаратов наносфер, наностержней золота и НЧ палладия в различных жидкостях, включая культуральные среды.

2. Исследовать взаимодействие наносфер золота и НЧ палладия с перитонеальными макрофагами первичной культуры и в условиях организма.

3. Исследовать взаимодействие наносфер золота и НЧ палладия с клетками эпителиальной культуры MDCK.

4. Изучить взаимодействие наностержней золота с клетками культуры ВНК-21 и клетками меланомы В16.

5. Исследовать способность наностержней золота вызывать фототермолиз клеток меланомы В16 в культуре и на животных при облучении лазером.

Научная новизна. В данной работе впервые описаны механизмы проникновения наносфер (НЧЗ), наностержней золота (НСЗ) и наночастиц палладия (НЧП) в эукариотические клетки на ультраструктурном уровне. Выявлены прямое пересечение НЧП мембран клеток MDCK и эндоцитоз НСЗ посредством циркулярных дорзальных складок. Впервые показано, что модификация НСЗ не влияет на механизм их эндоцитоза, но определяет скорость связывания с клеточной поверхностью и накопление в клетках. Установлено накопление НЧЗ и НСЗ в фагосомах и лизосомах. Впервые показана определяющая роль типа клеток в реализации механизмов взаимодействия НЧП с клетками. Выявлено накопление НЧП в ядре и, в меньшей степени, в цитоплазматических органеллах эпителиальных клеток и установлена связь между пересечением клеточных мембран НЧП и их повреждающим действием на эпителиальные клетки. Впервые показан фототермический эффект НСЗ, покрытых линейным полиэтиленмином, на меланоме мышей, открывающий новые перспективы их использования в ветеринарной и медицинской практике.

Научно-практическая значимость исследования. В работе получены новые фундаментальные знания о поведении НЧЗ, НСЗ и НЧП в разных жидкостях, механизмах их проникновения в эукариотические клетки и о «судьбе» этих НЧ в клетках. Результаты исследования могут быть использованы (1) при разработке систем адресной доставки медицинских препаратов на основе НЧЗ и (2) в разработке методов лечения поверхностных опухолевых образований с помощью направленного фототермолиза клеток с применением НСЗ и лазерного облучения. Результаты исследования

взаимодействия НЧП с макрофагами и эпителиальными клетками раскрывают механизмы потенциального вреда антропогенных НЧ и позволяют прогнозировать «судьбу» этих НЧ в условиях организма. Разработанные экспериментальные модели могут быть использованы для изучения биологических аспектов взаимодействия НЧ других металлов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Поверхностный заряд НЧЗ и НСЗ, определяемый их модификацией, влияет на скорость установления контакта НЧ с клеточной поверхностью и, соответственно, на поглощение НЧ клетками.

2. НЧЗ и НСЗ интернализируются посредством тех типов эндоцитоза, которые активны в исследуемых клетках; перемещаются по эндосомально-лизосомальному компартменту и остаются в фагосомах и лизосомах, не повреждая клетки и клеточные структуры.

3. НЧП проникают в эпителиальные клетки путем прямого пересечения плазмалеммы, а макрофаги - с помощью эндоцитоза. Пересечение клеточных мембран НЧП приводит к повреждению клеточных структур, отеку и деструкции клеток.

4. Облучение лазером НСЗ, модифицированных линейным полиэтиленмином, вызывает фототермолиз клеток меланомы В16 в культуре и на животных.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК. Материалы диссертации представлены на 8-й международной конференции по биоинформатике, регуляции генома и структурно-системной биологии (Новосибирск, 2012), 2-й международной школе-конференции «Прикладная нанотехнология и нанотоксикология» (Иркутск, 2013), 11-й международной научной конференции (Владимир, 2014), 21-м конгрессе по ликвидации последствий химических и биологических воздействий (Тбилиси, Грузия, 2014) и 1-й международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Новосибирск, 2014).

Вклад автора. Эксперименты по светооптическому и электронно-микроскопическому изучению взаимодействия НЧ с клетками *in vitro* и *in vivo*, а также характеристика НЧ были выполнены автором самостоятельно.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения и заключения, а также выводов и списка цитируемой литературы, в котором

содержится 190 ссылок. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 32 рисунка.

Благодарности. Автор глубоко признателен всем сотрудникам группы микроскопических исследований (рук. проф. Е.И. Рябчикова) и лаборатории биохимии нуклеиновых кислот (рук. проф. М.А. Зенкова) за помощь в выполнении настоящей работы. Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю проф. Е.И. Рябчиковой за постановку задач, научное руководство, помощь в подготовке диссертации и всестороннюю поддержку. Автор выражает огромную благодарность д.х.н. Д.В. Пышному и к.х.н. И.А. Пышной за участие в планировании и проведении экспериментов с НЧ. Автор благодарен вед. инженеру А.В. Владимировой за обучение и помощь в работе с культурами клеток, зав. виварием А.Г. Можной за помощь в работе с животными, а также проф. М.А. Зенковой и к.б.н. Е.П. Гончаровой за участие в планировании и проведении опыта по изучению фототермолиза.

Данная работа поддержана междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 57 2012-2014 гг. и государственным заданием Минобрнауки (НИР 4.3924.2011).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наночастицы. НЧП были синтезированы к.х.н. С.Ю. Троицким (ИК СО РАН); НЧЗ и НСЗ были синтезированы и модифицированы бычьим сывороточным альбумином (БСА) и линейным полиэтиленгликолем (ПЭГ) к.х.н. И.А. Пышной (ИХБФМ СО РАН). Для определения морфологии и размеров НЧ в суспензии, а также их поведения в различных растворах (фосфатный буфер, дистиллированная вода, 10%-ный раствор сыворотки, среда DMEM с сывороткой и кондиционированная среда) суспензии были исследованы автором с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) (Jeol, Япония), и к.х.н. И.А. Пышной методом динамического (ДСР) и электрофоретического светорассеяния на приборе Zetasizer NanoZS (Malvern, Англия).

Экспериментальные модели. Мыши были получены из ИЦИГ СО РАН (СВА) и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (С57BL) и содержались в стандартных условиях при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эксперименты проводили в соответствии с Хельсинской декларацией Второй медицинской ассоциации, «Международными положениями проведения биомедицинских исследований с использованием животных» и правилами «Лабораторной практики в Российской Федерации».

Культуры клеток меланомы мыши (B16); почек сирийского хомячка (ВНК-21); и эпителия почек коккер-спаниэля (MDCK) были получены из Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Для исследований культуры клеток готовились вед. инженером А. В. Владимировой (ИХБФМ СО РАН). Макрофаги автор получал из перитонеальной полости мышей линии СВА (22–25 г) после предварительной стимуляции 2%-ным раствором тиогликолята. Все клетки инкубировали в среде DMEM с 10% сыворотки и добавлением антибиотиков при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Изучение взаимодействия НЧ с клетками. Перед внесением в культуры клеток суспензию НЧП и НЧЗ разводили кондиционированной средой DMEM и НЧП 15 мин обрабатывали в ультразвуковой ванне Bandelin DT31 (Германия). ПЭИ-НЧЗ, ПЭИ- и БСА-НСЗ разводили средой DMEM с 10% сыворотки. Во всех опытах контролем служили необработанные НЧ клетки. Токсичность НЧ оценивали с помощью МТТ-теста, концентрация НЧП варьировала от 5×10^{-1} до 5×10^{-11} мг/л, а концентрация ПЭИ- или БСА-НСЗ и ПЭИ-НЧЗ - от 2 до 2×10^{-4} мг/л. Оптическую плотность измеряли на многоканальном спектрофотометре Multiscan RC (Labsystems, Финляндия) при длинах волн 570 и 620 нм. Жизнеспособность клеток выражали в процентах относительно необработанных НЧ клеток.

Для светооптического исследования клетки культуры MDCK (5×10^4 кл/лунку в 0,5 мл среды) высевали на покровные стекла, помещенные в 12-луночные культуральные планшеты. Через 24 ч в лунки добавляли НЧП в концентрации 0,05 мкг/л и инкубировали 30 мин, 5 и 24 ч, затем среду в лунках заменяли 4%-ным раствором параформальдегида (рН 7,3-7,4). Фиксированные клетки окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали в микроскопе Leica DM2500 с цифровой камерой DFC420 C (Leica, Германия).

Для ультраструктурного исследования клетки культур В16 и ВНК-21 высевали в 6-луночные планшеты (1×10^5 кл/лунку) и инкубировали 24 ч в 1 мл среды DMEM с сывороткой. Затем среду заменяли свежей, в лунки вносили ПЭИ-НЧЗ, БСА- и ПЭИ-НСЗ в концентрации 0,1 мкг/л. Планшеты инкубировали 30 мин, 3 и 24 ч при 37°C. Клетки культуры MDCK высевали в 6-луночные планшеты (2×10^5 кл/лунку в 1 мл среды), инкубировали 24 ч, добавляли НЧЗ или НЧП в концентрации 0,3 мкг/л и инкубировали 10, 30 мин, 3, 5 и 24 ч. Затем клетки снимали с помощью трипсина. Для изучения взаимодействия НЧ с перитонеальными макрофагами клетки высевали в чашки Петри (25 мм, 3×10^6 кл/чашку в 3,5 мл среды DMEM). Через 24 ч среду заменяли и добавляли НЧЗ или НЧП в концентрации 0,1 мкг/л. Через

10 и 30 мин, 3, 5 и 24 ч инкубации клетки снимали культуральным скребком. Для изучения взаимодействия НЧЗ с макрофагами *in vivo* мышам линии СВА вводили в перитонеальную полость суспензию НЧЗ (0,1 мкг/мышь в 0,5 мл 0,9%-ного раствора NaCl). Клетки отбирали из полости через 10, 30 мин, 3, 5 и 24 ч. Контроль: макрофаги мышей, которым не вводили НЧЗ. Все суспензии клеток осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 5 мин), осадки фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида 24 ч при 4°C, промывали культуральной средой, дофиксировали 1%-ным раствором OsO₄ в течение 1 ч и обезвоживали стандартным образом, заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме EM UC7 (Leica, Германия), контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца. Часть срезов не контрастировали для лучшей визуализации НЧ.

Изучение лазерного фототермолиза клеток, содержащих ПЭИ-НСЗ, *in vitro* и *in vivo*. Клетки В16 и ВНК-21 (5×10^4 кл/лунку в 0,5 мл DMEM) высевали на покровные стекла и культивировали 24 ч. Среду заменяли и в лунки вносили суспензию БСА- или ПЭИ-НСЗ (0,05 мкг/л). Через 24 ч клетки 15 мин облучали полупроводниковым лазером с длиной волны 808 или 650 нм (0,7 Вт/см²) и окрашивали гематоксилин-эозином или трипановым синим.

Модель меланомы была получена к.б.н. Е. П. Гончаровой (ИХБФМ СО РАН) подкожным введением $1,5 \times 10^5$ клеток меланомы В16 /мышь в 0,5 мл стерильного фосфатного буфера мышам линии С57В1/6 (самки, 18-20 г). На 10-й день в опухоль вводили ПЭИ-НСЗ (0,2 мг/мышь в 100 мкл стерильного 0,9%-ного NaCl) двух типов: с продольным плазмонным резонансом на длине волны 760 или 840 нм. Через 48 ч опухоль 5 мин облучали лазером с длиной волны 650 или 808 нм (0,1 Вт/см²), мыши были наркотизированы авертином. Разогрев опухоли регистрировали д.х.н. Д. В. Пышный и к.ф.-м.н. А. А. Ломзов (ИХБФМ СО РАН) с помощью тепловизора (ИФП СО РАН, Россия). На 4-й день после облучения опухолевую ткань иссекали, фиксировали и готовили образцы для световой и электронной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суспензии НЧЗ, НСЗ и НЧП в дистиллированной воде характеризовали по следующим параметрам: форма, размер, дзета-потенциал, однородность и дисперсность суспензии. (1) **НЧЗ**: сферические частицы (13,4±1,3 нм), максимум поглощения на длине волны 520 нм, дзета-потенциал -42,8±1,4 мВ. (2) **ПЭИ-НЧЗ**: сферические частицы (15,9±2,1 нм); дзета-потенциал 34,0±1,0 мВ. (3) **БСА-НЧЗ**: сферические частицы (13,8±2,7 нм); дзета-потенциал

-22,4±0,4 мВ. **(4) ЦТАБ-НСЗ:** палочковидные частицы (53,8±7,6 x 19,7±2,7 нм); продольный плазмонный резонанс при 760 нм; дзета-потенциал - 53,8±1,4 мВ. **(5)** палочковидные частицы **ПЭИ-НСЗ** (53,8±7,63 x 19,2±2,7 нм, дзета-потенциал 53,0±0,8 мВ) и **(6) БСА-НСЗ** (56,3±5,3 x 20,2±2,9 нм, дзета-потенциал -9,1±0,4 мВ) с продольным плазмонным резонансом при 760 нм; **(7) ПЭИ-НСЗ₈₄₀:** палочковидные частицы (35,1±5,8 x 7,8±1,3 нм) с продольным плазмонным резонансом при 840 нм. **(8) НЧП:** агломераты размером около 200 нм и обособленные частицы (5,8±1,6 нм), форма близка к сферической, дзета-потенциал 42,8±1,4 мВ. Данные по дисперсности суспензий НЧ в различных растворах приведены в Таб. 1 и Табл. 2.

Полученные в результате химического синтеза суспензии НЧ металлов зачастую находятся в несовместимой с живыми клетками среде, что определяет необходимость дополнительной обработки, сохраняющей наносвойства частиц. Суспензии НЧЗ и НСЗ, а также НЧП были стабильны и высокодисперсны в дистиллированной воде, однако, водные суспензии НЧ непригодны для внесения в среду, где культивируются клетки. Самым простым решением является замена воды на фосфатный буфер, входящий в состав всех культуральных сред. Однако, в богатых солевых растворах, таких как фосфатный буфер, зачастую отмечается агрегация и агломерация металлических НЧ, приводящая к потере наноразмерных свойств (Jiang et al. 2009; Harraz et al. 2012; Dominguez-Medina et al. 2013). НЧП в фосфатном буфере формировали устойчивые агрегаты, поэтому для получения высокодисперсной суспензии были испробованы разные подходы (Табл. 1). Модификация НЧП с помощью БСА, ПЭГ или ПВП оказалась неэффективной. Получить высокодисперсную суспензию НЧП, пригодную для исследований на культурах клеток, удалось при разведении НЧП в культуральной среде DMEM с 10% сыворотки и последующей обработке ультразвуком. Аналогичный подход к получению высокодисперсной суспензии применялся для НЧ платины диаметром 5-10 нм (Pelka et al. 2009) и 35 или 20 нм (Elder et al. 2007). Считается, что альбумин сыворотки предотвращает агрегацию НЧ (Orts-Gil et al. 2013; Wang et al. 2013). Наибольшую дисперсность обеспечило разведение суспензии НЧП кондиционированной средой DMEM, собранной после двухсуточного культивирования клеток (Табл. 1). Этот эффект свидетельствует о влиянии небелковых факторов, возможно, продуктов жизнедеятельности клеток, на стабильность и дисперсность суспензии НЧП, поскольку содержание сывороточных белков в кондиционированной среде меньше, чем в

свежеприготовленной. Данный подход, возможно, может решить проблему подготовки суспензий НЧ металлов для биологических исследований.

Табл.1 Дисперсность препаратов НЧП (метод ДСР)

Используемый раствор для разведения суспензии НЧП	Диапазон размеров, нм	Средний размер, нм
Дистиллированная вода (рН 7,0)	80-700	203,9
Фосфатный буфер (рН 7,3-7,5)	600-10000	906,2
1% р-р БСА в фосфатном буфере (рН 7,3-7,5)	95-2000	335,9
1% водный р-р ПВП (рН 7,0)	70-10000	760,0
1% р-р ПЭГ в карбонатном буфере (рН 8,3)	80-8000	198,6
Среда DMEM (рН 7,4)	50-1000	169,0
Среда DMEM с 10% сыворотки	10-500	57,1
Кондиционированная среда DMEM	20-200	51,9
Кондиционированная среда DMEM после недельного хранения	20-200	49,1

Изучение поведения НЧЗ и НСЗ, а также НЧП в разных жидкостях выявило увеличение их гидродинамических размеров через 40 мин инкубации, которое может быть обусловлено связыванием с поверхностью НЧ компонентов среды, либо агрегацией или агломерацией частиц в растворе (Dobrovolskaia et al. 2009; Schäffler et al. 2013). Применение комплекса методов ДСР и ПЭМ показало, что увеличение гидродинамического размера в культуральных и кондиционированной средах обусловлено формированием «короны» на поверхности ПЭИ-НЧЗ, ПЭИ- и БСА-НСЗ, а растворе сыворотки и фосфатном буфере - агломерацией или агрегацией частиц (Табл. 2). Наблюдаемое связывание с поверхностью НЧ компонентов среды с сывороткой (формирование «короны») соответствует представлению о том, что поверхность НЧ покрывается белками и другими биомолекулами при их попадании в биологическое окружение (Stebounova et al. 2011; Cohen et al. 2012; Mahon et al. 2012; Mirshafiee et al. 2013). Несомненно, формирование покрытия на поверхности НЧ является молекулярным событием, и оно может оказывать влияние на клеточные и органические реакции при токсикологических и других исследованиях НЧ (Maiorano et al. 2010). Очевидно, избежать этого невозможно: в любой среде с клетками НЧ будут взаимодействовать с компонентами среды, однако, это явление необходимо учитывать при планировании эксперимента и анализе полученных данных. Использование одинаковых сред для культур клеток обеспечило стандартизацию условий наших экспериментов.

Табл.2 Дисперсность препаратов НЧЗ и НСЗ (метод ПЭМ).

среда/ НЧ	Дист. вода	Фосф. буфер	Сыворотка	DMEM с сывороткой	Конд. DMEM
НЧЗ	частицы	-	-	агломераты	агрегаты
БСА- НЧЗ	частицы	агломераты	частицы	частицы	частицы
ПЭИ- НЧЗ	частицы	агрегаты	частицы	частицы	частицы
ЦТАБ- НСЗ	частицы	-	-	частицы	частицы
БСА- НСЗ	агрегаты	агрегаты	агломераты	частицы	агломе- раты
ПЭИ- НСЗ	агломераты	агрегаты	частицы + агломераты	частицы + агломераты	частицы

Используемые обозначения:

- *частицы* – обособленные наночастицы
- *агломераты* – кластеры из небольшого числа НЧ, зазоры (до 2 нм) между которыми хорошо визуализируются с помощью ПЭМ.
- *агрегаты* – кластеры из НЧ, настолько плотно прилегающих друг к другу, что промежутки между ними не просматриваются.

Многочисленные исследования показывают, что НЧ поглощаются нормальными и опухолевыми клетками, однако, механизмы этого взаимодействия в настоящий момент изучены не в полной мере. В данной работе впервые детально исследовано взаимодействие НЧП, НЧЗ и НСЗ с эукариотическими клетками разного типа (макрофаги мыши, культуры клеток MDCK, ВНК-21, меланома В16) на ультраструктурном уровне.

Главной функцией макрофагов в организме является захват и деструкция в фагосомах крупных частиц, включая бактерии и обломки клеток. Эта функция в полной мере реализовалась перитонеальными макрофагами мышей в отношении скоплений НЧЗ (Рис. 1) и НЧП (Рис. 2). Макрофаги продемонстрировали все известные механизмы микро- и макроэндоцитоза. Наше исследование показало, что макрофаги способны не только к фагоцитозу и макропиноцитозу НЧ (Krpetic et al. 2010; França et al. 2011), но и к микроэндоцитозу разного типа. Мы не наблюдали изменений структуры фагосом, содержащих НЧЗ и НЧП, характерных для деградации

поглощенного материала (превращение в фаголизосомы), по-видимому, эти НЧ не запускали соответствующие механизмы в клетках.

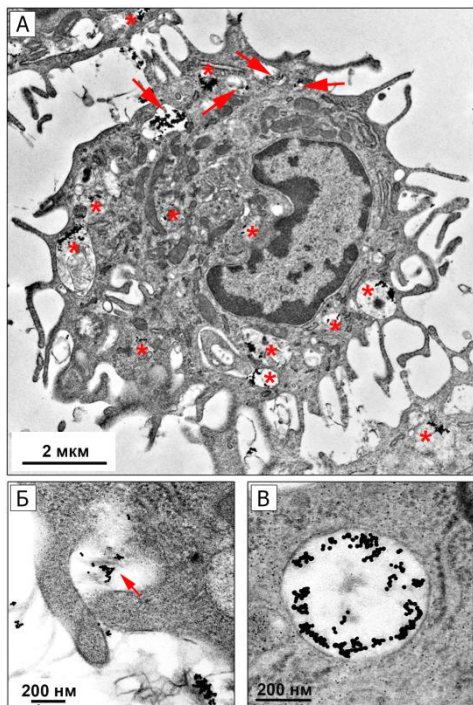


Рис.1 НЧЗ в перитонеальном макрофаге (in vivo, 10 мин после введения). Макрофаг в состоянии активного макропиноцитоза, по всей поверхности клетки видны длинные выросты цитоплазмы, НЧЗ в инвагинациях показаны стрелками, внутри органелл - звездочкой (А). Фагоцитоз скопления НЧЗ выростами цитоплазмы (Б). Фагосома, содержащая НЧЗ (В). Ультратонкие срезы, ПЭМ.

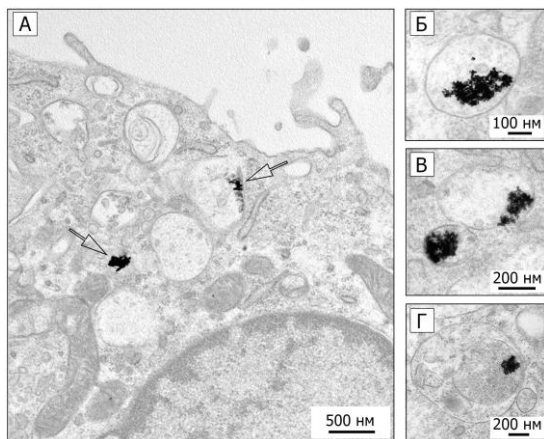


Рис. 2 НЧП в перитонеальных макрофагах: в фагосомах (А), эндосомах (Б, В) и в лизосоме (Г); 24 ч инкубации. Ультратонкие срезы без контрастирования, ПЭМ.

Исследование на животных обнаружило, что через 5 ч макрофаги, нагруженные НЧЗ, исчезают из перитонеальной полости, очевидно, путем

лимфатического дренажа. Важным результатом данного исследования явилась установленная идентичность механизмов проникновения НЧЗ в макрофаги в условиях культуры и организма.

Исследование взаимодействия НЧП с клетками эпителиальной культуры MDCK обнаружило частицы в цитозоле, аппарате Гольджи, митохондриях и других органеллах, а также в ядре (Рис. 3), что свидетельствовало о пересечении НЧП плазматической и цитоплазматических мембран, включая мембраны ядерной оболочки. Полагают, что способность НЧ металлов пересекать мембраны и накапливаться в цитозоле и в ядре, связана с их малыми размерами (до 5-10 нм) (Oberdörster et al. 2010; Coulter et al. 2012; Inkiewicz-Stepniak et al. 2014), тогда как НЧ металлов большего размера обычно захватываются клетками с помощью эндоцитоза (Canton, Battaglia 2012; Wilkinson et al. 2011). Мы впервые выявили непосредственное пересечение мембран клеток MDCK НЧП (около 6 нм), которое приводило к повреждению органоидов.

Применение НЧП в автомобильных катализаторах для дожигания выхлопных газов приводит к нарастанию содержания палладия в окружающей среде (Nishihata et al. 2002; Colombo et al. 2008; Goncalves et al. 2008), опубликованы данные о накоплении НЧП в живых организмах (Moldovan et al. 2001; Sures et al. 2001) и об индукции апоптоза в клетках бронхиального эпителия под действием НЧП (Wilkinson et al. 2011). Влияние НЧП на отдельные клетки и внутриклеточные структуры не изучено. Мы исследовали воздействие НЧП (около 6 нм), аналогичных содержащимся в выхлопных газах, на клетки разной природы. Оказалось, что перитонеальные макрофаги в условиях *in vitro* устойчивы к повреждающему действию НЧП. Макрофаги не только не разрушаются при инкубации с НЧП, но и способны очищать среду, захватывая и блокируя НЧ внутри фагосом. Эти данные позволяют предположить, что в условиях организма макрофаги могут очищать легкие от НЧ металлов, попавших при вдыхании загрязненного воздуха. Напротив, эпителиальные клетки культуры MDCK, сохраняющие морфологию однослойного эпителия, оказались чувствительны к повреждающему действию НЧП. Аналогичные клетки легких, очевидно, могут повреждаться НЧП, содержащимися во вдыхаемом загрязненном воздухе. Таким образом, существует различный характер взаимодействия НЧП с эпителиальными клетками и макрофагами, по-видимому, обусловленный морфофункциональными особенностями клеток, что необходимо учитывать при проведении аэрозольных экспериментов.

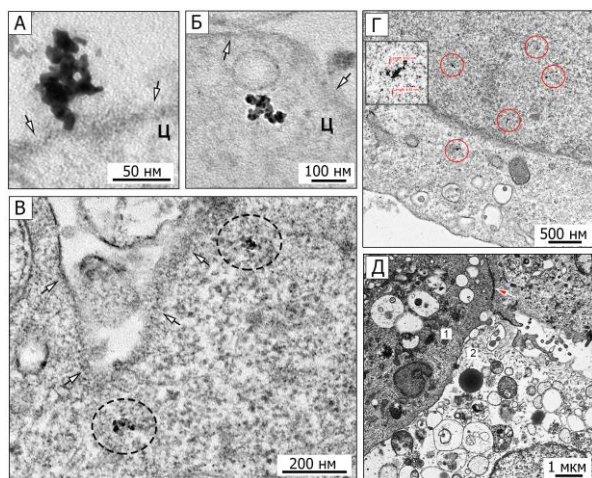


Рис.3 Скопление НЧП, контактирующие с плазмалеммой (показана стрелками) (А) и НЧП (обведены контуром) в цитоплазме, Ц (Б, В) (10 мин инкубации). Накопление НЧП (Г) и их повреждающее действие (Д) (5 ч инкубации): 1 – начальные этапы деструкции, 2 – погибшая клетка. Ультратонкие срезы, ПЭМ.

Использование ЦТАБ при синтезе НСЗ делает их токсичными для клеток (Pérez-Juste et al. 2005). Предприняты попытки модифицировать НСЗ с помощью БСА (Choi et al. 2012), ПЭГ (Lin et al. 2010; Park et al. 2010) или разветвленного ПЭИ (Patnaik, Gupta 2013). Однако, проблема получения нетоксичных НСЗ, стабильных в биологических жидкостях и способных активно проникать в клетки, не решена. Мы сравнили взаимодействие ПЭИ- и БСА-НСЗ, а также ПЭИ-НЧЗ с одними и теми же культурами клеток ВНК-21 и меланомы В16 *in vitro*. Анализ ультратонких срезов показал, что ПЭИ-НЧЗ и ПЭИ-НСЗ тесно контактируют со слоем гликокаликса на внешней стороне плазмалеммы клеток, в отличие от БСА-НСЗ и изученных ранее в нашей лаборатории БСА-НЧЗ.

Скорость связывания НЧЗ и НСЗ, покрытых ПЭИ, с плазмалеммой клеток ВНК-21 и В16 значительно превосходила таковую для БСА-НСЗ. Так, через 30 мин инкубации все наблюдаемые на срезах ПЭИ-НЧЗ и ПЭИ-НСЗ контактировали с клетками, тогда как БСА-НСЗ впервые отмечались между клетками только через 3 ч инкубации. Аналогично, БСА-НЧЗ не выявлялись на ультратонких срезах через 3 ч инкубации с клетками HeLa, хотя через такой же интервал времени многочисленные НЧЗ определялись уже в лизосомах. Полученные результаты свидетельствуют о длительной флотации БСА-НСЗ и БСА-НЧЗ, подтверждая тот факт, что положительно заряженные НЧ достигают клеток быстрее, чем отрицательно (Nühn et al. 2013). В среде DMEM, содержащей сыворотку, БСА- и ПЭИ-НСЗ приобретают отрицательный заряд; однако, ПЭИ-НСЗ быстрее вступают в контакт с

поверхностью клеток и активно проникают внутрь (Рис. 4), в отличие от БСА-НСЗ. Это подчеркивает роль поверхностного заряда НЧ, который зависит от модифицирующего вещества, во взаимодействии НСЗ с клетками. Мы можем также заключить, что формирование «короны» и, соответственно, изменение поверхностного заряда при инкубации в культуральной среде, не играют принципиальной роли в установлении контакта НЧ с плазмалеммой клеток, что подтверждает ранее высказанное предположение (Hühn et al. 2013). Способ проникновения НЧЗ и НСЗ определялся типом клеток, что свидетельствует о пассивной роли НЧ в их интернализации. Таким образом, ПЭИ-НСЗ стабильны в культуральных средах, нетоксичны для клеток, проникают в клетки с помощью эндоцитоза, и накапливаются в лизосомах.

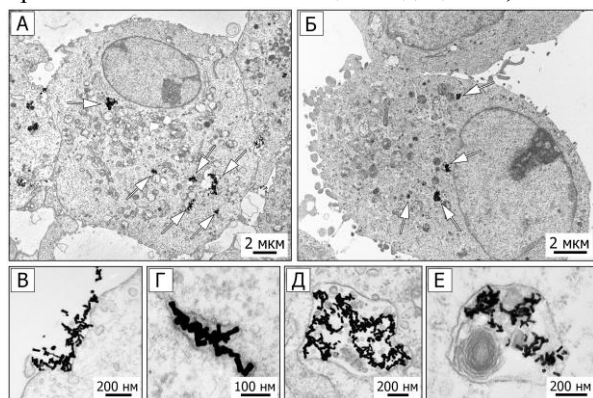


Рис.4 ПЭИ-НСЗ в клетках ВНК-21 (А, В-Е) и меланомы В16 (Б) через 24 ч инкубации. Контакт ПЭИ-НСЗ с плазмалеммой (В); ПЭИ-НСЗ в ранней эндосоме (Г), в МВТ (Д) и в лизосоме (Е). Ультратонкие срезы, ПЭМ.

НСЗ считаются перспективными контрастирующими агентами для фотодетекции (Liopo et al. 2012; Menon et al. 2013) и для фототермической терапии опухолевых заболеваний (Terentyuk et al. 2009; Menon et al. 2013) благодаря способности в течение короткого периода времени конвертировать энергию лазерного излучения в нагрев локальной области. Соответственно, воздействие лазером на клетки, содержащие НСЗ, вызывает гипертермию на клеточном уровне, развитие необратимых структурных и метаболических нарушений. Целевыми опухолями для фототермической терапии являются подкожные мягкие опухоли, в первую очередь - меланома (Park et al. 2010), поэтому в качестве экспериментальной модели мы выбрали меланому мышей В16. Мы сравнили в опытах *in vitro* индукцию фототермолиза клеток, содержащих ПЭИ- и БСА-НСЗ₇₆₀ при облучении лазером. Способность ПЭИ-НСЗ₇₆₀ вызывать фототермолиз клеток значительно превосходила таковую БСА-НСЗ₇₆₀. Это полностью согласуется с установленными различиями проникновения данных НЧ в клетки.

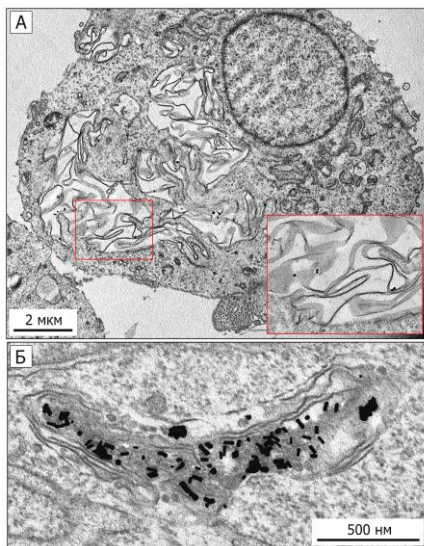


Рис.5 Крупные скопления складчатых мембран в цитоплазме клеток ВНК-21 через 3 ч инкубации с БСА-НСЗ; видны частицы, ассоциированные со складчатыми мембранами (А). Образование лизосом, содержащих БСА-НСЗ, в результате сжатия складчатых мембран (Б-Г). Ультратонкие срезы, ПЭМ.

В опытах *in vivo* мы изучали фототермический эффект при облучении опухолей лазерами с длиной волн 650 и 808 нм и с предварительным введением НСЗ₇₆₀ и НСЗ₈₄₀. Регистрация разогрева опухолей с помощью тепловизора (Рис. 6) показала, что максимальный эффект наблюдается при длине волны лазерного излучения 808 нм и введении ПЭИ-НСЗ₈₄₀.

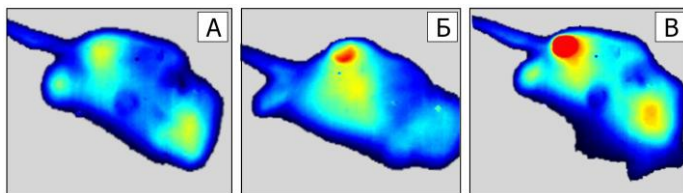


Рис. 6 Разогрев опухоли, термограммы мышей: до облучения (А) и в момент облучения лазером ($\lambda = 650$ нм, 5 мин) мышей контрольной группы (Б) и мышей, в опухоль которых вводили ПЭИ-НСЗ₇₆₀ (В).

Изучение гистологических срезов показало выраженный деструктивный эффект облучения опухоли лазером в присутствии ПЭИ-НСЗ₈₄₀ (Рис. 7). Сочетание лазера с длиной волны 808 нм и ПЭИ-НСЗ₈₄₀ обеспечивало максимальный фототермический эффект при облучении в течение 5 мин.

Выполненное нами комплексное исследование взаимодействия НЧ золота и палладия с эукариотическими клетками выявило несколько значимых аспектов. Во-первых, интернализация НЧП, НЧЗ и НСЗ является

пассивной и определяется типом клеток, за исключением эндоцитоза ПЭИ-НСЗ и БСА-НСЗ с помощью циркулярных дорзальных складок (Рис. 5). Скорость связывания с плазмалеммой и накопление данных НЧЗ и НСЗ в клетках определяется исходным поверхностным зарядом частиц. «Конечной станцией» эндоцитоза НЧ являются лизосомы, надежно изолирующие НЧ от цитозоля и ядра. Показана избирательность повреждающего действия НЧП на клетки разной природы (эпителиальные и макрофаги). Показана нетоксичность и биосовместимость ПЭИ-НСЗ, и их способность вызывать фототермолиз клеток меланомы В16 *in vitro* и *in vivo*. В совокупности, полученные результаты дополняют существующие представление о тонких механизмах взаимодействия НЧ с эукариотическими клетками и могут иметь общественно-полезный прикладной характер в плане разработок препаратов направленного действия на основе НЧ металлов и противоопухолевой терапии с использованием наностержней золота.

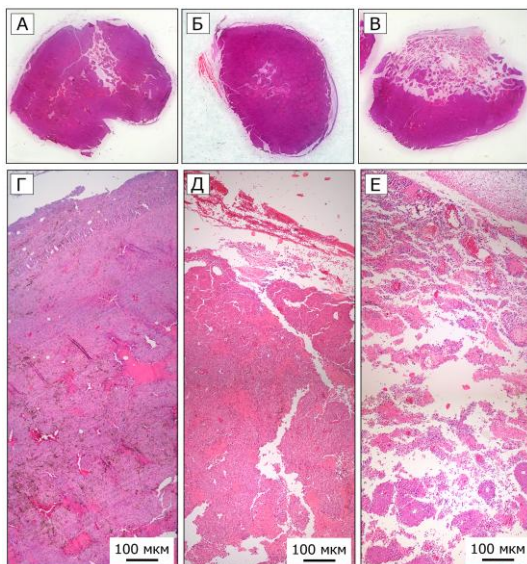


Рис.7 Гистологические срезы меланомы В16 мышцы: контрольный образец (А, Г); после облучения лазером (Б, Д); после введения ПЭИ-НСЗ₈₄₀ и облучения лазером (В, Е). Отчетливо видна глубина повреждения опухоли (В), дезинтеграция и обводнение ткани (Е). Облучение лазером (808 нм, 5 мин). Световая микроскопия, окрашивание гематоксилин-эозином.

ВЫВОДЫ

1. Внесение наносфер (~14 нм) и наностержней золота (~54x20 нм), а также наночастиц палладия (~6 нм) в культуральную среду сопровождается изменением их поверхностного заряда, гидродинамического размера и дисперсного состояния по сравнению с суспензиями в дистиллированной воде. Поверхностный заряд, определяемый модификацией наночастиц, а не «корона», играет решающую роль в их связывании с плазмалеммой клеток.

2. В эпителиальные клетки культуры MDCK наночастицы палладия проникают, прямо пересекая плазмалемму, оказывают выраженное повреждающее действие, накапливаются в ядрах клеток и органеллах цитоплазмы, тогда как наносферы золота интернализируются с помощью кавеолин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза и не повреждают клетки. В перитонеальные макрофаги и наночастицы палладия, и наносферы золота попадают путем фагоцитоза и микроэндоцитоза (клатрин-, кавеолин- и рафт-зависимого эндоцитоза), не повреждая клеточных структур.

3. Наносферы и наностержни золота, модифицированные линейным полиэтиленимином, проникают в клетки культуры ВНК-21 путем кавеолин- и рафт-зависимого эндоцитоза; в клетки меланомы В16 - с помощью рафт-зависимого эндоцитоза. Наностержни золота, модифицированные линейным полиэтиленимином или бычьим сывороточным альбумином, индуцируют в данных клетках эндоцитоз циркулярных дорзальных складок.

4. Наностержни золота, модифицированные линейным полиэтиленимином, вызывают фототермолиз клеток меланомы В16 в культуре и на животных при облучении лазером.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из списка ВАК:

1. **Razum K.V.**, Troitski S.Y., Pyshnaya I.A., Bukhtiyarov V.I., Ryabchikova E.I. Macrophages and epithelial cells differently respond to palladium nanoparticles // *Micro and Nanosystems*. – 2014. - Vol. 6. - N 2. - P. 133-141.
2. Pyshnaya I.A., **Razum K.V.**, Poletaeva J.E., Pyshnyi D.V., Zenkova M.A., Ryabchikova E.I. Comparison of behaviour in different liquids and in cells of gold nanorods and spherical nanoparticles modified by linear polyethyleneimine and bovine serum albumin // *BioMed Res Int*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1-13.

3. **Разум К.В.**, Троицкий С.Ю., Пышная И.А., Бухтияров В.И., Рябчикова Е.И. Взаимодействие наночастиц палладия с эпителиальными клетками MDCK и перитонеальными макрофагами *in vitro* // Ж. Российские нанотехнологии. - 2014. - Т. 9. - № 11-12. - С. 83-88.
4. Полетаева Ю.Е., **Разум К.В.**, Пышная И. А., Марченко А. К., Пышный Д. В., Зенкова М. А., Рябчикова Е. И. Взаимодействие наночастиц золота с эукариотическими клетками в культуре и в условиях организма // Ж. Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2014. - Т. 6. - № 1. - С. 36-46.

Тезисы:

5. Spitsyna Y.E., Pyshnaya I.A., Marchenko A.K., **Razum K.V.**, Pyshnyi D.V., Ryabchikova E.I. Pathways of gold nanoparticles internalization by different types of eucaryotic cells // The Eighth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, June 25-29, 2012, Novosibirsk, Russia, 2012, P. 165.
6. **Razum K.**, Pyshnyi D., Pyshnaya I., Goncharova E., Ryabchikova E. Polyethylenimine-coated gold nanorods: biocompatibility and photothermal effect // Second International School-Conference “Applied Nanotechnology and Nanotoxicology”, August 15-19, 2013, Listvyanka, Baikal Lake, Irkutsk Region, Russia: Book of Abstracts, ed.: Dr. Aleksey Vedyagin, Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, Russia, 2013, 192 p. ISBN 978-5-9902557-8-5 P. 56-57.
7. **Razum K.**, Trouzhyki S., Bukhtiyarov V., Ryabchikova E. Palladium nanoparticles: effects on macrophages and epithelial cells // Second International School-Conference “Applied Nanotechnology and Nanotoxicology”, August 15-19, 2013, Listvyanka, Baikal Lake, Irkutsk Region, Russia: Book of Abstracts, ed.: Dr. Aleksey Vedyagin, Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, Russia, 2013, 192 p. ISBN 978-5-9902557-8-5 P. 93-94.
8. Пышная И.А., **Разум К.В.**, Ломзов А.А., Пышный Д.В., Рябчикова Е.И. Фототермические эффекты наностержней золота в системах *in silico*, *in vitro* и *in vivo* // Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии: Доклады 11-й международной научной конференции. Книга 1. Владимир, 1-3 июля, 2014 г. ISBN 978-5-905527-08-1. С. 204-209.
9. Ryabchikova E., **Razum K.**, Pyshnaya I. Nature of nanoparticles calls for studies with cells at nanolevel // 21th Annual CSCM – WORLD CONGRESS ON CBRNE SCIENCE & CONSEQUENCE MANAGEMENT. Tbilisi, Georgia, 1-5 June 2014.
10. **Разум К.В.**, Пышная И.А., Троицкий С.Ю., Рябчикова Е.И. Закономерности взаимодействия наночастиц золота и наночастиц палладия с эукариотическими клетками на ультраструктурном уровне // I Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, 7-8 октября, 2014, Научоград Кольцово: Сб. тез. / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск: РИЦ НГУ, 2014. 155 с. ISBN 978-5-4437-0297-1 С. 35-39.

Подписано в печать 27.10.2010. Заказ №84.
Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.
Отпечатано в типографии Института катализа СО РАН
630090 Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 5