Beethuk Boar (* MV)==

УДК 620.3:57.085.23; 615.916

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ В ДИНАМИКЕ

Ю. И. Великородная¹, А. Я. Почепцов¹, И. А. Дворяшина^{1,2}, В. Л. Загребин², О. И. Соколов³

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России, Волгоград, ²Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра цитологии, гистологии и эмбриологии, ³ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН», Саратов

Была изучена реакция клеточных систем в ответ на введение 5 нм коллоидного золота через 4, 24 и 48 часов, а также через 24 часа после замены ростовой среды, содержащей наночастицы золота. В надосадочной жидкости определяли активность кислой фосфатазы, лактатдегидрогеназы, а также проводили постановку цитотоксического теста. Полученные результаты показали, что повреждающее воздействие наночастиц золота на клетки было обратимым, а метаболические изменения были обусловлены адаптивными механизмами.

Ключевые слова: наночастицы золота, цитотоксичность, лактатдегидрогеназа, кислая фосфатаза, восстановление.

EFFECT OF GOLD NANOPARTICLES ON THE VIABILITY AND METABOLIC PARAMETERS OF CELL LINES OVER TIME

Yu. I. Velikorodnaya¹, A. Ya. Pocheptsov¹, I. A. Dvoryashina^{1,2}, V. L. Zagrebin², O. I. Sokolov³

¹FederalStateUnitary Enterprise Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology FMBA of Russia, Volgograd, ²Volgograd State Medical University, Histology, embryology, cytology department, ³Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences. Saratov

We studied the response of cellular systems to the introduction of 5 nm colloidal gold 4, 24 and 48 hours, and 24 hours after replacing the growth medium containing gold nanoparticles. We evaluated the activity of acid phosphatase and lactate dehydrogenase in the supernatant. We also performed a cytotoxic test. The results showed that the damaging effect of gold nanoparticles on the cells was reversible, and metabolic changes were condiioned by adaptive mechanisms.

Key words: gold nanoparticles, cytotoxicity, lactate dehydrogenase, acid phosphatase, recover.

Наночастицы золота (НЧЗ) имеют ряд физических свойств, которые делают их привлекательными для использования в диагностических и терапевтических целях. Так, ослабление рентгеновских лучей с помощью наночастиц золота привело к их использованию в компьютерной томографии и в качестве адъювантов для лучевой терапии [4]. Кроме того, НЧЗ обладают потенциалом для их применения в таких областях биомедицины, как адресная доставка лекарственных средств, генная терапия, иммобилизация ферментов, создание диагностикумов, биодатчиков и биочипов [3, 4, 6].

Однако, несмотря на то, что ядро наночастиц золота считается инертным и биосовместимым, мы все еще далеки от прогнозирования того, какой эффект оказывают наночастицы золота на биологические системы. Использование клеточных культур при изучении данной проблемы позволяет в относительно короткие сроки получить предварительную информацию о специфическом действии тестируемых наночастиц. В то же время такие краткосрочные эксперименты (4—24 часа) зачастую не являются достаточными для обнаружения отдаленных последствий, которые могут повлиять на основные биологические параметры клеток. Также упускается из виду и вопрос об обратимости нарушений клеточных функций после удаления инородного компонента (в данном случае, наночастиц). Кроме того, основное направление большинства исследований сводится к выявлению неблагоприятного воздействия НЧЗ на биообъекты, но при этом не учитываются адаптационные механизмы как организма в целом, так и клетки, позволяющие им приспосабливаться к возмущениям гомеостаза.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение ответной реакции нескольких клеточных линий на коллоидное золото 5 нм в различные сроки экспозиции, включая восстановительный период.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Наночастицы золота. Наночастицы золота (НЧЗ) диаметром 5 нм были получены методом восстановления золотохлористоводородной кислоты одновременно натриевой солью ЭДТА и борогидридом натрия в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов) [1]. Концентрация 5 нм частиц золота составила 7 × 10¹³ в 1 мл [7]. Определение размеров наночастиц и их концентрация проводилась с помощью анализатора размера частиц «ZetaSizer» и электронного трансмиссионного микроскопа «Libra-120».

Культуры клеток. Исследование проводилось на 4 монослойных клеточных линиях: HuH, Vero, 3T3 и А549,

Beethuk Bonr (* MV)=

которые были любезно предоставлены Институтом Белка РАН (г. Пущино).

Клетки Vero и 3T3 культивировались на среде DMEM/F12 (ПанЭко), а HuH и A549 на среде Игла с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки («РАА», ПанЭко), а также глутамина и пенициллин-стрептомицина (ПанЭко).

Культуральные флаконы (75 см³) с клетками инкубировали в CO₂-инкубаторе при концентрации CO₂ 5%-й, температуре 37 °C и относительной влажности не менее 90 %. К моменту, когда конфлюэнтность клеток приближалась к 90—95 %, их снимали со дна флакона и суспендировали в соответствующей питательной среде до достижения концентрации от 1—2 × 10⁵ до 6—8 × 10⁵ в зависимости от клеточной линии.

Для постановки цитотоксических тестов 100 мкл клеточной суспензии рассевали в 96-луночные планшеты из расчета 4—6 \times 10⁴ клеток на лунку.

Через 24 часа, в течение которых клетки подращивались и прикреплялись к дну лунок, проводили замену среды (100 мкл) и добавляли по 100 мкл НЧЗ исследуемых концентраций. Соотношение питательной среды к НЧЗ составляло 1:1 — максимально возможное разведение.

Через 4, 24 и 48 часов после внесения НЧЗ отбирали аликвоты надосадочной жидкости и переносили в чистые планшеты для определения активности ферментов. Оставшиеся планшеты с клетками использовали для постановки цитотоксического теста. По истечении 48-часового периода инкубации клеточных линий с НЧЗ производили замену питательной среды, содержащей наночастицы, на чистую среду и культивировали еще 24 часа. Затем проводили аналогичные измерения активности ферментов и показатели жизнеспособности клеток.

Все эксперименты с культурами клеток проводились в шестикратных повторах с отрицательными и положительными контролями.

Определение лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы в культуральной среде. Изменения метаболического состояния клеток оценивали по следующим показателям: активность в среде инкубации цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), который использован как маркер целостности клеточной мембраны; активность в среде инкубации кислой фосфатазы (КФ) в качестве маркера активации лизосомального аппарата клеток.

Для определения активности ЛДГ и КФ были использованы биохимические наборы фирмы ВИТАЛ, модифицированные для планшетного анализатора.

Измерение активности ферментов проводили на многофункциональном планшетном фотометре SYNERGYHTX (BioTek) с использованием стандартов и калибровочных графиков. Активность ферментов рассчитывалась в Ед/мл инкубационной среды с помощью программsGEN5 (BioTek).

LEVE/DEAD Tecm. Использование классических цитотоксических тестов (МТТ-анализ и тест с Нейтральным красным) для тестирования наночастиц, по сообщениям ряда авторов, лимитировано их необычными физико-химическими свойствами. В первую очередь, это связано с их окислительно-восстановительным потенциалом (образование свободных радикалов и супероксидов), что может повлиять на точность результатов [7]. Поэтому в качестве современного альтернативного метода определения индекса цитотоксичности был использован флуоресцентный тест LEVE/DEAD (MolecularProbes). В состав набора входят 2 флуоресцентные метки: ацетоксиметиловый кальцеин (АМ) — маркер живых клеток и этидия гомодер (EtD) — индикатор мертвых или поврежденных клеток.

Все манипуляции с клетками и постановка теста проводились согласно инструкции производителя. Для измерения флуоресценции был использован многофункциональный планшетный фотометр SYNERGYHTX (BioTek). Расчет процентного содержание живых (AM) и мертвых (EtD) клеток проводился с помощью программ sGEN5 (BioTek). Помимо расчетов, рекомендованных производителем, мы рассчитывали отношение AM/EtD. По нашим данным, отношение количества живых клеток к мертвым оказалось наиболее информативным. Так, отношение АМ/ EtD = 1 свидетельствовало о том, что на 1 живую клетку приходилась 1 мертвая, то есть этот показатель соответствовал LC50 и коррелировал (с небольшими отклонениями) с результатами подсчета количества погибших клеток с использованием трипанового синего (данные не представлены).

Статистического анализа использовались программы Microsoft Excel и STATISTIKA. Для биохимического исследования рассчитывались параметры среднего арифметического значения. Сравнения между контрольной и экспериментальными группами проводили с помощью непараметрического анализа с использованием критерия Манна-Уитни. Статистически достоверными считались результаты при *p* ≤ 0,02.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование активности кислой фосфатазы в культуральной среде всех клеточных линий в первый срок инкубации их с наночастицами золота (4 часа) показало практически линейную зависимость в соотношении доза-эффект (табл. 1). Второй небольшой всплеск активности кислой фосфатазы наблюдали через 48 часов после добавления в инкубационную среду наночастиц золота в концентрациях 28,5 мкг/мл и 57 мкг/мл. Активность фермента через 24 часа после удаления НЧЗ в опытных группах не отличалась от контрольных значений.



Исследование активности ЛДГ показало, что наибольшее влияние на проницаемость мембран клеток оказывало содержание 5 нм коллоидного золота в питательной среде в максимальной концентрации (57 мкг/мл). Так, клеточные линии 3Т3 и А549 демонстрировали повышенный уровень ЛДГ в среде вплоть до удаления НЧЗ. В то время как для культур клеток Vero и HuH этот эффект носил отсроченный характер и проявлялся через 24 часа после добавления НЧЗ. Следует отметить, что культивирование клеточной линии Vero в восстановительный период сопровождалось снижением активности ЛДГ в ростовой среде (табл. 2).

Результаты флуоресцентного LIVE/DEAD теста показали, что наиболее чувствительной к воздействию наночастиц золота в первые сроки эксперимента оказалась клеточная линия А549. В остальных случаях процент погибших клеток не превышал 10—15 даже в группах, содержащих наибольшую концентрацию частиц, а пролиферативная активность оставалась на уровне контрольных значений. Об этом же свидетельствовал и показатель AM/EtD (рис., первый ряд).

По истечении 48 часов совместной экспозиции НЧЗ с клеточными линиями всех типов было обнаружено значительное снижение процента живых клеток. При этом в отдельных эпизодах отношение AM/ EtD было меньше двух условных единиц, что практически приравнивалось к значению LC50 (рис., второй ряд).

Таблица 1

Активность КФ (мЕД/мл) в питательной среде в различные сроки экспозиции культур клеток с 5 нм коллоидным золотом

Культура	Концентрация НЧЗ						
клеток/срок	Контроль	5,7 мкг/мл	11,4 мкг/мл	28,5 мкг/мл	57,0 мкг/мл		
3T3/4h	0,035 ± 0,014	0,066 ± 0,035	0,087 ± 0,021	0,16 ± 0,018	0,261 ± 0,021		
3T3/24h	0,205 ± 0,063	0,208 ± 0,063	0,257 ± 0,033	0,236 ± 0,078	0,330 ± 0,071		
3T3/48h	0,306 ± 0,053	0,368 ± 0,091	0,379 ± 0,087	0,438 ± 0,116	0,635 ± 0,076		
3T3/48+24h	0,691 ± 0,116	0,847 ± 0,069	0,931 ± 0,086	0,802 ± 0,052	0,795 ± 0,035		
HuH/4h	0,059 ± 0,031	0,09 ± 0,008	0,097 ± 0,020	0,143 ± 0,013	0,233 ± 0,024		
HuH/24h	0,281 ± 0,107	0,247 ± 0,048	0,271 ± 0,061	0,281 ± 0,035	0,382 ± 0,062		
HuH/48h	0,323 ± 0,069	0,320 ± 0,036	0,271 ± 0,024	0,344 ± 0,052	0,472 ± 0,026		
HuH/48+24h	0,330 ± 0,074	0,337 ± 0,04	0,334 ± 0,049	0,250 ± 0,065	0,375 ± 0,086		
Vero/4h	0,035 ± 0,008	0,115 ± 0,031	0,153 ± 0,023	0,174 ± 0,024	0,282 ± 0,013		
Vero/24h	0,302 ± 0,094	0,292 ± 0,036	0,445 ± 0,176	0,535 ± 0,449	0,511 ± 0,029		
Vero/48h	0,496 ± 0,069	0,469 ± 0,024	0,511 ± 0,031	0,632 ± 0,054	0,841 ± 0,072		
Vero/48+24h	0,882 ± 0,074	1,389 ± 0,625	1,129 ± 0,101	1,177 ± 0,236	0,99 ± 0,15		
A549/4h	0,032 ± 0,007	0,059 ± 0,017	0,076 ± 0,014	0,118 ± 0,018	0,247 ± 0,04		
A549/24h	0,083 ± 0,025	0,07 ± 0,025	0,104 ± 0,033	0,195 ± 0,025	0,271 ± 0,057		
A549/48h	0,483 ± 0,021	0,577 ± 0,087	0,629 ± 0,15	0,688 ± 0,136	0,910 ± 0,14		
A549/48+24h	0,379 ± 0,108	0,354 ± 0,043	0,375 ± 0,038	0,299 ± 0,008	0,368 ± 0,029		

Таблица 2

Активность ЛДГ в надосадочной жидкости в различные сроки экспозиции культур клеток с 5 нм коллоидным золотом

Культура	Группа					
клеток/срок	Контроль	5,7 мкг/мл	11,4 мкг/мл	28,5 мкг/мл	57,0 мкг/мл	
3T3/4h	1,214 ± 0,810	1,821 ± 1,019	4,553 ± 2,322	8,5 ± 3,135	15,381 ± 4,72	
3T3/24h	2,631 ± 1,382	2,226 ± 1,382	3,036 ± 0,775	4,25 ± 3,056	13,762 ± 2,383	
3T3/48h	6,881 ± 5,550	8,297 ± 3,702	2,429 ± 1,749	5,262 ± 3,135	16,19 ± 2,383	
3T3/48+24h	6,78 ± 6,74	9,107 ± 8,422	16,797 ± 11,067	10,119 ± 7,608	6,172 ± 5,961	
HuH/4h	1,356 ± 0,734	1,72 ± 0,834	1,429 ± 1,238	6,678 ± 2,755	14,166 ± 1,045	
HuH/24h	$4,29 \pm 4,050$	16,797 ± 13,964	12,952 ± 6,476	20,035 ± 9,072	24,69 ± 1,927	
HuH/48h	12,547 ± 10,668	6,375 ± 3,686	5,869 ± 2,675	9,512 ± 3,263	16,392 ± 1,382	
HuH/48+24h	16,19 ± 3,797	9,714 ± 5,162	13,053 ± 12,534	10,119 ± 6,948	11,738 ± 5,781	
Vero/4h	11,738 ± 4,650	7,286 ± 4,334	5,059 ± 4,737	6,881 ± 0,467	17,202 ± 1,532	
Vero/24h	11,94 ± 7,576	13,154 ± 7,719	9,107 ± 4,737	19,226 ± 7,069	38,047 ± 11,275	
Vero/48h	1,761 ± 1,534	13,154 ± 7,007	9,006 ± 7,213	12,547 ± 7,073	20,845 ± 3,263	
Vero/48+24h	15,988 ± 7,775	15,988 ± 9,333	8,5 ± 3,402?	6,881 ± 2,765?	4,958 ± 3,656?	
A549/4h	1,821 ± 0,405	1,417 ± 1,214	3,036 ± 1,669	4,25 ± 3,394	15,583 ± 1,382	
A549/24h	5,869 ± 3,263	5,262 ± 4,206	16,595 ± 16,424	9,714 ± 5,647	12,952 ± 1,145	
A549/48h	1,72 ± 1,06	1,595 ± 0,908	3,167 ± 1,909	6,071 ± 2,037	13,154 ± 2,417	
A549/48+24h	2,631 ± 1,382	3,643 ± 1,927	3,44 ± 2,417	6,476 ± 5,949	8,905 ± 7,959	

Beethuk Boar (* MV)

Восстановительный период после удаления наночастиц характеризовался увеличением процентного содержания живых клеток. В то же время самый незначительный прирост наблюдался в тех группах клеток, которые культивировались с исходной концентрацией НЧЗ — 57 мкг/мл (рис., третий ряд).

Сам факт проникновения НЧЗ в внутрь клетки с помощью фагоцитоза или через клатрин-опосредованный механизм эндоцитоза давно описан в научной литературе и не подвергается сомнениям [5]. В нашем эксперименте значительное повышение активности кислой фосфатазы в первые сроки эксперимента свидетельствовало об интернализации НЧЗ во внутреннюю среду клеток и активации их лизосомального аппарата. Второй пик повышения активности кислой фосфатазы через 48 часов мог быть сопряжен с повторным рециклингом наночастиц из клетки в питательный раствор и обратно, в цитоплазму клеток.

По результатам нашего исследования присутствие наночастиц золота в культуральной среде сопровождалось повреждением мембран клеток, в результате чего в надосадочной жидкости наблюдалось увеличение активности ЛДГ. При этом резистентность компонентов клеточной мембраны различных клеточных линий к воздействию наночастиц была вариативной. В то же время отмечался дозозависимый эффект: наибольший урон для клеток отмечался при их совместном культивировании с исходной концентрацией НЧЗ (57 мкг/мл), что может связано с их повышенной адсорбцией на поверхности клеток большого количества частиц из раствора.

Результаты LIVE/DEADтеста, в свою очередь, продемонстрировали, что цитотоксический эффект зависел не столько от концентрации НЧЗ в культуральной среде, сколько от времени воздействия, то есть длительное нахождение наночастиц золота в ростовой среде оказывало прямое негативное воздействие на культуры клеток. При этом сопоставление биохимических и цитотоксических данных показало, что в большинстве случаев активность ЛДГ значительно превалировала над процентным соотношением погибших клеток (результаты не представлены). Такое расхождение могло быть обусловлено перестройкой энергетического обмена клетки и, как следствие, увеличением активности всего изоферментного спектра ЛДГ, свойственного для каждого вида клеточной линии. Косвенным образом это подтверждали результаты, полученные в восстановительный период, когда, несмотря на большое количество погибших клеток в популяции, уровень активности ЛДГ возвращался к исходным значениям, а иногда и снижался как в случае с культурой Vero.

Наблюдаемые нами явления по своей сути являлись нормальной биологической реакцией живой системы в ответ на поступление инородного вещества. Результаты нашего эксперимента продемонстрировали, что удаление раздражающего фактора приводило к восстановлению функциональных свойства клеток. К аналогичным выводам пришла и группа ученых [5], которая показала, что скорость восстановления клеток после их совместной экспозиции с НЧЗ зависела от размера, концентрации и времени воздействия наночастиц. Поэтому, несмотря на то, что отдельные клетки в силу своей изолированности от целостного организма обладают ограниченным набором адаптивных реакцией, даже столь урезанные возможности помогают им приспосабливаться к воздействию наночастиц.



Рис. Графическое отображение данных цитотоксического теста LIVE/DEAD.

В столбчатой диаграмме указано процентное содержание живых (AM) и мертвых клеток (EtD), а на графике — отношение живых клеток к мертвым (AM/EtD) выражено в условных единицах

Beethuk Boar(TMV)=

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что негативное влияние наночастиц золота со средним диаметром 5 нм на клеточные системы носило обратимый характер. При этом наблюдаемые изменения были обусловлены, в большинстве случаев, включением адаптивных механизмов клеток, задействованных в компенсации повреждающего действия НЧЗ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богатырев В. А., Дыкман Л. А., Щеголев С. Ю. // Патент РФ № 2013374, 1994.

2. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы: синтез свойства, биомедицинское применение. — М.: Наука, 2008. 3. Chandra P., Das D., Wahab A. A. // Digest Journal of nanomedicine and biostructures. — 2010. — Vol. 5 (2). — P. 363—367.

4. *Mieszawska A. J., Mulder W. J. M., Fayad Z. A., et al //* Mol Pharm. — 2013. — March. — Vol. 10 (3). — P. 831—847.

5. Mironava T., Hadjiargyrou M., Simon M., Jurukovski V., et al. // Nanotoxicology. — 2010. — Vol. 4 (1). — P. 120—137.

6. *Pissuwan D., Niidome T., Cortie M. B. //* Journal of Controlled Release. — 2011. — Vol. 149 (1). — P. 65—71. 7. *Wang S., Yu H., WickliffeJ. K. //* ToxicologyinVitro. — 2011. — Vol. 25 (8). — P. 2147—2151.

Контактная информация

Великородная Юлия Ивановна — научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ФГУП Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии ФМБА России, e-mail: alta-u@mail.ru