

Полимер-стабилизированные магнитные наночастицы не оказывают токсического воздействия на магнитно - функционализированные клетки

М.Р. Дзамукова ¹, Е.А. Науменко ¹, Е.Ю. Закирова ², Р.А. Дзамуков ³, П.А. Шилягин ⁴,
О.Н. Ильинская ¹, Р.Ф. Фахруллин ¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

² Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

³ Республиканская клиническая больница, Казань

⁴ Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Polymer-stabilised magnetic nanoparticles do not affect the viability of magnetically-functionalised cells

M.R. Dзамukova ¹, E.A. Naumenko ¹, E.Y. Zakirova ², R.A. Dзамukov ³, P.A. Shilyagin ⁴, O.N. Ilinskaya ¹, R.F. Fakhrullin ¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

² Federal Center of Toxicological, Radiological and Biological Safety, Kazan

³ Republican Clinical Hospital, Kazan

⁴ Institute of Applied Physics RAS, Nizhny Novgorod

В работе проведён синтез суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, стабилизированных полиаллиламином гидрохлоридом, с целью их использования для модификации клеточной поверхности. Магнетизация клеток лёгкого эмбриона коровы не влияла на их жизнеспособность, формирование монослоя и пролиферативную активность, что было подтверждено с применением флуоресцентной и светлоразночной микроскопии, проточной цитометрии и теста с бромидом метилтиазолтетразолия. Модифицированные клетки проявляли способность к перемещению под действием постоянного магнитного поля. Описанный одностадийный метод модификации клеточной поверхности является принципиально новым и перспективным подходом к функционализации клеток млекопитающих в клеточной терапии для адресной доставки клеток в орган-мишень и тканевой инженерии для пространственной организации клеток.

Ключевые слова: суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, цитотоксичность, клетки лёгкого эмбриона коровы).

Одним из перспективных направлений инженерии клеточной поверхности является получение магнитно-восприимчивых клеток. В связи с этим в биомедицинских исследованиях интенсивно разрабатываются методы по модификации культивируемых клеток наночастицами оксида железа. Магнитные наночастицы (МНЧ) могут найти применение в тканевой инженерии, для неинвазивной визуализации меченых клеток при помощи магнитно-резонансной томографии, а также для повышения эффективности доставки лекарств и для лечения онкологических заболеваний путем магнитной гипертермии [1, 2]. Недавние клинические испытания демонстрируют возможность отслеживания перемещения и распределения введенных магнитно-модифицированных клеток в теле человека [3]. Поскольку интерес к использованию наночастиц оксида железа в последнее время возрастает, то проблема нехватки информации об их взаимодействии с клеткой становится всё более острой [4].

Here we report the synthesis of (poly)allylamine-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for the surface modification of living cells. Magnetic functionalisation of cow embryonic lung cells did not affect the viability of the coated cells, confluent monolayer formation and proliferation, as demonstrated using fluorescence and white light microscopy, flow cytometry and MTT assay. Functionalised cells were magnetically responsive. We believe that the single-step approach described here is a novel and potentially promising way to functionalise mammal cells with magnetic nanoparticles for the subsequent applications in cell therapy, directed cells delivery and spatial positioning in tissue engineering.

Key words: iron oxide superparamagnetic nanoparticles, cytotoxicity, cow embryonic lung cells.

Опубликованные результаты исследований по изучению потенциально токсичного воздействия наночастиц оксида железа на клетки противоречивы. Вероятно, это связано с характером использования наночастиц, что осуществляется либо путем нанесения МНЧ на поверхность клетки [5], либо внедрением их в цитоплазму [6]. Ранее, несколькими группами было установлено, что высокая концентрация МНЧ внутри клеток угнетает их пролиферативную активность [7, 8]. Более того, показано, что в присутствии лизосом в клетке некоторые типы частиц разрушаются, что снижает их эффективность в магнитно-резонансной томографии [6]. Кроме того, постепенная деградация наночастиц в клетке может сказываться на ее метаболизме и приводить к неконтролируемым последствиям. Таким образом, оптимальным способом модификации клетки является присоединение наночастиц к ее поверхности, без нарушения целостности мембраны.

e-mail: biosensor@bk.ru

В данном исследовании использовали суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (МНЧ), стабилизированные полиаллиламин гидрохлоридом (РАН). Данный полимер придавал наночастицам положительный заряд и препятствовал их агрегации. Положительный заряд необходим для эффективной адсорбции наночастиц на отрицательно заряженной поверхности клетки. В работе использовали культивируемые клетки легкого эмбриона коровы (ЛЭК). Показано, что магнитная модификация при помощи МНЧ является эффективной, но при этом незначительно сказывается на способности к росту и делению функционализированных клеток.

Материал и методы

Получение и характеристика МНЧ. Детально процедура синтеза наночастиц описана ранее [5]. Полученный коллоидный раствор наночастиц фильтровали с помощью шприцевых полимерных фильтров фирмы Millipore с размером пор 220 нм. Гидродинамический диаметр частиц и дзета-потенциал определяли с использованием анализатора Malvern Zetasizer Nano ZS.

Культура клеток. Клетки ЛЭК, полученные из лаборатории клеточных культур и гибридной технологии Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности (г. Казань), культивировали (37°C, 5% CO₂) в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, Италия) с глутамином, с добавлением 10% инактивированной фетальной телячьей сыворотки и раствора пенициллина/стрептомицина (100 ед. мл⁻¹/100 мг мл⁻¹). Клетки выращивали до 80-90% конфлюентности монослоя, удаляли ростовую среду, промывали фосфатно-солевым буфером Дюльбекко (ДФСБ) трипсинизировали 0,25% раствором трипсина-ЭДТА (Sigma, США), центрифугировали при 500 g и ресуспендировали в ДФСБ.

Функционализация клеток ЛЭК МНЧ. Клетки ЛЭК (5×10⁵ мл⁻¹) смешивали со стерильной суспензией МНЧ (0,0125 мг мл⁻¹; 0,025 мг мл⁻¹; 0,05 мг мл⁻¹) в 0,15 М NaCl. После инкубации в течение 3 мин с МНЧ клетки центрифугировали для удаления избытка МНЧ.

Определение жизнеспособности клеток. Ферментативную активность intactных и МНЧ-функционализированных клеток ЛЭК определяли с использованием диацетата флуоресцеина (ФДА) [9]. Флуоресцентная микроскопия применялась для оценки жизнеспособности окрашенных образцов. Проточный цитометр BD FACSCanto (Biosciences) использовали для количественного определения жизнеспособности ФДА-окрашенных клеток. Экспериментальные данные анализировали при помощи программного обеспечения FACSDiva.

Для определения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Суспензию клеток ЛЭК (7000 клеток в 200 мкл среды на лунку) разливали в 96-луночные плоскодонные планшеты, 8 лунок оставляли пустыми в качестве контроля, инкубировали 18 ч (37°C, 5% CO₂), добавляли 20 мкл МТТ-реagenta (5 мг/мл ДФСБ) и инкубировали 4 ч для метаболизации МТТ. Оптическую плотность измеряли при 560 нм на планшетном фотометре iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad Laboratories, США). Оптическая плотность лизата коррелирует с количеством живых клеток.

Скорость роста и характер формирования монослоя наблюдали в процессе культивирования функционализированных и intactных клеток при помощи инвертированного микроскопа (Микромед, Россия). Изображения были получены с использованием программы Scope Photo. Оптические и флуоресцентные микрофотографии были получены при помощи прямого микроскопа Carl Zeiss AxioScope A1 с использованием программы AxioVision.

Все эксперименты проведены как минимум в трех повторях, данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение.

Результаты

На первом этапе исследования были синтезированы стабилизированные полиаллиламин-гидрохлоридом (РАН) положительно-заряженные МНЧ. Процесс синтеза основан на преципитации ионов Fe²⁺ с Fe³⁺ в щелочной среде и приводит к формированию сферических частиц оксида железа. Поликатион использовали для стабилизации слабо стабильных в воде наночастиц оксида железа и обеспечения их положительно заряженной поверхностью.

Гидродинамический диаметр МНЧ в воде составил около 90 нм. Стабилизация при помощи РАН придавала МНЧ положительный дзета-потенциал 38±7 мВ.

Для магнитной функционализации катионными МНЧ использовали клетки ЛЭК. Клетки ЛЭК обладают слабо отрицательным поверхностным зарядом (дзета-потенциал -22±3 мВ), поэтому катионные МНЧ эффективно присоединяются к клеточной мембране (рис. 1).

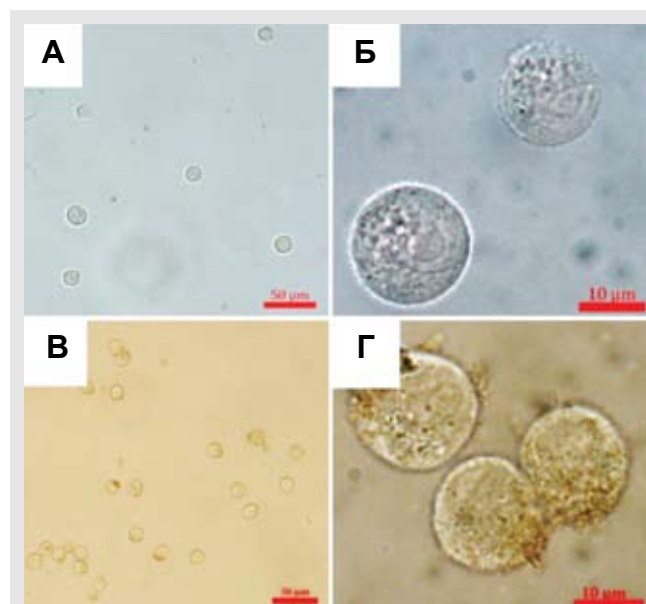


Рис. 1. Клетки ЛЭК:
А, Б – intactные клетки;
В, Г – МНЧ-функционализированные клетки.
Характерная коричневая окраска клеток свидетельствует о присутствии МНЧ.
Световая микроскопия

Оптическая микроскопия показала, что клетки покрыты однородным слоем МНЧ, при этом клетки приобретали коричневую окраску. Наблюдалась прямо пропорциональная зависимость между интенсивностью окраски и концентрацией вводимых МНЧ (рис. 2). При максимальной исследуемой концентрации ($0,05 \text{ мг/мл}^{-1}$) на одну клетку в среднем приходилось 10^{-7} мг МНЧ. При этом магнитные свойства функционализированные клетки ЛЭК приобретали уже при минимальной концентрации ($0,0125 \text{ мг/мл}^{-1}$), когда на одну клетку приходилось примерно $0,5 \times 10^{-7} \text{ мг}$ МНЧ. При помощи постоянного магнита их можно было концентрировать из суспензии у стенки сосуда. Скорость перемещения и концентрация клеток около магнита отличались в зависимости от количества МНЧ на клетке. Наибольшая скорость перемещения клеток под действием постоянного магнитного поля наблюдалась у клеток с наибольшим количеством МНЧ на их поверхности (10^{-7} мг). Так, для концентрации максимально-магнетизированных клеток у стенки сосуда при помощи магнита требовалось около 60 с, а для клеток, на которые в среднем приходилось по $0,5 \times 10^{-7} \text{ мг}$ МНЧ затрачивалось 80 с, тогда как при $0,25 \times 10^{-7} \text{ мг}$ МНЧ на поверхности каждой клетки нужно было около 100 с. Следует отметить, что клетки можно было перемещать при помощи магнита вдоль стенки сосуда.



Рис. 2. Минипробирки с функционализированными клетками ЛЭК, сконцентрированные под действием постоянного магнита. Интактные клетки остаются в суспензии (1), магнетизированные концентрируются со стороны поднесения магнита. Наблюдается зависимость между интенсивностью окраски клеток и концентрацией вводимых МНЧ (2–4)

Для исследования влияния МНЧ на внутриклеточные ферменты, использовали ФДА-тест [10]. Нефлуоресцирующий ФДА проходит через мембрану, где он подвергается ферментативному гидролизу при помощи внутриклеточных эстераз и окрашивает только живые клетки, тогда как в мертвых клетках эстеразы инактивированы, а повреждение мембран препятствует накоплению флуоресцентного красителя внутри цитоплазмы. При помощи флуоресцентной микроскопии было проведено качественное исследование влияния МНЧ на внутриклеточные ферменты. Различий между интактными клетками и МНЧ-функционализированными отмечено не было (рис. 3).

Проточная цитометрия была использована для количественной оценки воздействия различных концентраций МНЧ на жизнеспособность клеток. Как показано на рис. 4, в контрольном образце жизнеспособность клеток составляла 98%, что сравнимо с жизнеспособностью в опытных образцах при концентрациях МНЧ $0,0125 \text{ мг/мл}^{-1}$; $0,025 \text{ мг/мл}^{-1}$; $0,05 \text{ мг/мл}^{-1}$: 94, 95 и 96%, соответственно.

Для оценки цитотоксичности МНЧ по отношению к функционализированным клеткам был проведен МТТ-тест (рис. 5), результаты которого свидетельствовали об отсутствии значимого различия между контрольными и опытными образцами.

Также было установлено, что МНЧ-покрытые клетки не только сохраняют жизнеспособность, но также способны к росту и пролиферации. Как показано на рис. 6А, через 48 ч инкубации магнетизированные и интактные клетки пролиферировали с одинаковой скоростью, при этом наблюдалось незначительное отставание в варианте с наибольшей концентрацией МНЧ ($0,05 \text{ мг/мл}^{-1}$). Однако через 72 ч культивирования площадь заполнения лунки во всех вариантах была примерно одинаковой и составляла около 95% (рис. 6Б).

В основе одноэтапного способа магнитной модификации, описанного в данной работе, лежит электростатическое взаимодействие биосовместимых полимер-стабилизированных суперпарамагнитных МНЧ с поверхностью клеток. Следует подчеркнуть, что присоединение наночастиц не требует высоко-специфичного лиганд-рецепторного взаимодействия МНЧ с мембраной клеток [11], что потенциально делает разработанный метод универсальным по отношению ко всем клеткам млекопитающих.

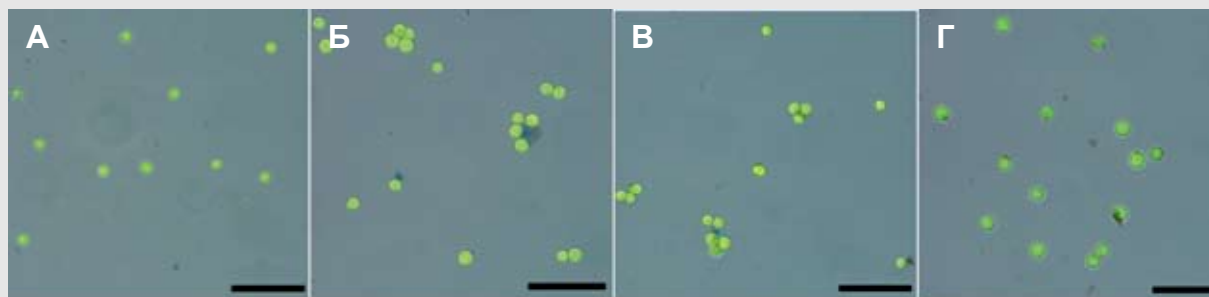


Рис. 3. Клетки ЛЭК, окрашенные ФДА: А – концентрация МНЧ 0 мг/мл (контроль); Б – $0,0125 \text{ мг/мл}$; В – $0,025 \text{ мг/мл}$; Г – $0,05 \text{ мг/мл}$. Совмещение светлого поля и флуоресценции; масштабная линейка – 100 мкм

Кроме того, данный прямой метод магнитной функционализации не требует предварительного последовательного нанесения на клетку полимерных слоев [12] и позволяет непосредственно покрывать поверхность клетки полимер-стабилизированными наночастицами, что также уменьшает возможное токсическое воздействие.

Таким образом, отсутствие токсического эффекта РАН-стабилизированных МНЧ на клетки млекопитающих открывает перспективы их применения в биомедицинских манипуляциях, а именно в клеточной терапии для адресной доставки клеток, а также в тканевой инженерии, для пространственной организации клеток в создаваемой *in vitro* ткани.

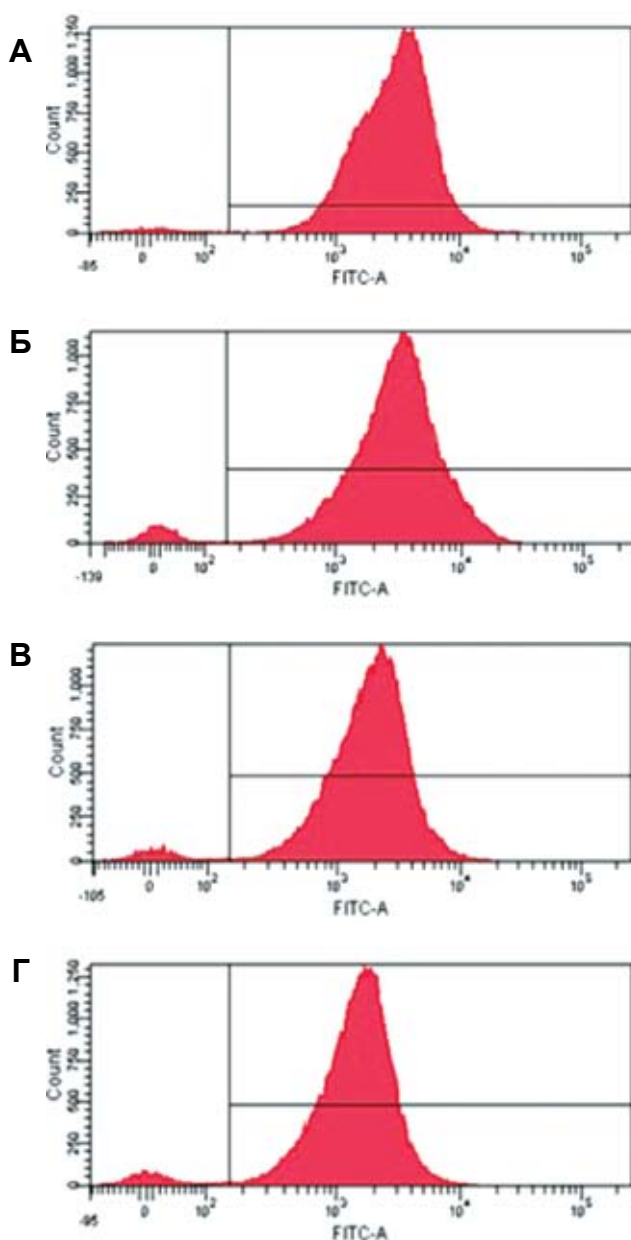


Рис. 4. Проточная цитометрия клеток ЛЭК, окрашенных ФДА:
А – концентрация МНЧ 0 мг/мл (контроль);
Б – 0,0125 мг/мл;
В – 0,025 мг/мл;
Г – 0,05 мг/мл

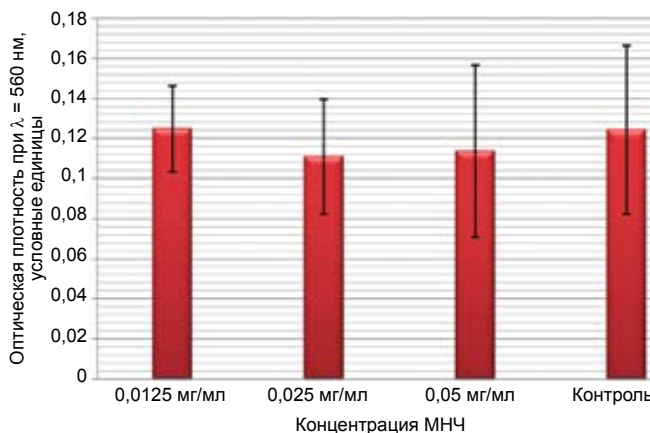


Рис. 5. Цитотоксическое действие МНЧ на клетки ЛЭК (МТТ-тест).
Снижение оптической плотности пропорционально уменьшению количества живых клеток

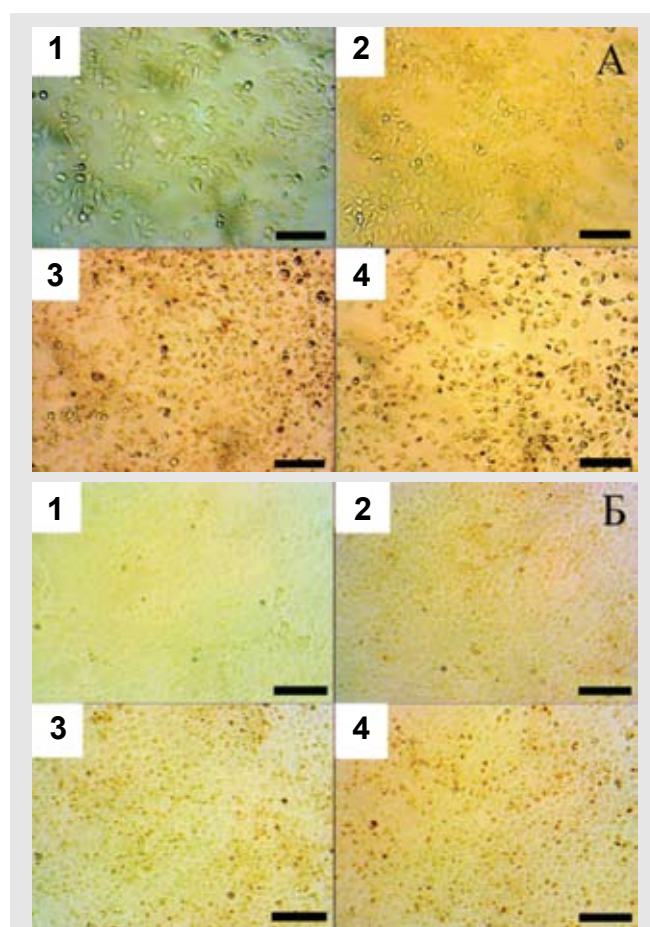


Рис. 6. Культуры intactных и магнетизированных клеток ЛЭК через 48 ч (А) и 72 ч (Б) культивирования:
1 – концентрация МНЧ 0 мг/мл (контроль);
2 – 0,0125 мг/мл;
3 – 0,025 мг/мл;
4 – 0,05 мг/мл.
Масштабная линейка – 200 мкм

Заключение

Таким образом, в работе впервые детально исследовано влияние РАН-стабилизированных суперпарамагнитных наночастиц оксида железа на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток млекопитающих, а именно клетки ЛЭК. Установлено, что МНЧ не оказывают значительного токсического эффекта на модифицируемые клетки в исследованных концентрациях. Магнитно-модифицированные клетки сохраняли не только жизнеспособность, но и способность к активной пролиферации. При этом скорость роста модифицированных клеток практически не отличалась от скорости роста интактных клеток. Таким образом, для получения модифициро-

ванных клеток с наиболее ярко выраженными магнитными свойствами целесообразно использовать наибольшую концентрацию МНЧ.

Благодарности

Авторы выражают благодарность доценту кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета Зеленихину Павлу Валерьевичу за помощь при проведении проточной цитометрии. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (проект № 2012-1.4-12-000-1001-7644).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Duguet E., Vasseur S., Mornet S et al. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine* 2006; 2: 157–68.
2. Gupta A.K., Naregalkar R.R., Vaidya V.D. et al. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine* 2007; 2: 23–39.
3. Jennifer M.J., Richards M.D. Catherine A.S et al. In Vivo mononuclear cell tracking using superparamagnetic particles of iron oxide. *Circ. Cardiovasc. Imaging*. 2012; 5: 509–17.
4. L'azou B., Jorly J., On D. et al. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Part Fibre Toxicol.* 2008; 19: 5–22.
5. Dзамукова М.Р., Замалева А.И., Ишмухаметова Д.Г. et al. A direct technique for magnetic functionalization of living human cells. *Langmuir* 2011; 27: 14386–93.
6. Xie J., Wang G., Niu J. and et. al. Human serum albumin coated iron oxide nanoparticles for efficient cell labeling. *Chem. Commun.* 2010; 46: 433–35.
7. Hu F., Neoh K., Cen L. et al. Cellular response to magnetic nanoparticles "PEGylated" via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules* 2006; 7: 809–16.
8. Soenen S.J., Illyes E., Vercauteren D. et al. The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. *Biomaterials* 2009; 30: 6803–13.
9. Medley C.D., Bamrungsap S., Tan W. et al. Aptamer-conjugated nanoparticles for cancer cell detection. *Anal. Chem.* 2011; 624: 727–34.
10. Breeuwer P., Drocourt J.L., Bunschoten N. et al. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61:1614–19.
11. Creixell M., Herrera A.P., Ayala V. et al. Preparation of EGF conjugated magnetic nanoparticles and their internalization into EGFR overexpressing cancer cells. *Magn. Magn. Mater.* 2010; 322: 2244–50.
12. Fakhruddin R. F., Garcia-Alonso J., Paunov V.N. A direct technique for preparation of magnetically functionalised living yeast cell. *Soft Matter.* 2010; 6: 391–97.

Поступила 14.08.2012