

УДК: 615.322; 576.08

Исследования токсичности нанодисперсий сферических аморфных наночастиц из тритерпеноидов бересты *in vitro**

Игнашкова Т.И.¹, Миронова С.О.², Гаврилова Л.А.², Московцев А.А.¹, Каплун А.П.^{1,2}, Юркин В.А.¹, Швец В.И.¹, Кубатиев А.А.¹

¹ — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86

Сферические аморфные наночастицы из тритерпеноидов бересты, перспективные носители гидрофобных субстанций, исследовались на токсичность на двух типах клеток HeLa и Jurkat. Указанные наночастицы не проявляют цитотоксических эффектов в исследуемых концентрациях (до 512 мкг/мл).

Ключевые слова: гемолитическая активность, МТТ-тест, сферические аморфные наночастицы, проточная цитофлуориметрия, цитотоксичность, HeLa, Jurkat

Введение

Бурное развитие нанотехнологий ставит на повестку дня вопрос о безопасности нанотехнологической продукции для здоровья человека. В наноразмерном состоянии многие вещества приобретают новые свойства и становятся в биологическом отношении весьма активными. Это, с одной стороны, открывает новые возможности использования наноматериалов в области биомедицины, фармакологии, производстве продуктов питания, при решении экологических и сельскохозяйственных проблем. Но с другой стороны, высокая биологическая активность наночастиц несет в себе риски токсических эффектов [10].

В МИТХТ разработан метод получения сферических аморфных наночастиц (САНЧ) из тритерпеноидов бересты [6]. Дисперсия САНЧ показала себя как эффективный адъювант [2, 3]. Целью настоящей работы было изучение токсичности *in vitro* дисперсии САНЧ.

Методика

Березовый экстракт сухой (БЭС) предоставлен ООО «Березовый мир». В качестве флуоресцентных зондов и красителей использовали: 3-метоксибензантрон, МБА (Sigma-Aldrich®, США), трипановый синий (ТВ), пропилий йодид (PI), флуоресцеин диацетат (FDA), 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFDA), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид МТТ (Invitrogen™, США), нейтральный красный (NR). Остальные реактивы и растворители были приобретены в Химмед (Россия) и соответствуют квалификации чда или хч.

Использовались следующие приборы: автоматический счетчик клеток Countess™ (Invitrogen™, США), анализатор Plate Chameleon (Multilabel Detection Platform) (Hidex, Финляндия), проточный цитофлуориметр BD FACSCalibur™ Flow Cytometer (BD Biosciences, Канада), ультразвуковая баня Sonorex ТК-52 (Bandelin, Германия).

С клеточными культурами работали в пределах стерильного ламинарного шкафа (ESCO® Biotech, Индия),

инкубировали в CO₂-инкубаторах: New Brunswick Galaxy 48R (Eppendorf, Германия); Sanyo CO₂ Incubator in Cusa-Fe™ (Sanyo, Япония).

Получение дисперсии САНЧ

В колбу объемом 100 мл к 1 мл раствора БЭС в тетрагидрофуране (ТГФ) с концентрацией 5 мг/мл впрыскивали 25 мл воды и перемешивали 5 мин. Полученные дисперсии упаривали на вакуумно-роторном испарителе до необходимой концентрации при 40С. В качестве криопротектора добавляли сахарозу в количестве, необходимом для получения ее 10% раствора в конечной дисперсии после регидратации.

Для приготовления флуоресцентно меченных САНЧ к БЭС добавляли 0,02% МБА.

Культивирование клеток

HeLa. Адгезионные клетки HeLa (человек, эпителиоидная карцинома шейки матки) культивировали на среде DMEM (Gibco™ Invitrogen Corporation) с 10% FBS (Gibco™ Invitrogen Corporation) в атмосфере 5% CO₂. Пересев клеток осуществлялся снятием с матрасов смесью трипсин 0,25%:версен 0,02%, кратность посева составляла 1:3, оптимальная плотность 3,0–9,0 · 10⁵ клеток/мл.

Jurkat. Суспензионные клетки Jurkat (человек, Т-лимфобластная лейкемия) культивировали на среде RPMI 1640 (Gibco™ Invitrogen Corporation) с 10% FBS (Gibco™ Invitrogen Corporation) в атмосфере 5% CO₂. Кратность посева составляла 1:3, оптимальная плотность 3,0–9,0 · 10⁵ клеток/мл.

Оценка цитотоксичности наночастиц с помощью МТТ-теста

1. С использованием адгезионной культуры клеток HeLa. Адгезионные клетки HeLa пересевали в плоскодонную 96-луночную планшетку в концентрации 30–50 тыс. клеток на лунку (200 мкл клеточной суспензии) и инкубировали 24 ч. По окончании инкубации аккуратно отбирали куль-

* Выражаем благодарность д.б.н. Попенко В.И. (ИМБ РАН им. Энгельгардта) за проведение исследований с помощью электронной микроскопии.

туральную среду и заменяли на свежую по 160 мкл (в первую) или 180 мкл в остальные лунки, вносили по 40 мкл (в первую) или по 20 мкл раститрованной дисперсии НЧ БЭС во все лунки, кроме контроля; инкубировали в течение 24 ч. Конечная концентрация БЭС составляла (мкг/мл): 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512.

После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (2,5 мг/мл в PBS (150 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.2), стерилизованного пропусканием через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,22 мкм). После инкубации в течение 4 ч при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ среду удаляли, промывали несколько раз PBS, далее к 200 мкл PBS добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) в соотношении 1:1 и вращали планшет на орбитальном шейкере при комнатной температуре 10 мин до полного растворения образовавшихся кристаллов формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм с помощью анализатора Plate Chameleon.

2. С использованием суспензионной культуры клеток Jurkat. Суспензионные клетки Jurkat пересевали в круглодонную 96-луночную планшетку в концентрациях 30–50 тыс. клеток на лунку — по 160 мкл (в первую) или 180 мкл клеточной суспензии в остальные лунки, вносили по 40 мкл (в первую) или по 20 мкл раститрованной дисперсии САНЧ во все лунки, кроме контроля; инкубировали в течение 24 ч. Конечная концентрация БЭС составляла (мкг/мл): 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512. После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (2,5 мг/мл в PBS (150 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.2), стерилизованного пропусканием через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,22 мкм). Инкубацию и регистрацию сигнала проводили аналогично вышеизложенной методике.

Оценка жизнеспособности клеток методом окрашивания трипановым синим

Клетки Jurkat пересевали в 12-луночные планшетки — по 1,8 мл клеточной суспензии (250–400 тыс. клеток) в лунку, прикапывали по 200 мкл дисперсии САНЧ (1 мг/мл) для получения конечной концентрации БЭС 100 мкг/мл и по 100 мкл дистиллированной воды и 100 мкл дисперсии для получения конечной концентрации БЭС 50 мкг/мл. В качестве контроля использовали интактные клетки (объем 2 мл, 250–400 тыс. клеток), а также клетки с добавлением сахарозы (0,5 мг/мл) в ростовую среду. Через 24, 48, 72 и 96 ч инкубации клеточную суспензию (10 мкл) и смешивали с 10 мкл раствора ТВ (0,4%), наносили на специальные пластиковые слайды и проводили измерения с помощью автоматического счетчика клеток Countess.

Оценка цитотоксичности дисперсий с помощью цитофлуориметрии

1. Окрашивание клеток PI. Клетки Jurkat пересевали в 12-луночные планшетки — по 1,8 мл клеточной суспензии (250–400 тыс. клеток) в лунку, прикапывали по 200 мкл дисперсии САНЧ (1 мг/мл) для получения конечной концентрации БЭС 100 мкг/мл и по 100 мкл дистиллированной воды и 100 мкл дисперсии для получения конечной концентрации БЭС 50 мкг/мл. В качестве контроля использовали интактные клетки, а также клетки с добавлением в ростовую среду сахарозы (1 мг/мл) (объем в лунке 2 мл, 250–400 тыс. клеток). Инкубировали в течение 24 ч.

Клеточную суспензию собирали в пробирки и осаждали клетки центрифугированием (7 мин, 1500 об./мин). Сливали супернатант, добавляли к осадку по 1 мл PBS в каждую пробирку, ресуспендировали осевшие клетки. Добавляли по 10 мкл раствора PI (1 мг/мл). Инкубировали в темноте 30 мин при комнатной температуре. Для удаления свободного PI, клетки осаждали центрифугированием (7 мин, 1500 об./мин), сливали супернатант, а осевшие клетки ресуспендировали в 1 мл PBS. Суспензию клеток, окрашенных PI, анализировали на проточном цитофлуориметре.

2. Окрашивание клеток флуоресцеин диацетатом. Клетки Jurkat пересевали в 12-луночные планшетки — по 1,8 мл клеточной суспензии (250–400 тыс. клеток) в лунку, прикапывали по 200 мкл дисперсии САНЧ (1 мг/мл) для получения конечной концентрации БЭС 100 мкг/мл и по 100 мкл дистиллированной воды и 100 мкл дисперсии для получения конечной концентрации БЭС 50 мкг/мл. В качестве контроля использовали интактные клетки, а также клетки с добавлением в ростовую среду сахарозы (1 мг/мл) (объем в лунке 2 мл, 250–400 тыс. клеток). Инкубировали в течение 24 ч. Перед реакцией окрашивания клеточную суспензию собирали в пробирки и осаждали клетки центрифугированием (7 мин, 1500 об./мин). Осторожно сливали культуральную среду, добавляли к осадку по 1 мл PBS в каждую пробирку, тщательно ресуспендировали осевшие клетки. Добавляли по 10 мкл раствора FDA (5 мг/мл). Инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Для удаления избытка FDA, клетки осаждали центрифугированием (7 мин, 1500 об./мин), сливали супернатант, а осевшие клетки ресуспендировали в 1 мл PBS. Суспензию клеток, окрашенных FDA, анализировали на проточном цитофлуориметре.

Оценка гемолитической активности наночастиц

На круглодонную 96-луночную планшетку наносили по 40 мкл раствора хлорида натрия (0,9%). В первые лунки добавляли 40 мкл исследуемого образца и далее переносили по 40 мкл в последующие лунки, при этом каждый раз происходило прогрессивное разбавление образца в 2 раза. Далее прикапывали по 40 мкл суспензии эритроцитов барана. В конечном итоге были получены следующие концентрации дисперсий и контрольных растворов сахарозы: САНЧ, мкг/мл: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; раствор сахарозы (контроль для САНЧ), мкг/мл: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5. Через час и спустя сутки визуально оценивали состояние эритроцитов (гемолиз или осаждение).

Выявление окислительного стресса

Клетки HeLa пересевали в плоскодонную 96-луночную планшетку в концентрации 30–50 тыс. клеток на лунку (150 мкл клеточной суспензии) и инкубировали 24 ч. По окончании инкубации аккуратно отбирали культуральную среду и заменяли на свежую — по 135 мкл в лунку (по 150 мкл для положительного и отрицательного контроля), вносили по 15 мкл раститрованной дисперсии САНЧ во все лунки, кроме контрольных. Для оценки влияния сахарозы, присутствующей в дисперсиях, к 135 мкл среды с клетками отдельно добавляли по 15 мкл раствора сахарозы (10 мг/мл). Конечная концентрация БЭС составила (мкг/мл): 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,1; 1,6; ГМ (мкг/мл): 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,1; сахарозы — 1 мг/мл. Инкубиро-

вали в течение 24 ч. За 30 мин до окончания инкубации добавляли в лунки для положительного контроля по 15 мкл 100 мМ раствора H_2O_2 . По истечении 24 ч инкубации проводили детекцию окислительного стресса по следующей методике. Готовили растворы H_2DCFDA и Hoechst 33342 (в расчете на 70 лунок по 5 мкл раствора красителя в каждую). Раствор H_2DCFDA : 2,63 мкл стокового раствора красителя (4 мМ) разбавляли 347 мкл воды (концентрации H_2DCFDA в лунке должна быть 1 мкМ). Раствор Hoechst 33342: 58,8 мкл стокового раствора красителя разбавляли в 291,2 мкл воды.

После инкубации с наночастицами из лунок удаляли среду. Вносили в лунки по 150 мкл PBS, затем по 5 мкл приготовленных растворов красителей DCFDA и Hoechst 33342. Инкубировали клетки с красителями 30 мин при 37°C. По окончании инкубации удаляли PBS с красителями, вносили по 150 мкл PBS.

С помощью анализатора Plate Chameleon детектировали флуоресценцию DCF (λвозб. 485 нм, λфлуор. 535 нм) и Hoechst 33342 (соответствующие длины волн 355 и 460 нм). По соотношению интенсивности флуоресценции DCF/Hoechst оценивали уровень окислительного стресса в клетках в сравнении с положительным и отрицательным контролем.

Результаты и обсуждение

Токсикологические исследования проводились на суспензионной культуре клеток Т-лимфобластомы человека Jurkat и адгезионной культуре клеток карциномы шейки матки человека HeLa. Наиболее широко используемые токсикологические методики позволяют оценить либо выживаемость клеток (соотношение живых и мертвых), либо определить механизм токсического воздействия. Тесты на жизнеспособность оценивают пролиферацию, количество метаболически активных клеток, некроз или апоптоз клеток; тесты, определяющие основные механизмы токсичности, включают методики, которые выявляют либо окислительный стресс, либо повреждение ДНК [8]. Мы использовали широкий набор тестов для всесторонней оценки цитотоксичности САНЧ.

Для первичной оценки цитотоксичности дисперсии САНЧ использовали МТТ-тест. В работах, посвященных изучению токсичности различных наночастиц, максимальная концентрация исследуемых образцов в большинстве случаев не превышала 500 мкг/мл [1]. Для проведения МТТ-теста была получена дисперсия САНЧ с концентрацией 2560 мкг/мл, максимальная исследуемая концентрация БЭС составила 512 мкг/мл, далее проводилось пошаго-

вое разбавление дисперсии до 1 мкг/мл. Для адгезионной культуры HeLa после 28 ч инкубации, клетки отмывали от САНЧ и измеряли оптическую плотность образцов, по величине которой судили о жизнеспособности клеток. Существенного снижения жизнеспособности обработанных клеток по сравнению с контрольными не наблюдалось.

МТТ-тест на суспензионной клеточной культуре Jurkat привел к очень сильному разбросу значений, при этом значение оптической плотности для образца клеток, к которым были добавлены САНЧ, зачастую превышало данную величину для контроля.

Данный факт может быть следствием того, что, в отличие от адгезионной культуры HeLa, клетки Jurkat от САНЧ не отмывались. Рассеивание присутствующих в среде наночастиц искажают результаты МТТ-теста. Было показано, что рассеяние света САНЧ вносят существенный вклад в оптическую плотность анализируемого образца, а при концентрациях выше 300 нм значение оптической плотности дисперсии САНЧ превышает значение поглощения света формазаном, который образуется из МТТ-реагента в результате ферментативной активности живых клеток.

Таким образом, добавление дисперсии САНЧ к клеткам не приводит к существенному снижению их жизнеспособности вплоть до концентрации БЭС 512 мкг/мл; при оценке цитотоксичности наночастиц БЭС с помощью МТТ-теста эксперимент следует проводить на адгезионных клетках.

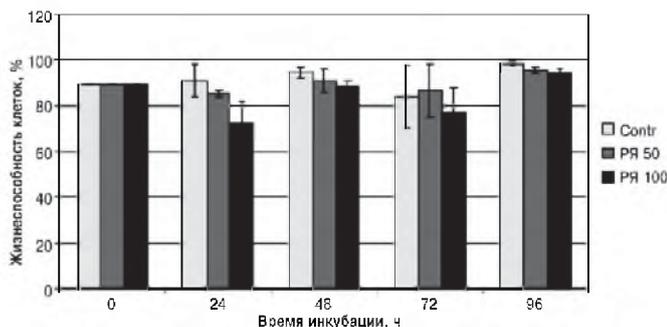
Учитывая концентрацию САНЧ, используемую в биологических испытаниях для определения их адьювантной активности, для проведения дальнейших токсикологических исследований дисперсии САНЧ были выбраны 2 концентрации — 100 мкг/мл и 50 мкг/мл.

Целостность мембраны клеток часто используется для определения жизнеспособности в токсикологических экспериментах *in vitro*. Стандартные методы оценки целостности мембраны контролируют либо попадание в клетку красителей, таких, как трипановый синий (Trypan Blue, ТВ), нейтральный красный (Neutral Red, NR) или пропидий йодид (PI), либо выход активных ферментов из клеток (например, лактатдегидрогеназы, ЛДГ). ТВ — при физиологических рН заряженная молекула, поэтому не может попасть в живые клетки. ТВ попадает только в клетки с поврежденной мембраной, окрашивая мертвые клетки в синий цвет (605 нм) [8].

Для оценки цитотоксичности дисперсии САНЧ (100 и 50 мкг/мл) этим методом, измеряли количество окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) красителем клеток через 24, 48, 72 и 96 ч инкубации клеток Jurkat с САНЧ. Минимальная жизнеспособность клеток была зафиксирована через 24 ч инкубации с САНЧ в концентрации 100 мкг/мл — 72% (в отсутствие САНЧ жизнеспособность зафиксирована на уровне 90%), однако через 96 ч после инкубации жизнеспособность клеток во всех случаях превышала 95% (рисунком).

Оценка цитотоксичности с использованием проточной цитометрии

Проточная цитометрия позволяет измерять флуоресценцию изучаемых объектов. Использование нескольких флуоресцентных меток позволяет проводить одновременный двух-, трехцветный и более анализ, так как каждый флуорохром при прохождении через луч лазера испускает свет различной длины волны [5].



Жизнеспособность интактных клеток (Contr) и клеток, к которым была добавлена дисперсия САНЧ в концентрации 50 мкг/мл и 100 мкг/мл

Жизнеспособность клеток Jurkat через 24 ч инкубации

Препарат	Количество мертвых клеток, %	
	Окрашивание PI	Окрашивание FDA
Контроль (интактные клетки)	4,27	2,05
Сахароза (1 мг/мл)	3,71	2,63
САНЧ (50 мкг/мл)	4,19	2,17
САНЧ (100 мкг/мл)	5,32	2,37

На первом этапе цитотоксичность дисперсии САНЧ (50 и 100 мкг/мл) оценивали с помощью окрашивания клеток PI, который при попадании в клетку с поврежденной мембраной интеркалирует в ДНК и дцРНК, при этом краситель попадает в гидрофобную среду, что резко увеличивает его флуоресценцию ($\lambda_{\text{ем}}$ 617 нм) [8]. Количество мертвых клеток в случаях добавления САНЧ в концентрации 50 и 100 мкг/мл не отличалось существенным образом от значений данного параметра для контрольных клеток — менее 6%, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического эффекта наночастиц БЭС.

Отсутствие цитотоксичности дисперсии САНЧ также было продемонстрировано с помощью другого цитофлуориметрического метода определения выживаемости клеток — с помощью прижизненного красителя FDA. Живые клетки поглощают и превращают нефлуоресцирующий краситель FDA в зеленый флуоресцирующий флуоресцеин [5]. Результаты данного теста показали, что количество жизнеспособных клеток во всех опытах превышало 97% (таблица).

Определение окислительного стресса

Одним из наиболее часто встречающихся механизмов токсического действия наночастиц является развитие окислительного стресса — образование активных форм кислорода (АФК), что может вызывать повреждение многих клеточных компонентов — липидов, ДНК и белков. В зависимости от силы стресса клетки могут погибнуть в результате апоптоза или в результате некроза [4].

Мы определяли развитие окислительного стресса под действием САНЧ в клетках HeLa. Одними из красителей, используемых для детекции активных форм кислорода, являются дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат и его производные. Данный гидрофобный краситель проникает в клетку, где гидролизуется внутриклеточными эстеразами до 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина. Далее он может окисляться активными формами кислорода до 2',7'-дихлорфлуоресцеина с высоким уровнем флуоресценции [9].

Для нормирования флуоресценции по количеству клеток применяли краситель Hoechst 33342, окрашивающий

ДНК и использующийся в различных целях, в том числе для подсчета клеток [7]. Уровень окислительного стресса оценивали по интенсивности флуоресценции продукта окисления, приведенной к значению флуоресценции Hoechst. Результаты эксперимента показали, что исследуемые наночастицы САНЧ не приводят к повышенной генерации АФК и гораздо меньшие по сравнению с положительным контролем (10 мМ H₂O₂).

Подводя итоги, можно заключить, что САНЧ не проявляют цитотоксических эффектов в исследуемых концентрациях (до 512 мкг/мл), а значит, могут использоваться в качестве носителей для лекарственных субстанций, в том числе и как адъюванты.

Список литературы

1. Глушкова А.В., Радилов А.С., Рембовский В.Р. Нанотехнологии и нанотоксикология — взгляд на проблему // Токсикологический вестник. — 2007. — №6. — С. 4—8.
2. Красильников И.В., Гамбарян А.С., Машин В.В. и др. Иммуногенные и протективные свойства инактивированных и живых кандидатных вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 // Вопросы вирусологии. — 2010. — Т. 55, №4. — С. 16—19.
3. Красильников И.В., Иванов А.В., Николаева А.М., Машин В.В. Изучение возможности использования нанодисперсии экстракта бересты в качестве адъюванта вакцинных препаратов // Сибирский медицинский журнал. — 2011. — Т. 26, №2. — С. 65—67.
4. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
5. Херрингтон С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. — М.: Мир, 1999. — 559 с.
6. Чистяков А.Н., Преснова Г.А., Балахнин В.В., Каплун А.П. Композиция биологически активных веществ и способ получения нанодисперсии её. Патент РФ 2322091 20.04.2008. Бюл. №11.
7. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp21486.pdf>
8. Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L., Haynes C.L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity // Analyst. — 2009. — Vol. 134. — P. 425—439.
9. Mitochondria (Series: Methods in Cell Biology), 2nd edition / Ed. by L.A. Pon, E.A. Schon. — Academic Press, Inc., 2001. — 363 p.
10. Seaton A., Tran L., Aitken R., Donaldson K. Nanoparticles, human health hazard and regulation // J. R. Soc. Interface. — 2010. — Vol. 7. — S119—S129.

Поступила 27.12.2012

Toxicity studies nanodispersions spherical amorphous nanoparticles of birch bark triterpenoids in vitro

Ignashkova T.I., Mironova S.O., GavriloVA L.A., Moskovtsev A.A.,
Kaplun A.P., Yurkiv V.A., Shvets V.I., Kubatiev A.A.

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, Russia, 125315, Moscow, Baltijskaya St., 8
Moscow State University of Fine Chemical Technology. MV Lomonosov, 119571, Moscow, prosp. Vernadskogo, 86

Spherical amorphous nanoparticles of birch bark triterpenoids, promising carriers of hydrophobic substances, were tested for toxicity on two types of cells HeLa and Jurkat. These nanoparticles do not exhibit cytotoxic effects under the studied concentrations (up to 512 ug/ml).

Key words: cytotoxicity, flow cytometry, hemolytic activity, HeLa, Jurkat, the MTT test, spherical amorphous nanoparticles