

УДК: 576-54

Каба С.И., Соколовская А.А., Тлупова З.А., Егорова Е.М.

Цитотоксическое действие наночастиц серебра с различным поверхностным зарядом по отношению к клеткам линии Jurkat

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
Федеральное агентство научных организаций, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Биологические, в том числе токсические эффекты наночастиц серебра (НЧС) *in vitro* зависят от ряда характеристик наночастиц, определяющих их взаимодействие с клетками и дальнейшее поведение внутри клеток. Во взаимодействии наночастиц с клетками определённую роль играет их поверхностный заряд, как показано, в частности, в экспериментах с НЧС. Однако систематических исследований роли поверхностного заряда НЧС в их действии на клетки на сегодняшний день недостаточно. **Цель данной работы** — изучение цитотоксических эффектов наночастиц серебра, различающихся по поверхностному заряду, в культуре клеток линии Jurkat. **Методы.** Были приготовлены два раствора НЧС одинаковой (сферической) формы и размеров (13 нм), но с разными стабилизаторами (аэрозолем-ОТ и β -циклодекстрином), вследствие чего наночастицы имели разные значения отрицательного ζ -потенциала: для НЧС, стабилизированных аэрозолем-ОТ и β -циклодекстрином ζ -потенциал составлял $-89,4$ мВ и $-35,6$ мВ соответственно. Через 24 ч инкубации НЧС с клетками в диапазоне концентраций наночастиц $0,5$ – $2,5$ мкг/мл определяли цитотоксические эффекты с помощью: 1) теста МТТ; 2) детекции апоптоза и некроза клеток с использованием аннексина V и пропидий йодида и 3) выявления морфологических изменений клеток. **Результаты.** Цитотоксичность наблюдалась при инкубации с НЧС, стабилизированными аэрозолем-ОТ, причем сам стабилизатор также обладал токсичностью; в случае стабилизации β -циклодекстрином токсические эффекты отсутствовали. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что поверхностный заряд, а в ряде случаев — и собственный эффект стабилизатора должны рассматриваться как значимые факторы взаимодействия наночастиц с клетками и учитываться в дальнейших исследованиях биологических эффектов НЧС.

Ключевые слова: наночастицы серебра; поверхностный заряд наночастиц; клетки Jurkat; нанотоксичность; цитотоксичность.

Для цитирования: Каба С.И., Соколовская А.А., Тлупова З.А., Егорова Е.М.

Цитотоксическое действие наночастиц серебра с различным поверхностным зарядом по отношению к клеткам линии Jurkat. Патогенез. 2016; 14(3): 31–37.

Для корреспонденции: Каба Саид Ибрагимович, научн. сотр. лаб. нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Федеральное агентство научных организаций, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8. e-mail: said.kaba@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.06.2016

Благодарности. Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Сергею Савельевичу Абрамчуку за работу по получению микрофотографий наночастиц серебра.

Kaba S.I., Sokolovskaya A.A., Tlupova Z.A., Egorova E.M.

The cytotoxic effects of silver nanoparticles with different surface charge in Jurkat cells

FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315

The *in vitro* biological (including toxic) effects of silver nanoparticles (SNP) depend on the nanoparticle characteristics that determine the SNP interaction with cells and their subsequent behavior in a cell interior. As shown in studies both with SNP and some other nanoparticles, the nanoparticle surface charge plays a role in nanoparticle – cell interaction. To date, however, there is still a lack of systematic studies on the role of surface charge in SNP effects on cells. The aim of this work is to study the cytotoxic effects of SNP with different surface charge using a Jurkat cell line. We prepared two SNP solutions where the particles have the same (spherical) shape and average size (13 nm) but are coated with different stabilizers, aerosol-OT and β -cyclodextrin; hence the nanoparticles possessed different negative zeta potential values, $-89,4$ mV and $-35,6$ mV for aerosol-OT and β -cyclodextrin, respectively. After the 24 h treatment of cells with SNP in the concentration range of 0.5 – 2.5 $\mu\text{g/mL}$, the cytotoxic effects were estimated by means of 1) MTT assay, 2) apoptosis and necrosis detection by annexin V and propidium iodide, and 3) observation of morphological alterations in cells. Cytotoxicity was detected after incubation with aerosol-OT-stabilized SNP; the toxicity of aerosol-OT itself was also observed. The SNP stabilized β -cyclodextrin did not exert any toxic effects. The results obtained suggest that surface charge

and, in some cases, the effects of only stabilizers should be considered as important factors in nanoparticle – cell interactions and should be taken into account in further studies of SNP effects.

Key words: silver nanoparticles; nanoparticle surface charge; Jurkat cells; nanotoxicity; cytotoxicity.

For citation: Kaba S.I., Sokolovskaya A.A., Tlupova Z.A., Egorova E.M. The cytotoxic effects of silver nanoparticles with different surface charge in Jurkat cells. *Patogenez*. 2016; 14(3): 31-37 (In Russian).

For correspondence: Kaba Said Ibragimovich, Researcher, FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315. e-mail: said.kaba@gmail.com.

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Received 30.06.2016

Введение

Для современных медицинских нанотехнологий характерно развитие вариантов использования металлов в наноразмерной форме, то есть в виде частиц, размер которых лежит в диапазоне 1–100 нм. Это связано с их необычными свойствами: высокой тепло- и электропроводностью, специфическими оптическими и электромагнитными свойствами. В частности, золотые и серебряные наночастицы предлагается использовать в системах отображения клеток, для детекции биомолекул, а также в противоопухолевой терапии с целью уничтожения раковых клеток в ходе проведения фототермальной терапии либо за счёт собственной активности частиц по отношению к раковым клеткам [1–3]. Для наночастиц серебра (НЧС) характерны также ярко выраженные антимикробные свойства, что предопределило использование наносеребра в качестве бактериостатического и бактерицидного компонента. Есть основания полагать, что в этом качестве НЧС заметно превосходят серебро в ионной форме [4], и это способствует их успешному применению в составе дезинфицирующих средств и медицинских изделий, для которых существенно наличие противомикробных свойств (катетеров, раневых повязок, медицинских мазей, гелей и др.). Известна активность НЧС и в отношении других биологических патогенов, например, вирусов иммунодефицита человека, гепатитов и гриппа, а также малярийного плазмодия [5, 6]. В центре внимания находится и обнаруженная противоопухолевая активность НЧС [7]. Появление экологически приемлемых методов «зелёного синтеза» НЧС (с применением растительных экстрактов в качестве восстановителей и стабилизаторов) привело к интенсификации исследования их противораковых свойств *in vitro* [8].

Вместе с тем хорошо известно, что наночастицы металлов не являются инертными по отношению к организму человека и могут вызывать нежелательные биологические эффекты, и НЧС — не исключение. Широкий спектр биоцидной активности делает наносеребро потенциальным цитотоксическим агентом, который в зависимости от своих характеристик и условий воздействия на клетки способен вызывать такие явления, как снижение общей метаболической активности клеток, дисфункцию митохондрий, окислительный стресс, а также вызывать гибель клеток вследствие апоптоза и некроза. Чтобы избежать негативных последствий из-за неконтролируемого использования НЧС, необходимо достаточно ясное понимание особенностей их воздействия на живые клетки.

Важную роль во взаимодействии с клетками играют собственные характеристики наночастиц. Было получено множество результатов касательно влияния размеров частиц на проявление патологических эффектов наночастиц *in vitro* [9, 10]. Не менее важными характеристиками явля-

ются форма наночастиц, химический состав поверхности (например, состав стабилизирующей оболочки) и поверхностный заряд, так как эти факторы также влияют на их взаимодействие с клетками [11]. Среди этих характеристик заряд поверхности наночастиц оказался наименее изученным, хотя существуют данные, подтверждающие влияние заряда поверхности наночастиц различного состава (включая НЧС) на их взаимодействие с клетками. Так, известно, что поверхностный заряд наночастиц играет роль в процессах их взаимодействия с клеточной мембраной и предопределяет их дальнейшую внутриклеточную локализацию [12, 13]. Что касается НЧС, то на сегодняшний день исследования влияния их поверхностного заряда слишком малочисленны, чтобы можно было сделать определённые выводы о роли этого параметра в их действии на животные клетки.

Чтобы восполнить этот пробел, мы начали проводить исследования цитотоксичности НЧС одинаковой формы и размеров, но с разным поверхностным зарядом на культивируемых клетках человека. Первая наша работа в этом направлении была посвящена взаимодействию НЧС с клетками эндотелия пупочной вены человека (линия EA.hy926) и было показано, что НЧС с большим поверхностным зарядом оказываются более токсичными [14]. В настоящей работе сообщается о результатах исследования на лимфобластных клетках линии Jurkat. В отличие от использовавшихся нами ранее адгезионных эндотелиальных клеток, эта линия поддерживается в суспензионном состоянии, что даёт возможность сравнить влияние НЧС с различным поверхностным зарядом на разные типы клеток с разным способом культивирования. В качестве исследуемых эффектов рассматриваются морфологические изменения клеток, влияние на жизнеспособность клеток, а также на развитие апоптоза и некроза. Как и в предыдущей работе, размеры и форма НЧС были одинаковыми, что позволяло проводить корректный анализ роли поверхностного заряда в проявлении токсических эффектов НЧС на клетках.

Методика

Получение и характеристика наночастиц серебра

Для синтеза НЧС использовали: воду деионизованную, получаемую в приборе «Водолей» (НПО «Химэлектроника», Россия); воду дистиллированную; нитрат серебра (х.ч., «ПЗЦМ-Втормет», Россия); изооктан эталонный («Химмед», Россия); 27%-ный раствор аммиака («Химмед»); 96%-ный этанол («Росбио», Россия); кварцетина дигидрат ($\geq 98\%$) («Carl Roth GmbH», Германия); аэрозоль-ОТ (АОТ, $\geq 96\%$) («Acros», США); β -циклодекстрин (β -ЦД, 98,9%), любезно предоставленный ГНУ «ВНИИ крахмалопродуктов» (Московская область, Россия).

Наночастицы серебра, стабилизированные АОТ (НЧС-АОТ), получали методом биохимического синтеза в обратных мицеллах (в мицеллярном растворе в органическом растворителе). Процедура синтеза была подробно описана ранее [15]. Концентрация НЧС в мицеллярном растворе составляла 1 ммоль/л. Далее осуществляли перенос синтезированных частиц в водную фазу путём смешения мицеллярного раствора с водой и последующего отстаивания [15]. Затем концентрацию АОТ в растворе наночастиц уменьшалась путем диализа. В результате получали водный раствор с концентрацией НЧС 1 ммоль/л и концентрацией АОТ 3,5 ммоль/л, который использовался для инкубации с клеточными культурами. Концентрацию АОТ определяли по стандартной методике «Определение молярной концентрации анионных ПАВ спектрофотометрическим методом в диапазоне концентрации 0,015–0,25 мг/мл» (ГОСТ Р 51211-98), модифицированной применительно к рабочим концентрациям АОТ в наших экспериментах. Концентрацию НЧС-АОТ в водном растворе определяли по спектрам поглощения, полученных на приборе «Shimadzu UV-2600» («Shimadzu Corporation», Япония) с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon = 1,14 \times 10^4$ л / (моль \times см), найденного ранее в отдельных экспериментах.

Синтез НЧС, стабилизированных β -циклодекстрином (НЧС- β -ЦД), проводили с помощью предложенного ранее варианта биохимического синтеза в водном растворе ([15]). Как и при синтезе в обратных мицеллах, НЧС здесь образуются в результате восстановления ионов серебра кверцетином; процесс протекает в водном растворе в присутствии β -ЦД. Для инкубации с клетками готовили раствор с концентрацией НЧС 1 ммоль/л и концентрацией β -ЦД 1 ммоль/л. Концентрацию НЧС- β -ЦД определяли по спектрам поглощения, с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon = 1,45 \times 10^4$ л / (моль \times см), найденного ранее в независимых экспериментах.

Размеры НЧС и значения их ζ -потенциала определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) на приборе «ZetaPALS» («Brookhaven Instruments», США).

Микрофотографии наночастиц получали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Капли раствора НЧС объёмом 3 мкл наносили на медные сетки для электронной микроскопии с формваровым покрытием и оставляли в потоке воздуха до высыхания капли раствора (до 5 мин). Сетки исследовали в просвечивающем электронном микроскопе «LEO912 AB OMEGA» («Carl Zeiss», Германия) под ускоряющим напряжением 120 кВ. Из микрофотографий определяли размеры и форму частиц, а также (по электронным дифрактограммам) получали параметры их кристаллической структуры. По изображениям не менее чем 500 частиц строили гистограмму распределения по размерам.

Культура клеток

Клетки Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия человека) получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия). Для субкультивирования использовали среду RPMI1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Invitrogen», США). Субкультивирование проводили в инкубаторе «New Brunswick Galaxy 48 R» («Eppendorf», Германия) при

37°C в увлажнённой атмосфере с 5% углекислого газа. Пасивирование клеток проводили 3 раза в неделю. Предварительно определяли концентрацию суспензии и жизнеспособность клеток методом исключения витального красителя (трипанового синего) путём подсчёта в автоматическом счётчике клеток «Countess» («Invitrogen», США) в соответствии с инструкцией к прибору. Для эксперимента использовали клетки с жизнеспособностью не менее 95%.

Определение жизнеспособности клеток после инкубации с наночастицами с помощью теста МТТ

Детекцию уровня жизнеспособности клеток с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид (МТТ) проводили по методике Mosmann с незначительными изменениями [16]. Клеточную суспензию вносили в лунки 96-луночного микропланшета в концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток/мл и инкубировали 48 ч, затем вносили НЧС в диапазоне концентраций 0,5–2,5 мкг/мл, а также деионизованную воду в качестве отрицательного контроля. Для оценки цитотоксичности стабилизаторов клетки инкубировали с водными растворами АОТ (3,5 ммоль/л) и β -ЦД (1 ммоль/л) в разведениях, соответствующих разведениям препаратов НЧС. После 24-часовой инкубации клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с pH 7,4 («Эко-Сервис», Россия), затем вносили свежую культуральную среду и раствор МТТ («AppliChem», США) в ФСБ до концентрации 500 мкг/мл и общего объёма суспензии 200 мкл. Через 4 ч инкубации с МТТ отбирали среду, вносили по 100 мкл диметилсульфоксида, затем перемешивали раствор на орбитальном шейкере при частоте 2000 об./мин в течение 3 мин. После перемешивания вносили по 100 мкл дистиллированной воды и снова перемешивали при частоте 1000 об./мин в течение 5 мин. Оптическую плотность полученного раствора формазана в лунках измеряли на фотометре «Chameleon V» («Hidex», Финляндия) при 544 нм. Жизнеспособность клеток вычисляли как долю оптической плотности формазана из испытуемых клеток от оптической плотности формазана из контрольных клеток (инкубированных с деионизованной водой), выраженную в процентах.

Детекция клеточной гибели вследствие апоптоза и некроза с помощью аннексина V и пропидий йодида

В лунки 12-луночного планшета вносили суспензию клеток объёмом 1 мл и концентрацией $2,5 \times 10^5$ клеток/мл. Клетки инкубировали 48 ч, после чего вносили исследуемые НЧС в диапазоне концентраций 0,5–2,5 мкг/мл, а также деионизованную воду в качестве отрицательного контроля, инкубировали 24 ч. По окончании инкубации клетки отмывали от среды и ресуспендировали в холодном ФСБ (4°C), переносили в чистые пробирки и определяли уровни апоптотических и некротических событий методом проточной цитофлуориметрии в приборе «FACS Calibur» («BD Biosciences», США) и с набором реагентов «Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I» («BD Biosciences») в соответствии с инструкцией. Детектировали поверхностный фосфатидилсерин, маркер раннего апоптоза, с помощью аннексина V, меченного флуоресцеинизотиоцианатом (FITC-A). Дополнительно клетки окрашивали пропидий йодидом (PI), который проникает сквозь повреждённую мембрану клеток на стадии позднего апоптоза и некроза [17].

Характеристики наночастиц серебра. Даны средние значения и стандартные отклонения

Определяемый параметр	НЧС-АОТ	НЧС- α -ЦД
Форма	Сферическая	Сферическая
Размер по данным ПЭМ, нм ¹	13,2 ± 4,72	13,3 ± 7,97
Размер по данным ФКС, нм	49,44 ± 0,80	38,75 ± 0,59
ζ -потенциал, мВ	-89,4 ± 4,32	-35,9 ± 2,52
Примечание. ¹ — даны среднее и ширина распределения		

Исследование морфологии клеток

Данную процедуру совмещали с детекцией клеточной гибели. Клетки после инкубации с НЧС исследовали под микроскопом «Eclipse TE 2000-U» («Nikon», Япония) в режиме фазового контрастирования под 100-кратным увеличением. Изображения клеток фиксировали на цифровую камеру «CoolSNAP Pro» («Media Cybernetics», США).

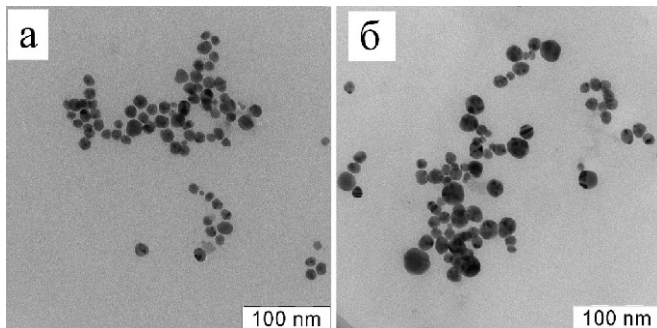


Рис. 1. Микрофотографии наночастиц серебра: а — НЧС-АОТ; б — НЧС- β -ЦД.

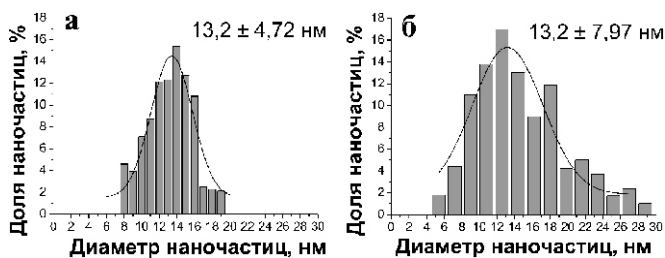


Рис. 2. Гистограммы распределения наночастиц по размерам: а — НЧС-АОТ; б — НЧС- β -ЦД.

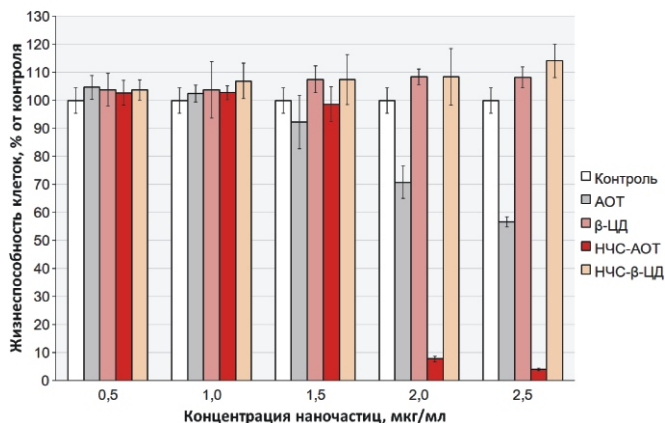


Рис. 3. Изменение жизнеспособности клеток Jurkat при инкубации с НЧС в течение 24 ч. По оси ординат — жизнеспособность представлена как доля оптической плотности испытуемых клеток от оптической плотности в контроле, выраженная в процентах.

Анализ результатов

Средний размер и ширину распределения НЧС по размерам по итогам ПЭМ выводили из построенных гистограмм в приближении Гаусса, используя программное обеспечение «Origin» (версия 6.1). Каждый вид исследований на клетках выполняли не менее чем в трёх независимых экспериментах. Данные, полученные в рамках теста МТТ, представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистические различия определяли, используя *t*-тест Стьюдента. Данные, полученные методом проточной цитофлуориметрии, анализировали с помощью программного обеспечения «CellQuest Pro» («BD Biosciences»); результаты представлены как проценты нормальных клеток, клеток в раннем апоптозе, клеток в позднем апоптозе и некротических клеток.

Результаты

Изображения НЧС, полученные с помощью ПЭМ, показаны на рис. 1. Синтезированные НЧС имели форму, близкую к сферической. Полученные в ходе исследования дифрактограммы свидетельствовали о кристаллической структуре с параметрами кубической гранецентрированной решётки, сходными с таковыми для стандартного образца кристаллического золота [15]. Это подтверждает, что наблюдаемые на микрофотографиях частицы состоят из металлического серебра.

Гистограммы распределений НЧС по размерам показаны на рис. 2. Полученные из гистограмм средние размеры частиц, а также их размеры и значения ζ -потенциалов, найденные методом ФКС, показаны в таблице. Следует отметить, что измерения ζ -потенциала проводили при одинаковой ионной силе раствора; при соблюдении этого условия (и при одинаковом среднем размере частиц) значения ζ -потенциала отражают действительные различия в плотности поверхностного заряда наночастиц [14].

Как видно на рис. 2, НЧС имели одинаковый средний размер, но ширина распределения у НЧС- β -ЦД была больше, чем у НЧС-АОТ. Значения размеров НЧС, полученных методом ФКС, заметно превышали соответствующие значения, полученные в результате анализа микрофотографий (таблица), что может быть связано с известной особенностью метода ФКС — его высокой чувствительностью к малым примесям частиц большого размера. Обсуждение этой и других возможных причин завышения размеров наночастиц при исследовании методом ФКС по сравнению с данными электронной микроскопии можно найти в литературе [15, 18]. Из таблицы видно также, что значения ζ -потенциала заметно отличаются для НЧС-АОТ и НЧС- β -ЦД. Это обусловлено тем, что молекулы АОТ и β -ЦД несут анионные ионизируемые группы

с разными значениями рК при нейтральном рН, и соответственно, создают разную плотность заряда на поверхности НЧС, что и отражается в различии измеряемых значений электрофоретической подвижности и рассчитанных из нее ζ -потенциалов.

Изменения жизнеспособности клеток Jurkat представлены на рис. 3. При инкубации с НЧС-АОТ жизнеспособность клеток уменьшалась, начиная с концентрации наночастиц 2,0 мкг/мл, тогда как инкубация с НЧС- β -ЦД не приводила к достоверному снижению жизнеспособности клеток во всем диапазоне концентраций наночастиц, включая 2,0 и 2,5 мкг/мл. При контрольных экспериментах с растворами стабилизаторов изменения наблюдались лишь при инкубации с АОТ: жизнеспособность клеток уменьшалась при концентрациях стабилизатора, соответствующих вносимым с растворами НЧС-АОТ до концентраций наночастиц 2,0 и 2,5 мкг/мл. Таким образом, оказалось, что в токсичность раствора НЧС-АОТ вносит вклад как собственно эффект наночастиц, так и эффект стабилизатора; аналогичный вывод был сделан нами ранее в исследованиях действия НЧС-АОТ на клетки эндотелия [14].

Как и в работе с эндотелием, мы сочли полезным выделить вклад наночастиц в общую токсичность раствора НЧС-АОТ для клеток Jurkat, построив зависимость разности значений жизнеспособности (ΔV) клеток при действии раствора АОТ и раствора НЧС-АОТ от концентрации наночастиц по данным рис. 3. Полученная зависимость показана на рис. 4; для сравнения здесь же приведены соответствующие данные для клеток эндотелия из работы [14]. Как видно из рисунка, в обоих случаях можно определить концентрации раствора наночастиц, при которых его токсичность определяется преимущественно самими наночастицами, поскольку вклад АОТ оказывается незначительным. Эти концентрации наночастиц соответствуют, очевидно, максимальной разности значений V , то есть ΔV_{\max} . Для клеток Jurkat ΔV_{\max} наблюдается при 2,0 мкг/мл, тогда как для EA.hy926 оно соответствует 1,5 мкг/мл. Это свидетельствует о более высокой чувствительности эндотелиальных клеток EA.hy926 к НЧС-АОТ по сравнению с Jurkat.

Данные по гибели клеток в результате апоптоза и некроза представлены на гистограмме рис. 5. Клетки, обладавшие (относительно контроля) высокой флуоресценцией только по FITC-A, относили к клеткам в стадии раннего апоптоза; клетки с флуоресценцией по FITC-A и PI — к клеткам в стадии позднего апоптоза; клетки с окрашиванием по PI — к некротическим клеткам [19]. Было установлено, что в клетках, инкубированных с НЧС-АОТ, заметно повышались уровни детектируемых событий, связанных с состоянием апоптоза и некроза, причём доля клеток, окрашиваемых и FITC-A, и PI, резко возрастала, начиная с 2,0 мкг/мл НЧС. При 2,5 мкг/мл НЧС-АОТ больше половины событий свидетельствовало о некрозе клеток. В клетках, инкубированных с НЧС- β -ЦД, напротив, не было никаких значительных изменений доли событий по сравнению с контрольными клетками.

Изменения морфологии клеток показаны на рис. 6. Контрольные клетки были округлые, с гладкой поверхностью. В клетках с НЧС-АОТ были обнаружены изменения, начиная с концентрации НЧС 2,0 мкг/мл, в то время как НЧС- β -ЦД не вызывали изменений на всём диапазо-

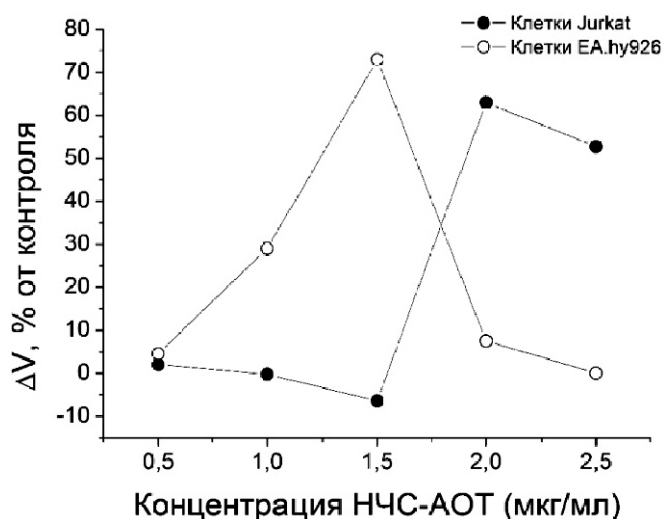


Рис. 4. Вклад АОТ в наблюдаемую цитотоксичность НЧС-АОТ по отношению к клеткам Jurkat и EA.hy926. $\Delta V = V_{\text{АОТ}} - V_{\text{НЧС-АОТ}}$, где $V_{\text{АОТ}}$ и $V_{\text{НЧС-АОТ}}$ — жизнеспособность клеток, инкубированных с АОТ и НЧС-АОТ соответственно. Данные для клеток EA.hy926 взяты из работы [14].

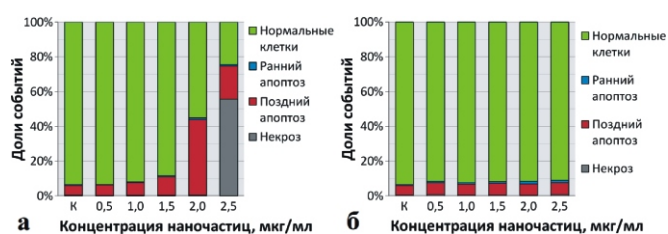


Рис. 5. Проявление апоптоза и некроза в клетках линии Jurkat: а — после инкубации с НЧС-АОТ; б — после инкубации с НЧС- β -ЦД. Время инкубации: 24 ч. Результаты соответствуют событиям, регистрируемым в ходе цитофлуориметрии по флуоресценции FITC-A (апоптоз) и PI (некроз). 100% событий соответствует 15 000 клеток. К — контроль. По оси ординат — доля клеток подвергшихся апоптозу и некрозу в процентах от контроля, принятого за 100%.

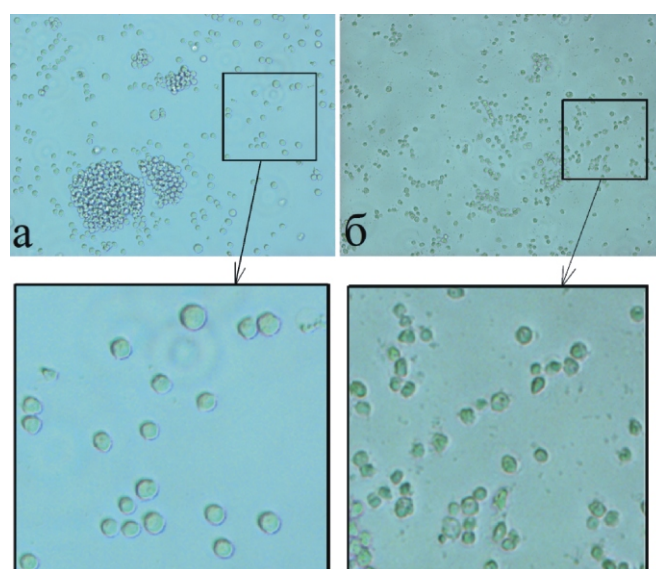


Рис. 6. Морфологические изменения в культуре клеток линии Jurkat: а — контрольные клетки; б — клетки, инкубированные с 2,0 мкг/мл НЧС-АОТ. Оптическая микроскопия в режиме фазового контрастирования, 100-кратное увеличение.

не концентраций. При воздействии НЧС-АОТ от 2,0 мкг/мл и выше наблюдались сморщивание и уменьшение клеток в размерах. Наблюдаемые изменения клеток совпали со снижением прямого светорассеяния от этих же клеток при цитофлуориметрических измерениях (данные не приведены).

Обсуждение

Вопрос о влиянии характеристик наночастиц на их взаимодействие с клетками широко освещается в литературе (см., например, обзор [11]). Тем не менее, соответствующие данные при всём их разнообразии трудно сопоставимы. Кроме того, сведения о таком параметре наночастиц, как поверхностный заряд, весьма скудны, хотя о его возможном влиянии наряду с другими факторами сообщалось и ранее [20, 21]. В данной работе нами было выполнено исследование общей цитотоксической активности НЧС двух видов, различавшихся между собой природой стабилизатора и как следствие — значениями ζ -потенциала, который характеризует поверхностный заряд наночастиц. Наша предыдущая работа в этой области была выполнена с использованием эндотелиальных клеток линии EA.hy926 [14]. При сравнении результатов, полученных на клетках EA.hy926, с результатами по клеткам Jurkat видно, что влияние НЧС-АОТ при повышении их концентрации проявляется сходным образом: начиная с концентрации НЧС-АОТ 2,0 мкг/мл, в клетках развиваются ярко выраженные цитотоксические эффекты, а именно резкое снижение жизнеспособности и возрастание уровня апоптоза и некроза. Кроме того, клетки EA.hy926 более чувствительны к стабилизатору АОТ, чем клетки Jurkat. Уровень жизнеспособности клеток EA.hy926 при воздействии НЧС- β -ЦД уменьшался примерно до 80% от контроля, что также свидетельствует об их более высокой чувствительности к НЧС по сравнению с Jurkat, на которые НЧС- β -ЦД не оказали заметного эффекта. Результаты по цитофлуориметрии для обеих клеточных линий также оказались сходными: заметное увеличение уровня апоптоза и некроза наблюдается только при воздействии НЧС-АОТ и начиная с концентрации 2,0 мкг/мл, но доля клеток Jurkat, подвергшихся некрозу при максимальной концентрации НЧС-АОТ заметно выше, чем доля эндотелиальных клеток при тех же условиях. Данные по действию НЧС-АОТ на клетки U937 и HeLa из другой нашей работы [22] указывают, что уровень цитотоксичности НЧС-АОТ для Jurkat в целом оказался чуть ниже, чем для клеток U937, и примерно тем же, что и для HeLa (особенно с учётом профиля токсичности).

Таким образом, полученные нами данные для различных клеток позволяют заключить, что:

- 1) выраженной цитотоксичностью обладают НЧС-АОТ;
- 2) проявление цитотоксичности может зависеть от типа клеток.

Кроме того, все клеточные линии чувствительны к АОТ, что особенно характерно для EA.hy926. Это указывает на то, что при исследовании эффектов плотности заряда следует учитывать собственные эффекты стабилизатора. Выводы о влиянии стабилизатора (то есть о свойствах поверхности наночастиц серебра) на их биологическую активность НЧС делались в литературе и раньше. Так, в ра-

боте Suresh et al. [23] показано, что химический состав поверхности предопределяет стабильность НЧС в клеточной среде и их способность взаимодействовать с клетками. В частности, из четырех препаратов НЧС, полученных с разными стабилизаторами, наиболее токсичными оказались наночастицы, стабилизированные полидиаллилдиметиламмонием. Авторы работы связывают данный эффект с устойчивостью этих НЧС к агрегации, а также (предположительно) со степенью взаимодействия разнозаряженных НЧС с клеточными мембранами; при этом роль собственно поверхностного заряда остаётся неясной.

Различия в дозозависимом падении жизнеспособности клеток при воздействии НЧС с различным поверхностным зарядом также наблюдались в работе Kaur and Ti-koor [24], где изменения жизнеспособности клеток были сравнительно плавными и заметно зависели от типа клеток. Интересно сопоставить результаты из работы [24] с полученными в нашей работе, т.к. в обоих исследованиях использовали по два препарата НЧС, различавшихся между собой лишь величиной ζ -потенциала. В работе [24] разница между его значениями была невелика (-22,2 и -34,6 мВ); при прочих равных условиях это может служить объяснением плавного снижения метаболической активности, а также небольших различий в жизнеспособности для одних и тех же клеток при действии этих двух препаратов наночастиц: для наиболее восприимчивых клеток максимальная разница между средними значениями жизнеспособности составляла $\approx 35\%$. В нашем случае разница значений ζ -потенциалов НЧС была существенно больше (таблица), и при этом НЧС с меньшей величиной заряда не оказывали какой-либо значимой токсичности. Таким образом, как цитируемой [24], так и в нашей работе степень уменьшения жизнеспособности клеток оказывается пропорциональной величине заряда НЧС.

Индукция апоптоза при воздействии НЧС описана в ряде работ [25, 26]. Она становится конечным результатом запуска комплексных патологических преобразований в клетке (остановки клеточного цикла, повреждения ДНК вследствие развития окислительного стресса, дисфункции митохондрий и др.), вызываемых НЧС. Более того, при определённых условиях НЧС способны вызывать некроз клеток, что имело место и в нашей работе. Как и в нашей предыдущей работе [14], дозозависимое проявление гибели клеток, обработанных НЧС-АОТ, имело неравномерный характер: общая доля повреждённых клеток резко возрастала, начиная с 2,0 мкг/мл НЧС. Как и в случае с тестом МТТ, столь ощутимая разница между эффектами двух препаратов НЧС может быть связана с различными свойствами их поверхности. Взаимодействуя с клетками более интенсивно, НЧС-АОТ, несущие больший по модулю заряд и содержащие в составе раствора активный по отношению к клеткам стабилизатор, оказывают комплексный токсический эффект, неизменно приводящий к апоптозу и некрозу большей части испытуемых клеток.

Заключение

Наночастицы серебра одинаковой формы и размеров, синтезированные нами с различными стабилизаторами и имеющие различные значения ζ -потенциалов, обладали заметной разницей в проявлении биологических эффек-

тов в диапазоне концентраций 0,5–2,5 мкг/мл и при 24-часовой инкубации. В то время как наночастицы, стабилизированные β-циклодекстрином (ζ-потенциал -35,9 мВ), не оказывали никакого влияния на жизнедеятельность клеток, наночастицы, стабилизированные аэрозолем-ОТ (ζ-потенциал -89,4 мВ), проявляли ярко выраженную цитотоксичность, что подтверждено тестом на жизнеспособность, детекцией признаков апоптоза и некроза клеток, а также наблюдаемыми морфологическими изменениями клеточной культуры. Было обнаружено также, что при стабилизации аэрозолем-ОТ сам стабилизатор оказывал умеренное токсическое действие; нами был выделен вклад собственно наночастиц в угнетение жизнеспособности клеток путем вычитания токсического эффекта стабилизатора. Таким образом была определена разность эффектов двух видов наночастиц, которая могла быть обусловлена различием их поверхностных зарядов. В итоге оказалось, что токсический эффект наблюдается для наночастиц с большим ζ-потенциалом; отсюда можно сделать вывод о влиянии плотности заряда наночастиц серебра на их действие на клетки. Вместе с тем, очевидно, что для продвижения в понимании роли электростатических взаимодействий необходимы дальнейшие исследования. В частности, следует выяснить, каким образом поверхностный заряд наночастиц может влиять на процессы их проникновения в клетки и их внутриклеточное распределение. Также необходимо учитывать и изучать возможный вклад стабилизаторов в токсичность растворов наночастиц серебра, так как механизм токсичности стабилизатора может влиять на проявления токсичности наночастиц. Такие исследования в будущем позволят детализировать механизмы воздействия наночастиц серебра на клетки *in vitro* и прояснить роль поверхностного заряда этих наночастиц в развитии вызываемых ими патологических процессов на клеточном уровне.

References

1. Austin LA, MacKey MA, Dreaden EC, El-Sayed MA. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. *Arch Toxicol*. 2014;88:1391-1417.
2. Conde J, Doria G, Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. *J Drug Deliv*. 2012;2012:751075.
3. Doria G, Conde J, Veigas B, et al. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors*. 2012;12(12):1657-1687.
4. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009;27(1):76-83.
5. Lara HH, Garza-Trevino EN, Ixtapan-Turrent L, Singh DK. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J Nanobiotechnology*. 2011;9(1):30.
6. Dos Santos CA, Seckler MM, Ingle AP, et al. Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. *J Pharm Sci*. 2014;1-14.
7. Ong C, Lim JZZ, Ng C-T, et al. Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity. *Curr Med Chem*. 2013;20(6):772-781.
8. Egorova EM, Kaba SI, Kubatiev AA. Toxicity of silver nanoparticles obtained by bioreduction as studied on malignant cells: Is it possible to create a new generation of anticancer remedies? In: Grumezescu AM, ed. *Nanobiomaterials in Cancer Therapy*. Nanobiomat. Elsevier Inc.; 2016:505-542.
9. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol*. 2008;3:145-150.
10. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology*. 2014;12(1):5.
11. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 2012;14:1-16.
12. Asati A, Santra S, Kaittanis C, Perez JM. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano*. 2010;4(9):5321-5331.
13. Schaeublin NM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, et al. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale*. 2011;3(2):410-420.
14. Egorova EM, Kaba SI, Tlupova SA. Assessment of the Cytotoxicity of Silver Nanoparticles with Different Surface Charge. In: Bartul Z, Trenor J, eds. *Advances in Nanotechnology*. Vol.15. New York: Nova Science Publishers; 2016:25-48.
15. Egorova EM, Kubatiev AA, Shvets VI. Biological effects of metal nanoparticles. Moscow: Nauka; 2014.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
17. Vermes I, Haanen CI, Stephens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(95):39-51.
18. Willcoxon JP, Williamson RL, Baughman R. Optical properties of gold colloids formed in inverse micelles. *J Chem Phys*. 1993;98(June):9933-9950.
19. AshaRani P V, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009;3(2):279-290.
20. Arvizo RR, Miranda OR, Thompson MA, et al. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano Lett*. 2010;10(7):2543-2548.
21. Chithrani DB. Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures. *Mol Membr Biol*. 2010;27(7):299-311.
22. Kaba SI, Egorova EM. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol Sci Appl*. 2015;8:19-29.
23. Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, et al. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. *Langmuir*. 2012;28(5):2727-2735.
24. Kaur J, Tikoo K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food Chem Toxicol*. 2013;51:1-14.
25. Eom H-J, Choi J. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ Sci Technol*. 2010;44(21):8337-42.
26. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(3):733-737.

Сведения об авторах:

Каба Саид Ибрагимович (Kaba S.I.), науч. сотр. лаб. нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий, e-mail: said.kaba@gmail.com

Соколовская Алиса Анатольевна (Sokolovskaya A.A.), канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови

Тлупова Залина Алексеевна (Tlupova Z.A.), канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий

Егорова Елена Михайловна (Egorova E.M.), доктор хим. наук, зав. лаб. нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий, e-mail: emenano@mail.ru