

Цитотоксическое и стресс-индуцирующее действие наночастиц серебра на клетки линий HeLa и U937

Каба С.И., Игнашкова Т.И., Рыбаков А.С., Мещерский М.Е., Соколовская А.А.,
Юркив В.А., Московцев А.А., Егорова Е.М., Кубатиев А.А.

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

На фоне роста производства нанотехнологической продукции, которую всё шире используют в медицине, существует проблема недостатка систематизированной информации о токсических эффектах наночастиц металлов. Нами проведен анализ свойств наночастиц серебра, полученных методом биохимического синтеза с использованием восстановителей — флавоноидов, и их действия на клетки линий эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa и гистиоцитарной лимфомы человека U937. Метод биохимического синтеза разработан Е.М. Егоровой с соавторами и основан на синтезе наночастиц из солей металлов в обратных мицеллах — в тройной системе: водный раствор соли металла, ПАВ АОТ, неполярный растворитель. Методом динамического рассеяния света была проведена оценка агрегативной устойчивости наночастиц в сложных растворах — ростовых средах и установлено, что синтезированные наночастицы серебра в среде RPMI 1640 агрегируют при концентрации $80 \cdot 10^{-6}$ г-ион/л, в среде DMEM — в диапазоне концентраций $20 \cdot 10^{-6}$ г-ион/л — $80 \cdot 10^{-6}$ г-ион/л. Инкубация наночастиц с клетками в средах, обедненных двухвалентными катионами и хлорид-ионами, приводила к большей стабильности наночастиц на начальной фазе инкубации, однако, спустя 24 ч инкубации агрегаты по-прежнему детектировались. Анализ цитотоксичности методом МТТ партии наночастиц с концентрацией $4,03 \cdot 10^{-3}$ г-ион/л показал токсичность стабилизатора АОТ, в связи с чем была выполнена модификация метода синтеза наночастиц с целью уменьшения концентрации АОТ. Токсичность новой партии наночастиц с концентрацией $1,07 \cdot 10^{-6}$ г-ион/л определялась в существенной степени собственно металлическими наночастицами и была выше токсичности первой партии наночастиц на фоне меньшей цитотоксичности АОТ в связи со снижением концентрации стабилизатора. Использование альтернативного метода оценки токсичности наночастиц с использованием флуоресцеиндиацета в сочетании с пропиридиумом йодидом при 4-часовом воздействии не показала существенной токсичности наночастиц, что указывает на отсроченный механизм токсического действия наночастиц, опосредованный, вероятно, пертурбацией митохондриальной функции клеток. Проведенный анализ генерации активных форм кислорода в клетках HeLa, инкубированных с наночастицами серебра, показал нелинейную зависимость роста АФК от концентрации наночастиц, что может быть обусловлено агрегативной неустойчивостью наночастиц в концентрации свыше $80 \cdot 10^{-6}$ г-ион/л в ростовой среде DMEM.

Ключевые слова: наночастицы серебра, клеточный стресс, цитотоксичность

Введение

На фоне стремительного развития нанотехнологии и роста производства нанотехнологической продукции, которую всё шире используют в медицине, все большую обеспокоенность вызывает недостаточность систематизированной информации о взаимодействии разнообразных нанообъектов с живыми организмами, включая токсикологические аспекты этого взаимодействия. В частности, это касается создания и применения таких продуктов нанотехнологии, как наночастицы.

Наночастицы — это субкласс ультрадисперсных частиц с размерами 1—100 нм в двух или трех измерениях. Наночастицы условно подразделяют на:

- природные, возникающие в результате естественных процессов (например, коллоиды почв);
- наночастицы — побочные продукты человеческой деятельности или естественных процессов (образующиеся, например, в результате сварочных, фрезерных, шлифовальных работ или горения);
- искусственные наночастицы, произведенные с целью получения материала с определенными свойствами или химическим составом [1].

подавляющее большинство наночастиц — побочных продуктов — имеет пирогенное происхождение и сопряжено с вулканической деятельностью или горением, что, очевидно, не является новым явлением для окружающей среды.

Искусственные наночастицы классифицируют, как правило, по материалу, из которого они изготовлены: липосомы, полимерные (из хитозана) и керамические наночастицы, металлические наночастицы и др. [2]. Применение наночастиц в биомедицине разнообразно, но магистральными направлениями в разработке применений являются системы детекции макромолекул (в том числе рецепторов клеточных мембран и молекул сигнальных путей клетки) и разработка систем доставки лекарств [2, 17, 18].

Наночастицы металлов в растворах — новая интерпретация достаточно давно исследуемых коллоидных растворов металлов, подчеркивающая преобладание в коллоидном растворе наноразмерной фракции. Наночастицы металлов относятся к искусственным наночастицам и являются примером нанотехнологического продукта для непосредственного применения и целевого использования специфических свойств — в частности, в медицине для диагностических и терапевтических приложений. Наночастицы предполагается использовать для доставки лекарственных препаратов в целевые клетки и ткани (особенно в опухолевые) [20, 21], визуализации *in vitro* и *in vivo* [22—24], а также как терапевтическое средство само по себе. При этом препараты наночастиц вводятся непосредственно в организм или применяются местно. Несмотря на растущее применение наночастиц металлов в медицине, их действие на биологические объекты изучаются не

столь интенсивно, как это имеет место с наночастицами из других материалов (например, углеродных и полимерных). Учитывая вышесказанное, моделирование взаимодействия наночастиц металлов с клетками *in vitro* представляется адекватным способом анализа их биологических эффектов.

Известно, что металлические частицы нестабильны и стремятся к агрегации — на небольших расстояниях начинают действовать ван-дер-ваальсовы силы, и в отсутствие противодействующих сил нестабилизированный золь коагулирует. Новый метод синтеза наночастиц металлов, разработанный Е.М. Егоровой с соавторами, обладает рядом существенных преимуществ [4] и позволяет получать непосредственно в водных растворах высокоустойчивые наночастицы различных металлов с узким диапазоном размеров частиц. Синтезированные биохимическим способом искусственные наночастицы серебра как целевой нанотехнологический продукт являются новым материалом, поэтому исследование его взаимодействия с биологическими объектами приобретает особую актуальность.

Наше внимание к серебряными наночастицам обусловлено растущими перспективами этого металла в нанотехнологии. Наносеребро уже используется для производства товаров народного потребления, таких, как санитарно-гигиенические средства и дезодораторы. В медицине наночастицы серебра используют как потенциальный противомикробный, противовирусный и противогрибковый агент [19–22], а также как противомикробный агент для медицинских имплантатов [23, 24].

Основными современными сферами применения серебра являются промышленное производство, ювелирная промышленность и фотографическое дело [5]. Серебро широко применяется в медицине для протезирования, а также в комбинации с сульфадиазином, где оно выступает топическим антибактериальным агентом для лечения ожогов [6–9]. Растет популярность применения серебра в качестве пищевой добавки для лечения ряда заболеваний [10, 11].

Серебро не является биологически инертным материалом, поэтому для оценки цитотоксического потенциала собственно наночастиц серебра необходимо учитывать действие серебра в других состояниях на биологические объекты, из которых наиболее важным, безусловно, является серебро в ионизированном виде, т.е. в составе водорастворимых солей.

Наше исследование посвящено изучению взаимодействия наночастиц серебра, полученных методом биохимического синтеза, с клеточными линиями человека HeLa (эпителиоидной карциномы шейки матки) и U937 (гистиоцитарной лимфомы). Цели данного исследования — определение общей цитотоксичности данных наночастиц серебра на заявленных культурах клеток: определение выживаемости клеток, детекция окислительного стресса и поведение наночастиц в среде с клетками.

Методы исследования

1. Биохимический синтез наночастиц серебра

Для получения наночастиц серебра сначала готовили раствор кварцетина. Для этого его вводили в виде порошка в 0,15 М раствор АОТ в углеводороде. В получен-

ный раствор добавляли водный раствор нитрата серебра до концентрации серебра 3 ммоль при степени гидратации $w = 3,7$. После встряхивания в течение нескольких минут бесцветный раствор кварцетина приобретал интенсивную красно-коричневую окраску, что свидетельствовало о появлении наночастиц. Дальнейшие изменения в системе регистрировались по изменениям спектров оптического поглощения. Исходный лот №1 синтезированных наночастиц имел концентрацию 4,03 мг/л, лот №2 — 1,07 мг/л. В связи с высокой цитотоксичностью наночастиц лота №1 синтез лотов №2 и №3 был произведен с уменьшением конечной концентрации АОТ.

2. Культуры клеток

Линии клеток культивировали с применением стандартной технологии, включающей в себя наращивание и пересев. Адгезионные клетки HeLa растили на среде DMEM (GIBCO, «Invitrogen Corporation», США) с 10% БСА (GIBCO) в атмосфере 5%-ного углекислого газа, суспензионные U937 — RPMI1640 (GIBCO) с 10% БСА (GIBCO) в атмосфере 5%-ного углекислого газа. Пересев адгезионных клеток производился снятием с матрасов смесью трипсин 0,25% : версен 0,02%, расеевом с кратностью 1:3. Пересев суспензионных клеток производится с контролем плотности, для U937 плотность составляет $5,0 \cdot 10^5$ клеток/мл.

3. Инкубация клеток с наночастицами серебра

3.1. Инкубация суспензионных клеток U937 с наночастицами серебра

Клетки отбирали из матраса на стадии логарифмического роста, затем определяли концентрацию живых клеток и выживаемость на автоматическом счётчике клеток «Countess» («Invitrogen Corp.»). После подсчёта клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 (GIBCO) с 10% БСА, нагретой до 37°C, до концентрации $2,5 \cdot 10^5$ клеток/мл. Затем суспензию клеток вносили в лунки 96-луночной плашки, по 200 мкл на лунку, либо в лунки 12-луночной плашки, по 2 мл на лунку.

Наночастицы серебра вносили в лунки с клеточной суспензией до конечных концентраций 0,5; 1; 2; 4 и 8 мг/л. В качестве отрицательных контролей использовали все компоненты, входящие в состав раствора наночастиц серебра помимо собственно наночастиц: ионы серебра в виде нитрата серебра, АОТ и воду. Их вносили до конечных концентраций и в объёме, соответствовавшим таковым при максимальном объёме внесения наночастиц.

После внесения наночастиц и контролей суспензию клеток перемешивали, а плашку инкубировали в течение 4, 12 и 24 ч.

3.2. Инкубация адгезионных клеток HeLa с наночастицами серебра

Клетки снимали с матраса с помощью смеси трипсин 0,25% : версен 0,02%, отмывали с помощью центрифугирования в течение 5 мин при 1500 об./мин, затем определяли концентрацию живых клеток и выживаемость с помощью счётчика клеток «Countess». Затем клетки ресуспендировали до концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток/мл в среде DMEM с 10% БСА. Суспензию клеток вносили в лунки

96-луночной плашки, по 200 мкл на лунку (т.е. по $3 \cdot 10^4$ клеток на лунку), либо в лунки 12-луночной плашки, по 2 мл на лунку. Для прикрепления клеток плашку с ними инкубировали 24 ч.

Через 24 ч в лунки с клетками вносили наночастицы серебра до конечных концентраций 0,5; 1; 2; 4 и 8 мг/л. В качестве отрицательных контролей использовали все компоненты, входящие в состав раствора наночастиц серебра помимо собственно наночастиц: ионы серебра в виде нитрата серебра, АОТ и воду. Их вносили до конечных концентраций и в объёме, соответствовавшим таковым при максимальном объёме внесения наночастиц. Среду перемешивали, и плашку инкубировали 4, 12 и 24 ч.

4. Определение размеров наночастиц в ростовой среде с помощью метода динамического рассеяния света

Метод динамического светорассеяния объединяет набор различных техник, позволяющих измерять *in situ* размеры наночастиц в жидкости и распределение этих размеров. Принцип метода заключается в измерении времени флуктуаций интенсивности света, проходящего через раствор с НЧ, и оценке размера частиц на основании формулы Стокса—Эйнштейна [19]. Данные флуктуации порождаются броуновским движением исследуемых НЧ. Фактически, метод определения динамического светорассеяния определяет гидродинамический диаметр частиц, находящихся в броуновском движении. Определение гидродинамического диаметра частиц выполняется с помощью фотонной корреляционной спектроскопии, широко используемой в биофизических и физико-химических исследованиях.

В полную ростовую среду RPMI 1640 при комнатной температуре вносили наночастицы серебра лота №2 до концентраций 0,5; 1; 2; 4 и 8 мг/л, перемешивали и оставляли на 10 и 30 мин. Ту же процедуру проделывали с ростовой средой DMEM. Размер частиц в среде определяли методом динамического рассеяния света на анализаторе размеров частиц «Horiba LB-550» («HoribaLtd», Япония). В качестве контроля использовали ту же среду без добавления наночастиц.

5. Определение выживаемости клеток с помощью теста МТТ

Оценка выживаемости клеток методом кратковременной инкубации с солью тетразолия является одним из подходов к оценке токсичности наноматериалов [18]. При инкубации исследуемых клеток с МТТ, МТС и другими растворимыми соединениями тетразолия в течение 2—4 ч митохондриальные дегидрогеназы восстанавливают соль тетразолия до нерастворимого формазанового красителя пурпурного цвета, который затем растворяется каким-либо детергентом (как правило, диметилсульфоксидом). Полученный раствор красителя подвергается колориметрическому измерению, в результате которого регистрируют оптическую плотность раствора. Величина оптической плотности раствора формазана прямо пропорциональна активности дыхательной цепи в митохондриях клеток. На основании этого судят о жизнеспособности клеток, обработанных НЧ.

Клетки, полученные по окончании инкубации с наночастицами, отмывали однократно ФСБ и в каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 10 мкл раствора МТТ

(3[4,5-диметил-тиазол-2-ил] -2,5- дифенилтетразолия). Клетки в 96-луночной плашке отмывали от среды с НЧ. Для этого их центрифугировали в течение 5 мин при 447 g (1500 об./мин) в центрифуге «ЛМС-3000» («Biosan», Латвия), ресуспендировали в ФСБ при 37°C и вновь центрифугировали при тех же условиях. После отмывки в клетки вносили 80 мкл ФСБ при 37°C, затем — 20 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл (т.е. до конечной концентрации 1 мг/мл). Инкубировали 3 ч в инкубаторе.

По окончании инкубации из аккуратно отбирали ФСБ с МТТ и вносили 100 мкл диметилсульфоксида, после чего ставили плашку на орбитальный шейкер на 5 мин. После растворения формазана производили измерение абсорбции в планшетном анализаторе «Chameleon V» («Hidex», Финляндия) на длине волны 492 нм.

6. Определение выживаемости клеток с помощью флуоресцеиндиацетата в сочетании с пропидия йодидом

Проинкубированные с НЧ клетки отмывали от НЧ и окрашивали в смеси зондов флуоресцеиндиацетата и пропидия йодида в темноте, после чего суспензии клеток отмывали и анализировали на проточном цитометре «PAS» («Partec», США).

Возбуждение флуоресценции осуществлялось лазером с длиной волны 488 нм, эмиссия регистрировалась с помощью фотоумножителей каналов FL1, FL2, FL3. Данные визуализировали на 1-параметрических гистограммах.

7. Детекция активных форм кислорода

Для детекции уровня продукции активных форм кислорода использовали дихлорофлуоресцеиндиацетат (H_2DCFDA) — почти не флуоресцирующее соединение, легко проникающее сквозь клеточную мембрану в клетку и гидролизующееся внутриклеточными эстеразами до 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCFH). Также не флуоресцирующее соединение DCFH, в свою очередь, окисляется реактивными формами кислорода до 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF) с высоким уровнем флуоресценции.

В качестве положительного контроля служили клетки, инкубированные 30 мин с пероксидом водорода в конечной концентрации 10 ммоль/л. Отрицательным контролем служили клетки с добавленным эквивалентным объемом воды. По окончании инкубации с НЧ клетки отмывали однократно в ФСБ и в каждую лунку 96-луночного планшета вносили краситель H_2DCFDA («Invitrogen Corp.», США) до конечной концентрации 1 мкмоль/л. Для учёта числа клеток в лунках использовали флуоресцентный зонд Hoechst 33342 («Invitrogen Corp.»). Клетки инкубировали 30 мин, затем однократно отмывали ФСБ, после чего детектировали флуоресценцию DCF при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 535 нм; флуоресценция Hoechst 33342 — при 355 нм возбуждения и 460 нм эмиссии на планшетном анализаторе «Chameleon V».

8. Статистическая обработка результатов

Производилась с помощью программного обеспечения «Statisticaver 6.0» («StatSoftInc», США), а также «Microsoft Excel». Использовались однофакторный дисперсионный анализ и критерий Краскела—Уоллиса. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

1. Инкубация наночастиц серебра с клетками

В исследовании мы использовали две клеточные линии человека для исследования их взаимодействия с НЧ серебра, стабилизированного АОГ, — адгезионную линию HeLa и суспензионную U937. Первый случай эквивалентен «двумерным» клеточным слоям (при конfluence), второй представляет собой трехмерную культуру, взаимодействующую с НЧ в объеме.

Добавление НЧ серебра Лота №2 в концентрации выше $4 \cdot 10^{-6}$ г/л в ФСБ, полную ростовую среду, DMEM или RPMI1640 приводило к образованию визуализируемых микроскопически агрегатов (рис. 4).

Для исследования возможности уменьшения агрегативной неустойчивости коллоидного серебра при добавлении к клеткам была произведена подбор специализированной инкубационной среды — ростовая среда была заменена на буфер со сниженной ионной силой, не содержащий двухвалентных катионов, хлорид-ионов. Скорость процесса агрегации НЧ в концентрации выше $4 \cdot 10^{-6}$ г/л в этом буфере при инкубации с клетками U937 и HeLa была существенно ниже. Однако после 24 часов инкубации агрегаты визуализировались. Это может быть обусловлено рядом факторов, среди которых уменьшение стерической стабилизации наночастиц, увеличение ионной силы буфера и снижение pH в результате жизнедеятельности клеток. В контрольных препаратах наночастиц с идентичными концентрациями образование агрегатов не наблюдалось, и стабильность их сохранялась в течение нескольких месяцев и более.

2. Исследование агрегативной устойчивости наночастиц серебра в полной ростовой среде методом лазерного динамического светорассеивания

Стабильность НЧ серебра в полных ростовых средах DMEM и RPMI исследовалась с помощью метода динамического рассеяния света.

Измерения, произведенные через 10 мин после добавления НЧ в среду RPMI, показали, что средний размер частиц, присутствовавших в среде после внесения НЧ, составлял $(9 \pm 0,5)$ нм для концентраций $5 \cdot 10^{-6}$; $1 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-5}$ г/л, а также $(12,3 \pm 0,5)$ нм для концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ г/л (рис. 5, А–В). В контроле (среда без НЧ) определялись частицы со средним размером $(9,4 \pm 0,4)$ нм, представляющие собой, по-видимому, белковую фракцию ростовой среды (преимущественно альбумин).

Детектированные в контроле частицы затрудняют дифференциальную идентификацию фракции НЧ в инкубационной среде. Тем не менее, для суспензии наночастиц в ростовой среде характерно увеличение дисперсии размеров частиц и смещение медианы фракции, равной 10 нм.

При концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ г/л наблюдались частицы со средними размерами (250 ± 50) и (570 ± 80) нм (рис. 5, Г). Это может свидетельствовать об агрегации НЧ в ростовой среде при данной концентрации, что согласуется с результатами микроскопических наблюдений.

Проведенное через 30 мин исследование не выявило заметных отличий в стабильности препаратов НЧ в среде с концентрациями вплоть до $4 \cdot 10^{-5}$ г/л. Для препарата

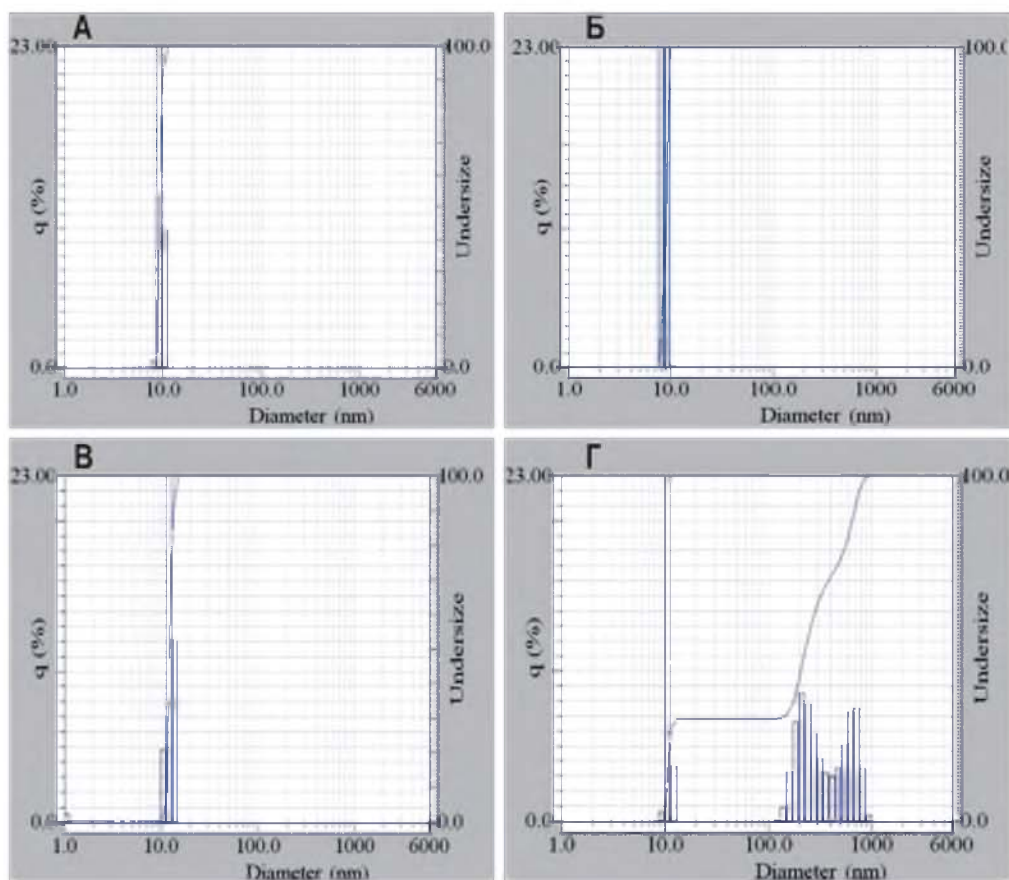


Рис. 2. Распределение частиц по размерам в среде при различных концентрациях наночастиц серебра (лот №2):

А — контроль (среда RPMI 1640 без добавления наночастиц); Б — концентрация $2 \cdot 10^{-5}$ г/л; В — концентрация $4 \cdot 10^{-5}$ г/л; Г — концентрация $8 \cdot 10^{-5}$ г/л (метод динамического рассеяния света), время инкубации 10 мин.

с концентрацией $8 \cdot 10^{-5}$ г/л комплексы не обнаруживались, при этом наблюдалось образование крупных агрегатов и их преципитация.

Исследование агрегативной устойчивости НЧ в ростовой среде DMEM после 10-минутной инкубации показало, что для всего диапазона концентраций $2 \cdot 10^{-5}$ г/л — $8 \cdot 10^{-5}$ г/л определялись сравнительно крупные частицы с широким распределением размеров от 100 до 1000 нм.

Таким образом, наночастицы серебра лота №2 в среде RPMI 1640 агрегируют при концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ мг/л, в среде DMEM — в диапазоне концентраций $2 \cdot 10^{-5}$ — $8 \cdot 10^{-5}$ г/л.

3. Определение выживаемости клеток методом теста МТТ

При выборе основного метода оценки цитотоксичности НЧ в водных растворах исходили из предположения, что их действие на клетку может быть обусловлено не только прямым мембранотропным эффектом, но и являться результатом цепи внутриклеточных событий после возможного попадания НЧ в клетку и иметь, таким образом, возможный отсроченный эффект. Для определения общей цитотоксичности был использован МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый МТТ в окрашенный формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Характер зависимости оптического поглощения от количества клеток в 1 мл суспензии для культур клеток HeLa и U937 близок к линейному в рабочем диапазоне концентраций клеточных суспензий (данные не приведены).

Тесту на цитотоксичность были подвергнуты первоначально наночастицы лота №1.

Клетки линий HeLa и U937 инкубировали с наночастицами лота №1 (концентрация наночастиц $4 \cdot 10^{-6}$ г/л) в течение двух временных интервалов — 4 и 24 ч.

Проведенный анализ показал, что АОТ вносит существенный вклад в цитотоксичность водных растворов наночастиц лота №1, значительно снижая жизнеспособность клеток обеих линий при двух временных интервалах инкубации. При этом клетки U937 оказались более чувствительны к АОТ. Наблюдаемая токсичность затрудняет анализ свойств собственно НЧ серебра.

Для увеличения стабильности НЧ применялась инкубация клеток в буфере со сниженными концентрациями двухвалентных катионов металлов. Однако было установлено, что буфер снижает выживаемость клеток в среднем на ~20% при 24-часовой инкубации. С учетом этого явления, а также факта агрегативной неустойчивости НЧ в данном буфере последующие эксперименты проводили в ростовой среде.

Для уменьшения цитотоксического действия АОТ метод биохимического синтеза был адаптирован с целью получения НЧ со сниженной концентрацией стабилизатора. В результате были синтезированы наночастицы серебра концентрацией $1,07 \cdot 10^{-3}$ г/л (лот №2).

Инкубации для временных интервалов 4 ч, 24 ч для обеих линий проводили в ростовой среде (рис. 4, 5).

На графиках с целью сравнения частично приведены кривые цитотоксичности для НЧ лота №1 из рис. 3. Полученные данные позволяют утверждать, что модификация метода биохимического синтеза привлекла снижению цитотоксичности АОТ.

Таким образом, водные растворы наночастиц лота №2 обладают цитотоксичностью, которую нельзя отнес-

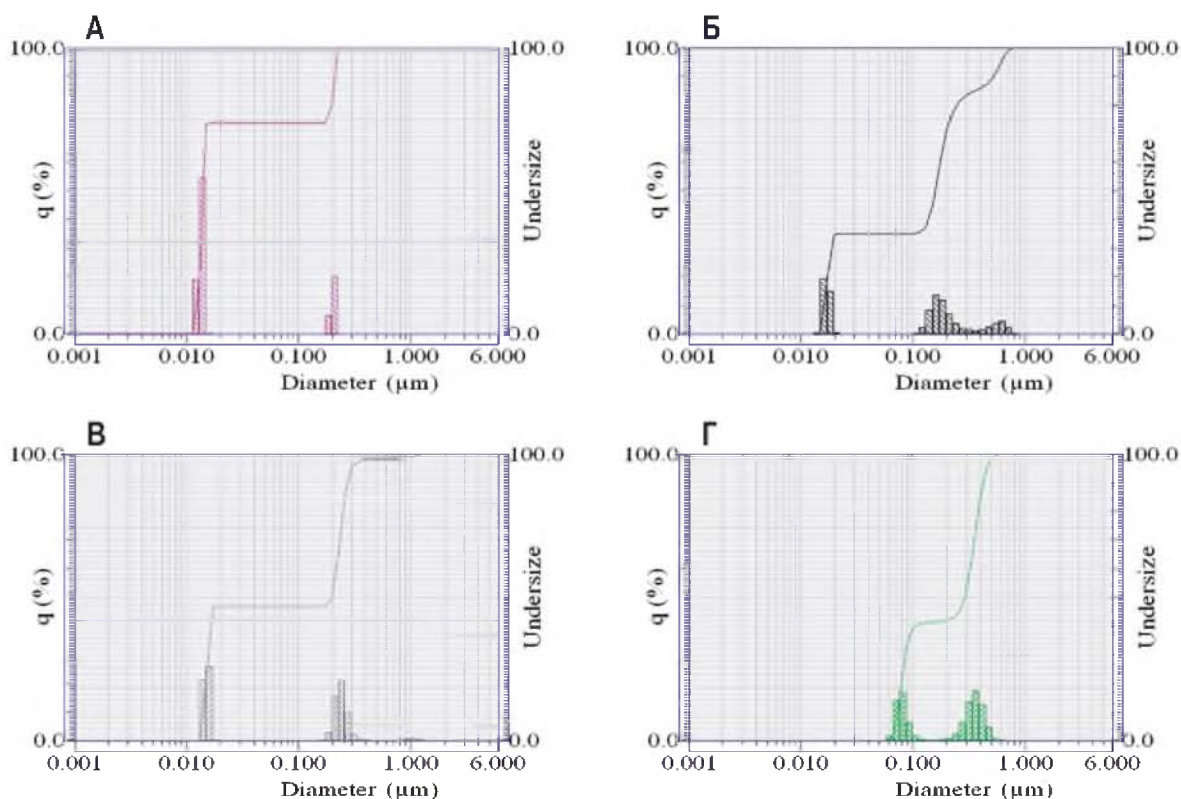


Рис. 3. Распределение частиц по размерам в среде при различных концентрациях наночастиц серебра (лот №2): А — контроль (среда DMEM без добавления наночастиц); Б — концентрация $2 \cdot 10^{-5}$ г/л; В — концентрация $4 \cdot 10^{-5}$ г/л; Г — концентрация $8 \cdot 10^{-5}$ г/л (метод динамического рассеяния света), время инкубации 10 мин.

ти к АОТ и, которая, по-видимому, присуща собственно НЧ серебра. На диаграммах видно, что токсичность НЧ серебра достоверно выше контролей — серебра в ионном виде и АОТ. Интересно, что наночастицы лота №2 для клеток HeLa (рис. 4), в целом, более токсичны, чем водный раствор наночастиц лота №1 при равных концентрациях. Это явление довольно сложно объяснить, возможно, это связано с большей стабильностью наночастиц лота №2 в ростовой среде и соответственно их меньшей агрегацией и большей площадью взаимодействия с клетками. В случае лота №1 токсичность, по-видимому, в большей степени определяется АОТ по причине возможно меньшей стабильности наночастиц лота №1 в растворах с высокой ионной силой, так как агрегация, по-видимому, снижает собственную токсичность наночастиц. Еще один, безусловно, влияющий фактор — это тип клеток, так как для U937 такой закономерности не наблюдается.

4. Цитотоксичность наночастиц серебра, определенная флуоресцеиндиацетатом в сочетании с пропидиума йодидом

Для структурирования цитотоксичности нами была произведена оценка выживаемости клеток U937 альтернативным методом — флуоресцеиндиацетата в сочетании с пропидиума йодидом. Флуоресцеиндиацетат проникает в жизнеспособную клетку, и сравнительно быстро метаболизируется цитоплазматическими эстеразами в флуоресцирующее соединение — флуоресцеин. Пропидия йодид неспособен преодолевать мембраны жизнеспособных клеток, он интеркалирует в ДНК погибших клеток или клеток с нарушенными мембранами, при этом существенно возрастает квантовый выход эмиссии флуоресценции. В результате применения комбинации двух флуоресцентных зондов становится возможным дифференцировать живые и погибшие клетки по спектру эмиссии флуоресценции. Анализ клеточных суспензий осуществлялся с применением проточной цитометрии.

Как видно из рис. 8, инкубация в течение 4 ч с водными растворами наночастиц Лота №2 при концентрации $1,07 \cdot 10^{-6}$ г/л не приводила к регистрируемому снижению выживаемости клеток. Необходимо отметить, что цветовая компенсация не проводилась ввиду технических особенностей проточного цитометра.

5. Детекция активных форм кислорода

Одним из факторов токсичности НЧ серебра, по нашему предположению, является генерация активных форм кислорода. Для проверки этого в клетках HeLa и U937 после 4-часовой инкубации в фосфатно-солевом буфере с НЧ в диапазоне концентраций $0,5-8 \cdot 10^{-6}$ г/л определяли общий уровень АФК по интенсивности флуоресценции зонда H_2DCFDA , нормированной по величине флуоресценции зонда Hoechst 33342. Зонд H_2DCFDA после транспорта в цитоплазму метаболически трансформируется. Примененный нами метод детекции позволяет оценить суммарную — внеклеточную и внутриклеточную — продукцию АФК.

Наночастицы серебра по сравнению с ионами серебра, стабилизатором АОТ, смесью стабилизатора АОТ и ионизированного серебра приводили к увеличению флуоресценции DCF, что коррелирует с более высоким уровнем АФК. График зависимости интенсивности флуоресцен-

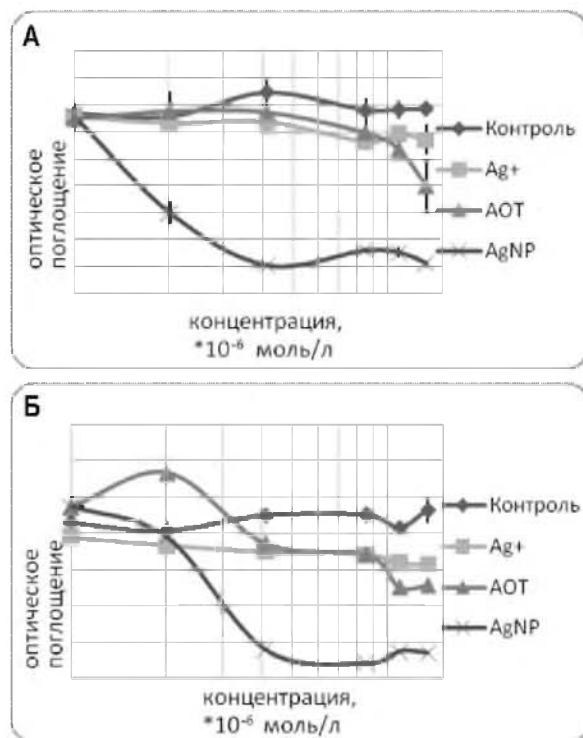


Рис. 4. Цитотоксичность водных растворов наночастиц (лот №2) в сравнении с лот №1 для культур клеток HeLa: А — инкубация 4 ч; Б — инкубация 24 ч, тест МТТ.

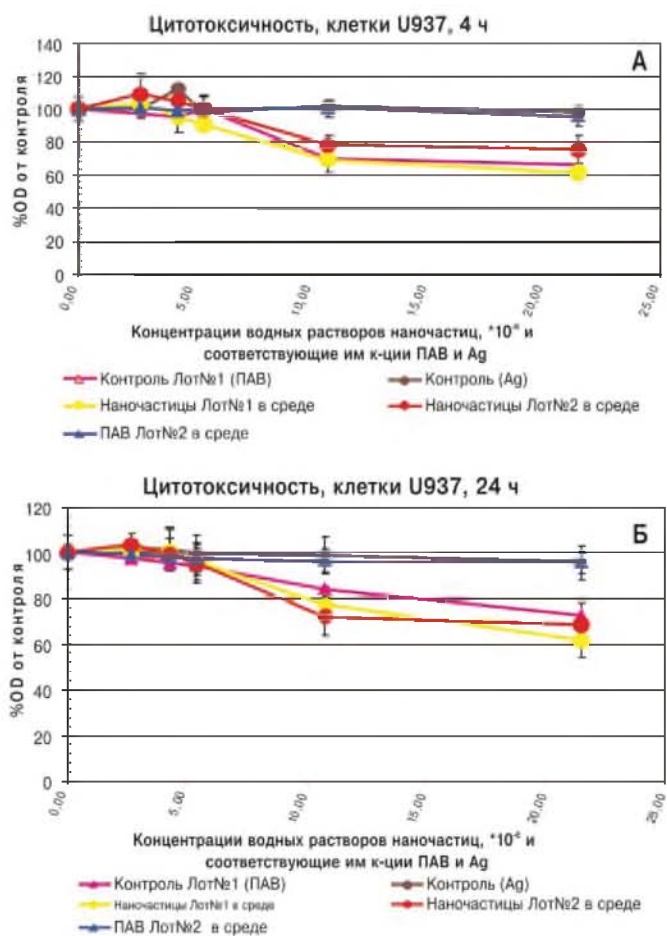


Рис. 5. Цитотоксичность водных растворов наночастиц (лот №2) в сравнении с лот №1 для U937: А — инкубация 4 ч; Б — инкубация 24 ч, тест МТТ.



Рис. 6. Цитотоксичность для интервала инкубации 4 ч водных растворов наночастиц (Лот №2) методом окрашивания флуоресцеиндиацетатом и пропидия йодидом для клеток линии U937: А — отрицательный контроль; Б — $10,7 \cdot 10^{-6}$ г/л водный раствор наночастиц; В — прямое и боковое светорассеивание; Г — положительный контроль.

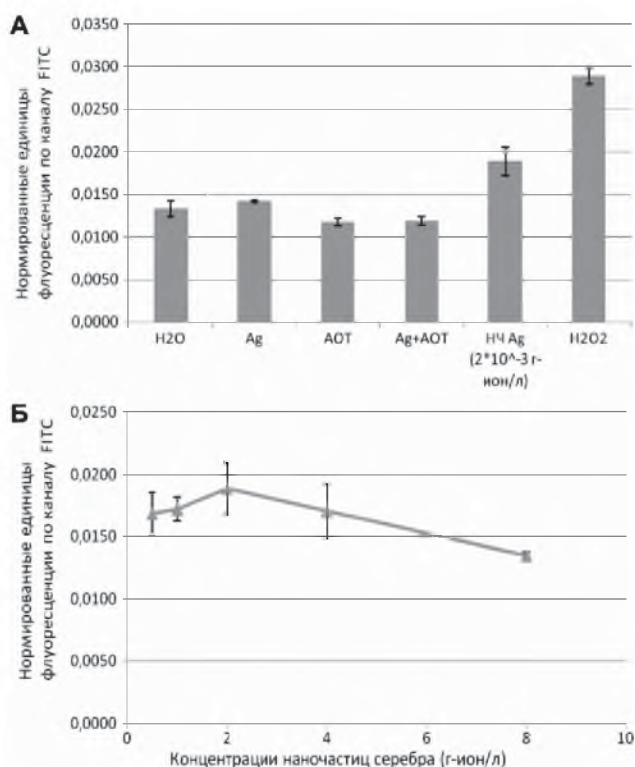


Рис. 7. А — продукция АФК клетками HeLa при 4-часовой инкубации с контрольными препаратами и наночастицами серебра; Б — зависимость продукции АФК клетками HeLa от концентрации наночастиц в ростовой среде при 4-часовой инкубации.

ции DCF от концентрации НЧ имеет излом и максимум приходится на концентрацию около $2 \cdot 10^{-6}$ г/л. Более высокие концентрации вызывают не рост продукции АФК, а, наоборот, снижению. По-видимому, наблюдаемое явление отчасти можно связать с процессом агрегации, наблюдающимся для концентраций свыше $4 \cdot 10^{-6}$ г/л. Образование комплексов приводит к уменьшению общей площади фракции НЧ и, как следствие, уменьшению цепной реакционной способности в генерации АФК.

Интересно, что присутствие стабилизатора АОТ привело к снижению содержания АФК.

Обсуждение

В нашей работе было проанализировано взаимодействие НЧ серебра, полученных методом биохимического синтеза [4], с клетками линии эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa и гистиоцитарной лимфомы человека U937. Инкубация клеток с наночастицами разной продолжительности была выбрана как модель воздействия НЧ на клетки в водной фазе.

Известно, что нестабильность и агрегация металлических наночастиц, обусловленная ван-дер-ваальсовыми силами, может быть преодолена двумя способами — электростатической стабилизацией и стерической стабилизацией. Метод биохимического синтеза с использованием ПАВ АОТ обеспечивает стерическую и электростатическую стабилизацию НЧ серебра. Однако, взаимодействие стабилизированного коллоида с биологическими средами, в частности, ростовой средой, цитоплазмой клеток, на концентрациях свыше $4 \cdot 10^{-3}$ г/л приводит к неравновесной агрегации с образованием микроскопически визуализируемых комплексов НЧ.

Известно, что электростатически стабилизированные золи могут коагулировать, если ионная сила среды существенно увеличивается. По всей видимости, это являлось основной причиной дестабилизации наночастиц при инкубации в ростовой среде и в значительной степени преодолевалось при применении буфера со значительно сниженной ионной силой. Тем не менее, агрегация НЧ, хотя и существенно более медленная, продолжалась и в условиях инкубации в буфере со сниженной ионной силой. Известно, что поверхностный заряд наночастиц может быть также уменьшен за счет замены адсорбированных анионов более аффинными нейтральными абсорбатами, что также может привести к агрегации. Приобретение заряда неорганическими поверхностями, включая металлы, было продемонстрировано при контакте с органическими фазами, такими, как растворители и полимеры [13]. По-видимому, эти факторы, а также растущая ионная сила в результате жизнедеятельности клеток приводили к агрегации НЧ. Увеличение стабильности НЧ при инкубации с клетками путем изменения состава ростовой среды является искусственной мерой, отдаляющей модель взаимодействия от условий *in vivo*.

Наблюдавшаяся агрегация НЧ в ростовой среде — явление, которое следует считать этапом трансформации НЧ металлов в биологических средах. Образование агрегатов НЧ и сложных комплексов, например, с белками является, по-видимому, фактором, влияющим на биологическую активность НЧ и в, частности, их цитотоксичность.

Известно, что способность металла индуцировать токсические эффекты зависит от нескольких факторов — растворимости металла, его способности связываться с биологическими сайтами и макромолекулами, метаболической трансформации, экскреции и биодеградации комплексов металлов (Weir, 1979).

В нашем исследовании мы провели анализ цитотоксичности НЧ двумя методами — МТТ и окрашиванием флуоресцеиндиацетатом в сочетании с пропидия йодидом. В связи с тем, что МТТ-тест основан на оценке ферментативной активности митохондриальных дегидрогеназ, зафиксированное снижение превращения МТТ в формазан может быть вызвано как минимум двумя факторами: изменением количества жизнеспособных клеток в результате их гибели, индуцированной цитотоксическим агентом, и влиянием веществ на метаболизм. Второй метод оценки цитотоксичности НЧ, использованный в работе, основан на проницаемости плазматической мембраны и активности эстераз. Для временной точки 4 ч цитотоксичность, регистрируемая методом МТТ, достоверно выше проанализированной методом ФДА/ПИ. Совокупность этих фактов может указывать на изменение митохондриальной функции в инкубированных с НЧ клетках. Это наблюдение совпадает с рядом других работ. В частности, митохондриальная функция была существенно снижена в клетках линии BRL 3А инкубированных с НЧ серебра при концентрации 5—50 мг/л [15, 16].

На основе данных, полученных методом МТТ, можно заключить, что для клеток U937 токсичность водных растворов наночастиц Лота №2 при концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ г/л находится на уровне ~32% для 24-часовой инкубации, ~24,5% для 4-часовой инкубации; для клеток HeLa при концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ г/л ~29% для 24-часовой инкубации, ~27% для 4-часовой инкубации. Токсичность НЧ выше, чем эквимольных контролей ПАВ, нитрата серебра, что может говорить о наличии специфической компоненты в действии НЧ. Инкубация в буфере со сниженной ионной силой может приводить к совокупному токсическому эффекту со стабилизатором АОТ, и максимальная токсичность водного раствора НЧ при инкубации отчасти может быть обусловлена именно этим.

Среди возможных механизмов индуцированного НЧ повреждения клеток, наиболее значимы модификация клеточных компонентов и генерация АФК [3,18]. Возможные пути продукции АФК наночастицами отличаются в зависимости от их типа. Для НЧ металлов известны следующие варианты:

- 1) распад НЧ и высвобождение ионов металлов;
- 2) переходные металлы на поверхности наноматериала (например, Fe^{2+} на углеродной нанотрубке или металлической наночастице) могут генерировать синглетный кислород посредством реакции Фентона.

Помимо присущей наноматериалам непосредственной способности к генерации АФК, другие их свойства, обуславливающие взаимодействие с клеточными структурами, могут привести к генерации АФК. Возможно, что искусственные НЧ, не обладающие ни полупроводниковыми свойствами, ни свойством ультрафиолетовой активации, ни характеристиками переходных металлов, тем не менее, могут привести к генерации АФК за счет пертурбации митохондриальной функции — нарушению дыхательной цепи во внутренней мембране митохондрий. В ча-

стности, катионные полистироловые наносферы индуцируют повреждения лизосом, митохондрий, продукцию АФК, что может в конечном итоге привести к апоптозу, что и имело место, в частности, для мышинных макрофагов [21].

В нашем исследовании мы зафиксировали увеличение продукции АФК при инкубации клеток линий HeLa и U937 с НЧ серебра. Пик генерации АФК для 4-часовой инкубации приходился на концентрацию $2 \cdot 10^{-6}$ г/л, для 24-часовой — $1 \cdot 10^{-6}$ г/л для клеток HeLa. Снижение уровня АФК при сравнительно высоких концентрациях НЧ мы связываем с агрегативной их неустойчивостью. По-видимому, длительные инкубации, в результате которых более существенно изменяется состав ростовой инкубационной среды, приводят к агрегации НЧ в сравнительно меньших концентрациях. Образование агрегатов приводит к снижению реакционноспособной площади фракции НЧ, что и может являться возможной причиной снижения АФК. Однако для уточнения механизмов генерации АФК при инкубации клеток с НЧ серебра требуются дополнительные исследования.

Обнаруженное нами увеличение уровня АФК может являться фактором цитотоксичности. Если предположить возможность высвобождения ионов серебра наночастицей, то ввиду их высокой аффинности к тиоловым группам следует ожидать снижение антиоксидантной функции клетки и развитие окислительного стресса.

Список литературы

1. Long T.C., Saleh N., Tilton R.D., Lowry G.V., Veronesi B. Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity // *Environ. Sci. Technol.* — 2006. — 40(14). — P. 4346—4352.
2. Norwegian Pollution Control Authority Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles. Report no. TA 2304/2007 / Eds.: E.J. Joner, T. Hartnik, C.E. Amundsen. — *Bioforsk. As.* 64. — P. 200.
3. Monteiro-Riviere N., Inman A. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin // *Carbon.* — 2006. — 44 (6). — P. 1070—1078.
4. Егорова Е.М. Наночастицы металлов в растворах: биохимический синтез и применение // *Нанотехнология.* — 2004. — №1. — С. 15—26.
5. GFMS (2004) World silver survey 2004-a summary. — Washington DC: The Silver Institute; London, UK: Gold Fields Mineral Services. ISBN 1-880936-12-7.
6. Modak S.M., Sampath L., Fox C.L. Jr. Combined topical use of silver sulfadiazine and antibiotics as a possible solution to bacterial resistance in burn wounds // *J. Burn Care Rehabil.* — 1988. — 9. — P. 359—363.
7. Fox C.L., Rao T.N.V., Azmeth R. et al. Comparative evaluation of zinc sulfadiazine and silver sulfadiazine in burn wound infection // *J. Burn Care Rehabil.* — 1990. — 11. — P. 112—117.
8. Fuller F.W., Parrish M., Nance F.C. A review of the dosimetry of 1% silver sulfadiazine cream in burn wound treatment // *J. Burn Care Rehabil.* — 1994. — 15. — P. 213.
9. Pruitt B.A. Jr, McManus A.T., Kim S.H. et al. Burn wound infections: current status // *World J. Surg.* — 1998. — 22. — P. 135—145.
10. Gulbranson S.H., Hud J.A., Hansen R.C. Argyria following the use of dietary supplements containing colloidal silverprotein // *Cutis.* — 2000. — 66. — P. 373—376.
11. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2003. — 27. — P. 341—353.
12. ATSDR. Toxicological Profile for Silver. TP-90-24. — Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990.
13. Fung M.C., Bowen D.L. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment // *Clin. Toxicol.* — 1996. — 34. — P. 119—126.

14. Baldi C., Minoia C., Di Nucci A. et al. Effects of silver in isolated rat hepatocytes // *Toxicol. Lett.* — 1988. — 41. — P. 261–268.
15. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles // *Small.* — 2008. — 4(1). — P. 26–49.
16. Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells // *Toxicol. in Vitro.* — 2005. — 19. — P. 975–983.
17. Nanoparticles: From Theory to Application / Ed. by Gunter Schmid. — Copyright 8 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
18. Asha Rani P.V., KahMun G.L., Hande M.P., Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells // *ACS Nano.* — 2009. — 3 (2). — P. 279–290.
19. Ahamed M., Karns M., Goodson M et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells // *Toxicol. App. Pharmacol.* — 2008. — 233. — P. 404–410.
20. Kingsley J.D., Dou H., Morehead J. et al. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system // *J. Neuroimmune Pharmacol.* — 2006. — 1. — P. 340–350.
21. Holback H., Yeo Y. Intratumoral drug delivery with nanoparticle carriers // *Pharm. Res.* — 2011. — 28. — P. 1819–1830.
22. Altinoglu E.I., Adair J.H. Near infrared imaging with nanoparticles. Wiley interdisciplinary reviews // *Nanomedicine and nanobiotechnology.* — 2010. — 2 (5). — P. 461–477.
23. Bentolila L., Ebenstein Y., Weiss S. Quantum dots for in vivo small-animal imaging // *Journal of nuclear medicine.* — 2009. — 50 (4). — P. 493–496.
24. Minchin R.F., Martin D.J. Nanoparticles for Molecular Imaging — An Overview // *Endocrinology.* — 2010. — 151. — P. 474–481.

Посмунна 27.12.2012

Cytotoxic and stress-inducing effects of the silver nanoparticles to HeLa and U937 cells

Kaba S.I., Ignashkova T.I., Rybakov A.S., Mesherskiy M.E., Sokolovskaya A.A., Yurkiv V.A., Moskovtsev A.A., Egorova E.M., Kubatiev A.A.

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS,
Russia, 125315, Moscow, Baltijskaya St., 8

Amid rising of nanotechnology production, which are increasingly used in medicine, there is a problem of lack of systematic information on the toxic effects of metal nanoparticles. We analyzed the properties of the silver nanoparticles obtained by biochemical synthesis using reductants — flavonoids — and their effect on cells of the cervix epitheloid carcinoma HeLa and human histiocytic lymphoma U937. Biochemical synthesis method developed Egorova E.M. et al., based on the synthesis of nanoparticles of metal salts in reverse micelles — a ternary system: an aqueous metal salt solution, the surfactant AOT, nonpolar solvent. By dynamic light scattering it was evaluated the nanoparticle aggregate stability in complicated solutions — growth media. We found that synthesized silver nanoparticles aggregate at a concentration of $80 \cdot 10^{-6}$ g ion / liter in RPMI 1640 medium, in a medium DMEM — in a concentration range of $20 \cdot 10^{-6}$ g ion / liter — $80 \cdot 10^{-6}$ g — ion/l, incubation of nanoparticles with the cells in an environment depleted of divalent cations, and chloride ions leads to greater stability of the nanoparticles in the initial phase of incubation, however, after 24h incubation, aggregates still detected. MTT Cytotoxicity Assay was performed using nanoparticles at a concentration of $4.03 \cdot 10^{-6}$ g ion/l, and stabilizer AOT showed significant toxicity, due to that the modification of the method of synthesis of the nanoparticles has been done in order to reduce the concentration of AOT. The toxicity of a new batch of nanoparticles with a concentration of $1.07 \cdot 10^{-6}$ g ion/l determined in substantially proper metallic nanoparticles and toxicity was higher for the first batch of nanoparticles less cytotoxicity against AOT due to lower concentration of the stabilizer. Using an alternative method for assessing the toxicity of nanoparticles using Fluorescein diacetate 5(6)-isothiocyanate combined with propidium iodide for 4h exposure showed no significant toxicity of nanoparticles, indicating that probably the mechanism of delayed toxic effects of nanoparticles takes place and it is mediated probably by perturbations of mitochondrial function of the cells. The analysis of reactive oxygen species in HeLa cells, incubated with silver nanoparticles, showed a nonlinear dependence of growth of ROS concentration of nanoparticles that may be caused by instability of aggregation of nanoparticles in the growth medium.

Key words: nanoparticles, cell stress, cytotoxicity