

УДК 57.044:5.76.52:615.31

## ТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ НА КОСТНОМОЗГОВЫЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

<sup>1</sup>Лыков А.П., <sup>2</sup>Лыкова Ю.А., <sup>1</sup>Бондаренко О.В., <sup>1</sup>Повешенко О.В., <sup>1</sup>Суровцева М.А.,  
<sup>3</sup>Гайдун К.В., <sup>4</sup>Душкин А.В., <sup>1</sup>Коненков В.И.

<sup>1</sup>НИИКЭЛ, Новосибирск;

<sup>2</sup>НГТУ, Новосибирск;

<sup>3</sup>НИИФКИ, Новосибирск;

<sup>4</sup>ИХТТМ СО РАН, Новосибирск, e-mail: aplykov2@mail.ru

Проведено исследование эффекта прекондиционирования мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток с наноструктурированными частицами диоксида кремния. Показано, что наночастицы диоксида кремния подавляют адгезию к пластику и пролиферацию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток по мере возрастания концентрации наночастиц диоксида кремния. В основе подавления пролиферации мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток лежит активация апоптоза клеток.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, наночастицы диоксида кремния, пролиферация, адгезия, клеточный цикл, МТТ-тест

## TOXIC EFFECT OF THE NANOSTRUCTURED SILICON DIOXIDE PARTICLES ON MARROWY MULTIPOTENTNY MESENCHYMAL STEM CELLS

<sup>1</sup>Likov A.P., <sup>2</sup>Lykova Y.A., <sup>1</sup>Bondarenko O.V., <sup>1</sup>Poveshchenko O.V., <sup>1</sup>Surovtseva M.A.,  
<sup>3</sup>Gaydul K.V., <sup>4</sup>Dushkin A.V., <sup>1</sup>Konenkov V.I.

<sup>1</sup>NIKEL, Novosibirsk;

<sup>2</sup>NSTU, Novosibirsk;

<sup>3</sup>CIFKI, Novosibirsk;

<sup>4</sup>ISSCM SB RAS, Novosibirsk, e-mail: aplykov2@mail.ru

It has been studied the effects of precondition multiple mesenchymal stem cells with nanostructured particles of colloidal silicon dioxide. It is shown that silica nanoparticles suppress adhesion to plastic and proliferation of multipotent mesenchymal stem cells in process of increase of concentration of nanoparticles. The activation of apoptosis in cells is the bases of suppression of multipotent mesenchymal stem cells.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stem cells, nanoparticles of silicon dioxide, proliferation, adhesion, cell cycles, MTT-test

В последнее время особый интерес представляют наноматериалы из наноструктурированных частиц диоксида кремния (SiO<sub>2</sub>-нч) в виде аморфной (кремнезем) и кристаллической (кварц) модификации [2, 4-9]. Форма частиц близка к сферической, а размер с учетом условий получения варьирует от 5 до 80 нм. При попадании в организм SiO<sub>2</sub>-нч они биodeградируют в почках до орто-кремниевой кислоты и выводятся с мочой [9]. Поэтому SiO<sub>2</sub>-нч рассматриваются как перспективный, биосовместимый и биodeградируемый материал способный проникать в внутрь клетки, для разработки на его основе лекарственных препаратов и диагностических средств [2].

С другой стороны, достижения в клеточных технологиях позволили в последнее время получать в достаточном количестве аутологичные мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК). ММСК обладают противоспалительной активностью, способны стимулировать процессы неoангиогенеза в зоне ишемии органов

и тканей, способны к цитодифференцировке в адипогенном, остеогенном, хондрогенном и миогенном направлениях, а функциональная активность ММСК регулируется различными факторами внешней и внутренней среды [3].

В тоже время, нет единого мнения о токсичности SiO<sub>2</sub>-нч, в частности при концентрациях свыше 190 мкг/мл отмечен токсический эффект на эпителиальную клеточную линию человека, а при внутрибрюшинном введении SiO<sub>2</sub>-нч в дозе 50 мкг/кг мышам отмечается активация перитонеальных макрофагов [7].

С учетом вышеизложенного, целью исследования стало изучение влияния прекондиционирования с SiO<sub>2</sub>-нч на морфофункциональные свойства костномозговых ММСК крыс Wistar.

### Материалы и методы исследования

Коллоидный диоксид кремния (энтеросорбент «Полисорб», Россия) подвергали механической обработке в шаровой мельнице (энергонапряженность 1г) для получения большего количества мелкодисперсных

(менее 5 мкм)  $\text{SiO}_2$ -нч. Эксперименты на 5 крысах-самках линии Wistar с массой 300-350 г. проведены в соответствии с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000). Ядросодержащие клетки костного мозга получали при помощи перфузии бедренных костей лабораторных животных и использовали для выделения ММСК. Для этого ядросодержащие клетки костного мозга ресуспендировали в среде DMEM (Биолот, СПб) и пропускали через фильтр (размер пор 80 мкм) для удаления клеточного дебриса, подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Далее ядросодержащие клетки костного мозга инкубировали в пластиковых флаконах (TPP, Швейцария) в среде DMEM (Биолот, СПб), дополненной 100 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Хабаровск), 2 мМ L-глутамин (ICN, США) и 15% FCS при 37°C в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . Через 48 часов неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюэнтного слоя. Снятие ММСК при пассировании осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина/0,02% раствора ЭДТА (ICN, США). Адгезию ММСК к пластику при кондиционировании с различными дозами  $\text{SiO}_2$ -нч (2, 20 и 200 мкг/мл) оценивали под инвертированным микроскопом Olympus (Япония). На проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) изучали влияние кондиционирования ММСК с  $\text{SiO}_2$ -нч на клеточный цикл. Пролиферативный потенциал ММСК изучали по включению по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид – МТТ (Sigma, США) при длине волны 492 нм на спектрофотометре (Stat Fax 2100, США) через 48 часов при сокультивировании с различными дозами  $\text{SiO}_2$ -нч и выражали в условных единицах оптической плотности. Индекс влияния  $\text{SiO}_2$ -нч высчитывали по формуле: ИВ =  $(1 - \text{опыт/контроль}) \times 100\%$ . Уровень продукции стойких метаболитов оксида азота (mNO) ММСК при кондиционировании с различными дозами  $\text{SiO}_2$ -нч оценивали с помощью реактива Грейсса. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квартилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна-Уитни, и принималась при значениях  $p < 0,05$  [1].

### Результаты исследования и их обсуждение

Ранее было показано, что коллоидный аморфный диоксид кремния состоял из округлых наночастиц размером 20-100 нм, сорбированных в рыхлые агрегаты размером 5-100 мкм [2]. В водной среде агрегаты частично разрушались. Количество частиц коллоидного диоксида кремния менее 3 мкм не превышало 0,5%, менее 5 мкм – 5,3% и менее 10 мкм – 25,7% при исследовании гранулометрического состава микрокомпозиционного исходного материала диоксида кремния. После механического измельчения массовая доля мелких (менее 3-5 мкм), потенциально наиболее биологически активных частиц увеличивается при механохимической активации от 23% до 38%.

Как видно из рис. 1, отмечено влияние  $\text{SiO}_2$ -нч на адгезию ММСК к пластику. Так

при концентрациях 20 мкг/мл и 200 мкг/мл  $\text{SiO}_2$ -нч при микроскопии уже через 3 часа после посадки клеток в лунки отмечено появление областей, которые не заселяются ММСК (рис. 1 д, ж). А через 48 часов это наиболее ярко проявляется при концентрации 200 мкг/мл  $\text{SiO}_2$ -нч (рис. 1 з).

Следовательно,  $\text{SiO}_2$ -нч в высоких концентрациях препятствуют прикреплению ММСК к пластику.

Показано, что  $\text{SiO}_2$ -нч статистически значимо снижает интенсивность пролиферации ММСК, что подтверждается не только абсолютными величинами поглощения клетками МТТ, но и интегральным показателем влияния  $\text{SiO}_2$ -нч на ММСК (табл. 1). Показано, что максимальный ингибирующий эффект  $\text{SiO}_2$ -нч проявляется при дозе 200 мкг/мл.

В то же время, нами не отмечено статистически значимого влияния  $\text{SiO}_2$ -нч на секреторный потенциал ММСК, определяемый по уровню продукции стойких метаболитов оксида азота.

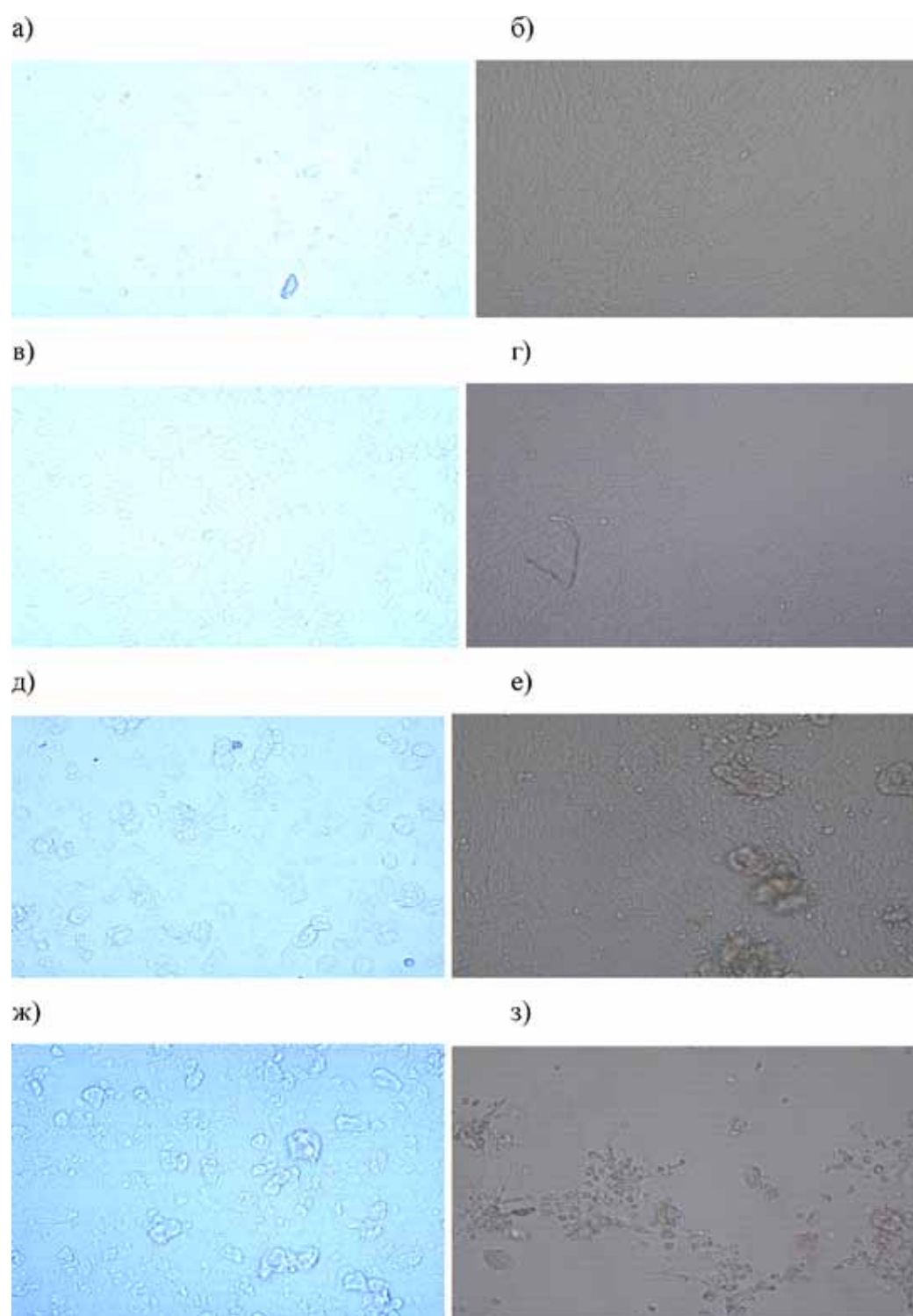
Показано наличие прямой и сильной взаимосвязи между спонтанным уровнем пролиферации ММСК и уровнем продукции стойких метаболитов оксида азота при кондиционировании с 20 мкг/мл  $\text{SiO}_2$ -нч. Это подтверждается и данными визуализации реакции МТТ – теста (рис. 2). Видно, что количество ММСК гранул МТТ преобразованных в формазан меньше по мере возрастания дозы  $\text{SiO}_2$ -нч.

Таким образом,  $\text{SiO}_2$ -нч в высоких дозах подавляют пролиферативный потенциал ММСК.

Следующим этапом исследования стал анализ нахождения ММСК в фазах клеточного цикла при кондиционировании их с различными дозами  $\text{SiO}_2$ -нч. Показано, что  $\text{SiO}_2$ -нч статистически значимо увеличивает количество апоптотических клеток (табл. 2). Также  $\text{SiO}_2$ -нч статистически значимо уменьшают количество ММСК в  $G_0G_1$ ,  $G_2+M$  и S-фазах клеточного цикла.

Таким образом, высокие дозы  $\text{SiO}_2$ -нч стимулируют апоптоз ММСК.

Полученные нами результаты влияния  $\text{SiO}_2$ -нч на ММСК не противоречат литературным данным. Так в работе авторов [4] показано, что  $\text{SiO}_2$ -нч проявляют токсическое действие на ММСК крысы при концентрациях свыше 80 мкг/мл. В основе токсического эффекта  $\text{SiO}_2$ -нч на ММСК человека лежит активация генов оксидативного стресса [8]. Более того,  $\text{SiO}_2$ -нч наряду с наночастицами оксида титана проявляют токсический эффект и на стволовые нервные клетки человека при концентрации 100 мкг/мл, что связано с нарушением экспрессии маркеров стволовых клеток нервной системы и маркеров нейронов [5].



*Рис. 1. Эффект преколонизации ММСК с SiO<sub>2</sub>-нч на адгезию к пластику: а – ММСК через 3 часа, б – ММСК через 48 часов, в – ММСК+2 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч через 3 часа, г – ММСК+2 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч через 48 часов, д – ММСК+20 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч через 3 часа, е – ММСК+20 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч через 48 часов, ж – ММСК+200 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч через 3 часа, з – ММСК+200 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч через 48 часов. Нативный препарат (x400)*

Таблица 1

Эффект прекондиционирования ММСК с SiO<sub>2</sub>-нч (Me; LQ-UQ)

Параметры	Уровень пролиферации (в ед опт. пл.)	Индекс влияния (в %)	Уровни продукции mNO (в μM/mL)
ММСК	1,65 1,64 - 1,68	100	10,64 5,79 - 14,68
ММСК + 2 мкг/мл SiO <sub>2</sub> -нч	1,45* 1,43 - 1,46	- 11,60* 11,28 - 13,31	13,12 8,81 - 20,15
ММСК + 20 мкг/мл SiO <sub>2</sub>	1,35*.# 1,34 - 1,36	- 18,62*.# 17,58 - 19,17	14,59 12,47 - 22,60
ММСК + 200 мкг/мл SiO <sub>2</sub>	1,10*.#,\$ 1,09 - 1,12	- 33,61*.#,\$ 31,90 - 33,94	11,00 8,62 - 30,52

Примечание. ММСК – мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки; SiO<sub>2</sub>-нч – наноструктурированные частицы диоксида кремния; \* – достоверность различия с ММСК  $p < 0,05$ ; # – достоверность различия с ММСК+2 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч  $p < 0,05$ ; \$ – достоверность различия с ММСК+20 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч  $p < 0,05$ .

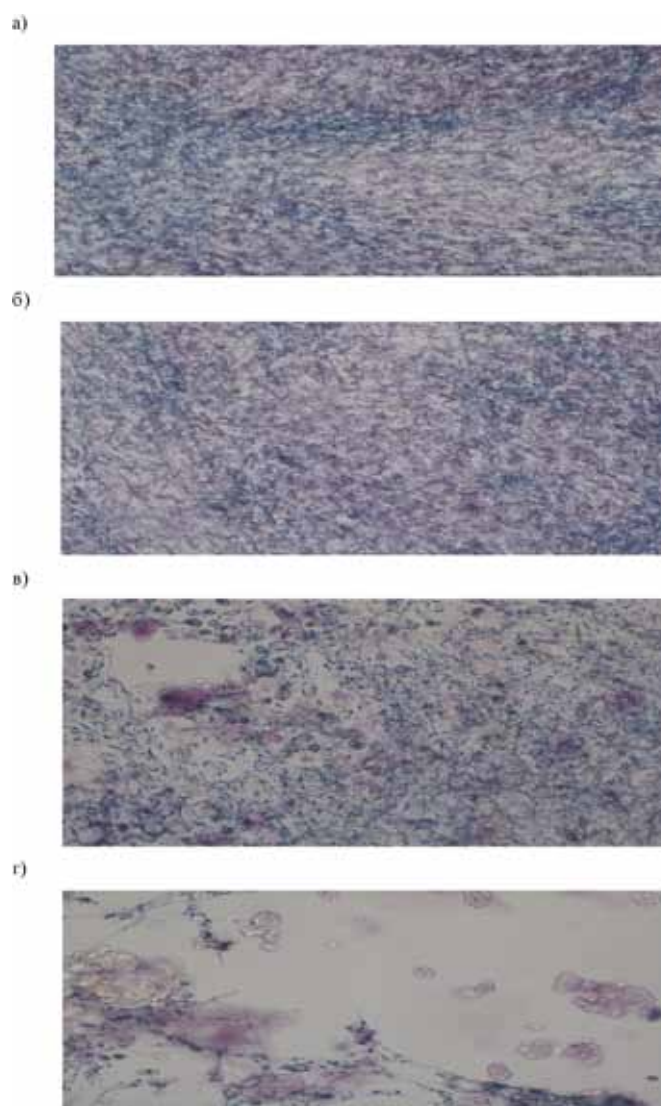


Рис. 2. Эффект прекондиционирования ММСК с SiO<sub>2</sub>-нч на поглощение МТТ:  
а – ММСК, б – ММСК+2 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч, в – ММСК+20 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч, г – ММСК+200 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч. Нативный препарат (x400)

**Таблица 2**

Эффект прекондиционирования ММСК с SiO<sub>2</sub>-нч на клеточный цикл (Me; LQ-UQ)

Параметры	Фазы клеточного цикла (в %)			
	< 2N	2N	> 2N	4N
ММСК	5,00 5,00 - 6,00	75,20 73,00 - 75,20	12,70 10,70 - 12,70	7,10 7,10 - 10,10
ММСК + 2 мкг/мл SiO <sub>2</sub> -нч	10,70* 10,70 - 11,50	75,20 75,20 - 76,00	12,70 10,50 - 12,70	7,10 6,80 - 7,10
ММСК + 20 мкг/мл SiO <sub>2</sub>	10,70* 9,50 - 10,70	66,90*# 66,90 - 70,50	12,60 12,20 - 12,60	7,60# 7,60 - 7,80
ММСК + 200 мкг/мл SiO <sub>2</sub>	44,90*#,\$ 44,90 - 45,60	41,90*#,\$ 40,00 - 41,90	8,20*#,\$ 8,20 - 9,00	5,00*#,\$ 5,00 - 6,40

Примечание. ММСК – мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки; SiO<sub>2</sub>-нч – наноструктурированные частицы диоксида кремния; \* – достоверность различия с ММСК p < 0,05; # – достоверность различия с ММСК+2 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч p < 0,05; \$ – достоверность различия с ММСК+20 мкг/мл SiO<sub>2</sub>-нч p < 0,05.

### Заключение

Таким образом, наночастицы диоксида кремния проявляют токсическое влияние на мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки в дозе 200 мкг/мл. Необходимо учитывать побочные эффекты наноструктурированных частиц диоксида кремния при применении их в медицине, фармации и при разработке диагностических средств, направленных на определение живых клеток с помощью внедрения светящихся меток, так как высока вероятность гибели клеток от наночастиц до момента их детекции на специальной аппаратуре.

### Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М: Практика. – 1999. – 459с.
2. Душкин А.В., Лыков А.П., Ларина О.Н. и др. Сравнительная характеристика антимикробной активности механохимически модифицированных и сорбированных на наноструктурированных частицах диоксида кремния форм цефтазидима на примере экспериментального сепсиса у мышей (СВА x C57Bl6F<sub>1</sub>), индуцированного *Pseudomonas aeruginosa* // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 4. – С. 47-52.

3. Aguirre A., Planell A., Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – Vol. 400. – P. 284-291.
4. Cao B., Yang M., Zhu Y. et al. Stem Cells Loaded with Nanoparticles as a Drug Carrier for In Vivo Breast Cancer Therapy // *Adv. Mater.* – 2014. – Vol. 26. – P. 4627–4631.
5. Fujioka K., Hanada S., Inoue Y. et al. Effects of Silica and Titanium Oxide Particles on a Human Neural Stem Cell Line: Morphology, Mitochondrial Activity, and Gene Expression of Differentiation Markers // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 11742-11759.
6. Ogneva I.V., Buravkov S.V., Shubenkov A.N. et al. Mechanical characteristics of mesenchymal stem cells under impact of silica-based nanoparticles // *Nanoscale Research Letters*. – 2014. <http://www.nanoscalereslett.com/content/9/1/284>.
7. Park E-J., Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro // *Toxicology Letters*. – 2009. – Vol. 184. – P.18-25.
8. Periasamy V.S., Athinarayanan J., Akbarsha M.A. et al. Silica nanoparticles induced metabolic stress through EGR1, CCND, and E2F1 genes in human mesenchymal stem cells. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 175. – P. 1181-1192.
9. Selem M.N., Munusamy P., Ranjan A. et al. Silica-Antibiotic hybrid nanoparticles for targeting intracellular pathogens // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2009. – P. 4270-4274.