

УДК 576.5:537.634

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖЕЛЕЗО-УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОГО МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

^{1,3}Минин А.С., ^{1,3}Уймин М.А., ^{1,3}Ермаков А.Е., ¹Бызов И.В., ¹Жаков С.В.,
¹Мысик А.А., ^{2,3}Белюсова А.В., ³Улитко М.В.

¹Институт физики металлов имени М.Н. Михеева Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, e-mail: calamatica@gmail.com;

²Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург;

³Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург

Магнитоуправляемое выращивание клеток в культуре является перспективным методом культивирования тканей, что может быть полезно, например, для изучения терапевтического действия новых лекарственных препаратов. В данной работе исследуется возможность использования наночастиц со структурой железное ядро – углеродная оболочка для контролируемого магнитным полем пространственного распределения клеток в культуре. Исследуется биосовместимость этих наночастиц: их цитотоксическое воздействие на клетки. При помощи оптической микроскопии, ЯМР-релаксометрии, проточной цитометрии анализируется захват частиц клетками. Показано, что, если частицам придать положительный заряд, модифицировав поверхность аминогруппой, они хорошо захватываются клетками HeLa. Показано также, что при помощи магнитного поля постоянных магнитов даже при малых концентрациях частиц в клетках возможно добиться контролируемого распределения клеток в культуре.

Ключевые слова: клетка, культура, магнитное поле, магнитная наночастица

USE OF IRON-CARBON NANOPARTICLES FOR CONTROLLED DISTRIBUTION OF CELLS IN CULTURE

^{1,3}Minin A.S., ^{1,3}Uymin M.A., ^{1,3}Ermakov A.E., ¹Byzov I.V., ¹Zhakov S.V.,
¹Mysik A.A., ^{2,3}Belousova A.V., ³Ulitko M.V.

¹M.N. Mikheev Institute of Metal Physics of Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
Ekaterinburg, e-mail: uimin@imp.uran.ru;

²Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg;

³Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg

Magneto-controlled cell culture is a promising method of tissue culture, which can be useful, for example, to study the therapeutic effect of new drugs. In this paper, the possibility of using nanoparticles with the iron-carbon core-shell structure for the magneto-controlled spatial distribution of cells in culture is studied. The cytotoxic effect of these nanoparticles on cells is investigated. With the help of optical microscopy, NMR-relaxometry, flow cytometry, the capture of particles by cells is analyzed. It is shown that if particles are positively charged by modifying the surface with an amine group, they are well captured by HeLa cells. It is also shown that with the help of the magnetic field of permanent magnets, it is possible to achieve a controlled distribution of cells in the culture even at small particle concentrations in cells.

Keywords: cell, culture, magnetic field, magnetic nanoparticle

Культивирование клеток часто используется в биологии и медицине. Культуры клеток используются в фундаментальной биологии, в биотехнологии как продуценты различных биологически активных веществ. Широко распространены также фармакологические исследования, в которых клетки, выращиваемые в культуре, служат модельным организмом для исследования воздействия различных лекарств [1]. Наиболее распространенным способом культивации клеток является их выращивание в питательной среде, на различных, как правило, пластиковых подложках. При этом клетки вносятся в среду в виде суспензии и в дальнейшем они закрепляются на подложке.

Однако сейчас активно развиваются методики не только культивирования однородных клеток, но и культивирования тканей, состоящих из разных клеток [2]. Для этого важно иметь способы контролируемого распределения клеток по площади. В настоящее время возможно применение методов 3Д-печати [3]. Для этого используются специализированные 3Д-принтеры, которые способны распределять живые клетки с микронной точностью, либо на двумерной подложке, либо в геле, позволяющем создавать трехмерные культуры. Использование нескольких экструдеров или одного экструдера, в котором смешиваются различные культуры, позволяет печатать сложные ткани, состоящие из нескольких разновидностей клеток.

Однако 3Д-биопринтинг довольно дорог и, как правило, используется не в клинических задачах, а для создания различных имплантов. Для фармакологических исследований более оптимальным является использование органоидов – небольших образований из тысяч – десятков тысяч разнородных клеток, способных частично выполнять функции какого-либо органа. Для создания органоидов разрабатываются методы, основанные на магнитном распределении клеток [4]. Например, в статье [5] авторы формировали модель рака груди из клеток опухоли и клеток фибробластов, которые были специфически связаны с полистироловыми сферами, содержащими наночастицы оксида железа. Предварительно в магнитном поле в органоид собирались клетки опухоли, движимые магнитными частицами, потом вторым слоем клетки фибробластов. Авторы показали, что влияние цитостатиков на культуры, выращенные методом магнитного культивирования, можно более достоверно сравнивать с реальной опухолью, чем обычную 2Д-культуру.

Ключевыми параметрами магнитных частиц, применяемых в магнитоуправляемом культивировании клеток, являются низкая токсичность и высокий магнитный момент, позволяющий манипулировать клетками, содержащими магнитные частицы, не вызывая токсического действия. Настоящая работа посвящена изучению возможности использования оригинальных магнитных наночастиц – нанокомпозигов Fe@C, представляющих собой железное ядро, покрытое углеродной оболочкой. В данной работе используется модификация аминокислотной группой $-NH_2$ и карбоксильной группой $-COOH$. Целью работы было создание и опробование простой магнитной системы для локализации клеток на подложке и определение концентрации магнитных частиц в клетках, с одной стороны, достаточной для обеспечения чувствительности к магнитному полю и, с другой стороны, еще не приводящей к токсическим эффектам.

Материалы и методы исследования

Металл-углеродные наночастицы Fe@C синтезировались газовой фазой методом, описанным в работе [6]. В потоке инертного газа, содержащего углеводородный прекурсор (бутан), высокочастотным переменным магнитным полем разогревалась до температуры порядка 2100 °C железная заготовка, что приводило к её постепенному испарению. Бутан каталитически разлагался на конденсированных наночастицах металла, образуя углеродную оболочку, покрывающую железное ядро [6]. Далее наночастицы охлаждались и улавливались тканевым фильтром.

Для модификации поверхности металл-углеродных наночастиц Fe@C применена модифицирован-

ная методика с использованием арил-диазониевых солей [7, 8] 4-аминобензиламина или 4-аминофенилуксусной кислоты для модификации аминокислотных и карбоксильных групп соответственно.

Перевиваемая клеточная линия HeLa была получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных института цитологии РАН (Россия, Санкт-Петербург). Культуру клеток поддерживали в пластиковых культуральных флаконах, в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина, в инкубаторе при +37 °C, в атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Цитотоксичность анализировалась при помощи МТТ теста. Клетки пересевались в 96-луночный планшет и культивировались в течение суток до концентрации примерно 10^5 клеток/мл, после чего к ним добавлялась суспензия наночастиц в дистиллированной воде. В качестве контроля соответственно использовалась дистиллированная вода. Через 72 часа инкубации среда менялась на чистую и добавлялся метилтиазолилдифенил-тетразолий бромид (МТТ) в концентрации 1 мг/мл, инкубация с красителем осуществлялась в течение 4 часов. Интенсивность окраски определялась с помощью планшетного фотометра на длине волны 540 нм, заключение о количестве жизнеспособных клеток делалось путем сравнения интенсивности оптического поглощения клеток бывших в эксперименте с интенсивностью оптического поглощения в контроле.

Исследование токсичности также проводилось при помощи проточного цитометра Beckman Coulter FC-500 (использовался тест на апоптоз и некроз с антителами к аннексину, конъюгированными с FITC и ядерным красителем 7-AAD). Для исследования клетки, проинкубированные в течение суток, с разными концентрациями железо-углеродных наночастиц, промывались фосфатным буфером, отщеплялись от планшета при помощи раствора трипсина-Версена и ресуспендировались в чистой питательной среде. Далее анализ осуществлялся по стандартному протоколу для исследования апоптоза/некроза.

Захват клетками наночастиц детектировался при помощи оптической микроскопии, а также при помощи проточной цитометрии (проточный цитометр Beckman Coulter-FC-500). Для этого инкубированные с наночастицами клетки смешивались в суспензии с контрольными клетками, после чего смесь клеток анализировалась на проточном цитометре. Контрольные клетки брались для определения нормального уровня гранулярности. Количество накопления наночастиц в клетках производилось при помощи ЯМР-релаксометрии культуральной среды, содержащей наночастицы, не связавшиеся с клетками. Перед инкубацией с наночастицами клетки рассеивали в 24-луночные культуральные планшеты, где они росли 24 часа до достижения состояния монослоя. Инкубирование с наночастицами проводили при 37 °C. К клеткам добавляли водную суспензию MNPs, предварительно подвергнутую ультразвуковой обработке для максимальной однородности. Концентрированную суспензию добавляли в среду капельно, после чего ее тщательно перемешивали. Пробы культуральной среды с диспергированными в ней наночастицами отбирались после внесения частиц в среду через 15 минут, 24 часа и 48 часов, после чего анализировались при помощи ЯМР-релаксометра по методике, описанной в [9].

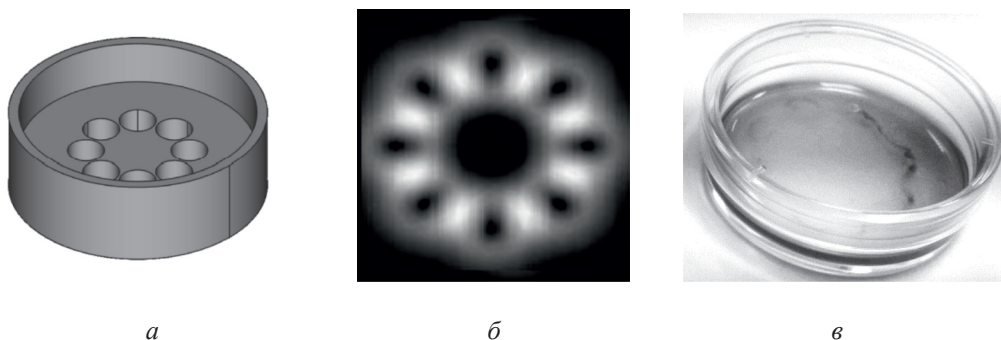


Рис. 1. а) конструкция держателя, б) конфигурация магнитного поля над магнитами на расстоянии 2 мм, более светлая окраска соответствует большей величине поля, в) распределение клеток с магнитными частицами в культуре. Скопления клеток видны как темные области

Для изготовления магнитной системы были использованы коммерчески доступные магниты Nd-Fe-B диаметром 7 мм и высотой 10 мм, намагниченные вдоль оси. Держатель представлял собой диск с углублением, в которое вставлялась чашка Петри для инкубирования клеток (рис. 1, а). Восемь магнитов размещались на окружности диаметром 20 мм по схеме (-N-S-N-S-).

Клетки предварительно выращивались в культуральном флаконе до достижения 80–90 % конfluence, после чего в среду добавлялись магнитные наночастицы до концентрации 0,05 мг/мл. С наночастицами клетки инкубировались в течение суток, после чего промывались фосфатным буфером и чистой культуральной средой. Далее клетки трипсинизировались и переносились в чашку Петри, которая устанавливалась в магнитную систему. Распределение клеток в магнитном поле анализировалось через двое суток.

Результаты исследования и их обсуждение

При помощи МТТ-теста была установлена низкая токсичность металл-углеродных наночастиц, как карбоксилированных, так и аминированных. Не было выявлено достоверных отличий от контроля при концентрации наночастиц в питательной среде до 1 мг/мл. Однако необходимо отметить, что МТТ-тест – это спектроскопический метод исследования, суть которого состоит в анализе светопропускания на определенной длине волны, при этом металл-углеродные наночастицы сами поглощают свет в широком диапазоне длин волн, следовательно, могут давать погрешность в определении жизнеспособности клеток таким методом. В качестве второго метода контроля жизнеспособности клеток была выбрана проточная цитометрия, основанная на анализе флуоресценции, в которую железо-углеродные наночастицы не должны вносить никакого вклада. Методом проточной цитометрии было показано отсутствие токсического эффекта при концентрации железо-углеродных наночастиц в питательной среде до 5 мг/мл.

Накопление наночастиц в клетках анализировалось при помощи оптической микроскопии. В среде наночастицы не видны, так как их размер ниже дифракционного предела, однако в клетках они концентрируются, накапливаясь в лизосомах [10], что позволяет увидеть агрегаты частиц. Наши эксперименты показали, что клетками поглощаются только аминированные железо-углеродные наночастицы (рис. 2), захват карбоксилированных частиц не был зафиксирован.

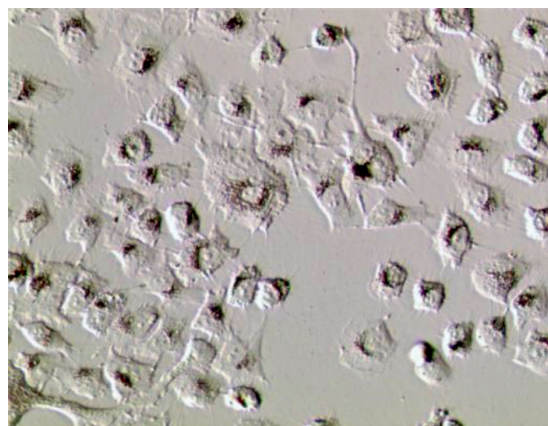


Рис. 2. Оптическая микроскопия культуры клеток HeLa, инкубированных с магнитными наночастицами Fe@C-NH₂. Темные области внутри клеток – скопления частиц

Анализ накопления наночастиц в клетках также проводился при помощи проточной цитометрии. Анализ осуществлялся по так называемому каналу бокового рассеяния, обычно применяемому для анализа гранулярности клеток. Наночастицы, кластеризованные в цитоплазме, усиливали гранулярность клетки, что отчетливо было видно в сравнении с чистыми клетками, как показано на рис. 2. При анализе методом проточной цитометрии также был за-

фиксирован захват только аминированных наночастиц, при этом не наблюдалось, так же как и методом оптической микроскопии, существенного количества клеток, не содержащих наночастицы.

трационных пятен в виде дуг связано с тем, что значительная часть клеток с частицами при движении попадает в локальные максимумы поля и минимума градиента. Наличие таких локальных максимумов

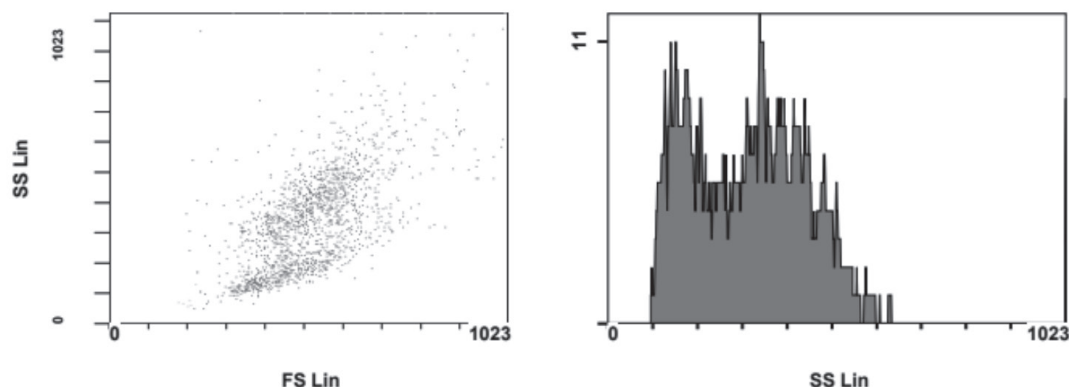


Рис. 3. Двухмерное (данные бокового и прямого светорассеяния) и одномерное (данные бокового светорассеяния) распределение клеток по данным проточной цитометрии. Анализировалась смесь из контрольных клеток и клеток содержащих наночастицы Fe@C-NH_2

Количественное исследование накопления железо-углеродных наночастиц проводилось с использованием метода ЯМР-релаксометрии [9]. Анализовалась остаточная концентрация магнитных наночастиц в среде. Достоверно было показано, что концентрация частиц уменьшается в среде только для аминированных наночастиц, при этом в клетках в первые сутки накапливается порядка 25% от всех наночастиц в среде и ещё 25% накапливается за вторые сутки. По оценке, сделанной из ЯМР измерений, концентрация наночастиц составляла не более чем 25–30 пкг на клетку. Таким образом, для магнитного распределения клеток в культуре было принято решение нагружать их аминированными железоуглеродными наночастицами.

В магнитном поле клетки с частицами должны двигаться в области с максимальным полем и локализоваться вблизи минимума градиента магнитного поля. Расчет поля в плоскости, расположенной на расстоянии 1 мм от плоскости полюсов магнитов, показал, что в данной конструкции области с максимальной напряженностью горизонтальной компоненты поля (3 кЭ) располагаются между ячейками с магнитами (рис. 1, б). Серым цветом обозначены области, где поле несколько меньше – эти области обрамляют каждый магнит. Эксперимент показал, что клетки скапливались и росли не только в областях с максимальным полем, но и на связывающих их дугах (рис. 1, в). Видимо, формирование концен-

выявил и более тщательный расчет топологии магнитного поля. Таким образом, даже при концентрациях на два порядка меньше, чем максимальная из проверенных на цитотоксичность, клетки с железо-углеродными наночастицами могут быть сконцентрированы магнитным полем относительно простой магнитной системой в определенных участках на подложке в удовлетворительном соответствии с магнитостатическими расчетами. В дальнейшем планируется оптимизация методики для достижения оптимального роста клеточных органоидов, состоящих из нескольких разных клеток, а также разработка конфигурации поля и магнитной системы для достижения магнитной левитации клеток на границе раздела жидкость – газ.

Заключение

1. Методами оптической микроскопии и проточной цитометрии было зафиксировано накопление наночастиц в клетках. Было показано, что наиболее эффективно захватываются клетками аминированные наночастицы Fe@C-NH_2 .

2. Показана низкая токсичность магнитных наночастиц Fe@C для клеток культуры HeLa.

3. Продемонстрировано, что при использовании простой магнитной системы можно целенаправленно локализовать область прикрепления и последующего роста клеток.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема

«Магнит», № 01201463328) и проекта № 15-9-24-10 Комплексной программы; разработка и изготовление релаксометра финансировались за счет гранта РНФ № 17-15-01116.

Список литературы

1. Stacey G.N. Cancer Cell Culture // *Methods Mol Biol.* – 2011. – vol. 731, no 1. – P. 79–91.
2. Souza G.R., Molina J.R., Raphael R.M., Ozawa M.G., Stark D.J., Levin C.S., Bronk L.F., Ananta J.S., Mandelin J. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. // *Nat. Nanotechnol.* Nature Publishing Group. – 2010. – vol. 5, no 4. – P. 291–296.
3. Zhang H.B., Xing T.L., Yin R.X., Shi Y., Yang S.M., Zhang W.J. Three-dimensional bioprinting is not only about cell-laden structures // *Chinese J. Traumatol.* – English Ed. Elsevier Ltd. – 2016. – vol. 19, no 4. – P. 187–192.
4. Daquinag A.C., Souza G.R., Kolonin M.G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. // *Tissue Eng. Part C. Methods.* – 2013. – vol. 19, no 5. – P. 336–344.
5. Jaganathan H., Gage J., Leonard F., Srinivasan S., Souza G.R., Dave B., Godin B. Three-Dimensional In Vitro Co-Culture Model of Breast Tumor using Magnetic Levitation // *Sci. Rep.* – 2014. – vol. 4. – P. 6468.
6. Tsurin V.A., Yermakov A.Ye., Uimin M.A., Mysik A.A., Shchegoleva N.N., Gaviko V.S., Maikov V.V. Synthesis, structure, and magnetic properties of iron and nickel nanoparticles encapsulated into carbon // *Phys. Solid State.* – 2014. – vol. 56, no 2. – P. 287–301.
7. Grass R.N., Athanassiou E.K., Stark W.J. Covalently functionalized cobalt nanoparticles as a platform for magnetic separations in organic synthesis // *Angew. Chemie – Int. Ed.* – 2007. – vol. 46, no 26. – P. 4909–4912.
8. Postnikov P.S., Trusova M.E., Fedushchak T.A., Uimin M.A., Ermakov A.E., Filimonov V.D. Aryldiazonium tosylates as new efficient agents for covalent grafting of aromatic groups on carbon coatings of metal nanoparticles // *Nanotechnologies Russ.* – 2010. – vol. 5, no 7–8. – P. 446–449.
9. Medvedeva I.V., Zhakov S.V., Revvo A.V., Byzov I.V., Bakhteeva Yu.A., Uimin M.A., Yermakov A.E., Mysik A.A. Application of NMR Relaxometry for Determining the Concentration of Nanopowder Magnetite in Aqueous Media // *The Physics of Metals and Metallography.* – 2014. – vol. 115, no. 8. – P. 744–748.
10. Marcos-Campos I., Asín L., Torres T.E., Marquina C., Tres A., Ibarra M. R., Goya G.F. Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells // *Nanotechnology.* – 2011. – vol. 22, no 20. – P. 205101.