

УДК 576.5

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ДОПИРОВАННЫХ ГАДОЛИНИЕМ, *IN VITRO*

¹Колманович Д.Д., ¹Чукавин Н.Н., ¹Савинцева И.В.,
¹Мысина Е.А., ²Аккизов А.Ю., ¹Попов А.Л.

¹ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук»,
Пуццо, e-mail: kdd100996@mail.ru; chukavinnik@gmail.com; savintseva_irina@mail.ru;
mironova_e27@rambler.ru; antonpopovleonid@gmail.com;

²ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова»,
Нальчик, e-mail: akkizov@mail.ru

Разработка новых мультифункциональных нанотераностиков, способных не только обеспечить эффективное контрастирование опухолевых клеток, но и функционировать как радиосенсибилизатор, является актуальной задачей. Перспективы практического применения таких нанотераностиков требуют получения устойчивых коллоидных золей с высокой степенью биосовместимости и агрегативной устойчивости. В рамках данной работы предложена схема синтеза нового типа наночастиц оксида железа, допированных гадолинием ($\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$), обладающих высокой степенью агрегативной устойчивости и биосовместимости. Проведено исследование физико-химических характеристик полученных наночастиц, которое подтвердило высокую степень их кристалличности и агрегативной стабильности. Был проведен комплексный анализ цитотоксичности наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$ на 5 культурах клеток человека и мыши: остеосаркомы человека линии MNNG/Hos, карциномы человека NCI/ADR, меланомы мыши B16/F10, карциномы мыши EMTP6 и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека через 24 и 72 часа сокультивирования в широком диапазоне концентраций (10–200 мкг/мл). Показано, что наночастицы $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$ проявляют токсичность в отношении клеток карциномы человека линии NCI/ADR, B16/F10 и МСК человека, снижая их метаболическую активность через 72 часа, инициируя запуск апоптоза. Культуры клеток линий MNNG/Hos и EMTP6 не показали достоверного снижения жизнеспособности как через 24 часа, так и через 72 часа сокультивирования.

Ключевые слова: наночастицы, оксид железа, гадолиний, МРТ, цитотоксичность, культуры клеток, апоптоз

IN VITRO STUDY OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF GADOLINIUM-DOPED IRON OXIDE NANOPARTICLES.

¹Kolmanovich D.D., ¹Chukavin N.N., ¹Savintseva I.V.,
¹Mysina E.A., ²Akkizov A.Yu., ¹Popov A.L.

¹Institute for Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino,
e-mail: kdd100996@mail.ru; chukavinnik@gmail.com; savintseva_irina@mail.ru;
mironova_e27@rambler.ru; antonpopovleonid@gmail.com;

²Kabardino-Balkarian State University named after I.I. HM. Berbekov, Nalchik,
e-mail: akkizov@mail.ru

The development of new multifunctional nanoteranostics capable of providing not only effective contrast of tumor cells, but also functioning as a radiosensitizer is an urgent task. The prospects for the practical application of such nanoteranostics require the production of stable colloidal sols with a high degree of biocompatibility and aggregative stability. Within the framework of this work, a scheme for the synthesis of a new type of gadolinium-doped iron oxide nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$), having a high degree of aggregative stability and biocompatibility. A study of the characteristics of $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$ nanoparticles was carried out, which confirmed the high degree of their crystallinity and aggregative stability. A comprehensive cytotoxicity analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$ nanoparticles was carried out on 5 human and mouse cell cultures: MNNG/Hos human osteosarcomas, NCI/ADR human carcinomas, B16/F10 mouse melanomas, EMTP6 mouse carcinomas and human mesenchymal stem cells (MSCs) after 24 and 72 hours of co-cultivation in a wide range of concentrations (10-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). It is shown that $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$ nanoparticles exhibit toxicity to human carcinoma cells of the NCI/ADR, B16/F10 and human MSCs lines reducing their metabolic activity after 72 hours, via inducing apoptosis. MNNG/Hos and EMTP6 cell lines showed no significant decrease in viability after both 24 hours and 72 hours of co-cultivation with $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$.

Keywords: nanoparticles, iron oxide, gadolinium, MRI, cytotoxicity, cell cultures, apoptosis

Магнитные наночастицы оксида железа являются репрезентативным кандидатом многофункциональных наноматериалов с растущим использованием во многих биомедицинских полях, включая магнитный резонанс визуализации (МРТ), биологический катализ, магнитную гипертермию,

магнитное наведение, магнитное сепарация, фотореактивную терапию и доставку наркотиков, и в настоящее время широко используются в диагностике и лечении опухолей [1-3]. Как известно, для повышения контрастности МРТ-изображений применяют различные парамагнитные контра-

стирующие агенты, влияющие на времена продольной (T1) и поперечной (T2) ядерной магнитной релаксации [4]. Например, на основе соединений (прежде всего органических комплексов) гадолиния получают T1-контрастные агенты, сокращающие время продольной релаксации (r1), а на основе суперпарамагнитных наночастиц магнетита – T2-контрастные агенты, поперечной релаксации (r2). Контрастные агенты на основе гадолиния являются наиболее важными и наиболее распространенными контрастирующими агентами для МРТ [5, 6, 7]. Между тем сегодня появляется все больше информации о токсических эффектах гадолиний-содержащих МРТ-контрастирующих агентов, что связано с токсическими эффектами свободных ионов гадолиния, депонируемых в различных органах и тканях и вызывающих развитие нефрогенного системного фиброза [8]. Это приводит к отзыву разрешений на использование контрастирующих агентов на основе гадолиния в ряде стран [9]. Если в клинической практике пока нет наночастиц соединений гадолиния (судя по всему, и не предвидится), то ряд наночастиц на основе оксидов железа (магнетиты Fe_3O_4 и маггемиты $\gamma-Fe_2O_3$) уже используют [10], в том числе и коммерческие предприятия (например, Endorem®, Ferumoxytol®, Supravist®). Обычно их модифицируют органическими молекулами, включая фосфат-дендримеры [11], карбоновые кислоты (лимонную [12], димеркапто-янтарную [13]), полимеры (полиэтиленгликоль [14], винилацетат или декстран [15] и пр.). Таким образом, разработка новых мультифункциональных контрастирующих агентов на основе наночастиц оксида железа является перспективным направлением. В рамках данной работы нами предложена новая схема синтеза наночастиц оксида железа, допированных гадолинием ($Fe_3O_4:Gd$), обладающих высокой степенью агрегативной устойчивости, и проведена комплексная оценка их цитотоксичности *in vitro*.

Цель исследования – комплексный анализ цитотоксического действия нового нанотераностика на основе оксида железа $Fe_3O_4:Gd$, допированного гадолинием, на культурах нормальных и трансформированных клеток млекопитающих.

Материал и методы исследования

Синтез и физико-химическая характеристика наночастиц $Fe_3O_4:Gd$. Наночастицы $Fe_3O_4:Gd$ получали путем гидролиза хлорида железа ($FeCl_2$ и $FeCl_3$) и хлорида гадолиния ($GdCl_3$) в эквимолярных концентрациях в присутствии концентрированного раствора аммиака и изопропилового

спирта. В качестве стабилизатора была использована лимонная кислота, которая является биосовместимым лигандом и эффективным стабилизатором коллоидного золя. Рентгенофазовый анализ образца проводили с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (CuK α -излучение, θ – 2θ -геометрия) в диапазоне углов 10° – 80° 2θ с шагом $0,02^\circ$ и временем накопления сигнала не менее $0,3$ с на точку. Микроструктуру образца наночастиц $Fe_3O_4:Gd$ изучали методом просвечивающей электронной микроскопии на электронном микроскопе Leo912 AB Omega (ускоряющее напряжение 100 кВ).

Культуры клеток. В исследовании было использовано 5 различных типов клеточных культур (остеосаркома человека линии MNNG/Hos, карцинома человека линии NCI/ADR, меланома мыши линии B16/F10, карцинома мыши линии EMTP6 и мезенхимальные стволовые клетки человека, выделенные из пульпы зуба (МСК) человека), депонированные в биобанке клеточных культур лаборатории тераностики и ядерной медицины ИТЭБ РАН. Клетки культивировались при 5%-ном содержании CO_2 и 95%-ной влажности в инкубаторе. Клетки культивировались в культуральных флаконах 25 см^2 (SPL, Корея) в среде ДМЕМ/Ф12 («ПАНЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 200 ед. смеси антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). Клетки снимались с культурального пластика путем их обработки раствором трипсин/версен 0,025% («ПАНЭко», Россия). Перед внесением наночастиц клетки трижды промывали раствором Хэнкса («ПАНЭко», Россия).

Анализ метаболической активности клеток после инкубации с наночастицами $Fe_3O_4:Gd$ (МТТ тест). Анализ жизнеспособности клеточных культур после 24 и 72 часов инкубации с наночастицами в различных концентрациях (100–200 мкг/мл) проводился с использованием колориметрического МТТ-теста (тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид). Клетки высевались в 96-луночные культуральные планшеты (SPL, Корея) в плотности $25\text{ тыс}/\text{см}^2$ в среде ДМЕМ/Ф12+10% эмбриональной телячьей сыворотки, к которым через 6 часов вносились различные концентрации наночастиц $Fe_3O_4:Gd$ (10–200 мкг/мл). Через 24 или 72 часа среда заменялась на среду, содержащую 0,5 мг/мл раствора тетразоля, и клетки инкубировали в течение 3 часов в CO_2 инкубаторе. Далее образовавшиеся в лунках кристаллы формазана растворяли ДМСО и измеряли опти-

ческую плотность растворенного формазана при длине волны 540 нм.

Анализ жизнеспособности клеток после инкубации с наночастицами $Fe_3O_4:Gd$ (Live/Dead assay). Для определения количественного соотношения живых и мертвых клеток в культуре после инкубации с наночастицами были использованы набор красителей LUCS13, окрашивающий все клетки, и йодид пропидия (PI), окрашивающий ядра только мертвых клеток. Данный метод основан на различной проницаемости живых и мертвых клеток. Наличие в клеточной мембране перфораций – критический фактор, несовместимый с жизнеспособностью клеток, что обеспечивает проникновение красителя. Подсчет клеток проводился по микрофотографиям, полученным с использованием инвертированного микроскопа Zeiss Axiovert 200 при 200-кратном увеличении.

Анализ апоптоза клеток после инкубации с наночастицами $Fe_3O_4:Gd$. Для количественного определения апоптотических клеток был использован набор селективных красителей YO-PRO™-1 Iodide (491/509) (Thermo Fisher Scientific). Данный набор основан на селективной проницаемости клеточной мембраны для флуоресцентных красителей, детектирующих апоптотические изменения в клетке. Подсчет клеток проводился по микрофотографиям, полученным с использованием инвертированного микроскопа Zeiss Axiovert 200 при 200-кратном увеличении при длинах волн возбуждения и эмиссии (491/509 нм).

Статистическая обработка. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного модуля GraphPad 8.5. Достоверные различия экспериментальных групп выявляли с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате синтеза был получен электростатически стабилизированный золь диоксида церия с размером частиц порядка 15–20 нм по данным просвечивающей электронной микроскопии (рис. 1 А). Для функционализации поверхности наночастиц был выбрана лимонная кислота, являющаяся широко используемым биосовместимым лигандом, которая обеспечила высокую стабильность полученного коллоидного золя, а гидродинамический диаметр в воде (MQ) составил около 20 нм (рис. 1 Б).

Для выявления цитотоксических эффектов был проведен анализ метаболической активности клеточных культур методом МТТ-теста через 24 и 72 часа сокультивирования с наночастицами в широком диапазоне концентраций (10–200 мкг/мл). Выявлено, что наночастицы $Fe_3O_4:Gd$ не производили токсического эффекта на клетки остеосаркомы человека линии MNNG/Hos и карциномы мыши линии EMTP6 во всех исследованных концентрациях (рис. 2 А, Б) как через 24 часа, так и через 72 часа сокультивирования. Культуры раковых клеток линий B16/F10 и NCI/ADR оказались более чувствительными и снижали уровень метаболической активности до 70–80% через 72 часа после внесения наночастиц (рис. 2 В, Г). Стоит отметить, что культура NCI/ADR показала более выраженное снижение метаболической активности (до 50%) по сравнению с клетками меланомы мыши. Мезенхимальные стволовые клетки человека, выделенные из пульпы зуба, также показали снижение жизнеспособности через 72 часа сокультивирования для всех исследованных концентраций (рис. 2 Д).

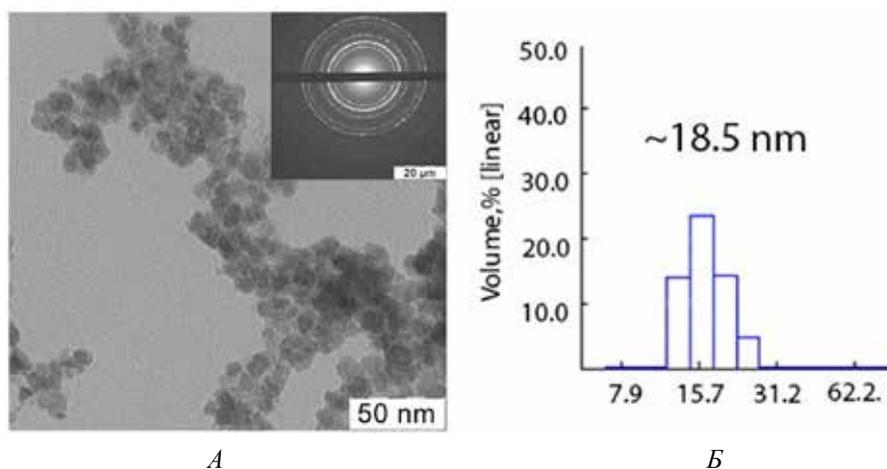


Рис. 1. (А) Просвечивающая электронная микроскопия и (Б) гидродинамический диаметр, полученный методом динамического рассеяния света наночастиц $Fe_3O_4:Gd$ в воде

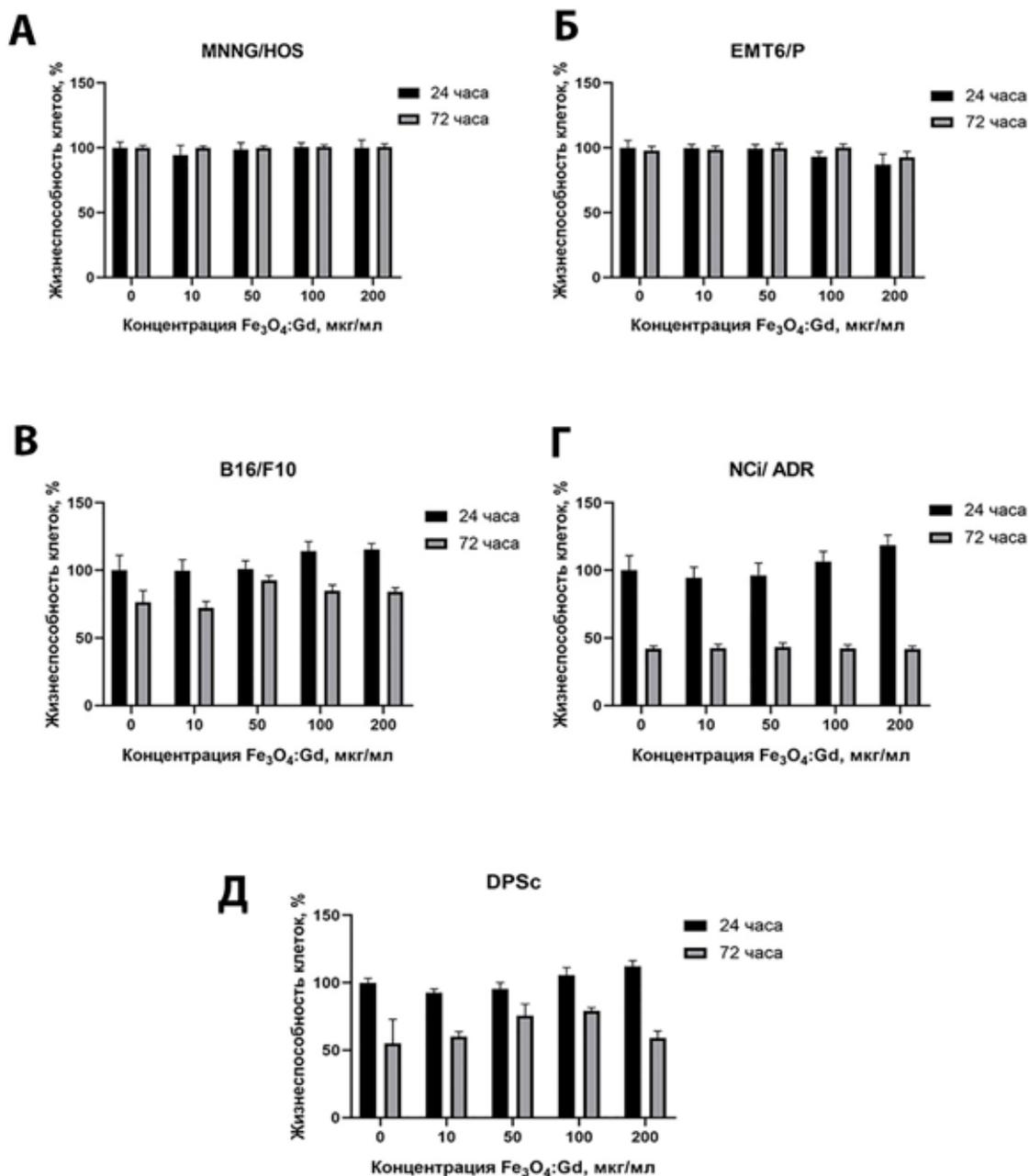


Рис. 2. Анализ метаболической активности клеток после инкубации с наночастицами $Fe_3O_4:Gd$ в течение 24 и 72 часов: (А) клетки остеосаркомы человека линии MNNG/HOS; (Б) клетки опухоли молочной железы мыши линии EMT6/P; (В) клетки меланомы мыши линии B16/F10; (Г) клетки рака яичников человека линии NCI/ADR; (Д) мезенхимальные стволовые клетки человека

Далее методом дифференциального окрашивания был проведен анализ количества апоптотических клеток (Yo-Pro-1) через 24 и 72 часа. Культура клеток MNNG/Hos после инкубации с наночастицами не показала достоверного увеличения числа апоптотических клеток (рис. 3А). В культуре карциномы мыши линии EMT6/P в контрольной группе детектировался высокий уровень мертвых клеток (рис. 3 Б). Максимальная

концентрация наночастиц $Fe_3O_4:Gd$ в концентрации 200 мкг/мл через 72 часа вызвала достоверное увеличение доли апоптотических клеток. Культура клеток меланомы мыши линии B16/F10 показала достоверное увеличение доли апоптотических клеток в большинстве исследованных концентраций, кроме максимальной (200 мкг/мл) (рис. 3 В). Максимальная концентрация наночастиц показала увеличенное число апоптотических клеток

непосредственно через 72 часа. При этом стоит отметить, что, несмотря на значительное снижение метаболической активности клеток линии NCI/ADR через 24 и 72 часа после инкубации с наночастицами $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$, достоверно не увеличивается количество апоптотических клеток (рис. 3 Г). Аналогичная тенденция наблюдается и для культуры

МСК человека: метаболическая активность клеток по данным МТТ-теста значительно снижается через 72 часа, однако не происходит детекции апоптотических клеток через 72 часа (рис. 3 Д). Такой эффект, по всей видимости, может быть связан с развитием состояния окислительного стресса, но не гибелью клеток.

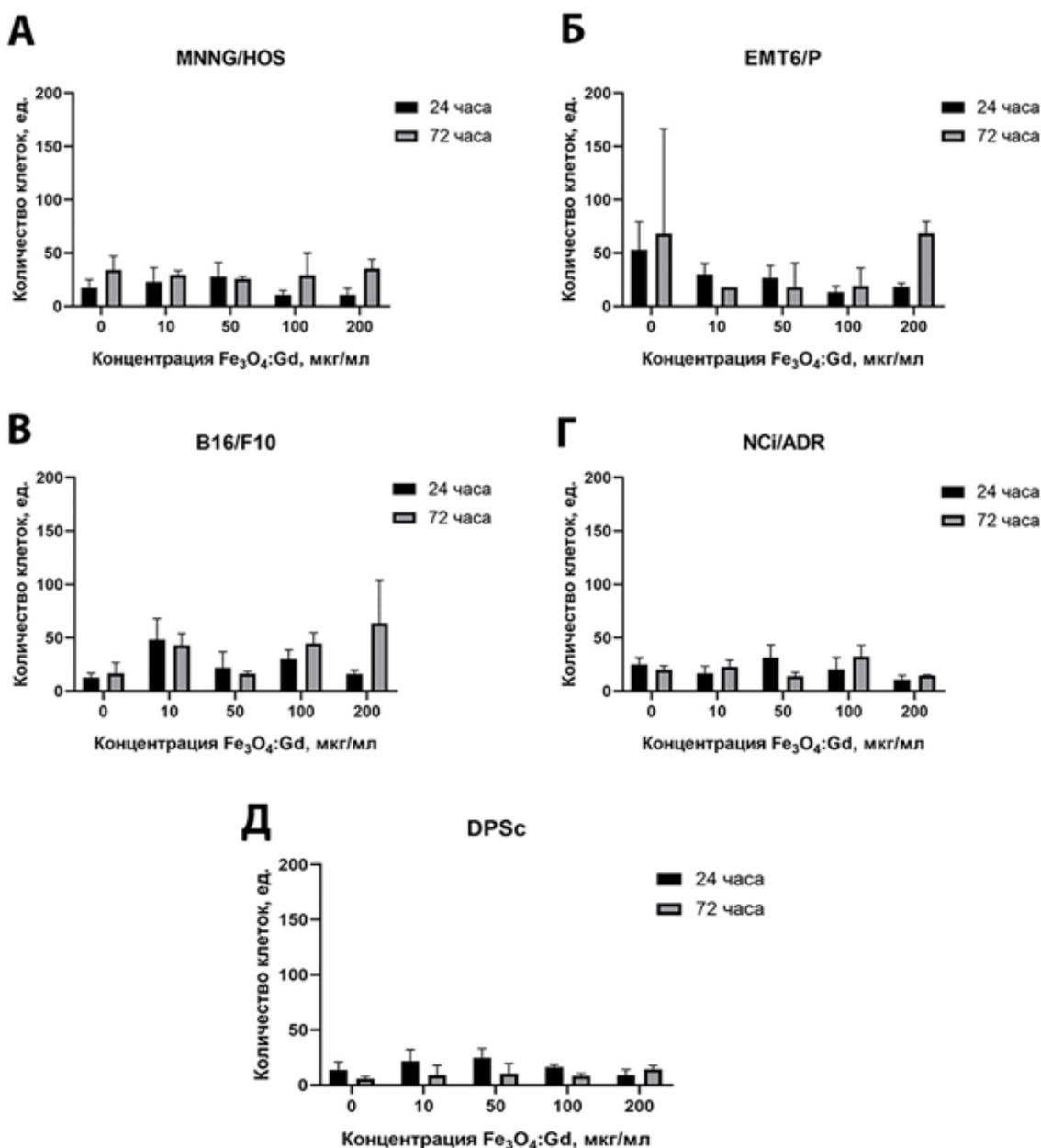


Рис. 3. Результаты анализа количества апоптотических клеток после инкубации с наночастицами $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Gd}$ в течение 24 и 72 часов: (А) – клетки остеосаркомы человека линии MNNG/HOS; (Б) – клетки опухоли молочной железы мыши линии EMT6/P; (В) – клетки меланомы мыши линии B16/F10; (Г) – клетки рака яичников человека линии NCI/ADR; (Д) – мезенхимальные стволовые клетки человека

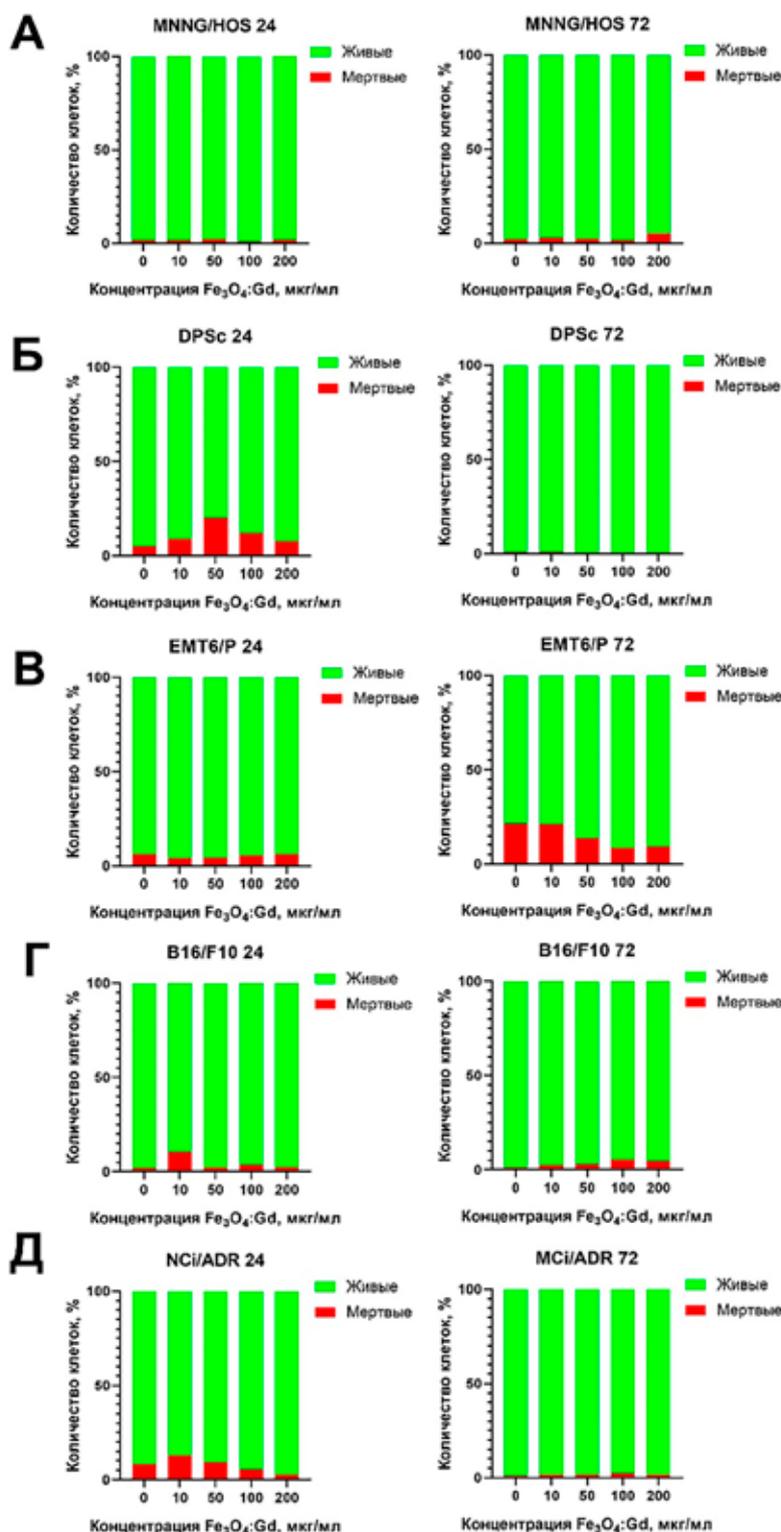


Рис. 4. Анализ доли мертвых клеток по отношению к количеству живых клеток после инкубации с наночастицами $Fe_3O_4:Gd$ в течение 24 и 72 часов: (А) клетки остеосаркомы человека линии MNNG/HOS; (Б) клетки опухоли молочной железы мыши линии EMT6/P; (В) клетки меланомы мыши линии B16/F10; (Г) клетки рака яичников человека линии NCi/ADR; (Д) мезенхимальные стволовые клетки человека. Данные были получены методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя йодид пропидия для детектирования мертвых клеток (красный), далее подсчет доли производился относительно общего количества клеток по результатам окрашивания красителем Hoechst 33342

Анализ соотношения живых и мертвых клеток после 24-часовой инкубации с наночастицами в культуре клеток линии MNNG/Hos не выявил повышения числа мертвых клеток. Аналогичная картина наблюдается и через 72 часа сокультивирования, за исключением максимальной концентрации 200 мкг/мл, где наблюдается рост числа мертвых клеток (рис 4. А). Наиболее выраженный рост числа мертвых клеток через 24 часа сокультивирования наблюдается в культуре МСК человека и культуры NCI/ADR (рис. 4. Б). В отношении культуры клеток карциномы мыши через 72 часа сокультивирования с наночастицами отмечено значительное увеличение числа мертвых клеток (до 20%) (рис 4.В).

Заключение

Разработана новая схема синтеза наночастиц оксида железа, допированных гадолинием, которые обладают высокой коллоидной стабильной, малым гидродинамическим диаметром (не более 20 нм) и высокой степенью биосовместимости (IC₅₀ выше 100 мкг/мл). Снижение метаболической активности некоторых культур раковых и нормальных клеток в высоких концентрациях наночастиц через 72 часа инкубации связано с развитием апоптоза. Дальнейший анализ достоверно выявил рост числа мертвых клеток после 72 часов сокультивирования. Нами выдвинуто предположение о том, что выявленная селективная токсичность наночастиц связана с различной эффективностью эндоцитоза синтезированных наночастиц для каждого типа использованных в исследовании клеточных культур, а также их дифференциального процессинга уже непосредственно внутри клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания Российской Федерации (075-01027-22-01).

Список литературы

- Gilroy K.D., Ruditskiy A., Peng H., Qin D., Xia Y. Bi-metallic nanocrystals: syntheses, properties, and applications. Chem Rev. 2016. Vol. 116. P. 10414-10472.
- Lee N., Yoo D., Ling D., Cho M.H., Hyeon T., Cheon J. Iron oxide based nanoparticles for multimodal imaging and magneto-responsive therapy. Chem Rev. 2015. Vol. 115. P. 10637-10689.
- Wu M., Yang Y. Metal-organic framework (MOF)-based drug/cargo delivery and cancer therapy. Adv. Mater. 2017. Vol. 29. P. 1606134.
- Chandrasekharan P., Tay Z.W., Hensley D., Zhou X.Y., Fung B.K., Colson C., Lu Y., Fellows B.D., Huynh Q., Saayujya C., Yu E., Orendorff R., Zheng B., Goodwill P., Rinaldi C., Conolly S. Using magnetic particle imaging systems to localize and guide magnetic hyperthermia treatment: tracers, hardware, and future medical applications. Theranostics. 2020. Vol. 10. P. 2965-2981.
- Fan C.H., Cheng Y.H., Ting C.Y., Ho Y.J., Hsu P.H., Liu H.L., Yeh C.K. Ultrasound/magnetic targeting with SPIO-DOX-microbubble complex for image-guided drug delivery in brain tumors. Theranostics. 2016. Vol. 6. P. 1542-1556.
- Jin H., Qian Y., Dai Y., Qiao S., Huang C., Lu L., Luo Q., Chen J., Zhang Z. Magnetic enrichment of dendritic cell vaccine in lymph node with fluorescent-magnetic nanoparticles enhanced cancer immunotherapy. Theranostics. 2016. Vol. 6. P. 2000-2014.
- Su Y., Fang J., Liao C., Lin C., Li Y., Hu S. Targeted mesoporous iron oxide nanoparticles-encapsulated perfluorohexane and a hydrophobic drug for deep tumor penetration and therapy. Theranostics. 2015. Vol. 5. P.1233-1248.
- Shah A.H., Olivero J.J., Gadolinium-Induced Nephrogenic Systemic Fibrosis. Methodist DeBakey Cardiovasc J. 2017. Vol. 13 No. 3. P. 172-173.
- Woolen S.A., Shankar P.R., Gagnier J.J., MacEachern M.P., Singer L., Davenport M.S. Risk of Nephrogenic Systemic Fibrosis in Patients With Stage 4 or 5 Chronic Kidney Disease Receiving a Group II Gadolinium-Based Contrast Agent: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Intern Med. 2020. Vol. 180. No. 2. P. 223-230.
- Tong S., Zhu H., Bao G. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Disease Detection and Therapy. Mater Today (Kidlington). 2019. Vol. 31. P. 86-99.
- Jeon M., Halbert M.V., Stephen Z.R., Zhang M. Iron Oxide Nanoparticles as T1 Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: Fundamentals, Challenges, Applications, and Prospectives. Adv. Mater. 2021. Vol. 33 No. 23. P. e1906539.
- Dheyab M.A., Aziz A.A., Jameel M.S., Noqta O.A., Khaniabadi P.M., Mehrdel B. Simple rapid stabilization method through citric acid modification for magnetite nanoparticles. Sci Rep. 2020. Vol. 10. P. 10793.
- Pandey G., Singh S., Hitkari G. Synthesis and characterization of polyvinyl pyrrolidone (PVP)-coated Fe₃O₄ nanoparticles by chemical co-precipitation method and removal of Congo red dye by adsorption process. Int Nano Lett. 2018. Vol. 8. P. 111-121.
- Zhao F., Zhang B., Wang J., Tu Z. Synthesis and properties of magnetite nanoparticles coated with poly(ethylene glycol) and poly(ethylene imine). J. Nanosci Nanotechnol. 2013. Vol. 13 No. 10. P. 6793-6797.
- Ba-Abbad M.M., Benamour A., Ewis D. et al. Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles with Different Shapes Through a Co-Precipitation Method and Their Application. JOM 2022. Vol. 74. P. 3531-3539.