

СТАТЬЯ

УДК 577:546.655

**ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ  
МАЛЬТОДЕКСТРИНОМ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ,  
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКОЙ,  
В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК**

**Замятина Е.А., Анкина В.А., Попова Н.Р.**

*ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,  
Пушчино, e-mail: sonyoru162@gmail.com, viktoriya.anikina@list.ru, nellipopovaran@gmail.com*

Наночастицы диоксида церия (НДЦ) являются одним из наиболее перспективных наноматериалов для биомедицинского применения, в связи с чем одной из актуальных задач при исследовании биологической активности НДЦ является исследование путей интернализации и внутриклеточной локализации наночастиц в различных типах клеток. Цель данного исследования – провести анализ цитотоксичности и внутриклеточной локализации НДЦ, модифицированных флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ), в культурах нормальных (фибробласты мышины NCTC L929) и трансформированных (остеосаркома человека MNNG/HOS) клеток. Было показано отсутствие цитотоксического эффекта НДЦ, модифицированных ФИТЦ, для нормальных и трансформированных клеток в диапазоне концентраций от 1 до 0,01 мг/мл. Синтезированные НДЦ визуализировались внутри клеток при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии, что свидетельствовало об успешной модификации наночастиц флуоресцентной меткой (ФИТЦ). Определена рабочая концентрация НДЦ для обоих типов клеток, она составляет 30–300 мкл/мл. Установлено, что накопление наночастиц происходит через 9–10 ч инкубации в обоих типах клеток. Методом дифференциального окрашивания было показано, что НДЦ, модифицированные ФИТЦ, локализуются преимущественно в цитоплазме и лизосомах, не попадая в ядра клеток.

**Ключевые слова:** наночастицы диоксида церия, флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ), внутриклеточная интернализация, визуализация *in vitro*, фибробласты мыши NCTC L929, остеосаркома человека MNNG/HOS

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-63-00082).*

**INTRACELLULAR LOCALIZATION OF FLUORESCENCE-MODIFIED  
MALTODEXTRIN STABILIZED CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES  
IN CULTURED NORMAL AND TRANSFORMED CELLS**

**Zamyatina E.A., Anikina V.A., Popova N.R.**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Puschino,  
e-mail: sonyoru162@gmail.com, viktoriya.anikina@list.ru, nellipopovaran@gmail.com*

Cerium dioxide nanoparticles (CeNPs) are one of the most promising nanomaterials for biomedical applications. Therefore, one of the current challenges in the investigation of the biological activity of CeNPs is to study the pathways of internalization and intracellular localization of nanoparticles in different cell types. The aim of this study was to analyze the cytotoxicity and intracellular localization of CeNPs modified with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) in normal (mouse fibroblast NCTC L929) and transformed (Human Caucasian osteosarcoma MNNG/HOS) cells. It was demonstrated that CeNPs modified with FITC did not exhibit cytotoxic effects on normal and transformed cells in the concentration range from 1 to 0.01 mg/ml. The working concentration of dyes for both types of cells has been determined and is 30–300 µl/ml. The synthesized CeNPs were visualized inside cells using confocal fluorescence microscopy, indicating successful modification of the nanoparticles with a fluorescent organic dye (FITC). It was found that the accumulation of nanoparticles occurs after 9–10 hours of incubation in both types of cells. It was demonstrated that FITC-modified CeNPs primarily localize in the cytoplasm and lysosomes, without entering the cell nuclei.

**Keywords:** cerium dioxide nanoparticles, fluorescein isothiocyanate (FITC), *in vitro* visualization, mouse fibroblasts NCTC L929, intracellular localization, human osteosarcoma MNNG/HOS

*The research was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project no. 22-63-00082).*

Нанокристаллический диоксид церия является одним из наиболее перспективных наноматериалов для биомедицинского применения [1–3]. Наночастицы диоксида церия (НДЦ) обладают способностью влиять на протекание редокс-процессов в живых клетках [4, 5], что обуславливает их биологическую активность и сравнительно низкую токсичность *in vitro* [6–8]. Таким образом, одной из актуальных задач при исследовании

биологической активности НДЦ является исследование путей интернализации и внутриклеточной локализации синтезированных наночастиц в различных видах клеток.

Для исследования механизмов биологической активности и мониторинга накопления наночастиц в живой клетке *in vitro* необходимо проводить их функционализацию люминесцентными метками. Для этих целей синтезируют наночастицы

стабилизированные полимерными молекулами, в качестве которых могут выступать полисахариды, с последующей фиксацией на их поверхности люминесцентной метки, например, флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ). Такой подход позволяет получать биосовместимые, стабильные высокодисперсные золи наночастиц с контролируемой морфологией и возможностью их визуализации в клеточных системах *in vitro*.

Цель исследования – провести анализ цитотоксичности и внутриклеточной локализации НДЦ, модифицированных ФИТЦ, в культурах нормальных (фибробласты мыши L929) и трансформированных (остеосаркома костной ткани человека MNNG) клеток *in vitro*.

#### Материалы и методы исследования

НДЦ, стабилизированные мальтодекстрином, были синтезированы методом, описанным ранее [9]. Затем стабилизированные НДЦ функционализировали люминесцентной меткой путем растворения порошка синтезированных НДЦ в деионизированной воде при 95°C и добавления флуоресцеин-5-изотиоцианата. После растворения охлаждали и добавляли 50 мл изопропилового спирта. Выпавший осадок отделяли центрифугированием (10000 g, 10 мин), затем осадок промывали изопропиловым спиртом и высушивали в темноте при 60 °C. Очищенный ярко-желтый золь наночастиц получали с использованием диализа. Затем проводили анализ размеров, полученных наночастиц методом динамического светорассеяния (Malvern Zetasizer Nano ZS), который выявил, что гидродинамический диаметр наночастиц без ультразвуковой обработки составлял в среднем 30 нм (Синтез #1), тогда как при обработке в ультразвуковой ванне (суммарно 24 ч) гидродинамический диаметр уменьшался в среднем до 3 нм (Синтез #2).

В работе были использованы клеточные линии из коллекции клеточных культур Лаборатории тераностики и ядерной медицины ИТЭБ РАН: фибробласты мыши (NCTC L929) и остеосаркома костной ткани человека (MNNG/HOS). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки. Культивирование клеточных культур проводили в 96-луночных планшетах в плотности 30000 клеток/см<sup>2</sup>. При исследовании биодоступности наночастиц исходную среду заменяли на растворы исследуемых образцов в среде DMEM/F12 с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки. Затем клетки инкубировали в присутствии тестируемых образцов в течение 24, 48 и 72 ч.

Анализ цитотоксичности проводили с использованием МТТ-теста и селективного окрашивания флуоресцентными красителями. Определение метаболической активности в живых клетках проводили с помощью МТТ-анализа, основанного на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) до формазана, который имеет пурпурное окрашивание. После инкубации клеток в присутствии образцов среду заменяли на раствор МТТ в среде DMEM/F12 без сыворотки в концентрации 0,5 мг/мл. Через 3 ч среду с МТТ заменяли на ДМСО, планшеты помещали на шейкер при температуре 37°C на 10 мин, после чего измеряли оптическую плотность растворов в лунках планшетов при длине волны 570 нм. Значения оптической плотности пересчитывали в проценты от значений контрольной группы, отклонения в выборках указывали в виде стандартного отклонения (SD). Значимость отклонений между выборками и контролем подтверждали с использованием t-критерия Уэлча при  $0,01 < p < 0,05$  (\*) и  $0,001 < p < 0,01$  (\*\*), с использованием GraphPad Prism.

Жизнеспособность клеточных культур в присутствии образцов оценивали с использованием флуоресцентных красителей Hoechst 33342 (поглощение – 350 нм, эмиссия – 461 нм) и йодид пропидия (поглощение – 493, эмиссия – 636 нм) (LIVE/DEAD-тест). Для каждой группы клеток исследовали пять полей в каждой лунке с помощью микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200. Соотношение клеток (общее количество клеток / количество мертвых клеток) рассчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ.

Внутриклеточную локализацию двух типов (Синтез #1 и Синтез #2) НДЦ, меченных ФИТЦ, исследовали на культурах нормальных и трансформированных клеток. Клетки высевали на 96-луночные планшеты в плотности 30000 клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки. Разведения тестируемых образцов готовили с использованием среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки в диапазоне концентраций от 25 до 500 мкл/мл. Для визуализации ядра и лизосом после 24 ч инкубации в присутствии ФИТЦ-меченных НДЦ были использованы флуоресцентные красители: Hoechst 33342 – для окрашивания ядер клеток (голубой цвет) и LysoTracker Red – для окрашивания лизосом клеток (красный цвет). Наночастицы за счет ФИТЦ были окрашены в зеленый цвет (поглощение – 495 нм, эмиссия – 525 нм).

**Результаты исследования  
и их обсуждение**

*1. Исследование влияния НДЦ,  
модифицированных ФИТЦ,  
на метаболическую активность  
и жизнеспособность клеток  
NCTC L929 и MNNG/HOS*

На рис. 1 показано влияние НДЦ, модифицированных ФИТЦ, на активность митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ и жизнеспособность NCTC L929 и MNNG/HOS, оцененных методами МТТ- и LIVE/DEAD-тестов.

Из диаграмм на рис. 1, А, видно, что дегидрогеназная активность NCTC L929, оцененная по восстановлению МТТ, при инкубации в течение 72 ч в присутствии НДЦ Синтез #1 в концентрации 5 мг/мл, снижается на  $47 \pm 8\%$  относительно контроля. Метаболическая активность NCTC L929 в присутствии НДЦ Синтез #1 в концентрации от 0,1 мг/мл до 0,01 мг/мл увеличивается на  $6 \pm 2\%$  относительно контроля. При инкубации NCTC L929 в присутствии НДЦ Синтез #2 было показано снижение метаболической актив-

ности на  $50 \pm 3\%$  относительно контроля в концентрации 5 мг/мл. В диапазоне концентраций от 1 мг/мл до 0,01 мг/мл НДЦ Синтез #2 не было отмечено изменения дегидрогеназной активности клеток относительно контроля. Оценка жизнеспособности клеток NCTC L929 в присутствии НДЦ Синтез #1 и НДЦ Синтез #2 показывает отсутствие цитотоксического эффекта исследуемых наночастиц в диапазоне концентраций от 5 до 0,01 мг/мл после инкубации в течение 72 ч. В исследуемом диапазоне концентраций НДЦ, модифицированных ФИТЦ (от 5 до 0,01 мг/мл), для обоих образцов наночастиц (Синтез #1 и Синтез #2) для культуры нормальных клеток (NCTC L929) значения  $IC_{20}$  и  $IC_{50}$  не были обнаружены.

Из диаграмм на рис. 1, Б, видно, что дегидрогеназная активность MNNG/HOS при инкубации в присутствии НДЦ Синтез #1 в концентрации 5 мг/мл снижается на  $57 \pm 2\%$  относительно контроля. Напротив, в концентрации НДЦ Синтез #1 от 1 до 0,01 мг/мл дегидрогеназная активность MNNG/HOS увеличивается на  $40 \pm 3\%$  относительно контроля.

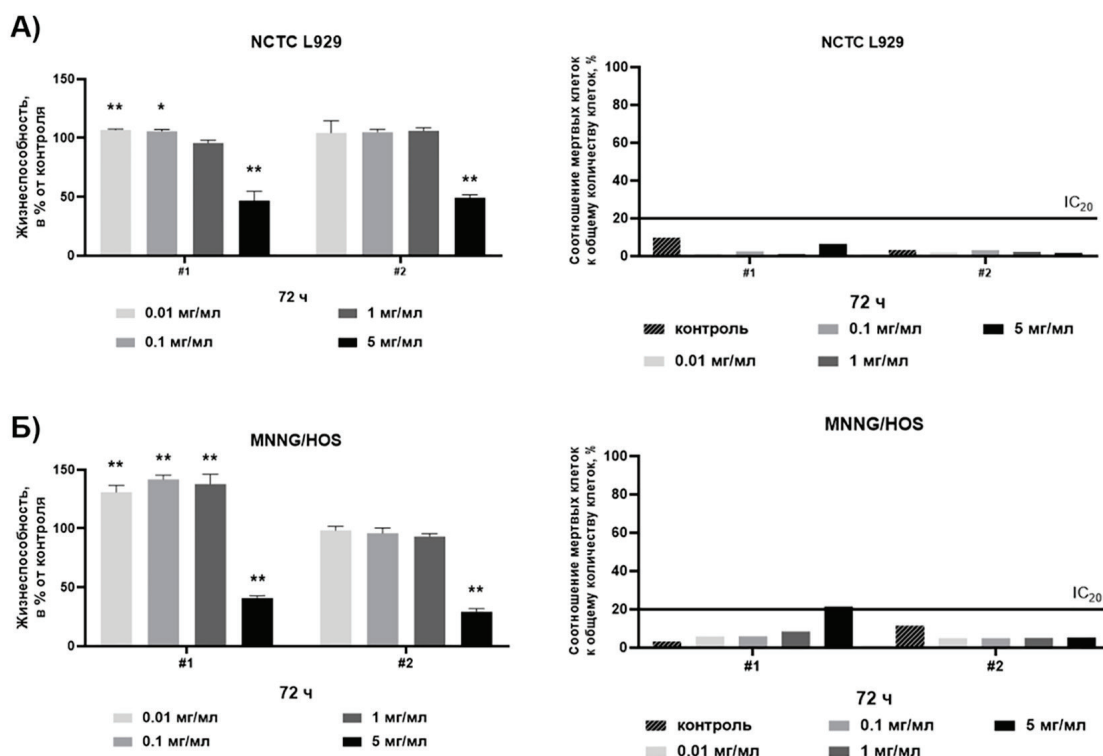


Рис. 1. Результаты МТТ- и LIVE/DEAD-тестов на NCTC L929 и MNNG/HOS in vitro. Тест проведен через 72 ч инкубации клеток в присутствии НДЦ в концентрациях от 5 до 0,01 мг/мл. Значимость отклонений между выборками и контролем подтверждалась с использованием t-критерия Уэлча при  $0,01 < p < 0,05$  (\*), при  $0,001 < p < 0,01$  (\*\*)

При инкубации MNNG/HOS в присутствии НДЦ Синтез #2 в концентрации 5 мг/мл дегидрогеназная активность клеток снижалась на  $64 \pm 3\%$ . Для НДЦ Синтез #2 в диапазоне концентраций от 1 до 0,01 мг/мл, так же как и в эксперименте с NCTC L929, не было отмечено изменения дегидрогеназной активности клеток MNNG/HOS относительно контроля. Оценка жизнеспособности клеток MNNG/HOS в присутствии НДЦ Синтез #1 в концентрации от 1 до 0,01 мг/мл и НДЦ Синтез #2 в концентрации от 5 до 0,01 мг/мл показывает отсутствие цитотоксического эффекта исследуемых наночастиц после инкубации в течение 72 ч. Однако для клеток MNNG/HOS было достигнуто значение  $IC_{20}$  при концентрации НДЦ Синтез #1 равной 5 мг/мл.

2. Внутриклеточная локализация НДЦ, модифицированных ФИТЦ, в культурах нормальных (NCTC L929) и раковых (MNNG/HOS) клеток

Для подбора рабочих концентраций НДЦ была использована клеточная культура NCTC L929, которую инкубировали от 3 до 72 ч в присутствии тестируемых образцов в концентрациях от 15 до 500 мкл/мл. Рабочей концентрацией ФИТЦ-меченных НДЦ выбиралась концентрация, при которой интенсивность свечения образцов была достаточной для визуальной оценки распределения наночастиц внутри клетки и не влияла значительно на жизнеспособность клеток. Рабочая концентрация красителей (Hoechst 33342, LysoTracker Red) для данных типов клеток была определена как 2 мкМ. Установлено, что накопление наночастиц происходит через 9–10 ч инкубации в обоих типах клеток. Оптимальное время инкубации, при ко-

тором поглощенные ФИТЦ-меченные НДЦ хорошо визуализировались внутри клеток, составило 24 ч. Таким образом, для проведения исследования внутриклеточной локализации исследуемых НДЦ, модифицированных ФИТЦ, было выбрано время инкубации 24 ч, а концентрации наночастиц составили для НДЦ Синтез #1 – 30 мкл/мл, для НДЦ Синтез #2 – 300 мкл/мл. Данные по внутриклеточной локализации НДЦ, модифицированных ФИТЦ, представлены на рис. 2 для NCTC L929 и на рис. 3 для MNNG/HOS.

Установлено, что максимальное накопление НДЦ внутри обоих типов клеточных культур происходит через 24 ч инкубации (рис. 2, 3). Однако показано, что большее накопление НДЦ, модифицированных ФИТЦ, как для наночастиц Синтез #1, так и для наночастиц Синтез #2 характерно для нормальной клеточной культуры (NCTC L929), что подтверждается более высоким уровнем зеленой флуоресценции. Как в нормальных, так и в трансформированных клеточных культурах ФИТЦ-меченные НДЦ локализуются преимущественно в цитоплазме и лизосомах, не попадая в ядра клеток. Данные подтверждаются микрофотографиями, полученными после обработки путем колокализации спектров (рис. 2, 3).

Для попадания внутрь клетки НДЦ должны пересечь клеточную мембрану, что возможно посредством ряда механизмов эндоцитоза: макропиноцитоза, клатрин-опосредованного эндоцитоза, кавеол-опосредованного эндоцитоза или клатрин/кавеол-независимого эндоцитотического механизма [10], а также поглощение наночастиц может происходить по пассивному механизму [11].

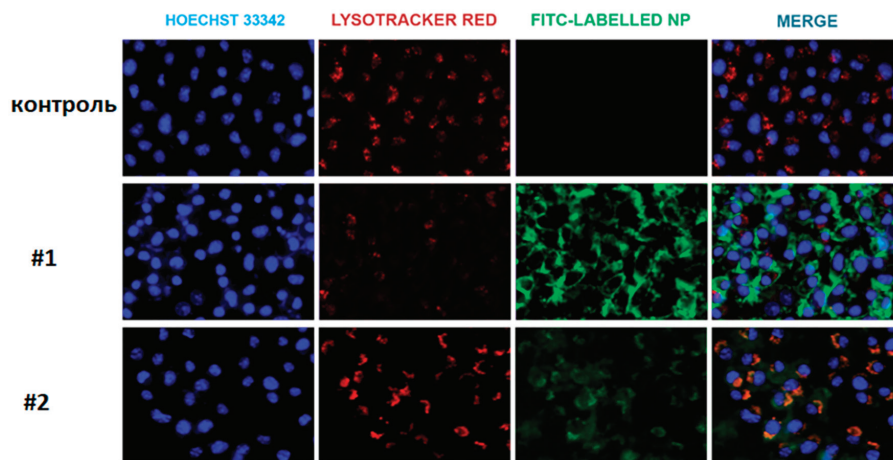


Рис. 2. Изображения культуры NCTC L929, полученные методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Hoechst 33342 – синий, LysoTracker Red – красный, FITC – зеленый, Merge – синий + красный + зеленый. Масштабная линейка = 30 мкм



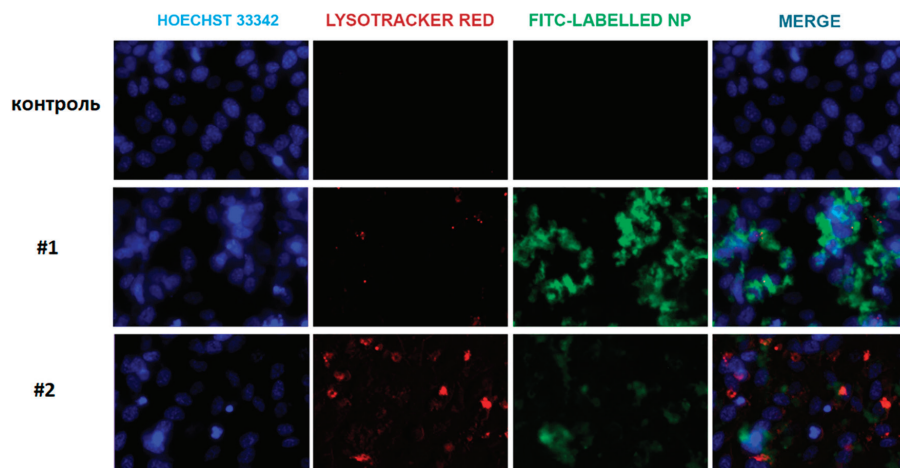


Рис. 3. Изображения культуры MNNG/HOS, полученные методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Hoechst 33342 – синий, LysoTracker Red – красный, FITC – зеленый, Merge – синий + красный + зеленый. Масштабная линейка = 30 мкм

Согласно литературным данным, в трансформированных клетках наблюдается более интенсивное и быстрое поглощение молекул или частиц, чем в нормальных клетках [12]. Однако данное предположение не согласуется с результатами, полученными нами на культурах NCTC L929 и MNNG/HOS, где наблюдается противоположный эффект. Это может быть связано с активацией рецепторов на поверхности нормальных клеток, и, таким образом, скорость рецептор-опосредованного эндоцитоза может быть увеличена. Поэтому, помимо локализации НДЦ внутри клетки, крайне актуально исследовать механизмы эндоцитоза, благодаря которым наночастицы проникают в клетку.

### Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что для обоих типов НДЦ, модифицированных ФИТЦ, показано отсутствие достоверного цитотоксического эффекта на культурах как нормальных (NCTC L929), так и трансформированных (MNNG/HOS) клеток в концентрациях от 1 до 0,01 мг/мл. Оба исследованных типа НДЦ визуализируются внутри нормальных и трансформированных клеток при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии в концентрациях НДЦ Синтез #1 – 30 мкл/мл и для НДЦ Синтез #2 – 300 мкл/мл и локализуются преимущественно в цитоплазме и лизосомах, не попадая в ядра клеток.

### Список литературы

1. Xu Z., Keller E., Beltran A.M., Zheng K., Voccacini A.R. Cerium doped dendritic mesoporous bioactive glass

nanoparticles with bioactivity and drug delivery capability // Journal of Non-Crystalline Solids. 2023. Vol. 620. P. 122578.

2. Singh K.R., Nayak V., Sarkar T., Singh R.P. Cerium oxide nanoparticles: properties, biosynthesis and biomedical application // RSC Adv. 2020. Vol. 10, Is. 45. P. 27194–27214.

3. Feng N., Liu Y., Dai X., Wang Y., Guo Q., Li Q. Advanced applications of cerium oxide based nanozymes in cancer // RSC Adv. 2022. Vol. 12, Is. 3. P. 1486–1493.

4. Lord M.S., Berret J.F., Singh S., Vinu A., Karakoti A.S. Redox Active Cerium Oxide Nanoparticles: Current Status and Burning Issues // Small. 2021. Vol. 17, Is. 51. P. 2102342.

5. Seminko V., Maksimchuk P., Grygorova G., Okrushko E., Avrunin O., Semenets V., Malyukin Y. Mechanism and Dynamics of Fast Redox Cycling in Cerium Oxide Nanoparticles at High Oxidant Concentration // J. Phys. Chem. C. 2021. Vol. 125, Is. 8. P. 4743–4749.

6. Zhang M., Zhang C., Zhai X., Luo F., Du Y., Yan C. Antibacterial mechanism and activity of cerium oxide nanoparticles // Sci. China Mater. 2019. Vol. 62, Is. 11. P. 1727–1739.

7. Sarnatskaya V., Shlapa Y., Yushko L., Shton I., Solopan S. Biological activity of cerium dioxide nanoparticles // J Biomedical Materials Res. 2020. Vol. 108, Is. 8. P. 1703–1712.

8. Tumkur P.P., Gunasekaran N.K., Lamani B.R., Nazario Bayon N., Prabhakaran K., Hall J.C., Ramesh G.T. Cerium Oxide Nanoparticles: Synthesis and Characterization for Biosafe Applications // Nanomanufacturing. 2021. Vol. 1, Is. 3. P. 176–189.

9. Щербakov А.Б., Жолобак Н.М., Иванов В.К., Иванова О.С., Марчевский А.В., Баранчиков А.Е., Спивак Н.Я., Третьяков Ю.Д. Синтез и антиоксидантная активность биосовместимых водных зелей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных мальтодекстрином // Журнал неорганической химии. 2012. Т. 57. № 11. С. 1499.

10. Sousa De Almeida M., Susnik E., Drasler B., Taladriz-Blanco P., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine // Chem. Soc. Rev. 2021. Vol. 50, Is. 9. P. 5397–5434.

11. Donahue N.D., Acar H., Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine // Advanced Drug Delivery Reviews. 2019. Vol. 143. P. 68–96.

12. Xia Q., Huang J., Feng Q., Chen X., Liu X. Size- and cell type-dependent cellular uptake, cytotoxicity and in vivo distribution of gold nanoparticles // IJN. 2019. Vol. 14. P. 6957–6970.