

ПАПУГА А.Е.¹, САМЧЕНКО Ю.М.², СУХОРАДА Е.М.¹, РУБАН Т.А.¹, КОЛОМИЕЦ Ю.Н.¹, ЗЕНИЧ А.В.¹, УВАРОВА И.В.³, УЛЬБЕРГ З.Р.², ЛУКАШ Л.Л.¹¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150, e-mail: alexander.papuga@gmail.com.*² *Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины, Украина, 03142, г. Киев, бульв. Академика Вернадского, 42*³ *Институт проблем материаловедения им. И.М. Францевича НАН Украины, Украина, 03680, г. Киев, ул. Кржижановского, 3***ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ И ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO***

В последние годы нанотехнология стала одной из наиболее развивающихся и одной из самых многообещающих областей знаний. В результате объединения нанотехнологии и биотехнологии появилась новая дисциплина – нанобиотехнология [1]. Наночастицы обладают высокоразвитой активной поверхностью, благодаря этому и своим размерам (менее 100 нм), сопоставимым с размерами клеток, наночастицы могут приближаться к клеткам, взаимодействовать с рецепторами на их поверхности и проникать внутрь [2].

Наночастицы, обладающие магнитными свойствами, интересны для медицины тем, что ими возможно дистантно управлять при наложении внешнего магнитного поля. Частицы оксидов металлов обладают более слабыми магнитными свойствами, однако они более устойчивы к окислению. В настоящее время наиболее широко применяются в биомедицине наночастицы оксида железа (II, III), что обусловлено их низкой токсичностью и стабильностью магнитных характеристик [3, 4].

В настоящее время продолжается поиск новых более успешных методов терапии различных повреждений кожи. Использование мазей, гелей, повязок сокращает сроки заживления ран, ожогов, трофических язв. Перспективным является создание новых лекарственных форм и биотехнологических средств (как, например, биологически активные раневые покрытия), содержащих наноматериалы в своём составе. Есть данные, указывающие на то, что биологический ответ на попадание в живой организм наночастиц металлов отличается от реакции на ионы металлов. Определённые дозы металлических наночастиц стимулируют метаболические процессы [5, 6], а также проявляют бактериостатическую и бактерицидную активность. Бактерицидный эффект серебра широко известен, также

в литературе имеются данные по поводу бактерицидного эффекта, например, наночастиц железа и меди по отношению к стандартным штаммам *E. coli*, *St. aureus* [5]. Имеются данные по влиянию экзогенного железа, цинка, марганца на заживление ран [7, 8].

Магнитные наночастицы окиси железа (II, III) признаны многообещающим инструментом для выполнения многих медицинских задач. Их воздействие на клетки зависит от типа клеток, концентрации и времени воздействия наночастиц на клетки [9, 10].

Ранее в Институте биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины были синтезированы гидрогелевые покрытия на основе сшитого сополимера акриламида и акрилонитрила, полученные посредством радикальной сополимеризации, и в совместной работе с нами апробированы на совместимость со стволовыми клетками человека [11, 12]. Показано, что данные гидрогели не являются цитотоксичными: через сутки после посева клеток на соответствующие гидрогелевые подложки наблюдалось прикрепление и распластывание клеток на носителе с последующим размножением до образования монослоя [13]. В дальнейшем оказалось, что в состав этих гидрогелей можно дополнительно вводить наночастицы или ионы металлов.

Исходя из этих предпосылок, целью нашей работы было изучение влияния наночастиц некоторых металлов на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток человека *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использовались мезенхимальные стволовые клетки человека линии 4BL, полученной в отделе генетики человека ИМБиГ НАН Украины [14]. Клетки культивировались в среде DMEM-HG с добавлением таких компонентов: 10 % термоинактивированной фетальной бычьей

сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («Sigma», США) в CO_2 -инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 и 95 % воздуха. Инкубирование клеток с наночастицами и материалами, содержащими наночастицы, проводилось в тех же условиях.

В экспериментах по изучению биологической активности наночастиц оксида железа Fe_3O_4 , имеющего ферромагнитные свойства, использовались порошки, которые были получены в Институте проблем материаловедения им. И.М. Францевича НАН Украины. В экспериментах по изучению влияния наноразмерных частиц оксида железа на выживаемость и пролиферацию клеток использовались четыре типа порошков с размерами частиц 10, 20, 60 и 200 нм.

Кроме того, изучалось влияние на жизнеспособность клеток наночастиц серебра, а также ионов цинка и марганца, включенных в состав гидрогелей. При этом при формировании гидрогеля на основе сшитого сополимера акриламида и акрилонитрила (при соотношении их звеньев 62,5:32,5 и концентрации сшивающего агента – N,N'-метил-бис-акриламида – 0,654 мас. %) были введены наноразмерные частицы или ионы металлов, затем на поверхность такого носителя высевались клетки, и мы наблюдали за влиянием этих дополнительных компонентов на пролиферацию клеток. При изготовлении гидрогелей их вырезали по форме культуральной посуды, перед проведением эксперимента высушенные гидрогели выкладывали на дно чашек Петри соответствующего диаметра. Затем их насыщали средой для культивирования клеток, не содержащей сыворотки. После такой предварительной адаптации излишки среды удаляли, и на поверхность гидрогеля наносили суспензию клеток с таким расчётом, чтобы капли суспензии не стекали на дно чашки, под носитель. Через несколько часов

инкубации добавляли ростовую среду с таким расчетом, чтобы общий объём среды культивирования соответствовал стандартным значениям для чашек Петри определенного размера.

Цитотоксичность изучали с помощью МТТ-теста [15], который основан на том, что дегидрогеназы митохондрий превращают МТТ-реактив в окрашенные кристаллы формазана в метаболически активных клетках. Клетки высевали в 96-луночные планшеты и после их прикрепления к поверхности лунок добавляли соответствующие количества порошка оксида железа. Затем после культивирования клеток с наночастицами в ростовую среду добавляли 10 мкл 0,5%-ного раствора МТТ, их инкубировали 3 часа при 37 °С. Затем кристаллы формазана растворяли в 0,2 мл DMSO при встряхивании на шейкере. После этого измеряли на мультискане оптическую плотность растворов при длине волны 540 нм.

Для подсчёта количества клеток на поверхности гидрогелей мы переносили фрагменты гидрогелей в чистые чашки Петри. Затем при помощи раствора трипсина в версене (0,25 %) клетки снимали с поверхности гидрогеля и осаждали в отдельных пробирках (центрифужные пробирки или пробирки Eppendorf на 1,5 мл) при помощи центрифугирования. Затем супернатант осторожно удаляли, а осаждённые клетки суспендировали в незначительном количестве культуральной среды DMEM-HG. Используя камеру Горяева, подсчитывали общее количество клеток, снятых с поверхности каждого гидрогеля.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы было изучено влияние концентрации наночастиц оксида железа Fe_3O_4 на жизнеспособность клеток в зависимости от размера наночастиц. Для частиц наименьшего размера (10 нм) была показана ярко

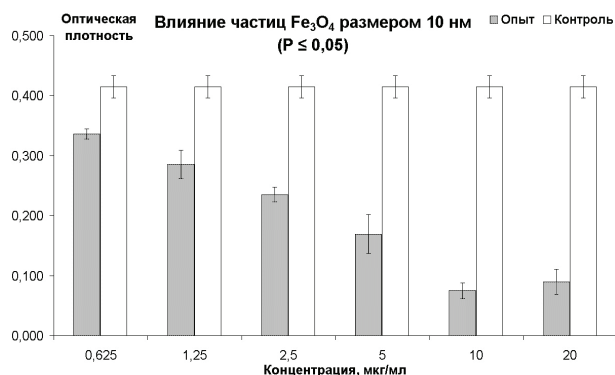


Рис. 1. Влияние наличия в среде частиц Fe_3O_4 размером 10 нм на пролиферацию клеток

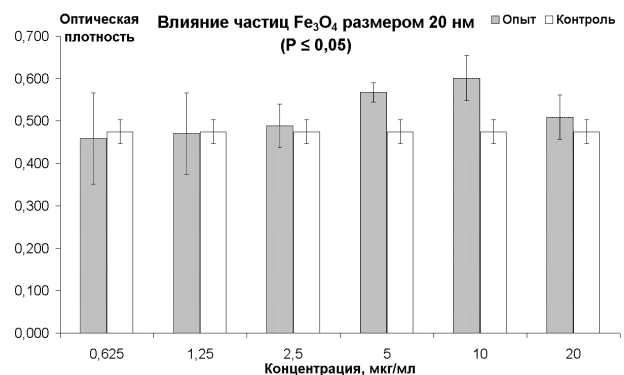


Рис. 2. Влияние наличия в среде частиц Fe_3O_4 размером 20 нм на пролиферацию клеток

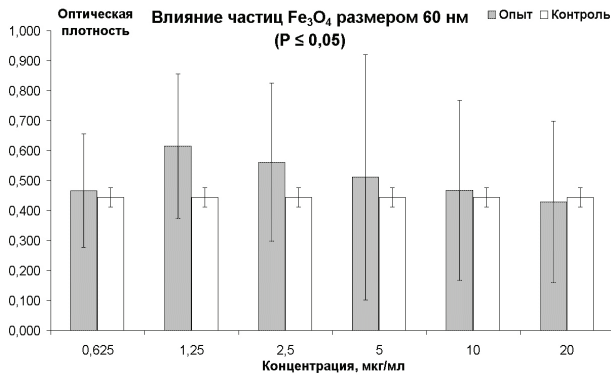


Рис. 3. Влияние наличия в среде частиц Fe_3O_4 размером 60 нм на пролиферацию клеток

выраженная обратная зависимость выживаемости клеток от концентрации частиц в культуральной среде (рис. 1). Наночастицы уже при наименьшей концентрации (0,625 мкг/мл), используемой нами, вызывали резкое снижение количества живых клеток (статистически достоверный эффект), и по мере увеличения их концентрации цитотоксическое действие значительно усиливалось.

Совершенно иначе действовали на выживаемость клеток наночастицы оксида железа большего размера. Так, наночастицы размером 20 нм (рис. 2) и 60 нм (рис. 3) не вызывали гибели клеток. Более того, при некоторых концентрациях наблюдалась тенденция увеличения количества метаболически активных клеток по отношению к необработанному контролю.

Как свидетельствуют данные, представленные на рис. 2 для наночастиц размером 20 нм эффект стимуляции пролиферации клеток наблюдался при концентрациях 5 и 10 мкг/мл (рис. 2). При этом позитивное влияние частиц размером 20 нм было статистически достоверным при $P \leq 0,05$. В то же время для частиц размером 60 нм существенный разброс экспериментальных данных не позволил выявить статистически достоверную разницу между опытом и контролем (рис. 3).

Наночастицы оксида железа размером 200 нм, как можно видеть на рис. 4, не оказывали существенного влияния на жизнеспособность клеток. Опытные и контрольные значения количества клеток достоверно не различались, также не обнаружено позитивных или негативных тенденций влияния наночастиц на выживаемость и пролиферацию клеток. Мы предполагаем, что различия в биологической активности наночастиц определяются их различной способностью к взаимодействию с клеточными рецеп-

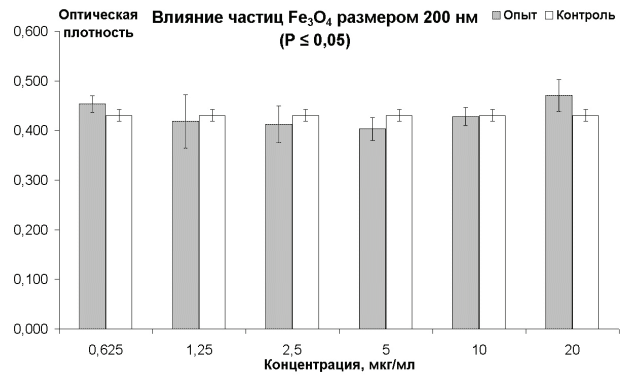


Рис. 4. Влияние наличия в среде частиц Fe_3O_4 размером 200 нм на пролиферацию клеток

торами, проникновению в клетки и воздействию на клеточные процессы. Возможно, наночастицы размером 200 нм вообще не проникают в исследуемые клетки, но этот вопрос нуждается в специальном изучении.

На втором этапе работы мы изучили, влияет ли на выживание и пролиферацию клеток включение наноразмерных частиц и ионов металлов в матрикс, на котором растут клетки. Исходя из данных литературы, мы предположили, что наличие наночастиц или ионов таких металлов, как серебро, цинк и марганец, в составе гидрогеля может стимулировать пролиферацию клеток на поверхности такого матрикса. Это предположение в определённой степени подтвердилось в эксперименте.

Мы наблюдали отчётливо выраженную тенденцию стимуляции пролиферации клеток при определённых концентрациях наночастиц серебра (максимум при 25 мкг/г массы гидрогеля, рис. 5), соединений марганца (максимум при 0,9 мкг/мл, рис. 6) и цинка (максимум при 0,5 мкг/

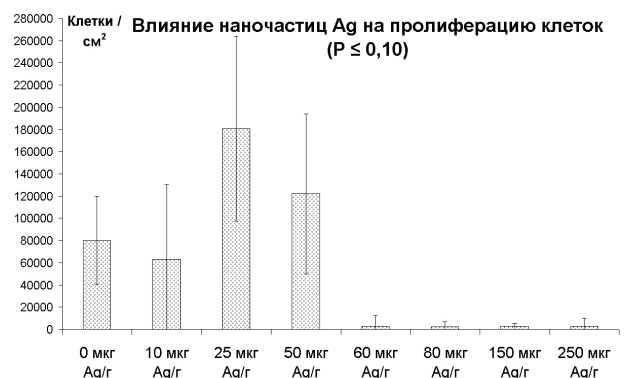


Рис. 5. Влияние наночастиц Ag в составе матрикса на пролиферацию клеток на поверхности гидрогеля

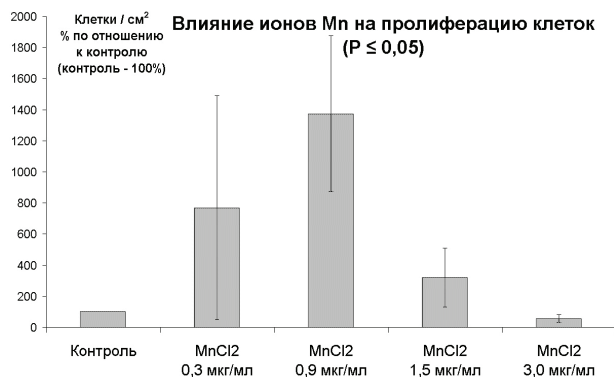


Рис. 6. Влияние ионов марганца в составе матрикса на пролиферацию клеток на поверхности гидрогеля

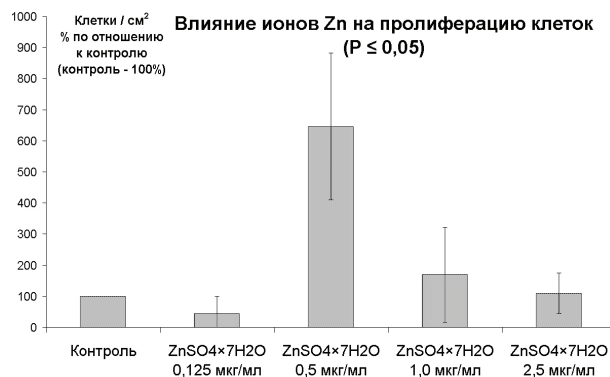


Рис. 7. Влияние ионов цинка в составе матрикса на пролиферацию клеток на поверхности гидрогеля

мл, рис. 7). В последнем случае различия между опытными и контрольными значениями статистически достоверны при $P \leq 0,05$.

Однако увеличение концентраций металлов выше определенного уровня (для каждого металла он различен) приводит к снижению количества клеток до контрольного уровня, а в случае наночастиц серебра при концентрациях 60 мкг/г массы гидрогеля и выше наблюдалось статистически достоверное цитотоксическое или цитостатическое действие на исследуемые клетки (рис. 5).

Выводы

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что наноразмерные частицы и ионы некоторых металлов, таких как железо, серебро, марганец и цинк при определенных условиях способны стимулировать пролиферацию стволовых клеток человека, а также влиять на их жизнеспособность и метаболическую активность. Поэтому наночастицы и ионы металлов, по-видимому, перспективны для использования в качестве дополнительного компонента биоконструкций, предназначенных для дальнейшего использования в медицине.

ЛИТЕРАТУРА

- Ernest H., Shetty R. Impact of nanotechnology on biomedical sciences: Review of current concepts on convergence of nanotechnology with biology [Электронный ресурс] // AZoNano – Online J. of Nanotechnology. – May 2005. – 1. – a0101. – Режим доступа: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1242>.
- Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine [Электронный ресурс] // Journal of Nanobiotechnology. – 2004. – 2, N 3. – Режим доступа: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>.
- Berry C., Curtis A. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine [Электронный ресурс] // J. Phys. D. Appl. Phys. – 2003. – 36, N 13. – Режим доступа: http://iopscience.iop.org/0022-3727/36/13/203/pdf/0022-3727_36_13_203.pdf.
- Lu A.-H., Salabas E.L., Schuth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application // Angew. Chem. Int. Ed. – 2007. – 46, N 8. – P. 1222–1244.
- Глущенко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов // Химическая физика. – 2002. – 21, № 4. – С. 79–85.
- Глущенко Н.Н., Ольховская И.П., Плетенева Т.В., Фаткуллина Л.Д., Ершов Ю.А., Федоров Ю.И. Биологическое действие высокодисперсных порошков металлов // Изв. АН СССР. Серия биологическая. – 1989. – № 3. – С. 415–422.
- Рахметова А.А., Богословская О.А., Ольховская И.П., Алексеева Т.П., Лейпунский И.О., Глущенко Н.Н. Ранозаживляющие свойства нового поколения на основе наночастиц меди // Сборник трудов X Международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке: инновационные технологии в биологии и медицине 2009». – М., 2009. – С. 299–300.
- Tenaud I., Saiagh I., Dreño B. Addition of zinc and manganese to a biological dressing // Journal of Dermatological Treatment. – 2009. – 20, N 2. – P. 90–93.
- Cheng F.Y., Su C.H., Yang Y.S., Yeh C.S., Tsai C.Y., Wu C.L., Wu M.T., Shieh D.B. Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications // Biomaterials. – 2005. – 26, N 7. – P. 729–738.
- Brunner T., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R., Limbach L., Bruinink A., Stark W.J. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility // Environ. Sci. Technol. – 2006. – 40, N 14. – P. 4374–4381.
- Косенко О.О., Лукаш Л.Л., Самченко Ю.М., Рубан Т.А., Ульберг З.Р., Лукаш С.И. Кополлимерные гидрогелевые мембраны для иммобилизации и культивирования стволовых клеток человека // Biopolymers and cell. – 2006. – 22, № 2. – С. 143–148.
- Самченко Ю.М., Лукаш Л.Л., Косенко О.О., Ульберг З.Р., Рубан Т.О., Козинец Г.П. Біосумісний гідрогель медичного призначення та спосіб його одержання. Патент України на винахід № 82583. Опубл. 25.04.2008, Бюл. № 1.

13. Косенко О.О., Лукаш Л.Л., Самченко Ю.М., Рубан Т.А., Лукаш С.І., Ульберг З.Р., Галаган Н.П. Штучний еквівалент шкіри на основі кополімерних гідрогелевих мембран з іммобілізованими мезенхімальними стовбуровими клітинами людини // *Biopolymers and cell.* – 2006. – 22, № 6. – С. 446–451.
14. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнирук В.О., Підпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* : зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2011. – 11. – С. 493–498.
15. Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А., Сидорук К.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Покровская М.В., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н. Противоопухолевая активность l-аспарагиназы из *Yersinia pseudotuberculosis* // *Биомед. химия.* – 2008. – 54, № 6. – С. 712–719.

PAPUGA A.YE.¹, SAMCHENKO YU.M.², SUHORADA H.M.¹, RUBAN T.A.¹,
KOLOMYETS YU.N.¹, ZENYCH A.V.¹, UVAROVA I.V.³, ULBERG Z.R.², LUKASH L.L.¹

¹ Institute of molecular biology and genetics of NASU,

Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: alexander.papuga@gmail.com.

² Ovcharenko Institute of biocolloid chemistry NASU,

Ukraine, 03142, Kyiv, Vernadskogo ave., 42

³ Frantsevich Institute for Problems of Materials Science NASU,

Ukraine, 03680, Kyiv, Krzhizhanovsky str., 3

INFLUENCE OF NANOPARTICLES AND IONS OF METALS ON SURVIVAL AND PROLIFERATION OF HUMAN STEM CELLS *IN VITRO*

Aims. The development of new therapeutic agents and biotechnological tools with nanomaterials in their compositions is perspective and promising field. Thus, the aim of our study was to investigate the effect of nanoscale particles or ions of some metals on the survival and proliferation of cells *in vitro*. **Methods.** We used human stem cell line 4BL. Cells were incubated in the presence of nanoparticles (Fe₃O₄, Ag) and metal ions (Mn²⁺, Zn²⁺). Proliferative activity of the cells was determined by MTT assay or direct counting the cells in suspension. **Results.** Metal nanoparticles and ions at certain concentrations increased the number of metabolic active cells as compared to control cell populations. **Conclusions.** Our data evidence that the nanoparticles (Fe₃O₄, Ag) and the metal ions (Mn²⁺, Zn²⁺) used in our experiments were to be able to influence on the survival and the proliferation of the cells in concentration dependent manner.

Keywords: nanoparticles, metal ions, cells *in vitro*, proliferation, survival.