

На правах рукописи

Позмогова Татьяна Николаевна

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАЗНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ
ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, ДОПИРОВАННЫХ КЛАСТЕРНЫМ
КОМПЛЕКСОМ МОЛИБДЕНА, В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

1.5.22 – Клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2023

Работа выполнена на кафедре физиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор

Шестопалова Лидия Владимировна

Официальные оппоненты:

Сорокина Ирина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук

Сергеевичев Давид Сергеевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной хирургии и морфологии Института экспериментальной биологии и медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н.Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2023 г. в _____ час. на заседании совета 24.1.242.03 в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время развивается большое количество методов лечения рака, однако все используемые в клинике методы имеют те или иные недостатки, ограничивающие их эффективность и область применения. Одними из наиболее перспективных методов противоопухолевой терапии на данный момент являются фотодинамическая терапия и доставка цитостатических препаратов в клетки опухоли. Для повышения эффективности этих направлений терапии ведется постоянная разработка новых методов и материалов. Цельные и пористые частицы диоксида кремния становятся достаточно популярным объектом исследования в различных областях биологии и медицины благодаря своей высокой инертности, биосовместимости и большой площади поверхности (Cui, 2020; He, 2011). Высокий интерес для исследователей представляет и возможность модификации поверхности данных частиц, которая позволяет менять такие параметры, как гидрофильность, чувствительность к pH и температуре и таргетность (Zhang, 2020). Сами по себе частицы диоксида кремния не обладают эффектами люминесцентных агентов или фотосенсибилизаторов – они являются инертным каркасом и могут проявлять различные свойства в зависимости от молекул, включаемых в их матрицу. В качестве таких молекул можно использовать октаэдрические кластерные комплексы молибдена, обладающие люминесцентными и фотодинамическими свойствами.

Потенциал применения допированных кластерным комплексом частиц может быть очень широким, но для изучения перспектив их использования в биологии и медицине необходим анализ их биологических эффектов. Актуальность данной работы заключается в том, чтобы понять, как поменяется жизнеспособность и активность клеток после инкубации с изучаемыми частицами. Особый интерес представляет изучение реакции клеток на частицы различного диаметра, поскольку зависимость биологических эффектов частиц от их диаметра исследована на данный момент недостаточно подробно. Оценка этих базовых параметров позволит судить о возможности использования полученных частиц для решения задач биомедицины.

Степень разработанности темы исследования. Частицы диоксида кремния были успешно использованы для доставки нуклеиновых кислот, белков, агентов для визуализации сосудов и очагов опухолей и препаратов против различных типов заболеваний (Huang, 2019; Мека, 2018). Для данного типа частиц оценена клеточная и системная токсичность, а также биологические эффекты при различных способах доставки в организм (Flood-Garibay, 2021). Преобладающее число работ направлено на изучение наноразмерных частиц кремния, поскольку они более широко используются в различных отраслях биологии, медицины и производства. Микрочастицы диоксида кремния с диаметром более 300 нм остаются недостаточно изученными, а работы, проводящие сравнение биологических эффектов частиц аморфного диоксида кремния (ASiO_2) различных размеров и форм, малочисленны и противоречивы (Yuan 2010; He, 2011; Liu, 2012).

Несмотря на то, что в состав кремниевых частиц ранее включались различные молекулы – такие, как золото или серебро – возможности включения в кремниевую матрицу кластерных комплексов тяжелых металлов уделено на данный момент небольшое внимание. Ранее была показана способность кластерных комплексов молибдена к люминесценции и фотоиндуцированной токсичности (Vorotnikova, 2019). Эти особенности свидетельствуют о том, что как сами кластерные комплексы, так и материалы, включающие их в свой состав, могут найти применение в качестве биологических меток, агентов для доставки препаратов в клетки и фотосенсибилизаторов. Тем не менее, данные комплексы ранее не были включены в состав кремниевых частиц, а также не было показано, сохраняются ли их свойства при таком включении.

Таким образом, данная работа направлена на установление зависимости биологических эффектов кремниевых частиц различного диаметра от включения в их состав кластерного комплекса молибдена и оценку поведения кластерных комплексов молибдена при

включении в кремниевую матрицу. В соответствии с этим были определены цель и задачи исследования.

Цель исследования. Охарактеризовать биологические эффекты частиц диоксида кремния различного диаметра, допированных кластерным комплексом молибдена, в культуре клеток.

Задачи исследования:

Определить биологические эффекты кластерных комплексов молибдена в растворе на культуре клеток Нер-2 и MRC-5.

Оценить жизнеспособность клеток после инкубации с частицами диоксида кремния различного диаметра и с различной долей кластерного комплекса молибдена в составе кремниевой матрицы в нормальных условиях и после облучения.

Изучить особенности проникновения, локализации и накопления в клетках частиц диоксида кремния различного диаметра.

Оценить и сравнить эффективность применения наночастиц и микрочастиц диоксида кремния, допированных октаэдрическим кластерным комплексом молибдена, в качестве фотосенсибилизаторов и агентов для доставки белков в клетки.

Научная новизна. В данной работе получены и описаны частицы диоксида кремния, допированные октаэдрическим кластерным комплексом молибдена ($\{Mo_6I_8\}@SiO_2$). Впервые установлено, что жизнеспособность клеток при инкубации с растворами частиц не зависит от концентрации кластерного комплекса молибдена в составе кремниевой матрицы частиц.

Впервые проведено изучение и сравнение таких биологических эффектов, как кинетика накопления и выведения из клетки, фотоиндуцированная токсичность и локализация частиц $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ различного диаметра в клетке. Показано, что меньший диаметр частиц способствует большей скорости их накопления в клетке и выведения из клетки. Кроме того, для частиц большего диаметра показана локализация в эндосомах, лизосомах и мультивезикулярных тельцах, тогда как для наночастиц наблюдалось свободное распределение в цитоплазме.

Впервые проведена оценка возможности практического применения полученных частиц в качестве агентов доставки белков в клетку и фотосенсибилизаторов. Продемонстрировано, что биологические эффекты частиц $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ зависят от их диаметра. Для кластерных комплексов молибдена в виде раствора изучена стабильность в фосфатном буфере и в культуральной среде, а также исследована цитотоксичность и фотодинамическая активность.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты носят как фундаментальный, так и прикладной характер. Показано, что токсичность частиц диоксида кремния не зависит от концентрации кластерного комплекса молибдена в составе их матрицы. Продемонстрировано, что частицы диоксида кремния с одинаковым содержанием кластерного комплекса молибдена, но отличающимся в 10 раз диаметром, проявляют различные биологические эффекты. Для микрочастиц диоксида кремния, включающих в свой состав кластерный комплекс молибдена, практически не проводились исследования биологической активности – таким образом, полученные в ходе работы данные вносят вклад в изучение биоматериалов. Для наночастиц $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ выявлена высокая эффективность в качестве фотосенсибилизатора. Показана способность микрочастиц $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ доставлять в клетку белок GFP, не утрачивая при этом люминесцентных свойств. Эти результаты свидетельствуют о большом потенциале применения изученных комплексов в биологии и медицине.

Методология и методы диссертационного исследования.

Дизайн эксперимента и разнообразие используемых методов позволяют обеспечить достижение поставленных задач и получить адекватные результаты. В работе были использованы методы МТТ-теста, двойного окрашивания, проточной цитометрии и конфокальной микроскопии для оценки цитотоксичности и внутриклеточного проникновения, электронно-микроскопическое исследование, а также проведен статистический анализ полученных результатов. Для определения фотодинамической активности изучаемых соединений

было проведено облучение клеток после инкубации с исследуемыми веществами видимым светом и рентгеном. Для лучшего понимания поведения кластерных комплексов молибдена в растворе были сняты их спектры эмиссии и оценены размеры образуемых в растворе частиц методом светового рассеяния. С помощью красителя 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (DCF) была изучена интенсивность генерации клетками синглетного кислорода после инкубации с наночастицами и облучения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Инкубация клеток линии Нер-2 с кластерными комплексами молибдена $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(2-[2-(2\text{-метоксиэтокс})\text{этокс}]\text{ацетат})_6]$ и $[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{DMSO})_6](\text{NO}_3)_4$ с последующим облучением вызывает фотоиндуцированную гибель клеток. Жизнеспособность клеток значительно меняется в зависимости от времени выдержки растворов кластерных комплексов, что является следствием быстрого гидролиза комплексов и затрудняет изучение их эффектов на биологических объектах.

2. После инкубации клеток линии Нер-2 с частицами $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$ диаметром 50 нм в отсутствие света их выживаемость остается без изменений, тогда как активация наночастиц светом приводит к фотоиндуцированной гибели клеток. Инкубация клеток Нер-2 с частицами диаметром 500 нм, напротив, снижает жизнеспособность клеток в отсутствие света, и не вызывает фотоиндуцированной токсичности. Таким образом, биологические эффекты допированных кластерным комплексом молибдена $(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{NO}_3)_6]$ частиц диоксида кремния зависят от их диаметра.

3. Накопление в клетках Нер-2 частиц $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$ диаметром 50 нм достигает максимума через 4 ч инкубации, тогда как для захвата частиц диаметром 500 нм клеткам требуется 8 ч. Время полного выведения обоих типов частиц из цитоплазмы клеток составляет более чем 24 ч. Микрочастицы $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$ локализуются поодиночке в эндосомах, лизосомах и микровезикулярных тельцах, тогда как наночастицы образуют скопления в цитоплазме.

4. Клетки линии Нер-2 приобретают свойство активно поглощать GFP в составе конъюгата с микрочастицами $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$, что обусловлено способностью микрочастиц $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$ эффективно доставлять GFP внутрь клетки.

Степень достоверности результатов диссертации. В работе использованы современные методы клеточной биологии (проточная цитометрия, двойное окрашивание, конфокальная микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия), обработка количественных данных проведена статистическими методами. Методы, использованные в работе, соответствуют поставленным целям и задачам. Исследования выполнены с достаточным для полноценного статистического анализа количеством повторов с использованием современного сертифицированного оборудования. Сформулированные в ходе работы выводы и научные положения вытекают из результатов работы и основаны на результатах собственных исследований.

Апробация результатов. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на XII международной конференции, посвященной 25-летию Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии (2016, Новосибирск), международной конференции «42nd International Conference on Coordination Chemistry» (2016, Брест, Франция), международной конференции «VI-th International Workshop of Transition Metal Clusters» (2018, Тюбинген), V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии института цитологии РАН (2016, Санкт-Петербург), XXVII международной конференции «International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry» (2019, Смоленица, Словакия), конференции «SIBIRCON 2019 – International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences» (2019, Новосибирск), научном съезде «BIOMATERIALS FOR CELL AND DRUG DELIVERY 2019» (2019, Манчестер), заседании совместного кафедр физиологии и цитологии и генетики Факультета естественных наук НГУ и лабораторий Института неорганической химии СО РАН (2022, Новосибирск).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 статьи – в журналах, входящих в международные базы данных (Web of Sciences, Scopus) и системы цитирования.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав («Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов исследований»), выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 261 источник. Работа иллюстрирована 50 рисунками, 2 таблицами.

Личный вклад автора. Все биологические исследования выполнены и проанализированы автором лично.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез частиц диоксида кремния и функционализация их поверхности группами 3-глицидилоксипропилаатриметоксилана. Синтез частиц проводился на базе Института неорганической химии им. А.В.Николаева СО РАН. Оценка диаметра полученных частиц была сделана с использованием электронного микроскопа Libra 120, Zeiss. Средний размер полученных частиц составил 50 и 500 нм. Частицы $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,0005}@\text{SiO}_2$ включали 0,5 мг, частицы $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,001}@\text{SiO}_2$ – 1 мг, $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,005}@\text{SiO}_2$ – 5 мг, а частицы $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$ – 10 мг кластерного комплекса на 1 г кремния. Часть полученных микрочастиц была в дальнейшем конъюгирована с GFP.

Ведение культуры клеток. Исследования проведены на линии клеток аденокарциномы гортани человека (Нер-2) и клетки фибробластов легкого эмбриона человека (MRC-5), полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки выращивали в ростовой питательной среде Игла MEM с содержанием 10% сыворотки крови плодов коровы, 200 мМ L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина в CO_2 инкубаторе при 37°C. Для пересева культур клеток в качестве диспергента применяли 0,25%-ный раствор трипсина (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) и 0,02%-ный раствор версена (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) в соотношении 1:2.

Исследование цитотоксичности полученных соединений с помощью МТТ-теста. Клетки культуры Нер-2 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тыс. клеток/лунку, инкубировали в течение 24 ч при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% двуокиси углерода (стандартные условия). Далее в планшеты вносили растворы синтезированных нано- и микрочастиц с различным соотношением кластерного комплекса молибдена – от 1% до 0,05% в широком диапазоне концентраций (от 0,01 мг/мл до 1,5 мг/мл, двойные разведения) и культивировали в течение 48 ч при стандартных условиях культивирования. Затем в каждую лунку добавляли МТТ-реагент в конечной концентрации 250 мкг/мл, инкубировали клетки в течение 4 ч, далее среду отбирали и добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) в каждую лунку. Значения оптической плотности субстрата в лунках измеряли с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Scientific) при длине волны 492 нм. Исследование цитотоксичности кластерных комплексов $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(2-[2-(2\text{-метоксиэтокси)этокси]ацетата})_6]$ и $[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{DMSO})_6](\text{NO}_3)_4$ проводили на клетках линий MRC-5 и Нер-2 по той же методике.

Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности. Клетки культуры Нер-2 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тыс. клеток/лунку. После этого питательная среда в лунках была заменена на свежую, содержащую частицы $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}0.01@\text{SiO}_2$ в диапазоне концентраций от 0,018 до 0,15 мг/мл. Клетки совместно инкубировались с растворами в течение 24 ч, после чего проводилось облучение клеток галогеновой лампой мощностью 500 W ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 30 мин. После облучения выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ-теста по методике, описанной выше. Исследо-

вание фотоиндуцированной цитотоксичности кластерных комплексов $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(2-[2-(2\text{-метоксиэтокси)этокси]ацетата})_6]$ и $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{DMSO})_6(\text{NO}_3)_4$ проводили на клетках линий MRC-5 и Нер-2 по той же методике. Для наночастиц также была проведена дополнительная оценка фотоиндуцированной токсичности по методике двойного окрашивания. Облученные клетки окрашивали Hoechst 33342 (SigmaAldrich) в течение 30 мин при 37°C и PI (от англ. Propidiumiodide, Пропидиум иодид) (Sigma-Aldrich) в течение 10 мин при 37°C. Для автоматической флуоресцентной визуализации использовали IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK).

Исследование кинетики накопления полученных соединений in vitro с использованием проточной цитометрии. К клеткам линии Нер-2 были добавлены растворы микрочастиц и наночастиц диоксида кремния $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}0.01@\text{SiO}_2$ в концентрации 0,1 мг/мл. Клетки инкубировались с добавленными растворами в течение 15 мин, 30 мин, 2, 4, 8 и 16 ч, после чего клетки были промыты и сняты с культурального планшета с помощью трипсина. Полученная суспензия клеток исследовалась с использованием проточного цитометра Cytoflex. Для детекции интенсивности люминесценции проникших в клетку частиц использовался фильтр на 690/50 нм.

Исследование кинетики выведения полученных соединений in vitro с использованием проточной цитометрии. К клеткам линии Нер-2 были добавлены растворы микрочастиц и наночастиц диоксида кремния $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}0.01@\text{SiO}_2$ в концентрации 0,1 мг/мл. Клетки инкубировались с добавленными растворами в течение 24 ч, после чего клетки промывались каждый час, а культуральная среда в клетках заменялась на чистую. Клетки продолжали инкубироваться таким образом в течение 15 мин, 30 мин, 2, 4, 8, 16 и 24 ч, после чего трижды промывали фосфатным буфером, чтобы удалить все не проникшие в клетки частицы из раствора. Затем клетки были сняты трипсином, и суспензия клеток исследовалась с использованием проточного цитометра Cytoflex. Для детекции интенсивности люминесценции проникших в клетку частиц использовался фильтр 690/50 нм.

Исследование проникновения частиц в клетки Нер-2 in vitro при помощи просвечивающей электронной микроскопии. К клеткам линии Нер-2 были добавлены растворы микрочастиц и наночастиц диоксида кремния $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}0.01@\text{SiO}_2$ в концентрации 0,1 мг/мл, затем клетки инкубировали 24 ч. В качестве контроля использовались клетки Нер-2, инкубированные в чистой среде. Далее работу проводили согласно протоколу пробоподготовки клеточных культур к исследованию на ПЭМ (Schrand A.M., 2010). Ультратонкие срезы изучали при помощи ПЭМ Libra 120 (Zeiss, Германия), документировали при помощи цифровой камеры и программного обеспечения iTEM версия 5.2 (Jeol, Япония). Элементный анализ проводили при помощи омега-фильтра и специального программного обеспечения по методике трех окон, описанных в литературе (Brydson, 2001).

Определение уровня генерации активных форм кислорода в клетках после инкубации с наночастицами $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}0.01@\text{SiO}_2$ и облучения. К клеткам линии Нер-2 были добавлены растворы кластер-содержащих наночастиц диоксида кремния $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}0.01@\text{SiO}_2$ в концентрации 0,1 мг/мл. Клетки инкубировались с частицами в стандартных условиях в течение 24 ч. В качестве положительного контроля использовались клетки, инкубированные с раствором радахлорина в концентрации 0,0025 мг/мл и 100 мкМ раствор перекиси водорода. В качестве отрицательного контроля выступали клетки, инкубированные в чистой питательной среде. Все группы клеток были поделены на клетки, которые облучались галогенной лампой мощностью 500 W ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 30 мин и клетки, которые держали в темноте. Перед облучением к клеткам был добавлен краситель 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат (Sigma-Aldrich) в концентрации 10 мкМ в HEPES-буфере с последующей инкубацией в темноте в течение 30 мин. Затем были получены изображения клеток с помощью клеточного сканера IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK) на увеличении 200x. Интенсивность зеленой флуоресценции клеток была подсчитана с использованием INCell Investigator software (GEHealthcare, UK).

Статистический метод. Статистическая обработка данных проводилась с использованием U-критерия Манна-Уитни, порог статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$. Для обчета данных использовалась программа Statistica 10 Enterprise, StatSoft.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование темновой и фотоиндуцированной токсичности кластерного комплекса $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(2-[2-(2\text{-метоксиэтокси)]ацетат})_6]$ (1) на клетках линий MRC-5 и Hep-2. После исследования токсичности кластерного комплекса методом МТТ-теста статистически значимых отличий между клетками двух линий отмечено не было (рис. 1). Поскольку кластерный комплекс (1) проявил значительную токсичность и низкую стабильность в водном растворе, его использование в фотоиндуцированной токсичности было возможно лишь в низких дозах. После облучения клеток с раствором (1) значительного снижения жизнеспособности не наблюдалось (рис. 2).

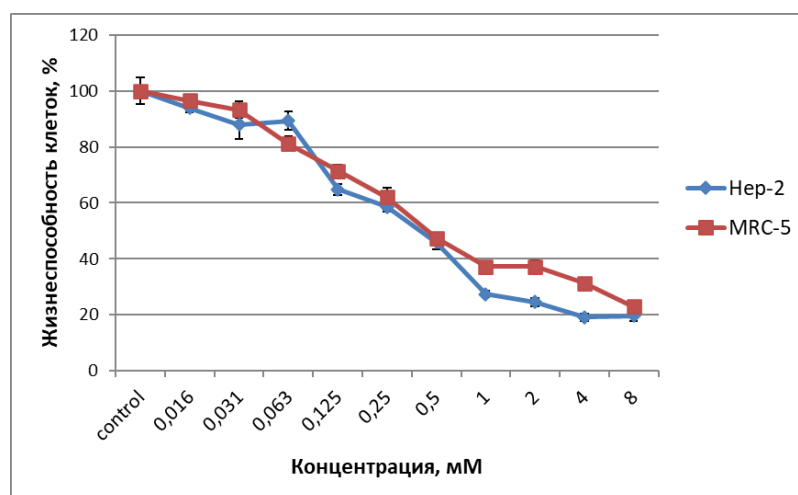


Рис. 1. Исследование темновой токсичности кластерного комплекса $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(2-[2-(2\text{-метоксиэтокси)]ацетат})_6]$ (1) на клетках линий MRC-5 и Hep-2.

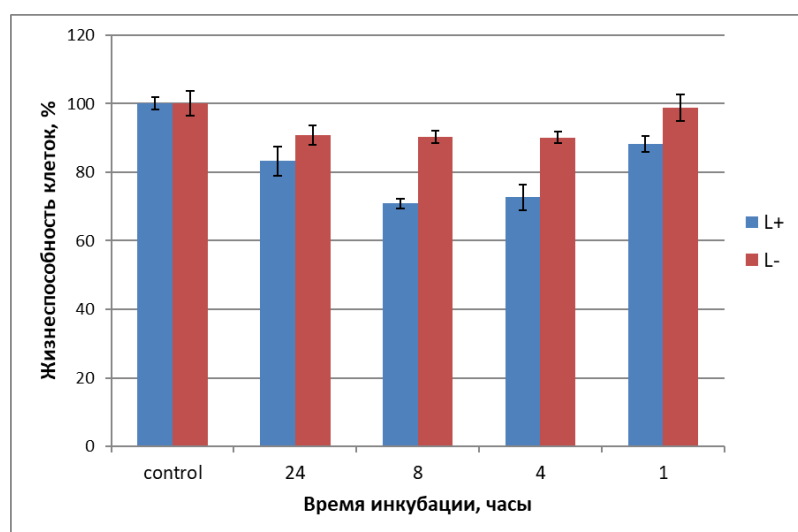


Рис. 2. Фотоиндуцированная токсичность кластерного комплекса (1) в концентрации 0,08 мМ на клетках линии Hep-2. Голубым цветом показана жизнеспособность клеток в отсутствие облучения, красным – после облучения.

Изучение цитотоксичности свежего и выдержанного кластерного комплекса $\{Mo_6I_8\}(DMSO)_6(NO_3)_4$ (2) на клетках линии Нер-2. Клетки линии Нер-2 были проинкубированы с выдержанным в течение 4 сут и свежим растворами кластерного комплекса (2). Выдержанный кластер, являющийся более гидролизованным, проявляет более низкую токсичность на клетках, тогда как свежий кластерный комплекс 2 обладает значительно более высокой токсичностью (рис. 3). Это говорит о низкой стабильности данного соединения в водном растворе, которая приводит к изменению его биологических эффектов.

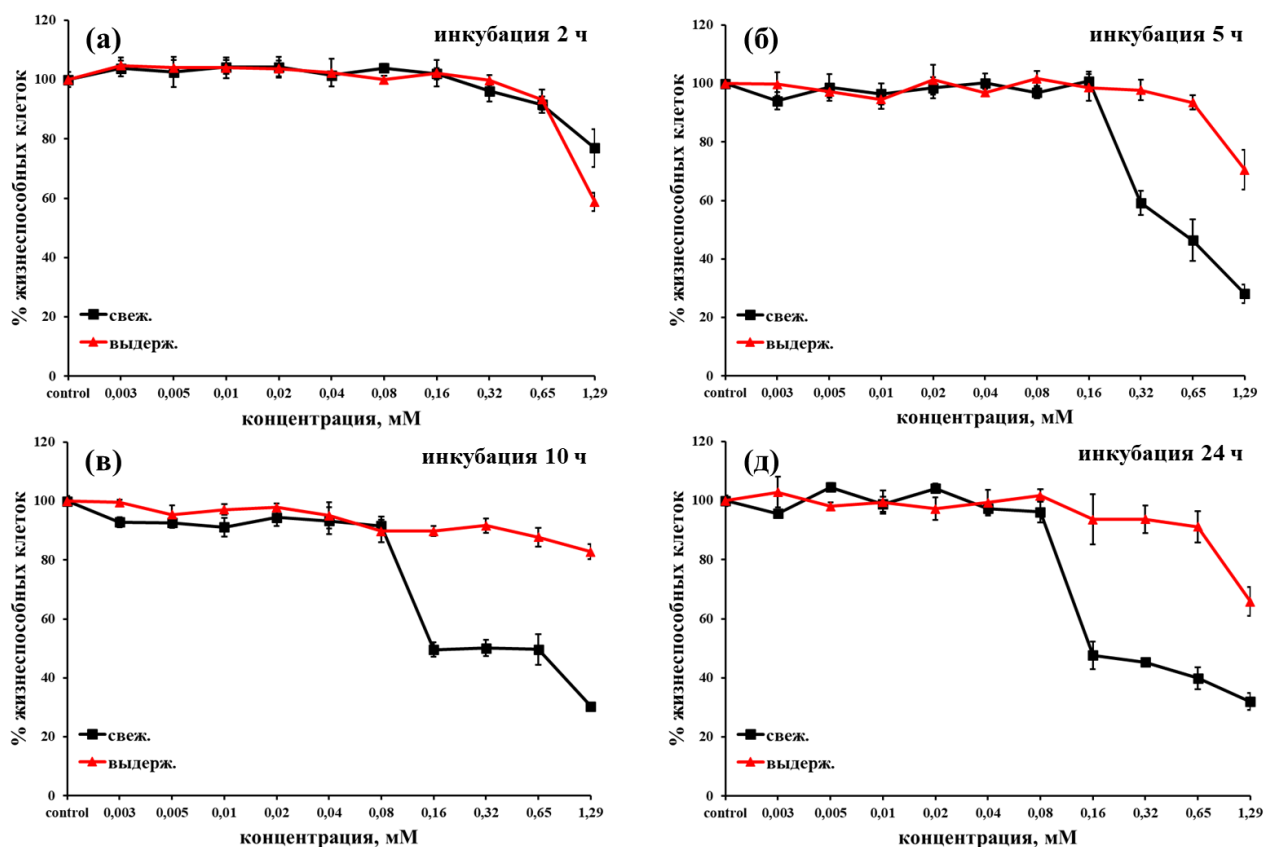


Рис. 3. Изучение жизнеспособности клеток линии Нер-2 после инкубации со свежим (черный) и выдержанным в течение 4 сут (красный) кластерным комплексом (2).

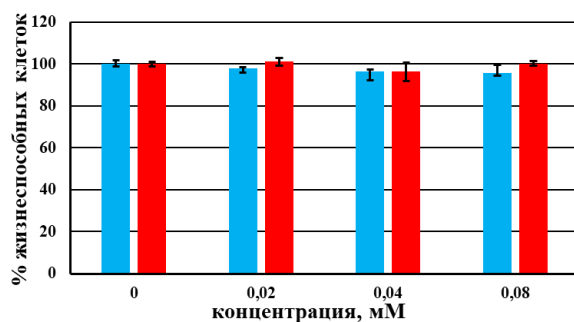
Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности свежего и выдержанного кластерного комплекса (2) на клетках линии Нер-2. Выдержанный кластерный комплекс показал умеренную фотоиндуцированную токсичность со снижением жизнеспособности клеток до 47 – 50%. Свежеприготовленный раствор не проявил фотоиндуцированной токсичности в исследованном диапазоне концентраций (рис. 4).

После изучения растворов кластерных комплексов стало очевидно, что их низкая стабильность в водном растворе мешает раскрыть весь возможный потенциал данных соединений. В дальнейшей работе кластерный комплекс молибдена был стабилизирован путем включения его в стабильную матрицу диоксида кремния с последующим получением частиц диаметром 50 ± 2 и 500 ± 33 нм.

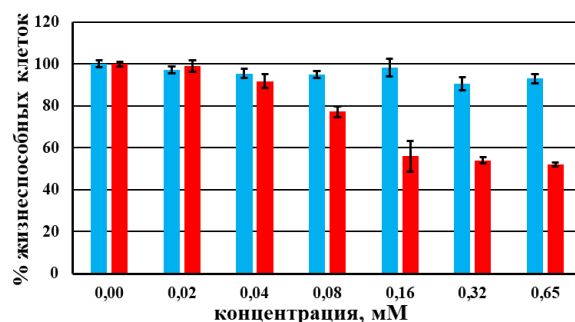
Сравнение цитотоксичности частиц диаметром 50 и 500 нм, содержащих различные концентрации кластера молибдена

После добавления к клеткам растворов микрочастиц SiO_2 , $\{Mo_6I_8\}^{0,001}@SiO_2$ и $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, результаты МТТ-теста не выявили достоверных отличий в токсичности между тремя группами (рис. 5). Для наночастиц результаты эксперимента были схожими – зависимости токсичности частиц от концентрации кластерного комплекса в их составе выявлено не было (рис. 6).

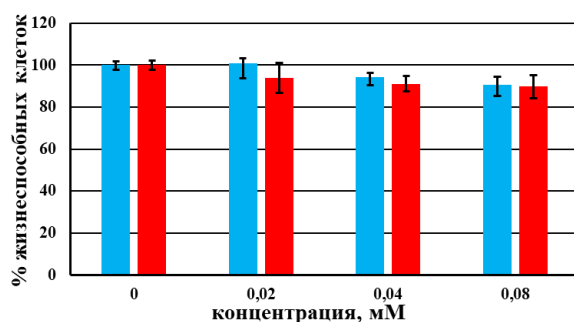
10 ч Свеж.



Выдерж.



24 ч Свеж.



Выдерж.

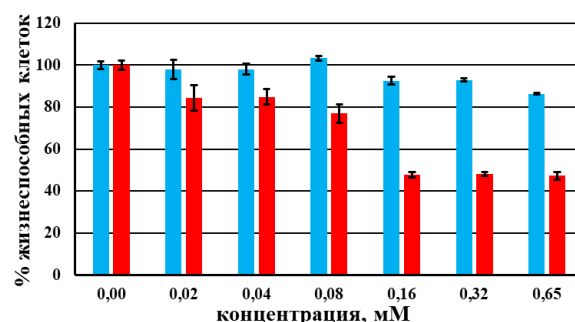


Рис 4. Фотоиндуцированная токсичность свежего и выдержанного кластерного комплекса (2) на клетках линии Нер-2. Голубым цветом показана жизнеспособность клеток в отсутствие облучения, красным – после облучения.

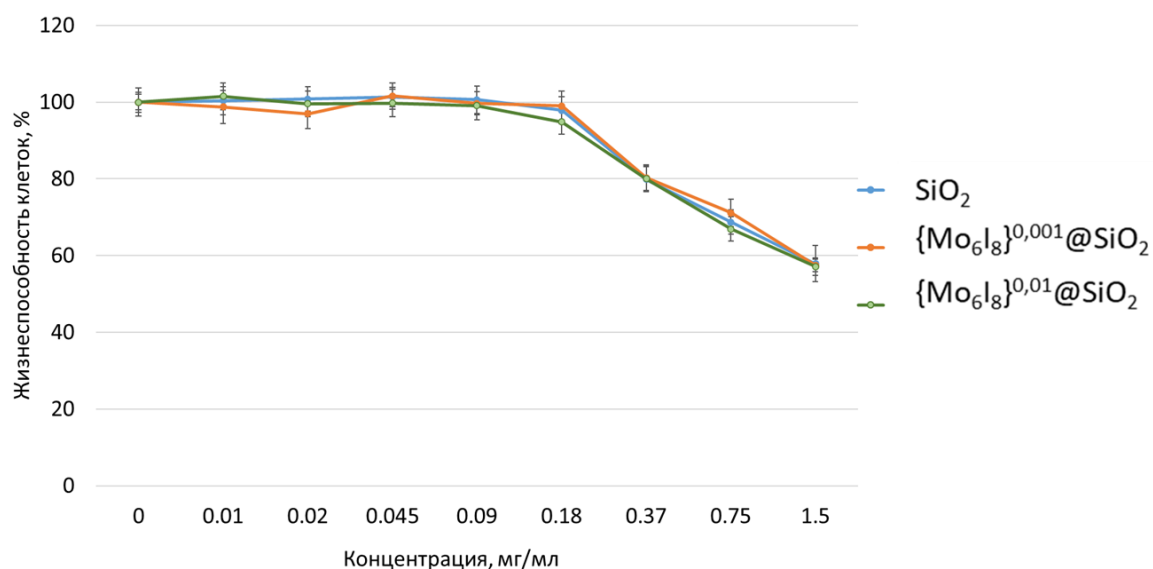


Рис. 5. Сравнение токсического эффекта микро частиц диаметром 500 нм с разной долей кластерного комплекса в составе кремниевой матрицы. МТТ тест на клетках линии Нер-2 после инкубации с растворами микро частиц.

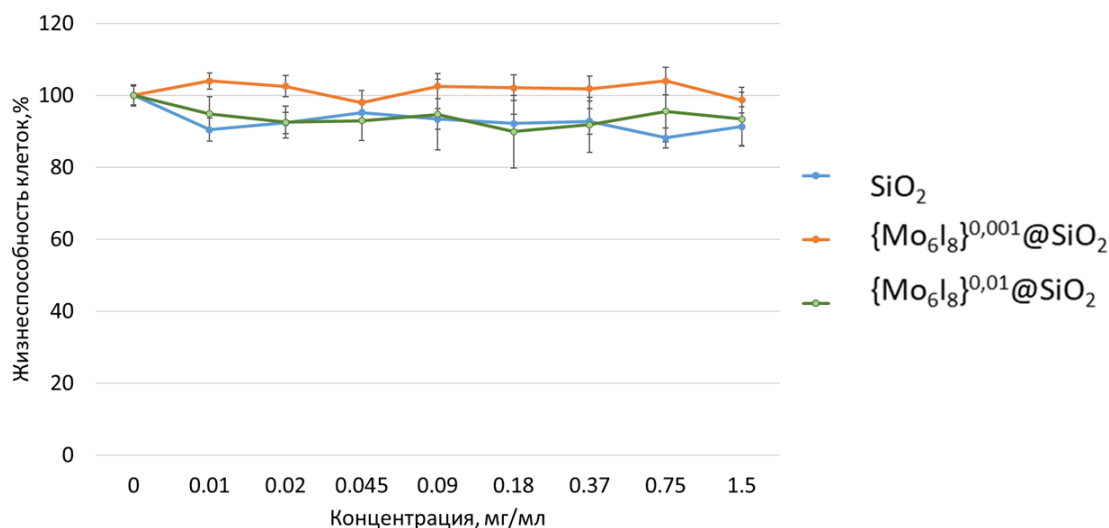


Рис. 6. Сравнение токсического эффекта наночастиц диаметром 50 нм с разной долей кластерного комплекса в составе кремниевой матрицы. МТТ-тест на клетках линии Нер-2 после инкубации с растворами наночастиц в течение 24 ч.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что и чистые наночастицы, и наночастицы с содержанием кластерного комплекса проявляют меньшую токсичность на клетках по сравнению с микрочастицами (табл. 1). Поскольку доля кластерного комплекса в составе частицы не оказывала значительного влияния на токсичность частиц, в дальнейшей работе использовались частицы с максимальным содержанием кластера.

Таблица 1. Значения полуингибирующих концентраций для микро- и наночастиц с различной долей кластерного комплекса молибдена

	SiO ₂	{Mo ₆ I ₈ } ⁿ @SiO ₂	
		n = 0,01	n = 0,001
микрочастицы	1,687±0,05	1,734 ± 0,07	1,755 ± 0,05
наночастицы	>1,5	>1,5	>1,5

Изучение кинетики клеточного накопления и выведения частиц. Поглощение наночастиц во всех контрольных точках за исключением 1,5 ч инкубации происходит значительно быстрее, чем микрочастиц. Наночастицы достигают пикового накопления в клетке через 2 ч после начала инкубации, тогда как микрочастицам требуется от 8 до 16 ч, чтобы достичь максимально возможной концентрации в клетке (рис. 7). Через 16 ч от начала инкубации концентрации наночастиц и микрочастиц в клетках имеют одинаковые значения. Помимо скорости накопления частиц в клетках, была исследована также скорость их выведения из клеток. Выведение микрочастиц из клеток происходит медленнее по сравнению с наночастицами. Возможно, более высокая токсичность микрочастиц по сравнению с наночастицами обусловлена именно тем, что они дольше задерживаются в клетках.

Исследование фотодинамической активности полученных микрочастиц. Для того, чтобы проверить, сохраняют ли кластерные комплексы молибдена свои фотодинамические свойства при включении в состав частиц, была проведена инкубация клеток линии Нер-2 с микро- и наночастицами {Mo₆I₈}^{0,01}@SiO₂ в нетоксичных концентрациях, с последующим облучением. Результаты данного эксперимента показали, что даже в максимальных дозах микрочастицы с кластерным комплексом молибдена проявляли незначительную фототоксичность – во всех концентрациях микрочастиц выживаемость клеток составляла более 80% (рис. 8). В отличие от микрочастиц, наночастицы в максимальных концентрациях выявили высокую фотоиндуцированную токсичность – в группе клеток, инкубированных с наночастицами в концентрации 0,15 мг/мл, доля выживших после облучения клеток составила всего 32%.

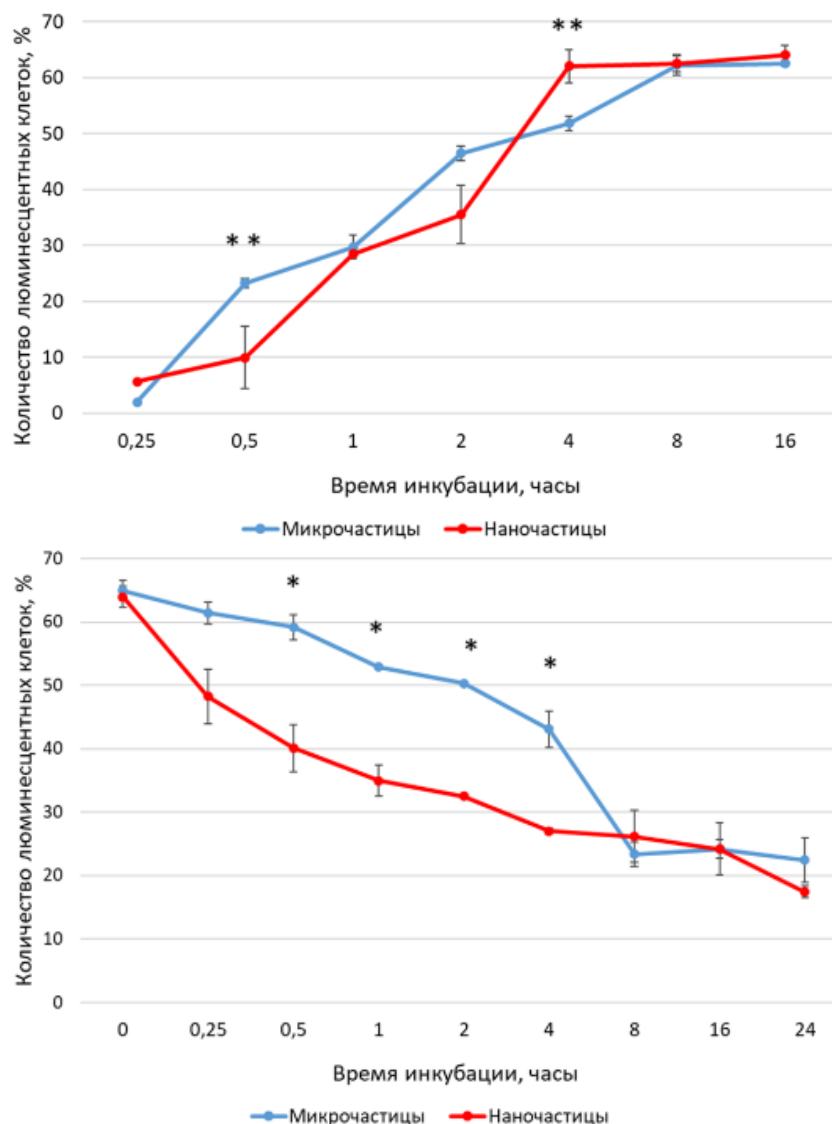


Рис. 7. Кинетика накопления (сверху) и выведения (снизу) частиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ диаметром 50 (синий) и 500 (красный) нм в клетках линии Нер-2, в зависимости от времени инкубации. ** $p < 0.05$.

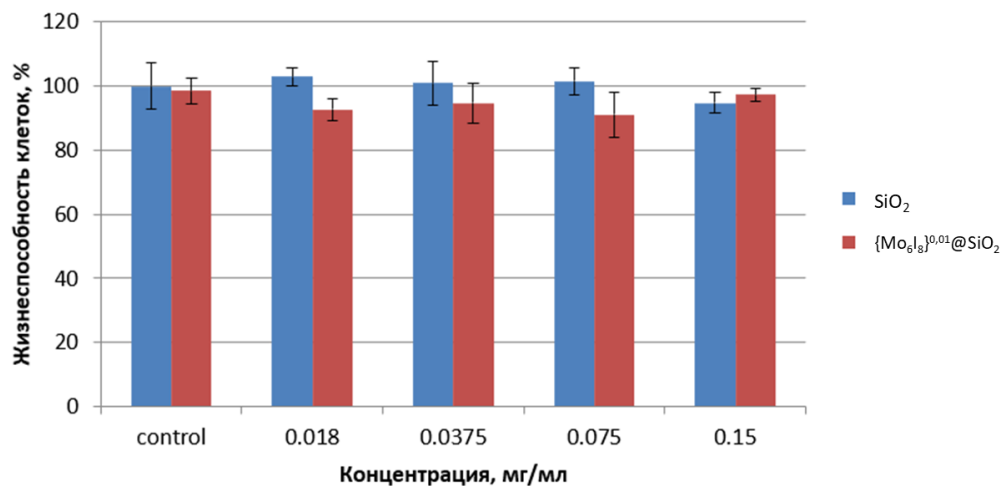


Рис. 8. Изменение жизнеспособности клеток линии Нер-2, инкубированных с микрочастицами диоксида кремния без кластерного комплекса и микрочастицами диоксида кремния, содержащими кластерный комплекс молибдена $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, в результате облучения галогенной лампой в течение 30 мин.

Несмотря на то, что доля кластерного комплекса была одинакова для обоих типов частиц – 10 мг кластерного комплекса на 1 г кремния – наночастицы оказались значительно более эффективны в элиминации опухолевых клеток при облучении, тогда как микрочастицы не проявили фототоксичности даже в максимальной концентрации (рис. 9). Вследствие того, что наночастицы продемонстрировали значительную цитотоксичность за счёт активации светом имеющегося в их составе кластерного комплекса, можно было ожидать их наибольшую эффективность в качестве фотоиндуцированных противоопухолевых агентов. Поэтому дальнейшее исследование наночастиц было направлено на оценку их фототоксичности и накопления в клетках. Микрочастицы проявили высокую биосовместимость и способность проникать в клетку. Благодаря этим качествам микрочастицы можно использовать в качестве люминесцентных детектируемых агентов-доставщиков, поэтому в следующих экспериментах оценивалась их способность доставлять в клетку конъюгированные с частицами молекулы.

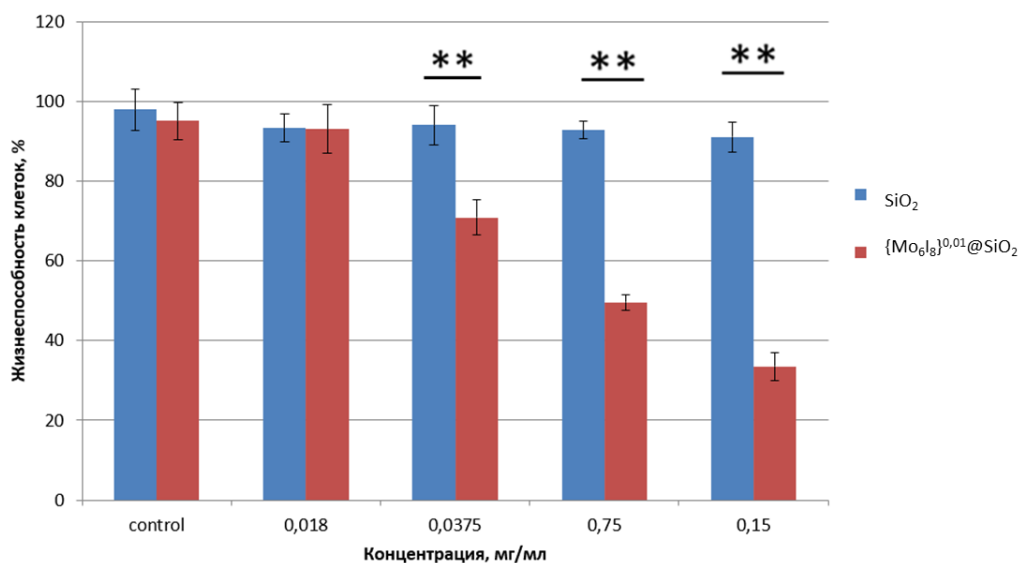


Рис. 9. Изменение жизнеспособности клеток линии Нер-2, инкубированных с наночастицами диоксида кремния без кластерного комплекса и наночастицами диоксида кремния, содержащими кластерный комплекс молибдена $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$, в результате облучения галогенной лампой в течение 30 мин. $p < 0.05$.

Оценка эффективности функционализации микрочастиц глицидиловыми группами. Для улучшения связывания переносимых белков с поверхностью микрочастиц была проведена обработка поверхности микрочастиц глицидиловыми группами. Далее была проведена конъюгация с GFP функционализированных и нефункционализированных микрочастиц. В качестве отрицательного контроля использовались микрочастицы, не конъюгированные с GFP. С помощью проточной цитометрии была оценена интенсивность зеленой люминесценции трех групп микрочастиц. Частицы, функционализированные глицидиловыми группами, проявляли большую степень люминесценции, что свидетельствует о более активном связывании молекул GFP с их поверхностью.

Оценка локализации микрочастиц в клетках линии Нер-2 с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки Нер-2 были проинкубированы с микрочастицами без GFP, с микрочастицами, конъюгированными с GFP, и с раствором GFP в свободном виде. Снимки, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, показали, что микрочастицы сами по себе проникают в клетки в достаточно большом количестве, тогда как GFP без прикрепления к микрочастицам не способен проникать в клетки. На изображениях клеток после инкубации с $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$, конъюгированными с GFP, отчетливо видна и красная эмиссия, излучаемая люминесцентными микрочастицами, и зеленая эмиссия, проявляемая белком GFP. Кроме того, на совмещенном изображении отчетливо видна колока-

лизация этих участков эмиссий. Эти результаты подтверждают, что микрочастицы действительно способны эффективно доставлять биологические молекулы в клетку, сохраняя при этом свои люминесцентные свойства.

Электронно-микроскопическое изучение локализации микрочастиц в клетках линии Нер-2. Клетки линии Нер-2, инкубированные с раствором $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$, были исследованы с помощью электронной микроскопии. В клетках были видны микрочастицы, локализованные в одномембранных везикулах, а также в структурах, которые могут быть идентифицированы как ранние эндосомы или мультивезикулярные тельца (рис. 10). Кроме того, значительное количество микрочастиц обнаружено в лизосомах (рис. 11).

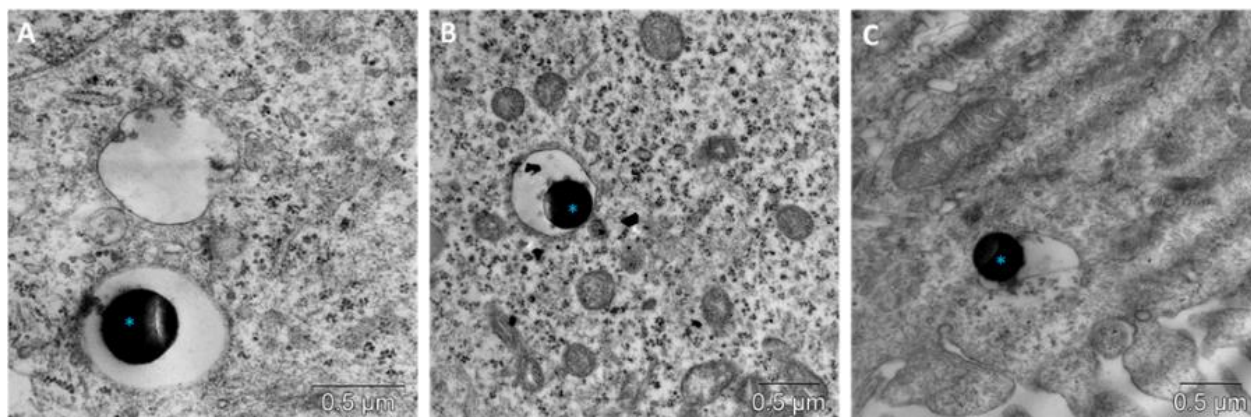


Рис. 10. Клетки линии Нер-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 60 000 (А) и 40 000 тыс. (В, С). Частицы расположены в мультивезикулярных тельцах. Голубой звездочкой показана частица.

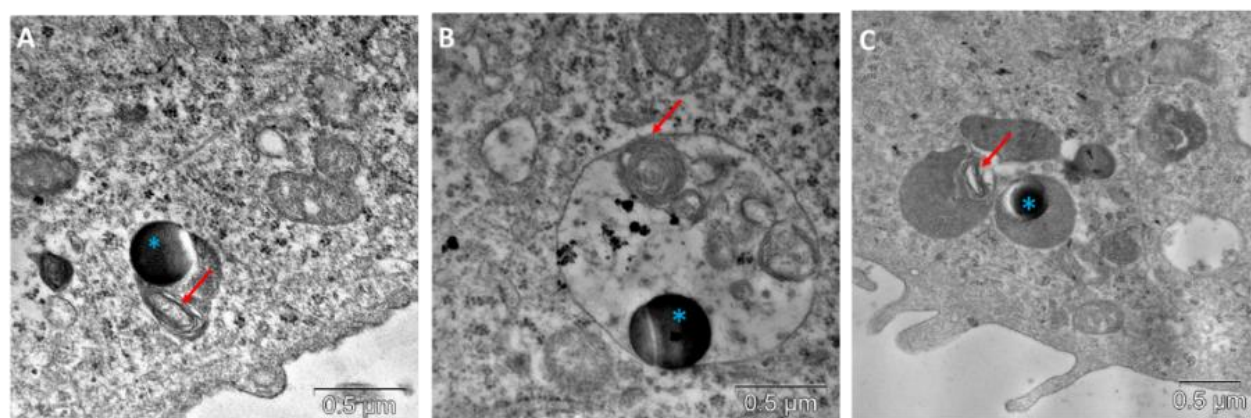


Рис. 11. Клетки линии Нер-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 60 000 (А, В) и 40 000 (С). Частицы расположены в мультивезикулярном тельце (В) или в лизосомах (А, С). Красной стрелкой отмечены миелиновые тельца. Голубой звездочкой показана частица.

Из общего числа исследованных клеток ($n=166$) 26% не включали частицы, 32% содержали частицы в мультивезикулярных телах, 21% – в лизосомах, 13% – в ранних эндосомах, и 8% - в поздних эндосомах (рис. 12).

Исследование фотоиндуцированной токсичности наночастиц $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$ методом двойного окрашивания. Метод двойного окрашивания позволил более точно определить количество живых и мертвых клеток Нер-2 после инкубации с наночастицами и облучения галогенной лампой. После облучения число погибших клеток в концентрациях 0,375, 0,75 и 0,15 мг/мл начинает пропорционально расти. В группе клеток, инкубированных с наночастицами в концентрации 0,15 мг/мл, после облучения погибло выше 65% клеток (рис. 13). Это является ярким свидетельством того, что наночастицы $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$, действительно, вызывают элиминацию раковых клеток после облучения.

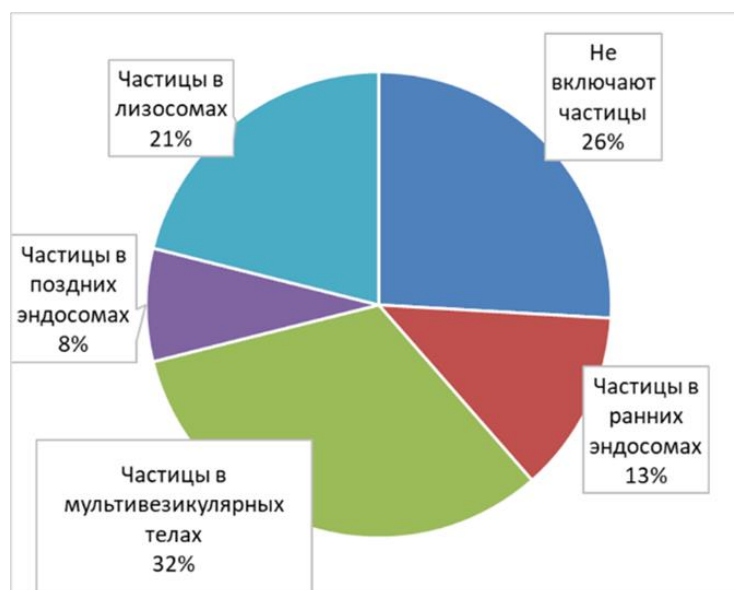


Рис. 12. Доля клеток Нер-2 (в %), включающих микрочастицы в различных клеточных структурах. Подсчитано 166 клеток.

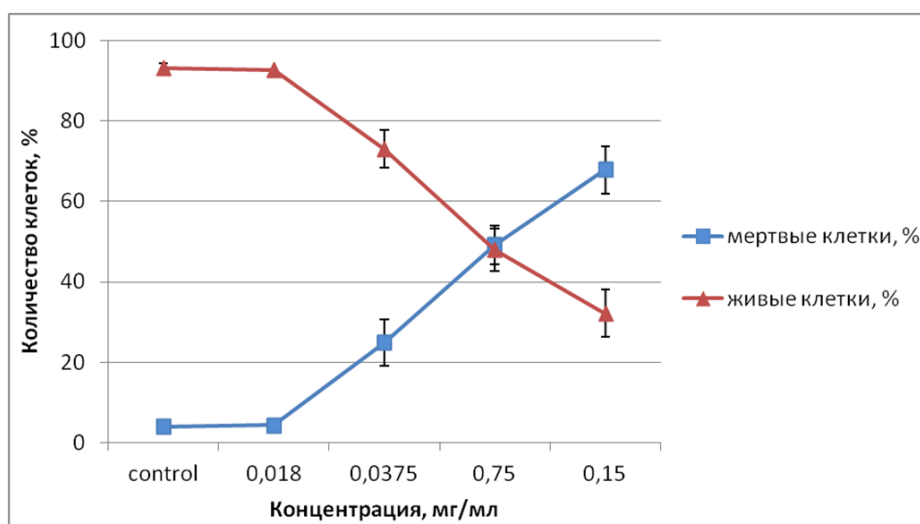


Рис. 13. Изменение жизнеспособности клеток линии Нер-2 после 24 часов инкубации с различными концентрациями кластерсодержащих наночастиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ после облучения галогенной лампой в течение 30 мин. Окрашивание йодидом пропидия и Hoechst.

Оценка внутриклеточной локализации наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки Нер-2 были проинкубированы с наночастицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$. После инкубации и фиксации клетки окрашивались флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (Thermo Fisher scientific) и AlexaFluor™ 532 Phalloidin (Sigma Aldrich). В результате данного анализа было выявлено, что наночастицы в цитоплазме клеток, преимущественно, образуют скопления. Конгломераты наночастиц располагаются в клеточной цитоплазме, не заходя в ядро клетки. Исходя из наблюдаемой на флуоресцентном микроскопе картины, можно предположить, что фотоиндуцированная токсичность наночастиц обусловлена не их воздействием на клеточное ядро, а высвобождением высоких концентраций активных форм кислорода в цитоплазме.

Электронно-микроскопическое картирование наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$. Элементное картирование проводили на ультратонких срезах клеточной культуры Нер-2, проинкубированной с наночастицами. Этот метод позволяет находить заданный элемент и точно определить его расположение на участке препарата. Результаты электронно-микро-

скопического элементного анализа подтверждают данные, полученные на флуоресцентном микроскопе. Наночастицы после попадания в клетку собираются в группы внутри цитоплазмы (рис. 14). Большая часть наночастиц располагаются в цитоплазме в свободном виде, лишь редкие группы собираются внутри эндосом.

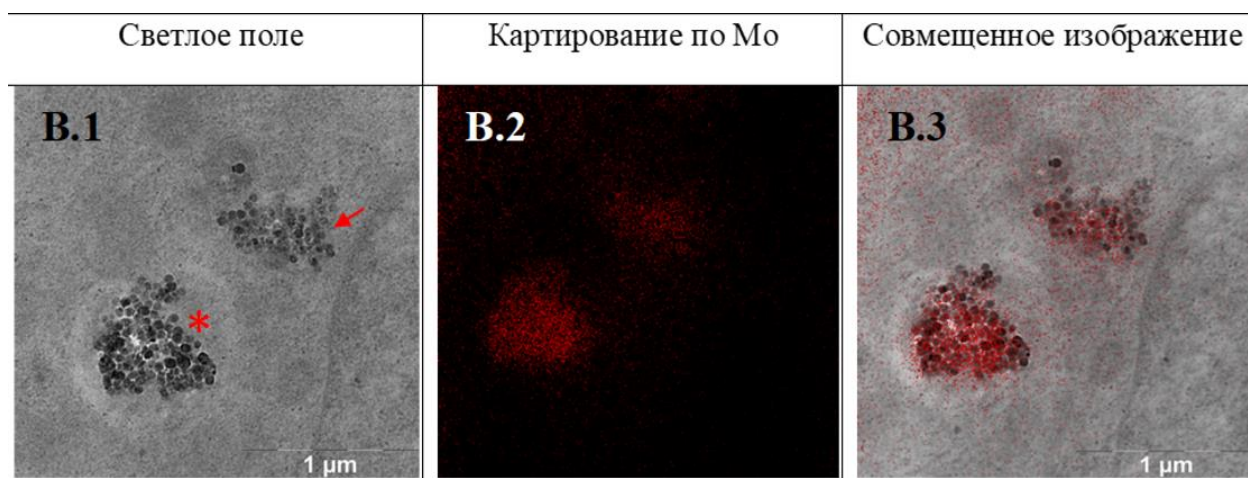


Рис. 14. Локализация наночастиц в цитоплазме клеток Нер-2. Стрелками отмечены свободные наночастицы в цитоплазме, звездочкой – наночастицы в эндосоме.

Оценка продукции клетками активных форм кислорода до и после облучения.

Для оценки механизма токсического действия наночастиц при облучении клетки линии Нер-2 были проинкубированы с раствором частиц и с красителем 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетатом (Sigma-Aldrich). Как только в клетке начинают образовываться избыточные количества активных форм кислорода (ROS), этот краситель активируется и начинает проявлять яркую люминесценцию в спектре 520 нм. В качестве положительного контроля были использованы клетки, инкубированные с перекисью, в качестве отрицательного – клетки, инкубированные в чистой среде. Третья группа клеток была инкубирована с радахлорином. В данном эксперименте была измерена интенсивность люминесценции клеток до и после облучения, что позволило нам судить, включает ли механизм фотоиндуцированной токсичности наночастиц выделение ROS. Общая интенсивность флуоресценции в описанных группах клеток до и после облучения представлена на рис. 15. В группе клеток, инкубировавшихся с радахлорином, и клеток, инкубировавшихся с наночастицами, показаны достоверные отличия в уровне ROS между клетками до облучения и клетками после облучения ($p < 0,005$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы на клеточной линии Нер-2 были изучены биологические эффекты кластерных комплексов молибдена $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(2-[2-(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетат})_6]$ и $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{DMSO})_6(\text{NO}_3)_4$ и их стабильность в водном растворе. Хотя данными соединениями была проявлена умеренная фотодинамическая токсичность, их низкая стабильность в водном растворе и в питательной культуральной среде не позволяет провести их полноценное изучение на биологических объектах.

Чтобы обойти трудности, которые вызывает использование кластерных комплексов в растворе, в данной работе были впервые получены частицы диоксида кремния диаметром $50 \pm$ и 500 ± 33 нм, которые включают в свою матрицу кластерный комплекс молибдена $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}$. Поскольку данные частицы обладают многими полезными свойствами – рентгеноконтрастность, люминесценция, фотоиндуцируемая активность – необходимо было определить для них оптимальную область перспективного применения.

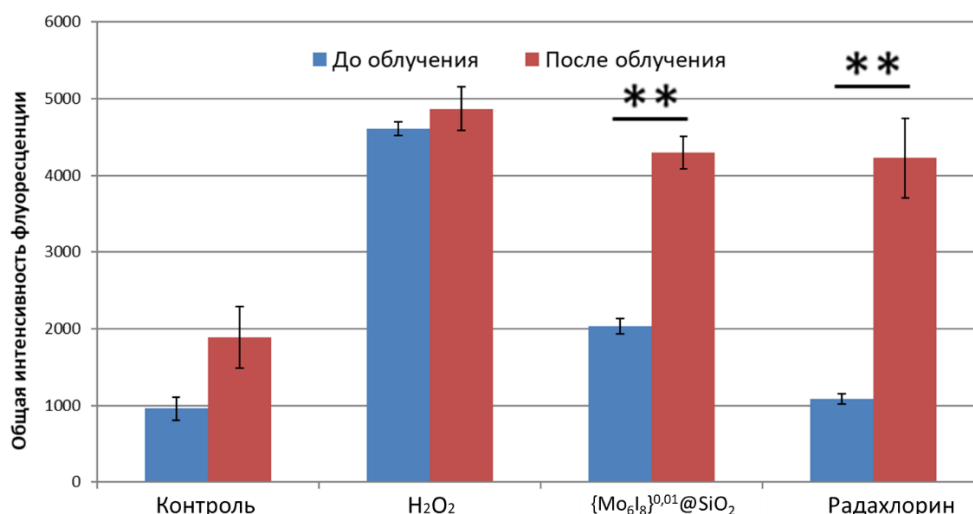


Рис. 15. Интенсивность люминесценции внутриклеточного красителя 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (Sigma-Aldrich) до и после облучения клеток Нер-2.

Проведено сравнение биологических эффектов частиц, а именно – темновой токсичности, фотоиндуцированной токсичности, кинетики клеточного накопления и выведения. Было показано, что токсичность частиц обоих диаметров не зависит от концентрации кластерного комплекса в их составе. Кинетика клеточного накопления и выведения для нано- и микрочастиц была схожей, однако в токсичности были выявлены значительные различия. Темновая токсичность проявлялась в большей степени у микрочастиц, тогда как фотоиндуцированная токсичность более значима у наночастиц. Это объясняется большей удельной площадью поверхности наночастиц по сравнению с микрочастицами. Таким образом, было продемонстрировано, что биологические эффекты – и, соответственно, возможные области применения частиц – зависят от их диаметра. Микрочастицы в дальнейшем исследовались с точки зрения их применения в качестве агентов для доставки биологически активных молекул, а наночастицы – в качестве фотосенсибилизаторов.

Как микро-, так и наночастицы показали себя эффективными в выбранных для них перспективных областях. Дополнительно модифицированные глицидильными группами микрочастицы хорошо себя проявили как доставщики белка GFP. Для наночастиц была проведена оценка механизмов токсичности и показан уровень генерации активных форм кислорода при облучении, сравнимый с используемым в клинике фотосенсибилизатором радахлорином. Оба типа частиц проникают в клетки в течение 4-8 часов и задерживаются в клеточной цитоплазме на протяжении 24 ч, что дает широкий временной диапазон для их использования. Таким образом, результаты данного исследования имеют не только фундаментальный характер, но и открывают широкие перспективы для практического использования в клинике.

ВЫВОДЫ

1. Инкубация клеток линии Нер-2 с кластерными комплексами молибдена $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(2-[2-(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетат})_6]$ и $[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{DMSO})_6](\text{NO}_3)_4$ с последующим облучением вызывает фотоиндуцированную гибель клеток. Жизнеспособность клеток значительно меняется в зависимости от времени выдержки растворов кластерных комплексов, что является следствием быстрого гидролиза комплексов и затрудняет изучение их эффектов на биологических объектах.

2. После инкубации клеток линии Нер-2 с частицами $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{0,01}@\text{SiO}_2$ диаметром 50 нм в отсутствие света выживаемость клеток не меняется, тогда как активация наночастиц светом приводит к фотоиндуцированной гибели клеток. Инкубация клеток Нер-2 с

частицами диаметром 500 нм, напротив, снижает жизнеспособность клеток в отсутствие света, и не вызывает фотоиндуцированной токсичности. Полуингибирующие концентрации растворов микрочастиц лежат в диапазоне 1,687-1,755 мг/мл; полуингибирующие концентрации наночастиц не достигнуты.

3. Накопление в клетках Нер-2 частиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ диаметром 50 нм достигает максимума через 4 ч инкубации, тогда как для захвата частиц диаметром 500 нм клеткам требуется 8 ч. Время полного выведения обоих типов частиц из цитоплазмы клеток составляет более чем 24 ч.

4. При проникновении в клетку частицы остаются в цитоплазме, не проникая в ядро. Микрочастицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ локализуются поодиночке в эндосомах и микровезикулярных тельцах, тогда как наночастицы образуют скопления в цитоплазме.

5. Клетки линии Нер-2 приобретают свойство активно поглощать GFP в составе конъюгата с микрочастицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, что обусловлено способностью микрочастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ эффективно доставлять GFP внутрь клетки.

6. Биологические эффекты допированных кластерным комплексом молибдена частиц диоксида кремния зависят от их диаметра, и не зависят от массовой доли кластерного комплекса в составе частиц.

7. Облучение видимым светом клеток линии Нер-2, содержащих поглощенные наночастицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, вызывает значительное повышение уровня генерации активных форм кислорода, сравнимое с уровнем, проявляемым используемым в медицине фотосенсибилизатором радахлорином.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GFP – «*green fluorescent protein*», зеленый флуоресцентный белок;
 ROS – реактивные формы кислорода;
 ASiO₂ – аморфный диоксид кремния;
 DMSO – диметилсульфоксид;
 PBS – фосфатный буфер;
 ПЭМ – просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vorotnikov Y.A., Pozmogova T.N., Solovieva A.O. et al. Luminescent silica mesoparticles for protein transduction // **Materials Science and Engineering C.** – 2019. – Vol. 96. – P. 530–538.
2. Kirakci K., Pozmogova T.N., Protasevich A.Y. A water-soluble octahedral molybdenum cluster complex as a potential agent for X-ray induced photodynamic therapy // **Biomaterials Science.** – 2021. – Vol. 9 (8). – P. 2893–2902.
3. Pronina E.V., Pozmogova T.N., Vorotnikov Y.A., Ivanov A.A., Shestopalov M.A. The role of hydrolysis in biological effects of molybdenum cluster with DMSO ligands // **Journal of Biological Inorganic Chemistry.** – 2022. – Vol. 27. – P. 111–119.
4. Pozmogova T.N., Vorotnikov Y.A., Solovieva A.O. et al Luminescent silica microparticles as new detectable agents for protein transduction // **BIOMATERIALS FOR CELL AND DRUG DELIVERY** 2019. – Манчестер, 2019.
5. Vorotnikov Y.A., Pozmogova T.N., Solovieva A.O. et al. Octahedral molybdenum cluster doped silica particles – New materials for biomedical applications // **VIth International Workshop of Transition Metal Clusters.** – Тюбинген, 2018.
6. Позмогова Т.Н., Евсюкова В.С., Иванов А.А. и др. Comparison of intravenous toxicity of hexaniobium cluster complex and its conjugate with gamma-cyclodextrin // **SIBIRCON 2019 - International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences.** – Новосибирск, 2019.

7. Соловьева А.О., Позмогова Т.Н., Красильникова А.А., Воротников Ю.А., Авроров П.А., Повешенко А.Ф., Шестопалов М.А. Кластерные комплексы молибдена, заключенные в кремниевые наночастицы, как перспективные агенты для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям. Материалы XII международной конференции, посвященной 25-летию Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии. - Новосибирск, 2016. – С. 235-237.

8. Соловьева А.О., Позмогова Т.Н., Красильникова А.А., Воротников Ю.А., Шестопалов М.А. Внутриклеточное распределение, фототоксичность и селективность накопления в опухолевых клетках кластерных комплексов молибдена, включенных в кремниевые наночастицы и их конъюгатов с антителами // V Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. – Санкт-Петербург, 2016.

9. Solovieva A.O., Pozmogova T.N., Vorotnikov Y.A., Trifonova K.E., Poveshchenko A.F., Shestopalov M.A. Evaluation the tumor specificity of a herceptin-conjugated {Mo6I8}@SiO2 nanoparticles in vitro» // 42nd International Conference on Coordination Chemistry. – Brest (France), 2016. – P. 430.

10. Vorotnikov Y.A., Pozmogova T.N., Solovieva A.O., Shestopalov M.A. Luminescent cluster-doped silica particles: surface modification and biological applications // Book of Abstracts – XXVII. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry. – Smolenice, Slovakia, 2019. – P. 116.