На правах рукописи

Шубенков Александр Николаевич

Эффекты модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН **Буравкова Людмила Борисовна**

Официальные оппоненты:

Ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функции митохондрий научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
доктор биологических наук **Плотников Егор Юрьевич**

Ведущий научный сотрудник лаборатории проблем клеточной пролиферации Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН)
доктор биологических наук **Воротеляк Екатерина Андреевна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН)

Защита диссертации состоится 2015 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д. 001.004.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д.3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте www.morfolhum.ru

Автореферат разослан ___________________________ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук Л.П. Михайлова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Введение

Развитие методов получения различных наноматериалов позволяет управлять их свойствами и получать наночастицы (НЧ), перспективные для медицины, фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, а также биотехнологии в целом. Сообщается как о токсичности ряда наноматериалов для живых организмов [Жорник Е.В. и др., 2014; Колбин И.А., Колесников О.Л. 2011; Braydich-Stolle et al., 2005; Choi J. et al., 2009; Ahamed M. et al., 2010; Suresh A.K. et al., 2010; Fabrega J. et al., 2011; Tsuchiya T. et al., 1996], так и о практически полной биобезопасности некоторых из них [Каливраджиян Э.С. и др., 2012; Андреева Е.Р. и др., 2013; Gupta A.K., Gupta M. 2005]. На данный момент более двухсот наномедицинских продуктов уже одобрены американским фармакологическим комитетом FDA, а некоторые из них уже проходят клинические испытания, как например НЧ Fe_2O_3 и НЧ магнетита (γ-Fe_3O_4) [Davis M.E. et al., 2010], серебряные НЧ (как антибактериальные агенты), НЧ диоксида титана и цинка, и др.[Etheridge M.L. et al., 2013]. В России в последние годы ведется разработка законов, регулирующих оборот наноматериалов на территории нашей страны. Так, в 2007 году было зарегистрировано постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

Для клинической оценки медицинских устройств и имплантируемых материалов, необходимо проверить их токсичность и отсутствие неблагоприятных реакций тканей, с которыми они будут контактировать. Существует большая потребность в разработке способов анализа цитотоксичности in vitro, которые позволили бы сократить количество исследований на животных, а также сократить время тестирования [Bhatia S.K., Yetter A.B. 2008]. В то же время, на данный момент отсутствуют стандартизированные индикаторы нанотоксичности, которые должны обязательно учитывать вклад таких свойств, как поверхностные характеристики, размер, форма, состав, химическая реактивность частиц [Терещенко В.П., Картель Н.Т. 2010].

К одним из потенциально биобезопасных и наиболее перспективных для биотехнологии наноматериалов относятся НЧ кремния (Si). Кремний традиционно рассматривается как нетоксичный полупроводниковый материал и кремниевые НЧ предлагаются для использования в ряде биотехнологических областей [Derfus A.M., Chan W.C.W, Bhatia S.N. 2004; Fujioka K. et al., 2008; Shiohara A. et al., 2010]. Кремний широко распространен в природе (его доля в земной коре составляет около 27%), биосовместим (в организме здорового человека весом 50-70 кг содержится 0.5-1.0 г кремния, что делает его третьим по содержанию микроэлементом после железа и цинка), подвержен биодеградации (кремний в виде НЧ растворяется в организме человека со скоростью от 1 нм в кислой среде и до 1000 нм в щелочной среде в день с образованием ортокремниевой кислоты). НЧ Si могут быть модифицированы различными функциональными группами, они гораздо стабильнее по сравнению с органическими полимерными матрицами и органическими флуоресцентными зондами. Возможно создание НЧ, которые будут способны защищать свое внутреннее содержимое (в случае полых НЧ) от внешних воздействий, в частности, кислорода, а также служить в качестве оптических меток при диагностике и возможной терапии онкологических заболеваний [Лившиц В.А. и др., 2008] и быть использованы для целенаправленного транспорта различных веществ, в том числе, лекарственного действия [Lu J. et al., 2010].

Перспективность исследования НЧ состоит в том, что НЧ чистого кристаллического кремния способны к флуоресценции, и таким образом, могут быть использованы в создании флуоресцентных наноразмерных биологических зондов, отличающихся высокой интенсивностью флуоресценции и фотостабильностью [Fujoka et al., 2011]. НЧ кремния, модифицированные бором (Si/B), предполагается использовать для бор-нейтрон захватной терапии [Колдаева Ю.А. 2011]. Бор в виде НЧ позволит реализовать адресную доставку и повысить эффективность воздействия на клетки-мишени. Создание НЧ, включающих палладий (Si/Pd), особенно важно, так как палладий часто используется как катализатор различных химических реакций [Ревина А.А. и др., 2006]. НЧ с серебряным покрытием (Si/Ag) обладают антибактериальными и противовирусными свойствами [Oloffs et al., 1994], а НЧ с золотым покрытием (Si/Au) перспективны для противораковой терапии [Monteith et al., 2007; Lee et al., 2008]. Также предполагается, что на золотую поверхность путём обычного электростатического взаимодействия можно адсорбировать антитела [Huang et al., 2008], что значительно расширяет применение таких НЧ в биотехнологии и медицине. В то же время, необходимо учитывать, что модификация НЧ атомами другого элемента способна не только обеспечить желаемые физико-химические свойства, но и сделать изначально безопасные наноматериалы токсичными для организма.

Исходя из всего вышеизложенного, можно сделать вывод о необходимости подбора и разработки биологических тест-систем, а также изучения клеточных эффектов НЧ, предшествующих их практическому применению [Brayner R. 2008; Nel A. et al. 2006; Service R.F. 2005; Jain A.K. et al., 2007; Donaldson K. et al., 2006; Stern S.T., McNeil E.S. 2008; Maysinger D. 2007]. В первую очередь, оценка токсического действия НЧ должна быть проведена на клеточном уровне, включая выяснение эффектов на внутриклеточные органеллы и молекулярные процессы.

Цель – изучение цитотоксических эффектов модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека.

Задачи исследования:

1) Охарактеризовать влияние кремниевых наночастиц и их модифицированных вариантов на жизнеспособность и пути клеточной гибели иммунокомпетентных и стромальных клеток.
2) Оценить участие активных форм кислорода как одного из механизмов активации клеточной гибели под действием кремниевых наночастиц и их модифицированных вариантов.
3) Исследовать функциональное состояние внутриклеточных органелл культивируемых клеток при взаимодействии с наночастицами на основе кремния.
4) Изучить пролиферативную активность фетальных фибробластов человека после экспозиции с наночастицами Si и Si/B.
5) Оценить влияние наночастиц на основе кремния на активацию лимфоцитов и продукцию ими интерлейкинов.
6) Изучить изменения актинового цитоскелета и жесткости клеточной мембраны мезенхимальных стромальных клеток при взаимодействии с наночастицами Si и Si/B.

Научная новизна

Впервые проведен сравнительный анализ цитотоксического действия наночастиц Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au, Si/Ag и SiO_2 на мезенхимальные стромальные клетки и мононуклеары человека. Показано, что все исследованные наночастицы практически не влияют на жизнеспособность клеток в использованных клеточных моделях in vitro, при этом наиболее биосовместимы немодифицированные наночастицы кремния.

Впервые установлены функциональные изменения органелл иммунокомпетентных и стромальных клеток при 24-часовой экспозиции с наночастицами кремния, модифицированными благородными металлами.

Впервые показано, что инкубация мезенхимальных стромальных клеток с наночастицами Si и Si/B приводит к увеличению жесткости их кортикального цитоскелета и снижению содержания F-актина.

Впервые показано, что модифицированные благородными металлами наночастицы кремния способны активировать иммунокомпетентные клетки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные результаты вносят дополнительный вклад в представление об эффектах взаимодействия наноматериалов с иммунокомпетентными и стромальными клетками. Апробированная экспериментальная модель позволяет оценить состояние основных параметров жизнедеятельности на клеточном и субклеточном уровне.

Биосовместимость наночастиц кремния зависит от характера модификации и типа клеток, на которые воздействуют наночастицы. Использованный подход дает возможность проводить скрининг и оценку цитотоксических свойств наноматериалов.

Проведенные исследования доказывают высокую биосовместимость наночастиц чистого кремния, возможность изменения биологических эффектов при модификации и необходимость тестирования цитотоксичности. Особое внимание следует обращать на способность наночастиц активировать иммунные клетки.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре анатомии и физиологии сельскохозяйственных животных Рязанского агротехнологического университета.

Положения, выносимые на защиту:

- наночастицы кремния не проявляют цитотоксических свойств в моделях in vitro и могут считаться биосовместимыми. Модификация кремниевых наночастиц металлами изменяет их свойства, в результате чего модулируется функциональное состояние таких клеточных органелл, как митохондрии и лизосомы, а также уровень внутриклеточных активных форм кислорода без снижения клеточной жизнеспособности.
- при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками наночастицы кремния могут вызывать их активацию. Степень активации зависит от типа наночастиц и их модификации.
- взаимодействие наночастиц кремния и кремний-бора с мезенхимальными стромальными клетками приводит к изменению жесткости клеточной мембраны и снижению содержания F-актина.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на Конференциях молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной Дню космонавтики (Москва. 2011, 2012, 2013, 2014 г.), на VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород. 2011 г.), на конференции «World conference on regenerative medicine» (Leipzig, Germany. 2013), на межлабораторной конференции ГНЦ РФ - ИМБП РАН (Москва. 2015 г.).

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах из перечня ВАК РФ.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №11-02-12210-офи-м и 14-04-00933-а.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследований», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Текст диссертации изложен на 122 страницах, содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Список литературы состоит из 237 цитируемых источников, из которых 41 - на русском и 196 - на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Клеточные культуры. Для проведения экспериментов использовали мононуклеары периферической крови человека (МНК), мезенхимальные стромальные клетки (МСК) жировой ткани человека 3-7 пассажей и эмбриональные фибробласты человека 2-11 пассажей.

Мононуклеары (МНК) получали из периферической крови здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, США).

Культивирование мононуклеаров периферической крови человека. МНК высевали в среду RPMI 1640 в концентрации $1 \cdot 10^6$ кл/мл на чашки 35 мм (Corning, США) и культивировали 24 часа в CO_2-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37°С в атмосфере 5 % CO_2 и 95 % воздуха и 100% влажности.

Культивирование МСК. МСК были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Культивирование МСК проводили в чашках Петри диаметром 60 мм в полной среде α-МЕМ. После достижения монослоя клетки пассировали с использованием раствора трипсин-ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), рассевая на чашки Петри диаметром 60 мм по 12500 клеток на чашку.

Культивирование фетальных фибробластов. В экспериментах использовали клетки 7–15 пассажей, любезно предоставленные д.б.н. Б.К.Гаврилюком. Фибробласты высевали в чашки 60 мм по 12500 клеток на чашку, и культивировали в полной среде α-MEM до состояния монослоя.

Наночастицы кремния. Все использованные в работе НЧ были изготовлены и любезно предоставлены сотрудниками лаборатории гетерофазных оптических процессов ИОФ РАН (зав. лаб., док. физ-мат. наук Владимир Иванович Пустовой). Были использованы НЧ чистого кристаллического кремния (Si, 7 нм), а также его модификации бором (Si/B, 10 нм), палладием (Si/Pd, 15 нм), золотом (Si/Au, 15 нм) и серебром (Si/Ag, 15 нм). Все НЧ имели кристаллическую решетку типа алмаза и были растворены в воде [Korovin S.B. et al., 2000].

Структура исследования (схема эксперимента). Используемые клетки инкубировали в чашках Петри в среде роста с добавлением НЧ при стандартных условиях CO_2-инкубатора (Sanyo, Япония). После 24 ч инкубации клетки отбирали и отделяли от супернатанта при помощи центрифугирования (Eppendorf, Germany). После чего инкубировали в среде с флуоресцентными зондами и анализировали на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). Схема проводимых экспериментов представлена на рис. 1.

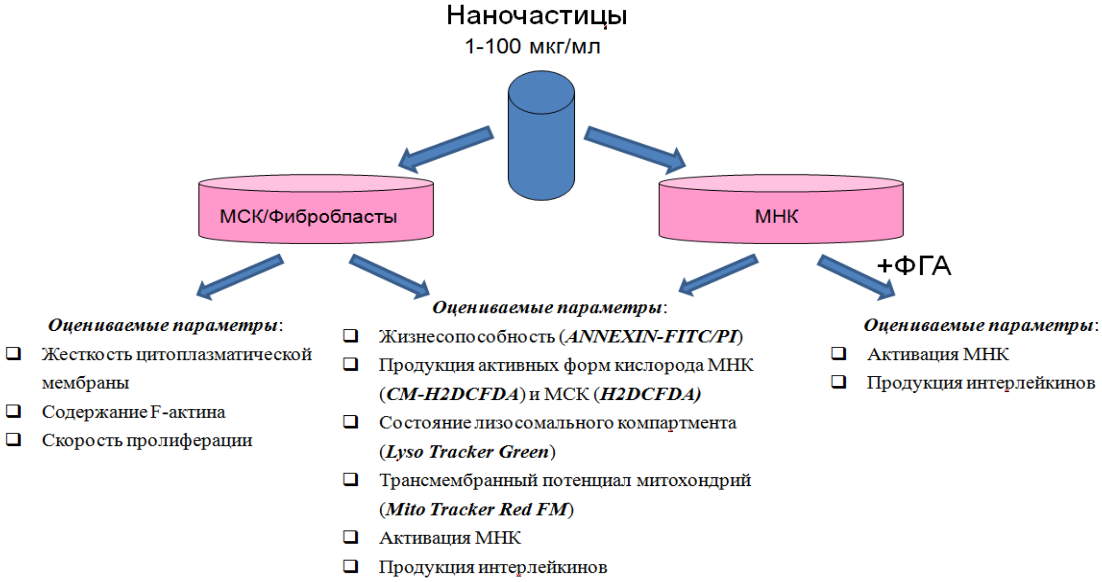


Рис. 1. Общая схема проводимых экспериментов.

Определение состояния клеточных параметров проводили с помощью флуоресцентных клеточных зондов (Invitrogene, США) на проточном цитофлуориметре Epics XL при помощи программного обеспечения System II. Все нижеперечисленные зонды использовали согласно инструкциям производителя. Предварительно культуральную среду отмывали фосфатным буфером, после чего суспендировали клеточный осадок в 1 мл среды, содержащей зонд, и инкубировали в CO_2 инкубаторе *Sanyo* (Япония) в течение 30 минут. Анализировали не менее 10 000 событий в каждой пробе.

Оценка жизнеспособности клеток. В большинстве экспериментов клеточную жизнеспособность оценивали при помощи набора ANNEXIN V – FITC Kit (Immunotech, Франция) по стандартной методике. Цитотоксическое действие НЧ SiO_2 оценивали с помощью МТТ-теста.

Характеристика трансмембранного потенциала митохондрий. Трансмембранный потенциал митохондрий был охарактеризован при помощи флуоресцентного зонда Mito

Tracker red FM (Invitrogen, США). Концентрация зонда в среде составляла 0.5 мкМ/л. Клетки инкубировали в среде с зондом в течение 30 мин.

Оценка состояния лизосомального компартмента. Состояние лизосомального компартмента оценивали при помощи pH чувствительного флуоресцентного зонда Lyso Tracker Green DND 26 (Invitrogen, США). Концентрация зонда в среде составляла 0.05 мкМ/л. Клетки инкубировали в среде с зондом в течение 30 мин.

Анализ продукции активных форм кислорода. Активные формы кислорода (АФК) в клетках выявляли, используя зонд CM-H_2DCFDA (Invitrogen, США). Концентрация зонда в среде составляла 1 мкмоль/л. Клетки инкубировали в среде с зондом в течение 30 мин.

Анализ активации лимфоцитов. Активацию лимфоцитов оценивали после стимуляции ФГА (фитогемагглютинин) (10 мкг/мл) при помощи пар моноклональных антител CD3/CD25 и CD3/HLA-DR (флуоресцентная метка FITC/PE) (Immunotec, Франция) на проточном цитофлуориметре Epic XL. Конечная концентрация антител 0.2 мг/л. Для подготовки проб клетки отмывали от среды и инкубировали в PBS (фосфатный буфер) с добавлением 10 мкл раствора антител в темноте при комнатной температуре в течении 15 мин. Анализировали не менее 5 000 событий.

Анализ продукции цитокинов. Для анализа синтеза цитокинов использовалась клеточная среда, отобранная после 72 ч сокультивирования МНК с НЧ. Использовали набор FlowCytomix human Th1/Th2 11 Plex (Bender MedSystems, Австралия). Данный набор позволяет детектировать содержание 11 цитокинов (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN-γ, TNF-α, TNF-β) одновременно при анализе одного образца. Анализ проводили на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) совместно с к.б.н.Т.А.Берендеевой в лаборатории метаболизма и иммунитета ГНЦ РФ-ИМБП РАН. Данные анализировали при помощи программы FlowCytomixPro.

Оценка пролиферативной активности фибробластов. Пролиферативную активность фибробластов изучали после их культивирования в среде, содержащей НЧ Si и Si/B в концентрациях 100 мкг/мл и 10 мкг/мл. Через 24 часа после пассирования клеток, культуральную среду заменяли на среду с НЧ. После 72 часов среду полностью заменяли на не содержащую НЧ, и далее заменяли 50% среды на свежую (свободную от НЧ) каждые 72 часа. Контроль прироста клеток осуществляли, фотографируя в каждой чашке 5 фиксированных рандомически выбранных полей зрения при 10× увеличении на микроскопе Leica DMIL (Leica, Германия).

Оценка жесткости клеточной мембраны мезенхимальных стромальных клеток. Жесткость клеточной мембраны МСК оценивали на атомно-силовом микроскопе Solver P47-Pro (NT-MDT, Россия), исследования проводили совместно с д.ф-м.н. И.В.Огневой (ГНЦ РФ - ИМБП РАН).

Исследование структуры актинового цитоскелета мезенхимальных стромальных клеток. Влияние НЧ на структуры фибриллярного F-актина МСК оценивали после окраски TRITC-фаллоидином на конфокальном микроскопе LSM 780. Исследование выполнено совместно с д.м.н. С.В. Буравковым на базе факультета фундаментальной медицины МГУ им.М.В.Ломоносова.

Оценка поглощения/адсорбции наночастиц клетками. Оценка проникновения/сорбции НЧ на клеточную мембрану проводили при помощи метода проточной цитометрии с помощью анализа прямого и бокового светорассеяния на цитофлуориметре Epic XL.

Статистическая обработка данных. Все данные были получены в трех и более независимых экспериментах. Достоверность различий между экспериментами определялась при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни, различие считалось значимым при $p<0.05$. В тексте работы приведены средние значения и ошибка среднего. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Microsoft Exel.

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние наночастиц на иммунокомпетентные клетки человека

На первом этапе исследования была проанализирована жизнеспособность МНК из периферической крови человека и пути клеточной гибели после 24–часовой инкубации с НЧ кремния в диапазоне концентраций 1 - 100 мкг/мл. Подсчитывали процент МНК в состоянии апоптоза (An^+/PI^-), некроза (An^-/PI^+) и позднего апоптоза (An^+/PI^+). Установлено, что все исследованные НЧ не оказывали влияния на жизнеспособность МНК. Стоит отметить, что при использовании НЧ Si/Au и Si/Ag в концентрации 10 мкг/мл выявлено статистически незначимое снижение процента живых клеток (табл. 1).

Таблица 1. Пути гибели мононуклеаров при инкубации с наночастицами in vitro

Тип НЧ	Концентрация НЧ в среде	Живые, %	Апоптоз, % (An^+/PI^-)	Некроз, % (An^-/PI^+)	Поздний апоптоз, % (An^+/PI^+)
Si	Без НЧ	88,1±1,2	3.3±0.3	1.1±0.3	7.4±1.1
	1 мкг/мл	86±0,5	3.6±0.7	1.6±0.3	8.8±1.1
	10 мкг/мл	86,2±1,5	3.7±0.4	2.5±1.0	7.7±1.1
	100 мкг/мл	85±1,7	3.9±0.7	1.9±0.8	9.3±1.2
Si/B	Без НЧ	87,7±0,6	5.5±1.6	1.3±0.4	5.5±0.9
	1 мкг/мл	87±1,2	6.2±1.8	1.0±0	5.8±0.6
	10 мкг/мл	87,5±0,5	5.7±1.4	0.7±0.3	6.0±1.1
	100 мкг/мл	81,3±3	7.2±2.8	2.5±0.8	9.0±0.6*
Si/Pd	Без НЧ	82,7±2,8	10.1±2.6	1.5±0.5	5.7±0.5
	10 мкг/мл	83,3±2,7	8.1±0.6	2.7±1.2	5.8±1.1
	100 мкг/мл	87,4±3,2	6.3±1.3	1.1±0.5	5.1±1.4
Si/Au	Без НЧ	79,6±5,0	6.7±2.4	6.5±2.9	7.4±2.3
	10 мкг/мл	70,4±5,0	8.8±5.8	11.5±3.7	9.3±2.3
	100 мкг/мл	78,3±3,9	8.1±1.5	6.2±2.4	7.2±1.9
Si/Ag	Без НЧ	84,7±1,8	7.1±0.7	3.2±0.7	4.9±0.6
	10 мкг/мл	75,5±6,3	8.2±1.9	6.0±1.4	10.3±3.3
	100 мкг/мл	87,1±3,7	5.8±1.2	1.9±1.0	5.3±1.7
SiO_2	Без НЧ	86,3±3,0	6.4±0.6	11.6±0.7	Н.о.
	1мкг/мл	82,2±1,7	6.8±0.3	10.1±0.3	Н.о.
	10 мкг/мл	81,4±2,5	7.1±0.2	10.7±0.2	Н.о.
	100 мкг/мл	77,9±7,4	9.5±0.6*	12.5±0.3	Н.о.

Данные представлены как M ± m, *$p<0.05$ относительно контроля. n=5. Н.о. – не определяли.

Также не выявлено достоверных изменений в доле МНК в состоянии апоптоза, некроза и позднего апоптоза при взаимодействии с НЧ Si и Si/B во всех исследованных концентрациях. Аналогичное отсутствие эффекта было установлено для низких концентраций НЧ Si, модифицированных металлами. При повышении концентрации НЧ Si/Pd и Si/Ag снижалась доля клеток в состоянии раннего апоптоза. При инкубации клеток с НЧ Si, Si/B и Si/Pd преобладал ранний и поздний апоптоз, некроз после экспозиции с данными образцами был незначительным. Для НЧ Si/Au и Si/Ag преобладания того или иного пути клеточной гибели не наблюдалось. НЧ SiO_2 не оказывали влияния на долю клеток в апоптозе. Во всех экспериментальных сериях процент клеток в состоянии некроза был минимальным.

Важное место в процессах взаимодействия НЧ с живыми клетками играет способность клеток к поглощению НЧ. Для оценки проникновения/сорбции НЧ на клеточную мембрану использовался метод проточной цитометрии. Но важно учитывать, что поглощение и адсорбция НЧ на мембране могут идти параллельно [Florez L. et al., 2012]. При проведении оценки светорассеяния МНК после инкубации с исследованными НЧ мы обнаружили увеличение этого параметра в экспериментах с НЧ Si и Si/B, что может свидетельствовать о проникновении НЧ в клетку, либо об их адсорбции на цитоплазматической мембране.

Влияние наночастиц на внутриклеточные компартменты мононуклеаров и продукцию активных форм кислорода

Для оценки функционального состояния МНК после инкубации с НЧ были использованы флуоресцентные зонды: CM-H_2DCFDA, Mito Tracker Red FM, Lyso Tracker Green. Наиболее заметный эффект был отмечен при анализе уровня АФК, который выражался в изменении средней интенсивности флуоресценции (СИФ) зонда CM-H_2DCFDA (рис. 2). Максимальный эффект наблюдался для НЧ Si/B, минимальный – для SiO_2. Концентрационной зависимости не было установлено.

Показано, что генерация АФК является одной из основных причин клеточной гибели [Green M., Hawman E. 2005; Ipe B.I., Lehnig M., Niemeyer C.M., 2005; Lovrić J. et al., 2005]. Известно, что многие НЧ, проникая в клетку, индуцируют генерацию АФК [Ipe B.I., Lehnig M., Niemeyer C.M. 2005; Lin W. et al., 2006; Halamoda K.B. et al., 2012; Moore M.N. et al., 2009; Bhattacharjee S. et al., 2010]. Однако, исследованные нами НЧ Si и его модификации в указанных концентрациях хотя и вызывали повышение количества АФК, тем не менее, не оказывали цитотоксического действия на МНК (таблица 1). Стоит отметить, что повышенный уровень АФК был обнаружен при скрининге всех типов НЧ Si (рис. 2 А), кроме SiO_2. В случае модифицированных золотом и серебром НЧ при концентрации 10 мкг/мл уровень АФК был выше, чем при 100 мкг/мл, что может объяснять некоторое снижение доли живых лимфоцитов, описанное выше. Однако, при этом стоит учесть, что данный уровень АФК был ниже, чем в экспериментах с НЧ Si/B, которые не оказывали влияния на жизнеспособность клеток.

Ряд авторов полагает, что генерация АФК и окислительный стресс могут быть использованы как одни из основных параметров при оценке цитотоксичности различных НЧ [Xia et al., 2006]. Несмотря на то, что не все НЧ обладают теми поверхностными свойствами, которые позволяют генерировать АФК в клетке напрямую, взаимодействие НЧ с клеточными органеллами может приводить к образованию АФК [Xia T. et al., 2006]. Это может быть причиной токсического эффекта, если уровень продукции АФК превосходит антиоксидантную защиту или запускается механизм апоптоза, в который вовлечены митохондрии.

При экспонировании клеток с НЧ, которые способны индуцировать генерацию АФК, одними из первых реагируют митохондрии [Maysinger D., 2006]. В проведенных нами исследованиях СИФ (средняя интенсивность флуоресценции) зонда Mito Tracker red FM, характеризующая трансмембранный потенциал митохондрий, не изменялась в экспериментах с Si, повышалась при использовании Si/B и понижалась в экспериментах с НЧ, модифицированными благородными металлами: Si/Pd, Si/Au и Si/Ag. НЧ SiO_2 не оказывали влияния на трансмембранный потенциал митохондрий в МНК (рис. 2 Б).

Наибольшее число путей поглощения наноматериалов клеткой связано с лизосомами, тем самым, представляя лизосомальный компартмент наиболее вероятным внутриклеточным сайтом депонирования и деградации наноматериалов [Stern S. T., Adiseshaiah P. P., Crist R. M., 2012]. Инкубация МНК с НЧ Si, Si/B и Si/Au приводила к снижению активности лизосом, о чем свидетельствовало уменьшение СИФ Lyso Tracker Green DND 26. НЧ Si/Pd и Si/Ag не влияли на лизосомальный компартмент МНК. НЧ SiO_2 в концентрации 100 мкг/мл увеличивали активность лизосом (рис. 2 В).

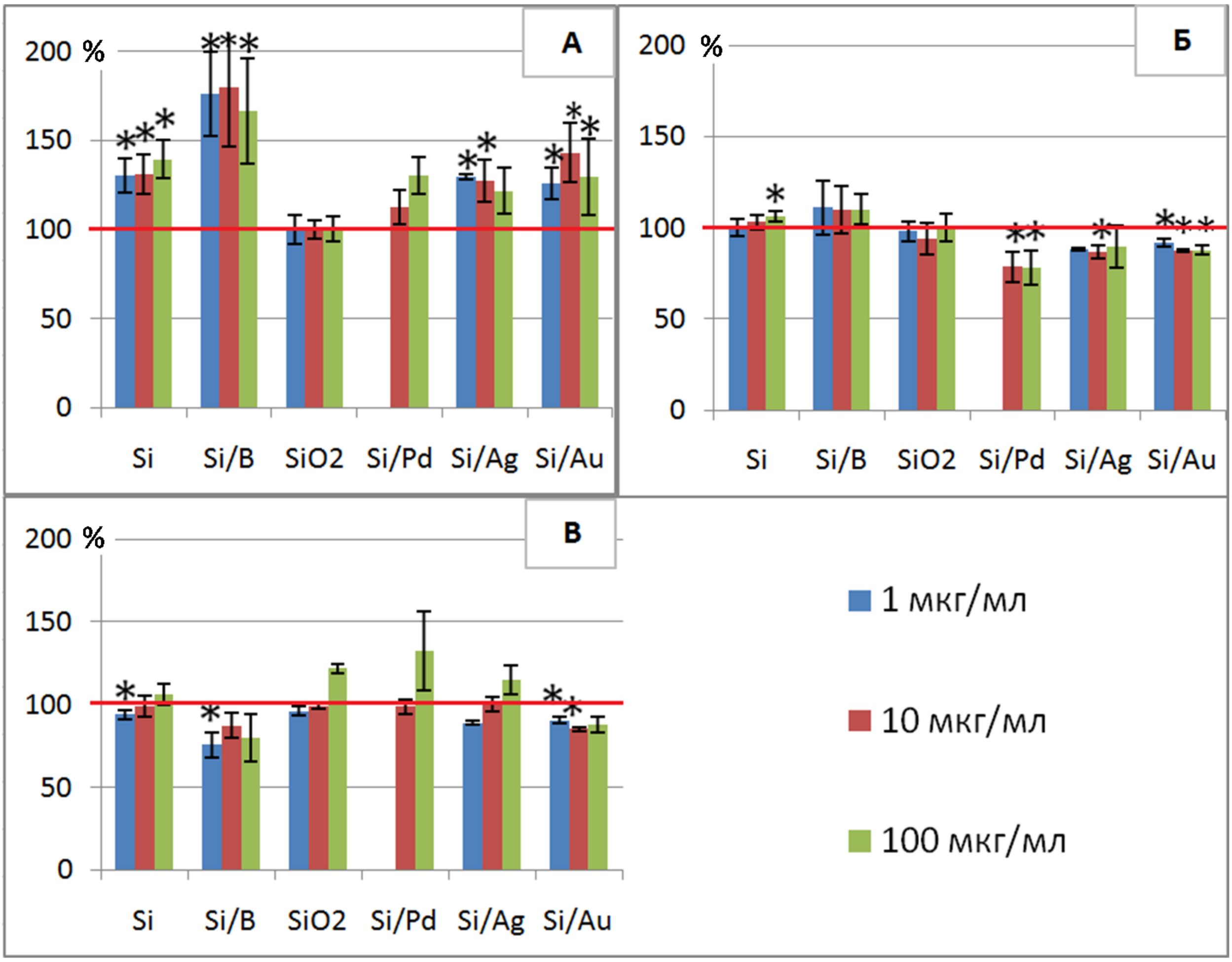


Рис. 2. СИФ зондов (**А** – CM-H_2DCFDA, **Б** – Mito Tracker, **В** - Lyso Tracker) при инкубации мононуклеаров с наночастицами in vitro. СИФ зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%. Данные представлены как M±m, n=5. * - достоверность отличий от контроля без НЧ, $p<0.05$.

Недавние исследования подтверждают, что некоторые наноматериалы способны индуцировать процесс аутофагии и повреждать лизосомальную мембрану [Stern S.T., et. al., 2012], а активация лизосом способна увеличивать окислительный стресс [Halamoda K.B. et al., 2012]. В нашей работе подобный эффект наблюдался в экспериментах с НЧ Si/Pd в максимальной концентрации, когда было показано одновременное повышение уровня АФК и СИФ специфичного лизосомального зонда. Нами не выявлено связи между состоянием лизосомального компартмента (рисунок 2 В) и жизнеспособностью МНК (таблица 1). И, хотя потеря лизосомальной целостности может быть ассоциирована с потерей мембранного потенциала митохондрий [Xia T. et al., 2008; Sohaebuddin et al., 2010], и способна приводить к апоптозу [Thibodeau et al., 2004], выявленное нами совместное снижение активности лизосом и митохондрий после инкубации лимфоцитов с НЧ SiAu не приводило к индукции клеточной гибели при концентрации НЧ 100 мкг/мл, но данный эффект проявлялся при концентрации 10 мкг/мл. Поскольку для всех исследованных НЧ Si не обнаружено зависимости между повышением уровня АФК и изменениями митохондрий и лизосом, можно предположить, что НЧ влияют на митохондриальный и лизосомальный компартменты посредством механизмов, в которые вовлечены не только АФК. Например, показано, что НЧ способны изменять конформацию белков, тем самым влияя на их биологические функции [Karajanagi S.S. 2004]. Одно лишь это свойство НЧ предполагает широкий спектр их возможного влияния на клетку.

Таким образом, показано, что НЧ на основе кремния нетоксичны для МНК, о чем свидетельствует отсутствие значительных изменений в жизнеспособности и соотношении апоптотических и некротических клеток после 24 часовой инкубации. Однако, будучи интеркалированными атомами бора, палладия, золота и серебра, данные наноматериалы способны вызывать изменения митохондрий и лизосомального компартмента. Следовательно, модификация кремниевых НЧ атомами других химических элементов способна изменять степень их цитотоксичности в отношении различных клеточных параметров, что может быть выявлено в системе in vitro.

Активация лимфоцитов и продукция интерлейкинов

В данной работе мы выявляли такие маркеры лимфоцитов как CD25 – рецептор IL-2 (маркер ранней активации) и HLA-DR - антиген главного комплекса гистосовместимости II класса (маркер поздней активации). В результате проведения экспериментов на неактивированных МНК, выявлено повышение доли CD25+ клеток после 72 ч экспозиции со всеми НЧ. Увеличение доли МНК, несущих маркер активации HLA-DR, показано только для НЧ Si/Ag и Si/Au, в то время как для НЧ Si и Si/B доля таких клеток несколько снижалась (рис. 3). Важно отметить, что увеличение экспрессии HLA-DR в экспериментах с НЧ Si/Ag и Si/Au на нестимулированных МНК наблюдалось одновременно с ростом продукции провоспалительных цитокинов IL-1β, TNF-α (рис. 5 А). Значительно возрастал в среде IL-6, концентрация которого достоверно повышалась в 198,4 и 289,8 раза, соответственно (на рисунке не показано), а также IL-10, концентрация которого повышалась в 20 и 29 раз, соответственно (рис. 5 А).

В экспериментах на ФГА-активированных МНК модифицированные серебром и золотом НЧ не изменяли степень активации (рис. 4). Экспрессия HLA-DR на активированных МНК несколько снижалась при взаимодействии с НЧ Si и Si/B. Одновременная инкубация МНК с ФГА и НЧ не выявила достоверных отличий в спектре и количестве интерлейкинов в кондиционированной среде по сравнению с активированными МНК (рис. 5 Б).

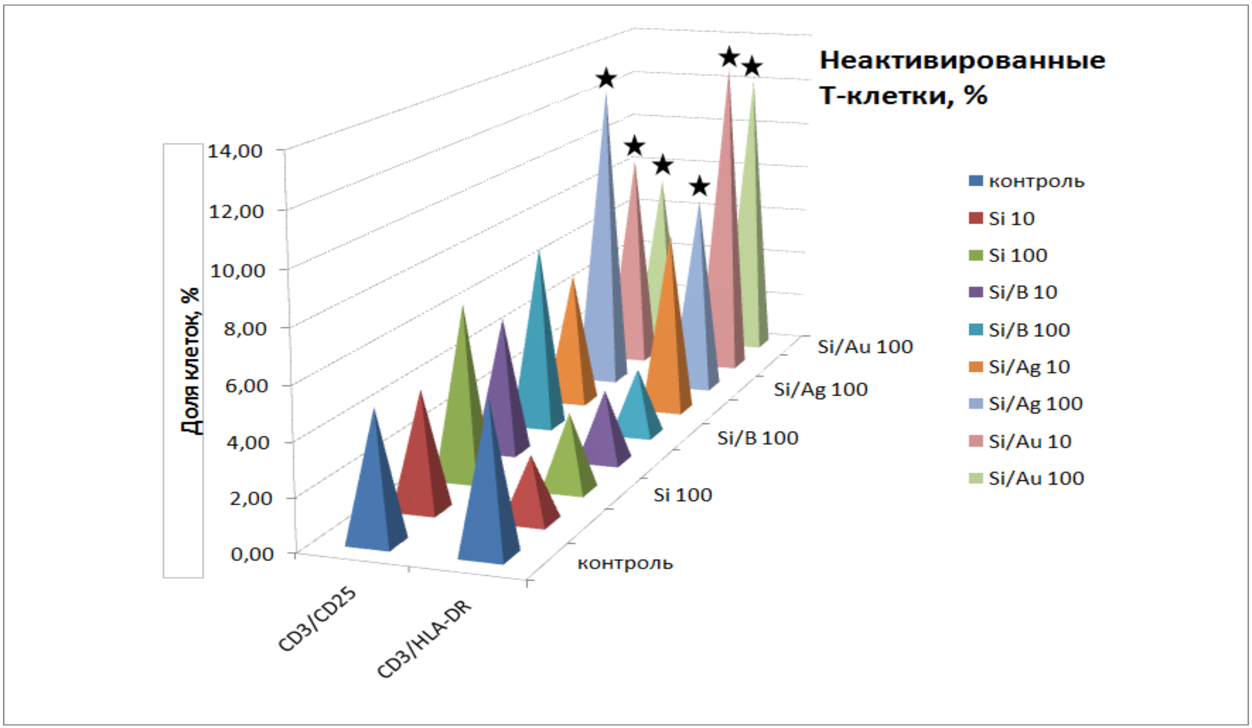


Рис. 3. Экспрессия маркеров ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации Т-клетками после экспозиции с наночастицами in vitro. Данные представлены как доля клеток, несущих соответствующий антиген (M±m, n=3).

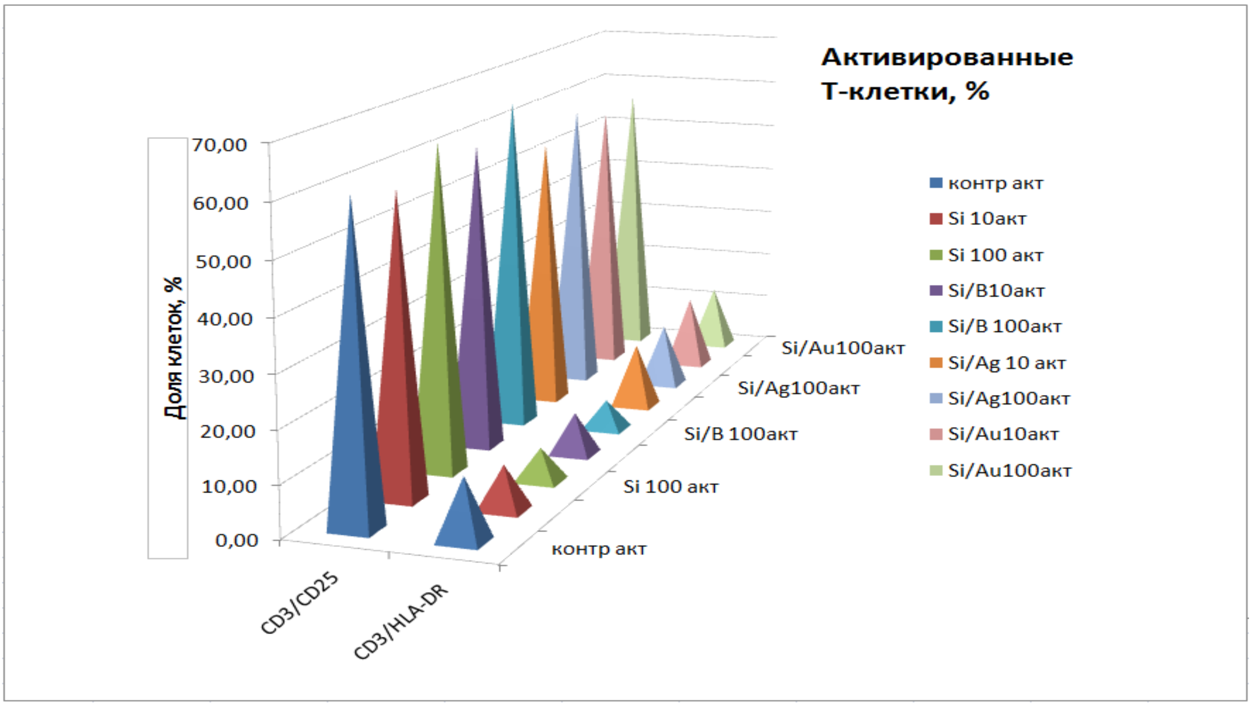


Рис. 4. Влияние наночастиц на экспрессию маркеров ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации на ФГА-стимулированных Т-клеток. Данные представлены как доля клеток, несущих соответствующий антиген (M±m, n=3).

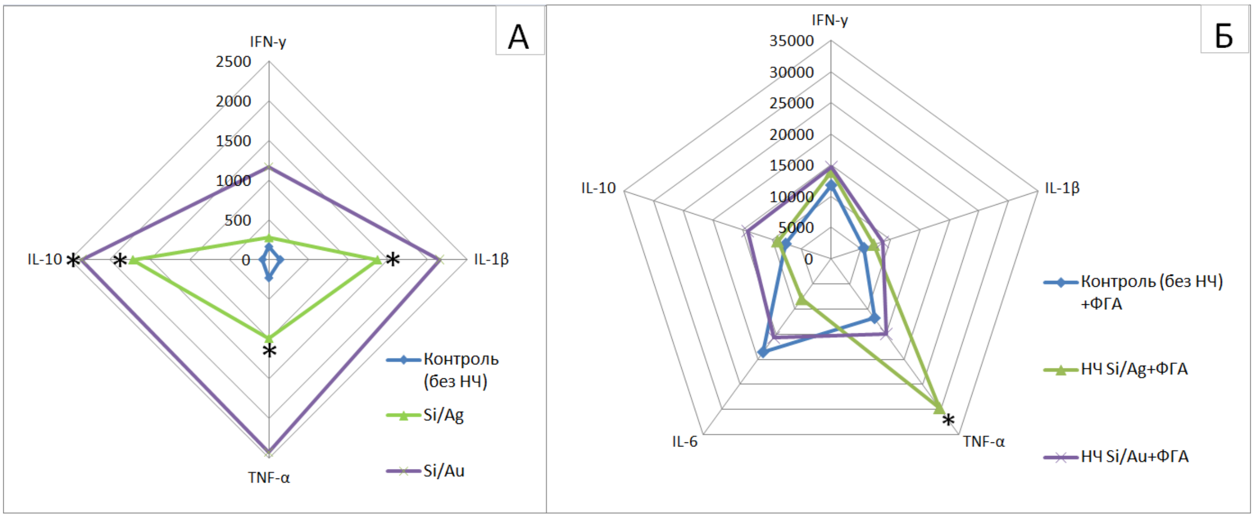


Рис. 5. Продукция интерлейкинов (по всем осям - пкг/мл) при инкубации Т-клеток с наночастицами кремния, модифицированными благородными металлами (100 мкг/мл). А – неактивированные Т-клетки, Б – ФГА-стимулированные Т-клетки. Данные представлены как M±m, n=3. *- достоверность отличий от контроля без наночастиц, $p<0.05$.

В настоящее время существует гипотеза о взаимодействии НЧ с поверхностью клетки, предполагающая, что начальным этапом воздействия НЧ на клетку является окислительный стресс, который приводит к включению сигнального каскада с участием генов-регуляторов воспалительных реакций. В результате стресса происходит выброс медиаторов воспаления, таких как цитокины [Жорник Е.В. и др., 2009]. Это подтверждается экспериментами, в которых показано, что обработка лимфоцитов многостенными углеродными нанотрубками в дозе 100 мкг/мл вызывала увеличение уровня экспрессии генов TNF-α, IL-1β, IL-8 в лимфоцитах человека [Жорник Е.В. и др., 2009].

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что НЧ кремния при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками могут вызывать их активацию, выраженность которой меньше по сравнению с классическими митогенными активаторами. При совместном действии НЧ кремния и ФГА аддитивных реакций не наблюдается, степень активации зависит от модификации НЧ.

3.2 Влияние наночастиц на мезенхимальные стромальные клетки человека

Для оценки влияния НЧ на МСК человека использовали клетки четырех линий 3-8 пассажей. Клетки высевали в чашки диаметром 60 мм в количестве 3 000 кл/см^2. В течение 5-7 суток клетки достигали состояния монослоя, после этого в чашках заменяли среду на не содержащую НЧ. Через 24 ч после культивирования со всеми исследованными НЧ кремния клеточная морфология не изменялась.

Для оценки жизнеспособности МСК человека использовали тесты Annexin/PI и МТТ-тест. Проведение экспериментов по оценке влияния НЧ на жизнеспособность МСК было начато с исследования НЧ SiO_2, так как они состоят из природного вещества - оксида кремния. В результате при помощи МТТ теста было показано, что НЧ SiO_2 несколько снижали долю жизнеспособных клеток лишь при концентрации 100 мкг/мл. Процент живых клеток при этом был достаточно высоким (78%) по сравнению с контролем. По этой причине в последующих экспериментах на МСК с другими частицами использовалась лишь эта концентрация.

Снижение жизнеспособности при воздействии НЧ не превышало 15% и было максимальным для НЧ Si/Au. Все исследованные модификации НЧ кремния металлами достоверно снижали жизнеспособность МСК, что отличало их от эффектов НЧ чистого кремния и кремния, модифицированного бором, при применении которых процент живых клеток практически не отличался от контроля. При анализе путей клеточной гибели в экспериментах с НЧ Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au и Si/Ag показано, что гибель МСК происходила в основном за счет индукции апоптоза, менее всего наблюдалось клеток в состоянии некротической гибели. В то время как для НЧ SiO_2 преобладал некроз (таблица 2).

Таблица 2. Пути гибели МСК после инкубации с наночастицами 24 ч in vitro.

Тип НЧ	НЧ, мкг/мл	Живые, %	Апоптоз (An^+/PI^-) %	Некроз (An^-/PI^+) %	Поздний апоптоз (An^+/PI^+) %
Si	Без НЧ	88.4±1.1	7.9±1.1	0.9±0.0	2.8±0.3
	100	87.4±1.5	8.7±1.3	1.0±1.2	2.9±0.4
Si/B	Без НЧ	88.4±1.1	7.9±1.1	0.9±0.0	2.8±0.3
	100	87.4±1.6	8.1±1.1	1.2±0.3	3.2±0.4
Si/Ag	Без НЧ	81.7±3.6	13.6±3.0	1.3±0.2	3.4±0.6
	100	73.2±5.0	21.4±4.7	2.0±0.6	3.4±0.3
Si/Au	Без НЧ	83.7±5.1	11.9±4.2	1.3±0.3	3.1±0.6
	100	71.6±3.3*	22.3±3.5	1.5±0.1	4.6±0.3*
Si/Pd	Без НЧ	76.2±1.8	18.4±1.5	1.9±0.2	3.4±0.4
	100	70.9±1.0*	22.0±1.6	2.4±0.5	4.8±0.5*
SiO_2	Без НЧ	95,9±2,3	1,1±0,1	4,6±0,1	Н. о.
	100	94,5±3,4	1,5±0,1	6,4±0,3*	Н. о.

Данные представлены как M ± m, * - достоверность отличий от контроля без наночастиц, $p<0.05$, n=5. Н.о. – не определяли.

Обращает на себя внимание тот факт, что модификация НЧ Si золотом и паладием приводит к увеличению числа клеток в состоянии позднего апоптоза (An^+/PI^+).

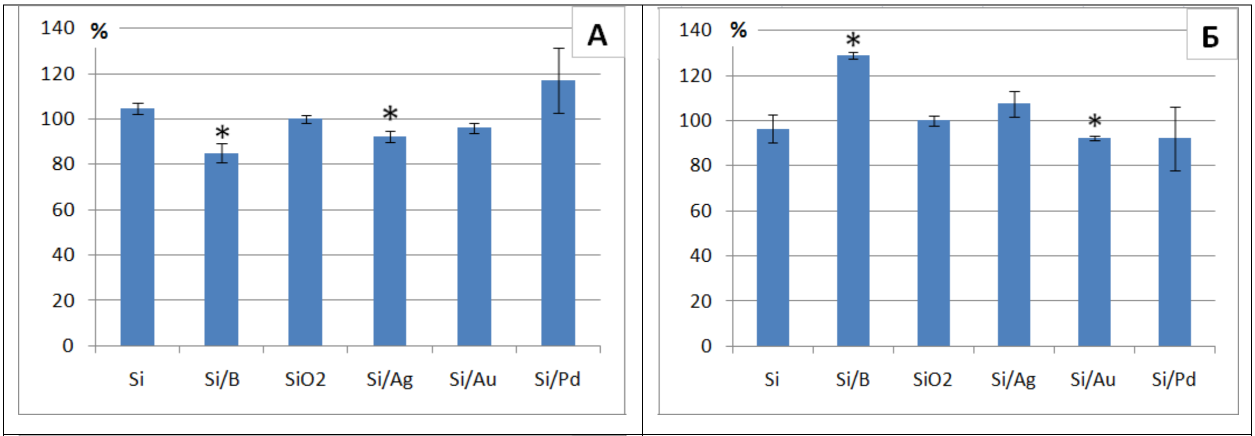
Исходя из представленных выше данных, можно сделать вывод о биобезопасности исследованных НЧ при их кратковременном (24 ч) воздействии на МСК. Однако стоит отметить, что даже в этом случае модификация НЧ кристаллического кремния благородными металлами приводит к достоверному повышению их цитотоксичности. При анализе показателей светорассеяния МСК и фибробластов отмечались изменения в экспериментах с НЧ Si и Si/B, свидетельствующие о поглощении данных НЧ клеткой, либо об их адсорбции на мембране.

Внутриклеточные компартменты

Исходя из данных литературы [Nel. A. et al., 2006], при оценке негативного воздействия НЧ на клетки особое внимание следует уделять изменению внутриклеточного уровня АФК. В наших экспериментах при инкубации МСК с НЧ Si/B и Si/Ag отмечено снижение уровня АФК (рис. 6 А). Для НЧ Si, Si/Au, Si/Pd и SiO_2 изменений в продукции АФК выявить не удалось.

Активность лизосомального компартмента увеличивалась при инкубации клеток с Si/B, SiO_2 и снижалась в экспериментах с SiAu. Другие НЧ практически не влияли на данный параметр. Для НЧ Si/Pd также показано небольшое снижение активности лизосом и незначительное снижение жизнеспособности. Однако, НЧ Si/Ag, вызывая больший по сравнению с НЧ Si и Si/B цитотоксический эффект, при этом напротив, несколько повышали лизосомальную активность (рис. 6 Б). Таким образом, маловероятно, что понижение активности лизосомального компартмента связано с эффектом снижения жизнеспособности.

Трансмембранный потенциал митохондрий МСК возрастал при инкубации с НЧ Si и Si/Pd и снижался при инкубации с НЧ Si/B (рис. 6 В). Культивирование в течение 24 часов с НЧ SiO_2 даже при концентрации 100 мкг/мл существенно не влияло на функциональное состояние митохондрий.



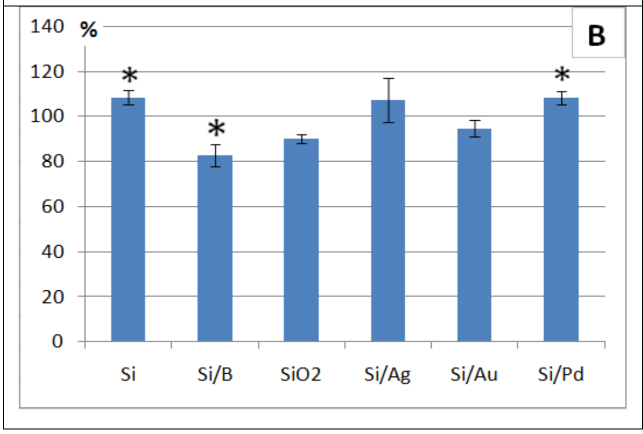


Рис. 6. СИФ зондов при инкубации МСК с наночастицами in vitro. **А** - H_2DCFDA, **Б** – Lyso Tracker, **В** – Mito Tracker. Данные представлены как M±m, n=3. СИФ зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%, * - достоверность отличий от контроля без наночастиц, $p<0.05$.

Полученные результаты показывают отсутствие выраженных цитотоксических эффектов изученных НЧ на МСК человека.

Исходя из вышеизложенного можно заключить, что изученные НЧ при концентрации до 100 мкг/мл и времени воздействия до 24 ч не обладали токсическими свойствами, приводящими к гибели МСК, однако были способны незначительно изменять уровень АФК и состояние внутриклеточных органелл.

Влияние наночастиц Si и Si/B на пролиферацию эмбриональных фибробластов человека

Влияние НЧ Si и Si/B на пролиферацию эмбриональных фибробластов человека оценивали по числу удвоений популяции и времени удвоения популяции. Морфология контрольных клеток и культивируемых с НЧ в течение 6 суток не отличались, что говорит в пользу биосовместимости данных НЧ.

В результате проведенных экспериментов выявлены изменения в пролиферативной активности клеток. Отмечено, что при добавлении в среду НЧ Si фибробласты пролиферировали быстрее, чем в контроле без добавления НЧ (рис. 7, 8).

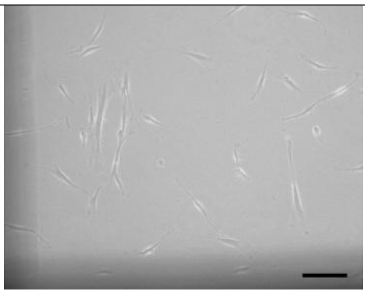
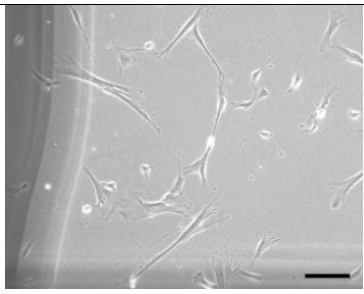
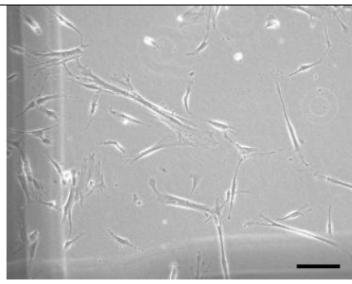
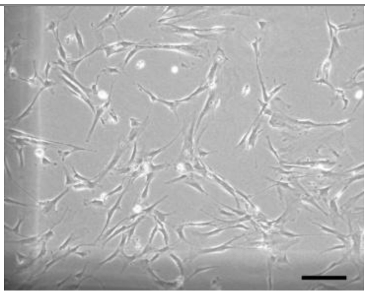
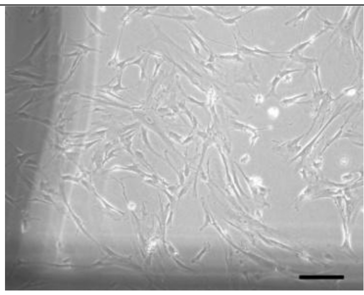
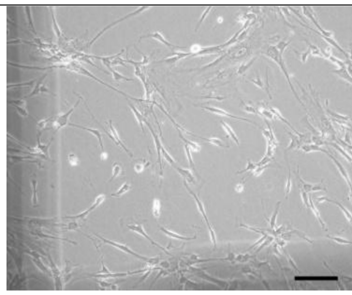
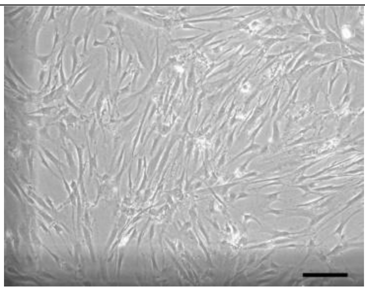
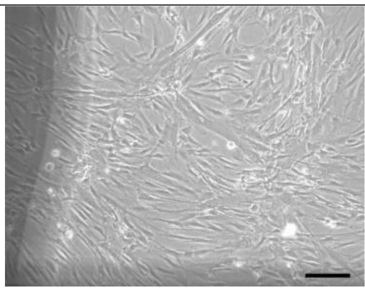
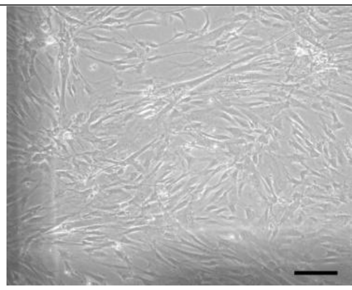
День	Контроль	Si	Si/B
24 ч			
96 ч			
144 ч			

Рис. 7. Фибробласты человека при культивировании в течение 144 ч с наночатицами Si и Si/B. Представлены микрофотографии фиксированного поля зрения на разных сроках эксперимента. Фазовый контраст. Увеличение х10. Масштабный отрезок 100 мкм.

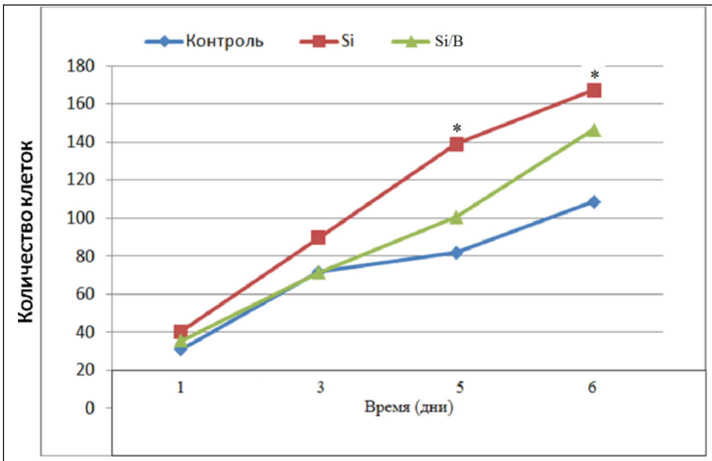


Рис. 8. Влияние наночастиц Si и Si/B (100 мкг/мл) на пролиферацию фибробластов. Каждая точка – среднее число клеток в пяти полях зрения. Представлены данные репрезентативного эксперимента. * - достоверность отличий от контроля без наночастиц, $p<0.05$.

Стоит отметить, что после 48 часов культивирования клетки с добавлением НЧ Si/B пролиферировали так же, как и клетки в контроле, в то время как при добавлении НЧ Si число клеток увеличивалось быстрее в среднем в 1.4 раза по сравнению с контролем. Возможно, НЧ Si адсорбируют на свою поверхность различные компоненты среды и сыворотки, образуя так называемую «корону» из биомолекул [Sohaebuddin S. K. et al., 2010], в то время как модифицированные НЧ Si/B могут не обладать требуемыми поверхностными свойствами для образования аналогичной «короны». Факт увеличения скорости пролиферации также говорит в пользу биобезопасности НЧ Si.

Ускорение роста фибробластов может происходить по причине умеренного повышения уровня внутриклеточных АФК [Caporossi D. Et al., 2003; Roth S., Droge W. 1987; Murrell A.C. et al., 1990]. При оценке влияния НЧ Si и Si/B на фибробласты нами также было отмечено статистически незначимое повышение АФК, причем для НЧ Si оно было несколько выше.

Жесткость цитоплазматической мембраны и цитосклет мезенхимальных стромальных клеток

Для определения механических характеристик МСК при инкубации их с НЧ Si и Si/B клетки подвергались воздействию НЧ в течение 1 ч и 24 ч. Результаты измерения жесткости клеток свидетельствовали о том, что после 24-часовой инкубации с частицами Si (группа «Si 24 ч») и Si/B (группа «Si/B 24 ч») жесткость клеток увеличивалась на 63% и 136%, соответственно, по сравнению с контрольной группой (группа «Контроль 24 ч») ($p<0.05$) (рис. 9).

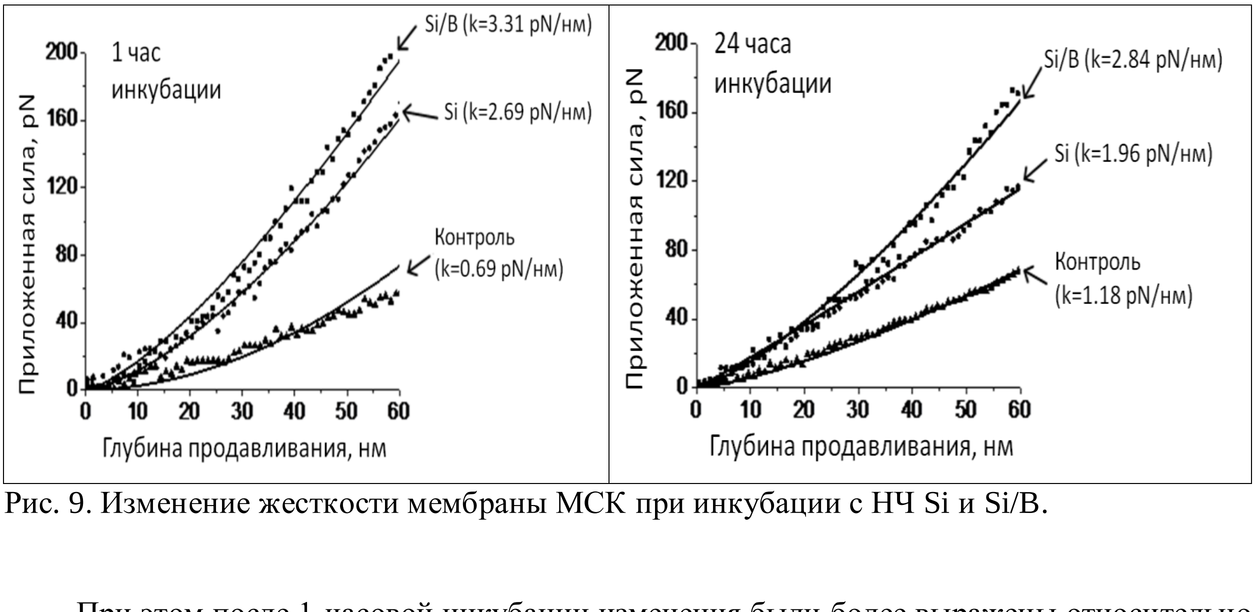


Рис. 9. Изменение жесткости мембраны МСК при инкубации с НЧ Si и Si/B.

При этом после 1-часовой инкубации изменения были более выражены относительно соответствующего контроля (группа «Контроль 1 ч»): жесткость клеток в группе «Si 1 ч» увеличилась на 181%, а группе «Si/B 1 ч» – на 247% ($p<0.05$). Кроме того, и после 24-

часовой, и после 1-часовой инкубации жесткость клеток, инкубированных с частицами Si/B, была достоверно выше ($p<0.05$), чем клеток, инкубированных с частицами Si.

Интенсивность флуоресценции TRITC-фаллоидина, которая прямо коррелирует с содержанием F-актина, снижалась в ряду «Контроль 24 ч» – «Si 24 ч» – «Si/B 24 ч». Величина данного параметра в группах «Si 24 ч» и «Si/B 24 ч» снижалась по сравнению с группой «Контроль 24 ч» на 31% и 42%, соответственно ($p<0.05$). Также имели место некоторые структурные перестройки актинового цитоскелета при инкубации с НЧ: в клетках группы «Контроль 24 ч» актиновые филаменты расположены, в основном, продольно (рис. 10 A-D); в клетках группы «Si 24 ч» появляются филаменты, расположенные поперечно (рис. 10 E-H); в клетках группы «Si/B 24 ч» расположенных поперечно актиновых филаментов становится больше, нежели в клетках группы «Si 24 ч» (рис. 10 I-L).

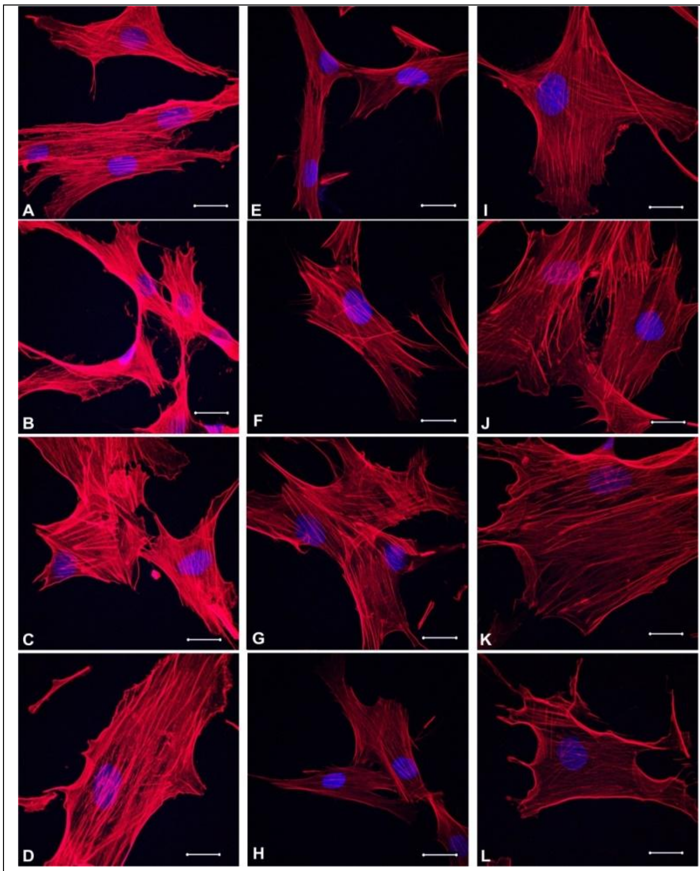
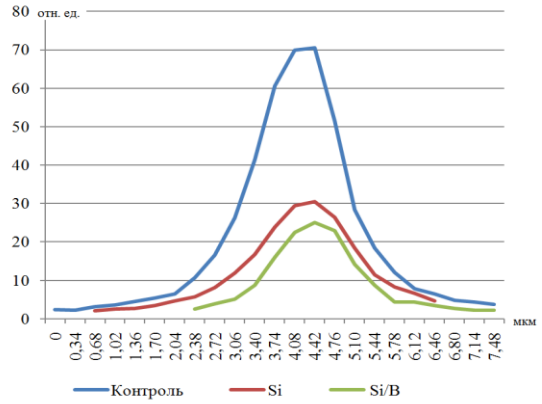


Рис. 10. Репрезентативные фото МСК, окрашенных DAPI (ядра) и TRITC-фаллоидином (F-актин). A-D – Контроль, E-H – Si, I-L – Si/B. Масштабный отрезок 20 мкм.



Интенсивность флуоресценции FITC-фаллоидин (F-актин), полученная на разных глубинах клеток (z-стек) в контроле, при обработке наночастицами Si и Si/B и нормированные по моде распределения.

Проведенная оценка распределения актиновых филаментов по толщине клетки свидетельствовала о том, что во всех исследованных группах («Контроль 24 ч», «Si 24 ч», «Si/B 24 ч») имело место центральное расположение актиновых фибрилл без смещения к поверхности клетки (рис. 10). Содержание F-актина под мембраной уменьшалось в ряду «Контроль»-«Si»-«Si/B». Возможно, свой вклад в увеличение жесткости вносит тубулиновый цитоскелет [Pelling A. E. et al., 2007]. Однако, на использованных нами небольших глубинах продавливания при измерении жесткости, его вклад будет весьма незначителен [Collinsworth A. et al., 2002].

Механизм увеличения жесткости кортикального цитоскелета на фоне снижения содержания F-актина остается не вполне ясным, но, по-видимому, связан с реорганизацией структуры, например, с увеличением числа «сшивок» между стресс-фибриллами вслед за модификацией поверхности клеток или/и взаимодействием с мембраной. Это важно учитывать, поскольку изменения в структуре мембраны и в структуре кортикального цитоскелета, который неразрывно связан с фософолипидным бислоем, могут запускать целый ряд внутриклеточных процессов, а изменение жесткости кортикального цитоскелета может модифицировать сигнальные процессы и регулировать активность ионных каналов [Suzuki M. et al., 1993; Schwiebert E.M. et al., 1994; Negulyaev Yu.A. et al., 1996].

Заключение

Модели оценки цитотоксичности веществ in vivo не позволяют детально изучить те возможные реакции клеток, тканей и органов организма млекопитающего, которые должны быть известны при использовании НЧ в качестве компонентов лекарств и в других биотехнологических областях. По этой причине крайне важно иметь способы изучения токсических свойств НЧ in vitro, в которых в качестве моделей будут выступать именно те клетки, которые должны контактировать с изучаемыми НЧ. В то же время исследования in vivo не позволяют, либо затрудняют оценку реакций на НЧ отдельных клеток и тканей и таких параметров, как влияние НЧ на клеточную пролиферацию, репродуктивный потенциал, оценку канцерогенных свойств, способность к поглощению НЧ различными типами клеток и определение путей поглощения. Кроме этого, их проведение дороже, требует больше времени и часто противоречит биоэтическим требованиям. Поэтому при анализе цитотоксических свойств НЧ как с экономической точки зрения, с позиции биоэтики и научного подхода представляется целесообразным использование клеточных культур на первых этапах скрининга.

В результате проведенной работы апробирован метод оценки цитотоксичности, который может быть использован в отношении различных НЧ. Показана возможность детектировать in vitro изменения под воздействием НЧ таких клеточных параметров, как жизнеспособность, изменения митохондриального и лизосомального компартментов, продукцию АФК, скорость пролиферации.

Показана хорошая степень биосовместимости НЧ Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au, Si/Ag и SiO_2, что делает их перспективными для использования в биотехнологии. Не выявлено цитотоксических свойств всех исследованных НЧ, которые приводили бы к увеличению числа погибших МНК относительно контроля, а среди погибших клеток не наблюдалось изменения доли клеток в состоянии апоптоза, некроза и позднего апоптоза. Однако, при анализе МСК показана незначительная токсичность НЧ SiO_2 и НЧ кремния, модифицированного металлами. Таким образом, можно заключить, что в отношении клеток различного типа НЧ способны проявлять разные биологические эффекты, что возможно модулировать путем модификаций.

При анализе всех использованных НЧ для МНК были подтверждены данные ранее проведенных исследований, где показано увеличение уровня АФК при инкубации клеток с исследуемыми НЧ различного типа (металлсодержащих, органических). Однако, в отличие от анализа жизнеспособности, где МНК показали большую устойчивость, в случае с МСК напротив, не наблюдалось увеличения уровня АФК, а инкубация МСК с НЧ Si/B и Si/Ag приводила к его понижению. Таким образом, нельзя утверждать, что увеличение уровня АФК является обязательным условием активации механизмов клеточной гибели при взаимодействии клеток с НЧ. Однако, в экспериментах с модифицированными металлами НЧ повышенный уровень АФК сопровождался незначительным снижением жизнеспособности. При этом модифицированные золотом и серебром НЧ кремния повышали продукцию провоспалительных интерлейкинов.

При анализе действия исследуемых НЧ на лизосомальный и митохондриальный компартменты, показаны различные эффекты – как повышения, так и снижения активности этих органелл. Данные эффекты зависели как от модификации НЧ, так и от типа используемых клеток. При этом была показана способность НЧ (Si) стимулировать пролиферацию фетальных фибробластов человека, что свидетельствует о нормальном протекании базовых клеточных функций.

Для НЧ Si/B получены данные, свидетельствующие в пользу способности данных НЧ поглощаться клетками. При анализе светорассеяния показано, что данные НЧ либо оседали на мембране, либо проникали в клетку, что согласуется с изменением жесткости клеточной мембраны, также показанной для данных НЧ.

Таким образом, в результате проведенной работы подтверждена высокая степень биосовместимости НЧ чистого кристаллического кремния и его модификаций. Показано, что модификация таких НЧ благородными металлами способна изменять характер их взаимодействия с клетками разных типов.

Выводы

1) Все исследованные НЧ (Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au, Si/Ag и SiO_2), при их взаимодействии с несколькими типами культивируемых in vitro клеток человека (мезенхимальные стромальные клетки, мононуклеары, фибробласты) в течение 24-48 ч in vitro оказывали воздействие на функциональные характеристики культивируемых клеток.

2) При взаимодействии с мононуклеарами периферической крови человека in vitro все наночастицы кремния (кроме наночастиц диоксида кремния) индуцировали повышение уровня активных форм кислорода. Наночастицы, модифицированные благородными металлами (Ag и Au), вызывали функциональное понижение трансмембранного потенциала митохондрий этих клеток, тогда как наночастицы чистого кремния, а также их модификации бором и золотом приводили к снижению активности лизосом этих клеток.

3) Наночастицы кремния, модифицированные благородными металлами (Ag и Au) вызывали увеличение доли лимфоцитов, несущих маркеры активации (CD-25, HLA-DR), а также стимуляцию продукции провоспалительных цитокинов TNF-α, IL1-β, IL-6 и антивоспалительного IL-10. Однако, это увеличение было существенно ниже ФГА-стимулированной активации, при которой наночастицы не оказывали аддитивного эффекта как на экспрессию маркеров активации, так и синтез провоспалительных цитокинов.

4) В мезенхимальных стромальных клетках при инкубации с наночастицами Si/B и Si/Ag отмечено снижение уровня активных форм кислорода, активность лизосомального компартмента увеличивалась при инкубации с Si/B и снижалась в случае с Si/Au, трансмембранный потенциал митохондрий возрастал при инкубации с наночастицами Si и Si/Pd и снижался при инкубации с наночастицами Si/B.

5) Кратковременное (1-24 ч) взаимодействие мезенхимальных стромальных клеток человека с наночастицами Si и Si/B приводило к увеличению жесткости их кортикального цитоскелета и изменениям структуры F-актина, что не влияло на жизнеспособность клеток.

6) Наночастицы чистого Si без модификаций при кратковременной экспозиции обладают высокой биосовместимостью, которая зависит от концентрации и типа клеток, на которые они действуют. Модификация металлами придает данным наночастицам способность влиять на состояние митохондрий и лизосом.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

СТАТЬИ

1. **А. Н. Шубенков**, С. Б. Коровин, Е. Р. Андреева, Л. Б. Буравкова, В. И. Пустовой. Изучение цитотоксических свойств наночастиц кристаллического кремния in vitro // Биофизика. - 2014. – Т. 59. - № 1, - С. 134-139.
2. **А. Н. Шубенков**, С. Б. Коровин, Е. Р. Андреева, Л. Б. Буравкова, В. И. Пустовой. Модификация поверхности наночастиц кремния серебром или золотом снижает их биосовместимость in vitro // Цитология -2014. – Т. 56. - № 7. – С. 511-515.
3. I.V. Ogneva, S.V. Buravkov, **A.N. Shubenkov**, L.B. Buravkova. Mechanical characteristics of mesenchymal stem cells under impact of silica-based nanoparticles// Nanoscale Research Letters – 2014. - Vol.9. - №1. - P. 284.

ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. Е.Г. Рудимов, А.Н. Горностаева, **А.Н. Шубенков.** «Экспресс-оценка биобезопасности наночастиц на основе кремния in vitro». Материалы VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» Звенигород. -2011. -С. 71-72.
2. E. Andreeva, S. Korovin, **A. Shubenkov**, V. Pustovoy, L. Buravkova «Silicon nanoparticles as a perspective tool for biomedical applications: synthesis, physical properties, functional modifications and biocompartibility». World conference on Regenerative Medicine. Leipzig, Germany. -2013. -P. 12.
3. **Шубенков А.Н.** «Наночастицы Si, SiB, SiPd не токсичны для мононуклеаров периферической крови человека IN VITRO». Материалы XII Конференции молодых специалистов, аспирантов и студентов, посвященной Дню космонавтики. Москва. -2013. -С. 59-60.
4. **Шубенков А.Н.** «Оценка биосовместимости наночастиц кремния и их модификаций бором, золотом, серебром и палладием на мезенхимальных стромальных клетках человека *iv vitro»*. Материалы XIII Конференции молодых специалистов, аспирантов и студентов, посвященной Дню космонавтики. Москва. -2014. -С. 51.