

ЗАВИСИМОСТЬ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДЕНДРОНИЗИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ОТ УРОВНЯ ПЕГИЛИРОВАНИЯ

В. А. Жогла

Белорусский государственный университет, г. Минск;

vika.physics@yandex.ru;

науч.рук. – Д. Г. Щербин, д-р биол. наук, доц.; В. М. Абашкин

В работе исследован цитотоксический эффект наночастиц серебра, декорированных дендронами второй и третьей генерации и полиэтиленгликолем. Для оценки жизнеспособности клеток измерялся уровень флуоресценции резорфина, образующегося восстановлением резазурина НАДФН-дегидрогеназой. Установлено, что цитотоксичность наночастиц снижается при повышении уровня пегилирования и возрастает при увеличении плотности дендронов. Пегилирование более эффективно уменьшает цитотоксичность частиц, декорированных дендронами второй генерации. Наночастицы с дендронами третьей генерации проявляют меньшую цитотоксичность, чем наночастицы с дендронами второй генерации.

Ключевые слова: наночастицы серебра; пегилирование; дендроны; цитотоксичность.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия происходит активное развитие нанотехнологий и, в частности, наномедицины. Металлические наночастицы обладают интересными оптическими свойствами, связанными с возбуждением коллективных колебаний плотности свободных электронов (плазмонов) в структуре металла. Наличие резонансной частоты колебаний плазмонов делает возможным эффективное применение металлических наночастиц в системах медико-биологической визуализации и диагностики. Помимо оптических свойств, наночастицы обладают магнитными свойствами, на основе которых могут создаваться наносистемы для контрастирования в магнитно-резонансной томографии, магнитной гипертермии и в других методиках [1]. Дендроны могут ковалентно и не ковалентно связываться с лекарственными средствами и генетическим материалом, и т.о. использоваться для доставки препаратов в клетки и генетической терапии онкологических заболеваний. Однако, несмотря на имеющиеся преимущества, использование наночастиц в медицине ограничивается вызываемыми ими токсическими эффектами. На сегодняшний день существует ряд возможностей для снижения цитотоксичности и повышения биосовместимости наноструктур, в частности, использование полиэтиленгликоля (ПЭГ) для модификации целевых частиц. Эффективность данной модификации неодинакова для разных наночастиц.

В связи с этим, целью исследования явилось выявление зависимости цитотоксического эффекта дендронизированных наночастиц серебра от уровня пегилирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследовании использовались наночастицы серебра, декорированные дендронами второй и третьей генерации (G2 и G3, соответственно) и полиэленгликолем, при различных молекулярных соотношениях дендрон/ПЭГ: 1:1, 3:1, 1:3 (рис. 1).

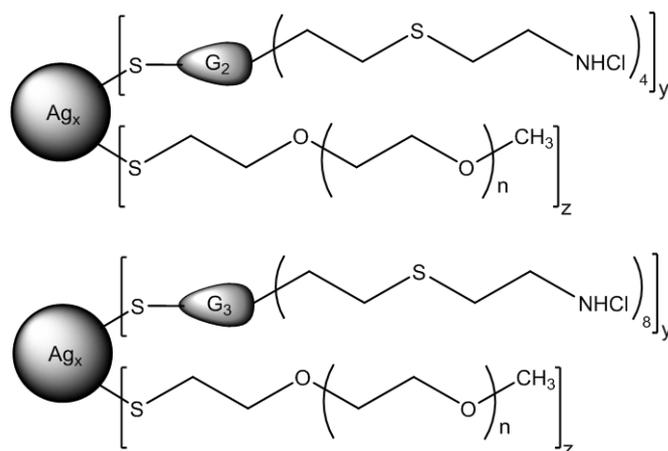


Рис. 1. Химическая структура исследованных наночастиц с дендронами второй и третьей генерации, соответственно, при молекулярном соотношении z:y

Наночастицы серебра имеют сферическую форму, их средний размер составляет ~30 нм. Данные наночастицы были синтезированы в Университете Алькала, Алькала-де-Хенарес, Испания. Дендроны в водной среде несут положительный заряд +1 на концевых группах. Таким образом, катионный заряд единичного дендрона составляет +4 для G2 и +8 для G3.

Исследование проводили на клеточной линии острого промиелоцитарного лейкоза человека HL-60. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и антибиотиков пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Культуры клеток выращивали в флаконах с площадью поверхности роста 75 см² в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, при температуре 37 °С и влажности 80 %.

Выживаемость клеток оценивали с помощью резазурина. В жизнеспособных клетках резазурин восстанавливается митохондриальным ферментом НАДФН-дегидрогеназой до розового флуоресцирующего резорифина [2]. Клетки высаживали на черные 96-луночные планшеты в концентрации 1×10⁵ клеток/мл в объёме 100 мкл клеточной суспензии на

лунку. Спустя 5 ч к посеянным клеткам добавляли исследуемые наночастицы, растворённые в 10 мкл фосфатного солевого буфера (ФСБ). В контрольные лунки вносили по 10 мкл ФСБ. Для негативного контроля в лунки вносили 10 мкл диметилсульфоксида. После 72-часовой инкубации во все лунки планшета добавляли по 10 мкл раствора резазурина (0,01 мг/мл) и инкубировали в течение 2 ч. Далее, с использованием микропланшетного спектрофотометра Wallac1420 VICTOR2 (Финляндия) измеряли флуоресценцию резорурфина ($\lambda_{\text{возб}}=530$ нм, $\lambda_{\text{исп}}=590$ нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.2 и 3 представлены результаты измерения выживаемости клеток в зависимости от концентрации наночастиц. Данные, полученные для наночастиц с дендронами второй и третьей генерации, свидетельствуют о снижении цитотоксичности наночастиц при увеличении уровня пегилирования и, соответственно, снижении плотности дендронов на поверхности наночастиц.

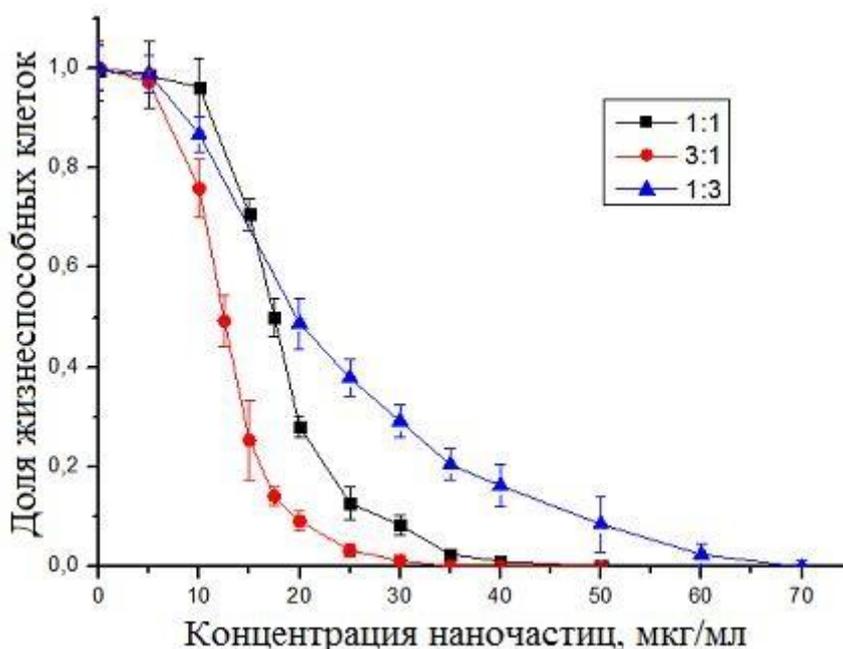


Рис. 2. Кривые «доза-эффект» для наночастиц с дендронами второй генерации при различном молекулярном соотношении дендрон/ПЭГ (1:1, 3:1, 1:3)

В таблице приведены значения IC50 (концентрации наночастиц, при которой жизнеспособность клеток снижается на 50 %) для исследованных наночастиц. Пегилирование оказалось более эффективным для снижения токсичности наночастиц, декорированных дендронами второй генерации. В целом, наночастицы с дендронами третьей генерации про-

явили меньшую цитотоксичность в сравнении с наночастицами, содержащими дендроны второй генерации.

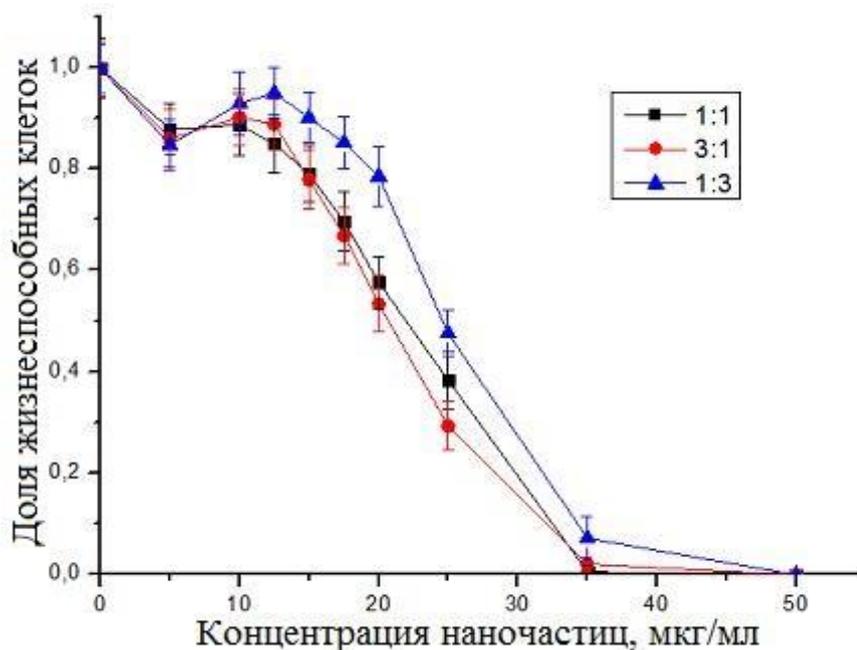


Рис. 3. Кривые «доза-эффект» для наночастиц с дендронами третьей генерации при различном молекулярном соотношении дендрон/ПЭГ (1:1, 3:1, 1:3)

Таблица

Значения IC₅₀ для исследованных наночастиц

Генерация дендрона	Соотношение дендрон/ПЭГ	IC ₅₀ , мкг/мл	Генерация дендрона	Соотношение дендрон/ПЭГ	IC ₅₀ , мкг/мл
2	3:1	12,4	3	3:1	21,5
	1:1	17,3		1:1	23,1
	1:3	21,3		1:3	25,2

Таким образом, показано, что цитотоксичность дендронизированных наночастиц серебра зависит от уровня пегилирования, а так же от генерации дендронов и их плотности на поверхности наночастиц.

Библиографические ссылки

1. Nanostructures for novel therapy: synthesis, characterization and applications : Nanostructures in therapeutic medicine series. Nanostructures for novel therapy / eds. D. Ficaï, A. M. Grumezescu. Amsterdam, 2017.
2. Uzarski J. S. Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds // Biomaterials. 2017. V. 129. P. 163–175.