

ВЛИЯНИЕ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО КРЕМНИЯ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ ФИБРОБЛАСТОВ И КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ГОРТАНИ

И. Ю. Искусных¹, А. Л. Попов², Т. Н. Попова¹, В. М. Кашкаров¹, В. Н. Ципенюк¹

¹ Воронежский государственный университе

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Поступила в редакцию 23.09.2011 г.

Аннотация. Исследовано влияние наночастиц пористого кремния на особенности пролиферации фибробластов и клеток карциномы гортани. С помощью метода дифференцированного флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток установлено, что нанокристаллический кремний обладает токсичными свойствами по отношению к фибробластам и приводит к развитию пикноза и кариореаксиса, являющимися признаками апоптоза. Воздействие пористого кремния в концентрации 0,01% на фибробласты и клетки карциномы гортани сопровождалось увеличением их митохондриальной активности в 1,25 и 1,21 раз соответственно. По-видимому, увеличение активности митохондрий приводит к повышенной генерации активных форм кислорода, что приводит к увеличению числа клеток, вовлекаемых в апоптоз.

Ключевые слова: нанокристаллический кремний, клетка, апоптоз, наночастицы.

Abstract. The influence of nanocrystallized silicon nanoparticles on features of fibroblasts proliferation and cells carcinoma of larynx was investigated. Using the differential fluorescent staining method of living and dead cells was shown that nanocrystallized silicon has toxic properties with respect to fibroblasts and leads to pyknosis and karyorhexis, which are signs of apoptosis. The influence of nanocrystallized silicon at a concentration of 0.01% on fibroblasts and laryngeal carcinoma cells was accompanied by an increase in their mitochondrial activity in 1.25 and 1.21 times respectively. Apparently, the raise of mitochondria activity leads to intensification of generation of reactive oxygen species, which provides an increase of cells quantity involved in apoptosis.

Keywords: nanocrystallized silicon, cell, apoptosis, nanoparticles.

Принятые сокращения: ДМЕМ — среда игла в модификации Дальбекко, ДМСО — диметилсульфоксид, МТТ — 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, НК — нанокристаллический кремний, ПАК — полиакриловой кислоты, ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка, ARAF1 — фактор активации пептидазы, BAX — проапоптотический белок, BCL-2 — ингибитор каспаз, CD 95 — трансмембранный белок, участвующий в индукции апоптоза.

ВВЕДЕНИЕ

Использование наноматериалов в области здравоохранения показало наличие огромного положительного экономического потенциала в этой области. Несомненно, что одной из важнейших возможностей нанотехнологий является развитие новых эффективных способов лечения пациентов с различными заболеваниями. Их использование

может также значительно расширить ограниченные на сегодняшний день возможности молекулярной диагностики. Особенности свойств частиц в ультрадисперсном состоянии открывают широкие перспективы для создания новых эффективных катализаторов, сенсорных систем, препаратов с высокой биологической активностью для применения в экологии, медицине и сельском хозяйстве. Однако известно, что наночастицы обладают более высокой токсичностью по сравнению с обычными микрочастицами, способны проникать в неизменном виде через клеточные барьеры, а также через гематоэнцефалический барьер в центральную нервную систему, циркулировать и накапливаться в органах и тканях, вызывая более выраженные патоморфологические поражения внутренних органов. Токсичность наночастиц определяется их формой и размерами, при этом мельчайшие наночастицы веретенообразной формы вызывают более разрушительные эффекты в организме, нежели подобные им частицы сферической формы. При воздействии на организм отчетливо прослежива-

© Искусных И. Ю., Попов А. Л., Попова Т. Н., Кашкаров В. М., Ципенюк В. Н., 2012

ется связь «доза-эффект» [1, 2]. В связи с этим, исследование цитотоксичности наночастиц представляет несомненный интерес. Нанокристаллический кремний (НК) привлекает внимание исследователей в связи с перспективностью его использования в качестве газового сенсора. Высокая газовая чувствительность НК объясняется большой развитостью структуры его поверхности (сотни м²/г). В настоящее время известно, что НК медленно реагирует с окружающей средой [3]. Показано, что нанокристаллические частицы, содержащие кремний могут влиять на редокс-реакции [4–7], обеспечивающие защиту клеток в условиях окислительного стресса: инактивацию пероксида водорода, супероксид-аниона, гидроксильного радикала. При этом разовая доза наночастиц НК, оказывающая влияние на окислительно-восстановительный гомеостаз, не определена.

В связи с этим, целью нашей работы было исследование влияния наночастиц НК на дыхательную активность митохондрий и особенности пролиферации мышечных фибробластов L929 и клеток карциномы гортани HEP-2.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования проводились на линиях клеток из коллекции клеточных культур Института Биофизики Клетки РАН: NCTC clone L929 — фибробласты, полученные из клеток подкожной соединительной ткани мышей C3H/An (Flow Laboratories, Великобритания, J.Nat.CancerInst. 1948, 9, 229); HEP-2 — эпителиальные клетки, первичным источником которых является эпидермоидная карцинома гортани (Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, Москва, CancerRes., 1954, 14, 660).

Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 1% L-глутамин при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO₂. Посев клеток на поверхность матрасов проводили с плотностью 30–50 тыс/см², соответствующей 1/4–1/6 плотности монослоя. Через 3 дня после посева культуру пересевали в новый флакон или использовали в опыте. В этих условиях возникал монослой типичного вида. Наблюдение за морфологией и подсчет клеток проводили на микроскопе Биолам-МПЗ. Микрофото-съемка клеток проводилась на микроскопе Axiovert 200 (Цейс, Германия).

В работе были использованы эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), а также пенициллин и

стрептомицин (ОАО «Биосинтез», Россия). Среда Игла в модификации Дальбекко (DMEM), среда F12, L-глутамин, МТТ-реагент, растворы трипсина и Версена («ПанЭко», Россия). Для культивирования клеток использовали пластиковую посуду (матрасы, 96-луночные планшеты, чашки Петри, пипетки) фирм “Nunc” и “Costar” (США, Дания).

На первом этапе работы был проведен химический синтез НК методом электрохимического травления [8]. Поверхность исходной пластины монокристаллического кремния марка (КЭФ-0,2; кремний электронный, легированный фосфором, удельное сопротивление 0.2 Ом×см, с ориентацией (100)) отмывали изопропиловым спиртом и высушивали на воздухе. После этого пластину кремния помещали в электрохимическую ячейку из фторопласта и подвергали электрохимическому травлению в 40%-ом растворе плавиковой кислоты и диметилформамида с добавлением небольшого количества 30%-ой перекиси водорода. В процессе электрохимического травления кремниевая пластина служила анодом, а в качестве катода использовалась металлическая пластина из пищевой нержавеющей стали. Травление проводили при плотности тока 50 мА/см² в течение 30 мин. После завершения процесса травления пластину промывали в дистиллированной воде и изопропиловом спирте, а затем высушивали на воздухе. Морфологию и элементный состав пластин исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL — JSM 6380LV (Japan). Далее соскабливали слой пористого кремния в виде рыхловатого налета бурого цвета, сформировавшийся в результате травления на поверхности пластины. Порошок кремния временно помещали в стеклянную емкость, а пластину кремния снова подвергали электрохимическому травлению при тех же условиях. Процесс травления повторяли 3–4 раза до истончения исходной пластины. Размер полученных кремниевых частиц составлял 5–30 нм. Поскольку подготовленный таким образом нанокристаллический кремний характеризуется повышенной гидрофобностью, его поверхность необходимо активировать для обеспечения возможности взаимодействия Si частиц с биологическими структурами, в частности, с культурами клеток.

Поверхность НК активировали в 10% растворе полиакриловой кислоты (ПАК). Известно, что изначально поверхность наночастиц кремния образована связями Si–H. После обработки в ПАК большая часть этих связей замещается связями

типа Si–C–O и Si–C–OH, в результате чего формируется гидрофильная поверхность [9].

После обработки порошка Si в растворе в водном растворе ПАК в течение 20 мин. его промывали в дистиллированной воде и помещали в изопропиловый спирт, в результате чего получали спиртовую суспензию кремния.

Раствор наночастиц НК получали при интенсивном перемешивании 10 мг порошка пористого кремния в 100 гр среды для культивирования в ультразвуковой бане.

Исследование распределения наночастиц по размеру проводили методом измерения динамического светорассеяния на наносайзере N5 Submicron Particle Size Analyser «BeckmanCoulter» — стендовом приборе для определения размера субмикронных частиц, позволяющем осуществить анализ эмульсий, частиц в суспензии и молекул в растворе с диаметрами, лежащими в интервале от 3 нм до 3000 нм.

Предварительно, перед экспериментом, проводились измерения параметров культуральных сред, используемых для разведения водных зелей наночастиц НК. Измерение индекса рефракции осуществляли на рефрактомере УРЛ Модель-1. Вязкость растворов была определена на капиллярном вискозиметре ВПЖ-1м. Перед измерением исследуемые образцы жидкостей (вода, среда, сыворотка) пропускали через фильтр «Corning» (Германия) с размером пор 0,2 мкм.

Для приготовления суспензии клетки ополаскивали средой ДМЕМ, не содержащей сыворотки, и добавляли раствор трипсина, смешанный с раствором Версена в пропорции 1:1 (раствор А). После трехминутного выдерживания при 37 °С раствор А сливали, клетки суспендировали в среде культивирования. Посев клеток на поверхность субстратов проводился в тех же концентрациях, что и при ведении культуры. Определение числа клеток в суспензии проводили, используя гемоцитометр Горяева. Подсчет проводили по 5 полям (20—100 клеток в каждом) и определяли среднее значение. Проводили не менее 2 независимых подсчетов, при расхождении средних значений двух подсчетов более чем на 25% проводили перемешивание суспензии и повторное определение числа клеток.

Исследование митохондриальной активности клеток проводили на основании МТТ-теста, основанного на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых

метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде (ДМСО). В качестве контроля прохождения МТТ теста использовали добавление в среду культивирования клеток 10%-го диметилсульфоксида (ДМСО).

Раствор МТТ (5 мг/мл в растворе PBS [150 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,2, 150 мМ NaCl], добавляли в среду культивирования (10% от объема среды). Планшет интенсивно встряхивали в течение 5 мин, затем помещали в CO₂-инкубатор на 3 часа. После инкубации среда удалялась, и в лунки вносили равный объем ДМСО, планшет интенсивно встряхивали в течение 5 мин, до полного растворения солей формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм в лунках 96 — луночного планшета с помощью фотометра (модель 680 BIO-RAD, США) (рис. 3). Число параллельных экспериментов составляло не менее трех.

Оценку жизнеспособности клеток, культивируемых в присутствии наноматериалов, проводили на микроскопе Axiovert 200 (Цейсс, Германия). Для проведения анализа использовали набор L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США), в который входят флуоресцентные красители SYTO 9 (поглощение — 420 нм, эмиссия — 580 нм) и иодид пропидия (поглощение 488 нм, эмиссия 640 нм). SYTO 9 окрашивает все клетки в зеленый цвет, иодид пропидия окрашивает в красный цвет ядра погибших клеток. Красители добавлялись в среду (5 мг/мл), затем планшет помещался в CO₂-инкубатор на 15 мин, затем проводилась микрофотосъемка клеток.

Индукцию апоптоза оценивали по изменению морфологии ядер. Для анализа изменения ядерной морфологии клетки, выращенные на 96 — луночных планшетах, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 2 %-ным параформальдегидом в течение 10 мин и окрашивали красителем Hoechst (1 мкМ) в течение 30 мин. Препараты просматривали во флуоресцентном микроскопе Axiovert 200 Цейсс и фотографировали с помощью CD-камеры.

Соотношение живых и мертвых клеток определяли в камере Горяева с помощью окрашивания клеток трипановым синим.

Опыты проводили в 3—4 кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в двух повторностях. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2010, за досто-

верные принимали различия средних величин по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При разведении наночастиц НК в культуральной среде наблюдалась агломерация наночастиц субмикронных до микронных размеров. Возможно, что агломерация наночастиц происходит вследствие увеличения электростатических сил при их взаимодействии. Длительное выдерживание наночастиц НК в ультразвуковой бане при рабочей частоте 37,44 кГц приводит к уменьшению размеров агломератов частиц.

Был проанализирован размер наночастиц в суспензиях, приготовленных на основе культуральной среды DMEM, содержащих PBS — буфер, pH=7.2. Результаты исследований показали, что в растворе присутствуют частицы с размером преимущественно 6,5 нм. С помощью программного обеспечения к наносайзеру был рассчитан средний размер частиц — 7,9 нм. Также в суспензии обнаруживались частицы размером 26,1 нм, 182,1 нм, 516,5 нм (табл. 1). По-видимому, это устойчивые агломераты наночастиц НК.

Исследование агрегативной устойчивости наночастиц НК при разведении наночастиц в культуральной среде DMEM, содержащей 5% фетальную телячью сыворотку, показало, что размер наночастиц сохраняется исходным.

Анализ результатов МТТ-теста позволил установить увеличение активности фибробластов и клеток карциномы гортани. В положительном контроле МТТ — теста (среде, содержащей 10% ДМСО) наблюдалась практически 100% гибель клеток. При концентрации НК 0,01% происходило относительное увеличение сигнала МТТ в 1,25 у фибробластов линии L929 и в 1,21 раза у клеток карциномы гортани HEP-2 (рис. 1). Это может быть

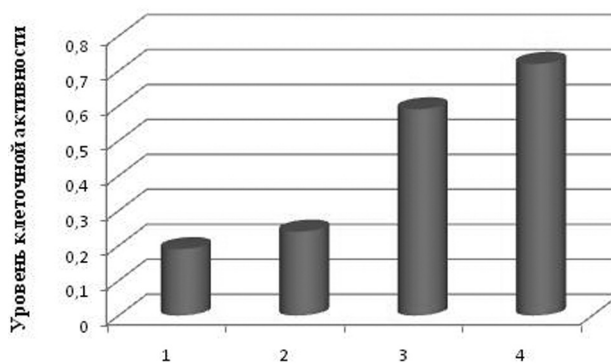


Рис. 1. Клеточная активность фибробластов линии L929 и клеток карциномы гортани HEP-2 при воздействии наночастиц пористого кремния в концентрации 0,01 %: 1 — контрольные клетки линии L929; 2 — клетки L929, обработанные НК; 3 — контрольные клетки HEP-2; 4 — клетки HEP-2, обработанные НК

связано с увеличением митохондриальной активности клеток.

Метод дифференцированного флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток позволил установить наличие токсического эффекта наночастиц НК на фибробласты L929. Микрофотографии клеток, подвергнутых воздействию наночастиц НК в 0,01 % концентрации, представлены на рис. 2, 3. Для фибробластов L929 процент клеточной гибели был значительно больше, чем у клеток линии HEP-2 (рис. 2, 3). Клетки карциномы гортани были практически не чувствительными к цитотоксическому действию наночастиц пористого кремния.

В настоящей работе установлено, что НК в клетках линии L929 приводит к пикнозу и кариорексису, являющимися признаками апоптоза. Фрагментация и сморщивание клеточных ядер является при окрашивании флуоресцентным красителем Hoechst (рис. 4). Нельзя исключить, что увеличение митохондриальной активности клеток L929 приводит к интенсификации свободно-радикальных процессов. Оксидативный стресс, в свою очередь, способствует выходу цитохрома C из кристы митохондрий, который индуцирует запуск каскада реакций, ведущих к апоптозу. Возможно, что раковые клетки менее чувствительны к действию свободных радикалов из-за повышенной экспрессии антиоксидантных белков. Механизмы клеточной гибели в раковых клетках могут инактивироваться на нескольких уровнях. Одним из них является повышение уровня экспрессии ингибитора апоптоза — BCL-2 и мутация проапоптотических генов, таких как BAX, APAF1, CD 95 [10—14]. При онкогенезе около половины различных опухолей содержат мутантный ген P53, утра-

Таблица 1
Параметры наночастиц НК в культуральной среде DMEM

Размер наночастиц, нм	Количество, %	Стандартное отклонение	Средний размер наночастиц, нм
6,5	97,13	1,6	7,9
26,1	2,56	5,4	
182,1	0,22	76,7	
516,5	0,1	109,3	

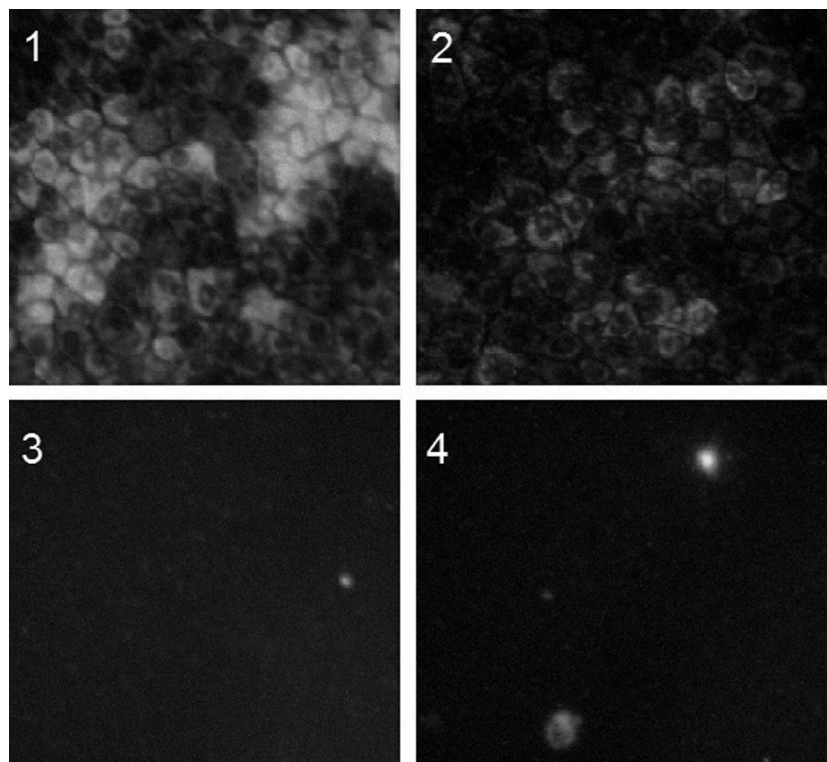


Рис. 2. Клетки линии HEP-2 при инкубации с наночастицами НК в концентрации 0,01%: флуоресцентное окрашивание SYTO 9 (1 — контроль, 2 — клетки, обработанные НК) и иодидом пропидия (3 — контроль, 4 — клетки, обработанные НК)

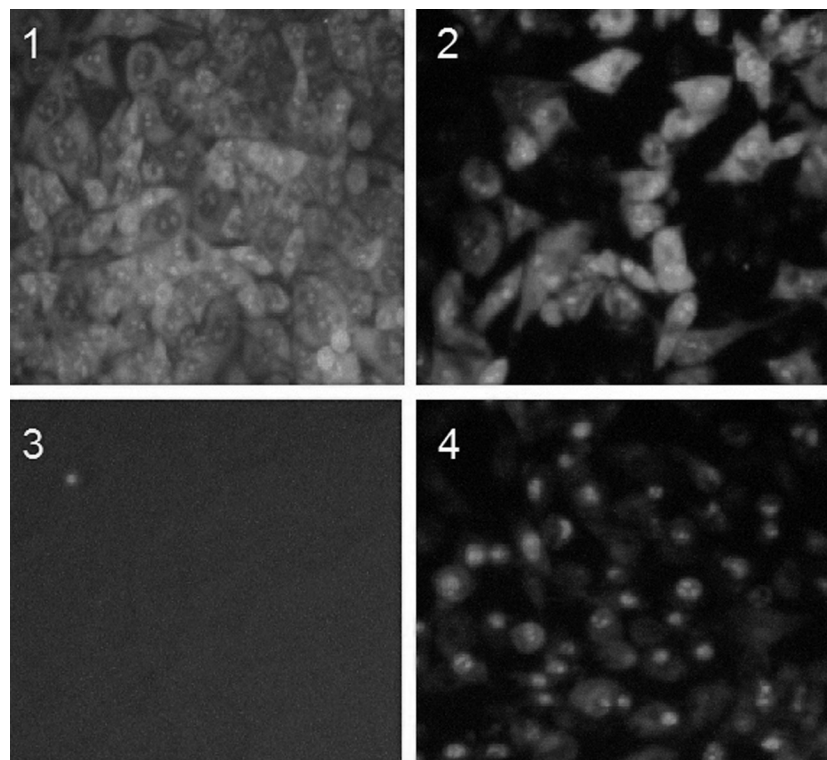


Рис. 3. Клетки линии L929 при инкубации с наночастицами НК в концентрации 0,01 %: флуоресцентное окрашивание SYTO 9 (1 — контроль, 2 — клетки, обработанные НК) и иодидом пропидия (3 — контроль, 4 — клетки, обработанные НК)

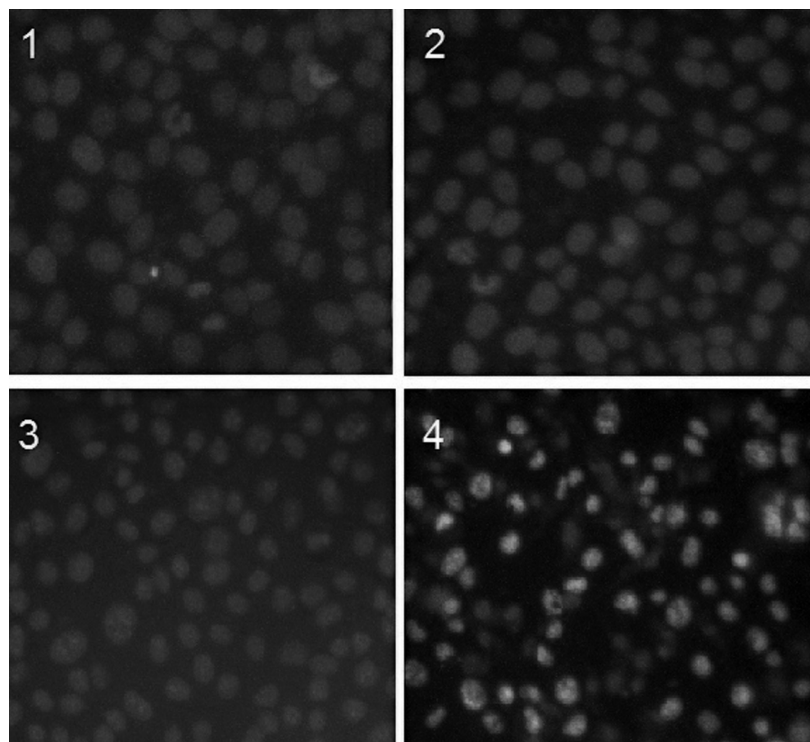


Рис. 4. Окрашивание флуоресцентным красителем Hoechst клеток линии HEP-2 (1 — контроль, 2 — клетки, обработанные НК в концентрации 0,01%) и фибробластов L929 (3 — контроль, 4 — клетки, обработанные НК в концентрации 0,01%)

тивший свои функции. Это приводит к активации клеточного цикла в G1 и G2 фазе митоза и неограниченной пролиферации, сопровождающейся повышенной устойчивостью клеток к токсическим агентам [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что токсичность частиц НК может быть обусловлена интенсификацией свободнорадикальных процессов. Раковые клетки, очевидно, менее чувствительны к действию свободных радикалов в связи с возможностью гиперэкспрессии их антиоксидантных белков и ингибиторов апоптоза, защищающих клетки от токсического воздействия наночастиц НК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глушкова А. В. Нанотехнологии и нанотоксикология — взгляд на проблему / А. В. Глушкова, А. С. Радилов, В. Р. Рембовский // Токсикол. Вестник. — 2007. — № 6. — С. 4—8.
2. Hoet P. H. Nanoparticles — known and unknown health risks / P. H. Hoet, I. Bröske-Hohlfeld, O. V. Salata // J. Nanobiotechnology. — 2004. — Vol. 2, № 1. — P. 2—12.
3. Лукьянова Е. Н. Динамика взаимодействия молекул воды с пористым кремнием / Е. Н. Лукьянова, С. Н. Козлов, А. И. Ефимова // Структура и динамика

молекулярных систем. — 2003. — № X. — P. 41—44.

4. Alvarez Sara D. The compatibility of hepatocytes with chemically modified porous silicon with reference to in vitro biosensors / Sara D. Alvarez, Austin M. Derfus, Michael P. Schwartz // J. Biomaterials. — 2009. — № 1. — P. 26—34.

5. Tao Zhimin. Mesoporous silica nanoparticles inhibit cellular respiration / Zhimin Tao, Matthew P. Morrow, A. Tewodros // Nano Lett. — 2008. — № 5. — P. 1517—1526.

6. Limbach Ludwig K. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress / K. Limbach Ludwig, Peter Wick, P. Manser // Environ. Sci. and Technol. — 2007. — № 11. — P. 4158—4163.

7. Van Hoecke Karen. Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Importance of surface area / Karen Van Hoecke, A.C. Karel De Schamphelaere, P. Van der Meeren // Environ. Toxicol. and Chem. — 2008. — № 9. — P. 1948—1957.

8. Кашкаров В. М. Состав и строение слоев нанопористого кремния с гальванически осажденным Fe и Co / В. М. Кашкаров, А. С. Леньшин, А. Е. Попов // Известия РАН, сер. Физическая. — 2008. — Т. 72, № 4. — С. 484—490.

9. Park Ji-Ho. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications / Ji-Ho Park, Luo Gu, Geoffrey von M // Nature Materials. — 2009. — № 2. — P. 1—6.

10. *Igney F. H.* Tumor counterattack: fact or fiction? / F. H. Igney, P. H. Krammer // *Cancer Immunol Immunother.* — 2005. — № 54. — P. 1127—1136.
11. *Lavrik I.* Death receptor signaling / I. Lavrik // *J. Cell Sci.* — 2005. — № 118. — P. 265—267.
12. *Green D. R.* A matter of life and death / D. R. Green, G. I. Evan // *CancerCell.* — 2002. — № 1. — P. 19—30.
13. *Hunt A.* Apoptosis. Till death us do part / A. Hunt, G. Evan // *Science.* — 2001. — № 293. — P. 1784—1785.
14. *Viktorsson K.* Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies / K. Viktorsson // *Adv. Cancer Res.* — 2005. — № 94. — P. 143—196.
15. *Цурко В. В.* Гериатрия в лекциях / В. В. Цурко, Н. И. Некрасова. — Москва. — 2005. — С. 29—31.

Искусных Игорь Юрьевич — аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет; Тел.: (473) 2208278, e-mail: iskusnykh.i@gmail.com

Попов Антон Леонидович — аспирант института теоретической и экспериментальной биофизики РАН; тел. служебный: 7 (4967) 73-25-80, e-mail: office@iteb.ru

Попова Татьяна Николаевна — заведующий кафедрой медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет; Тел.: (473) 2208278, e-mail: tpopova@bio.vsu.ru

Кашикар Владимир Михайлович — доцент кафедры физики твердого тела и наноструктур, Воронежский государственный университет; Тел.: (473) 2208363, e-mail: kashkarov@phys.vsu.ru

Ципенюк Владимир Николаевич — магистрант кафедры физики твердого тела и наноструктур, Воронежский государственный университет; Тел.: (473) 2208363, e-mail: ftt@phys.vsu.ru

Iskusnykh Igor Y. — PhD student of the chair of the Medical Biochemistry and Microbiology, Voronezh State University; tel.: (473) 2208278, e-mail: iskusnykh.i@gmail.com

Popov Anton L. — Phd student of Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Voronezh State University, tel.: (4967) 73-25-80, e-mail: office@iteb.ru

Popova Tatyana N. — Head of the chair of the Medical Biochemistry and Microbiology, Voronezh State University, Tel.: (473) 2208278, e-mail: tpopova@bio.vsu.ru

Kashkarov Vladimir M. — docent of the chair of the Physics of a solid body and nanostructures, Voronezh State University, tel.: (473) 2208363, e-mail: kashkarov@phys.vsu.ru

Tsipenyuk Vladimir N. — master of the chair of the Physics of a solid body and nanostructures, Voronezh State University, tel.: (473) 2208363, e-mail: ftt@phys.vsu.ru