

**ВЛИЯНИЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫХ ЛИПОСОМ НА
МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* И КЛЕТКИ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА****И. А. Колтаков, Е. В. Шилова*, В. Г. Артюхов**

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 29.12.2021 г.

Аннотация. Вопросы создания наносистем для адресной доставки лекарственных средств являются на сегодняшний день одним из приоритетных направлений фармацевтики. Среди таких систем липосомы занимают особое место, позволяя инкапсулировать лекарственный препарат, предотвращая возможный негативный эффект на здоровые ткани. Обязательным условием при разработке липосомальных форм терапевтических веществ является оценка их возможного токсического действия. В работе были получены липосомальные частицы состава фосфатидилхолин – холестерин – дистероилфосфоэтанолламин – полиэтиленгликоль (2000) – Fe_3O_4 – цетилтриметиламмония бромид – антитела к гистону H3. Облучение проводили на ультразвуком дезинтеграторе Qsonica Sonicators (США) в течение 15 мин (20 кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3 с). Изучены токсические свойства синтезированных «пустых» липосом и липосом, содержащих 0.03% азид натрия в отношении микроводоросли *Chlorella vulgaris* и клеток крови человека. Установлено, что «пустые» липосомальные наночастицы в соотношениях клеток/липосом = 1/1 - 1/1000 не оказывают токсического воздействия на выбранные объекты. Для оценки токсичности в отношении микроводоросли определяли индекс токсичности. Критерием токсичности наночастиц является снижение на 20 % и более величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов в дисперсной системе наночастиц (ДС НЧ), по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде. При соотношении клетка/липосома = 1/1000 наблюдается снижение индекса токсичности в отношении микроводоросли *Chlorella vulgaris*, сопровождающееся ростом количества клеток изучаемой микроводоросли. Токсичность в отношении эритроцитов оценивали по выходу лактатдегидрогеназы. Для липосом, содержащих 0.03% азид натрия, выявлено токсическое действие на эритроциты крови человека при соотношении клетка/липосома = 1/100-1/1000. Жизнеспособность лимфоцитов оценивали методом проточной цитофлуориметрии, во всех исследуемых диапазонах концентраций жизнеспособность лимфоцитов составила более 98%. Полученные результаты могут быть учтены при разработке липосомальных форм лекарственных препаратов и прогнозировании их возможного цитотоксического действия.

Ключевые слова: липосомы, токсичность, *Chlorella vulgaris*, эритроциты, лимфоциты

Применение традиционных форм лекарственных препаратов имеет ряд недостатков, которые связаны, в первую очередь, с их неравномерным распределением в организме. При таком подходе доза препарата, достигающая клеток-мишеней, значительно меньше терапевтической, что вынуждает вводить большие дозы препарата. [1-7] Данных проблем можно избежать с помощью инкапсулированных форм лекарственных препаратов. Создание липосомальных наночастиц является перспективным способом инкапсулиро-

вания лекарственных веществ. Применяемые в терапевтической практике липосомы должны соответствовать ряду требований: размерные характеристики (в диапазоне 110-180 нм), достаточная степень включения лекарственного препарата, достаточное время циркулирования в крови. [8-14] Обязательным этапом при разработке липосомальных форм препаратов является оценка их токсических свойств.

Целью данного исследования явилось изучение токсичности синтезированных липосом в отношении микроводоросли *Chlorella vulgaris*, лимфоцитов и эритроцитов крови человека.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение иммуномагнитолипосом. Липосомы синтезировали методом гидратации/регидратации. Раствор фосфатидилхолина (0.5%) (Sigma, США), холестерина (0.5%) (Sigma, США) и дистероилфосфоэтаноламин–полиэтиленгликоля (2000) (0.1%) (Avanti Polar lipids, США) в этиловом спирте испаряли в роторном испарителе RV10 control (ИКА, Германия) при температуре водяной бани 60°C. К полученной липидной пленке добавляли 0.1 М натрий-фосфатный буфер с наночастицами магнетита, покрытого ЦТАБ (1 мг/мл), и перемешивали в течение одной минуты. При получении липосом, содержащих азид натрия (Sigma, США), последний в концентрации 0.03% также вносили в натрий-фосфатный буфер. Антитела к гистону H3 (Cloud-Clone corp., США) инкубировали с реагентом Траута (Sigma, США) 1 ч. Тиолированное антитело добавляли к синтезированным липосомам и инкубировали в течение 12 ч при $t = 4^\circ\text{C}$. [15]

Следующим этапом стала диспергенция получаемых липосом, для чего растворы были подвержены воздействию ультразвука. Облучение проводили на ультразвуком дезинтеграторе Qsonica Sonicators (США) в течение 15 мин (20 кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3 с).

Дизайн токсикологических экспериментов с микроводорослями. Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной в водной среде, не содержащей искусственных наночастиц (контроль) и в водных дисперсных системах, содержащих тестируемые наночастицы (опыт). Критерием токсичности наночастиц является снижение на 20 % и более величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов в дисперсной системе наночастиц (ДС НЧ), по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде. Количественная характеристика токсичности при этом определяется общепринятым показателем: индексом токсичности (I) – относительной (в %) величиной прироста оптической плотности для ДС по сравнению с контролем:

$$I = (\Delta D_k - \Delta D_{дс}) / \Delta D_k \times 100 \%, \quad (1)$$

где ΔD_k и $\Delta D_{дс}$ – средние значения прироста оптической плотности в контроле и в дисперсной системе соответственно. [16]

Определение токсических свойств наночастиц на эритроцитах крови человека. В качестве

объекта исследования использовали суспензии эритроцитов, полученные из крови доноров в день взятия пробы. Операцию отмывки эритроцитов физиологическим раствором проводили трижды методом центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут. Полученную суспензию эритроцитарных клеток доводили до величины оптической плотности (D412) равной 0.8, а затем использовали в экспериментах. Суспензии эритроцитарных клеток предварительно инкубировали в течение 1 ч с «пустыми» липосомами и липосомами, содержащими 0.03% азид натрия, в соотношениях эритроциты / липосомы: 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000. Затем эритроциты осаждали центрифугированием при 3 000 об/мин на центрифуге MPV-340. О разрушении эритроцитов судили по выходу лактатдегидрогеназы (ЛДГ), определяя её активность в надосадочной жидкости. [17].

В кварцевую кювету для спектрофотометра помещали 2.8 мл надосадочной жидкости и 0.1 мл NADH до конечной концентрации $5.4 \cdot 10^{-5}$ моль/л. На спектрофотометре ShimadzuUV-2401 при длине волны 340 нм измеряли оптическую плотность D1. Затем в кювету приливали 0,1 мл пирувата натрия до конечной его концентрации в смеси $1.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л и через 30 секунд регистрировали оптическую плотность D2. Каталитическую активность ЛДГ оценивали по формуле (A):

$$A = (D1 - D2) \cdot V_{пр} / (\varepsilon \cdot l \cdot t), \quad (2)$$

где ε – коэффициент молярного поглощения соединения (NADH), равный $6.22 \cdot 10^3$ моль⁻¹ см⁻¹, l – длина оптического пути, t – время инкубации (30 с), $V_{пр}$ – конечный объём реакционной смеси (3 мл).

Определение токсических свойств наночастиц на лимфоцитах крови человека. Лимфоциты крови человека выделяли центрифугированием на градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1.077$ г/см³). К лимфоцитам добавляли наночастицы в тех же соотношениях, что и в эксперименте с эритроцитами.

Определение жизнеспособности полученной клеточной фракции осуществляли на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8 HT (MerkMillipore Group, USA) согласно протоколу коммерческого набора GUAVA VIA COUNT. В работе использовали образцы клеток с жизнеспособностью не менее 98%. [18]

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2010. Достоверность различий контрольных и опытных величин устанавливали

с использованием t-критерия Стьюдента. В процедурах статистического анализа рассчитывали достигнутый уровень значимости (p), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимали равным 0.05. Полученные данные были представлены в виде среднего арифметического и его стандартного отклонения ($M \pm Sd$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Токсическое действие липосом оценивали, добавляя синтезированные наночастицы в соотношениях клеток хлореллы/липосом от 1/1 до 1/1000. Исследовали влияние на биосистемы «пустых» липосом и липосом, содержащих в своем составе азид натрия в концентрации 0.03%. Данное вещество использовали в качестве модельной системы, позволяющей оценить стабильность липосом и выход лекарственного препарата из них. Исследование индекса токсичности полученных липосом по отношению к водорослям показало, что при соотношении клетка/липосома от 1/1 до 1/100 статистически значимых различий в индексе токсичности не наблюдается (табл. 1). При увеличении числа липосом до соотношения клетка/липосома = 1/1000 наблюдается снижение индекса токсичности.

Подсчет концентрации клеток показал, что после инкубации в течение 22 ч в соотношении клетка/липосома = 1/1000 происходит статистически значимое увеличение количества клеток (рис. 1).

Стимуляция роста клеток микроводоросли хлорелла, по-видимому, связана с эффектами оксидов железа, входящих в состав полученных

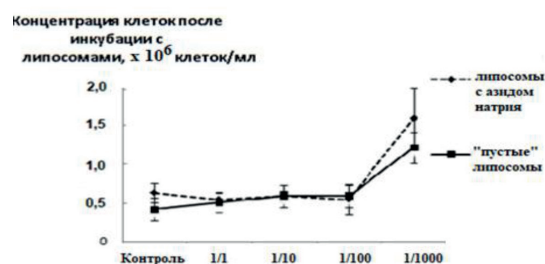


Рис. 1. Количество клеток *Chlorella vulgaris* после инкубации с липосомами

липосом. Железо необходимо для образования хлорофилла. При этом железо катализирует образование предшественников хлорофилла: 5-аминолевулиновой кислоты и протопорфиринов. При недостатке железа нет условий для образования таких важнейших компонентов хлоропластов, как цитохромы, ферредоксин и некоторые другие. Кроме того, целый ряд ферментов содержит железо в негемовой форме. В хлоропластах железо в негемовой форме входит в состав реакционных центров фотосистем I и II [19, 20].

В качестве модельных объектов, позволяющих судить о влиянии синтезированных липосом на компоненты крови человека при их введении, были выбраны эритроциты и лимфоциты человека.

В ходе исследований было установлено, что при инкубации клеток с «пустыми» липосомами в соотношениях клетка/липосома = 1/1-1/1000 не наблюдается повышения содержания ЛДГ в надосадочной жидкости по сравнению с контролем. (рис.2, а)

При инкубации эритроцитов с липосомами, содержащими азид натрия, повышение выхода

Таблица 1

Индекс токсичности влияния синтезированных липосом на микроводоросли *Chlorella vulgaris*

| Клеток/липосом | 1 / 1 | 1 / 10 | 1 / 100 | 1 / 1000 |
|--------------------------|--------------|--------------|-------------|---------------|
| «Пустые» липосомы | -2.16 ± 3.06 | 0.51 ± 0.11 | 2.61 ± 0.99 | -21.03 ± 7.11 |
| Липосомы с азидом натрия | 3.83 ± 3.28 | -3.81 ± 1.04 | 0.78 ± 3.25 | -22.14 ± 1.32 |

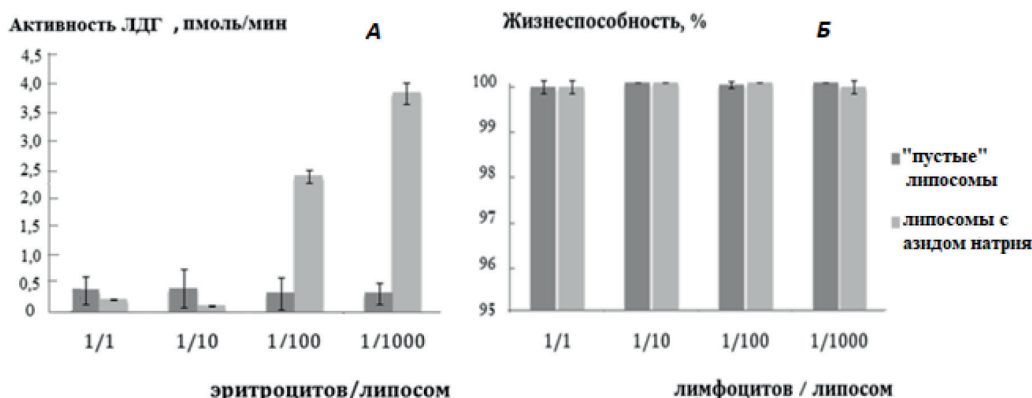


Рис. 2. Оценка токсических свойств синтезированных липосом. Обозначения: а) выход ЛДГ из эритроцитов крови человека при их инкубации с липосомами; б) жизнеспособность лимфоцитов крови человека при их инкубации с липосомами

ЛДГ наблюдалось в соотношении клетка/липосома = 1/100-1/1000.

Исследования на лимфоцитах крови человека проводились в тех же соотношениях клетки/липосомы, что и в экспериментах с эритроцитами. Жизнеспособность лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии. Было показано, что липосомы не оказывают токсического влияния на лимфоциты крови человека. (Рис.2, б)

Было установлено, что количество жизнеспособных клеток во всех образцах составляет более 98%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены новые сведения о токсических эффектах магнитоиммунолипосом в отношении различных биологических объектов. Описанные результаты могут быть использованы при создании липосомальных форм лекарственных препаратов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания вузам в сфере научной деятельности на 2020–2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азаренков Н.А., Веревкин А.А., Ковтун Г.П. Основы нанотехнологий и наноматериалов. Харьков, Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, 2009. 69 с.
2. Барышников А. Ю. // Вестник РАМН. 2012. №3. С. 23–31.
3. Краснопольский Ю.М., Швец В.И. // Нанотехнология и охрана здоровья. 2013. №2. С. 125–135.
4. Мельникова Е. В., Горячев Д. В., Чапленко А. А., Водякова М. А., Сайфутдинова А. Р., Меркулов В. А. // Вестник РГМУ. 2018. №6. С. 35–42.
5. Наквасина М.А., Артюхов В.Г. Бионанотехнологии: достижения, проблемы, перспективы развития. Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2015, 151 с.
6. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. Москва. Изд-во ЛКИ, 2011, 280 с.
7. Машков Ю.К., Малий О.В. Материалы и методы нанотехнологии. Омск. Изд-во ОмГТУ, 2014, 136с
8. Asmatulu R., Zalich M.A., Claus R.O. // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2005. V.292. P.108-119.
9. Ho A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. // J.Biosci.Bioeng. 2005. V.100. P.1-11.
10. Lu A.H., Salabas E.L., Schuth F. // Angew. Chem. Int. Ed. 2007.– Vol. 46. P. 1222-1244.
11. Кулакова И.И., Лисичкин Г.В., Яковлев Р.Ю., Селезнев Н.Г. Направленный транспорт лекарственных средств: от идеи до внедрения. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Рязань, ОТС и ОП, 2018, 104 с.
12. Никифоров В.Н. // Известия академии Инженерных Наук им. А.М. Прохорова. 2013. № 1. С. 23-34.
13. Шилова Е.В., Артюхов В.Г., Скорбач Е.Д., Тололина М.В., Близнецова Г.Н., Колтаков И.А. // Нанотехнологии: разработка, применение. XXI век. 2018. №4. С. 9-14.
14. Шилова Е.В., Скорбач Е.Д., Артюхов В.Г., Колтаков И.А. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. №4. С. 137-141.
15. Allen T.M., Mumbengegwi D.R., Charrois G.J.R. // Journal Clinical cancer research. 2005. V.11, T. 9. P. 3567-3573.
16. Методика определения индекса токсичности нанопорошков, изделий из наноматериалов, нанопокровов, отходов и осадков сточных вод, содержащих наночастицы, по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) (ФР.1.39.2010.09103), 2010 г.
17. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2000, 296 с.
18. Колтаков И. А., Артюхов В.Г., Лавриненко И.А. Проточная цитофлуориметрия в современных биофизических исследованиях. Воронеж. гос. ун-т . Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2018, 104 с.
19. Иванищев В.В. // Изв. Тульского государственного университета. Естественные науки. 2019. № 3. С. 149.
20. Venkatesan S., Murugesan S., Senthur-Pandian V.K. // Food Chem. 2005. V. 90. P. 535.

Колтаков И. А., Шилова Е. В., Артюхов В. Г.

Воронежский государственный университет
Колтаков И. А., к.б.н., доцент кафедры био-
физики и биотехнологии
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Шилова Е.В., ассистент кафедры биофизики
и биотехнологии
E-mail: zinkovae@list.ru

Артюхов В.Г., д.б.н., профессор, заведующий
кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Voronezh State University
Koltakov I. A., PhD., Associate Professor of
Biophysics and biotechnology department
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Shilova E.V., Assistant of Biophysics and
biotechnology department
E-mail: zinkovae@list.ru

Artyukhov V.G., PhD., DSci., Head of Biophysics
and biotechnology department
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

EFFECT OF MAGNETICALLY CONTROLLED LIPOSOMES ON MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS* AND HUMAN BLOOD CELLS

I. A. Koltakov, E. V. Shilova*, V. G. Artyukhov

Abstract. The issues of creating nanosystems for targeted drug delivery are currently one of the priority areas of pharmaceuticals. Among such systems, liposomes occupy a special place, allowing the drug to be encapsulated, preventing a possible negative effect on healthy tissues. A prerequisite for the development of liposomal forms of therapeutic substances is the assessment of their possible toxic effects. In this work, liposomal particles of the composition phosphatidylcholine - cholesterol - disteoylphosphoethanolamine - polyethylene glycol (2000) - Fe_3O_4 - cetyltrimethylammonium bromide - antibodies to H3 histone were obtained. Irradiation was carried out on an ultrasonic disintegrator Qsonica Sonicators (USA) for 15 min (20 kHz, 10 second pulse with a 3 s interval). The toxic properties of synthesized "empty" liposomes and liposomes containing 0.03% sodium azide against the microalgae *Chlorella vulgaris* and human blood cells were studied. It has been established that "empty" liposomal nanoparticles in the ratio of cells/liposomes = 1/1 - 1/1000 do not have a toxic effect on the selected objects. To assess toxicity against microalgae, a toxicity index was determined. The criterion for the toxicity of nanoparticles is a decrease by 20% or more in the optical density of an alga culture grown for 22 hours in a dispersed system of nanoparticles (DS NPs) compared to its growth in a control medium prepared with distilled water. At a ratio of cell/liposome = 1/1000, a decrease in the toxicity index against the microalgae *Chlorella vulgaris* is observed, accompanied by an increase in the number of cells of the studied microalgae. Toxicity to erythrocytes was assessed by the release of lactate dehydrogenase. For liposomes containing 0.03% sodium azide, a toxic effect on human erythrocytes was revealed at a ratio of cell/liposome = 1/100-1/1000. The viability of lymphocytes was assessed by flow cytometry; in all the studied concentration ranges, the viability of lymphocytes was more than 98%. The results obtained can be taken into account when developing liposomal forms of drugs and predicting their possible cytotoxic effect.

Keywords: liposomes, toxicity, *Chlorella vulgaris*, erythrocytes, lymphocytes

REFERENCES

1. Azarenkov N.A., Verevkin A.A., Kovtun G.P., *Osnovy nanotekhnologii i nanomaterialov*, Har'kov, Har'kovskij nacional'nyj universitet imeni V. N. Karazina, 2009, 69 p.
2. Baryshnikov A. Yu., *Vestnik RAMN*, 2012, №3, pp. 23–31.
3. Krasnopol'skij Yu.M., Shvec V.I., *Nanotekhnologiya i ohrana zdorov'ya*, 2013, №2, pp. 125–135.
4. Mel'nikova E. V., Goryachev D. V., Chaplenko A. A., Vodyakova M. A., Sajfutdinova A. R., Merkulov V. A., *Vestnik RGMU*, 2018, №6, pp. 35–42.
5. Nakvasina M.A., Artyukhov V.G., *Bionanotekhnologii: dostizheniya, problemy, perspektivy razvitiya*. Voronezh, Izdatel'skij dom VGU, 2015, 151 p.
6. Tarahovskij Yu.S. *Intellektual'nye lipidnye nanokontejnery v adresnoj dostavke lekarstvennyh veshchestv*, Moskva, Izd-vo LKI, 2011, 280 s.

7. Mashkov Yu.K., Malij O.V., *Materialy i metody nanotekhnologii*, Omsk, Izd-vo OmGTU, 2014, 136 p.
8. Asmatulu R., Zalich M.A., Claus R.O., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, V.292, pp. 108-119.
9. Ho A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T., *J.Biosci.Bioeng*, 2005, V.100, pp. 1-11.
10. Lu A.H., Salabas E.L., Schuth F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, Vol. 46, pp. 1222—1244.
11. Kulakova I.I., Lisichkin G.V., Yakovlev R.Yu., Selezenev N.G., *Napravlennyj transport lekarstvennyh sredstv: ot idei do vnedreniya*. FGBOU VO RyazGMU Minzdrava Rossii, Ryazan', OTS i OP, 2018, 104 p.
12. Nikiforov V.N., *Izvestiya akademii Inzheneryh Nauk im. A.M. Prohorova*, 2013, № 1, pp. 23–34.
13. Shilova E.V., Artyuhov V.G., Skorbach E.D., Tololina M.V., Bliznecova G.N., Koltakov I.A., *Nanotekhnologii: razrabotka, primenenie. XXI vek*, 2018, №4, pp. 9 -14.
14. Shilova E.V., Skorbach E.D., Artyuhov V.G., Koltakov I.A., *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya*, 2018, №4, pp. 137 – 141.
15. Allen T.M., Mumbengegwi D.R., Charrois G.J.R., *Journal Clinical cancer research*, 2005, V.11, T. 9, pp. 3567-3573.
16. *Metodika opredeleniya indeksa toksichnosti nanoporoshkov, izdelij iz nanomaterialov, nanopokrytij, othodov i osadkov stochnyh vod, soderzhashchih nanochasticy, po izmeneniyu opticheskoy plotnosti kul'tury vodorosli hlorella (Chlorella vulgaris Beijer) (FR.1.39.2010.09103)*, 2010 g.
17. Artyuhov V.G., Nakvasina M.A., *Biologicheskie membrany: strukturnaya organizaciya, funkcii, modifikaciya fiziko-himicheskimi agentami*. Voronezh : Izdatel'skij dom VGU, 2000, 296 p.
18. Koltakov I. A., Artyuhov V.G., Lavrinenko I.A. *Protochnaya citofluorimetriya v sovremennyh biofizicheskikh issledovaniyah.*, Voronezh. gos. un-t . Voronezh : Izdatel'skij dom VGU, 2018, 104 p.
19. Ivanishchev V.V., *Izv. Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki*, 2019, № 3, P. 149.
20. Venkatesan S., Murugesan S., Senthur-Pandian V.K., *Food Chem.*, 2005, V. 90, P. 535.