

УДК 622.232; 546.3

Цитотоксические и иммуномодулирующие свойства наночастиц золота

М. В. ХАРЬКОВА¹, А. В. ЧЕРЕПАНОВА¹, Е. С. МОРОЗКИН¹, И. А. ЗАПОРОЖЧЕНКО¹, П. П. ЛАКТИОНОВ¹, А. А. СТРУНОВ², Е. В. КИСЕЛЕВА², Т. Г. ТОЛСТИКОВА⁴, Н. В. ШИКИНА³, З. Р. ИСМАГИЛОВ³, В. В. ВЛАСОВ¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: kharkova@niboch.nsc.ru

²Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск 630090 (Россия)

³Институт катализа им. Г. К. Борескова Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 5, Новосибирск 630090 (Россия)

⁴Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)

(Поступила 26.07.12)

Аннотация

Представлены результаты исследования цитотоксических и иммуномодулирующих свойств золотых наночастиц разного диаметра (12, 16, 22 и 35 нм) на первичных и трансформированных клетках *in vitro*. Исследованы их локализация и распределение в клетке. Установлено, что наночастицы золота нетоксичны в диапазоне концентраций 0.06–6 мкг/мл для всех использованных клеточных культур, активно проникают в клетку и накапливаются внутри вакуолей различных размеров, селективно активируют провоспалительный иммунный ответ в зависимости от размера наночастиц и типа клеток.

Ключевые слова: золотые наночастицы, токсичность, иммуномодулирующие свойства, первичные и трансформированные клеточные культуры

ВВЕДЕНИЕ

Возможность использования химически стабильных, биосовместимых золотых наночастиц в биологических системах интенсивно исследуется в настоящее время. Наночастицы золота предлагается использовать как в виде однокомпонентных препаратов, так и в многокомпонентных системах, в качестве инертных носителей для различного рода биомолекул (ДНК, пептидов, антител, тканеспецифичных маркеров). Благодаря явлению поверхностного плазмонного резонанса (ППР), золотые частицы представляют большой интерес для фотодинамической терапии, а частицы со связанными на поверхности лиган-

дами – для диагностики [1], в качестве транспортных систем доставки терапевтических и косметических препаратов [2, 3], индукторов иммунного ответа [4] и т. д. Необходимым этапом на пути использования наноматериалов в медицинской практике является предварительное исследование их безопасности/токсичности и инертности/провоспалительного действия на биологических системах *in vivo* и *in vitro*. Первичные и трансформированные клеточные культуры служат удобной моделью для оценки эффектов, вызываемых наноматериалами в нормальных и раковых клетках *in vitro*.

В настоящей работе исследованы цитотоксические и иммуномодулирующие свойства

золотых наночастиц разного диаметра на нормальные и трансформированные клетки человека, а также их локализация и распределение в клетке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез наночастиц золота

Золотые частицы получены методом Френса [5], т. е. цитратным восстановлением золотохлороводородной кислоты (ЗХВК). К кипящему 0.01 % водному раствору ЗХВК добавляли 1 % водный раствор цитрата натрия (Cit), используя молярные соотношения Cit/Au, равные 4/1, 3/1, 2.3/1, 1.5/1, для получения частиц со средним диаметром 12 (Au-1), 16 (Au-2), 22 (Au-3) и 35 нм (Au-4) соответственно.

Методы исследования наночастиц золота

Концентрацию золота в растворах определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на ICP-спектрометре OPTIMA 4300DV фирмы Perkin-Elmer.

Дисперсные характеристики золота исследовали методами трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), атомно-силовой микроскопии (АСМ) и UV-vis спектроскопии. ТЭМ-исследования препаратов, нанесенных на сеточки с форваровой подложкой, стабилизированной углеродом, проводили с помощью электронного микроскопа JEOL JEM 1400 (Япония). Для АСМ каплю препарата объемом 20 мкл наносили на свежий скол слюды площадью 25–30 мм², адсорбировали в течение 1 ч при комнатной температуре и исследовали в атомно-силовом микроскопе SolverP47Bio производства НТ-МДТ (Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме. Электронные спектры пропускания растворов снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-2501PC. Спектры записаны с компенсацией поглощения относительно воды в диапазоне 11 000–54 000 см⁻¹ в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Клеточные культуры

Клетки HeLa и Mscf-7 получены из Американской коллекции клеток тканей (American

Tissue Cell Collection, ATCC, США). Первичные эндотелиальные клетки и фибробласты получали из пупочной вены и ткани десны человека по ранее описанным протоколам [6, 7]. Все клетки культивировали в среде IMDM (Gibco, США, 42200-014) в присутствии 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Gibco, США, 10106) в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Для диссоциации первичных фибробластов, клеток HeLa и Mscf-7 использовали раствор 0.05 % трипсина в фосфатно-солевом буфере PBS (Sigma, США, Т-4799). Для диссоциации первичных эндотелиоцитов использовали 0.1 % раствор коллагеназы (Invitrogen, США, 17104-019). Первичные эндотелиоциты культивировали на чашках, предварительно покрытых 0.5 % раствором желатина (Sigma, США, G-2500).

Все компоненты, контактирующие с клетками, проверены на наличие примесей бактериального эндотоксина с помощью ЛАЛ-теста (Associate of Cape Cod Incorporated, США).

Исследование цитотоксического действия наноконструктов

Первичные фибробласты и эндотелиоциты рассаживали в плотности 7000, а HeLa и Mscf-7 – 15 000 клеток на одну лунку 48-ячеечного планшета. Клетки культивировали в течение 16 ч, затем однократно отмывали IMDM, добавляли 200 мкл (для 48-ячеечного планшета) коллоида (в концентрации 6, 0.6 и 0.06 мкг/мл) в среде IMDM с 10 % ЭТС, инкубировали в течение 24 ч и оценивали количество жизнеспособных клеток с помощью коммерческого набора EZ4U (Biomedica, Германия).

Исследование локализации и распределения наночастиц золота в клетке методом ТЭМ

Клетки выращивали на пластиковых подложках (Agar Scientific, Великобритания) в 24-луночном планшете, дважды отмывали культуральной средой и инкубировали с золотыми наночастицами (6 мкг/мл) в течение 24 ч. После инкубации с коллоидом клетки дважды отмывали культуральной средой, фиксировали в течение 1 ч в 2.5 % растворе глутаральдегида в PBS и затем в течение 1 ч

– в 1 % OsO_4 в PBS. Далее образцы отмывали буфером от фиксатора и обезвоживали в спиртах и ацетоне, заключали в эпон-812 и полимеризовали в термостате. С полученных блоков получали ультратонкие срезы клеток (50–80 нм) по ранее описанному протоколу [8]. Срезы клеток исследовали с помощью электронного микроскопа (JEOL 100SX, Япония).

Исследование клетками секреции интерлейкинов ИЛ-6 и ИЛ-8

Для исследования иммуностимулирующих свойств наноконструктов фибробласты и эндотелиоциты рассаживали в плотности 7000 клеток на одну лунку 48-ячеечного планшета; клетки культивировали в течение 16 ч, далее однократно отмывали с использованием IMDM. Затем клетки инкубировали в культуральной среде IMDM с 10 % ЭТС с золотыми коллоидами (в концентрациях 6, 1.2 и 0.24 мкг/мл) в течение 24 ч. Культуральную среду отбирали, центрифугировали в течение 10 мин при 1500g и хранили при -20°C . В качестве позитивного контроля клетки инкубировали в присутствии аналога двуцепочечной РНК полиинозиновой/полицитидиловой кислоты (pIC) (Sigma, США, P9582) в концентрации 0.1 мг/мл в тех же условиях. Для определения базового уровня секреции цитокинов клетки инкубировали в культуральной среде IMDM с 10 % ЭТС. Перед определением концентрации цитокинов образцы размораживали при комнатной температуре и центрифугировали в течение 5 мин при 3000g. Концентрацию интерлейкинов 6 и 8 (ИЛ-6 и ИЛ-8) в супернатантах определяли с помощью коммерческих наборов ИЛ-6-ИФА-БЕСТ и ИЛ-8-ИФА-БЕСТ (“Вектор-Бест”, Россия) по методике, рекомендованной фирмой-производителем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика использованных золотых коллоидов

Ранее показано [9, 10], что самые мелкие золотые наночастицы (2–7 нм) обладают значительно выраженным цитотоксическим и иммуностимулирующим действием, тогда

ТАБЛИЦА 1

Характеристики исследованных золотых наночастиц (концентрация золотых наночастиц 60 мкг/мл)

Частицы	Количество наночастиц, 10^{12} нч/мл	Размер, нм
Au-1	3.40	12 ± 1.8
Au-2	1.40	16 ± 2.3
Au-3	0.56	22 ± 3.2
Au-4	0.14	35 ± 6.0

как более крупные частицы (от 10–15 нм) нетоксичны для клеток. Размер наночастиц может определять их биологические эффекты, по-видимому, благодаря различной эффективности транспорта и особенности взаимодействия с клеточными биополимерами. В настоящей работе мы исследовали коллоидные растворы, содержащие наночастицы золота размером от 12 до 40 нм, которые были получены методом Френса. Этот метод наиболее часто используется для получения коллоидов с целью их последующего медико-биологического исследования и позволяет получать золотые частицы в диапазоне размеров от 8 до 70 нм. Характеристики полученных золотых коллоидов представлены в табл. 1.

Размер наночастиц исследован методами UV-vis-спектроскопии, ТЭМ и АСМ. В UV-vis-спектрах (рис. 1) препаратов золотых наночастиц наблюдаются полосы поглощения в области 518 нм для препарата Au-1, 519 нм – для Au-2, 524 нм – для Au-3 и 528 нм – для Au-4. Авторы [11] приводят калибровочную кривую для определения раз-

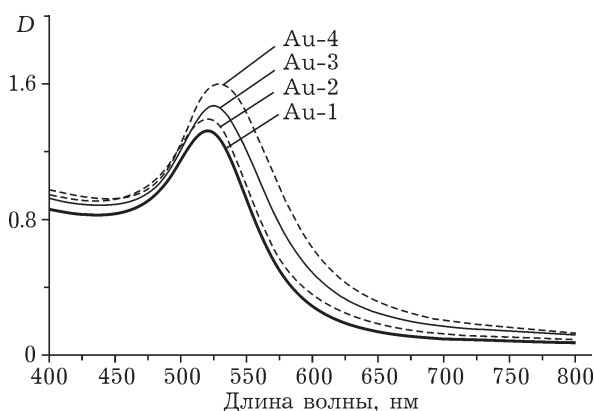


Рис. 1. UV-vis-спектры препаратов коллоидного золота Au-1–Au-4.

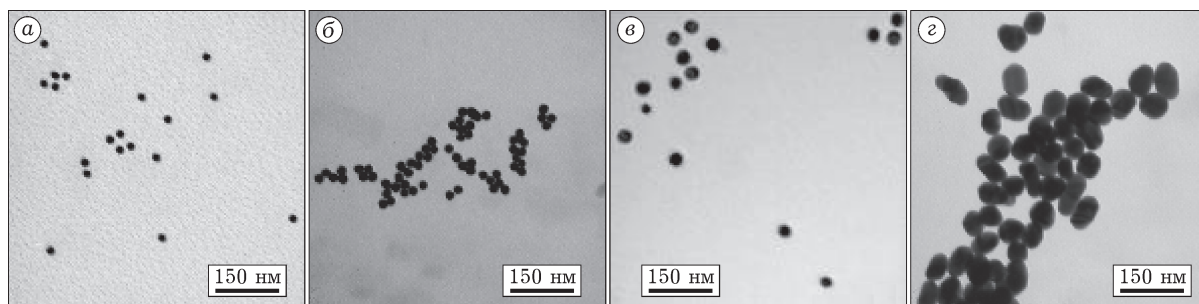


Рис. 2. ТЭМ-снимки препаратов коллоидного золота Au-1 (а), Au-2 (б), Au-3 (в), Au-4 (г).

мера наночастиц золота по длине волны λ_{\max} , основанную на наилучшей сглаженной полиномиальной аппроксимации спектрофотометрических и электронно-микроскопических данных, размер частиц в приготовленных препаратах Au-1, Au-2, Au-3 и Au-4 составляет 12, 15, 25 и 35 нм соответственно.

На рис. 2 приведены ТЭМ-снимки приготовленных экспериментальных образцов, согласно которым препараты содержат наночастицы преимущественно сферической формы с узким интервалом значений их размеров: (12 ± 1.8) нм для Au-1, (16 ± 2.3) нм для Au-2, (22 ± 3.2) нм для Au-3 и (35 ± 6) нм для Au-4. Данные АСМ-исследований для образцов Au-1 и Au-4 (рис. 3) подтверждают выводы о хорошей дисперсной однородности препаратов и коррелируют с результатами ТЭМ и UV-vis-спектроскопии по размеру частиц.

Интегрируя данные разных методов анализа, можно утверждать, что коллоиды содержат частицы диаметром (12 ± 1.8) , (16 ± 2.3) , (22 ± 3.2) и (35 ± 6) нм.

Непосредственно перед экспериментами *in vitro* препараты коллоидного золота очищались диализом против апиrogenной воды

при температуре 4°C в течение 24 ч. После диализа наблюдалось потемнение исходной пурпурной окраски коллоидов. Известно, что в исходных коллоидных растворах золота, полученных по методу цитратного восстановления, поверхность золотых частиц Au(I) легирована с цитрат-ионами в коионном слое [12]. Диализ препаратов приводит к выведению излишка цитрата и частичной потере заряда на поверхности частиц золота, что, в свою очередь, способствует процессу агрегации. Наблюдаемое потемнение окраски золя обусловлено началом агрегирования наночастиц. Об этом свидетельствует наблюдаемый нами сдвиг полос поглощения в область более длинных волн в UV-vis-спектрах. В то же время методами ТЭМ и АСМ не зарегистрировано существенного изменения в дисперсности препаратов после диализа по сравнению с исходными данными.

Исследование цитотоксических свойств золотых коллоидов

Для исследования действия золотых наночастиц на нормальные клетки человека в ка-

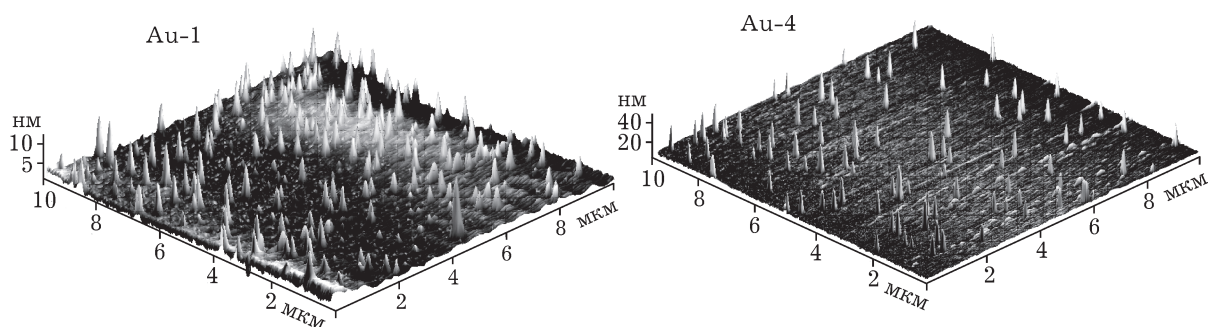


Рис. 3. АСМ-снимки (3D-изображения) препаратов коллоидного золота Au-1 и Au-4.

честве модельных систем выбраны первичные эндотелиоциты, выделенные из пупочной вены новорожденных (HUVEC), первичные фибробласты из ткани десны человека и клетки цервикальной аденокарциномы HeLa и аденокарциномы молочной железы Mscf-7. Эндотелий стенок сосудов – это основной барьер, который необходимо преодолеть препарату для проникновения из крови в подлежащие ткани для оказания терапевтического эффекта. Кроме того, эндотелиоциты – клетки, характеризующиеся высокой активностью клеточного транспорта и участвующие в формировании иммунного ответа [13]. Соединительная ткань входит в состав всех паренхиматозных органов, а формирующие ее фибробласты представляют собой один из наиболее представленных в организме типов клеток. Несмотря на наличие у фибробластов специализированных функций, определяемых локализацией соединительной ткани в организме, эти клетки схожи как морфологически, так и функционально и являются потенциальными кандидатами на взаимодействие с лекарственными препаратами [14]. В настоящее время активно развиваются подходы к диагностике и терапии рака, основанные на использовании золотых наночастиц [1], в связи с чем в качестве моделей трансформиро-

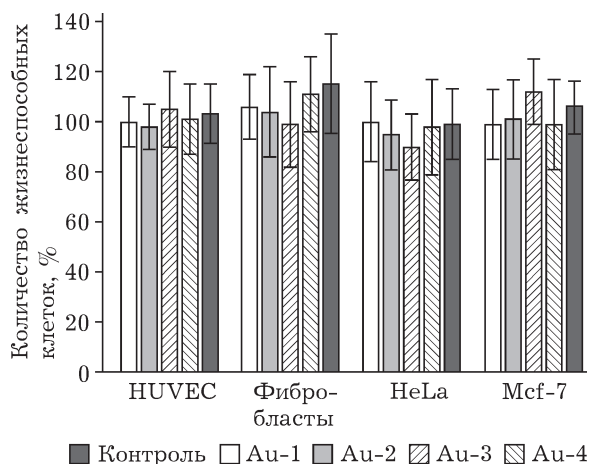


Рис. 4. Цитотоксическое действие наночастиц золота. Зависимость количества жизнеспособных клеток от концентрации наноконструкта.

ванных клеток выбраны клеточные линии аденокарциномы шейки матки и молочной железы (HeLa и Mscf-7 соответственно).

Количественный анализ цитотоксического/пролиферативного действия золотых наночастиц с помощью EZ4U-теста показал, что наночастицы золота в исследуемом диапазоне концентраций (0.06–6 мкг/мл) не токсичны для всех типов клеток, использованных в работе (рис. 4), что согласуется с литературными данными [10, 15]. В связи с отсутстви-

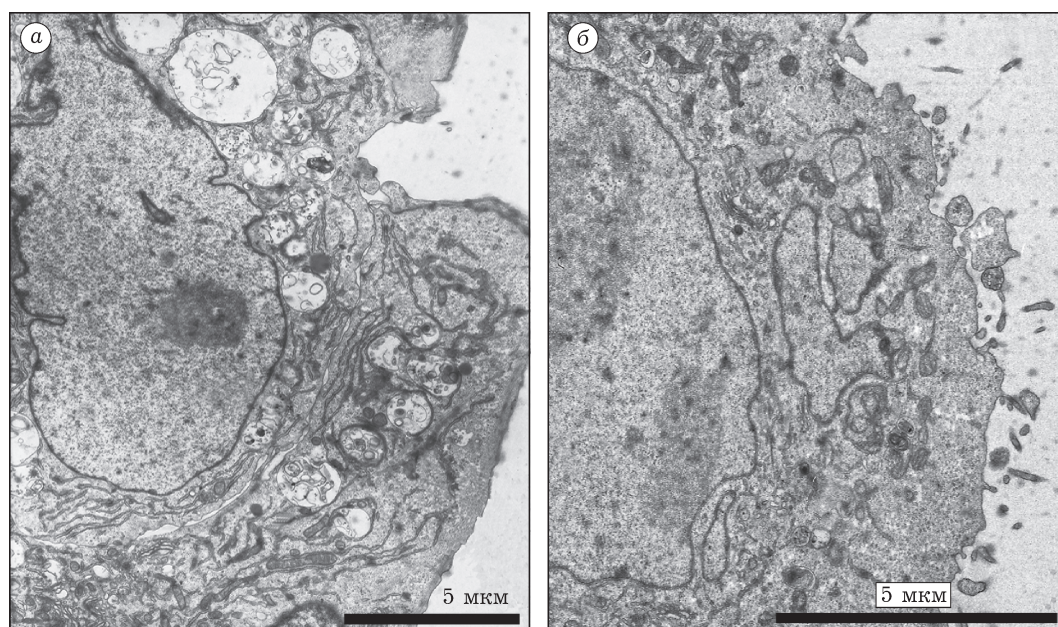


Рис. 5. Ультраструктурная организация эндотелиальных клеток линии HUVEC (а) и трансформированных клеток линии HeLa (б).

ем цитотоксического эффекта полученные данные представлены для максимальной концентрации наночастиц (6 мкг/мл) (см. рис. 4).

Исследование локализации и распределения наночастиц золота в клетке

Распределение и локализация золотых частиц в клетках исследованы на первичных (HUVES) и трансформированных (HeLa) клетках методом ТЭМ. Полученные результаты представлены на рис. 5–7. Видно (см. рис. 5), что в эндотелиальных клетках имеются длинные мембраны шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭПР), многочисленные комплексы Гольджи и крупные аутофагосомы. Цитоплазма клеток HeLa формирует многочисленные микроворсинки, содержит слабо развитый ЭПР и комплексы Гольджи, а также лизосомы и аутофагосомы небольших размеров. Таким образом, эндотелиальные клетки и клетки аденокарциномы схожи по плотности цитоплазмы, однако первые содержат более развитый ЭПР и большее количество различающихся по размеру аутофагических вакуолей по сравнению с трансформи-

рованными клетками (см. рис. 5). Это свидетельствует об активных синтетических и обменных процессах эндотелиальных клеток. Следует также отметить, что клетки HeLa формируют многочисленные микроворсинки, которые почти не наблюдаются на поверхности эндотелиальных клеток.

По данным электронно-микроскопического исследования, размер частиц золота, выявляемых в клетках, соответствует их размерам в исходных коллоидах. Видно (см. рис. 6), что в эндотелиоцитах частицы золота независимо от их размера выявляются исключительно внутри аутофагических вакуолей, содержащих остаточные фрагменты разрушенных мембранных структур. Встречаются одиночные частицы, группы из двух-шести частиц и агрегаты тесно слипшихся частиц (см. рис. 6). Наибольшее количество золотых частиц в аутофагосомах наблюдается при использовании частиц диаметром 12 нм (см. рис. 6, а), а минимальное – в случае частиц с размером 35 нм (см. рис. 6, з).

В клетках линии HeLa (см. рис. 7) наблюдается меньшее количество золотых частиц по сравнению с первичными эндотелиоцитами

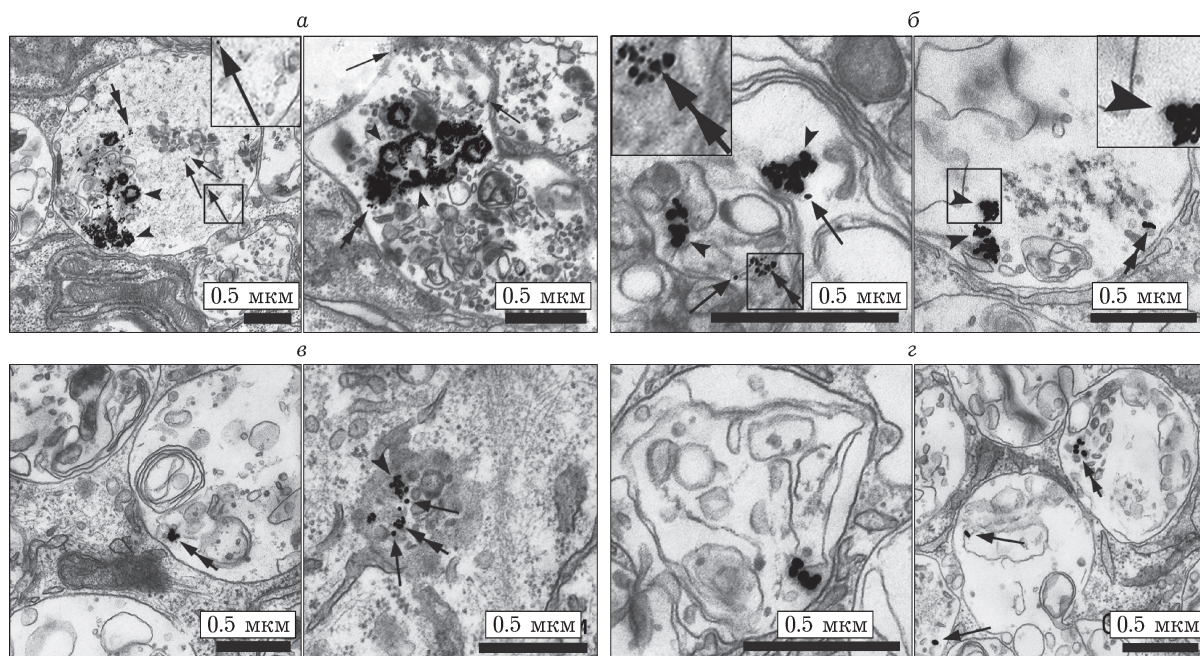


Рис. 6. Трансмиссионная электронная микроскопия ультратонких срезов клеток линии HUVES после их инкубации с золотыми наночастицами Au-1 (а), Au-2 (б), Au-3 (в), Au-4 (з). Места локализации коллоидных частиц отмечены стрелками: черные стрелки – одиночные частицы, двойные стрелки – группы из двух-шести частиц, головки стрелок – агрегаты тесно слипшихся частиц.

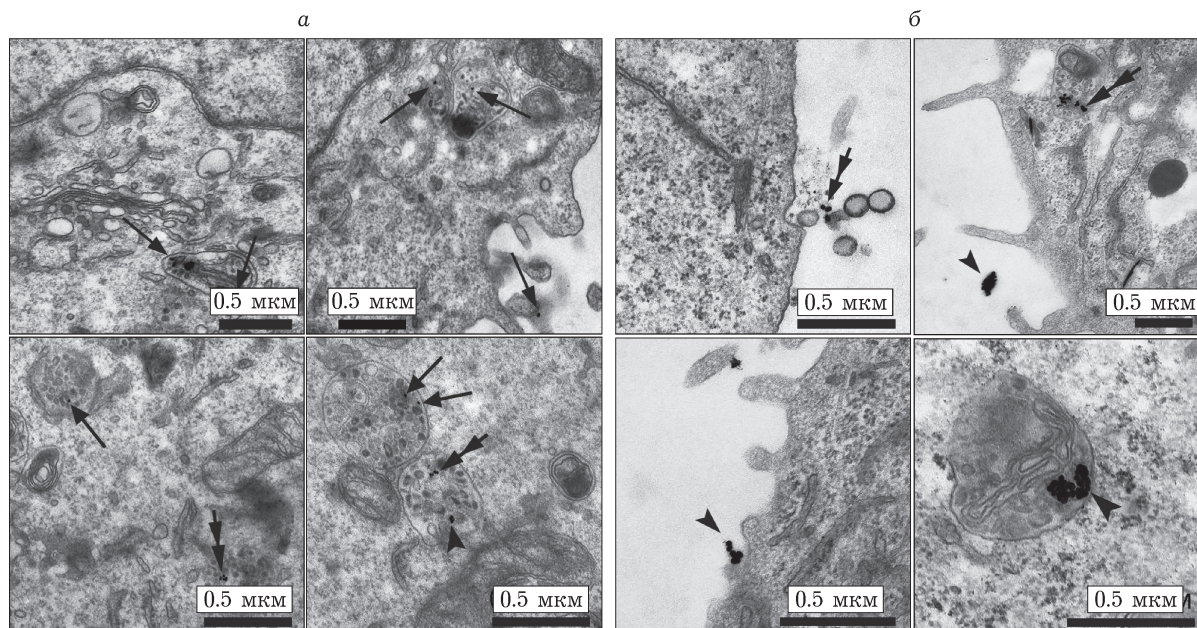


Рис. 7. Трансмиссионная электронная микроскопия ультратонких срезов клеток линии HeLa после их инкубации с золотыми наночастицами Au-1 (12 нм) (а) и Au-3 (22 нм) (б). Обозн. см. рис. 6.

(см. рис. 6). Единичные и двоянные частицы золота располагаются внутри небольших аутофагических вакуолей и мультивезикулярных телец при инкубации клеток с 12 нм Au-1 (см. рис. 7, панель а). При инкубации клеток с 22 нм Au-3 (см. рис. 7, панель б) небольшие скопления частиц наблюдаются на поверхности микроворсинок и внутри мультивезикулярных телец, а крупные скопления выявляются в составе фагосом и вблизи поверхности клеток.

Таким образом, золотые частицы во всех проведенных экспериментах не выявляются в ядре и локализуются в основном в цитоплазме клеток (см. рис. 6, 7) внутри вакуолей различных размеров, содержащих большое количество мелких гладкостенных пузырьков (мультивезикулярные тельца) или остаточные фрагменты разрушенных мембранных структур (по-видимому, аутофагосомы). Характер распределения частиц разных размеров в первичных эндотелиоцитах (HUVES) и трансформированных (HeLa) клетках схожий. Частицы наименьшего диаметра встречаются поодиночке, а также в виде небольших (две-шесть частиц) и крупных скоплений (до 50–100 частиц внутри одной вакуоли). Число частиц на клетку уменьшается с увеличением размера частиц. Частицы большого диаметра

(30–40 нм) встречаются реже, как в группах (меньше 10), так и поодиночке. Интересно, что скопления частиц в трансформированных клетках (см. рис. 7) наблюдаются в контакте с мембраной многочисленных микроворсинок, а также вне клеток. Можно предположить, что подобные частицы находятся на разных стадиях эндо- или экзоцитоза.

Полученные нами данные в целом совпадают с данными других исследований. В работе [10] установлено, что золотые частицы размером от 4 до 30 нм довольно быстро проникают в клетки и через 3 ч уже детектируются в цитозоле. Методом ТЭМ было показано, что золотые частицы локализуются в клетке в везикулярных структурах, внутри которых располагаются кластерами и не проникают в ядро [10]. Известно, что лизосомальная система реагирует на попадание чужеродных компонентов в клетку путем индукции процесса образования лизосом, адаптивного синтеза ферментов, усиления аутофагоцитоза, направленного экзоцитоза и апоптоза, организуя тем самым механизмы защиты от действия ксенобиотиков на клеточном уровне. Такую активацию мы наблюдаем при попадании частиц золота в клетки, в результате чего основной пул частиц накапли-

вается в составе аутофагосом. Везикулярная локализация золотых наночастиц в эндотелиальных клетках показана в работе [15]: сферические наночастицы диаметром 15 нм локализованы в везикулах группами от 10 до 100 шт. в количестве около 2000 шт./клетку. Проникновение другого типа (кремниевых) частиц в эндотелиальные клетки путем эндоцитоза и их накопление в лизосомах в виде агрегатов также продемонстрировано в работе [16]. При инкубации эндотелиоцитов с другими (кварцевыми) наночастицами различных размеров (от 10 до 400 нм) они накапливались не только внутри пузырьков и вакуолей, но и в цитозоле [16], что может свидетельствовать о разных механизмах транспорта частиц, отличающихся по составу. Установлена повышенная токсичность частиц размером 10 нм по сравнению с более крупными частицами, вероятно из-за их более быстрого проникновения и накопления в клетках.

Поверхность золотых наночастиц может быть представлена мономолекулярным слоем бифункциональных реагентов с экспонированными в раствор амино- или карбоксильными группами, в результате чего получают положительно или отрицательно заряженные частицы (Z -потенциал от +30 до -36 мВ). На модели опухолевого цилиндрида показано, что отрицательно заряженные частицы быстрее проникают в клетку по сравнению с положительно заряженными частицами [17]. В работе [18] установлено, что эффективность связывания с белками сыворотки и транспорта в клетки отрицательно заряженных золотых частиц зависит от их размера, частицы транспортируются путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и в процессе транспорта могут взаимодействовать с внутриклеточными иммуномедиаторами. Сравнительный анализ проникновения разных по размеру золотых частиц в клетки COS-1 показал, что при инкубации клеток с малыми (2–4 нм) наночастицами последние обнаруживаются не только в цитоплазме, но и в ядре. В случае применения частиц средних размеров (5.5–8.2 нм) они выявляются в цитоплазме и в перинуклеарном пространстве, а частицы размером 16 нм локализуются в виде агрегатов исключительно в цитоплазме [19]. Аналогичные результаты были получены на раковых клетках [20]. Это свиде-

тельствует о том, что транспорт наночастиц золота в ядро отличается от транспорта в цитозольный компартмент и ограничен размером частицы, т. е. крупные частицы не транспортируются через поры ядерной оболочки.

Данные электронной микроскопии свидетельствуют об идентичности мест локализации одиночных и агрегированных золотых частиц в цитоплазме эндотелиальных и трансформированных клеток, а также о схожем характере накопления частиц в зависимости от их размера в первичных и трансформированных клетках. Вместе с тем установлено, что коллоид идентичного размера накапливается в этих клетках с разной интенсивностью. Можно предполагать, что это обусловлено как различной функциональной активностью клеток, так и особенностями специфических реакций их транспортных систем на проникновение наночастиц золота в цитоплазму.

Исследование иммуномодулирующих свойств золотых коллоидов

По данным ряда исследований, золотые наночастицы биологически инертны, нетоксичны и пригодны для использования *in vivo* [2]. Ранее было продемонстрировано [10], что мышинные макрофаги линии J774 A1 стимулируются под действием определенных концентраций золотых коллоидов. Однако тот факт, что авторы [10] не оценивали наличие бактериального липополисахарида в препаратах коллоидов, не позволяет достоверно утверждать, что золотые частицы обладают иммуностимулирующим действием. Кроме того, влияние коллоидов золота на первичные клетки до сих пор не исследовано. Нами изучено действие золотых наночастиц на первичные человеческие клетки – эндотелиоциты пупочной вены и фибробласты из ткани десны. В недавних исследованиях было показано, что наряду с выполнением основных функций (барьерной и структурной) эти клетки принимают активное участие в регуляции врожденного иммунного ответа. Фибробласты и эндотелиоциты экспрессируют рецепторы интерлейкинов и паттерн-распознающие рецепторы (PRRs), отвечают на компоненты бактерий и вирусов, а также на интерлейкины продукцией провоспалительных медиато-

ров, таких как ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1 β , ИФН 1-го типа [21]. Содержание бактериального липополисахарида (ЛПС) в препаратах наночастиц золота, определенное при помощи LAL-теста, не превышало двух единиц эндотоксина (ЕЭ) на 1 мг золотых наночастиц, что для рабочей концентрации золотых наночастиц в 6 мкг/мл соответствует 0.0125 ЕЭ/мл. В таких концентрациях бактериальный ЛПС не индуцирует иммунные реакции в первичных эндотелиоцитах и фибробластах [22]. Результаты влияния наноматериалов на секрецию провоспалительных цитокинов первичными клетками представлены на рис. 8

Видно, что наночастицы не индуцировали изменения концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-6 (см. рис. 8, а) и ИЛ-8 (дан-

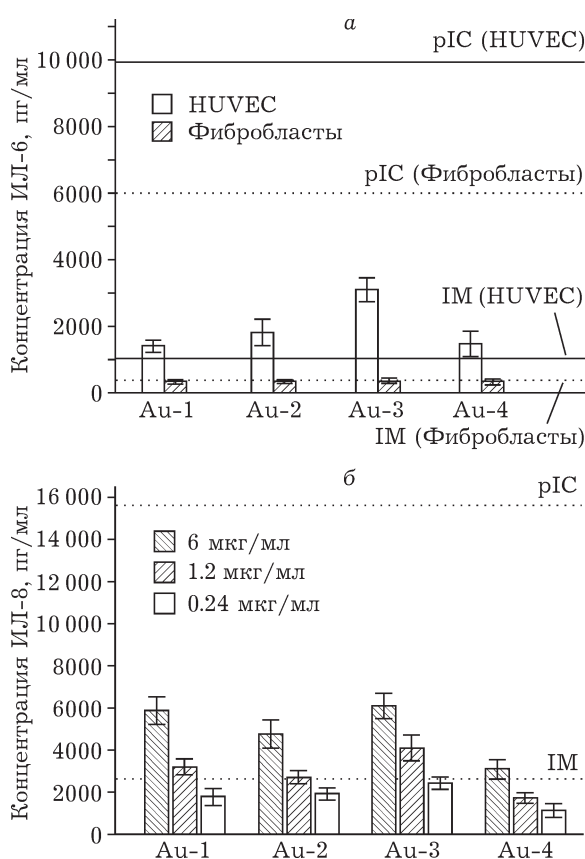


Рис. 8. Индукция провоспалительной реакции в первичных клетках под действием наночастиц золота: а – концентрация ИЛ-6 в эндотелиоцитах и фибробластах, б – концентрация ИЛ-8 в эндотелиоцитах. Горизонтальными штриховыми и сплошными линиями обозначена концентрация интерлейкинов в среде с интактными клетками (IM) и после их стимуляции pIC (1 мг/мл). Концентрация наночастиц золота, мкг/мл: 6 (а), 6, 1.2 и 0.24 (б) мкг/мл.

ные не представлены) в культуре первичных фибробластов. Инкубация эндотелиоцитов в присутствии наночастиц золота приводила к индукции секреции этими клетками как ИЛ-6, так и ИЛ-8. Максимальное увеличение (в три раза для ИЛ-6 и в 2.3 раза для ИЛ-8 по сравнению с базовым уровнем) наблюдалось в случае нанопрепарата Au-3 с размером частиц 22 нм. В эндотелиоцитах наблюдается зависимость интенсивности секреции интерлейкинов от размера и концентрации коллоидных частиц: частицы большого размера в низкой концентрации ингибируют нормальную секрецию ИЛ покоящимися эндотелиоцитами, в то время как частицы диаметром 22 нм активируют секрецию ИЛ во всех исследованных концентрациях. Зависимость индукции провоспалительного клеточного ответа от размера золотых наночастиц установлена в работе [10], авторы которой показали, что с уменьшением размера золотых наночастиц возрастает генная экспрессия провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6 и ИФН 1-го типа [10].

Различия в активации наночастицами золота первичных эндотелиоцитов и фибробластов требуют дальнейших исследований. Известно, что иммунный ответ в клетках разных типов определяется экспрессией и локализацией PRRs. Большинство PRRs расположены внутриклеточно (в цитоплазме и эндосомах), следовательно, их активация напрямую зависит от транспорта лигандов в клетки [23, 24]. Таким образом, иммуностимулирующее действие золотых частиц в первичных эндотелиоцитах может быть связано с высокой активностью эндоцитоза (и особенно кавеолин-зависимого), характерной для этого типа клеток [11]. При этом, по данным электронной микроскопии, в первичных эндотелиоцитах имеется большое количество везикулярных структур, внутри которых локализованы практически все золотые частицы. Размер золотых частиц также оказывает существенное влияние на их транспорт, внутриклеточное распределение и иммуномодулирующие свойства. Так, частицы диаметром 22 нм, в отличие от более крупных частиц, локализованных поодиночке или небольшими группами, преобладают в везикулярных структурах в виде плотно слипшихся кластеров по 20–40 шт. Можно предположить, что такие скоп-

ления более активно взаимодействуют с эндосомальными PRRs в силу того, что имеют большую поверхность, и определяют более выраженный иммунный ответ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что данные золотые наночастицы нетоксичны в исследованном диапазоне концентраций (от 0.06 до 6 мкг/мл), активно проникают в клетку и селективно активируют провоспалительный иммунный ответ (в зависимости от размера наночастиц и типа клеток). Эти данные необходимо учитывать при разработке наноструктурированных препаратов для внутреннего введения, основанных на использовании коллоидов золота.

Кроме того, на основании наших данных и данных других авторов [9, 25] можно сделать вывод о том, что золотые наночастицы могут служить не только инертными платформами-носителями лекарственных препаратов, но и активными реагентами, способными в зависимости от размера (и, возможно, заряда) влиять на функцию клеточных систем, которые связаны с эндосомальной, экзосомальной и лизосомальной системами.

Работа выполнена при финансовой поддержке СО РАН (Межакадемический проект № 9) совместно с организациями УрО и ДВО РАН, государственных академий наук России, национальных академий наук стран СНГ, Монголии и Китая, а также Минобрнауки России (соглашение № 8289).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Lim Z. Z., Li J. E., Ng C. T., Yung L. Y., Bay B. H. // *Acta Pharmacol Sin.* 2011. Vol. 32. P. 8983.
- 2 Vigderman L., Zubarev E. R. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012. [Epub ahead of print]
- 3 Rippel R. A., Seifalian A. M. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2011. Vol. 11, No. 5. P. 3740.
- 4 Bastus N. G., Sanchez-Tillo E., Pujals S., Farrera C., Kogan M. J., Giralt E., Celada A., Lloberas J., Puntès V. // *Mol. Immunol.* 2009. Vol. 46, No. 4. P. 743.
- 5 Frens G. // *Nature.* 1973. Vol. 241. P.20.
- 6 Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G., Minick C. R. // *J. Clin. Invest.* 1973. Vol. 52. P. 2745.
- 7 Takada H., Mihara J., Morisaki I., Hamada S. // *Infection and Immunity.* 1991. Vol. 59, No. 1. P. 295.
- 8 Kruglova A. A., Matveeva N. M., Gridina M. M., Battulin N. R., Karpov A., Kiseleva E. V., Morozova K. N., Serov O. L. // *Cell Tissue Res.* 2010. Vol. 340, No. 3, P. 437.
- 9 Jiang W., Kim B. Y., Rutka J. T., and Chan W. C. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. Vol. 3. P. 145.
- 10 Yen H-J., Hsu S., and Tsai C-L. // *Small.* 2009. Vol. 5, No. 13. P. 1553.
- 11 Хлебцов Н. Г., Богатырев В. А., Дыкман Л. А., Мельников А. Г. // *Коллоид журн.* 1995. Т. 57, № 3. С. 412.
- 12 Stendroff C. J., Herschbach D. R. // *Langmuir.* 1985. Vol. 1. P. 131.
- 13 Simionescu M., Popov D., Sima A. // *Cell Tissue Res.* 2009. Vol. 335, No. 1. P. 27.
- 14 Aboussekhra A. // *Int. J. Dev. Biol.* 2011. Vol. 55, No. 7-9. P. 841.
- 15 Bartzczak D. // *Small.* 2012. Vol. 8, No. 1. P. 122.
- 16 Corbalan J. J. // *Int. J. Nanomedicine.* 2011. Vol. 6. P. 2821.
- 17 Kim B., Han G., Toley B. J., Kim C. K., Rotello V. M., Forbes N. S. // *Nat. Nanotechnol.* 2010. Vol. 5, No. 6. P. 465.
- 18 Chithrani B. D., Ghazani A. A., Chan W. C // *NanoLett.* 2006. Vol. 6, No. 4. P. 662.
- 19 Oh E., Delehanty J. B., Sapsford K. E., Susumu K., Goswami R., Blanco-Canosa J. B., Dawson P. E., Granek J., Shoff M., Zhang Q., Goering P. L., Huston A., Medintz I. L. // *ACS Nano.* 2011. Vol. 5, No. 8. P. 6434.
- 20 Huang K., Ma H., Liu J., Huo S., Kumar A., Wei T., Zhang X., Jin S., Gan Y., Wang P. C., He S, Liang X. J. // *ACS Nano.* 2012. Vol. 6, No. 5. P. 4483.
- 21 Uehara A., Takada H. // *J. Dent. Res.* 2007. Vol. 86. P. 249.
- 22 Darveau R. P., Pham T. T., Lemley K., Reife R. A., Bainbridge B. W., Coats S. R. // *Infect Immun.* 2004. Vol. 72, No. 9. P. 5041.
- 23 Hornung V., Latz E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. Vol. 10. P. 123.
- 24 Takeuchi O., Akira S. // *Immunol. Rev.* 2009. Vol. 227. P. 75
- 25 Tsai C. Y., Lu S. L., Hu C. W., Yeh C. S., Lee G. B., Lei H. Y. // *J. Immunol.* 2012. Vol. 188, No. 1. P. 68.