

На правах рукописи



Пшеничников Станислав Евгеньевич

**«ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ ЖЕЛЕЗА ДЛЯ
ИНДУКЦИИ ПРОЦЕССОВ РЕГУЛИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ
СМЕРТИ»**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Калининград – 2024

Работа выполнена в научно-образовательном центре «Умные материалы и биомедицинские приложения» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет им. И. Канта».

Научный руководитель – **Левада Екатерина Викторовна**
кандидат наук (PhD), ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта», заведующий лабораторией биомедицинских приложений НОЦ «Умные материалы и биомедицинские приложения», доцент.

Официальные оппоненты – **Артюхов Валерий Григорьевич**
доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии;
Каршиева Саида Шамильевна
кандидат биологических наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина», старший научный сотрудник.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Защита состоится «27» декабря 2024 г. в 10:30 на заседании совета 24.2.287.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» по адресу: 394036, Воронеж, пр-т Революции, д. 19, конференц-зал.

Отзывы на автореферат, заверенные гербовой печатью учреждения, просим присылать ученому секретарю совета 24.2.287.02.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Полный текст диссертации размещен в сети «Интернет» на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsuet.ru.

Автореферат размещен в сети Интернет на интернет-сайте ВАК Министерства науки и высшего образования РФ: vak.minobrnauki.gov.ru и на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsuet.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 20 ____ г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.т.н.



О. Л. Мещерякова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время биотехнология предоставляет широкие перспективы для развития биомедицинских приложений и инструментов наномедицины, открывая новые возможности в области диагностики и лечения заболеваний, а также регуляции отдельных биологических процессов. Особого внимания заслуживает раздел биотехнологии, связанный с применением материалов нанометрового масштаба – бионанотехнология.

Объектами пристального внимания исследователей, благодаря уникальным свойствам, определяющих широкий круг потенциальных применений в области биотехнологии, а также в рамках приложений для наномедицины является обширный класс наноматериалов - наночастицы (НЧ). Вариативность физических и химических свойств, возможность структурной модификации и функционализации НЧ определили широкую область использования данных материалов – в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ), антимикробных агентов, компонентов скаффолдов, магнитных эластомеров и композитных материалов, инструментов гипертермии, противораковой терапии и тераностики, инструментов для систем магнитной манипуляции и левитации.

Одними из наиболее перспективных видов НЧ являются наночастицы оксидов железа (НЧОЖ), обладающие высокой магнитной восприимчивостью. Это делает НЧОЖ эффективными инструментами для магнитного мечения биологических структур, процессов *in vivo* и *in vitro* визуализации клеток, в системах магнитной клеточной манипуляции, адресной доставки лекарств, иммунотерапии. Однако, современные исследования демонстрируют ряд токсических эффектов, связанных с воздействием НЧОЖ на клеточные структуры. По этой причине ряд биомедицинских инструментов на основе НЧОЖ был отозван из медицинской практики. При этом знания о механизмах, лежащих в основе токсичности, индуцированной воздействием НЧОЖ, а также прочих сопутствующих эффектах остаются довольно ограниченными.

Возможность эффективного использования НЧ в области наномедицины требует соблюдения ряда требований для данных материалов – низкой токсичности, высокой биосовместимости, диспергируемости, неиммуногенности и стабильности в физиологических средах. Понимание механизмов цитотоксичности имеет решающее значение для заблаговременного предотвращения неблагоприятных последствий в ходе применения НЧ в практике.

Исследования в области цитотоксичности и биосовместимости НЧОЖ, существенно дополняют современные представления о взаимодействии НЧ с клеточными структурами, выявляют отдельные механизмы токсичности и способствуют расширению сферы потенциальных применений НЧ и в итоге коммерциализации терапевтических инструментов на основе НЧ. При оптимальном подборе параметров используемых НЧ, возможно добиться получения материала с желаемыми свойствами. Особенности модификации поверхности, форма наночастиц, размер и другие свойства определяют характер их взаимодействия со здоровыми и опухолевыми клетками организма, что служит одним из важнейших факторов для разработки данных материалов и применения биомедицине и наномедицине.

Целью настоящей работы является выявление и исследование особенностей взаимодействия наночастиц на основе оксидов железа с рядом клеточных культур человека.

В **задачи** диссертационного исследования входило:

1. Определить уровень цитотоксичности наночастиц магнетита на примере клеточной линии Т-лимфобластного лейкоза человека (Jurkat) и мононуклеарных клеток крови человека.

2. Выявить и охарактеризовать механизмы, лежащие в основе цитотоксичности наночастиц магнетита.

3. Определить уровень цитотоксичности двух видов наночастиц оксидов железа, имеющих различную форму (представляющих собой нанокубы и нанокластеры), но одинаковый химический состав.

4. Идентифицировать механизмы, лежащие в основе цитотоксичности наночастиц и определяющих характер клеточного ответа.

Научная новизна. Впервые проведён комплексный анализ воздействия НЧОЖ различной формы и размеров на серию клеточных культур человека Alexander, HepG2, Huh7 и Jurkat. Установлена возможность серии НЧОЖ (имеющих одинаковые размеры и химический состав) индуцировать различные сценарии клеточного ответа (апоптоз или аутофагию) в зависимости от формы НЧ. Выявлена зависимость индукции интенсивной пермеабилзации лизосомальных мембран и апоптоза в клетках Alexander и Huh7 от действия НК. Впервые доказано, что НК вызывают слабый эффект ПЛМ, приводящий к аутофагии в клеточных линиях Alexander и Huh7. Экспериментальным путем подтверждено, что повышенный уровень экспрессии Bcl-2 в клетках HepG2, ингибирует процессы аутофагии и при воздействии НК и НКЛ, приводит к активации апоптических процессов в клетках. Установлено, что НЧМ индуцируют

оксидативный стресс в клетках Jurkat, но не оказывают ингибирующего воздействия на МНК.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые и расширены существующие знания о взаимодействии НЧОЖ, в частности НЧМ, НК и НКЛ с биологическими структурами на примере серии различных культур клеток человека. В работе получены комплексные данные о характере индуцируемых НЧОЖ клеточных процессов. Детально изучен и подтверждён механизм ПЛМ, вызванный влиянием НК и НКЛ. Продемонстрировано влияние генетических особенностей клеточной культуры HepG2, на вид клеточного ответа, после воздействия НЧ. Продемонстрирована индукция цитотоксических процессов и усиление пермеабилзации НЧ внутрь клеток при приложении МП.

Объектами данного исследования послужили наночастицы магнетита, а также два типа наночастиц оксида железа, обладающих схожими характеристиками, но имеющие различную морфологию; цитотоксические эффекты и процессы, индуцированных действием наночастиц оксидов железа в серии клеточных линиях человека Alexander, HepG2, Huh7 и Jurkat.

Методы исследования. В диссертационной работе использовали общенаучные и специальные методы исследования: методы клеточной биологии, флуоресцентной микроскопии и математические (статистические) методы обработки данных. Экспериментальные результаты прошли статистическую обработку после обработки выборки из 3 опытов.

Научные положения, выносимые на защиту:

- наночастицы на основе магнетита (в концентрации 100 мкг/мл при воздействии в течение 24 ч) индуцируют цитотоксические эффекты в клетках Т-клеточной лимфомы человека (Jurkat), но не ингибируют жизнеспособность мононуклеарных клеток крови человека. Снижение жизнеспособности (до 77,7%) связано с индукцией оксидативного стресса, внутриклеточной интернализацией наночастиц, а также усиливается при приложении постоянных магнитных полей (вплоть до 54,5% при 0.45 Т).

- наночастицы оксида железа одинакового состава, но различной формы – нанокубы и нанокластеры ингибируют жизнеспособность клеток Alexander, HepG2 и Huh7 в равной степени, при этом величина ингибирования имеет прямую концентрационную зависимость. При этом повышенный уровень экспрессии Bcl-2 в клетках HepG2, ингибирует процессы аутофагии, что, при воздействии нанокубов и нанокластеров, приводит к активации апоптотических процессов в клетках.

- нанокластеры индуцируют более интенсивную пермеабиллизацию лизосомальных мембран по сравнению с нанокубами, что приводит к апоптозу в клетках Alexander и Huh7, вызванного массивным повреждением мембран. В тоже время, нанокубы индуцируют процессы аутофагии в клеточных линиях Alexander и Huh7.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 30 рисунков. Структура состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, объектов и методов исследований, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы, состоящего из 201 наименования, в том числе 195 на иностранном языке.

Личный вклад автора. Личное участие автора состоит в проведении поиска и анализе информации по исследуемой теме, выборе направления исследований, непосредственном участие в постановке цели и задач исследовательской работы, планировании, подготовке и проведении экспериментов, а также анализе и обработке результатов. Автор осуществлял подготовку публикаций в международные научные журналы, а также представлял итоги исследований в ходе конференций.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных научного цитирования (Web of Science, Scopus, РИНЦ). Опубликовано 12 тезисов и материалов конференций (в т.ч. 2 тезисов, индексируемых РИНЦ).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе описаны особенности наночастиц, как отдельного класса наноматериалов. Рассмотрены возможности применения наночастиц, как инструмента биотехнологии и биомедицины, с точки зрения специфики их взаимодействия с клеточными структурами. Выявлены основные преимущества и недостатки использования наночастиц оксидов железа в качестве терапевтического инструмента. В отдельном разделе рассмотрены основные варианты клеточной смерти, выделяемые согласно Номенклатурному комитету по клеточной смерти (the Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD). Подробно описаны процессы регулируемой и программируемой клеточной смерти. Обсуждена связь различных форм регулируемой клеточной смерти. Описаны возможности индукции процессов клеточной смерти с применением наночастиц оксидов железа.

Во второй главе подробно описана методика проведения исследований, посвященных теме диссертации. Представлена информация об основных объектах исследования – клеточных линиях и наночастицах. Представлены методы культивирования и оценки клеточной жизнеспособности клеточных культур. Описан протокол культивирования клеток при приложении внешних магнитных полей и при добавлении наночастиц различных концентраций в питательную среду. Показаны методики оценки образования активных форм кислорода, жизнеспособности и клеточной гранулярности с использованием методов проточной цитометрии. Подробно расписаны методы выявления признаков апоптотических изменений в клетках с использованием конфокальной микроскопии. Представлен протокол вестерн-блота, посвященный идентификации белков-маркеров клеточной смерти.

В третьей главе представлены результаты исследований и подробно проведен анализ и обсуждение полученных данных. В главе выделено три раздела.

1. Воздействие НЧМ на жизнеспособность клеток Jurkat и МНК

На рисунке 1 приведена ключевая информация о НЧ, использованных в исследованиях по теме диссертации, необходимая для корректной интерпретации результатов биологических экспериментов.

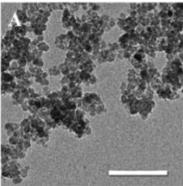
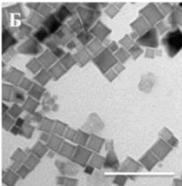
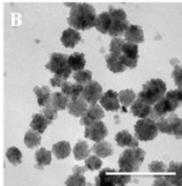
Название	Наночастицы магнетита (НЧМ)	Нанокубы (НК)	Нанокластеры (НКЛ)
Форма			
ПЭМ			
Размер	9 ± 3 нм	36 ± 8 нм	38 ± 10 нм
Состав	Fe ₃ O ₄ γ-Fe ₂ O ₃	Fe ₃ O ₄	Fe ₃ O ₄
Описание	частицы октосферической формы	частицы кубической формы	кластеры частиц кубической формы
Покрытие	отсутствует	нитродопамин-ПЭГ	нитродопамин-ПЭГ

Рисунок 1. Характеристика наночастиц, использованных в исследованиях. А, Б, В – изображения наночастиц магнетита, нанокубов и нанокластеров, соответственно, полученных с использованием

просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Размер шкалы составляет 100 нм.

Физические, химические и структурные свойства наноматериалов определяют характер их взаимодействия с биологическими объектами. Данные свойства определяют уровень цитотоксичности наноматериалов, степень биосовместимости, возможные побочные и сопутствующие эффекты, стабильность в биологических средах и тканях, а также область и эффективность потенциального применения. Физическая и структурная характеристика, использованных в данном исследовании наноматериалов – наночастиц магнетита (НЧМ), нанокубов (НК) и нанокластеров (НКЛ), выполнена научными коллегами автора диссертации и опубликована в совместных научных публикациях.

В первом разделе показаны результаты анализа воздействия НЧМ на жизнеспособность клеток Jurkat и МНК. На первом этапе исследований была проведена оценка биосовместимости НЧМ с использованием с клеточного красителя WST-1 методом спектрофотометрии. НЧМ продемонстрировали цитотоксическое воздействие на клетки Jurkat после культивирования с НЧМ в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 ч (рис. 2 А). В то же время, после культивирования МНК в аналогичных условиях снижения жизнеспособности не было обнаружено. Также было проведено измерение цитотоксичности НЧМ при концентрациях 10 и 50 мкг/мл (данные не показаны).

На следующем этапе исследования, воздействие НЧМ на экспериментальные клетки было модифицировано приложением постоянных МП умеренной напряженности. Анализ клеточной жизнеспособности показал значительное снижение жизнеспособности клеток Jurkat, культивированных в постоянных МП различной напряженности (0.26, 0.36 и 0.45 Т) в присутствии наночастиц (рис. 2 Б).

Ингибирование жизнеспособности клеток Jurkat при воздействии НЧМ усиливалось по мере увеличения напряженности МП (рис. 2, Б, Jurkat). Жизнеспособность МНК, напротив, не была снижена совместным действием НЧМ и МП, и демонстрировала флуктуации в пределах статистической погрешности. Данные различия клеточного ответа связаны, предположительно, с нарушением окислительно-восстановительного гомеостаза в раковых клетках. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых показана различная восприимчивость здоровых и раковых клеток к АФК-опосредованному воздействию НЧОЖ. Из этого следует, что методы элиминации клеток, основанные на различиях в окислительно-восстановительном гомеостазе раковых и здоровых клеток организма, могут предоставить эффективные стратегии избирательной индукции клеточной смерти.

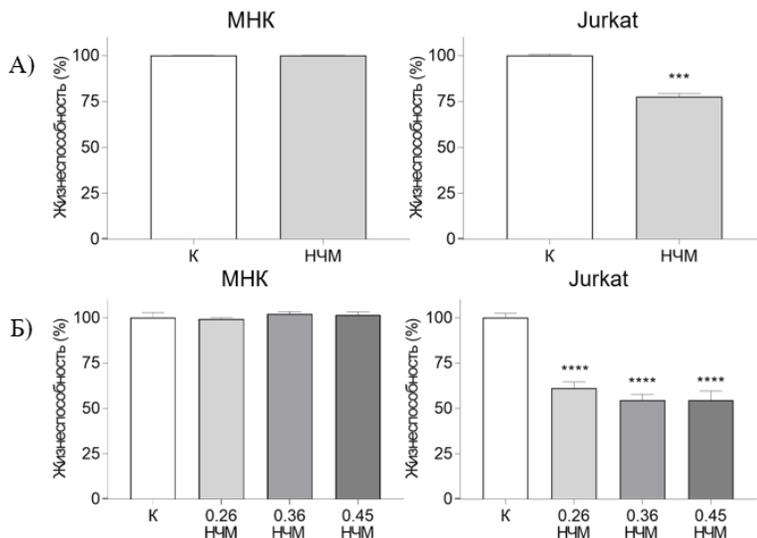


Рисунок 2. Уменьшение жизнеспособности клеток Jurkat после культивирования с НЧМ (А), а также при совокупном воздействии НЧМ и постоянных магнитных полей (0.26, 0.36 и 0.45 Т) различной напряженности (Б).

На следующем этапе, для идентификации процессов, лежащих в основе цитотоксических эффектов, было проведено исследование образования АФК в клетках Jurkat. С помощью клеточного красителя дигидроэтидия, методом проточной цитометрии была оценена интенсивность окислительных процессов в экспериментальных клетках по сравнению с контрольными. Экспериментальные условия были аналогичны предыдущему эксперименту. На полученных данных (рис. 3 А), представленных в виде графика, четко выделяются позитивно окрашенные пики (показаны стрелками), что говорит о выраженном окислительном стрессе, вызванном воздействием НЧМ и МП. В то же время обнаружено изменение гранулярности экспериментальных клеток (рис. 3 Б). Возросшая гранулярность клеток – один из признаков внутриклеточной интернализации НЧ.

Для подтверждения процесса интернализации НЧМ в клетки Jurkat был использован метод проточной цитометрии с использованием красителя пропидий йодид. При изучении данного процесса были четко выделены две клеточные субпопуляции (рис 3, I и II). В результате культивирования в течение 24 ч с добавлением НЧМ и при приложении МП повысило гранулярность субпопуляций Jurkat (рис. 3 Г, показано стрелками).

Таким образом, выявлено цитотоксическое действие НЧМ на клеточную линию Jurkat (рис. 3 Д), при этом МП усиливало цитотоксический эффект. В то же время, МНК продемонстрировали устойчивость к воздействию НЧМ, а также совместного действия НЧМ и МП. Исследование воздействия НЧМ на клеточную жизнеспособность позволило выявить различия в чувствительности здоровых клеток (МНК) и раковых клеток (Jurkat) к данному воздействию.

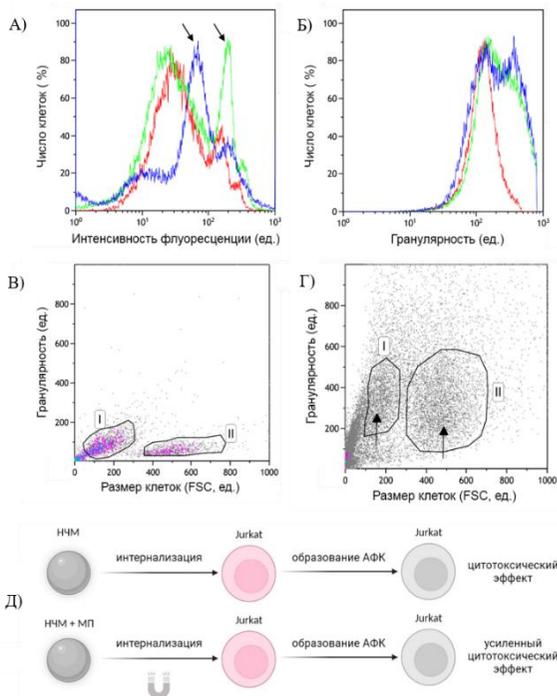


Рисунок 3. Цитотоксическое действие НЧМ на клетки Jurkat. Графики А и Б отображают интенсивность флуоресценции красителя DNE (А - индукцию образования АФК в клетках Jurkat после культивирования с НЧМ при приложении МП (красные, зеленые и синие линии отображают показания для контрольных клеток, клеток культивируемых при 100 мкг/мл НЧМ, а также клеток культивируемых при 100 мкг/мл НЧМ и приложения МП 0.45 Т соответственно), а также клеточную гранулярность (Б)). I и II – отдельные клеточные субпопуляции Jurkat. Д - цитотоксическое действие НЧМ на клеточную линию Jurkat под действием НЧМ вне источников магнитного поля (НЧМ) и при приложении постоянных магнитных полей (НЧМ + МП).

Полученные данные позволят разработать концепт инструмента для биомедицины, позволяющего избирательно ингибировать жизнеспособность раковых клеток посредством использования комбинации НЧМ и МП. Полученные результаты, согласуются с литературными источниками, подтверждающих усиление токсичности НЧМ под действием МП.

3.2 Влияние формы наночастиц на характер клеточного ответа

Во втором разделе показаны результаты, посвященные исследованию влияния формы наночастиц на характер клеточного ответа. Для этого были использованы НЧОЖ, представляющие собой нанокубы (НК) и нанокластеры (НКЛ) (рис. 1). В работе использовались клеточные линии гепатоцеллюлярной карциномы человека Alexander (PLC/PRF/5), HepG2 и Huh7. Для определения фармакологического окна исследуемых НЧОЖ, как инструментов биомедицины, был проведен тест цитотоксичности с тремя различными концентрациями по прошествии 48 ч (рис. 4).

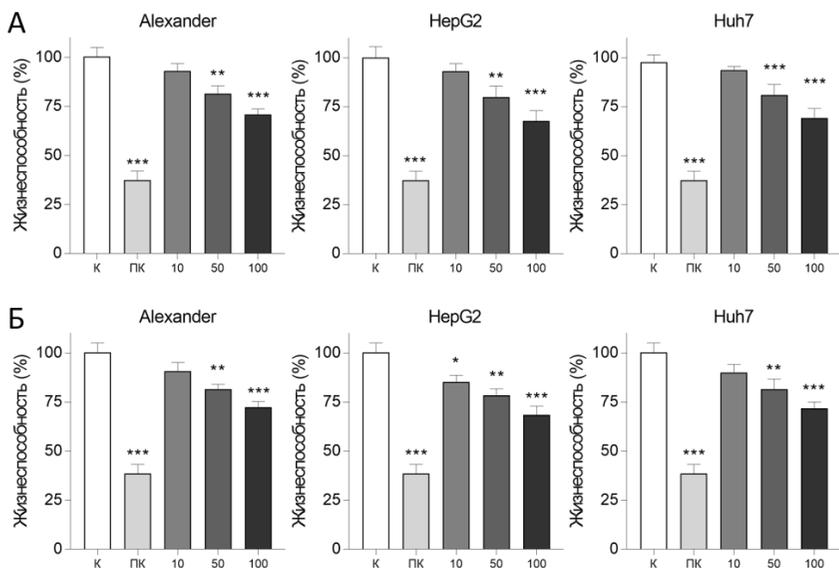


Рисунок 4. Снижение клеточной жизнеспособности клеточных линий Alexander, HepG2 и Huh7 после культивирования с различными концентрациями НК (А) и НКЛ (Б) в течение 48 ч. Анализ проведен с использованием красителя alamarBlue. Данные нормализованы к контролю. Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («**») для $p < 0,01$, («***») для значения $p < 0,001$. К – контроль, ПК – положительный контроль,

10, 50,100 – экспериментальные группы клеток культивированные при концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл НК или НКЛ, соответственно.

Жизнеспособность всех трёх клеточных линий гепатоцеллюлярной карциномы была ингибирована под воздействием НК и НКЛ. При этом величина токсического эффекта возрастала с увеличением концентрации НК. 48-часовое воздействие концентрации 100 мкг/мл НК и НКЛ приводит к эффекту острой токсичности в клетках печени (гепатотоксичности), снижая жизнеспособности приблизительно на 30% (рис. 4).

На следующем этапе исследования было оценено цитотоксическое действие НК и НКЛ, с использованием клеточных красителей Аннексин V и пропидий йодид. По прошествии 24 ч воздействия, с использованием эпифлуоресцентной микроскопии, были обнаружены клетки позитивно окрашенные Аннексином, что является индикатором транслокации фосфатидилсерина с внутренней на внешнюю поверхность клеточных мембран (рис. 5 А). Транслокация фосфатидилсерина является одним из ранних признаков апоптоза. Исследуемые НЧ продемонстрировали меньший цитотоксический эффект после 24 ч воздействия (рис. 5 Б), по сравнению с 48 ч. В то же время, НКЛ оказали наибольший токсический эффект в клетках Huh7. НК также снизили жизнеспособность клеток Huh7, при этом воздействие на клеточные линии Alexander и HepG2 лежало в пределах статистической погрешности.

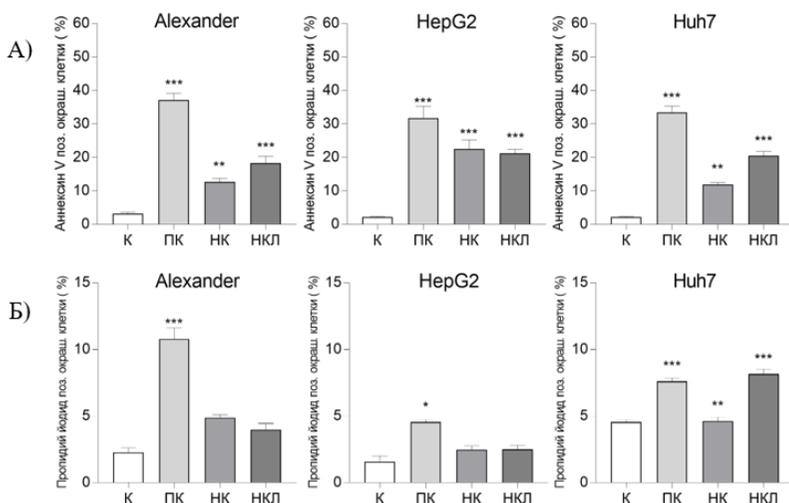


Рисунок 5. Сравнение цитотоксического эффекта для клеточных линий Alexander, HepG2 и Huh7, вызванного воздействием НК и НКЛ в

концентрации 100 мкг/мл течение 24 ч. (А) – количество клеток, положительно окрашенных Аннексином V. (Б) – количество клеток, положительно окрашенных пропидием йодидом.

После оценки величины цитотоксических эффектов НК и НКЛ, было проведено исследование клеточной морфологии. С помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения было обнаружено, что клетки после воздействия НК и НКЛ демонстрируют характерные признаки апоптоза (рис. 6). Были обнаружены фрагментация ядер, формирование и отделение отдельных пузырьков цитоплазматических мембран, а также сморщивание клеток в целом. Согласно результатам, интенсивность процесса фрагментации ядер наиболее интенсивно проходит в клеточных линиях Alexander и Huh7. В то же время процессы фрагментации цитоплазматических мембран обнаружены во всех трех исследуемых клеточных линиях.

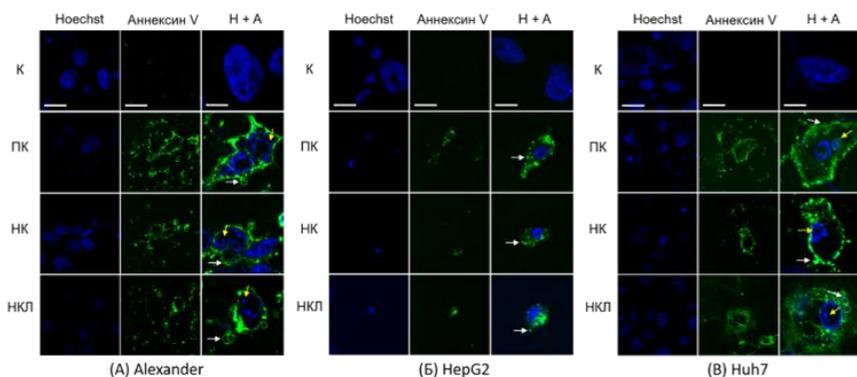


Рисунок 6. Фрагментация ядер и нарушение целостности цитоплазматических мембран в клеточных линиях Alexander (А), HepG2 (Б) и Huh7 (В) после культивирования с НК и НКЛ (100 мкг/мл) в течение 24 ч. Для определения колокализации анализируемых объектов флуоресцентные каналы Hoechst 33342 и Annexin V были объединены на увеличенном изображении (H + A). Размер шкалы составляет 5 мкм для H + A. Размер шкалы для Hoechst и Аннексина составляет 15 мкм. Желтые стрелки обозначают фрагментацию ядер. Белые стрелки обозначают отделившиеся пузырьки лизосомальных мембран.

Таким образом, были получены экспериментальные данные, показывающие, что НК и НКЛ оказывают схожее воздействие на все три исследованные клеточные линии (рис. 7). При этом, количество

жизнеспособных клеток уменьшалось при повышении концентрации НЧ, а клетки демонстрировали внешние апоптотические признаки.

На следующем этапе исследования, в экспериментальных клетках была проведена оценка активности каспазы-3 – клеточного маркера апоптоза. После 24 ч воздействия НК и НКЛ при концентрации 100 мкг/мл экспериментальные клетки были проинкубированы с флуоресцеин-конъюгированным ингибитором панкаспазы (VAD-FMK). Количественная оценка полученных флуоресцентных изображений проводилась с использованием методики скорректированной общей флуоресценции клеток (СОФК) с помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения.



Рисунок 7. Схема воздействия НЧ на исследуемые клетки. НК и НКЛ оказывают дозозависимый эффект снижения жизнеспособности клеток Alexander, HepG2 и Huh7, сопровождающийся проявлением внешних апоптотических признаков.

Оценка активности каспазы-3 показала (рис. 8), что воздействие НКЛ индуцировало массивную активацию каспазы-3 в клетках HepG2, Huh7 и Alexander. Полученные данные подтверждают индукцию апоптоза во всех трех изученных клеточных линиях после воздействия НКЛ.

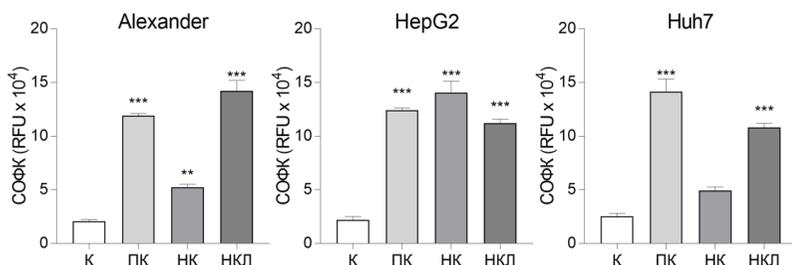


Рисунок 8. Активация Каспазы-3 в клеточных линиях Alexander, HepG2 и Huh7. Клеточные линии были прокультивированы с НК и НКЛ (100 мкг/мл) в течение 24 ч. Скорректированная общая флуоресценция

клеток представлена в виде относительных единиц флуоресценции (RFU). Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («*» для $p < 0,05$, «**» для $p < 0,01$, «***» для значения $p < 0,001$).

В то же время, воздействие НК приводит к небольшому либо незначительному повышению уровня каспазы-3 в клетках Alexander и Huh7. При этом, НК как и НКЛ, вызвали массивную активацию каспазы-3 в клетках HepG2.

С использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения и клеточного красителя MitoTracker Green была визуализирована морфология митохондрий экспериментальных клеток. Согласно полученным результатам (рис. 9), в клеточных линиях Alexander, HepG2 и Huh7 обнаружены слияние и фрагментация митохондрий. Зарегистрированная чрезмерная фрагментация является признаком митохондриальной дисфункции. Было обнаружено повышение циркуляризации митохондрий после воздействия и НК, и НКЛ, во всех трёх исследуемых клеточных линиях, по сравнению с контролем.

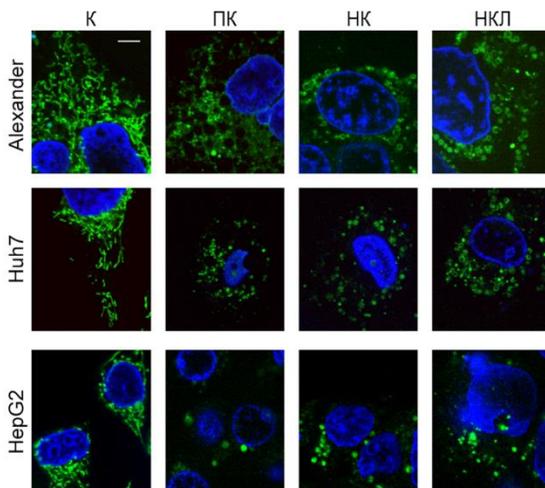


Рисунок 9. Изменение морфологии митохондрий под воздействием НК и НКЛ. Клетки культивировали с НК и НКЛ в концентрации 100 мкг / мл в течение 24 часов. Клетки окрашены флуоресцентным красителем MitoTracker Green (митохондрии зелёного цвета). Для позитивного контроля клетки были обработаны 20% раствором этанола в течение 20 мин. Клеточные ядра (синий цвет) окрашены флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Размер шкалы составляет 5 мкм.

Помимо изменения морфологии, процесс митохондриальной дисфункции сопровождается деполяризацией мембран митохондрий. Поэтому на следующем этапе экспериментов проведено исследование изменений трансмембранного потенциала митохондрий, с использованием красителя JC-1. Проведенный анализ показывает (рис. 10) соотношение интенсивности флуоресценции J-агрегатов и мономеров JC-1 в митохондриях экспериментальных клеток Alexander, HepG2 и Huh7, после культивирования с НК и НКЛ в течение 24 ч. Таким образом НК и НКЛ, индуцировали помимо морфологических изменений митохондрий, деполяризацию митохондриальных мембран во всех трех исследованных клеточных линиях.

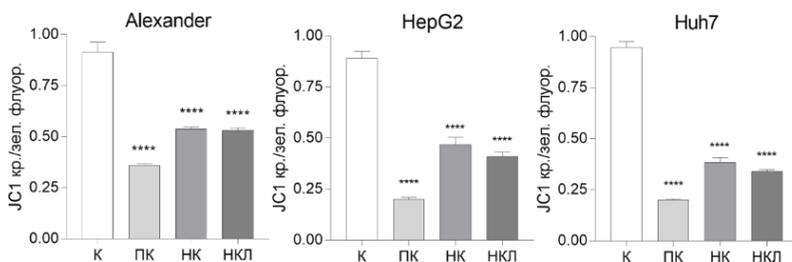


Рисунок 10. Деполяризация митохондриальных мембран клеток Alexander, HepG2 и Huh7, после воздействия НК и НКЛ в течение 24 ч. Данные представлены в относительных единицах, демонстрирующих соотношение интенсивностей флуоресценции митохондрий в длинах волн красного (~590 нм) и зеленого (~529 нм) спектров (JC-1 кр./зел. флуор.).

После этого, была исследована интенсивность течения аутофагических процессов в клетках с использованием первичного антитела anti-LC3A/B, с последующим мечением вторичным флуоресцентным антителом. Обнаружено, что НК индуцировали липидацию LC3-II в клетках Alexander и Huh7, но не в клетках HepG2 (рис. 11). НКЛ, напротив, не оказали эффекта на липидацию LC3 во всех трёх клеточных линиях. Дополнительно, была проанализирована экспрессия клеточного маркера некроптоза RIP1. Оба вида НЧ не продемонстрировали значимого влияния на экспрессию RIP1 во всех трёх клеточных линиях. Это позволяет исключить возможное влияние некроптотических процессов.

Чтобы подтвердить индукцию аутофагии в ответ на воздействие НК, был использован иммунофлуоресцентный анализ с использованием антитела к LC3A/B в ходе микроскопического анализа. На полученных изображениях (рис. 12) были обнаружены позитивно окрашенные флуоресцирующие точки, представляющие собой скопления LC3A/B-специфичных антител и являющиеся маркерами аутофагосом.

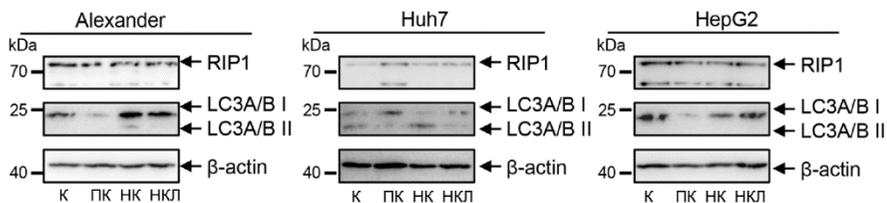


Рисунок 11. Липидация LC3 в клетках Alexander и Huh7, индуцированная воздействием НК. Иммуноблот белков клеточного лизата, получен из клеток обработанных НК и НКЛ в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 часов.

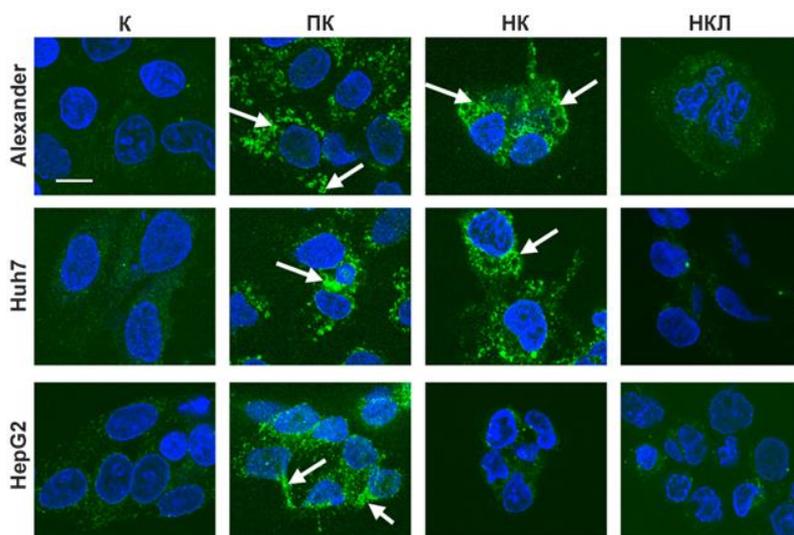


Рисунок 12. Образование аутофагосом в клетках Alexander и Huh7 после 24 ч воздействия НК. Изображения окрашенных клеток были получены с использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения. Белые стрелки указывают на скопления аутофагосом. Размер шкалы – 10 мкм.

Таким образом выявлено массовое образование аутофагосом в клетках Alexander и Huh7 после воздействия НК. В клетках HepG2, напротив, данный процесс не был зарегистрирован.

Согласно данным, полученным с использованием тестов цитотоксичности и экспериментов с оценкой ранних признаков апоптоза (рис. 4, рис. 5) исследования изменений клеточной морфологии (рис. 6), анализа активации Каспазы-3 (рис. 8), изучения изменения морфологии

митохондрий (рис. 9) и их мембранного потенциала (рис. 10), оценки трансформации LC3-II (рис. 11), визуализации процесса образования аутофагосом (рис. 12), можно сделать вывод, что НК индуцируют аутофагический тип клеточной смерти в клеточных линиях Alexander и Huh7. НКЛ, напротив, запускают процессы апоптоза в клетках Alexander и Huh7. Отметим, что в случае с клетками HepG2, воздействие НК и НКЛ приводит к апоптозу. При этом клетки HepG2 демонстрируют более высокие уровни экспрессии Bcl-2, по сравнению клеточными линиями Alexander и Huh7. Данный факт согласуется с результатами экспериментов, поскольку Bcl-2 является блокатором аутофагии. Полученные результаты могут объяснить причины преимущественной активации апоптотических процессов, нежели аутофагии в клетках HepG2, после воздействия НК и НКЛ.

На данном этапе исследования оставался открытым вопрос различия в действии химически идентичных НК и НКЛ на активацию механизмов клеточной смерти в клеточных линиях Alexander и Huh7. Согласно современным представлениям, индукция аутофагии под влиянием НЧОЖ инициируется с лизосомального уровня. Для идентификации аутофагических процессов проведен анализ морфологии лизосом клеток, после воздействия НК и НКЛ в течение 24 ч. На изображениях, полученных с помощью конфокальной микроскопии (рис. 13), обнаружены дестабилизированные (поврежденные) лизосомы в клеточных линиях Alexander, HepG2 и Huh7. На изображениях обнаружены флуоресцентные НК и НКЛ, локализованные в цитоплазме клеток, что подтверждает внутриклеточную интернализацию исследованных НЧ. Также обнаружено изменение окраски лизосом в клетках, культивированных с НЧ.

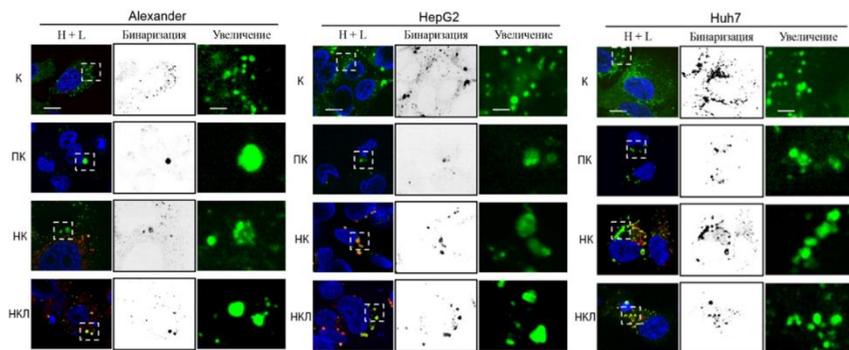


Рисунок 13. Воздействие НК и НКЛ в концентрации 100 мкг / мл в течение 24 ч вызывает дестабилизацию и нарушение целостности лизосом в клетках Alexander, HepG2 и Huh7. Размер шкалы составляет 10 мкм.

Использованы красители клеточных ядер (Hoechst 33342, синий) и лизосом (LysoTracker, зеленый). НК и НКЛ модифицированы флуоресцентными метками (Cy5, красный). В колонке «Увеличение» представлены увеличенные изображения лизосом (размер шкалы – 2 мкм). В колонке «Бинаризация» указаны бинаризованные изображения лизосом. Желтый цвет указывает на колокализацию наночастиц и лизосом. Для ПК клетки были проинкубированы в 20% растворе этанола. Изображения получены с использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения.

Данные изменения вызваны локализацией НК и НКЛ в лизосомах экспериментальных клеток. Также было обнаружено что воздействие как НК, так и НКЛ приводило к набуханию и укрупнению лизосом во всех трёх клеточных линиях, что является индикатором дестабилизации данных структур. Далее была оценена интенсивность флуоресценции красителя LysoTracker в экспериментальных клетках для определения интенсивности протекания ПЛМ. Обнаружено (рис. 14), что НК индуцировали более высокий уровень ПЛМ в клетках Alexander и Huh7 по сравнению с НКЛ. Стоит отметить, что воздействие НК и НКЛ продемонстрировало сходный уровень индукции ПЛМ. Таким образом, данные показывают, что НК и НКЛ индуцируют ПЛМ, имеющую прогрессирующий характер и приводящую к аутофагии или апоптозу в клетках Alexander и Huh7. НК и НКЛ вызывают аналогичный уровень ПЛМ в клетках HepG2, однако, это приводит только к апоптотическому пути клеточной гибели. Таким образом, в клетках HepG2 воздействие НК и НКЛ запускало апоптотический сценарий клеточной гибели (рис. 15).

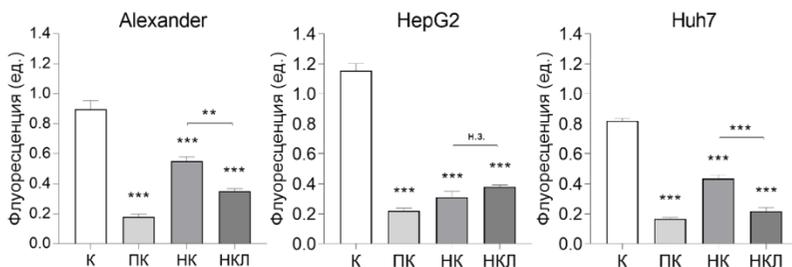


Рисунок 14. Индукция ПЛМ в клетках Alexander, HepG2 и Huh7 в результате воздействия НК и НКЛ в течение 24 в концентрации 100 мкг / мл. Клетки окрашены флуоресцентным красителем LysoTracker. Данные получены с использованием спиннинг-диск конфокальной микроскопии высокого разрешения IXplore SpinSR (Olympus)

В то же время, воздействие НК на клетки Alexander и Huh7 индуцировало аутофагию. НКЛ, напротив вызывали апоптоз в клетках

Alexander и Huh7. Известно, что уровень экспрессии Bcl-2 в клетках HepG2, выше чем в клетках Alexander и Huh7, при этом Bcl-2 ингибирует процессы аутофагии. Так как процессы апоптоза и аутофагии взаимосвязаны, экспрессия Bcl-2 в клетках HepG2 приводит к индукции апоптоза, а не аутофагии, после воздействия НК и НКЛ. Высокий уровень экспрессии Bcl-2 ингибирует течение аутофагического потока в клетках HepG2, после воздействия НК и НКЛ. Однако, ПЛМ вызванная действием НЧ усугубляется со временем и приводит к апоптозу. Таким образом, генетические особенности имеют решающее значение в определении характера клеточного ответа на воздействие НЧОЖ.

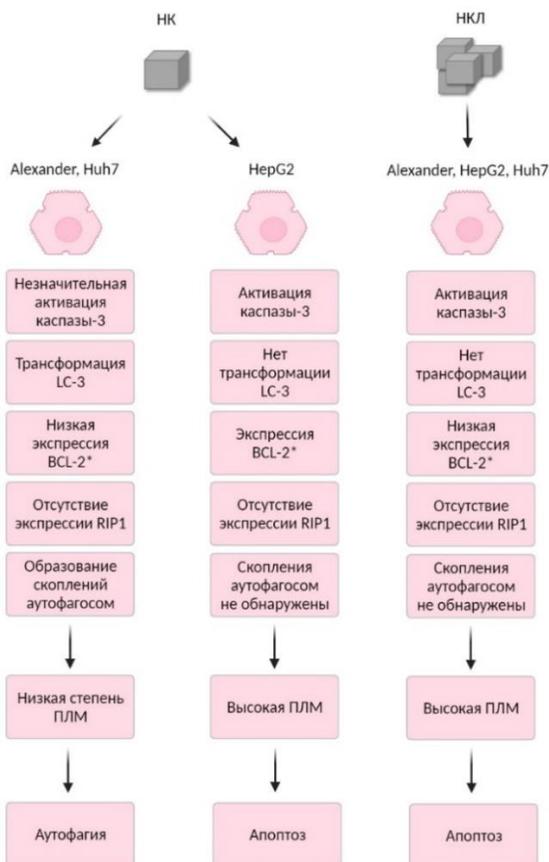


Рисунок 15. Схема индукции аутофагии и апоптоза в клетках Alexander, HepG2 и Huh7, после воздействия НК и НКЛ. Данные по экспрессии Bcl-2 представлены из литературных источников.

ВЫВОДЫ

1) НЧМ ингибируют жизнеспособность клеток Т-клеточной лимфомы человека, при этом цитотоксическое воздействие связано с их интернализацией в клетки Jurkat и сопутствующей генерацией АФК (оксидативным стрессом). Интернализация НЧМ приводит к увеличению гранулярности субпопуляций клеток Jurkat. Приложение внешнего постоянного МП умеренной напряжённости увеличивает цитотоксический эффект НЧМ.

2) Воздействие НЧМ вне источников магнитного поля и с приложением внешнего магнитного поля умеренной напряженности не оказывает цитотоксического воздействия на мононуклеарные клетки крови человека, в отличие от выраженного цитотоксического эффекта в клетках Jurkat.

3) Воздействие НК и НКЛ на клеточные линии Alexander, HepG2 и Nuh7 вызывает цитотоксический эффект, усиливающийся при повышении концентрации НЧ. Характер клеточного ответа зависит от формы НЧ - НК и НКЛ индуцируют различные виды клеточного ответа (апоптоз, аутофагия) опухолевых клеточных линий.

4) НК, вызывают более слабую пермеабиллизацию лизосомальных мембран, по сравнению с НКЛ, что приводит к аутофагии в клеточных линиях Alexander и Nuh7. НКЛ, напротив, индуцируют более интенсивную пермеабиллизацию лизосомальных мембран, что приводит к апоптозу в клетках Alexander и Nuh7, вызванного массивным повреждением мембран.

5) Характер клеточного ответа на воздействие НК и НКЛ зависит от генетических особенностей клеток. Это продемонстрировано на клеточной линии HepG2, обладающей повышенным уровнем экспрессии Bcl-2, ингибирующего процессы аутофагии. Данный фактор привёл к формированию апоптоза в клетках HepG2, после воздействия НК и НКЛ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus:

1. K. Levada. Progressive lysosomal membrane permeabilization induced by iron oxide nanoparticles drives hepatic cell autophagy and apoptosis / K. Levada, S. Pshenichnikov, A. Omelyanchik, V. Rodionova, A. Nikitin, A. Savchenko, I. Schetinina, D. Zhukov, M. Abakumov, A. Majouga, M. Lunova, M. Jirsa, B. Smolková, M. Uzhytchak, A. Dejneka, O. Lunov. // Nano convergence. – 2020. – Т. 7. – С. 1-17.

2. S. Pshenichnikov. Control of oxidative stress in Jurkat cells as a model of leukemia treatment / S. Pshenichnikov, A. Omelyanchik, M. Efremova, M.

Lunova, N. Gazatova, V. Malashchenko, O. Khaziakhmatova, L. Litvinova, N. Perov, L. Panina, D. Peddis, O. Lunov, V. Rodionova, K. Levada // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2021. – Т. 523. – С. 167623.

Публикации в изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России:

3. Пшеничников С.Е. Потенциал использования композитных нано- и микроматериалов в качестве агента для биомедицинских применений / Пшеничников С.Е., Моторжина А.В., Аникин А.А., Панина Л.В., Левада Е.В. // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2025. №1. С. 101—117.

Публикации в других изданиях и материалах конференций, индексируемых РИНЦ:

4. Пшеничников С.Е. Применение магнитных наночастиц в тераностике заболеваний печени и манипулировании одиночными клетками / Пшеничников С.Е., Ефремова М., Никитин А., Абакумов М.А., Мажуга А.Г., Дейнека А., Лунов О.Г., Невзорова Ю.А., Эстевез О., Колесникова В.Г., Родионова В.В., Левада Е.В. // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России, Сочи, 16–21 сентября 2019 года. Том 2. – Сочи: ООО Полиграфическое объединение «Плехановец», 2019. – С. 211-212.

5. Пшеничников С.Е. Особенности влияния магнитных полей постоянных магнитов, наличия наночастиц и ферромагнитных микропроводов на жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови человека и т-лимфоцитов клеточной линии Jurkat / Пшеничников С.Е., Шунькин Е.О., Малащенко В.В., Газатова Н.Д., Колесникова В.Г., Омелянчик А.С., Литвинова Л.С., Родионова В.В., Левада Е.В. // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России, Сочи, 16–21 сентября 2019 года. Том 2. – Сочи: ООО Полиграфическое объединение «Плехановец», 2019. – С. 70.