

## ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ИММУНОМАГНИТОЛИПОСОМ НА ПРИМЕРЕ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *Chlorella vulgaris*

© 2022 г. И. А. Колтаков<sup>1</sup>, Е. В. Шилова<sup>1,\*</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

\*E-mail: zinkovae@list.ru

Поступила в редакцию 01.06.2021 г.

После доработки 30.10.2021 г.

Принята к публикации 12.11.2021 г.

Получены иммуномагнитолипосомы состава фосфатидилхолин–холестерин–дистероилфосфоэтанолламин–полиэтиленгликоль (2000)–магнетит–антитела к гистону H3. Изучены их размерные характеристики методом динамического рассеяния света. Выявлено, что липосомальные наночастицы имеют размеры  $176.4 \pm 12.9$  нм. Получены данные о токсичности синтезированных наночастиц по отношению к культуре микроводорослей *Chlorella vulgaris*: липосомы при соотношениях клеток к липосомам от 1/1 до 1/1000 не оказывают токсического воздействия на выбранный объект, а в соотношении 1/1000 наблюдается стимуляция роста численности клеток изучаемой микроводоросли.

DOI: 10.56304/S1992722322020091

### ВВЕДЕНИЕ

Адресная доставка лекарственных препаратов является быстроразвивающимся направлением медицины. Исследователи ведут активный поиск новых способов адресной доставки и усовершенствования имеющихся технологий. Липосомы занимают особое место среди таких средств в силу того, что с их помощью возможно нивелировать токсические эффекты лекарственных препаратов на здоровые ткани [1–4]. Также ведутся исследования по созданию и возможному практическому применению липосом, содержащих в своем составе магнитовосприимчивые наночастицы (НЧ). Например, липосомы с включенными НЧ оксида железа показали свою эффективность при лечении железодефицитной анемии у крыс линии Wistar [5]. Перспективным представляется использование магнитоуправляемых липосом для адресной доставки лекарственных препаратов, при этом оксид железа может выступать в качестве МРТ-контрастирующего вещества.

Одним из возможных путей доставки противоопухолевых препаратов может быть их доставка к опухолевым клеткам посредством нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Исследование [6] показало, что при стимуляции форболмезистацетатом нейтрофилы формируют ретикулярную структуру ДНК вокруг клеток рака легких A549. Согласно [7] опухолевые клетки взаимодействуют со структурами НВЛ, адсорбируясь на них с помощью молекулы  $\beta 1$ -интегрина. Эти дан-

ные позволяют рассматривать НВЛ в качестве возможного средства доставки противоопухолевых препаратов. Местом взаимодействия липосом с НВЛ могут служить молекулы гистона H3, которые являются неотъемлемой частью внеклеточных сетей, но в свободном виде в кровеносном русле не циркулируют [8]. В связи с этим разработаны иммунолипосомы, функционализированные антителами к гистону H3 в качестве вектора.

Тем не менее одной из главных проблем при применении липосомальных НЧ является возможное токсическое воздействие на здоровые клетки и ткани в силу разрушения со временем липосомальных структур и “утечки” их содержимого. Поэтому оценка токсического воздействия используемых средств доставки лекарственных препаратов является необходимой частью исследований при их создании. Микроводоросль *Chlorella vulgaris* является удобным объектом для токсикологических исследований, так как у нее достаточно короткий цикл развития, составляющий 22 ч.

Цель исследования заключалась в изучении токсических свойств иммуномагнитолипосом, синтезированных в настоящей работе, по отношению к культуре микроводорослей *Chlorella vulgaris*. В качестве магнитовосприимчивого вещества использовали НЧ магнетита, покрытые цетилтриметиламмония бромидом, в качестве вектора присоединяли антитела к гистону H3.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Синтез наночастиц магнетита, стабилизированных цетилтриметиламмония бромидом.* НЧ магнетита получали модифицированным методом Массарта путем соосаждения солей железа(II) и железа(III) в щелочной среде [9]. В качестве осаждающего реагента использовали 1%-ный раствор аммиака (Вектон, Россия), от которого НЧ магнетита отмывали 3 раза дистиллированной водой. Поверхность полученных НЧ магнетита модифицировали цетилтриметиламмония бромидом (Sigma, США) в концентрации 0.06 М, после чего трижды отмывали НЧ дистиллированной водой и высушивали в лиофильной сушилке Labconco (США) в течение 3ч.

*Получение иммуномагнитолипосом.* Липосомы синтезировали методом гидратации/регидратации [10, 11]. Раствор фосфатидилхолина (0.5%) (Sigma, США), холестерина (0.5%) (Sigma, США) и дистероилфосфоэтанолламин–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-фосфатного буфера с НЧ магнетита (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  $t = 4^\circ\text{C}$ . Следующим этапом стала диспергация получаемых липосом, для чего растворы подвергали воздействию ультразвука. Облучение проводили в ультразвуком дезинтеграторе Qsonica Sonicators (США) в течение 15 мин (20 кГц, 10-секундный импульс с перерывом 3 с) [12].

*Изучение размеров синтезированных наночастиц методом динамического рассеяния света (ДРС).* Размер полученных липосом определяли с помощью спектрометра ДРС Zetasizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания). Измерения проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см при температуре 37°C.

*Расчет количества липосом.* Для оценки токсичности получаемых липосом необходимо контролировать их содержание в системе. Количество добавляемых к микроводорослям липосомальных НЧ рассчитывали согласно [13].

Количество молекул липидов на одну липосому рассчитывали по формуле

$$N_{\text{tot}} = \frac{4\pi\left(\frac{d}{2}\right)^2 + 4\pi\left(\frac{d}{2} - h\right)^2}{a}, \quad (1)$$

где  $N_{\text{tot}}$  – общее количество молекул липидов,  $d$  – диаметр липосом,  $h$  – толщина бислоя (около 5 нм),  $a$  – площадь “головки” липида 0.71 нм<sup>2</sup>,  $\pi$  – математическая константа, выражающая отношение длины окружности к длине ее диаметра.

Количество липосом в растворе вычисляли с учетом молярной массы липидов, входящих в состав липосомы, и их концентрации по формуле

$$N_{\text{lipo}} = \frac{(n_1 + n_2 + n_3)N_A}{N_{\text{tot}}}, \quad (2)$$

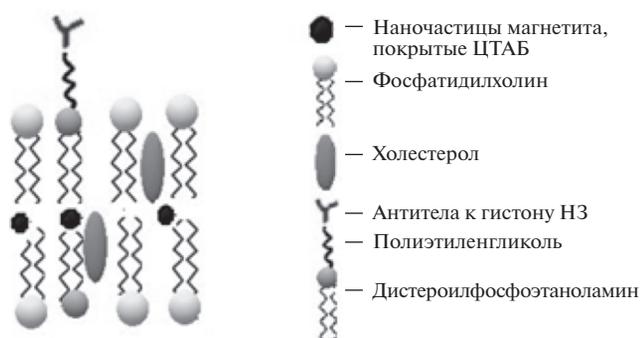
где  $N_{\text{lipo}}$  – число липосом;  $n_1, n_2, n_3$  – количество липидов (моль);  $N_{\text{tot}}$  – число молекул липидов в одной липосоме;  $N_A$  – число Авогадро –  $6.02 \times 10^{23}$ .

*Определение токсических свойств наночастиц на примере водоросли Chlorella vulgaris.* Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной в водной среде, не содержащей искусственных НЧ (контроль), и в водных дисперсных системах, содержащих тестируемые НЧ (опыт). Критерием токсичности НЧ является снижение на 20% и более величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 ч (при 37°C) в дисперсной системе 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 (процент) величиной прироста оптической плотности для дисперсионной среды по сравнению с контролем:

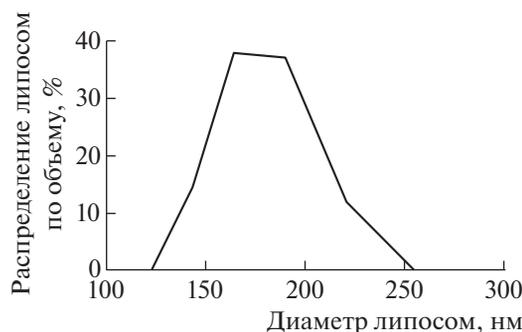
$$I = (\Delta D_{\text{к}} - \Delta D_{\text{дс}}) / \Delta D_{\text{к}} \times 100\%,$$

где  $\Delta D_{\text{к}}$  и  $\Delta D_{\text{дс}}$  – средние значения прироста оптической плотности в контроле и дисперсной системе соответственно [14]. Синтезированные иммуномагнитолипосомы добавляли к суспензии микроводорослей в соотношениях клетка/липосома = 1/1–1/1000, инкубировали 22 ч и определяли индекс токсичности. Измерения проводили при длине волны 650 нм. Концентрацию клеток хлореллы контролировали до и после инкубации во всех образцах. Подсчет концентрации клеток проводили с помощью камеры Горяева на микроскопе Микмед-2 (Ломо, Россия). Подсчитывали количество клеток в пяти больших квадратах камеры Горяева. В общее количество подсчитанных клеток включали все клетки, лежащие на верхней и левой сторонах квадрата камеры Горяева, но не учитывали клетки, расположенные на его нижней и правой сторонах [15].

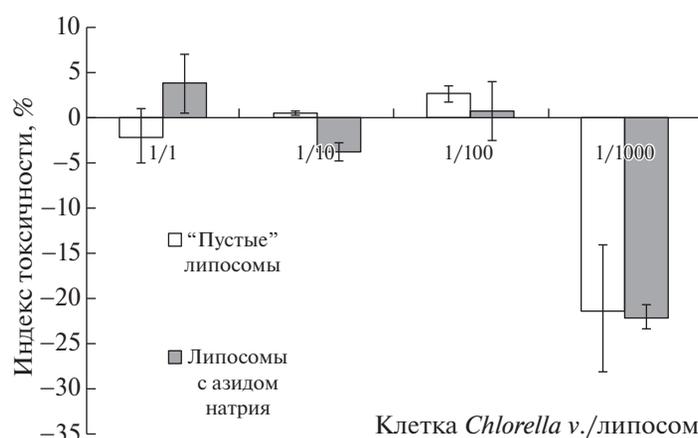
*Статистическую обработку данных* проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2010. Достоверность различий контрольных и опытных величин устанавливали с использованием  $t$ -критерия Стьюдента. В проце-



**Рис. 1.** Схематическое строение мембраны синтезированных магнитоиммунолипосом. ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид.



**Рис. 2.** Распределение по размерам липосом из соевого лецитина с включенными наночастицами магнетита.



**Рис. 3.** Определение индекса токсичности синтезированных иммуномагнитолипосом по отношению к микроводорослям *Chlorella vulgaris*.

дурах 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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структура полученных липосомальных НЧ представлена на рис. 1. Липидный бислой состоит из молекул фосфатидилхолина, холестерина и дистероилфосфоэтанолламин–полиэтиленгликоля (2000), к которому присоединены антитела к гистону H3. НЧ магнетита, покрытые цетилтри-

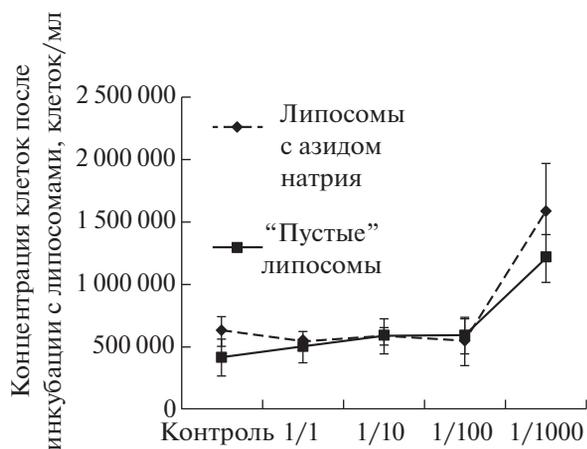
метиламмония бромидом ( $[C_{16}H_{33}N(CH_3)_3]Br$ ), встраиваются преимущественно в липидный бислой за счет взаимодействия поверхностно-активного вещества с используемыми липидами [16, 17].

Размер липосом контролировали методом ДРС. Исследование размера полученных липосом показало, что липосомальные НЧ имеют размеры  $176.4 \pm 12.9$  нм (рис. 2). Данный размер позволяет рассматривать полученные липосомы в качестве возможного средства адресной доставки лекарственных препаратов.

Токсическое действие липосом оценивали, добавляя синтезированные НЧ в соотношениях

**Таблица 1.** Индекс токсичности влияния синтезированных липосом на микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Клеток/липосом	1/1	1/10	1/100	1/1000
“Пустые” липосомы	$-2.16 \pm 3.06$	$0.51 \pm 0.11$	$2.61 \pm 0.99$	$-21.03 \pm 7.11$
Липосомы с азидом натрия	$3.83 \pm 3.28$	$-3.81 \pm 1.04$	$0.78 \pm 3.25$	$-22.14 \pm 1.32$



**Рис. 4.** Концентрация клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* после инкубации с магнитоиммунолипосомами.

клеток хлореллы/липосом от 1/1 до 1/1000. Исследовали влияние “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. Азид натрия — токсичное химическое вещество, накапливаясь в митохондриях, вызывает разобщение окислительного фосфорилирования [18]. 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 (рис. 3), что говорит об увеличении содержания хлорофилла в суспензии микроводорослей *Chlorella vulgaris*.

Подсчет концентрации клеток показал, что после инкубации в течение 22 ч в соотношении клетка/липосома = 1/1000 происходит статистически значимое увеличение количества клеток (рис. 4).

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

вой форме входит в состав реакционных центров фотосистем I и II [19, 20].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исучено влияние синтезированных иммуномагнитолипосом на клетки микроводорослей *Chlorella vulgaris*. Установлено, что полученные НЧ в исследуемом диапазоне концентраций (соотношения клетка к липосомам от 1/1 до 1/1000) не оказывают токсического эффекта на клетки микроводорослей. Таким образом, результаты имеют практическое значение для оценки биобезопасности липосом, а также для планирования доклинических оценок потенциала их использования в качестве средства адресной доставки лекарственных веществ.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балоян Б.М., Колмаков А.Г., Алымов М.И. и др. Наноматериалы. Классификация, особенности свойств, применение и технологии получения. Учебное пособие. М.: Международный университет природы, общества и человека “Дубна”, Филиал “Угреша”, 2007. 125 с.
2. Барышников А.Ю. // Вестн. РАМН. 2012. № 3. С. 23.
3. Краснопольский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шоболов Д.Л. и др. // Рос. хим. журн. 2012. Т. 56. № 3–4. С. 11.
4. Наквасина М.А., Артюхов В.Г. // Бионанотехнологии: достижения, проблемы, перспективы развития: учеб. пособие. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2015. С. 146.
5. Fathy M.M., Fahmy H.M., Balah A.M.M. et al. // Life Sci. 2019. V. 1. № 234. P. 116787. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116787>
6. Cools-Lartigue J., Spicer J., Najmeh S. // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71. № 21. P. 4179. <https://doi.org/10.1172/jci67484>
7. Najmeh S., Cools-Lartigue J., Rayes R.F. et al. // Int. J. Cancer. 2017. V. 140. P. 2321.
8. Коротина О.Л., Генералов И.И. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. № 4. С. 23.
9. Massart R. // IEEE Trans. Magn. 1981. V. 17. № 2. P. 1247.
10. Шилова Е.В., Колтаков И.А., Артюхов В.Г. // Сб. науч. Тр. VI Съезда биофизиков России: в 2 т., Т. 2. Сочи. 16–21 сентября 2019. Краснодар: Полиграфическое объединение “Плехановец”, 2019. С. 273.
11. Шилова Е.В., Артюхов В.Г., Скорбач Е.Д. и др. // Нанотехнологии: разработка, применение: XXI век. 2018. № 4. С. 9.

12. *Артюхов В.Г., Колтаков И.А., Шилова Е.В.* Способ получения липосом. Пат. 2621145. Россия. 2017.
13. *Huang C.H., Mason J.T.* // Proc. Nat. Acad. Sci. 1978. V. 75. № 1. P. 308.
14. 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.
15. *Путинцева О.В., Артюхов В.Г., Колтаков И.А.* // Иммунология. Практикум. Ч. II. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2008. 44 с.
16. *Hwan T.-L., Hsu C.-Y., Aljuffali I.A. et al.* // Colloids Surf. B. 2015. V. 128. P. 119. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.02>
17. *Cano-Sarabia M., Angelova A., Ventosa N. et al.* // J. Colloid Interface Sci. 2010. V. 350 (1). P. 10. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.04.069>
18. *Chang S., Lamm S.H.* // Int. J. Toxicol. 2003. V. 22. № 3. P. 175. <https://doi.org/10.1080/10915810305109>
19. *Venkatesan S., Murugesan S., Senthur-Pandian V.K. et al.* // Food Chem. 2005. V. 90. P. 535. <https://doi.org/10.7831/fas.3.1>
20. *Иванищев В.В.* // Изв. Тул. гос. ун-та. Естественные науки. 2019. № 3. С. 149.