

УДК 612.822:57.085.23

Сравнительный анализ действия антистоксовых нанофосфоров на нормальные и опухолевые клетки нервной системы

Т. А. Мищенко^{1,2*}, Е. В. Митрошина^{1,2}, А. С. Смышляева¹, Е. Л. Гурьев^{1,2}, М. В. Ведунова¹¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950 Россия²Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, 603005 Россия

*E-mail: saHarnova87@mail.ru

Поступила в редакцию 09.12.2019

Принята к печати 16.04.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11033

РЕФЕРАТ Глиома – наиболее агрессивный вид опухолей головного мозга. Высокая частота диагностируемых случаев глиомы, риск образования метастазов, низкая эффективность традиционной терапии и неутешительный прогноз для пациентов диктуют необходимость поиска альтернативных или комбинированных подходов к своевременной диагностике и лечению данной патологии. Особые перспективы связывают с применением антистоксовых нанофосфоров (НАФ). В настоящей работе получены и охарактеризованы НАФ, содержащие редкоземельные элементы иттербий и тулий. Эти НАФ имеют максимумы эмиссии фотолюминесценции в видимой и инфракрасной областях спектра, что дает возможность глубокой оптической визуализации опухолевых клеток в головном мозге. Исследована токсичность НАФ в отношении нормальных клеток нервной системы и клеток глиомы. Показано, что НАФ не оказывают цитотоксического действия на опухолевые клетки, однако в высоких концентрациях проявляют умеренный цитотоксический эффект в первичных нейрональных культурах, характеризующийся снижением жизнеспособности и изменением функциональной активности нейроглиальных сетей. Высокая перспективность применения НАФ в качестве люминесцентных маркеров делает необходимым изучение скорости накопления и выведения НАФ в опухолевых и здоровых клетках нервной системы, а также возможностей модификации поверхности наночастиц для снижения токсических эффектов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антистоксовые нанофосфоры, первичные культуры гиппокампа, глиома, U-251 MG, GL261, токсичность, функциональная нейросетевая активность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DIV – день развития культур *in vitro*; PBS – фосфатно-солевой буфер; PDI – индекс полидисперсности; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ДМСО – диметилсульфоксид; ИК – инфракрасный; НАФ – антистоксовые нанофосфоры; ПЭГ-ДГЭ – диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля; СМАОД – сополимер малеинового ангидрида с 1-октадеценом; ФЛ – фотолюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ

Многие годы нейроонкология остается одной из острых проблем здравоохранения. Согласно данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer) частота диагностируемых случаев опухолей головного мозга за 2016–2017 гг. составляет у мужчин 6–19 случаев, у женщин 4–18 случаев на 100 тысяч населения и имеет неуклонную тенденцию к росту. Глиомы являются наиболее распространенным и агрессивным типом опухолей головного мозга, для которых характерны минимальные сроки дожития (не более

5 лет), высокая частота образования метастазов и летальных исходов [1]. Оптимальный комплекс процедур, применяемых в настоящее время в клинической практике, включает микрохирургию, химиотерапию и радиотерапию [2, 3]. Тем не менее, эти методы не позволяют значительно увеличить продолжительность жизни пациентов или улучшить ее качество.

В рамках данной проблематики особые надежды связывают с применением наноматериалов. Благодаря своим малым размерам, многообразию конформаций, химической структуры ядра и оболочки наночастицы могут выполнять широкий спектр

задач. Так, наночастицы могут выступать в качестве носителя, осуществляющего направленную доставку лекарственного средства в опухолевый очаг. Наноразмерная система доставки способна проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), защищать химиотерапевтический агент от преждевременного распада, улучшать его фармакокинетику, а также снижать дозу активного вещества, минимизируя тем самым риск развития неспецифической токсичности [4]. В ряде экспериментальных исследований показано, что применение в терапии глиом наночастиц, загруженных доксорубицином [5], паклитакселом [6], а также комбинацией паклитаксела с ангиопепом (препаратом, облегчающим проникновение через ГЭБ сосудов самой опухоли) [7], обеспечивает специфичность накопления химиотерапевтического агента в клетках-мишенях, ингибирование роста и пролиферации опухолевых клеток и их гибель. Также ведутся работы по созданию наночастиц-носителей, способных индуцировать иммуногенную клеточную смерть. Формирование стойкого Т-клеточного адаптивного иммунного ответа позволяет эффективно устранять инфильтративные опухолевые клетки, которые могут стать одной из причин образования метастазов [8].

Наночастицы также могут выступать в качестве флуоресцентных маркеров, обеспечивающих визуализацию опухолевых клеток для определения четких границ резекции в ходе хирургического вмешательства. Особый интерес представляют антистоксовые нанофосфоры (НАФ). Помимо того, что НАФ могут использоваться в качестве носителей лекарственных средств [9], они являются фотолюминесцентными (ФЛ) наночастицами, способными преобразовывать низкоэнергетические фотоны в фотоны более высокой энергии. НАФ обладают уникальными фотофизическими свойствами и фотохимической стабильностью, которые обеспечивают возможность проведения глубокого биоимиджинга [10–13]. ФЛ НАФ возбуждаются инфракрасным (ИК) светом низкой интенсивности ($1-10^3$ Вт·см⁻²), попадающим в «окно прозрачности биологической ткани», а выраженные максимумы эмиссии ФЛ в видимой и ИК-области спектра позволяют минимизировать влияние автофлуоресценции ткани и рассеянного возбуждающего излучения на регистрацию целевого ФЛ-сигнала [14]. Объединение НАФ в комплексы с направляющими агентами, специфичными к маркерам на поверхности опухолевых клеток, позволяет визуализировать даже небольшие опухолевые очаги [15, 16].

Тем не менее, эффективность применения НАФ в клинической практике определяется в первую очередь отсутствием или низким уровнем токсичности

для здоровых нервных клеток. Риск интернализации НАФ в нормальные клетки и развитие токсических эффектов повышают возможность потери функционально значимых звеньев нейроглиальных сетей, что может привести к развитию неврологического дефицита и тяжелой инвалидизации пациента.

В настоящей работе синтезированы и охарактеризованы НАФ, легированные ионами иттербия и тулия ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$), изучено их токсическое действие на нормальные и опухолевые клетки нервной системы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез НАФ

НАФ состава $\text{NaY}_{0.794}\text{Yb}_{0.2}\text{Tm}_{0.006}\text{F}_4/\text{NaYF}_4$ синтезировали методом сольватотермического разложения как описано в работе [10]. Навески Y_2O_3 (0.794 мМ), Yb_2O_3 (0.2 мМ) и Tm_2O_3 (0.006 мМ) помещали в трехгорлую колбу, растворяли в 70% трифторуксусной кислоте при нагревании и перемешивании, затем охлаждали и выпаривали. К полученному преципитату добавляли трифторацетат натрия до 2.2 мМ и по 7.5 мл олеиновой кислоты и 1-октадецена, смесь инкубировали (30 мин при 100°C) при перемешивании под вакуумом, затем в течение 15 мин при 180°C при продувке аргоном. Смесь нагревали в сплаве Вуда до 343°C до помутнения раствора, затем инкубировали в течение 25 мин при 312°C до получения прозрачного раствора, далее температуру снижали до 210°C и добавляли 4 мл 1-октадецена. Полученные кристаллы (ядро) НАФ преципитировали изопропанолом, центрифугировали в течение 12 мин при 8000 g. Преципитат ресуспендировали в 3.5 мл гексана и трижды промывали 20 мл этанола.

К суспензии НАФ добавляли 60 мг трифторацетата натрия, 140 мг трифторацетата иттрия, 3 мл олеиновой кислоты и 3 мл 1-октадецена, смесь помещали в трехгорлую колбу и инкубировали в течение 30 мин при 100°C при перемешивании под вакуумом. Затем смесь инкубировали (15 мин при 170°C) при продувке аргоном. Смесь нагревали в сплаве Вуда до 290°C до помутнения раствора и в тех же условиях до приобретения прозрачности. Раствор охлаждали до 210°C и добавляли 3 мл 1-октадецена. Полученные НАФ, имеющие структуру ядро/оболочка, преципитировали и промывали, как описано выше, и ресуспендировали в хлороформе.

Исследование фотофизических свойств НАФ

Спектр эмиссии фотолюминесценции НАФ получали с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (SOLAR, Беларусь) и внешнего полупроводникового лазерного модуля АТС-С4000-200АМF-980-5-F200

с длиной волны 978 нм («Полупроводниковые приборы», Россия).

Измерение гидродинамического диаметра НАФ

Гидродинамический диаметр НАФ измеряли методом динамического светорассеяния с использованием системы Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) согласно рекомендациям производителя.

Модификация поверхности НАФ

Покрытие НАФ полимерной оболочкой проводили как описано в [17]. К 50 мкл суспензии НАФ в хлороформе (50 мг/мл) добавляли 130 мкл раствора сополимера малеинового ангидрида и 1-октадецена (СМАОД) в хлороформе (8 мг/мл). Смесь обрабатывали ультразвуком в течение 30 с и инкубировали при перемешивании до испарения 4/5 объема. Суспензию добавляли по каплям к 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), перемешивали и обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин до полного испарения хлороформа. НАФ трижды отмывали PBS, добавляли 40 мкл раствора ПЭГ-ДГЭ в деионизированной воде (15 мг/мл), перемешивали, обрабатывали ультразвуком в течение 10 с. Смесь инкубировали (30 мин при 80°C), периодически перемешивая и обрабатывая ультразвуком. Полученную суспензию ПЭГ-ДГЭ дважды отмывали PBS.

Культивирование клеток постоянных клеточных линий глиомы

Клетки постоянной клеточной линии глиомы мыши GL261 культивировали согласно паспорту культуры в среде DMEM с добавлением 4.5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия), 2 mM глутамина («ПанЭко»), 0.11 г/л пирувата натрия (Life Technologies, США) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко»). По завершении периода экспоненциального роста клетки снимали раствором версен-трипсина (3 : 1) и пересевали. Кратность посева составляла 1 : 10, плотность посева – 1.0×10^5 клеток/мл.

Клетки постоянной клеточной линии глиомы человека U-251 MG культивировали согласно паспорту культуры в среде DMEM («ПанЭко») с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко»). По завершении периода экспоненциального роста, клетки снимали раствором версен-трипсина (3 : 1) и пересевали. Кратность посева 1 : 5, плотность посева – 1.0×10^5 клеток/мл.

Экспериментальные работы с клетками глиомы проводили после третьего пассажа. Жизнеспособность культур поддерживали в условиях CO₂-инкубатора Shellab (Sheldon Manufacturing, США) при температуре 35.5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂.

Культивирование первичных культур клеток гиппокампа

Первичные нейрональные культуры получены от эмбриональной ткани гиппокампа мышей линии SHK (18 день гестации) в соответствии с протоколом, описанным в работе [18]. Работу с экспериментальными животными проводили согласно «Правилам для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Россия, 2010), «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), с неукоснительным соблюдением этических принципов, установленных Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). На проведение экспериментальных исследований на животных получено разрешение биоэтической комиссии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Эвтаназия беременных самок осуществлялась путем дислокации шейных позвонков. Далее из полости матки извлекали эмбрионы. Ткань гиппокампа подвергали механической, а затем ферментативной диссоциации с помощью 20-минутной инкубации в 0.25% растворе трипсина (Life Technologies, США). Полученную суспензию клеток наносили на покровные стекла (18 × 18 мм), предварительно обработанные положительно заряженным гидрофильным полиэтиленимином (1 мг/мл, Sigma Aldrich, США) для обеспечения эффективного прикрепления клеток к субстрату. Исходная плотность клеток составляла 4500 клеток/см². Первичные нейрональные культуры культивировали в CO₂-инкубаторе Shellab (Sheldon Manufacturing, США) при температуре 35.5°C и в газовой смеси, содержащей 5% CO₂, в течение 21 дня. Особенности формирования нейроглиальных сетей первично оценивали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ токсичности НАФ в отношении первичных нейрональных культур и постоянных клеточных линий глиомы

Клетки постоянных клеточных линий U-251 MG и GL261 высевали на тонкодонный 48-луночный планшет в количестве 1.0×10^4 клеток на лунку. На первые сутки после начала культивирования в культуральную среду добавляли НАФ в концентрациях: 1, 10, 25, 50, 100 мкг/мл.

Цитотоксичность НАФ в отношении опухолевых клеток оценивали через 24 ч после начала инкубации с использованием МТТ-теста [19, 20]. В среду культивирования вносили тетразолиевый краситель

Шкала цитотоксичности согласно ГОСТ Р ИСО 10993-5:2009

Шкала цитотоксичности	Количество мертвых клеток в культуре, %	Интерпретация
0	0–10	Не цитотоксичный
1	10–20	Легкая цитотоксичность
2	20–30	Средняя цитотоксичность
3	более 30	Значительная цитотоксичность

3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид в концентрации 0.5 мг/мл, который при участии NADH-зависимых дегидрогеназ жизнеспособных клеток восстанавливается до окрашенного водонерастворимого формазана. По истечении 60-минутной инкубации культуральную среду сливали, кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Оптическую плотность раствора измеряли с использованием планшетного спектрофотометра Epoch (Biotek, США) на длинах волн 570 и 620 нм. Количество жизнеспособных клеток ($N_{ж}$, %) рассчитывали по формуле:

$$N_{ж} = E_{опыта} / E_{контроля} \times 100\%$$

На 14 день культивирования первичных культур гиппокампа в культуральную среду добавляли раствор НАФ в аналогичных концентрациях. Жизнеспособность клеток оценивали на 3 и 7 сутки после добавления НАФ согласно [21], по соотношению количества мертвых клеток, окрашенных флуоресцентным красителем пропидий йодидом (Sigma Aldrich, США), и общего количества клеток, окрашенных флуоресцентным красителем бисбензимидами (Sigma-Aldrich). Пропидий йодид (5 мкг/мл) и бисбензимида (1 мкг/мл) добавляли в среду культивирования за 30 мин до оценки жизнеспособности. Клетки визуализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss, объектив 10×/0.2 Ph1).

Дополнительно проводили качественную оценку цитотоксических эффектов с использованием шкалы цитотоксичности (таблица).

Анализ влияния НАФ на функциональную метаболическую кальциевую активность первичных нейрональных культур

Особенности функциональной кальциевой активности первичных культур клеток гиппокампа на фоне применения НАФ оценивали методом кальциевого

имиджинга. Этот метод позволяет детектировать изменения концентрации ионов цитоплазматического Ca^{2+} , одного из ключевых регуляторов метаболических каскадов в клетке, а также проводить тонкий анализ функциональной активности как нейронов, так и глии [22, 23]. Кальциевые события детектировали с помощью специфического кальциевого красителя Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB1) (Invitrogen, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss). Флуоресценцию OGB1 возбуждали излучением аргонного лазера с $\lambda = 488$ нм, регистрировали с помощью светофильтра с полосой пропускания 500–530 нм. Анализ кальциевых событий проводили с помощью программы Astroscanner (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2014662670). Учитывали следующие параметры: длительность Ca^{2+} -осцилляций (с), частота Ca^{2+} -осцилляций (количество кальциевых событий/мин), количество работающих клеток в культуре (%).

Статистическая обработка данных

Данные представляли как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Статистическую значимость различий между экспериментальными группами определяли с помощью пакета ANOVA в программе SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез и исследование свойств НАФ

НАФ, имеющие структуру ядро/оболочка, $NaY_{0.794}Yb_{0.2}Tm_{0.006}F_4/NaYF_4$ были синтезированы методом сольватотермического разложения с дополнительной термической обработкой, что позволило перевести их из кубической (α -фаза) в более стабильную β -гексагональную фазу, отличающуюся значительно более высоким коэффициентом ап-конверсии и более яркой ФЛ [11, 24, 25]. Для легирования матрицы $NaYF_4$ использовали ионы трехвалентных лантаноидов – иттербия Yb^{3+} и тулия Tm^{3+} , что позволило получить НАФ с максимумами эмиссии ФЛ в синей области (на длине волны 474 нм) и в ИК-области (на длине волны 801 нм) при возбуждении на длине волны 980 нм (рис. 1А). Наличие инертной оболочки из $NaYF_4$ в несколько раз увеличивает интенсивность ФЛ НАФ в связи с отсутствием в таких структурах ядро/оболочка поверхностных эффектов тушения [11]. Интенсивная полоса в ИК-области спектра (801 нм) попадает в окно оптической прозрачности биоткани, что обеспечивает максимально чувствительную фоторегистрацию излучения на этой длине волны в слое биоткани глубиной до 1 см [26, 27].

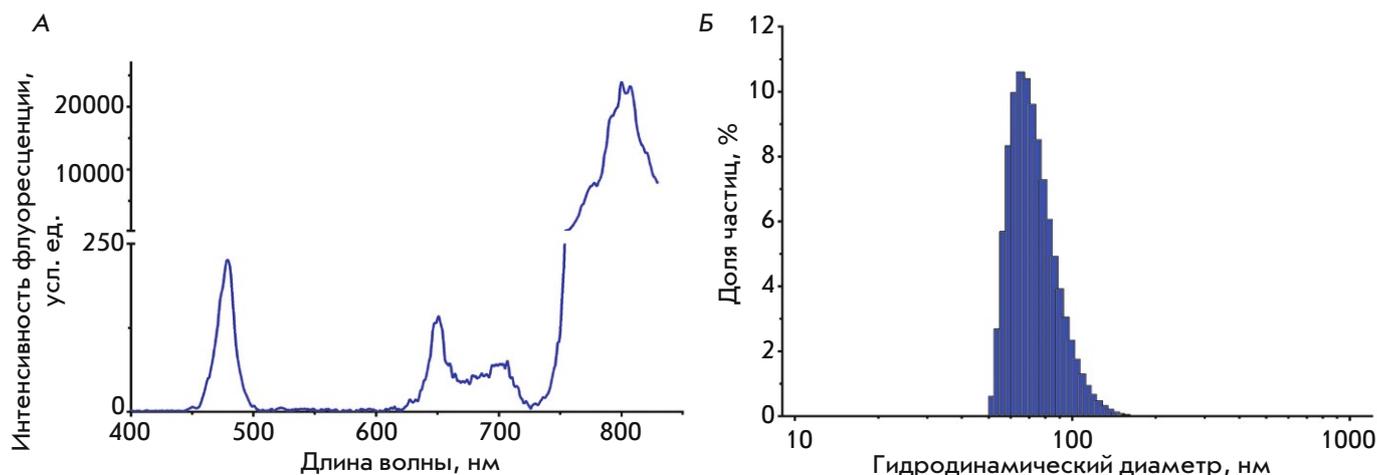


Рис. 1. Свойства НАФ состава $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$. А – спектр эмиссии ФЛ НАФ при возбуждении на длине волны 980 нм. Б – распределение по размерам НАФ с поверхностью, модифицированной СМАОД и ПЭГ-ДГЭ

Синтезированные НАФ $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ несут на поверхности гидрофобные олеиновые группы. Гидрофобные поверхностные свойства наночастиц делают их нестабильными в водных растворах и не биосовместимыми. Для стабилизации и увеличения биологической совместимости НАФ были гидрофилизированы путем покрытия оболочкой из амфифильного чередующегося сополимера малеинового ангидрида с 1-октадеценом (СМАОД). При этом гидрофобные цепи молекул СМАОД взаимодействуют с гидрофобными остатками олеата, в то время как образующиеся карбоксильные группы СМАОД остаются экспонированными на поверхности покрытия НАФ, делая ее гидрофильной [10].

Для дополнительной стабилизации структуры оболочки НАФ был использован диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДГЭ). Эпоксигруппы ПЭГ-ДГЭ реагируют с карбоксильными группами СМАОД, в результате чего ПЭГ-ДГЭ встраивается в структуру полимерной оболочки НАФ, увеличивая их коллоидную стабильность [17]. Гидродинамический диаметр НАФ, покрытых СМАОД, составил 119 ± 9 нм с индексом полидисперсности (PDI) 0.662. После присоединения ПЭГ-ДГЭ средний гидродинамический диаметр НАФ снизился до 75 ± 15 нм при PDI = 0.136 (рис. 1Б), что говорит об уплотнении оболочки и коллоидной стабилизации НАФ.

Таким образом, конфигурация и химический состав полученных НАФ позволяют расположить максимумы возбуждения и эмиссии флуоресценции в инфракрасной области спектра, что соответствует «окну прозрачности биологической ткани». Данное свойство НАФ позволит четко визуализировать клетки-мишени даже в глубоких слоях головного

мозга. В недавних исследованиях фотолюминесцентных характеристик схожих по химическому составу НАФ ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$) установлено, что с использованием лазерной сканирующей или широкопольной флуоресцентной микроскопии возможно проведение высокоразрешающей, высококонтрастной и высокоскоростной визуализации опухолевых клеток с большой долей специфичности [28, 29].

Тем не менее, ключевое требование, предъявляемое к любому флуоресцентному агенту, – отсутствие или минимальный уровень токсичности для клеток, не являющихся его мишенями, поэтому на следующем этапе исследований оценили цитотоксичность синтезированных НАФ в отношении нормальных и опухолевых клеток нервной системы.

Анализ токсичности НАФ в отношении клеток глиомы U-251 MG и GL261

Анализ цитотоксичности НАФ в отношении клеток постоянных клеточных линий глиомы человека (U-251 MG) и мыши (GL261) показал, что НАФ в использованных концентрациях не оказывает выраженного токсического действия на опухолевые клетки (рис. 2). Морфология и интенсивность пролиферации клеток линий U-251 MG и GL261 были сравнимы с контрольной группой. В поле зрения визуализировались активно делящиеся клетки, а также единичные клеточные элементы, отделенные от субстрата культивирования и свободно плавающие в культуральной среде, характеризующие одну из стадий развития монослоя.

Оценка жизнеспособности клеток в культуре глиомы человека U-251 MG с помощью МТТ-теста не выявила статистически значимых отличий от кон-

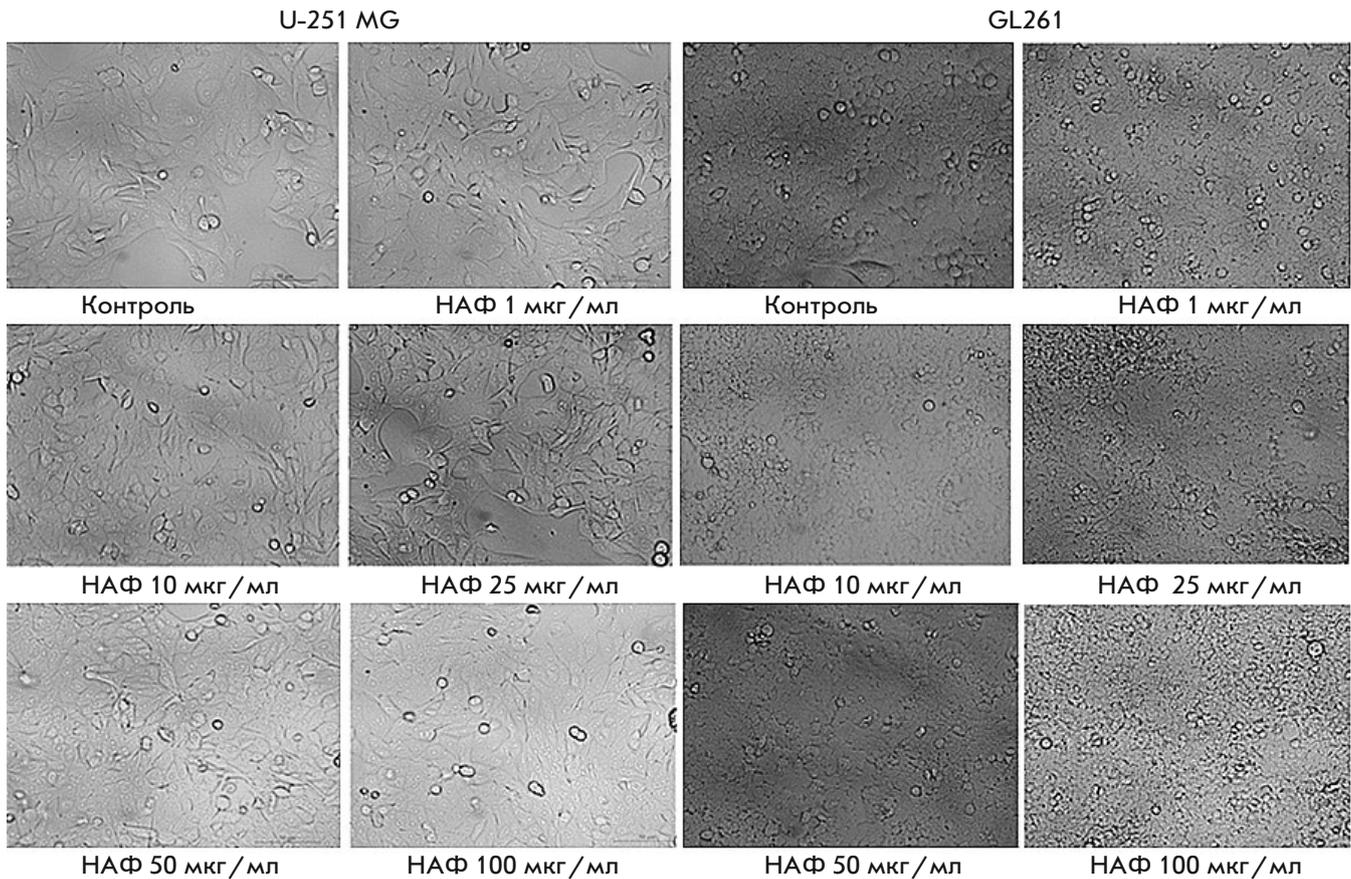


Рис. 2. Характерные широкопольные световые микроскопические изображения культур постоянных клеточных линий глиомы человека U-251 MG и мыши GL261 после 24 ч инкубации с НАФ

трольной группы (рис. 3). Легкий цитотоксический эффект на клетки глиомы мыши GL261 наблюдали только при использовании НАФ в концентрации более 50 мкг/мл. Количество жизнеспособных клеток в группе «НАФ 50 мкг/мл» составило $85.5 \pm 7.1\%$, в группе «НАФ 100 мкг/мл» – $83.9 \pm 7\%$.

Анализ токсичности НАФ в отношении первичных культур клеток гиппокампа

Токсические эффекты НАФ в нормальных клетках нервной системы оценивали на первичных культурах гиппокампа. В ранних работах авторов было показано, что первичные нейрональные культуры могут выступать в качестве адекватной биологической модели нейроглиальных сетей головного мозга *in vitro* [30]. Анализ токсичности проводили на 3 и 7 дни после добавления НАФ. Отсроченная оценка цитотоксичности связана с особенностями метаболизма здоровых нервных клеток, а также с более длительным развитием процессов деградации. Так, под действием токсического агента гибель основной доли клеток происходит в течение первых 3 суток после воздействия, в то время как к 7 суткам гибнут клетки, утратившие

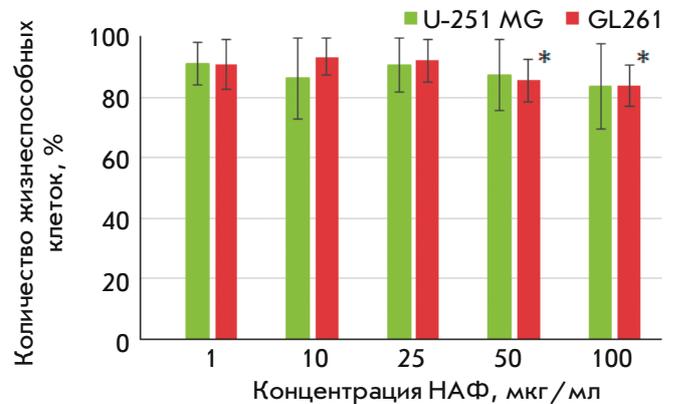


Рис. 3. Влияние НАФ на жизнеспособность клеток глиомы человека U-251 MG и мыши GL261 после 24 ч инкубации с НАФ. Данные представлены в % относительно группы «Контроль», * – значения достоверны относительно группы «Контроль», $p < 0.05$, ANOVA

большое количество связей и вследствие этого получившие внутренний сигнал на программируемую гибель [21].

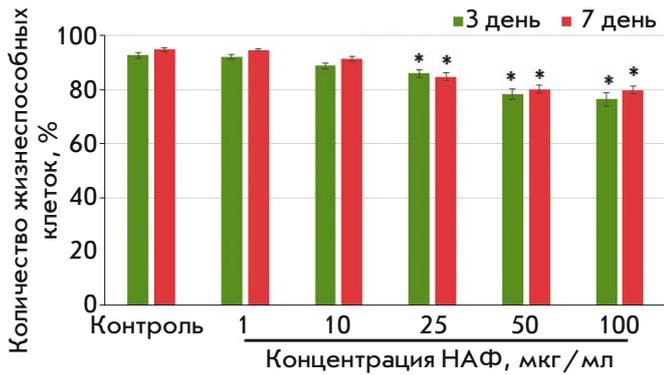


Рис. 4. Влияние НАФ на жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа в течение 7 суток после начала инкубации. * – значения достоверны относительно группы «Контроль», $p < 0.05$, ANOVA

В результате проведенного анализа показано, что применение НАФ в концентрации 1 и 10 мкг/мл не влияет на жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа. На 3 и 7 дни после добавления НАФ количество мертвых клеток в экспериментальных группах не отличалось от значений в контроле. Проявление цитотоксических эффектов отмечено в группах культур, в которых НАФ применяли в концентрациях свыше 25 мкг/мл. На 7 день после добавления НАФ количество жизнеспособных клеток в группе «НАФ 25 мкг/мл» составило $84.9 \pm 1.5\%$, что согласно шкале цитотоксичности соответствует проявлению легкого цитотоксического воздействия. В группах НАФ в концентрации 50 и 100 мкг/мл количество жизнеспособных клеток в первичных культурах составило 80.2 ± 1.4 и $79.9 \pm 1.4\%$ соответственно, что характерно для среднего цитотоксического эффекта (рис. 4).

Таким образом, НАФ не оказывали выраженного цитотоксического действия на клетки глиомы, однако вызывали умеренный цитотоксический эффект в нормальных клетках нервной системы. В ряде работ по изучению влияния различных концентраций НАФ на основе редкоземельных элементов показано, что эти наноматериалы вызывают гибель от 5 до 20% популяции опухолевых клеток [31–33]. Низкий уровень цитотоксичности связан, в основном, с высоким уровнем метаболизма опухолевых клеток, а также с их высокой устойчивостью к различным фармакологическим воздействиям.

Структура ткани головного мозга характеризуется выраженной гетерогенностью клеточного состава. Наиболее чувствительными к действию фармакологических и флуоресцентных агентов являются нейроны. В первую очередь, это связано с низким уровнем адаптационных возможностей, что в большей степени обусловлено неполноценностью анти-

оксидантных ферментативных систем клеток данного типа. Поскольку нейронные сети мозга отвечают за обработку, хранение и передачу информации, гибель 20% функционально значимых клеток может оказаться критической. Потеря элементов нейроглиальных сетей с высокой долей вероятности приведет к полной элиминации нейросетевой активности и, следовательно, нарушению функций центральной нервной системы.

В связи с этим изучено влияние НАФ $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ на функциональную кальциевую активность клеток первичных культур гиппокампа.

Исследование действия НАФ на функциональную активность нейроглиальных сетей первичных культур гиппокампа

Исследование функциональной активности клеток первичных культур гиппокампа в присутствии НАФ методом кальциевого имиджинга показало, что высокие концентрации НАФ вызывают выраженные изменения спонтанной кальциевой активности нейроглиальных сетей (рис. 5А–В). Выявлено статистически значимое снижение содержания (%) «работающих» клеток на 3 и 7 дни после добавления НАФ в концентрации 10 мкг/мл и выше (рис. 5Г). Наиболее выраженный эффект отмечен в группе «НАФ 100 мкг/мл», содержание работающих клеток в которой равно $40.4 \pm 3.4\%$, что в 2.2 раза ниже значений в интактной группе.

Кроме того, применение высоких концентраций НАФ приводило к снижению длительности кальциевых осцилляций. К 7 дню эксперимента величина данного параметра в группах с применением НАФ в концентрациях 25, 50 и 100 мкг/мл составила 3.9 ± 0.2 , 3.7 ± 0.2 и 5.8 ± 0.3 с соответственно, что достоверно отличалось от значений в интактной группе (рис. 5Д). Частота кальциевых осцилляций также значимо изменялась при применении НАФ в концентрации 10 мкг/мл и выше. В концентрации 100 мкг/мл НАФ способствовали статистически значимому снижению частоты кальциевых осцилляций, что, по всей видимости, связано с гибелью большого количества функционально активных клеток в культуре.

Таким образом, НАФ в концентрациях 25, 50 и 100 мкг/мл оказывают умеренный токсический эффект на клетки первичных культур гиппокампа, проявляющийся в снижении жизнеспособности и значимых изменениях функциональной активности нейроглиальных сетей. Ранее было показано, что токсические свойства наночастиц во многом определяются химическим составом оболочки [34]. В связи с этим перспективной представляется разработка новых типов покрытий для НАФ, способствующих снижению токсичности для нормальных клеток нерв-

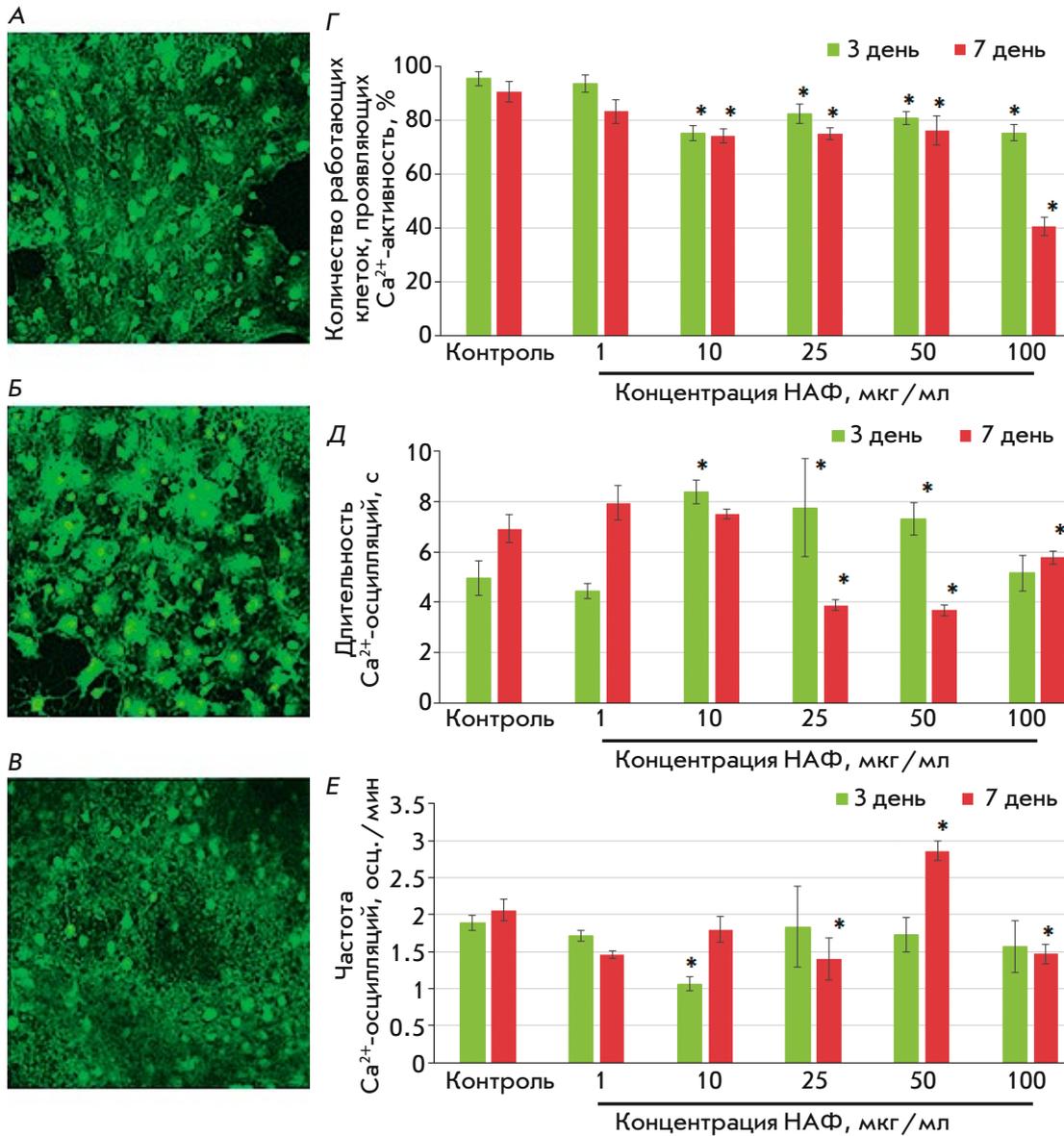


Рис. 5. Особенности функциональной кальциевой активности клеток первичных культур гиппокампа на фоне применения НАФ. А–В – репрезентативные конфокальные изображения первичных культур гиппокампа, окрашенных Oregon Green 488 ВАРТА-1: А – контроль; Б – НАФ, 10 мкг/мл; В – НАФ, 100 мкг/мл. Г–Е – основные параметры спонтанной кальциевой активности первичных культур гиппокампа: Г – доля клеток, проявляющих активность; Д – длительность кальциевых осцилляций; Е – частота кальциевых осцилляций. * – различия достоверны относительно группы «Контроль», $p < 0.05$, ANOVA

ной системы и повышению эффективности как тераностического агента относительно онкотрансформированных клеток. Создание мультимодальных гибридных структур на основе НАФ [35] существенно расширяет возможности их использования для онкотераностики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физико-химические свойства НАФ, легированных ионами иттербия и тулия ($\text{NaY}_{0.794}\text{Yb}_{0.2}\text{Tm}_{0.006}\text{F}_4$), позволяют использовать их в качестве агентов для проведения глубокой оптической визуализации опухолевых клеток в головном мозге. Установлено, что НАФ не оказывают цитотоксического действия на опухолевые клетки (клетки глиомы), однако в высоких концентрациях проявляют цитотоксический

эффект на первичные нейрональные культуры, характеризующийся снижением жизнеспособности клеток и изменением функциональной активности нейроглиальных сетей. Таким образом, перспективность применения НАФ в качестве флуоресцентных маркеров делает необходимым изучение скорости накопления и выведения НАФ в опухолевых и здоровых клетках нервной системы, а также возможности модификации поверхности наночастиц с целью снижения токсических эффектов. ●

Работа выполнена в рамках проекта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-29-01055), а также при поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-1485.2019.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tykocki T., Eltayeb M. // *J. Clin. Neurosci.* 2018. V. 54. P. 7–13.
2. Bush N.A., Chang S.M., Berger M.S. // *Neurosurg. Rev.* 2017. V. 40. № 1. P. 1–14.
3. Platten M., Bunse L., Wick W., Bunse T. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2016. V. 65. № 10. P. 1269–1275.
4. Frosina G. // *Nanomedicine.* 2016. V. 12. № 4. P. 1083–1093.
5. Cheng Y., Dai Q., Morshed R.A., Fan X., Wegscheid M.L., Wainwright D.A., Han Y., Zhang L., Auffinger B., Tobias A.L., et al. // *Small.* 2014. V. 10. № 24. P. 5137–5150.
6. Hu Q., Gao X., Gu G., Kang T., Tu Y., Liu Z., Song Q., Yao L., Pang Z., Jiang X., et al. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 22. P. 5640–5650.
7. Xin H., Sha X., Jiang X., Zhang W., Chen L., Fang X. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 32. P. 8167–8176.
8. Mishchenko T., Mitroshina E., Balalaeva I., Krysko O., Vedunova M., Krysko D.V. // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2019. V. 1871. № 1. P. 99–108.
9. Fan W., Shen B., Bu W., Chen F., He Q., Zhao K., Zhang S., Zhou L., Peng W., Xiao Q., et al. // *Biomaterials.* 2014. V. 35. № 32. P. 8992–9002.
10. Mironova K.E., Khochenkov D.A., Generalova A.N., Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. // *Nanoscale.* 2017. V. 9. № 39. P. 14921–14928.
11. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Russian Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 1277–1296.
12. Sreenivasan V.K., Zvyagin A.V., Goldys E.M. // *J. Phys. Condens. Matter.* 2013. V. 5. № 19. P. 1–23.
13. Dou Q., Idris N.M., Zhang Y. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 6. P. 1722–1731.
14. Chen J., Zhao J.X. // *Sensors.* 2012. V. 12. № 3. P. 2414–2435.
15. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // *Молекуляр. биология.* 2017. Т. 51. № 6. С. 907–926.
16. Xiong L., Chen Z., Tian Q., Cao T., Xu C., Li F. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 21. P. 8687–8694.
17. Generalova A.N., Rocheva V.V., Nechaev A.V., Khochenkov D.A., Sholina N.V., Semchishen V.A., Zubov V.P., Koroleva A.V., Chichkov B.N., Khaydukov E.V. // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 30089–30097.
18. Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E., Perminova M., Pimashkin A., Zakharov Y., Dityatev A., Mukhina I. // *Front. Cell Neurosci.* 2013. V. 7. Article 149. P. 1–10.
19. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
20. Алясова А.В., Терентьев И.Г., Цыбусов С.Н., Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Шахова К.А., Конторщикова К.Н. // *Современные технологии в медицине.* 2017. Т. 9. № 2. С. 145–149.
21. Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015. V. 2015. P. 1–9.
22. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., Астраханова Т.А., Прохорова М.В., Ведунова М.В. // *Биол. мембраны.* 2018. Т. 35. № 2. С. 104–114.
23. Zakharov Y.N., Mitroshina E.V., Shirokova O.M., Mukhina I.V. // *Springer Proc. Math. Stat. Model. Algorithms Technol. Netw. Anal.* 2013. V. 32. P. 225–232.
24. Wang F., Han Y., Lim C.S., Lu Y., Wang J., Xu J., Chen H., Zhang C., Hong M., Liu X. // *Nat. Lett.* 2010. V. 463. P. 1061–1065.
25. Suyver J.F., Aebischer A., Biner D., Gerner P., Grimm J., Heer S., Kramer K.W., Reinhard C., Gudel H.U. // *Optical Materials.* 2005. V. 27. P. 1111–1130.
26. Chen G.Y., Shen J., Ohulchansky T.Y., Patel N.J., Kutikov A., Li Z.P., Song J., Pandey R.K., Agren H., Prasad P.N., Han G. // *ACS Nano.* 2012. V. 6. P. 8280–8287.
27. Nyk M., Kumar R., Ohulchansky T.Y., Bergey E.J., Prasad P.N. // *Nano Lett.* 2008. V. 8. № 11. P. 3834–3838.
28. Смышляева А.С., Гурьев Е.Л., Костюк А.Б., Воденеев В.А., Деев С.М., Звягин А.В. // *Актуальные вопросы биологической физики и химии.* 2018. Т. 3. № 4. С. 840–846.
29. Kostyuk A.B., Guryev E.L., Vorotnov A.D., Sencha L.M., Peskova N.N., Sokolova E.A., Liang L., Vodeneev V.A., Balalaeva I.V., Zvyagin A.V. // *Sovrem. Technol. Med.* 2018. V. 10. № 1. P. 57–63.
30. Широкова О.М., Фрумкина Л.Е., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Захаров Ю.Н., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В. // *Современные технологии в медицине.* 2013. Т. 5. № 2. С. 6–13.
31. Chatterjee D.K., Gnanasammandhan M.K., Zhang Y. // *Small.* 2010. V. 6. № 24. P. 2781–2795.
32. Haase M., Schäfer H. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011. V. 50. № 26. P. 5808–5829.
33. Zhou J., Liu Z., Li F. // *Chem. Soc. Rev.* 2012. V. 41. № 3. P. 1323–1349.
34. Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Ponomareva N.V., Yuditsev A.V., Generalova A.N., Deyev S.M., Mukhina I.V., Semyanov A.V., Zvyagin A.V. // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 33656–33665.
35. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., et al. // *PNAS.* 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.