

НАНОБИОФИЗИКА

NANOBIOPHYSICS

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО ПРОИЗВОДНОГО ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ F-828 НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ГИБЕЛЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКАСергеева В.А.¹, Костюк С.В.¹, Ершова Е.С.¹, Каменева Л.В.¹, Малиновская Е.М.¹, Трошин П.А.², Вейко Н.Н.¹¹ФГБУН «Медико-генетический Научный Центр»*Москворечье, 1, г. Москва, 115478, РФ*²Институт проблем химической физики РАН*пр. Аккад. Семенова, 1, г. Черноголовка, 142432, РФ**e-mail: tracytheplane@gmail.com*

Аннотация. В последнее время все больше внимания в мире уделяется нанотехнологиям. Применение наноматериалов в медицине сопряжено с определенными рисками, связанными с воздействием этих материалов на клетки человека. О влиянии на клетки человека таких наносоединений, как фуллерены, известно очень мало. Для использования новых производных фуллерена в медицине необходимо охарактеризовать общий ответ клеток на присутствие различных концентраций фуллерена в среде. В данной работе исследовано влияние одного из представителей этого класса – производного фуллерена C₆₀ F-828, содержащего 3-фенилпропионильные заместители и атом хлора на эмбриональные фибробласты легкого человека (ФЛЭЧ). Было обнаружено, что исследуемое соединение увеличивает пролиферативную активность ФЛЭЧ в диапазоне концентраций 4 нМ - 0.1 мкМ. Все исследованные концентрации вызывают повреждения ДНК и усиливают процессы репарации. В концентрациях, превышающих 20 мкМ, исследованное соединение вызывает некротическую клеточную смерть, блокируя апоптоз и, таким образом, является цитотоксичным.

Ключевые слова: наномедицина, фуллерены, некроз, ФЛЭЧ

THE EFFECT OF WATER SOLUBLE F-828 [C₆₀] FULLERENE DERIVATIVE ON PROLIFERATION AND CELL DEATH OF HUMAN EMBRYONIC LUNG FIBROBLASTSSergeeva V.A.¹, Kostyuk S.V.¹, Ershova E.S.¹, Kameneva L.V.¹, Malinovskaya E.M.¹, Troshin P.A.², Veiko N.N.¹¹Federal State Budgetary Institution "Research Centre For Medical Genetics"*Moskvorechie, 1, Moscow, 115478, Russia*²Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, ICP RAS*Acad. Semenov av., 1, Chernogolovka, 142432, Russia**e-mail: tracytheplane@gmail.com*

Abstract. It is a matter of common knowledge that C₆₀ fullerenes and their derivatives have antioxidant properties due to their chemical structure. Studies show that these substances also possess antiviral and anticancer activity, moreover, they are under studies as potential nanocarriers for drug delivery across biological barriers. But the effect of such derivatives on human cells is still controversially discussed and needs further investigation. Here we assessed the time-dependent effect of a water soluble fullerene derivative that contains five residues of 3-phenylpropionic acid and a chlorine substituent attached to the carbon cage (F-828) on human embryonic lung fibroblasts (HELFS). Investigated substance increases proliferation of HELFS in concentration range 4 nM - 0.1 μM. All concentrations of F-828 cause DNA damage and give rise to reparation process. In concentrations exceeding 20 μM F-828 causes necrotic cell death, blocks apoptosis, and is therefore cytotoxic.

Key words: fullerene derivatives, necrosis, HELFS

Введение. Фуллерены – группа молекулярных соединений, принадлежащих к классу аллотропных форм углерода, представляющих собой выпуклые замкнутые многогранники, составленные из четного числа атомов углерода. В последнее время фуллерены и их производные активно изучаются в связи с их перспективностью для создания новых лекарственных препаратов, а также использования в качестве вектора для доставки активных соединений в клетку. Благодаря своему химическому строению фуллерены могут выступать в качестве "ловушек" свободных радикалов, что делает их возможной основой для создания препаратов, замедляющих старение. Кроме того, важными свойствами соединений фуллеренов является их противораковая и иммуномодулирующая активность [1-3]. В литературе встречаются данные о токсичности производных фуллеренов. Так, есть данные о снижении уровня пролиферации в кератиноцитах под действием фуллеренов [4], а также данные о том, что фенилаланиновые производные фуллерена являются цитотоксичными и вызывают некроз в эпидермальных кератиноцитах человека [5]. Кроме того, было показано, что фуллерены

вызывают повреждение мембран и повышенный уровень активных форм кислорода в астроцитах, гепатоцитах и фибробластах кожи [6]. Нами было исследовано влияние водорастворимого производного фуллерена с 3-фенилпропионильными заместителями на эмбриональные фибробласты легкого человека (ФЛЭЧ). Структура соединения приведена на рисунке 1.

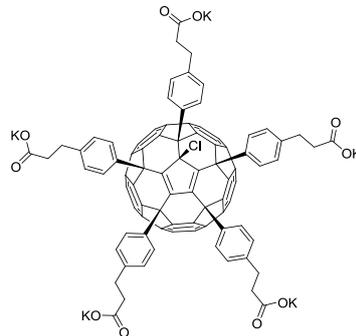


Рисунок 1 – Структура исследованного производного фуллерена F-828

Методика исследования. Клетки эмбриональных фибробластов легкого человека культивировали в культуральных флаконах на 25 см² (Corning-Costar, Великобритания) в среде 199 (ПанЭко, РФ), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки РАА (Австрия), пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, гентамицин 10 мкг/мл (ПанЭко, РФ), НЕПЕС 20 мкл (ПанЭко, РФ) при 37 °С. Для проведения опыта использовали клетки 2-4 пассажей. Инкубацию на первом пассаже проводили в культуральных флаконах (Corning-Costar, Великобритания), на 2-4 пассаже - в слайд-флаконах (Nunclon, Германия) или планшетах на 96 лунок (Corning-Costar, Великобритания). В эксперименте использовали субконфлюентную культуру. Для оценки количества клеток использовался метод подсчета в камере Горяева.

МТТ-тест. Клетки растили в 96-луночной плашке в течение 72 часов, после чего инкубировали с исследуемым соединением 72 ч. Затем добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) [7] и определяли оптическую плотность при длине волны 550 нм (EnSpire reader).

Проточная цитофлуориметрия и автоматический подсчет клеток. Клетки промывали раствором Версена, обрабатывали 0,25 % раствором трипсина, осаждали центрифугированием, промывали стандартным раствором фосфатно-солевого буфера (ФБ) и фиксировали 3 % формальдегидом (10 мин, 37 °С). Далее клетки промывали ФБ и обрабатывали 0,1 % раствором тритона X-100 в ФБ (15 мин, 4 °С). Для анализа количества аннексина в клетках методом проточной цитометрии использовали соответствующие первичные антитела и вторичные антитела, конъюгированные с ФИТЦ (Abcam, Великобритания – «Almabion» РФ). Измерения проводили не менее трех раз. Анализ субпопуляций клеток проводили с использованием программы прибора CyFlow Space (Partec) и программы «FCS-riдер» (ФГБУ МГНЦ РАМН). Аналогичный анализ был проведен с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen).

Определение количества мРНК. РНК выделяли с использованием RNeasy Mini kit («Qiagen» Германия), обрабатывали ДНКазой I. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора реактивов фирмы "Силекс" (Россия) с использованием фермента MuLV-RT обратной транскриптазы согласно стандартной методике. Контролировали концентрацию кДНК, измеряя ее флуориметрически. Использовали метод ПЦР в реальном времени по принципу TaqMan, прибор Rotor Gene 300 ("Corbett Research", Австралия). Количество мРНК анализировали в нескольких независимых опытах с помощью программного обеспечения прибора; ошибка метода составляла 2%. В качестве гена внутреннего стандарта использовали TBP. Использовали праймеры *TBP* (F: GCC CGA AAC GCC GAA TAT, R: CCG TGG TTC GTG GCT CTC T, P: R6G-ATC CCA AGC GGT TTG CTG CGG-BQH1), *BCL2* (F: GCCTTCTTTGAGTTCGGTGG, R: ATCTCCCGGTTGACGCTCT), *BRCA1* (F: TGTGAGGCACCTGTGGTGA, R: CAGTCTCTGGCACTGGTAGAG).

Результаты исследования. Для оценки цитотоксичности исследуемого производного фуллерена использовали МТТ-тест, выявляющий относительное количество живых метаболически активных клеток, митохондриальные и цитоплазматические дегидрогеназы которых восстанавливают бесцветный 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в окрашенный формазан. ФЛЭЧ инкубировали с F-828 в течение 72 часов. Было показано, что соединение фуллерена с 3-фенилпропионильными группами является цитотоксичным при концентрациях выше 20 мкМ. При действии на фибробласты F-828 в нецитотоксичной концентрации наблюдали нелинейную зависимость количества метаболически активных клеток от концентрации производных фуллерена. Повышение активности митохондрий наблюдалось в пределах 10-30 мкМ. В интервале концентраций от 0.1 нМ до 30 нМ F-828 не оказывал влияние на интенсивность сигнала, концентрации 0.03-3 мкМ увеличивали интенсивность сигнала на 30 % ($p < 0.05$), 3-20 мкМ вызывают значительное увеличение сигнала. Дальнейшее увеличение концентрации F-828 приводило к значительному уменьшению сигнала по сравнению с контролем. В литературе имеются данные о том, что некоторые наночастицы способны восстанавливать МТТ даже в отсутствие клеток [8, 9], поэтому был дополнительно проведен эксперимент с МТТ и фуллереном в среде для культивирования без клеток, который показал, что F-828 самопроизвольно не восстанавливает МТТ. Таким образом, изменение

сигнала в МТТ-тесте связано с клеточным ответом, а не с прямым взаимодействием фуллерена с МТТ в среде культивирования.

Наблюдаемый эффект может объясняться увеличением количества пролиферирующих клеток или ответом ФЭЛЧ на стресс. Для того, чтобы понять данный эффект, были исследованы уровень пролиферации и клеточной гибели.

F-828 влияет на пролиферативную активность клеток ФЛЭЧ.

Для оценки количества пролиферирующих клеток был проведен эксперимент по определению количества пролиферационного маркера Ki-67 в клетках ФЛЭЧ при действии исследуемым соединением с помощью проточной цитофлуориметрии. В концентрации 1 нМ F-828 вызывает увеличение количества клеток, содержащих Ki-67, на 10-20 % по сравнению с контролем ($p < 0.05$). В интервале концентраций 10 нМ - 4 мкМ производное фуллерена вызывает снижение количества пролиферирующих клеток на 10 % ($p > 0.05$). Более высокие концентрации вызывают значительное уменьшение количества пролиферирующих клеток. Кроме того, был проведен анализ содержания белка PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) – 1 нМ концентрации фуллерена повышали количество PCNA+ клеток на 30 %. В интервале концентраций от 0.4 до 4 мкМ F-828 не вызывал изменений по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение концентрации вплоть до 20 мкМ приводило к увеличению PCNA+ клеток. Более высокие концентрации исследуемого соединения снижали количество клеток, экспрессирующих PCNA. Увеличение экспрессии этого белка при концентрациях от 4 до 20 мкМ противоречит данным, полученным при анализе экспрессии Ki-67, однако, следует помнить, что PCNA задействован не только в пролиферации, но и также в репарации поврежденных ДНК [10, 11]. Поэтому полученные данные указывают на то, что в концентрации 4-20 мкМ производное фуллерена вызывает повреждения в ДНК, что приводит к усилению репарационного процесса.

F-828 вызывает повреждения ДНК фибробластов.

Поскольку данные, полученные при исследовании количества PCNA, не совпадали с данными по экспрессии маркера Ki-67 и известно, что PCNA также участвует в процессах репарации, был исследован уровень повреждения ДНК производным фуллерена. Двунитевые разрывы ДНК были определены с помощью меченных антител к фосфорилированному гистону γ H2AX (Ser-139) методом проточной цитофлуориметрии [12]. Были проанализированы зависимости изменения количества гистона γ H2AX в ФЛЭЧ от времени инкубации ФЛЭЧ в присутствии F-828. Через 1 час после добавления F-828 в концентрации 4 нМ, а также 0.1 и 4 мкМ в среду культивирования наблюдается увеличение на 20-30 % количества гистона γ H2AX в клетках. Через 3 часа уровень γ H2AX практически не отличался от контрольного уровня при всех исследуемых концентрациях F-828. Дальнейшее культивирование клеток 24 и 48 часов в присутствии F-828 сопровождалось увеличением количества γ H2AX по сравнению с контролем (см. рис. 2). Таким образом, даже в низкой концентрации исследуемое вещество вызывало увеличение количества фосфорилированного гистона γ H2AX через 24 и 48 часа.

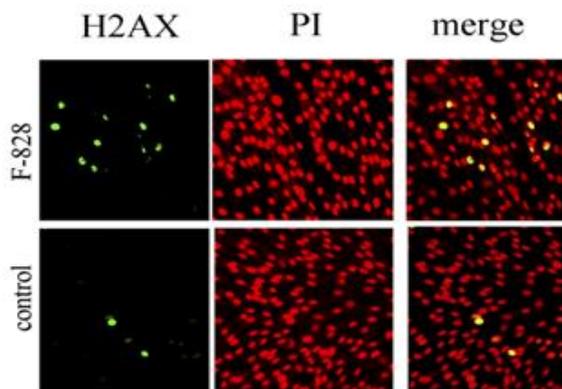


Рисунок 2 – Концентрация F-828 20 мкМ. Клетки окрашены антителами к гистону и пропидий иодидом

Известно, что возникновение двойных разрывов ДНК приводит к активации сигнальных путей, связанных с репарацией этих разрывов. Клеточным ответом на повреждения ДНК является экспрессия протеинкиназ ATM и ATR. Одним из компонентов репарационного комплекса, наряду с гистоном γ H2AX, является белок BRCA1. Мы проанализировали изменение экспрессии генов *ATM*, *ATR* and *BRCA1* в ответ на введение в среду культивирования фуллерена. При всех используемых концентрациях фуллерена (1 нМ - 19 мкМ) в 2 раза возрастает количество РНК *BRCA1*. Количество РНК генов *ATM* and *ATR* увеличивается при концентрации фуллерена соответственно 0.1 мкМ и 4 мкМ. При низких концентрациях количество РНК этих генов снижено по сравнению с контролем.

F-828 влияет на уровень экспрессии транскрипционного фактора p53.

p53 – это транскрипционный фактор, активируемый в ответ на окислительный стресс и повреждения ДНК, который среди прочего регулирует арест клеточного цикла и апоптоз. Через 48 часов после начала инкубирования клеток с F-828 в низких концентрациях (4 нМ и 0.1 мкМ), мы наблюдали увеличение количества мРНК p53 по сравнению с контролем. При больших концентрациях (4 и 19 мкМ) F-828 количество

мРНК p53 не отличалось от экспрессии p53 в контрольных клетках. Методом проточной цитофлуориметрии была исследована зависимость изменения уровня p53 в клетках от времени культивирования в присутствии 4 нМ, 0.1 мкМ, 4 мкМ и 19 мкМ производного фуллерена F-828. Уровень p53 в клетках не изменялся или немного снижался через 1, 3 и 24 часа. Через 48 часов культивирования при концентрации F-828 0.1 мкМ, 4 мкМ и 19 мкМ количество белка p53 в клетках возрастало на 40-50 %. В присутствии 4 нМ F-828 через 48 часов детектировали снижение уровня p53.

Число клеток в культуре определяется двумя основными процессами – клеточным делением и клеточной гибелью. С целью оценки уровня гибели клеток в присутствии F-828 мы проанализировали уровень апоптоза и уровень некроза клеток.

F-828 блокирует апоптоз и вызывает гибель клеток по механизму некроза

Для того, чтобы установить механизм клеточной гибели при действии F-828, клетки были проанализированы с ранним маркером апоптоза аннексин-ФИТЦ и маркером некроза пропилий йодидом. Концентрации F-828 в среде культивирования ФЛЭЧ составляли 4 нМ, 0.1 мкМ, 4 мкМ и 19 мкМ. Через 1 час после добавления в среду F-828 наблюдается увеличение среднего сигнала аннексин-ФИТЦ. Однако уже через 3 часа от момента добавления фуллерена наблюдается снижение среднего значения сигнала аннексин-F. Ответ на действие фуллерена сохраняется при последующем культивировании 24 часа и 48 часов. Отсутствие апоптоза в культуре ФЛЭЧ спустя 3, 24 и 48 часов после добавления F-828 коррелирует с повышенной экспрессией анти-апоптотического гена *BCL2*. При культивировании ФЛЭЧ в присутствии 4 мкМ и 19 мкМ F-828 первые признаки некроза появляются через 24 часа после добавления фуллерена и усиливаются к 48 часу культивирования. Концентрации 4 нМ и 0.1 мкМ F-828 не влияют на количество клеток с признаками некроза.

Кроме того, с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen) было установлено, что уровень апоптоза в культурах ФЛЭЧ, культивированных с F-828 уменьшается в 1.4-11 раз по сравнению с контролем, а уровень некроза увеличивается в 1.3- 2.8 раз.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при действии исследуемого соединения клетки погибают по механизму некроза, а не апоптоза.

Обсуждение результатов / заключение. Было исследовано влияние нового водорастворимого производного фуллерена C₆₀ F-828 на клетки эмбриональных фибробластов человека. Таблица 1 суммирует результаты, отражающие биологическое действие фуллерена F-828 на ФЛЭЧ, полученные в данном исследовании. Ответ пролиферирующих клеток на присутствие F-828 в среде культивирования существенно зависит от концентрации фуллерена при культивировании клеток в течение 48 часов. Можно условно выделить три интервала концентраций F-828, при которых наблюдается различный ответ HELFs. Очень низкие концентрации F-828 (4 нМ - 0.1 мкМ) стимулируют пролиферативную активность HELFs – наблюдается увеличение количества пролиферирующих клеток (KI-67+, PCNA+), на фоне усиления пролиферативной активности HELFs в этих условиях наблюдается увеличение экспрессии белка γ H2AX и увеличение экспрессии гена BRCA1. Белки γ H2AX и BRCA1 участвуют в репарации двунитевых разрывов ДНК. Возможно, уже при низких концентрациях F-828 в небольшой части клеток вызывает образование двунитевых разрывов, которые достаточно быстро репарируются, поэтому не обнаруживаются в эксперименте. Низкие концентрации (0.1-5 мкМ) не вызывают увеличения количества пролиферирующих клеток. Средние концентрации F-828 (1 мкМ - 20 мкМ) вызывают значительное увеличение разрывов ДНК, усиление процессов репарации и гибель по механизму некроза. В концентрациях, превышающих 20 мкМ, исследованное соединение вызывает некротическую клеточную смерть, блокируя апоптоз и, таким образом, является цитотоксичным.

Таблица 1 – Результаты влияния F-828 в разных концентрациях на ФЛЭЧ

Параметр	Диапазон концентраций			
	0.004 - 0.1 мкМ	0.1 - 5 мкМ	5 – 20 мкМ	> 20 мкМ
Количество клеток	↑	↑	контроль	↓↓
Количество KI-67+ клеток	↑	контроль	контроль	↓↓
Апоптоз	контроль	контроль	контроль	контроль
Некроз	контроль	контроль	↑	↑↑
МТТ-тест	контроль	↑	↑↑	↓
Экспрессия γ H2AX	↑	↑	↑↑	↓
Количество PCNA+ клеток	↑	контроль	↑↑	↓
Экспрессия транскрипционного фактора P53	контроль	↑	↑↑	↓

Работа была поддержана грантом РФФИ 15-29-01200 офу_м.

Список литературы / References:

1. Yang X., Ebrahimi A., Li J., Cui Q. Fullerene-biomolecule conjugates and their biomedical applications, *Int J Nanomedicine*, 2014, vol. 9, pp. 77-92.
2. Grebowski J., Kazmierska P., Krokosz A. Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine, *Biomed Res Int [Online]*, 2013, p. 751913.

3. Nakamura S., Mashino T. Water-soluble fullerene derivatives for drug discovery, *J Nippon Med Sch.*, 2012, vol. 79, pp. 248-254.
4. Bullard-Dillard R., Creek K.E., Scrivens W.A., Tour J.M., Tissue sites of uptake of ¹⁴C labelled C60. *Bioorg. Chem.*, 1996, vol. 24, no. 4, pp. 376-385.
5. Rouse J.G., Yang J., Barron A.R., Monteiro-Riviere N.A. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. In Vitro*, 2006, vol. 20, no. 8, pp. 1313-1320.
6. Sayes C.M., Marchione, A.A., Reed K.L., Warheit D.B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. *Nano Lett.*, 2007, vol. 7, no. 8, pp. 2399-2406.
7. Vistica D.T., Skehan P., Scudiero D., Monks A., Pittman A., Boyd M.R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, pp. 2515-2520.
8. Holder A.L., Goth-Goldstein R., Lucas D., Koshland C.P. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem Res Toxicol*, 2012, vol. 17, pp. 1885-1892.
9. Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Zhang L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, vol. 234, pp. 222-235.
10. Moore J.O., Palep S.R., Saladi R.N., Gao D., Wang Y., Phelps R.G., Lebowitz M.G., Wei H. Effects of ultraviolet B exposure on the expression of proliferating cell nuclear antigen in murine skin. *Photochem Photobiol*, 2004, vol. 80, pp. 587-595.
11. Shivji K.K., Kenny M.K., Wood R.D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 1992, vol. 69, pp. 367-374.
12. Löbrich M., Shibata A., Beucher A., Fisher A., Ensminger M., Goodarzi A.A., Barton O., Jeggo P.A. GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA doublestrand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 2010, vol. 9, pp. 662-669.

КОНЦЕПЦИЯ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ НАНОСТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ПАНЦИРЯ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ (BACILLARIOPHYTA) ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДА

Шевченко О.Г.^{1,2}, Романова Д.Ю.³, Карпенко А.А.², Пономарева А.А.^{1,2}

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН
ул. Пальчевского, 17, г. Владивосток, 690041, РФ

²Научно-образовательный комплекс «Приморский океанариум» ДВО РАН
о-в Русский, г. Владивосток, 690922, РФ

³ФГБУН «Карадагская научная станция им. Т.И.Вяземского – природный заповедник РАН»
ул. Науки, 24, пгт. Курортное, г. Феодосия, 298188, РФ

e-mail: 713553@mail.ru

Аннотация. С применением методов электронной микроскопии и рамановской спектроскопии проведено исследование тонкой структуры панциря морской планктонной диатомовой водоросли *Skeletonema* sp. (Bacillariophyta), лабораторный клон Sk021002. В работе были использованы современные методы идентификации вида. При помощи сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии показано, что структуры панциря – створка, краевые выросты и поясok различаются по морфологическим признакам. Впервые с помощью метода Рамановской спектроскопии получены данные диатомовой водоросли рода *Skeletonema*. Выявлены различия в раман-спектрограммах органической оболочки и кремниевого панциря клона Sk021002. Применение метода Рамановской спектроскопии дает обширные, уникальные сведения по наноструктурным характеристикам различных элементов панциря диатомей. Изучение биологических объектов с помощью метода Рамановской спектроскопии не инвазивное, что является важным моментом для фундаментальных биофизических исследований.

Ключевые слова: идентификация, створка, Рамановская спектроскопия, наноструктурные характеристики.