

4. Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharm. Res.*, 2010, vol. 62, pp. 144-149.
5. Mulens V., Morales M.P., Barber D.F. Development of magnetic nanoparticles for cancer gene therapy: a comprehensive review. *Hindawi Publishing Corporation, ISRN Nanomaterials*, vol. 2013, Article ID 646284, 14 pages.
6. Miller M.M., Prinz G.A., Cheng S.F., Bounnak S. Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor. *Appl. Phys. Lett.*, 2002, vol. 81, no. 12, pp. 2211-2213.
7. Felton C., Karmakar A., Gartia Y., Ramidi P., Biris A.S., Ghosh A. Magnetic nanoparticles as contrast agents in biomedical imaging: recent advances in iron- and manganese-based magnetic nanoparticles. *Drug Metab. Rev.*, 2014, vol. 46, no. 2, pp. 142-154.
8. Rockenberger J., Scher E.C., Alivisatos A.P. A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal oxides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, pp. 11595-11596.
9. Biddlecombe G.B., Gun'ko Y.K., Kelly J.M., Pillai S.C., Coey J.M.D., Venkatesan M., Douvalis A.P. Preparation of magnetic nanoparticles and their assemblies using a new Fe(II) alkoxide precursor. *J. Mater. Chem.*, 2001, vol. 11, pp. 2937-2939.
10. Inouye K., Endo R., Otsuka Y., Miyashiro K., Kaneko K., Ishikawa T. Oxygenation of ferrous ions in reversed micelle and reversed microemulsion. *J. Phys. Chem.*, 1982, vol. 86, pp. 1465-1469.
11. Duxin N., Stephan O., Petit C., Bonville P., Colliex C., Pileni M.P. Pure α -Fe coated by an $\text{Fe}_{1-x}\text{B}_x$ alloy. *Chem. Mater.*, 1997, vol. 9, pp. 2096-2100.
12. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.*, 1981, vol. 17, pp. 1247-1248.

НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НЕ ЯВЛЯЮТСЯ ТОКСИЧНЫМИ ДЛЯ МСК ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБНЫ СТИМУЛИРОВАТЬ ИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ *IN VITRO*

Попов А.Л.¹, Попова Н.Р.¹, Иванов В.К.²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
ул. Институтская, 3, г. Пуццоно, 142290, РФ

²Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН
Ленинский пр., 31, г. Москва 119333, РФ
e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

Аннотация. Разработка и синтез новых функциональных наноматериалов для биомедицинских целей требует обязательного проведения комплексной оценки их токсичности в условиях *in vitro* и *in vivo*. В данной работе проведен анализ агрегативной устойчивости нового типа наночастиц диоксида церия, допированных гадолинием, а также проведено исследование их влияния на пролиферативную и метаболическую активность МСК человека *in vitro*. Показано, что наночастицы диоксида церия не являются токсичными в широком диапазоне концентраций (10^{-5} - 10^{-9} М), а также способны стимулировать пролиферацию МСК человека в дозозависимой манере. Высокая степень биосовместимости и низкая токсичность синтезированных наноматериалов позволяют говорить о перспективности разработки биомедицинских препаратов на их основе.

Ключевые слова: наночастицы диоксида церия, пролиферативная активность, МСК человека

CERIUM OXIDE NANOPARTICLES ARE NOT TOXIC FOR HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND ARE ABLE TO STIMULATE THEIR PROLIFERATION *IN VITRO*

Popov A.L.¹, Popova N.R.¹, Ivanov V.K.²

¹Institute of theoretical and experimental biophysics RAS
Institutskaya St., 3, Pushchino, 142290, Russia

²Kurnakov institute of general and inorganic chemistry RAS
Leninskii av., 31, Moscow, Russia
e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

Abstract. Design and synthesis of new nanomaterials for biomedical applications require a comprehensive assessment of their toxicity *in vitro* and *in vivo*. We analyzed the aggregate stability of new types of cerium oxide nanoparticles doped with gadolinium and checked their influence on the proliferative and metabolic activity of human fibroblast *in vitro*. It has been shown that cerium oxide nanoparticles are not toxic in a wide range of concentrations (10^{-5} - 10^{-9} M), and are able to stimulate proliferation of the human MSCs in a dose-dependent manner. The high degree of biocompatibility and low toxicity of synthesized nanomaterials allow us to consider it as perspective compound for development of biomedical products.

Key words: cerium oxide nanoparticles, proliferative activity, human mesenchymal stem cells

Введение. Наночастицы диоксида церия находят широкое применение во многих промышленных приложениях, в том числе в качестве абразивов [1], катализаторов [2] и топливных элементов [3]. Высокий уровень кислородной нестехиометрии и редокс-активность поверхности, а также низкая токсичность и биосовместимость делают наночастицы диоксида церия весьма перспективным материалом в биомедицинских

приложениях. Ранее показано, что наночастицы диоксида церия обладают антиоксидантными [4], кардиопротекторными [5], гепатопротекторными [6], геропротекторными [7], генопротекторными [8], радиопротекторными [9] свойствами, а также способны выступать в качестве эффективных УФ-фильтров [10]. Допирование наночастиц диоксида церия различными металлами, в частности ионами гадолиния, приводит к изменению физико-химических характеристик, а вместе с тем придает ему новые функциональные свойства. Как известно, ион Gd^{3+} имеет 7 неспаренных электронов ($^8S_{7/2}$) и обладает высоким магнитным моментом ($7.94 \mu B$), что позволяет использовать гадолинийсодержащие соединения в качестве контрастирующих агентов в магнитно-резонансной томографии (МРТ). Оксид гадолиния в нанокристаллическом состоянии является одним из наиболее перспективных контрастирующих агентов для МРТ, поскольку он характеризуется более высоким значением констант продольной релаксации по сравнению с хелатными комплексами Gd^{3+} [11]. Следует отметить, что в форме малорастворимого оксида гадолиний существенно менее токсичен, чем гадолиний в ионной форме [12]. Допирование диоксида церия ионами Gd^{3+} позволяет повысить его кислородную нестехиометрию [13], а, следовательно, и антиоксидантную активность, что открывает новые направления использования данного соединения в биомедицинских целях. В связи с этим возникает необходимость комплексного исследования влияния нового типа наноматериала на функциональное состояние и жизнеспособность клетки.

Материалы и методы. Синтез твердых растворов $CeGdO_2$ был произведен в лаборатории методов получения и диагностики наноматериалов ИОНХ РАН им. Н.С. Курнакова по методике, описанной [13].

Анализ гидродинамического радиуса и дзета-потенциала. Определение гидродинамического радиуса частиц в золях проводили методом динамического светорассеивания на анализаторе N5 Submicron Particle Size Analyser «Beckman Coulter». Анализ дзета-потенциала наночастиц диоксида церия определяли с использованием ZetaNanoSizer (Malvern, UK).

Культура клеток. Клетки пульпы зуба (Th1) выделяли из зачатка третьего моляра, извлеченного по ортодонтическим показаниям у здорового пациента 16 лет. Клетки извлекали промывкой струей среды DMEM ("ПанЭко", Россия), содержащей 200 Ед/мл пенициллина и 200 мкг/мл стрептомицина ("Life technologies", США) через иглу шприца, вставленную в верхушку канала зуба, и диссоциировали обработкой раствора 0.25 % трипсин-0.02 % ЭДТА ("ПанЭко", Россия) в течение 30 минут при 37 °С. Полученные клетки собирали центрифугированием в течение 2 минут при 1500 об/мин, а затем ресуспензировали до состояния одиночных клеток в среде DMEM/F12 («ПанЭко») в соотношении 1:1 с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (ФБС), переносили в 25 см² флаконы и культивировали в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С в среде DMEM («ПанЭко»), содержащей 10 % ЭТС (HyClone), 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина и добавлением 2 мМ L-глутамина. При достижении субконфлюентного состояния клетки обрабатывали 0.25 % раствором трипсин-ЭДТА и пассировали в 75 см² флаконы в соотношении 1:3, культивирование проводили в среде α – MEM («ПанЭко»), с 10 % ЭТС, 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина и добавлением 2мМ L-глутамина. При проведении исследований использовали культуры 5-8 пассажей.

Метод дифференцированного флуоресцентного окрашивания клеток. Для оценки соотношения живых и мертвых клеток в культуре использовали набор L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen), содержащий красители SYTO 9 (окрашивает все клетки, $\lambda = 485/498$ нм) и пропидий йодид (окрашивает ядра мертвых клеток, $\lambda = 535 / 617$ нм). Окраску клеток осуществляли путем замены культуральной среды DMEM/F12 с 5 % ЭТС, на содержащую смесь красителей в концентрации 1 мкл/мл. Наблюдение за морфологией и флуоресцентной окраской проводили на инвертированном микроскопе LSM-510 (Carl Zeiss). Микрофотосъемка осуществлялась с использованием цифрового фотоаппарата Power Shot A620 (Canon).

Оценка уровня лактатдегидрогеназы. Метод позволяет оценить концентрацию цитоплазматического фермента – лактатдегидрогеназы, которая обнаруживается в культуральной среде в случае повреждения клеточной мембраны. Клетки высевались в 96-луночные планшеты и культивировались в течение 24 часов в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ и 37 °С. Через 6 часов после посева клеток среда заменялась на среду, содержащую наночастицы $CeGdO_2$ в концентрациях 10^{-4} - 10^{-9} М. В качестве положительного контроля использовались клетки со средой, но без добавления $CeGdO_2$. В качестве отрицательного контроля использовали лунки с клетками, в которые вносили Тритон X-100 (10 мкл). Через 24 часа после внесения наночастиц $CeGdO_2$ определяли уровень лактатдегидрогеназы в культуральной среде в соответствии с протоколом производителя (The Thermo Scientific™ Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit). Оптическую плотность растворов определяли на длине волны $\lambda = 490$ нм и $\lambda = 640$ нм с использованием фотоколориметра Microplate Reader Thermo Multiskan Ascent 96 & 384 (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom)

Анализ пролиферативной активности. Первичные фибробласты мыши высеивались в 96 луночные планшеты (Corning Costar, USA) в плотности 10 тыс/см², далее культивировались 12 часов при 5 % CO₂ и 37 °С, а затем путем смены среды вносились различные концентрации наночастиц диоксида церия (10^{-3} - 10^{-9} М) и каждый день в течение 5 дней проводился анализ пролиферативной активности и числа клеток в каждой лунке с помощью планшетного ридера CloneSelect Imager System (Molecular Devices, USA).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики. Определяли среднее значение величин и среднеквадратичное отклонение от среднего значения. Достоверность различий между группами в результатах микроядерного теста определяли по t-критерию Стьюдента, при проведении клеточных тестов и экспериментов по выживаемости животных значимость различий оценивали по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Для оценки влияния среды на коллоидно-химические характеристики в зольях (гидродинамический радиус, размерное распределение и агрегативную устойчивость) была приготовлена дисперсия наночастиц CeGdO₂ в деионизованной воде. Выявлено, что дзета-потенциал составляет -31.1 мэВ (см. рис. 1 А), а гидродинамический радиус порядка 8-9 нм (30 % объема частиц) (см. рис. 1 Б).

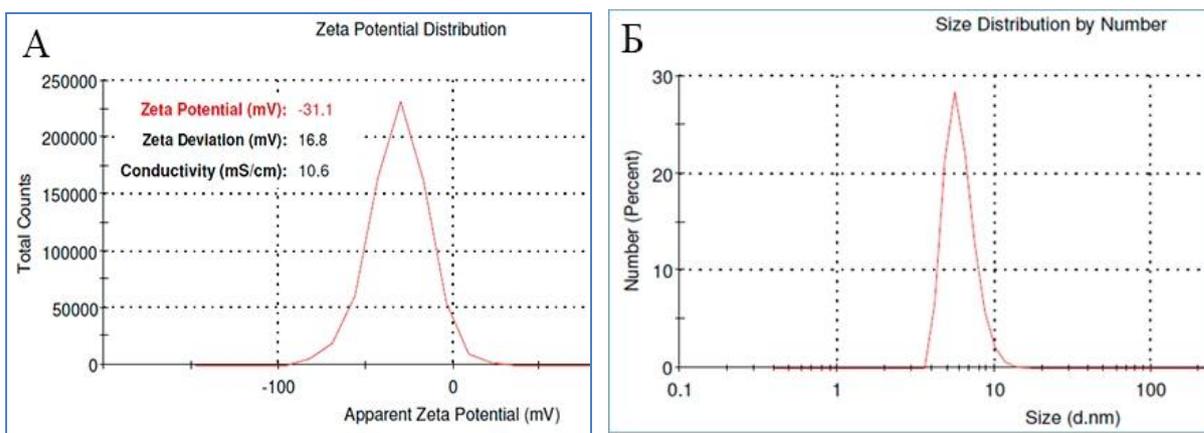


Рисунок 1 – Гидродинамический радиус (А) и дзета-потенциал (Б) наночастиц диоксида церия, допированных гадолинием, при разведении в деионизованной воде

Метод дифференцированного флуоресцентного окрашивания основан на мониторинге жизнеспособных клеток в зависимости от целостности их мембраны. Краситель SYTO 9 окрашивает все клетки в культуре (зеленое окрашивание), в то время как нарушение целостности мембраны обеспечивает ее проницаемость для селективного ДНК-красителя пропидия иодида (красное окрашивание ядра). Наночастицы CeGdO₂ во всем диапазоне исследованных концентраций не вызывают появления окрашенных пропидий иодидом; аналогичный результат наблюдается для лунок в которые не вносили наночастицы диоксида церия (см. рис. 2 Б).

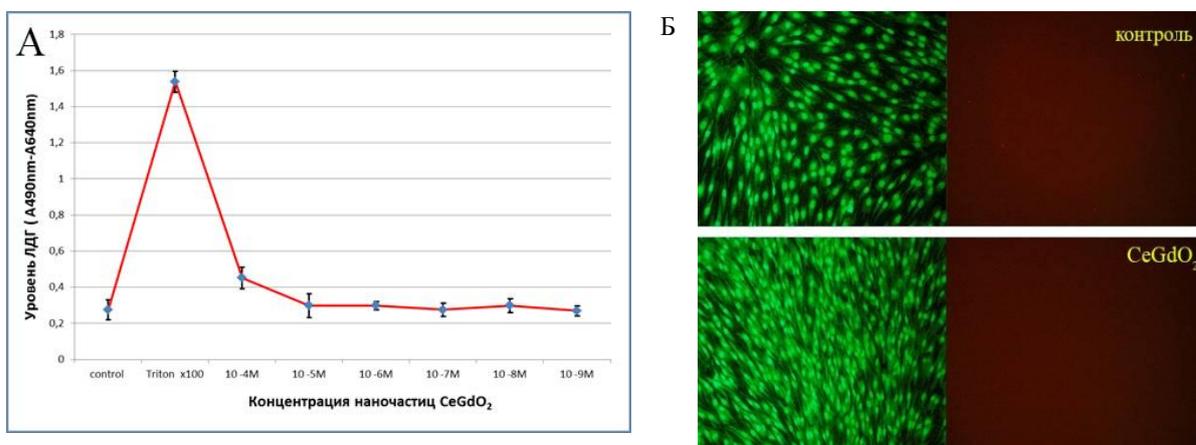


Рисунок 2 – Оценка уровня лактатдегидрогеназы через 24 часа инкубации с наночастицами CeGdO₂ (А), дифференциальное окрашивание набором LIVE/DEAD через 72 часа инкубации с наночастицами CeGdO₂ в концентрации 10⁻⁵ М (Б)

По результатам анализа пролиферативной активности с использованием системы Clone Select Imager показано, что концентрации 10⁻⁵ по 10⁻⁹ М наиболее эффективно стимулируют пролиферацию МСК человека после 4 дней культивирования. При этом высокие концентрации наночастиц диоксида церия (10⁻⁵ М) также стимулируют клеточную пролиферацию, но в меньшей степени (см. рис. 3). Предположительно, высокие концентрации наночастиц CeO₂ снижают уровень АФК до минимальных значений (ниже физиологического уровня), что негативно сказывается на внутриклеточном метаболизме. Увеличение количества клеток в лунках, содержащих наночастицы CeGdO₂, подтверждают более активную пролиферацию клеток, что может быть связано с косвенным влиянием наночастиц диоксида церия на внутриклеточные сигнальные пути. Недавние публикации показывают, что наночастицы диоксида церия способны ускорять пролиферацию клеток в культуре при этом присутствие ионов церия в той или иной степени окисления может быть важнейшим параметром, регулирующим пролиферативную активность клеток. Так [14] показано, что при культивировании мезенхимальных стволовых клеток на участках подложки с адсорбированными на поверхность ионами Ce⁴⁺, происходит лучшая адгезия и пролиферация клеток, в отличие от поверхности с

Ce^{3+} на которую адгезировалось небольшое количество клеток. При этом анализ адсорбции компонентов культуральной среды на эти типы поверхности не показал достоверных отличий, что косвенно подтверждает способность наночастиц направленно регулировать пролиферативную активность. Предположительно, одним из механизмов, лежащих в основе стимуляции пролиферативной активности, заключается в способности наночастиц диоксида церия выступать в качестве эффективного антиоксиданта и снижать базовый уровень АФК в клетке. Хорошо известно, что высокий уровень АФК в процессе клеточного роста, препятствует активной пролиферации клеток [15]. При этом дисперсный диоксид церия способен регулировать уровень АФК, стимулируя пролиферативную функцию, что может быть использовано в разработке технологий эффективного культивирования МСК для клеточной терапии.

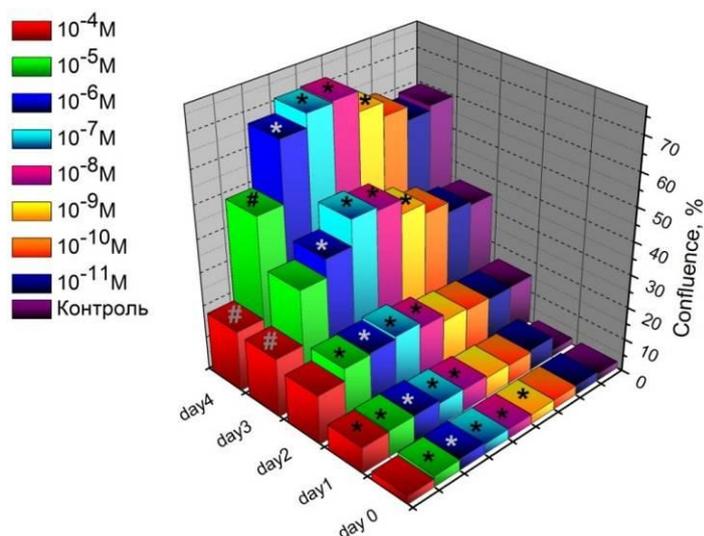


Рисунок 3 – Анализ пролиферативной активности МСК человека при культивировании с наночастицами CeGdO_2

Выводы. Показано, что наночастицы диоксида церия, допированные ионами гадолиния, не являются токсичными для мезенхимальных стволовых клеток человека в широком диапазоне концентраций (10^{-5} - 10^{-9} М), а также способны стимулировать их пролиферацию в дозозависимой манере. Высокая степень биосовместимости и низкая токсичность синтезированных наноматериалов позволяют говорить о перспективности разработки биомедицинских препаратов на их основе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы № 15-34-70019 «мол_a_мос»), РФФИ № 14-44-03615 p_центр_a, № 3116-34-60248\15 мол_a_дж.

Список литературы / References:

1. Kilbourn B.T. Cerium and Cerium Compounds. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2003
2. Antonova A.A., Jilina O.V. [et al.] Synthesis and properties of hydrosols of cerium oxide. *Colloidal J.*, 2001, vol. 63, no. 6, pp. 728-734.
3. Killbourn B.T. *Cerium: a guide to its role in chemical technology*. NY: Molycorp, 1992.
4. Shcherbakov A.B., Zholobak N.M., Baranchikov A.E., Ryabova A.V., Ivanov V.K. Cerium fluoride nanoparticles protect cells against oxidative stress. *Materials Science and Engineering*, 2015.
5. Niu J., Azfer A., Rogers L.M., Wang X., Kolattukudy P.E. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.*, 2007, vol. 73, no. 3, pp. 549-559.
6. Amin K.A., Hassan M.S., Awad el-S.T., Hashem K.S. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *Int J Nanomedicine*, 2011, vol. 6, pp. 143-149.
7. Kong L., Cai X., Zhou X., Wong L.L., Karakoti A.S., Seal S., McGinnis J.F. Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways. *Neurobiol Dis.*, 2011, vol. 42, no. 3, pp. 514-523.
8. Rubio L., Annangi B., Vila L., Hernández A., Marcos R. Antioxidant and anti-genotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system. *Arch Toxicol.*, 2015.
9. Madero-Visbal R.A., Alvarado B.E., Colon J.F., Baker C.H., Wason M.S., Isley B., Seal S., Lee C.M., Das S., Mañon R. Harnessing nanoparticles to improve toxicity after head and neck radiation. *Nanomedicine*, 2012, vol. 8, no. 7, pp. 1223-1231.

10. Zholobak N.M., Sherbakov O.B., Babenko L.P., Bogorad-Kobelska O.S., Bubnov R.V., Spivak M.Y., Ivanov V.K. The perspectives of biomedical application of the nanocerium. *EPMA Journal*, 2014, vol. 5, Suppl. 1, p. A136
11. Gasimova G.A., Ivanova O.S., Baranchikov A.E., Sherbakov A.B., Ivanov V.K., Treytkov Yu.D. Synthesis aqueous sols of nanocrystalline cerium oxide doped by gadolinium. *Nanosystems*, 2011, vol. 2, no. 3, pp. 113-120.
12. Louis C., Bazzi R., Marquette C.A., Bridot J., Roux S., Ledoux G., Mercier B., Blum L., Perriat P., Tillement O. Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labeling. *Chem. Mater.*, 2005, vol. 17, pp. 1673-1682.
13. Gil D.O., Dolgoplova E.A., Shekunova T.O., Sadovnikov A.A., Ivanova O.S., Ivanov V.K., Tretyakov Yu. D. Photoprotective properties of solid solutions of cerium oxide. *Nanosystems*, 2013, vol. 4, no. 1, pp. 78-82.
14. Naganuma T., Traversa E. The effect of cerium valence states at cerium oxide nanoparticle surfaces on cell proliferation. *Biomaterials*, 2014, vol. 35, no. 15, pp. 4441-4453.
15. Muller F.L. [et al.] Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, vol. 43, 477 p.

ОБРАТНАЯ КРАЕВАЯ ЗАДАЧА ДЛЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МАГНИТНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В МАГНИТНОМ ПОЛЕ

Абрамов Е.Г.¹, Богомолова Е.В.^{1,2}, Панина Л.К.¹, Коликов В.А.³, Снетов В.Н.³

¹Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ

e-mail: lkpanina@yandex.ru

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

ул. Проф. Попова, 2, г. Санкт-Петербург, 197376, РФ

³Институт электрофизики и электроэнергетики РАН

Дворцовая наб., 18, г. Санкт-Петербург, 191186, РФ

Аннотация. Модификация исходно немагнитных клеток и микроорганизмов с помощью магнитных наночастиц является одной из перспективных тенденций нанотехнологий. Искусственно созданные магнитно чувствительные клетки поддаются дистанционному управлению, транспорту или целенаправленной локализации с помощью магнитного поля. Предложена математическая модель, описывающая движение и распределение магнитно модифицированных микроорганизмов во внешнем магнитном поле. Цель данной работы состояла в решении обратной задачи поиска значений координат поля, в которых скорости перемещения магнитно модифицированных микроорганизмов обращаются в ноль. Определены изолинии нулевых значений скоростей в расчетной области, в которой клетки захватываются магнитным полем. Показано, что решение обратной задачи при заданных магнитной индукции, плотности среды, концентрации клеток, размера наночастиц и их намагниченности зависит от размера клетки и числа наночастиц, присоединенных к ней и позволяет определять область захвата магнитно модифицированных клеток.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, магнитно модифицированные клетки, магнитное поле.

INVERSE BOUNDARY VALUE PROBLEMS FOR THE DISTRIBUTION OF MAGNETIC MODIFIED MICROORGANISMS IN A MAGNETIC FIELD

Abramov E.G.¹, Bogomolova E.V.^{1,2}, Panina L.K.¹, Kolikov V.A.³, Snetov V.N.³

¹Saint-Petersburg state university

Universitetskaya emb., 7/9, St.Petersburg, 199034, Russia

e-mail: lkpanina@yandex.ru

²Komarov Botanical institute RAS

Prof. Popov str., 2, St.Petersburg, 197376, Russia

³Institute for Electrophysics & Electroenergetics RAS

Palace emb., 18, St.Petersburg, 191186, Russia

Abstract. Modification of originally non-magnetic cells and microorganisms using magnetic nanoparticles is one of the promising trends in nanotechnology. Artificially created magnetic sensitive cells amenable to remote control, transport or targeted localization using a magnetic field. We propose a mathematical model describing the movement and distribution of the magnetically modified microorganisms in an external magnetic field. The work focuses on the solution of the inverse value problem in order to search coordinate, where velocity of magnetically modified microorganisms are treated to zero. Zero-speed contours are defined in the computational domain, in which cells are captured by the magnetic field. It is shown that the solution of the inverse problem under given magnetic induction, density of the medium, cell's concentration, the size of nanoparticles and their magnetization depends on the size of matrix cells and on the number of nanoparticles attached to it and allows to determine the area to capture the magnetically modified cells.

Key words: magnetic nanoparticles, the magnetically modified cells, the magnetic field.