

**ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ МАРКИРОВКИ
МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ Fe₃O₄ ПРИ МАЛОМ ВРЕМЕНИ ЭКСПОЗИЦИИ**
Солопов М.В.^{1,2}, Турчин В.В.², Лёгенький Ю.А.¹, Попандопуло А.Г.², Беспалова С.В.¹, Глазунова В.А.³

¹Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283050, ДНР

²Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака

пр. Ленинский, 47, г. Донецк, 283045, ДНР

³Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина

ул. Розы Люксембург, 72, г. Донецк, 283050, ДНР

e-mail: mxsolopov@yandex.ru

Аннотация. В связи с активным развитием клеточной трансплантологии, как отрасли регенеративной медицины, разработка методик точного нацеливания клеток *in vivo* представляется актуальной. Всё большую популярность приобретает использование магнитных наночастиц в качестве маркеров, как инструмента для получения управляемых клеточных препаратов. В результате магнитной маркировки клетка приобретает возможность быть управляемой с помощью магнитного поля. В представленной работе исследовались магнитные свойства фетальных фибробластов человека (ФФЧ), полученных после инкубации с наночастицами Fe₃O₄ при малом времени экспозиции. Были определены такие показатели модифицированных клеток, как жизнеспособность, внутриклеточное содержание железа, а также магнитная восприимчивость (χ). На основе расчетных экспериментальных данных была построена компьютерная модель захвата клеток в условиях кровеносного русла в присутствии внешнего магнитного поля. Результаты моделирования указывают на то, что эффективность захвата маркированных клеток, полученных по описанной методике, линейно зависит от значения χ и может составлять около 60 %.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, магнитное поле, магнитная восприимчивость, фетальные фибробласты человека.

**PREPARATION OF MAGNETICALLY CONTROLLED HUMAN CELLS BY LABELING WITH Fe₃O₄
MAGNETIC NANOPARTICLES AT SHORT TIME OF EXPOSITION**

Solopov M.V.^{1,2}, Turchyn V.V.², Legenkiy Yu.A.¹, Popandopulo A.G.², Bepalova S.V.¹, Glazunova V.A.³

¹Donetsk National University

Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283050, DPR

²V.K. Gusak Institute of Urgent and Recovery Surgery

Leninsky av., 47, Donetsk, 283045, DPR

³A.A. Galkin Donetsk Physicotechnical Institute

Rose Luxemburg str., 72, Donetsk, 283050, DPR

e-mail: mxsolopov@yandex.ru

Abstract. Due to the active progress of cell transplantology as branch of regenerative medicine, development of techniques for precise cell targeting *in vivo* has a great relevance. Application of magnetic nanoparticles as cell markers becoming a rather popular tool for obtaining of controlled cell products. As a result of magnetic labeling, the marked cell acquires the possibility of being controlled by means of a magnetic field. In the presented work the magnetic properties of human fetal fibroblasts (HFF) obtained after incubation with Fe₃O₄ nanoparticles at a short exposure time were investigated. Such characteristics of the modified cells as viability, intracellular iron content and magnetic susceptibility (χ) were defined. A computer model of cell capture in the conditions of the blood channel in the presence of an external magnetic field based on calculated experimental data was constructed. The results of the simulation indicate that the capture efficiency of the labeled cells obtained by the described procedure is linearly dependent on the value of χ and can reach about 60 %.

Key words: magnetic nanoparticles, magnetic field, magnetic susceptibility, human fetal fibroblasts.

Современные достижения в сфере производства наноматериалов находят широкое применение в биологических и медицинских исследованиях [1]. В частности, особое внимание исследователей приковано к суперпарамагнитным наночастицам оксида железа Fe₃O₄ (SPION) за счёт возможности их использования в качестве маркеров с целью усовершенствования методик клеточной трансплантологии [2, 3]. Клеточная трансплантология является активно развивающейся сферой регенеративной медицины, однако, её потенциал может быть лимитирован за счёт низкой эффективности нацеливания клеток при трансплантации *in vivo*. Одним из возможных путей преодоления этого ограничения является технология создания управляемых клеток с помощью направленного маркирования магнитными наночастицами. На данный момент создание управляемых и жизнеспособных клеточных препаратов, модифицированных SPION, является перспективным направлением в биотехнологии, достижения которого в будущем можно использовать в клинической практике.

Особо интересным является вопрос об эффективности удержания модифицированных клеток в заданном сайте с помощью магнитного поля при введении в организм. Удобным инструментом, позволяющим оценить эффективность нацеливания клеток, может служить компьютерное моделирование. Однако построение модели требует задания определенного параметра, который отражал бы магнитные свойства клеток, например,

магнитной восприимчивости (χ). Поэтому основной целью нашего исследования было определение параметра χ фетальных фибробластов человека (ФФЧ) как модельных здоровых клеток после маркирования наночастицами, стабилизированными цитратом натрия (SPION-Cit), при серии концентраций внеклеточного железа и малом времени экспозиции. Полученные параметры были использованы при компьютерной симуляции магнитного захвата клеток в модельной артерии.

Материалы и методы. Синтез и анализ магнитных наночастиц. Получение магнитных наночастиц осуществляли по аналогии с методикой, описанной в работе [4]. Раствор солей $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (AppliChem GmbH, Германия), приготовленный в мольном соотношении 1:2, устанавливали на магнитную мешалку и медленно нагревали до 70°C , после чего быстро вносили 20 мл 25 % раствора аммиака (AppliChem GmbH, Германия). После этого проводили многократную промывку продукта дистиллированной водой путём магнитной декантации. Затем в коллоид добавляли 10 мл 50 % (w/v) раствора цитрата натрия (Sigma-Aldrich, США) и перемешивали в течение 2 часов без нагревания. После этого избыток стабилизатора удаляли магнитной декантацией, а осадок растворяли в 100 мл дистиллированной воды и обрабатывали ультразвуком с помощью диспергатора УЗДН-А в течение 5 минут. Крупные частицы отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 минут с помощью центрифуги Jouan B4i (Франция). Стерилизацию частиц осуществляли путём фильтрования через шприцевый фильтр с диаметром пор 0.2 мкм (Millipore, США). Микрофотографии магнитных наночастиц получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM 200 (Япония). Анализ фотографий свидетельствует о том, что средний диаметр синтезированных частиц составил около 15 нм (рис. 1(A)). Определение качественного состава частиц проводили с помощью электронографии в режиме микродифракции указанного электронного микроскопа (рис. 1(Б, В)). Определение концентрации железа в синтезированном коллоиде магнитных наночастиц проводили путём атомно-абсорбционной спектроскопии (Сатурн-ЗПЭА1).

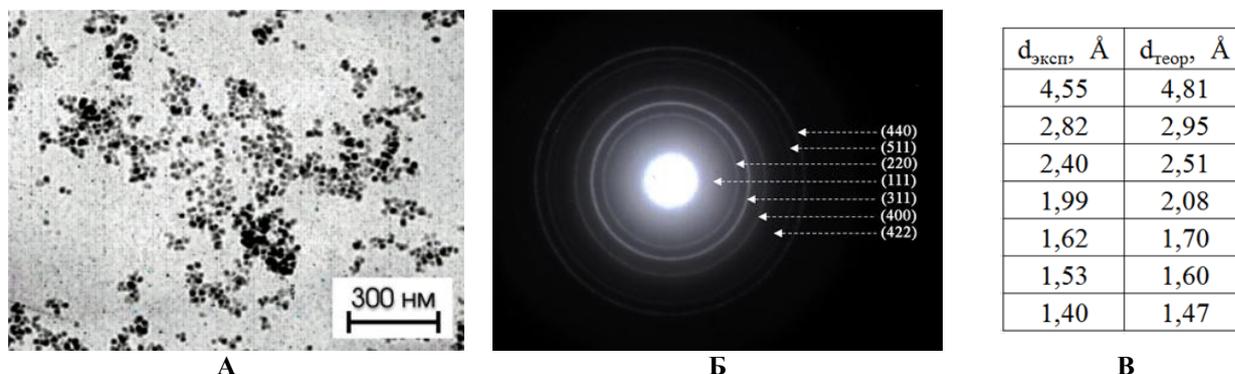


Рисунок 1 – А) электронная микрофотография SPION-Cit (увеличение 30000x); Б) электронограмма SPION-Cit, полученная в режиме микродифракции микроскопа JEOL JEM 200 (указаны индексы Миллера, характерные для кристаллической структуры Fe_3O_4); В) экспериментально рассчитанные значения межплоскостных расстояний ($d_{\text{эксп}}$) в сравнении с теоретическими, характерными для Fe_3O_4

Культура клеток. ФФЧ были выделены из эмбриона человека 11 недели гестации, полученного от здоровой матери после операции по прерыванию беременности. Материал забирали в условиях операционной отделения гинекологии ИНВХ, предварительно получив информированное согласие матери. Подробное описание процедуры получения культуры клеток описано в работе [5].

Магнитомаркирование клеток. Магнитную модификацию клеток проводили в культуральных чашках Петри (Greiner Bio-One, Австрия) при достижении культурой монослойного состояния. Для маркирования было приготовлено по 10 мл растворов на основе среды RPMI без сыворотки (Sigma-Aldrich, США) с содержанием Fe от 0.5 до 15 мМ. С целью предотвращения агрегации частиц в раствор дополнительно вносили лимонную кислоту (AppliChem GmbH, Германия) до конечной концентрации 10 мМ. pH маркирующего раствора корректировали до значения 7.4 путём внесения 1М раствора NaOH. Перед модификацией клетки отмывали 10 мл буферного раствора DPBS с Ca^{2+} и Mg^{2+} . После отмывки в чашки вносили маркирующие растворы и проводили инкубацию культур в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37°C , 5 % CO_2 и 95 % влажности на протяжении 20 минут. По завершении маркирования клетки отмывали средой RPMI с 5 мМ содержанием лимонной кислоты (RPMI-Cit). Для достижения интернализации частиц клетки дополнительно инкубировали на протяжении 2 часов в среде RPMI-Cit при указанных выше условиях.

Оценка жизнеспособности модифицированных клеток. Уровень жизнеспособности модифицированных клеток после процедуры магнитомаркирования оценивали путём прижизненного окрашивания трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Для этого исследуемую суспензию смешивали с красителем в соотношении 1:1, после чего образец микроскопировали с использованием камеры Горяева, подсчитывая общее число клеток и окрашенных (нежизнеспособных).

Визуализация и определение внутриклеточного железа. Для определения распределения наночастиц в структуре клеток проводили окрашивание гексацианоферратом калия (ГЦФ) на выявление берлинской лазури, образующейся при взаимодействии ионов железа с красителем. Культуру ФФЧ после магнитомаркирования

([Fe] = 10 мМ) и промывки фиксировали 4 % раствором глутарового альдегида (AppliChem GmbH, Германия) на протяжении 30 минут. По завершении фиксации к образцам вносили смесь растворов ГЦФ (10 %) и HCl (5 %) в соотношении 1:1 и выдерживали на протяжении 30 минут, после чего осуществляли микрофотографирование.

Определение содержания внутриклеточного железа проводили в соответствии с методикой, описанной в работе [6]. После магнитомаркирования клетки лизировали 10 % раствором додецилсульфата натрия (AppliChem GmbH, Германия) в течение 5 минут при 70 °С, а затем определяли оптическую плотность проб при 370 и 750 нм. В данном исследовании для измерений использовался планшетный спектрофотометр Synergy HT (BioTek, США).

Оценка магнитофоретических свойств клеток. Магнитофорез клеток выполняли в специальной магнитофоретической камере [5]. В качестве источника магнитного поля служил дисковый NdFeB магнит ($B = 380$ мТл). Для видеорегистрации движения клеток использовали фото/видео камеру SC30, входящую в комплект микроскопа Olympus CKX-41, и программу CellSens (Olympus, Япония). Магнитомаркированные и контрольные ФФЧ открепляли от поверхности культуральной чашки трипсинизацией, промывали раствором DPBS и разводили в 3 мл этого же буфера ($\sim 10^6$ кл/мл). Магнитофорез проводили по такой схеме: 20 мкл клеточной суспензии вносили в магнитофоретическую камеру, устанавливали магнит на расстоянии 5 мм от края ячейки и в течение 1-2 минут регистрировали движение клеток по направлению к магниту. Траектории движения модифицированных клеток в магнитном поле определяли с помощью трекинга (отслеживания положения объекта при движении), обрабатывая видеофайлы в программе Adobe After Effects CC 2014. Возможности этой программы позволяют проводить ручное и автоматическое отслеживание движения заданного объекта и сохранять данные о его положении в заданные моменты времени в формате таблицы Excel.

Скорость движения маркированных ФЭЧ определяли путём линейной аппроксимации числовых массивов, содержащих данные о траекториях отдельных клеток, с помощью пакета прикладных программ Matlab 2013b.

На основе рассчитанных значений магнитофоретических скоростей определяли магнитную восприимчивость клеток по следующей формуле:

$$\Delta\chi = \frac{6\pi\eta r v}{\mu_0 V H \nabla H} \quad (1)$$

где $\Delta\chi$ – разница магнитной восприимчивости клетки и буферной среды; η – динамическая вязкость буферной среды; r – средний радиус клетки; v – скорость клетки; μ_0 – магнитная проницаемость среды; V – объем клетки; H – напряжённость магнитного поля; ∇H – градиент напряжённости магнитного поля.

Моделирование захвата клеток. Для оценки эффективности удержания маркированных клеток с помощью магнитного поля была построена компьютерная модель в программе Comsol Multiphysics 5.2. Геометрия модели была представлена в двухмерной форме и состояла из магнита-имплантата ($M=1000$ кА/м), модельной артерии, содержащей одно входное (4 мм) и 7 выходных отверстий (0.4-1 мм), а также прямоугольной расчётной области. При создании модели были использованы модули AC/DC (для моделирования магнитного поля) и CFD (для вычисления гидродинамики процесса) со следующими физическими интерфейсами: Magnetic Fields, No Currents, Laminar Flow and Particle Tracing for Fluid Flow. Скорость крови в артерии задавалась аналитически на основе аппроксимации кривой, представленной в работе [7]. Расчёт траекторий движения производили для 50 клеток, выпуск которых осуществлялся со входного отверстия в промежутке от 0.01 до 0.05 с. Решение модели, состояло из двух этапов, первый – моделирование распределения магнитного поля и скорости потока жидкости, второй – вычисление траекторий движения клеток. Эффективность захвата определялась процентом клеток, удержанных с помощью магнитного поля у стенки модельной артерии.

Результаты и обсуждение. Эффективность маркирования клеток магнитными наночастицами и их токсичность во многом зависит от стабилизирующего агента, препятствующего агрегации частиц. Популярными являются SPION с полимерными оболочками из декстрана, хитозана, полиэтиленгликоля, поливинилового спирта и др. Такие частицы обладают низкой токсичностью, однако, эффективность маркирования клеток ими относительно невысокая за счёт небольшой величины поверхностного заряда или его отсутствия. В нашей работе для модификации клеток использовались SPION, стабилизированные цитратом натрия, молекулы которого обеспечивают отрицательный заряд для наночастиц. Одним из главных преимуществ таких частиц является их способность концентрироваться на мембране клетки за счёт неспецифической электростатической адсорбции [3].

Магнитомаркирование по методике, описанной в представленной работе, предполагало короткую выдержку (в сравнении со временами инкубации как в [5]) клеток в среде, содержащей магнитные наночастицы, с последующей инкубацией в среде без частиц с целью обеспечения достаточного количества времени для проникновения SPION-Cit, адгезированных на мембране, внутрь клеток. На протяжении всей процедуры не наблюдалось значительного изменения морфологии клеток и открепления их от дна культурального сосуда, что свидетельствовало бы о нарушении клеточного гомеостаза. Анализ жизнеспособности путём прижизненного окрашивания свидетельствует о незначительном повышении процента мёртвых клеток среди магнитомаркированных ФФЧ (рис. 2(A)).

Окрашивание клеток с целью обнаружения железа указывает на присутствие частиц внутри клеток. Стоит отметить, что по контуру клетки окрашивание более интенсивное, это может свидетельствовать о плотных скоплениях наночастиц на мембране (рис. 2, Г1-Г2). Результаты по определению содержания внутриклеточного железа свидетельствуют о повышении числа захваченных клеткой частиц при росте их внеклеточной

концентрации. Однако при концентрации более 10 мМ Fe наблюдается выход на плато, указывая на то, что максимальное значение внутриклеточного содержания частиц составляет около 40 пкг Fe/кл при использовании данной методики магнитомаркирования фибробластов. Характер кривой и порядок значений внутриклеточного содержания Fe согласовываются с подобными исследованиями, проведёнными ранее [3].

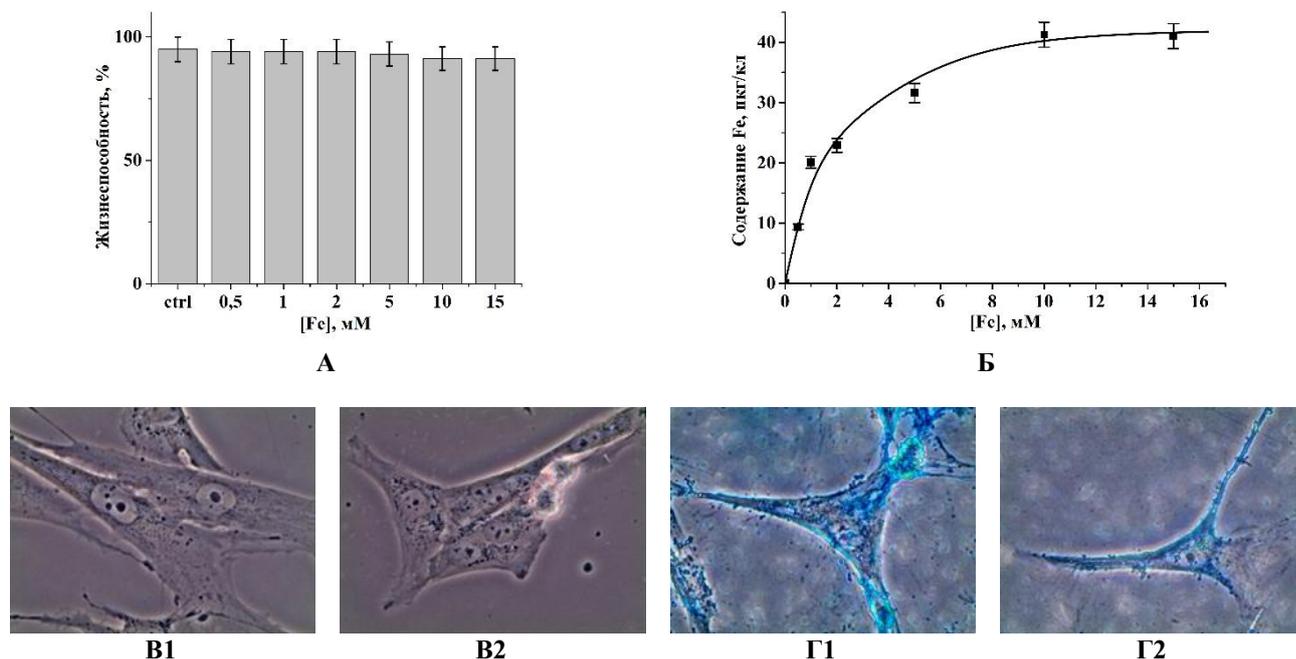


Рисунок 2 – А) Влияние SPION-Cit на жизнеспособность культуры ФФЧ при различных концентрациях частиц (в пересчете на Fe), используемых при магнитомаркировании; Б) зависимость внутриклеточного содержания железа от концентрации частиц после магнитомаркирования; В1-В2) световая микроскопия ФФЧ, не подвергавшихся магнитной модификации; Г1-Г2) микроскопия клеток, маркированных SPION-Cit, фиксированных глутаральдегидом, и окрашенных смесью ГЦФ/НСI для выявления берлинской лазури (увеличение 400х)

Определение магнитных свойств клеток путём измерения магнитофоретической скорости является удобным инструментом за счет простоты выполнения экспериментальной процедуры и обработки полученных данных [4]. Этот метод может использоваться в лабораториях различного уровня оснащённости для быстрой и эффективной оценки магнитных свойств клеток, маркированных магнитными наночастицами. Методика магнитомаркирования фибробластов, описанная в представленной работе, позволяет относительно быстро получать культуру управляемых клеток, которые интенсивно реагируют на приложение внешнего магнитного поля. В частности, это подтверждается анализом видеозаписей движения клеток в поле дискового магнита магнитофоретической ячейки, на которых наблюдается сообщенное движение клеток к области высокого значения $H_{\text{ВН}}$. На рисунке 3 представлена зависимость значений магнитной восприимчивости клеток от внеклеточной концентрации железа, используемой при маркировании. Кривая имеет сходный характер с зависимостью, представленной на рисунке 2, Б, указывая на то, что значение параметра χ коррелирует со внутриклеточным содержанием SPION-Cit. Из представленной зависимости видно, что максимальное среднее значение χ , которое может приобрести культура фибробластов после модификации SPION-Cit согласно описанной процедуре, составляет около 0.055, свидетельствуя о приобретении клетками парамагнитных свойств.

На рисунке 3(Б) представлена зависимость эффективности модельного захвата модифицированных клеток от значения магнитной восприимчивости, определенной экспериментальным путем. Представленные данные, полученные в результате расчета компьютерной модели, указывают на линейную зависимость эффективности захвата от параметра χ в указанном интервале значений. Основываясь на результатах моделирования можно предполагать, что клетки с максимально возможным значением восприимчивости, которого можно достичь по представленной методике магнитной модификации, могут удерживаться магнитным полем в заданном сайте. Значение эффективности удержания таких клеток составляет около 60 %. Стоит отметить, что исходя из картины, представленной на рисунке 3(В 1-4), отсутствие захвата некоторых клеток частично связано с разветвленной структурой модельной артерии.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о том, что описанная технология магнитомаркирования позволяет получать жизнеспособные клетки с магнитными свойствами, достаточными для высокоэффективного магнитного нацеливания в организме. Мы предполагаем, что данная методика магнитомаркирования имеет перспективу применения для получения магнитоуправляемых терапевтических типов клеток.

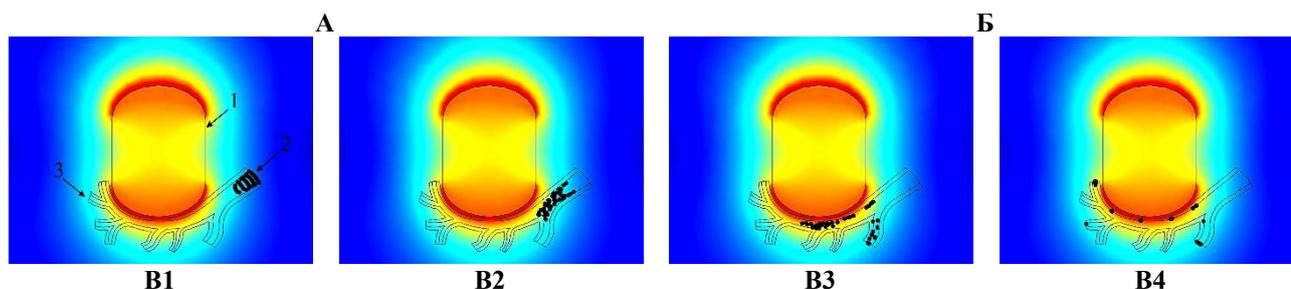
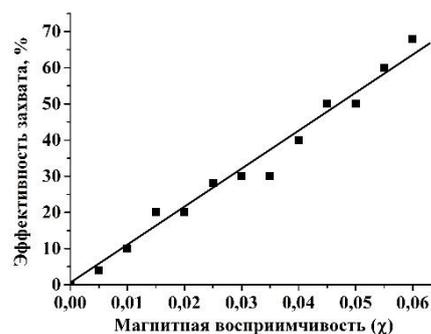
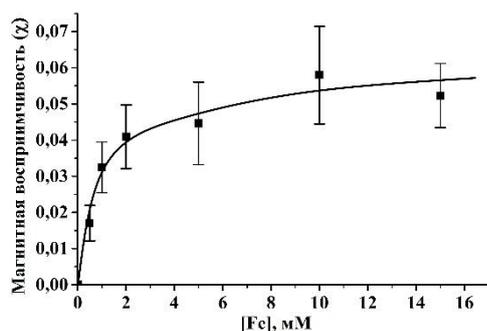


Рисунок 3 – А) Зависимость магнитной восприимчивости ФФЧ от внеклеточной концентрации магнитных наночастиц; Б) эффективность захвата клеток в зависимости от магнитной восприимчивости; В1-В4) иллюстрация магнитного поля магнита-имплантата (1) и распределения клеток с $\chi=0.055$ (2) в модельной артерии (3) на 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 с после выпуска

Список литературы / References:

1. Wu W., Wu Z., Yu T., Jiang C., Kim W.-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2015, vol. 16, iss. 2, 023501.
2. Cores J., Caranasos T.G., Cheng K. Magnetically targeted stem cell delivery for regenerative medicine. *J. Funct. Biomater.*, 2015, vol. 6, pp. 526-546.
3. Wilhelm C., Gazeau F. Universal cell labeling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 2008, vol. 29, pp. 3161-74.
4. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *Trans. Magn.*, 1981, vol. 17, pp. 1247-1249.
5. Турчин В.В., Лёгенький Ю.А., Солопов М.В., Попандопуло А.Г., Беспалова С.В., Фисталь Э.Я. Магнитофоретические свойства фетальных фибробластов человека, маркированных суперпарамагнитными наночастицами оксида железа, стабилизированными цитратом. *Гены и клетки*, 2017, т. 12, вып. 1, с. 47-53. [Turchyn V.V., Legenkiy Yu.A., Solopov M.V., Popandopulo A.G., Bepalova S.V., Fistal E.Ya. Magnetophoretic properties of human fetal fibroblasts magnetically labeled with citrate stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Genes and cells*, 2017, vol. 12, iss. 1, pp. 47-53 (In Russ.)]
6. Dadashzadeh E.R., Hobson M., Bryant Jr L. H., Deana D. D., Franka J. A. Rapid spectrophotometric technique for quantifying iron in cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: potential translation to the clinic. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2013, vol. 8, pp. 50-56.
7. Lunnoo T., Puangmali T. Capture efficiency of biocompatible magnetic nanoparticles in arterial flow: a computer simulation for magnetic drug targeting. *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, vol. 10, pp. 1-11.

МЕТАЛЛИЗАЦИЯ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОССТАНОВЛЕННОГО СЕРЕБРА

Касьяненко Н.А., Бакулев В. М., Осолодков М. И., Барышев А. В., Демидов В.Н., Соколов П. А.

Санкт-Петербургский государственный университет

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

e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

Аннотация. В работе показана возможность восстановления серебра на ДНК с использованием соединения серебра с фенантролином (AgPhen). При достаточно больших концентрациях AgPhen и ДНК в растворе и при добавлении восстановителя образуются фибриллы с металлическим серебром. Для формирования таких структур макромолекула выступает в качестве основы. Получены изображения структур методами атомной силовой, сканирующей электронной и просвечивающей электронной микроскопии.

Ключевые слова: металлизация ДНК, восстановление серебра, acetate bis(1,10-phenanthroline)silver(I).