УДК 546,057:621.927:549.73:537.6

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ФЕРРИМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

[1]Анисимова Н.Ю., [2]Сенатов Ф.С., [2]Миляева С.И., [1]Киселевский М.В.

[1]Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва;
[2]Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, e-mail: Senatov@misis.ru

В настоящей работе исследована способность 4-х образцов ферримагнитных наночастиц (Fe_3O_4; Fe_3O_4, модифицированный углеродом; Fe_3O_4, модифицированный серебром и Fe_2O_3) элиминировать из растворов медиаторы воспаления (фактор некроза опухолей α, интерлейкин-6, интерлейкин-1β, интерлейкин-10). Показано, что наночастицы эффективно (до 91–100%) элиминируют эти биологически активные молекулы. Однако эти материалы обладают достаточно высокой (до 84%) цитотоксичностью по отношению к клеткам крови, что существенно ограничивает возможность их применения для гемосорбции. Однако указанный материал может рассматриваться как чрезвычайно перспективный для детоксикации бесклеточных физиологических жидкостей, таких как лимфа или плазма крови. Перспективным направлением является создание нанокомпозитных материалов, где полимерная гемосовместимая матрица экранирует поверхность неорганического компонента.

Ключевые слова: ферримагнитные наночастицы, сорбция, цитокины, цитотоксичность

INVESTIGATION OF SORPTION PROPERTIES OF FERRIMAGNETIC NANOPARTICLES

[1]Anisimova N.Y., [2]Senatov F.S., [2]Milyaeva S.I., [1]Kiselevsky M.V.

[1]N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the RAMS, Moscow;
[2]National University of Science and Technology «MISIS», 119049, Moscow, e-mail: Senatov@misis.ru

In this paper, the ability of 4 samples of ferromagnetic nanoparticles (Fe_3O_4, Fe_3O_4 modified with carbon, Fe_3O_4 and Fe_2O_3 modified with silver) to eliminate from the solutions of inflammatory mediators (tumor necrosis factor α, interleukin-6, interleukin-1β, interleukin-10) was investigated. It is shown that nanoparticles efficiently (up to 91–100%) eliminate these biologically active molecules. However, these materials have relatively high (up to 84%) cytotoxicity against the cells in the blood, which greatly limits their applicability to hemosorption. However, this material can be considered as very promising for the detoxification of cell-free body fluids such as lymph or blood plasma. A promising application is producing of nanocomposite materials with the hemocompatibility polymer matrix which screens surface of the inorganic component.

Keywords: ferrimagnetic nanoparticles, sorption, cytokines, cytoxicity

В настоящее время комплексное лечение сепсиса и септического шока включает методы экстракорпоральной детоксикации, и, в частности, гемо- и лимфосорбции [5]. Процедура гемосорбции не только способствует улучшению реологических свойств крови, но и значительно снижает содержание в системном кровотоке триггеров и медиаторов воспаления (бактериальные эндо- и экзотоксины, цитокины) [6]. В качестве неселективных гемосорбентов в медицине широко применяется активированный уголь. Однако показатели биосовместимости этого вида материалов не являются оптимальными: при контакте гранул активированных углей с клетками крови отмечаются гемолиз эритроцитов и активная агрегация тромбоцитов [8]. Современные достижения в области разработки новых материалов с использованием нанотехнологий расширили спектр потенциально перспективных гемосорбентов. В частности, по-мнению ряда специалистов, чрезвычайно перспективными материалами для использования в качестве сорбентов в медицинской практике являются ферримагнитные частицы. Так было установлено, что наночастицы Fe_2O_3 и $CoFe_2O_4$ способны эффективно сорбировать антигены и вирусы [3]. Также имеются сообщения о перспективности применения в медицине нанодисперсного магнетита (Fe_3O_4) [4,7]. Суммарная площадь сорбционной поверхности магнетита составляет от 800 до 1200 м^2/г, а напряженность магнитного поля, которое индуцируется каждой частицей, достигает 300–400 кА/м [1]. Однако в литературе имеются сведения о негативном влиянии ферримагнитных наночастиц на клетки крови, что может лимитировать применение этого в качестве гемосорбентов [9]. Кроме того, практически отсутствуют сведения о способности ферримагнитных наночастиц элиминировать триггеры и медиаторы воспаления из крови и других биологических жидкостей.

Цель исследования: изучить элиминацию цитокинов наночастицами на основе Fe_3O_4 и Fe_2O_3, а также оценить их токсичность при контакте с клетками крови.

Материалы и методы исследования

Исследуемые наночастицы: Fe_3O_4, чист. 98%; Fe_3O_4, модифицированный углеродом, чист. 98%; Fe_3O_4,

модифицированный серебром (1%), чист. 99%; Fe_2O_3, порошок чист. 99%. Размер частиц в указанных образцах – 20–100 нм. Подготовка образцов сорбентов к исследованию включала 3-кратную промывку спиртом, а затем физиологическим раствором хлорида натрия.

Оценка связывания цитокинов. Исследуемые наночастицы (1,6 ± 0,14 г), вносили в физиологический раствор хлорида натрия (5 мл), содержащий рекомбинантные цитокины человека фактор некроза опухолей α TNFα (Biosourse), интерлейкин-6 (IL-6) (Miltenyi Biotec), интерлейкин-1 β IL-1β (Sigma), интерлейкин-10 IL-10 (Biosourse) и инкубировали на шейкере орбитальном шейкере OS-10, Latvia (350 rpm) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем частицы удаляли с помощью магнитного концентратора частиц Dynal MPC-L и оценивали с помощью иммуноферментного анализа концентрацию цитокинов, оставшихся в растворе. Полученные результаты сравнивали с показателями интактного контроля (суспензия цитокинов, в которую не вносили наночастицы). Все образцы супернатанта до исследования хранили при –60 °С. Концентрацию цитокинов определяли с использованием коммерческих наборов на основе твердофазного сэндвич- ELISA (a solid phase sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Вектор Бест, РФ; в соответствии с инструкциями производителей. Показатель элиминации цитокинов в результате адсорбции рассчитывали как отношение концентрации цитокина в образце после адсорбции и интактного контроля, выраженное в %.

Исследование уровня клеточного метаболизма мононуклеарных лейкоцитов (МЛ). Суспензию МЛ в среде RPMI-1640 ПанЭко, РФ в концентрации $4{,}5\times10^5$ кл/мл ± 10,1%, выделенных из венозной крови здорового донора, стабилизированной цитратом натрия, на градиенте плотности фиколл-урографин и трижды отмытых при центрифугировании средой RPMI-1640 или раствором Хенкса, коинкубировали с навесками наночастиц в течение 1 часа в термостатируемом дигитальном шейкере ST-3L, РФ при 37 °С и 200 об/мин. Затем сорбенты удаляли магнитным концентратором. Суспензию МЛ пассировали в плоскодонные лунки 96-луночных микропланшетов Costar по 200 мкл. Физиологическую активность клеток исследовали в МТТ-тесте [2].

Для расчета показателя токсического воздействия сорбентов на клетки, отражающего относительное количество погибших клеток в суспензии, использовали следующую формулу:

$$\text{Цитотоксичность, \%} = (1 - ОП_{пас}/ОП_{к})\cdot100, \quad (1)$$

где $ОП_{пас}$ – оптическая плотность в лунке после адсорбции, $ОП_{к}$ – оптическая плотность в лунке с интактным контролем.

Показатель элиминации цитокинов в результате адсорбции рассчитывали как отношение концентрации цитокина в образце после адсорбции к показателю в интактном контроле, выраженное в %.

Статистический анализ проводился с использованием методов непараметрического анализа пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0 «StatSoft Inc». Межгрупповое множественное сравнение показателей осуществляли с использованием критерия Крускалла-Уоллиса, а попарное сравнение с интактным контролем − при помощи критерия Даннета. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0{,}05$. Данные представлены в виде медианы, минимального и максимального значений.

Результаты исследования и их обсуждение

Элиминация цитокинов

Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют, что все 4 образца эффективно (91–100%) элиминировали из физиологического раствора TNFα и IL-1β –после удаления сорбентов в растворе определялись только следовые концентрации (менее 4 пг/мл) этих цитокинов. Аналогично, все исследуемые сорбенты способны связывать IL-10, однако статистически значимый эффект был отмечен только после инкубации с Fe_3O_4 (на 40%), Fe_3O_4 + C (на 37%) и Fe_2O_3 (на 96%). Уровень IL-6 достоверно снижался только после инкубации с Fe_3O_4 + Ag (на 97%) и Fe_2O_3 (на 76%), однако заметна также статистически не подтвержденная ($p > 0{,}05$) тенденция к снижению этого цитокина после коинкубации с Fe_3O_4 (на 36%) и Fe_3O_4 + C (на 40%).

В целом, из исследованных образцов сорбентов наиболее эффективно элиминировали рекомбинантные цитокины человека Fe_2O_3 и чистый магнетит (Fe_3O_4) .

Гемосовместимость ферримагнитных наночастиц

Тестирование исследуемых частиц на гемосовместимость осуществляли, оценивая изменение митохондриальной активности лейкоцитов крови человека после коинкубации с сорбентами относительно показателей интактного контроля клеточной суспензии.

Представленные на рис. 2 данные свидетельствуют о том, что образцы магнетита с модифированной поверхностью Fe_3O_4 + C и Fe_3O_4 + Ag оказывали более выраженный цитотоксический эффект (49 и 84% соответственно) в сравнении с образцами из чистого оксида железа Fe_3O_4 и Fe_2O_3. При этом магнетит обладал наименьшей токсичностью (17%), тогда как Fe_2O_3 вызывал гибель 24% клеток.

Результаты исследований свойств ферримагнитных наночастиц, приведенные в данной работе, свидетельствуют о том, что рассматриваемые наночастицы эффективно элиминируют широкий спектр биологически активных молекул (цитокины, бактериальные экзо-и эндотоксины). Вместе с тем эти материалы обладают высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам крови, что существенно ограничивает возможность их применения для гемосорбции, предполагающей непосредственный контакт наночастиц с клетками крови. Однако указанный материал может рассматриваться как чрезвычайно перспективный для детоксикации бесклеточных физиоло-

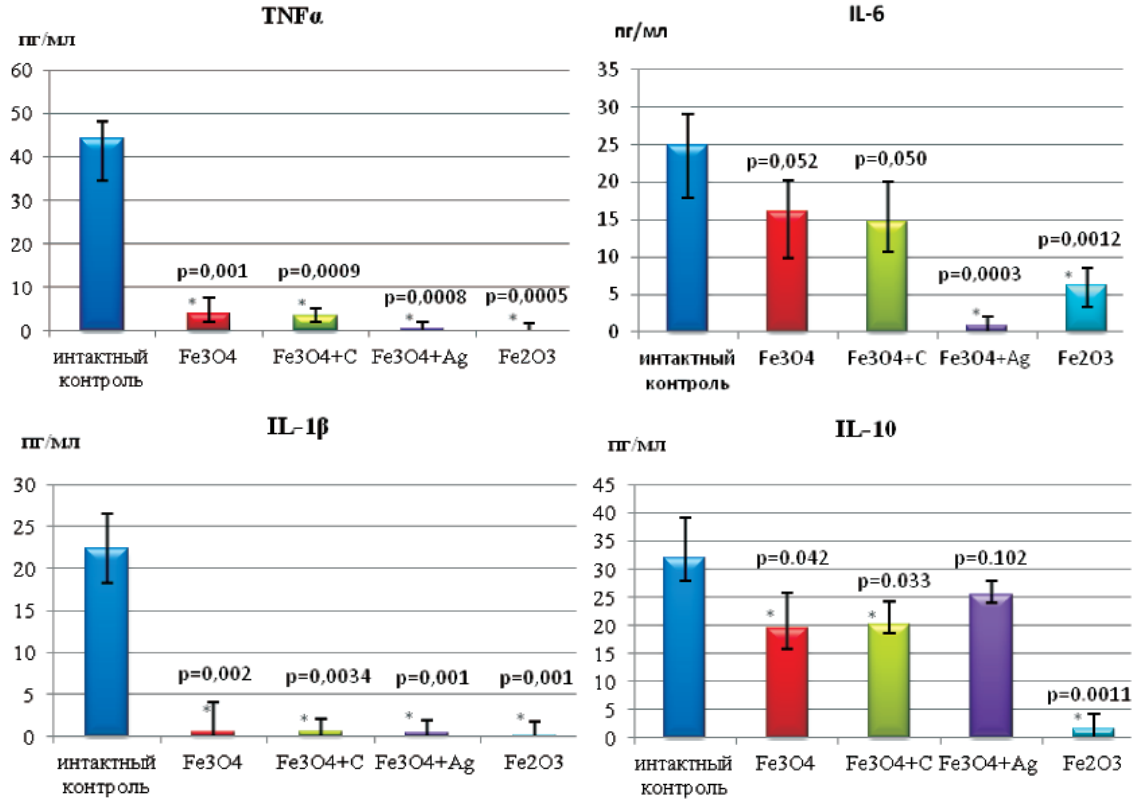

Рис. 1. Концентрация рекомбинантных цитокинов человека в 0,9%-м растворе хлорида натрия после инкубации с ферримагнитными наносорбентами
** – достоверное отличие от интактного контроля (p < 0,05)*

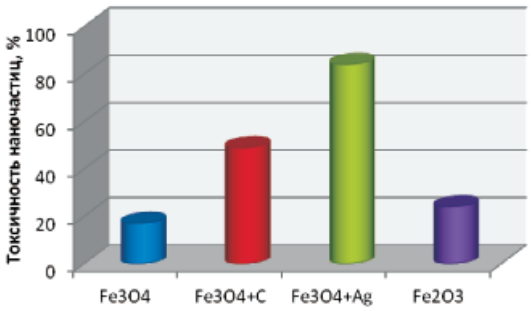

Рис. 2. Гибель МЛ крови человека после коинкубации с ферримагнитными наночастицами

гических жидкостей, таких как лимфа или плазма крови. Кроме того, проблему улучшения гемосовместимости в значительной степени можно разрешить созданием нанокомпозитных материалов, где полимерная гемосовместимая матрица экранирует поверхность неорганического компонента.

Список литературы

1. Белоусов А.Н. Научно-практический опыт применения наночастиц магнетита в медицине // Вестник Национального технического университета «ХПИ». –2010. – Т. 47. – С. 9–16.

2. Шпакова А.П., Павлова К.С., Булычева Т.И. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – №2. – С. 20–23.

3. Яновский Ю.Г. Сравнительные исследования сорбционной эффективности и структуры поверхности нано- и микроразмерных магнитоуправляемых частиц для их использования в медицине и биологии // Технологии живых систем. – 2007. – Т.4, №5–6. – С. 73–84.

4. Cai K. β-Cyclodextrin conjugated magnetic nanoparticles for diazepam removal from blood // Chemical Communications (Cambridge). – 2011. – № 27. – P. 7719-21.

5. de Pont A.C. Hemofiltration in the early phase of sepsis: friend or foe? // Critical Care Medicine. – 2009. – Vol. 37, № 3. – P. 1125–1126.

6. Johnson G.B., Brunn G.J., Platt J.L. Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists // Critical Reviews in Immunology. – 2003. – Vol. 23. – P. 15–44.

7. Madhumita Bhaumik. Removal of fluoride from aqueous solution by polypyrrole/Fe3O4 magnetic nanocomposite // Journal of Hazardous Materials. – 2011. – Vol. 186, Issue 1, 15. – P. 150–159

8. Mikhalovsky S.V. Emerging technologies in extracorporeal treatment: focus on adsorption // Perfusion. – 2003. –Vol. 18 (1). – P. 47–54.

9. Zhao H., Saatchi K., Häfel U.O. Preparation of biodegradable magnetic microspheres with poly(lactic acid)-coated magnetite // J. Magnetism Magnetic Materials. – 2009. – Vol. 321 (10). – P. 1356–1363.

Рецензенты:

Грубер И.М., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории НИИВС им. Мечникова РАМН, г. Москва;

Аминат Р.Т., д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии ГОУ ВПО «Адыгейский государственный университет» г. Майкоп.

Работа поступила в редакцию 21.09.2011.