

М.А. Копаница

МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЗОЛОТЫХ ГЛИКОНАНОЧАСТИЦ ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛЕТКАМ CACO-2

Научный руководитель: д-р биол. наук, доц. И.В. Черных

Кафедра фармацевтической химии

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», г. Рязань

M.A. Kopanitsa

MECHANISM OF CYTOTOXICITY OF GOLD GLYCONANOPARTICLES IN CACO-2 CELLS

Tutor: Dr. Sci. Biol., associate professor I.V. Chernykh

Department of Pharmaceutical Chemistry

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan

Резюме. В исследовании оценена цитотоксичность гликонаночастиц золота на клетках Caco-2 и анализ их влияния на уровень липопероксидации (ЛП), количество белка p53 и каспазы-3. Анализировались растворы ЗНЧ, покрытых остатками фукозы, лактозы и галактозы. Цитотоксичность оценена с помощью МТТ-теста, рассчитана IC₅₀. Методом иммуноферментного анализа выявлено влияние веществ (IC₅₀) на количество p53 и каспазы-3, интенсивность ЛП.

Ключевые слова: золотые гликонаночастицы, МТТ-тест, Caco-2, липопероксидация, транскрипционный фактор p53, каспаза-3

Resume. The aim of the study was to evaluate the cytotoxicity of gold glyconanoparticles on Caco-2 cells and to analyze their effect on the level of lipid peroxidation (LP), the amount of p53 protein and caspase-3. We analyzed solutions of GNP coated with residues of fucose, lactose, and galactose. Using the MTT test, evaluated their cytotoxicity with the calculation of IC₅₀. The effect of substances (IC₅₀) in tumor cells on the amount of p53 protein and caspase-3, the intensity of LP was assessed by ELISA.

Keywords: gold glyconanoparticles, MTT assay, IC₅₀, Caco-2 cell culture, lipid peroxidation, transcription factor p53, caspase-3.

Актуальность. Рак ободочной кишки человека является лидирующим онкологическим заболеванием, при этом используемые химиотерапевтические препараты являются высокотоксичными и неизбирательными [4].

Применение наночастиц благородных металлов в качестве химиотерапевтических агентов является перспективным направлением благодаря наличию ряда специфических физических свойств (явление поверхностного плазмонного резонанса, поглощение в ИК-области, возможность модификации поверхности), выявленной цитотоксичности в отношении опухолевых клеток *invitro*[1]. Наночастицы благородных металлов также обладают развитой поверхностью с возможностью её модификации, что позволяет придавать им различные фармакологические характеристики. Актуальной является модификация поверхности наночастиц золота углеводными фрагментами, которые обладают тропностью к мембранным лектинам опухолевых клеток, что придает им потенциальную селективность действия [2].

Цель: Оценка цитотоксичности гликонаночастиц золота на клетках Caco-2 и

анализ их влияния на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), количество белка p53 и каспазы-3.

Задачи:

1. Оценить цитотоксичность гликонаночастиц золота *invitro* по отношению к клеткам аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2).

2. Проанализировать влияние золотых гликонаночастиц на уровень липопероксидации, количество белка p53 и каспазы-3.

Материалы и методы. Исследование противоопухолевой активности наночастиц золота проводили на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2). Клетки культивировали на 96-луночном планшете до достижения монослоя[3].

В исследовании использовались коллоидные растворы гликонаночастиц золота с диаметром 18 – 21 нм в питательной среде[5]:

- Золото-Фукоза-Меркаптогексаноилгидразид (Au-Fuc-MNH) (1 мг/мл);
- Золото-Лактоза-Меркаптопропаноилгидразид (Au-Lac-MPH) (2 мг/мл);
- Золото-Галактоза-Меркаптопропаноилгидразид (Au-Gal-MPH) (1 мг/мл).

Срок инкубации клеток с растворами гликонаночастиц составил 2 и 8 ч. Использовали следующие диапазоны концентраций растворов: 100 – 600 мкг/мл (Au-Fuc-MNH); 200 – 900 мкг/мл (Au-Lac-MPH); 100 – 550 мкг/мл (Au-Gal-MPH) при 2-часовой инкубации; конечные концентрации наночастиц при 8-часовой инкубации были ниже, что связано с предполагаемой более высокой активностью.

Для оценки влияния растворов гликонаночастиц золота на интенсивность метаболизма клеток и дальнейшего расчета IC_{50} (GraphPadPrizm 8.4.3) использовали МТТ-тест.

Оценка влияния исследуемых веществ на интенсивность ПОЛ проводилась в концентрациях, соответствующих их IC_{50} . Анализировалось общее количество SH-групп по методу Элмана (с 5,5'-дитиобис-2-нитробензоатом в неденатурирующих условиях), количество малонового диальдегида (МДА), глутатионпероксидазы IV типа (G-per). Также исследовался уровень транскрипционного фактора p53 и каспазы-3 в клеточном лизате с помощью гетерогенного иммуноферментного анализа с применением коммерческих наборов BlueGene (Китай). Уровень SH-групп, МДА, G-per, белка p53 и каспазы-3 пересчитывали на количество белка, который определяли по методу Bradford.

В качестве контроля использовались клетки, инкубируемые с чистой питательной средой. Каждый анализ повторялся трижды.

Обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0.

Результаты и их обсуждение. МТТ-тест показал, что протестированные гликонаночастицы проявляли цитотоксичность в отношении культуры клеток Caco-2.

Для Au-Fuc-MNH IC_{50} составила $581,5 \pm 28,9$ и $335,5 \pm 35,5$ мкг/мл после 2- и 8-часовой инкубации соответственно; для Au-Lac-MPH – $768,9 \pm 50,3$ и $514,5 \pm 44,8$ мкг/мл, для Au-Gal-MPH – $466,9 \pm 29,2$ и $298,6 \pm 27,8$ мкг/мл. В случае более длительной инкубации, происходило достоверное снижение IC_{50} протестированных

наночастиц Au-Fuc-MNH, Au-Lac-MPH и Au-Gal-MPH по отношению к клеткам в 1,43 ($p=0,0007$), в 1,50 ($p=0,0003$) и в 1,56 раза ($p=0,0003$) в сравнении с 2-часовой инкубацией соответственно.

Оценка интенсивности ПОЛ показала, что со всеми гликонаночастицами в концентрациях, соответствующих их IC_{50} , уровень SH-групп в лизате клеток резко снижался при 2-часовой инкубации клеток Caco-2: с Au-Fuc-MPH – в 35,73 раза ($p=0,008$), с Au-Lac-MPH – в 11,91 раза ($p=0,005$), с Au-Gal-MPH – в 20,56 раза ($p=0,006$). При 8-часовой инкубации данный показатель снижался для указанных гликонаночастиц в 6,14 раза ($p=0,007$), в 5,61 раза ($p=0,004$) и в 20,78 раза ($p=0,008$) соответственно.

Достоверное возрастание уровня МДА зарегистрировано только при инкубации опухолевых клеток с Au-Fuc-MNH: через 2 часа показатель возрастал в 1,42 раза (уровень тенденции: $p=0,099$), через 8 ч – в 1,58 ($p=0,048$).

Все протестированные наночастицы при инкубации с клетками достоверно не изменяли количество антиоксидантного фермента G-per.

Со всеми протестированными наночастицами наблюдалось возрастание уровня проапоптотического транскрипционного фактора p53 в клеточном лизате при 8-часовой инкубации: в 2,56 раза ($p=0,021$) для Au-Fuc-MNH, в 2,26 раза (уровень тенденции: $p=0,057$) для Au-Lac-MPH и в 2,16 раза для Au-Gal-MPH (уровень тенденции: $p=0,078$).

При этом уровень каспазы-3 – фермента, являющегося ключевым звеном апоптотического процесса, не изменялся при инкубации клеток с золотыми гликонаночастицами ($p>0,05$).

Полученные результаты цитотоксичности тестируемых наночастиц по отношению к культуре клеток Caco-2 могут объясняться интенсивным внутриклеточным накоплением гликонаночастиц, что связано с наличием на поверхности частиц остатков сахаров, обладающих сродством к мембранным лектинам опухолевых клеток. Оценка интенсивности ПОЛ показала, что Au-Fuc-MNH проявляют характер прооксидантов, в то же время механизм цитотоксичности Au-Lac-MPH и Au-Gal-MPH, вероятно, не связан с интенсификацией перекисного окисления липидов, так как не наблюдалось достоверного возрастания МДА в клеточном лизате. Отсутствие изменения количества G-per при инкубации со всеми анализируемыми наночастицами может быть связано с недостаточной длительностью инкубации, которая необходима для интенсификации экспрессии гена, кодирующего данный антиоксидантный фермент. Гибель клеток, вероятно, происходит отличным от апоптоза путем, о чем свидетельствует отсутствие изменений уровня каспазы-3. Уровень транскрипционного фактора p53 возрастал при 8-часовой инкубации клеток Caco-2 с гликонаночастицами золота, что говорит о возможной гибели клеток в процессе аутофагии, который также индуцируется транскрипционным фактором p53.

Выводы:

1. Показана цитотоксичность гликонаночастиц золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, по отношению к

культуре клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) уже при 2-часовой инкубации.

2. Золотые наночастицы, модифицированные остатками фукозы, оказывают прооксидантное действие, о чем свидетельствует возрастание количество малонового диальдегида как при 2, так и при 8 часовой инкубации с опухолевыми клетками.

3. Цитотоксическое действие наночастиц золота, модифицированных остатками фукозы, лактозы и галактозы, по отношению к клеткам аденокарциномы ободочной кишки человека реализуется за счет активации липопероксидации (Au-Fuc-MNH) или путем инициации одного из путей запрограммированной клеточной гибели через активацию транскрипционного фактора p53.

Литература

1. Chakraborty A., Das A., Raha S., Barui A. Size-dependent apoptotic activity of gold nanoparticles on osteosarcoma cells correlated with SERS signal// *Journal of Photochemistry and Photobiology*. – 2020. – Vol.203. – Art.No. 111778.

2. Jin S., Cheng Y., Reid S., Li M., Wang B. Carbohydrate Recognition by Boronolactins, Small Molecules, and Lectins // *Med. Res. Rev.* – 2010. – Vol.30, №2. – P.171–257.

3. Sambuy Y., Angelis I. D., Ranaldi G., Scarino M. L., Stamatii A., Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics // *Cell Biol Toxicol.* – 2005. – Vol. 21, №1. – P.1–26.

4. Бойцов С.А., Деев А.Д., Шальнова С.А. Смертность и факторы риска неинфекционных заболеваний в России: особенности, динамика, прогноз // *Терапевтический архив (архив до 2018 г.)*. – 2017. – Т.89, №1. – С.5–13.

5. Ершов А.Ю., Мартыненко А.А., Лагода И.В., Якунчикова Е.А., Копаница М.А., Черных И.В., Якиманский А.В. Синтез гликонаночастиц золота на основе 3-меркаптопропионилгидразонов 6-дезоксид- и 2-(ацетиламино)альдоз // *Журнал общей химии*. – 2020. – Т.91, №2. – С.260–268.