

УДК 577 : 544.525.4 : 544.77:544.723.2

МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ НСТ116

© 2025 г. М. Т. Нгуен¹, А. А. Маркова¹, Б. Б. Батчаева¹, М. Г. Горобец¹,
А. В. Торощева¹, М. В. Мотякин¹, М. И. Абдуллина¹, А. В. Бычкова^{1*}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: anna.v.bychkova@gmail.com

Поступила в редакцию 19.07.2024

После доработки 06.09.2024

Принята в печать 20.09.2024

Синтезированы гибридные наноразмерные системы на основе магнитных наночастиц оксидов железа (НЧОЖ) и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), содержащие метиленовый синий (МС) как модельный фотосенсибилизатор. Полученные наносистемы ЧСА@НЧОЖ были охарактеризованы по размеру и составу с помощью спектрофотометрии УФ- или видимой области (в частности, с использованием метода Брэдфорда), методов динамического светорассеяния и электронного магнитного резонанса. Выполнено исследование темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности МС, НЧОЖ, ЧСА@НЧОЖ, МС–НЧОЖ, МС–(ЧСА@НЧОЖ) на опухолевых клетках аденокарциномы толстой кишки человека НСТ116. В условиях эксперимента разница между темновым и световым действием наносистем на клетки была значительно расширена при иммобилизации фотосенсибилизатора на поверхность частиц-носителей по сравнению со свободным фотосенсибилизатором в эквивалентных концентрациях.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, наночастицы оксидов железа, магнитные наночастицы, фотодинамическая терапия, гибридные наноразмерные системы, метиленовый синий, клеточная линия НСТ116.

DOI: 10.31857/S0207401X25030119

1. ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия активно развивается направление науки, связанное с дизайном гибридных наноразмерных систем различного состава, в числе которых можно выделить наночастицы оксидов железа (НЧОЖ) с биосовместимыми функциональными покрытиями, в частности, из сывороточного альбумина. Эти системы потенциально применимы как для диагностики онкологических заболеваний, влияя на контрастность при визуализации опухолей, так и для осуществления терапевтического воздействия за счет доставки терапевтических веществ в клетки-мишени, обеспечивая их аккумуляцию в целевой области, а также за счет нагрева под действием СВЧ [1–7]. Метиленовый синий (МС) – широко изученный и коммерчески доступный фотосенсибилизатор (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ) опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*, охарактеризованный как эффективный и безопасный

ФС, вызывающий селективную гибель опухолевых, но не здоровых клеток [8]. Метиленовый синий вводили в состав различных наносистем, включая частицы мезопористого диоксида кремния, покрытые сывороточным альбумином [9], и НЧОЖ, покрытые оболочкой из диоксида кремния [10].

Цели настоящей работы – синтез гибридной наносистемы, включающей МС, на основе НЧОЖ, покрытых человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), и оценка применимости полученной наносистемы в ФДТ опухолевых клеток карциномы толстой кишки человека НСТ116 как актуальной модели для исследования активности новых агентов для ФДТ [11–13].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления образца ЧСА@НЧОЖ гидрозоль магнитных наночастиц, синтезированных методом соосаждения и электростатически ста-

билизованных 0.1 М фосфатно-цитратным буфером (0.05 М NaCl) с рН = 4.3, и 10-кратный избыток по массе ЧСА производства АО НПО “Микроген” (Россия) смешивали в 0.05 М фосфатном буфере с рН = 6.3, инкубировали в течение 30 ч при температуре 25 °С, а затем подвергали магнитной сепарации для удаления избытков белка и буфера, как описано ранее [14]. Образец НЧОЖ готовили аналогичным образом без использования белка. Присутствие белка в системе ЧСА@НЧОЖ оценивали методом Бредфорда с использованием спектрофотометра SPECTROstar Nano производства компании BMG (Germany). Концентрации НЧОЖ определяли в сравнении с эталоном методом электронного магнитного резонанса с использованием спектрометра EMX-8/2.7 X-диапазона производства компании Bruker (Germany). Метиленовый синий производства компании Sigma-Aldrich (Germany), растворенный в ДМСО, с концентрацией $5 \cdot 10^{-2}$ М, был введен в объеме 1 мкл к 500 мкл гидрозолей ЧСА@НЧОЖ и НЧОЖ с концентрациями 3 мг/мл по НЧОЖ. Смеси инкубировали при 20 °С в течение 12 ч, а затем подвергали магнитной сепарации для удаления несвязанного МС и получения количественных характеристик связывания. Оптическую плотность растворов МС измеряли при длине волны 660 нм на спектрофотометре UV3101RS производства компании Shimadzu (Japan). Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния с использованием анализатора размеров и счетной концентрации наночастиц АРНмини производства ООО “КОРТЭК” (Россия).

Для экспериментов использована клеточная линия человека НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки человека), протестированная в коллекции типовых культур American Type Culture Collection (USA). Клетки культивировали в базовой среде DMEM. В культуральную среду добавляли следующие компоненты до конечных концентраций: 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (использованы среды и добавки производства компании “ПанЭко”, Россия). Инкубацию проводили при 37 °С в увлажненной атмосфере (5 об.% CO₂). В экспериментах использована культура в логарифмической фазе роста. Для профилактики микоплазменного заражения использовался препарат Мусокилл (GE, USA). Перед началом экспериментов проводилось

не менее трех пассажей на свободной от антимиоплазменного препарата среде.

Цитотоксическое действие образцов исследовали методом МТТ-теста (по способности восстановления желтой соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола в темно-синий кристаллический формазан митохондриями живых клеток) [15]. По результатам исследования цитотоксичности построены кривые выживаемости и определены показатели IC₅₀ (концентрации, необходимые для гибели 50% клеток) [16]. Клетки рассеивали в лунки 96-луночного планшета (NUNC, USA) – 5000 клеток в 190 мкл культуральной среды, инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в увлажненной атмосфере (5 об.% CO₂). Образцы, содержащие МС, вносили в культуральную среду до конечных концентраций по метиленовому синему, равных 0.3–5.0 мкМ; для образцов, не содержащих МС, вносили эквивалентное пробам с МС количество частиц. В темновом эксперименте клетки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в увлажненной атмосфере (5 об.% CO₂). Для светового эксперимента клетки инкубировали в течение 24 ч, меняли среду на свежую, освещали диодным источником света с длиной волны 660 нм и конечной плотностью дозы 8 Дж/см² с использованием аппарата АФС “Полироник” (Россия). В лунки вносили по 20 мкл водного раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл (“ПанЭко”, Россия) и выдерживали 2 ч. После окончания инкубации клеток с МТТ-реагентом культуральную среду отбирали, клетки ресуспендировали в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и измеряли оптическую плотность раствора на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Scientific, USA) при длине волны 540 нм. Процент клеток, выживших при действии каждой концентрации исследуемых веществ, рассчитывали как отношение средней оптической плотности в лунках после инкубации с данной дозой к средней оптической плотности контрольных лунок (значения последних приняты за 100%). Каждую концентрацию изучали с трехкратной статистикой, на кривых выживаемости приведены стандартные отклонения от среднего.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для синтезированных гибридных наносистем ЧСА@НЧОЖ и НЧОЖ связывание МС на 1 мг НЧОЖ составило (5.8 ± 0.6) и (5.3 ± 0.6) мкг, со-

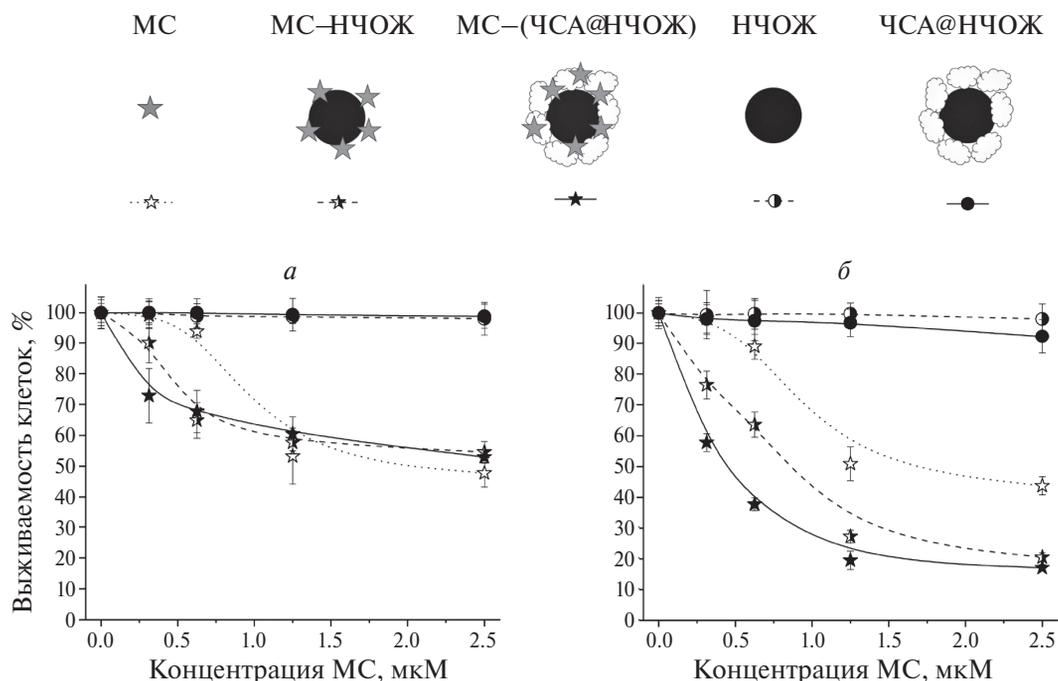


Рис. 1. Выживаемость клеток аденокарциномы толстой кишки человека НСТ116 при действии исследованных образцов в темновом (*а*) и световом (*б*) экспериментах. В случае частиц без МС (НЧОЖ и ЧСА@НЧОЖ) клетки инкубировали с количеством частиц, эквивалентным частицам с МС (МС–НЧОЖ и МС–(ЧСА@НЧОЖ) соответственно). В верхней части рисунка приведены наименования исследуемых систем, их структуры, а также их обозначения, присутствующие на рисунках.

ответственно, что доказывает связывание МС как с поверхностью самих НЧОЖ, так и с ЧСА, причем в ЧСА@НЧОЖ нельзя исключать конкуренцию между ЧСА и НЧОЖ за связывание фотосенсибилизатора. Содержание белка в МС–(ЧСА@НЧОЖ) составило ~ 72 мкг на 1 мг НЧОЖ.

В результате связывания МС с поверхностью ЧСА@НЧОЖ и НЧОЖ наблюдался рост средних диаметров частиц, дающих максимальный вклад в распределение интенсивности рассеяния света: от (104 ± 18) нм для ЧСА@НЧОЖ до (179 ± 30) нм для МС–(ЧСА@НЧОЖ) и от (93 ± 21) нм для НЧОЖ до (167 ± 36) нм для МС–НЧОЖ, объясняемый, вероятно, воздействием ДМСО на системы при синтезе, приводящим к частичной потере их агрегативной устойчивости, а также связыванием МС с поверхностью наноразмерных систем, обусловленным электростатическими взаимодействиями [17].

Наносистемы без метиленового синего не вызывали гибель клеток в исследованном диапазоне концентраций. Наносистемы МС–(ЧСА@НЧОЖ) и МС–НЧОЖ показали низкую темновую цитотоксичность, не приводящую к 50%-ной гибели клеток при концентрациях МС до 5 мкМ, однако в эксперименте с фотовозбуждением (рис. 1) гибель 50% клеток была достигнута при субмикро-

молярной концентрации в пробе МС–(ЧСА@НЧОЖ). В условиях эксперимента разница между темновым и световым действием на клетки была значительно расширена при иммобилизации МС на поверхность частиц-носителей по сравнению со свободным МС (табл. 1). Таким образом, фотосенсибилизатор МС проявил себя втрое эффективнее на наноносителях МС–(ЧСА@НЧОЖ), чем в их отсутствие. Также следует подчеркнуть, что при использовании системы МС–(ЧСА@НЧОЖ) по сравнению с МС–НЧОЖ возрастает гибель клеток, что говорит о важности наличия биосовместимого белкового покрытия для иммобилизации ФС на поверхности наночастиц оксидов железа. Приведенные данные показывают преимущество использования НЧОЖ и ЧСА@НЧОЖ для доставки фотосенсибилизатора в клетки по сравнению со свободным ФС.

Для получения данных ЭМР, спектральных характеристик и анализа цитотоксичности в работе использовано оборудование ЦКП “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН (проекты № 122041400114-2, № 122041300210-2, № 122041300207-2).

Синтез гибридных наносистем и их физико-химический анализ проведены за счет гранта Рос-

Таблица 1. Показатели 50%-ной выживаемости клеток НСТ116 (IC₅₀) в условиях темного и светового экспериментов (по МС)*

Образец	IC ₅₀ , мкМ	
	темнота	освещение 660 нм, 8 Дж/см ²
МС	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2
МС–НЧОЖ	> 5	0.8 ± 0.1
МС–(ЧСА@НЧОЖ)	> 5	0.4 ± 0.1
НЧОЖ	> 5	> 5
ЧСА@НЧОЖ	> 5	> 5

*В случае частиц без МС (системы НЧОЖ и ЧСА@НЧОЖ) показатели цитотоксичности даны по количеству частиц, эквивалентному частицам с МС (МС–НЧОЖ и МС–(ЧСА@НЧОЖ) соответственно).

сийского научного фонда № 22-75-10150; <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen Q., Liu Z.* // *Adv. Mater.* 2016. V. 28. № 47. P. 10557.
2. *Israel L.L., Galstyan A., Holler E. et al.* // *J. Control. Release.* 2020. V. 320. P. 45.
3. *Chubarov A.S.* // *Magnetochemistry.* 2022. V. 8. № 2. P. 13.
4. *Бердникова Н.Г., Донцов А.Е., Ерохина М.В. и др.* // *Хим. физика.* 2019. Т. 38. № 12. С. 48. <https://doi.org/10.1134/S0207401X19120045>
5. *Menshutina N.V., Uvarova A.A., Mochalova M.S. et al.* // *Russ J. Phys Chem. B.* 2023. V. 17. № 7. P. 1507. <https://doi.org/10.1134/S1990793123070163>
6. *Кольванова М.А., Климович М.А., Дементьева О.В. и др.* // *Хим. физика.* 2023. Т. 42. № 1. С. 64. <https://doi.org/10.31857/S0207401X23010065>
7. *Поволоцкий А.В., Солдатова Д.А., Лукьянов Д.А., Соловьёва Е.В.* // *Хим. физика.* 2023. Т. 42. № 12. С. 70. <https://doi.org/10.31857/S0207401X23120087>
8. *Tardivo J.P., Del Giglio A., de Oliveira C.S. et al.* // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2005. V. 2. № 3. P. 175.
9. *Zhang Y., Ye Z., He R. et al.* // *Colloids Surf. B.* 2023. V. 224. P. 113201.
10. *Toledo V.H., Yoshimura T.M., Pereira S.T. et al.* // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2020. V. 209. P. 111956.
11. *Rodrigues J.A., Correia J.H.* // *Intern. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 12204.
12. *Бурцев И.Д., Егоров А.Е., Костюков А.А. и др.* // *Хим. физика.* 2022. Т. 41. № 2. С. 41. <https://doi.org/10.31857/S0207401X22020029>
13. *Климович М.А., Сажина Н.Н., Радченко А.Ш. и др.* // *Хим. физика.* 2021. Т. 40. № 2. С. 33. <https://doi.org/10.31857/S0207401X21020084>
14. *Vychkova A.V., Yakunina M.N., Lopukhova M.V. et al.* // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. № 12. P. 2771.
15. *Nguyen M.T., Guseva E.V., Ataeva A.N. et al.* // *Intern. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 7995.
16. *Далидчик Ф.И., Лопатина О.А., Ковалевский С.А. и др.* // *Хим. физика.* 2024. Т. 43. № 2. С. 92.
17. *Hu Y.-J., Li W., Liu Y. et al.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. V. 39. № 3–4. P. 740.

MAGNETIC NANOPARTICLES AS A PLATFORM FOR DELIVERY OF THE PHOTOSENSITIZER METHYLENE BLUE TO HCT116 TUMOR CELLS

M. T. Nguyen¹, A. A. Markova¹, B. B. Batchaeva¹, M. G. Gorobets¹,
A. V. Toroptseva¹, M. V. Motyakin¹, M. I. Abdullina¹, A. V. Bychkova^{1*}

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**E-mail: anna.v.bychkova@gmail.com*

Hybrid nanosystems based on magnetic iron oxide nanoparticles (IONPs) and human serum albumin (HSA), containing methylene blue (MB) as a model photosensitizer, have been synthesized. The resulting HSA@IONP nanosystems were characterized for size and composition using UV/visible spectrophotometry (particularly, using the Bradford method), dynamic light scattering, and electron magnetic resonance. A study of the dark and photoinduced cytotoxicity of MB, IONP, HSA@IONP, MB–IONP, MB–(HSA@IONP) on of human colon adenocarcinoma HCT116 cells was carried out. Under the experimental conditions, the difference between the dark and light-induced cytotoxicity of nanosystems on cells was significantly enhanced when the photosensitizer was immobilized on the surface of the carrier particles compared to free photosensitizer in equivalent concentrations.

Keywords: human serum albumin, iron oxide nanoparticles, magnetic nanoparticles, photodynamic therapy, hybrid nanosystems, methylene blue, HCT116.

REFERENCES

1. Q. Chen, Z. Liu. *Adv. Mater.* **28**, 10557–10566 (2016).
<https://doi.org/10.1002/adma.201600038>
2. L.L. Israel, A. Galstyan, E. Holler et al. *J. Control. Release.* **320**, 45 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.009>
3. A.S. Chubarov. *Magnetochemistry* **8**, 13 (18 pages) (2022).
<https://doi.org/10.3390/magnetochemistry8020013>
4. N.G. Berdnikova, A.E. Dontsov, M.V. Erokhina et al. *Russ. J. Phys. Chem. B.* **13**, 942 (2019).
<https://doi.org/10.1134/S1990793119060150>
5. N.V. Menshutina, A.A. Uvarova, M.S. Mochalova et al. *Russ. J. Phys. Chem. B.* **17**, № 7, 1507 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123070163>
6. M.A. Kolyvanova, M.A. Klimovich, O.V. Dement'eva et al. *Russ. J. Phys. Chem. B.* **17**, 206 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123010062>
7. A.V. Povolotskiy, D.A. Soldatova, D.A. Lukyanov et al. *Russ. J. Phys. Chem. B* **17**, 1398 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123060192>
8. J.P. Tardivo, A. Del Giglio, C.S. de Oliveira et al. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2**, 175 (2005).
[https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9)
9. Y. Zhang, Z. Ye, R. He et al. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **224**, 113201 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113201>
10. V.H. Toledo, T.M. Yoshimura, S.T. Pereira et al. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **209**, 111956 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111956>
11. J.A. Rodrigues, J.H. Correia. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 12204 (2023).
<https://doi.org/10.3390/ijms241512204>
12. I.D. Burtsev, A.E. Egorov, A.A. Kostyukov et al. *Russ. J. Phys. Chem. B.* **16**, 109 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010195>
13. M.A. Klimovich, N.N. Sazhina, A.S. Radchenko et al. *Russ. J. Phys. Chem. B.* **15**, 93 (2021).
<https://doi.org/10.1134/S1990793121010206>
14. A.V. Bychkova, M.N. Yakunina, M.V. Lopukhova et al. *Pharmaceutics.* **14**, 2771 (2022).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122771>
15. M.T. Nguyen, E.V. Guseva, A.N. Ataeva et al. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 7995 (2023).
<https://doi.org/10.3390/ijms24097995>
16. F.I. Dalidchik, O.A. Lopatina, S.A. Kovalevsky et al. *Russ. J. Phys. Chem. B.* **18**, 266 (2024).
<https://doi.org/10.1134/S1990793124010238>
17. Y.-J. Hu, W. Li, Y. Liu et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, 740 (2005).
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.009>