

3	300	0.60	15.32	0.78	17.27	1497.7	1.13	349.9	0.53
4	350	0.60	15.44	0.78	17.19	1478.3	1.13	356.9	0.53
5	400	0.56	15.67	0.77	16.18	1379.4	1.13	373.1	0.57

где W_0 - удельный объем микропор, E_0 - стандартная характеристическая энергия адсорбции по бензолу, x_0 - радиус микропор, a_0 - предельная величина адсорбции азота, $S_{БЭТ}$ - удельная поверхность по методу БЭТ, W_s - суммарный объем пор, S_{me} - удельная поверхность мезопор, W_{me} - объем мезопор.

Как следует из данных таблицы 1, при повышении температуры активации от 130 до 350 °С наблюдается рост величин W_0 , a_0 и $S_{БЭТ}$, который затем сменяется падением в области температур 350 - 400 °С. Образцы, полученные при температуре активации 300 и 350 °С, характеризуются наибольшими значениями объема микропор, предельной величиной адсорбции азота, рассчитанными по уравнению Дубинина-Радushkevicha, и удельной поверхности по БЭТ. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что для получения оптимальной пористой структуры данного вида MOF наиболее предпочтительным является проведение активации в области температур 300 - 350 °С.

Следует также отметить, что наличие развитой пористой структуры MOF позволяет подбирать их для конкретных задач, в частности, в области адсорбции как высокоэффективных адсорбентов различных газов [2].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ:

1. Батракова М.К., Соловцова О.В., Фомкин А.А., Цивадзе А.Ю., Школин А.В., Ширяев А.А., Высоцкий В.В., Синтез и структурно - энергетические характеристики металлоорганической каркасной структуры MOF Al-BTC //Физикохимия поверхности и защита материалов, 2017, Т. 53, № 6, С. 563-568.
2. Князева М.К., Цивадзе А.Ю., Соловцова О.В., Фомкин А.А., Прибылов А.А., Школин А.В., Пулин А.Л., Меньшиков И.Е., Адсорбция метана в металлоорганической каркасной структуре MOF Al-BTC //Физикохимия поверхности и защита материалов, 2019, Т. 55, № 1, С. 11-17.

ФОРМИРОВАНИЕ ТРЕХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КЛАСТЕРОВ ИЗ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ И ПРИРОДНЫМ МИНЕРАЛОМ ГАЛЛУАЗИТОМ FORMATION OF THREE-DIMENSIONAL CELL CLUSTERS FROM MAMMALIAN CELLS MODIFIED BY MAGNETIC NANOPARTICLES AND THE NATURAL MINERAL HALLOYSITE

Рожина Э.В., Данилушкина А.А., Баташева С.Н., Ишмухаметов И.Р., Фахруллин Р.Ф.
Rozhina E.V., Danilushkina A.A., Batasheva S.N., Ishmukhametov I.R., Fakhrullin R.F.

*Россия, Казанский федеральный университет, ИФМуБ, НИЛ OpenLab
«Бионанотехнологии», rozhinaelvira@gmail.com*

Формирование трехмерных кластеров из различных культур клеток млекопитающих актуально для клеточной биологии из-за возможного их применения в тестированиях противораковых препаратов [1], скрининга токсичности наноматериалов, а также понимания 3D развитие органов млекопитающих. Сфероиды в значительной степени имитируют микроокружение живых тканей in vivo [2]. Магнитные наночастицы в настоящее время

широко применяются в биомедицине, терапии рака, тканевой инженерии благодаря их высокой биосовместимости и стабильности [3]. Второй тип нетоксичных и экологически чистых наноматериалов с широким спектром потенциального использования - это нанотрубки галлуазита, которые представляют собой многослойные нанотрубки с внешним диаметром около 50 нм и внутренним диаметром 15 нм. Природный минерал галлуазит используется в качестве наносредств для переноса лекарств и ферментов в тканевой инженерии, а также для доставки противоопухолевых средств, в том числе тех, которые влияют на метастазирование.

Однако, несмотря на растущий интерес к применению сфероидов в качестве моделей органов человека в различных исследованиях, существует мало доказательств о влиянии наноматериалов на формирование сфероидов. Сфероиды могут приобретать новые свойства из-за их модификации наноматериалами, в частности, из-за способности манипулировать внешним магнитным полем. Нами были сформированы сфероиды из нескольких клеточных линий, используя природный минерал галлуазит и магнитные наночастицы для модификации отдельных клеток, впоследствии используемых для формирования многоклеточных кластеров (рисунок 1).

МНЧ (магнитные наночастицы) были приготовлены из водных растворов FeCl_3 , в соответствии с методикой [4]. Затем МНЧ стабилизировали путем инкубации с катионным полиэлектролитом ПАГ (поли (аллиламин гидрохлорид) Mw 70 кДа) в течение 12 часов с последующей промывкой дистиллированной водой от избытка поликатиона. Характеристики наночастиц (дзета-потенциал и гидродинамический размер) были получены с использованием Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Суспензию МНЧ в NaCl (0,15 M) стерилизовали с использованием шприцевого фильтра Millipore 0,45 мкм перед экспериментальными процедурами. Концентрация магнитных наночастиц составляла 0,025 мг / мл. Клетки трипсинизировали, центрифугировали, супернатант удаляли и клетки суспендировали в растворе наночастиц в соотношении 10^6 клеток к 1 мл МНЧ-ПАГ. После 10 минут инкубации с легким встряхиванием клетки отделяли от несвязанных МНЧ центрифугированием (1500 об / мин в течение 5 минут) и трижды промывали буфером. Полученные функционализированные клетки были использованы для формирования сфероидов.

Нанотрубки галлуазита (Китай) в концентрации 10 мг / мл промывали деионизированной водой, стерилизовали этанолом (70%) и промывали 5 раз деионизированной стерильной водой. Клетки смешивали с нанотрубками природного минерала галлуазита (50 мкг на 100 000 клеток) в течение 1-2 мин и помещали в висющую каплю для образования сфероида.

Были использованы клетки рака легких человека (A549), рака шейки матки человека (Hela), рака печени человека (Hep3B), приобретенные в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Rockville, Maryland, USA). Все клетки культивировали в стандартных условиях (5% CO_2 при 37 ° C) в минимальной среде Игла Альфа (α MEM) с добавлением 0,2 mM L-глутамина, 100 ед / мл пенициллина, 100 мкг / мл стрептомицина и 10% инактивированной бычьей сыворотки (РАА). Метод «висящей капли» был использован для образования сфероидов [5]. Клетки, модифицированные наноматериалами, культивировали в висящих каплях в течение 24-168 ч в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 при 37 ° C.

Результаты: Распределение наноматериалов на поверхности и внутри сфероида, образованного из клеток A549, модифицированных нанотрубками MNPs-PAH и галлуазитами, было визуализировано с помощью гиперспектральной микроскопии (рисунок 1, Б). Показано, что оба типа наноматериалов проникают в клетки, предположительно, путем эндоцитоза (рисунок 1, В). Наноматериалы были обнаружены в эндосомах и фагосомах. Наличие нанотрубок в клетках не меняет клеточную структуру: клеточная поляриность сохраняется, и нет признаков конденсации хроматина в ядре. Модификация клеток A549 двумя типами наноматериалов позволяет перемещать клетки с помощью постоянного магнита.

Трехмерная клеточная структура, благодаря своим особым характеристикам, таким как формирование внеклеточного матрикса, является более реалистичной моделью для оценки

различных воздействий окружающей среды на живой организм, чем двумерная. Мы сравнили реакцию клеток, культивируемых в монослоях или сфероидах, на добавление МНЧ и нанотрубок галлуазита путем измерения активности NO-синтазы. В контроле сфероидные культуры производили меньше оксида азота, чем однослойные культуры. МНЧ и нанотрубки природного минерала галлуазита, добавленные отдельно или одновременно, не вызывали значительного увеличения активности синтазы, в то время как в 3D культурах продукция NO различалась в зависимости от тестируемого наноматериала.

Таким образом, нами показана возможность формирования многоклеточных кластеров сфероидов с использованием сферических магнитных наночастиц и природного материала галлуазита стержневой формы. Также выявлено, что 3D сфероиды являются более чувствительной моделью при оценке токсичности различных субстратов.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и грантов РФФИ № проекта 18-34-00306 мол_а № проекта 18-44-160001.

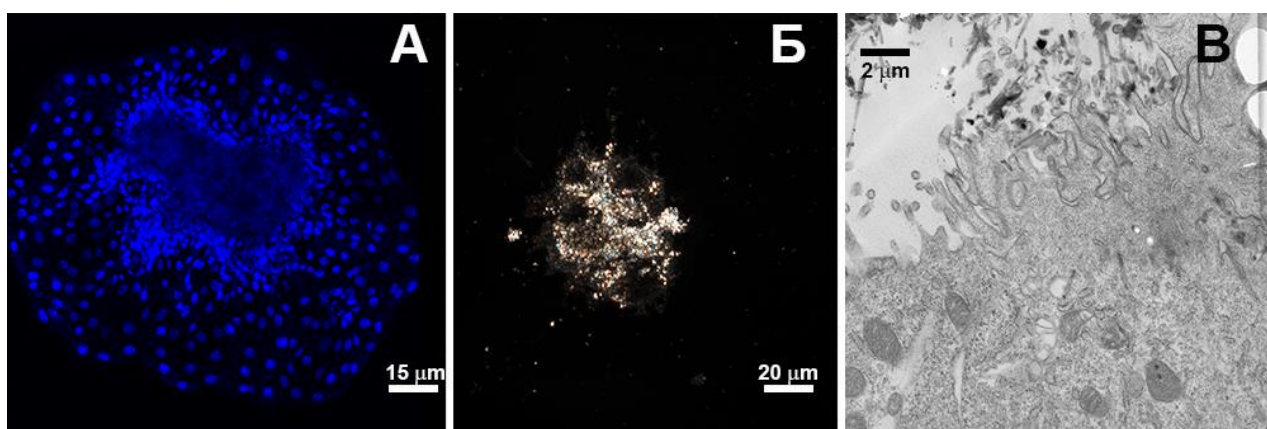


Рис.1 Визуализация трехмерного многоклеточного кластера с использованием лазерной конфокальной микроскопии (А); визуализация многоклеточного кластера из клеток, модифицированных магнитными наночастицами и нанотрубками галлуазита с использованием темнопольной микроскопии (Б); визуализация сорбции наноматериалов клетками, с использованием просвечивающей электронной микроскопии (В).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ:.

1. Theodoraki, M. A. Spontaneously-forming spheroids as an in vitro cancer cell model for anticancer drug screening / M.A. Theodoraki [et al.] // *Oncotarget*. - 2015. - №6. - P. 21255-21267.
2. Ivascu, A. Rapid Generation of Single-Tumor Spheroids for High-Throughput Cell Function and Toxicity Analysis / A. Ivascu, M. Kubbies // *J. Biomolecular Screening*. - 2006. - №11. - P.922-932.
3. Silva, L.H Magnetic targeting as a strategy to enhance therapeutic effects of mesenchymal stromal cells / L.H. Silva [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* - 2017. - №8. - P.58.
4. Dзамукова, М.Р. Cell surface engineering with polyelectrolyte-stabilized magnetic nanoparticles: A facile approach for fabrication of artificial multicellular tissue-mimicking clusters / M.R. Dзамукова [et al.] // *Nano Research*. - 2015. - №8. - P.2515-2532.
5. Kelm, J.M. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types / J.M. Kelm [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* - 2003. - №83. - P. 173–180.