

DOI: 10.26693/jmbs04.04.230

УДК 546/662-022.513.2:57.085.23:577.336:577.112.824

Богуславський К. І., Алабедацька Н. М.

МІЧЕННЯ КЛІТИН ЛІНІЇ РК-15 НАНОЧАСТИНКАМИ НА ОСНОВІ ОРТОВАНАДАТУ ГАДОЛІНІЮ: ВПЛИВ ЧАСУ ТА УМОВ ІНКУБАЦІЇ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

konstantin.bwb@gmail.com

На теперішній час наночастинки широко використовуються у медицині та біології. Зокрема, показано, що накопичення наночастинок у клітинах залежить від багатьох факторів: хімічного складу, форми, розміру, а також від складу розчину інкубації та типу клітин, що взаємодіють з наночастинами. З огляду на це було досліджено лінію клітин РК-15, оскільки вона конститутивно експресує ксеноантиген Gal- α -1,3-Gal (α -Gal-епітоп) на клітинній мембрані. Цей епітоп активує реакцію гіпергострого відторгнення за умов трансплантації. У зв'язку з цим питання щодо його елімінації є принципово важливим при використанні біоімплантатів, клапанних протезів, біоскафолдів, отриманих з тканин тварин.

Мета дослідження – встановлення основних параметрів мічення наночастинами на основі ортованадату гадолінію європію $GdYVO_4:Eu^{3+}$ та $GdVO_4:Eu^{3+}$ (часу інкубації, температури та складу розчину, необхідності струшування) клітин лінії РК-15.

За допомогою методів клітинного культивування та флуоресцентної мікроскопії в роботі було досліджено мічення клітин лінії РК-15 наночастинами за умов варіації наступних параметрів: концентрації наночастинок, часу інкубації, температури інкубації, введення до складу розчину 10% фетальної телячої сироватки, струшування. В експерименті були використані наночастинки на основі ортованадату гадолінію європію різні за розміром та формою: сферичні $GdYVO_4:Eu^{3+}$ (1-2 нм) та веретеноподібні $GdVO_4:Eu^{3+}$ (25x8 нм).

Встановлено, що інкубація клітин з наночастинами протягом 60 хвилин при 22°C є достатньою для зв'язування наночастинок різної форми та роз-

міру з клітинами РК-15. За умов інкубації при 0°C струшування було необхідно для полегшення контакту клітин з наночастинами. Використання інкубаційних розчинів, які містять фетальну телячу сироватку, виявилось недоцільним, оскільки в цих умовах не спостерігається флуоресценції наночастинок. Це можливо є наслідком того, що фетальна теляча сироватка перешкоджає взаємодії наночастинок з мембранами клітин.

Ключові слова: наночастинки, ортованадат гадолінію, клітини лінії РК-15, культивування, флуоресценція.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконано в рамках науково-дослідної теми «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації», № державної реєстрації 0116U003494.

Вступ. Інтенсивний розвиток нанотехнологій останніми роками сприяв розширенню галузей застосування наночастинок (НЧ) в біології та медицині [4, 9, 11, 14, 24]. Було встановлено, що біосумісність НЧ багато в чому залежить від умов захоплення НЧ клітинами [27]. Також показано, що акумуляція НЧ клітинами залежить від хімічного складу НЧ і середовища інкубації [15], форми та розміру НЧ [16], часу їх накопичення та концентрації [21], а також типу клітин, які взаємодіють з НЧ [2, 20].

Лінія клітин нирки свині РК-15 широко використовується в медико-біологічних дослідженнях, але й досі є мало вивченим в цьому аспекті об'єктом. Щодо взаємодії клітин цієї лінії з НЧ різної хімічної

природи встановлено можливість використання НЧ в якості носіїв генів для трансфекції клітин РК-15. Крім того, клітини цієї лінії було використано як модельну систему для дослідження вільно-радикальних процесів, індукованих НЧ в мітохондріях [12, 28].

Тим часом, лінія клітин нирки свині РК-15 володіє дуже важливою характеристикою, а саме конститутивною експресією ксеноантигена Gal- α -1,3-Gal на клітинній мембрані [19]. Високий природний титр антитіл до цього антигену у людини є причиною розвитку гіпергострого і гострого відторгнення трансплантату, отриманого від донора, що експресує α -Gal епітоп [6]. Було показано, що α -Gal епітоп, навіть екстрагований і кон'югований з органічними наночастинками, при взаємодії з природними антитілами до цього ксеноантигену викликає *in vivo* швидку мобілізацію макрофагів і стимулює секрецію ними широкого спектру цитокінів [6, 29]. Тому, елімінація епітопу або зниження його експресії на поверхні клітин може продовжити «життя» трансплантату. Це особливо актуально для використання біоімплантатів, отриманих з тканин свиней клапанних протезів, біоскаффолдів тощо. Відомо, що наночастинки можуть бути використані для модифікації антигенів на поверхні клітин [23].

Метою даного дослідження було встановлення основних параметрів мічення наночастинками на основі ортованадату гадолінію європію $GdVO_4:Eu^{3+}$ та $GdVO_4:Eu^{3+}$ (часу інкубації, температури та складу розчину, необхідності струшування) клітин лінії РК-15.

Матеріал та методи дослідження. В експерименті використана перещеплювана лінія клітин нирки свині РК-15. Лінію клітин РК-15 підтримували в стандартних умовах з використанням живильного середовища DMEM/F12 («РАА», Австрія), що містить 100 Од/мл пеніциліну («Arterium», Україна), 100 мг/мл стрептоміцину («Arterium») і 10% фетальної телячої сироватки (ФТС; «Biowest», Франція). Для експерименту клітинний моношар відкріпляли за допомогою суміші 0,5% трипсину («Sigma», США) і розчину Версену (1: 1). Після ретельного відмивання від ферменту шляхом центрифугування у живильному середовищі клітини інкубували з наночастинками без сироватки або з ФТС.

В експерименті були використані НЧ на основі ортованадату гадолінію європію різні за розміром та формою: сферичні $GdYVO_4: Eu^{3+}$ (1-2нм) – НЧ1 та веретеноподібні $GdVO_4: Eu^{3+}$ (25 × 8нм) – НЧ2.

Інкубацію проводили в поліпропіленових пробірках SPL (life sciences) в об'ємі 1 мл в кінцевій концентрації клітин $1 \cdot 10^5$ кл/мл та інкубували з наночастинками в концентраціях в діапазоні від 25 до 100 мкг/мл протягом 60-180 хв за температури 0 і

22 °С. Температурний режим 0 та 22 °С підтримували з використанням водяної бані (для 0 °С – з льодом). Струшування здійснювали на струшувачі UOSLab SH 5 (Україна) зі швидкістю 60 об/хв. В якості розчину для інкубації використовували розчин DMEM (РАА, Австрія), що в деяких експериментах містив 10% фетальної телячої сироватки (ФТС).

Спостереження ізольованих клітин проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа Olympus X171 (Японія) на збільшенні $\times 1000$. Зв'язування НЧ з клітинами РК-15 визначали за наявністю ділянок з характерною червоно-помаранчевою люмінесценцією на поверхні клітин, що обумовлена переносом енергії від групи VO_4^{3-} на Eu^{3+} при збудженні ультрафіолетом [17, 25]. Для обробки зображень використовували програму AxioVision Rel4.7 (США).

Результати дослідження. В сучасній науковій літературі існує розбіжність щодо вибору розчину для інкубації з НЧ. Стандартна методика акумуляції НЧ на основі ортованадату гадолінію, яка була розроблена для ізольованих гепатоцитів щура, передбачала інкубацію клітин в середовищі з 10% ФТС [26]. Автори стверджували, що наявність в середовищі інкубації сироваткових протеїнів стабілізує НЧ та перешкоджає їхній агрегації, яка розвивається в сольових розчинах [15]. Однак згідно з протоколом [11], клітини РК-15 інкубували з НЧ в розчині без сироватки. Більш того, в роботі [30] показано, що введення в розчин інкубації холестерину, який у певній кількості присутній у сироватці, знижує ефективність накопичення НЧ гепатоцитами щурів. Крім того, в роботі [10] показано, що введення 10% ФТС в розчин інкубації може пригнічувати захоплення НЧ клітинами одного фенотипу, і не впливати на інші. Враховуюче вищесказане, необхідно було вивчити взаємодію клітин лінії РК-15 з НЧ в розчинах обох типів, тобто тих, що містять та не містять ФТС.

Досить суперечливі дані існують також щодо токсичності НЧ на основі ортованадату гадолінію. Відсутність вираженого цитотоксичного ефекту комплексу $GdVO_4:Eu^{3+}$ було показано для клітинних ліній SKOV3 та A549 [13]. У роботі Гольцева А.М. з співавт. [7] було показано, що НЧ здатні до виборчого зв'язування з пухлинними клітинами певного фенотипу і пригнічення росту пухлини. Також було показано [1], що сферичні НЧ мали виражений прооксидантний ефект.

Нами було досліджено чотири різних концентрації НЧ1 в діапазоні від 25 до 100 мкг/мл. Інкубацію проводили в розчинах, що не містили ФТС. Встановлено, що НЧ1 в концентрації 25 та 50 мкг/мл не мають вираженої токсичної дії на клітини лінії РК-15. Однак, в цих випадках практично не спостерігається

зв'язування НЧ1 (рис. 1, а, б). Чітка флуоресценція НЧ1 на поверхні клітин спостерігається за концентрацій 75 та 100 мкг/мл (рис. 1, в, г). Однак, при цьому виявляються пошкоджені клітини та фрагменти зруйнованих клітин.

У наступному експерименті інкубацію НЧ1 проводили в розчинах, які містили 10% ФТС. Було встановлено, що ФТС в концентрації 10% запобігала токсичній дії підвищених концентрацій НЧ1. Однак після інкубації клітин РК-15 з НЧ1 в присутності ФТС в жодному з досліджених зразків не було виявлено специфічної флуоресценції зв'язаних НЧ1. Це свідчило про те, що додавання ФТС до інкубаційного середовища перешкоджає взаємодії клітин лінії РК-15 з НЧ1.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу температури інкубації клітин РК-15 на накопичення НЧ1 в розчинах без сироватки. На рис.2 представлені флуоресцентні фотографії клітин після інкубації з НЧ1 при температурах 22 та 0° С без струшування та при постійному струшуванні. Встановлено, що після 60 хв інкубації з НЧ1 в концентрації 100 мкг/мл при 22°С НЧ1 зв'язуються з клітинами незалежно від струшування (рис. 2 а, б), а при 0°С – тільки при постійному струшуванні (рис. 2, в, г).

При використанні НЧ різного розміру фактор перемішування інкубаційного середовища теж відіграє значну роль. Нами було в порівняльному

аспекті використані НЧ1 та НЧ2 при постійному струшуванні та без нього. Встановлено, що струшування в процесі інкубації сприяло збільшенню кількості зв'язаних НЧ1, що виявлялося більш яскравою флуоресценцією об'єктів (рис. 3, а, в). При інкубації з більш крупними веретеноподібними НЧ2 без струшування мічення клітин не спостерігалось (рис. 1, б), тоді як струшування сприяло цьому процесу (рис. 1, г).

Обговорення результатів дослідження. При використанні наночастинок у сучасних біологічних дослідженнях завжди постає питання про їхню токсичність для живих клітин. Шкідлива дія наночастинок, як і накопичування їх у клітинах, залежить від хімічного складу, форми, розміру та типу клітин, що взаємодіють з наночастинами. У проведених нами експериментах виявилось, що сферичні наночастинки GdYVO₄: Eu³⁺ розміром 1-2 нм мають токсичну дію на клітини лінії РК-15 в концентраціях 75 та 100 мкг/мл. При цьому додавання ФТС в концентрації 10% запобігає токсичній дії підвищених концентрацій наночастинок, однак одночасно в цих умовах зникає флуоресценція наночастинок, які взаємодіють з клітинами. Це можливо є наслідком того, що ФТС перешкоджає взаємодії наночастинок з мембранами клітин.

Отримані дані узгоджується з даними інших авторів про те, що при додаванні НЧ в розчині з ФТС, вони утворюють комплекси з білками сироватки,

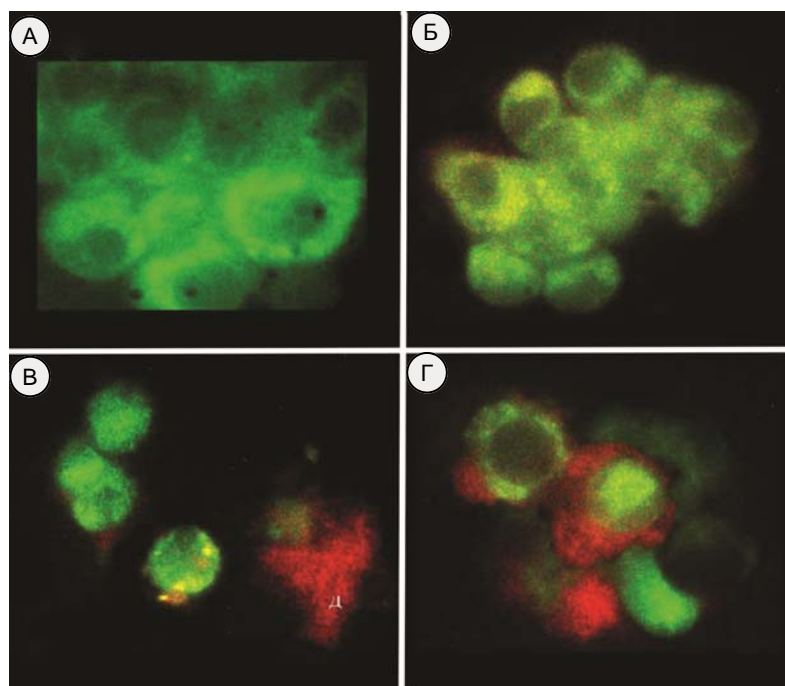


Рис. 1. Флуоресцентні зображення клітин РК-15 після 60 хв інкубації з НЧ1 у концентраціях 25 (а), 50 (б), 75 (в) і 100 (г) мкг/мл при 22°С при постійному струшуванні. Інкубація в розчині без ФТС. Червоно-помаранчева флуоресценція – НЧ на поверхні клітин, зелена флуоресценція - аутологічна флуоресценція клітин. Зб. х 1000

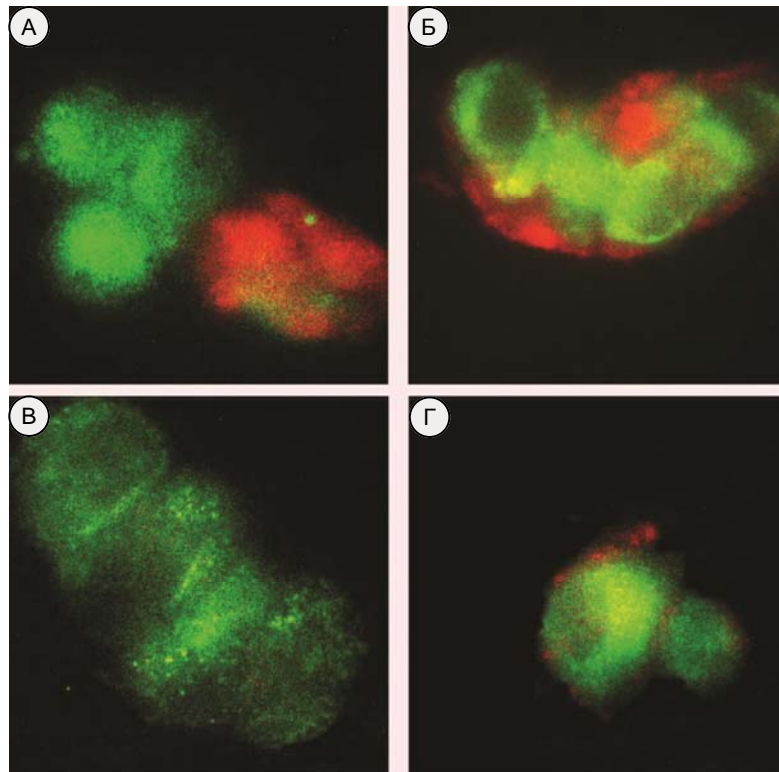


Рис. 2. Флуоресцентні зображення клітин РК-15 після 60 хв інкубації з НЧ1 в концентрації 100 мкг/мл при 22°C (а, б) і 0°C (в, г) без струшування (а, в) або при постійному струшуванні (б, г). Червоно-помаранчева флуоресценція – НЧ на поверхні клітин, зелена флуоресценція - аутологічна флуоресценція клітин. 36. x 1000

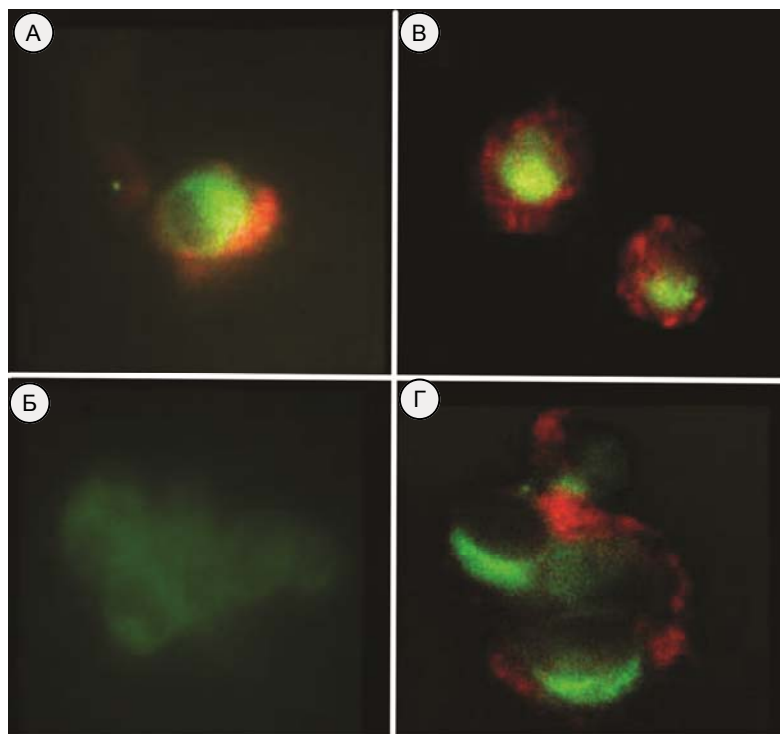


Рис. 3. Флуоресцентні зображення клітин РК-15 після 60 хв інкубації з НЧ 1 (а, б) і НЧ 2 (в, г) в концентрації (100 мкг/мл) при 22°C без (а, в) та при постійному струшуванні (б, г). Червоно-помаранчева флуоресценція – НЧ на поверхні клітин, зелена флуоресценція - аутологічна флуоресценція клітин. 36. x 1000

формує «корону» – динамічне утворення, розмір якого залежить від часу інкубації і складу розчину [3, 15, 18]. При цьому подальша здатність до інтерналізації комплексів білок-НЧ в клітини також різна для різних середовищ культивування і типів клітин. Так, для клітин лінії Hela було показано, що комплекси білок-НЧ, утворені в живильному середовищі RPMI, більш активно інтерналізуються в клітини, в порівнянні з середовищем DMEM [18]. Макрофаги лінії RAW 264.7 повністю втрачали здатність до фагоцитозу НЧ в комплексі з «короною» протеїнів, збагаченої імуноглобулінами, факторами комплекменту і коагуляційними білками [3].

Як було з'ясовано раніше, проникнення НЧ в клітини може здійснюватися різними шляхами: за допомогою ендоцитозу, пасивної дифузії, по мембрано-транспортним каналам, крізь самоорганізовані нанорозмірні пори в мембрані [5, 8, 22]. Очевидно, що в наших експериментальних умовах при температурі інкубації 0°C взаємодія НЧ з клітинами може йти тільки енергонезалежними шляхами, на-

приклад, пасивною дифузією, швидкість якої залежить від температури. Тому за умов інкубації за зниженої температури постійне перемішування клітин збільшує вірогідність їхньої взаємодії з НЧ та сприяє міченню клітин.

Висновки. За температури 22°C для взаємодії клітин лінії PK-15 з НЧ 60 хв є достатнім часом інкубації, при цьому постійне струшування не має значення. При використанні часу інкубації 60 хв при температурі 0°C струшування є необхідним для полегшення контакту клітин з НЧ. Використання інкубаційних розчинів, що містять 10% ФТС, є недоцільним, оскільки в даних умовах не спостерігається флуоресценції НЧ, що зв'язалися з клітинами.

Перспективи подальших досліджень. Перспектива проведених досліджень полягає у більш детальному вивченні взаємодії НЧ з мембраною клітин, збагачених епітопом Gal- α -1,3-Gal. Особливо актуальним є вивчення можливості його деактивації або маскування за допомогою зв'язування з наночастинками.

Подяка

Щиро дякуємо члену-кореспонденту НАН України, доктору фіз.-мат. наук, професору Малюкіну Ю. В., доктору фіз.-мат. наук Єфімовій С. Л. та співробітникам відділу нанокристалічних матеріалів Інституту сцинтиляційних матеріалів України за надані наночастинки.

References

1. Averchenko KA, Kavok NS, Klochkov VK, Sedyh OO, Yefimova SL, Malyukin YV. Effect of inorganic nanoparticles and organic complexes on their basis on free-radical processes in some model systems. *Biopolymers and cell*. 2015; 31(2): 138-45. doi: 10.7124/bc.0008D9
2. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev*. 2012; 41(7): 2718-39. PMID: 22389111. doi: 10.1039/c2cs15309b
3. Caracciolo G. Liposome-protein corona in a physiological environment: challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. *Nanomedicine*. 2015; 11(3): 543-57. PMID: 25555353. doi: 10.1016/j.nano.2014.11.003
4. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(5): 1310-6. PMID: 18316549. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441
5. Ding HM, Ma YQ. Theoretical and computational investigations of nanoparticle-biomembrane interactions in cellular delivery. *Small*. 2015; 11(9-10): 1055-71. PMID: 25387905. doi: 10.1002/smll.201401943
6. Galili U. Acceleration of wound healing by α -gal nanoparticles interacting with the natural anti-Gal antibody. *J Immunol Res*. 2015; 2015: 589-648. PMID: 25922849. PMID: PMC4397477. doi: 10.1155/2015/589648
7. Goltsev AN, Babenko NN, Gayevskaya YA, Bondarovich NA, Ostankov MV, Chelombitko OV, et al. The ability of nanoparticles based on orthovanadates to identify in vitro and inactivate in vivo stem cancer cells. *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies*. 2013; 11(4): 729-39. [Russian] PACS: 87.15.-v, 87.19.xj, 87.64.-t, 87.80.-y, 87.85.Rs
8. Gurtovenko AA, Anwar J, Vattulainen I. Defect-mediated trafficking across cell membranes: insights from in silico modeling. *Chem Rev*. 2010; 110(10): 6077-103. PMID: 20690701. doi: 10.1021/cr1000783
9. Hahn MA, Singh AK, Sharma P, Brown SC, Moudgil BM. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives. *Anal Bioanal Chem*. 2011; 399(1): 3-27. PMID: 20924568. doi: 10.1007/s00216-010-4207-5
10. Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Usui Y, Maruyama K, et al. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicology in vitro*. 2013; 27(6): 1679-85. PMID: 23648666. doi: 10.1016/j.tiv.2013.04.012
11. Hilger I. In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 2013; 29(8): 828-34. PMID: 24219800. doi: 10.3109/02656736.2013.832815
12. Hu X, Han H, Hua L, Sheng Z. Electrogenetically induced chemiluminescence of blue emitting ZnSe quantum dots and its biosensing for hydrogen peroxide. *Biosens Bioelectron*. 2010; 25(7):1843-6. PMID: 20060705. doi: 10.1016/j.bios.2009.12.021
13. Huang S, Cheng Z, Ma P, Kang X, Dai Y, Lin J. Luminescent GdVO₄:Eu³⁺ functionalized mesoporous silica nanoparticles for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Dalton Trans*. 2013; 42(18): 6523-30. doi: 10.1039/c3dt33114h

14. Jiang S, Gnanasammandhan MK, Zhang Y. Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles. *J R Soc Interface*. 2010; 7(42): 3-18. PMID: 19759055. PMCID: PMC2839386. doi: 10.1098/rsif.2009.0243
15. Kavok N, Grygorova G, Klochkov V, Yefimova S. The role of serum proteins in the stabilization of colloidal $\text{LnVO}_4\cdot\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{La}, \text{Gd}, \text{Y}$) and CeO_2 nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2017; 529: 594-9. doi: doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.052
16. Klochkov V, Kavok N, Grygorova G, Sedyh O, Malyukin Y. Size and shape influence of luminescent orthovanadate nanoparticles on their accumulation in nuclear compartments of rat hepatocytes. *Mater Sci Eng C Mater Biol*. 2013; 33 (5): 2708-12. doi: 10.1016/j.msec.2013.02.046
17. Liang Y, Noh HM, Park SH, Choi BC, Jeong JH. Colloidal $\text{GdVO}_4\cdot\text{Eu}^{3+}$ SiO_2 nanocrystals for highly selective and sensitive detection of Cu^{2+} ions. *Applied Surface Science*. 2018; 433: 381-7. doi: 10.1016/j.apsusc.2017.10.058
18. Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R, Pompa PP. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*. 2010; 4 (12): 7481-91. doi: 10.1021/nn101557e
19. Neethling FA, Koren E, YeY, Richards SV, Kujundzic M, Oriol R, Cooper DK. Protection of pig kidney (PK15) cells from the cytotoxic effect of anti-pig antibodies by alpha-galactosyl oligosaccharides. *Transplantation*. 1994; 57 (6): 959-63. PMID: 8154046. doi: 10.1097/00007890-199403270-00032
20. Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9(1): 51-63. PMID: 24872703. PMCID: PMC4024976. doi: 10.2147/IJN.S26592
21. Panyam J, Labhasetwar V. Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res*. 2003; 20(2): 212-20. PMID: 12636159. doi: 10.1023/A:1022219003551
22. Pogodin SS, Werner M, Sommer JU, Baulin VA. Nanoparticle-induced permeability of lipid membranes. *ACS Nano*. 2012; 6(12): 10555-61. doi: 10.1021/nn3028858
23. Stephan MT, Moon JJ, Um SH, Bershteyn A, Irvine DJ. Therapeutic cell engineering with surface-conjugated synthetic nanoparticles. *Nat Med*. 2010; 16(9): 1035-41. PMID: 20711198. PMCID: PMC2935928. doi: 10.1038/nm.2198
24. Strobel C, Förster M, Hilger I. Biocompatibility of cerium dioxide and silicon dioxide nanoparticles with endothelial cells *Beilstein J Nanotechnol*. 2014; 5: 1795-807. PMID: 25383291. PMCID: PMC4222402. doi: 10.3762/bjnano.5.190
25. Szczeszak A, Grzyb T, Sniadecki Z, Andrzejewska N, Lis S, Matczak M, et al. Structural, spectroscopic, and magnetic properties of Eu^{3+} -doped GdVO_4 nanocrystals synthesized by a hydrothermal method. *Inorg Chem*. 2014; 53(23): 12243-52. doi: 10.1021/ic500354t
26. Tkacheva TN, Yefimova SL, Klochkov VK, Sorokin AV, Malyukin Yu. V Dynamics of dye release from nanocarriers of different types in model cell membranes and living cells. *Biopolym Cell*. 2014; 30(4): 314-320. doi: http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008A7
27. Treuel L, Jiang XE, Nienhaus GU. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J R Soc Interface*. 2013 Feb; 10 (82): 20120939. PMID: 23427093. PMCID: PMC3627074. doi: 10.1098/rsif.2012.0939
28. Wang Y, Cui H, Li K, Sun C, Du W, Cui J, et al. A magnetic nanoparticle-based multiple-gene delivery system for transfection of porcine kidney cells. *PLoS One*. 2014; 9(7): e102886. PMID: 25048709. PMCID: PMC4105564. DOI: 10.1371/journal.pone.0102886
29. Wigglesworth KM, Racki WJ, Mishra R, Szomolanyi-Tsuda E, Greiner DL, Galili U. Rapid Recruitment and Activation of Macrophages by Anti-Gal/α-Gal Liposome Interaction Accelerates Wound Healing. *J Immunol*. 2011; 186(7): 4422-32. PMID: 21357545. PMCID: PMC4091898. doi: 10.4049/jimmunol.1002324
30. Yefimova SL, Tkacheva TN, Kavok NS, Klochkov VK, Sorokin AV. In vitro study of NCs/dyes complexes accumulation and dyes release kinetics in rat hepatocytes. *Functional Materials*. 2015; 22(2): 199-206. doi: http://dx.doi.org/10.15407/fm22.02.199

УДК 546/662-022.513.2:57.085.23:577.336:577.112.824

**МЕЧЕНИЕ КЛЕТОК ЛИНИИ РК-15 НАНОЧАСТИЦАМИ НА ОСНОВЕ
ОРТОВАНАДАТА ГАДОЛИНИЯ: ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ И УСЛОВИЙ ИНКУБАЦИИ
Богуславский К. И., Алабедаькарим Н. М.**

Резюме. В настоящее время наночастицы широко используются в медицине и биологии. В частности, показано, что накопление наночастиц в клетках зависит от многих факторов: химического состава, формы, размера, а также от состава раствора инкубации и типа клеток, взаимодействующих с наночастицами. В связи с этим была изучена линия клеток РК-15, поскольку она конститутивно экспрессирует ксеноантиген Gal-α-1,3-Gal (α-Gal-эпитоп) на клеточной мембране. Этот эпитоп активирует реакцию гиперострого отторжения в условиях трансплантации, поэтому вопрос о его элиминации является принципиально важным при использовании биоимплантантов, клапанных протезов, биоскаффолдов из тканей животных.

Цель исследования – выяснение основных параметров мечения наночастицами на основе ортованадата гадолия европия $\text{GdYVO}_4\cdot\text{Eu}^{3+}$ и $\text{GdVO}_4\cdot\text{Eu}^{3+}$ (времени инкубации, температуры и состава раствора, необходимости встряхивания) клеток линии РК-15.

С помощью методов клеточного культивирования и флуоресцентной микроскопии в работе было исследовано мечение клеток линии РК-15 наночастицами в условиях вариации следующих параметров: концентрации наночастиц, времени инкубации, температуры инкубации, введения в состав раствора 10% фетальной телячьей сыворотки, встряхивания. В эксперименте были использованы наночастицы на основе ортованадата гадолиния европия разные по размеру и форме: сферические $GdYVO_4: Eu^{3+}$ (1-2 нм) и веретенообразные $GdVO_4: Eu^{3+}$ (25×8 нм). Установлено, что инкубация клеток с наночастицами в течение 60 минут при 22°C является достаточной для связывания наночастиц различной формы и размера с клетками РК-15. В условиях инкубации при 0°C встряхивание было необходимо для облегчения контакта клеток с наночастицами. Использование инкубационных растворов, содержащих фетальную телячью сыворотку, оказалось нецелесообразным, поскольку в этих условиях не наблюдается флуоресценции наночастиц. Это возможно является следствием того, что фетальная телячья сыворотка препятствует взаимодействию наночастиц с мембранами клеток.

Ключевые слова: наночастицы, ортованадат гадолиния, клетки линии РК-15, культивирование, флуоресценция.

UDC 546/662-022.513.2:57.085.23:577.336:577.112.824

Labeling Of Pk-15 Cell Line with Nanoparticles of Gadolinium Orthovanadate: Influence of time and Incubation Conditions

Bohuslavskiy K., Alabedalkarim N.

Abstract. Currently, nanoparticles are widely used in medicine and biology. In particular, it was shown that the accumulation of nanoparticles in cells depended on many factors: chemical composition, shape, size as well as composition of the incubation solution and the type of cells interacting with nanoparticles. Based on this, the PK-15 cell line was studied due to constitutively expressing Gal- α -1,3-Gal xenoantigen (α -Gal-epitope) on the cell membrane. This epitope activates the reaction of hyperacute rejection at transplantation; therefore the question of its elimination is crucial when using bioimplants, valve prostheses, bioscaffolds, which originate from animal tissues. Elimination of this epitope or reduction of its expression on the cell surface may prolong graft survival. Thus, the study of the possibility of using nanoparticles to modify the surface of Gal- α -1,3-Gal-bearing cells is relevant.

The purpose of the study was to determine the main parameters of PK-15 cell labeling with nanoparticles based on gadolinium europium orthovanadate $GdYVO_4:Eu^{3+}$ and $GdVO_4:Eu^{3+}$ (incubation time, temperature and composition of the solution, need for shaking).

Material and methods. Using cell culture techniques and fluorescence microscopy, the labeling of the PK-15 cell line with nanoparticles was studied under various conditions: nanoparticle concentration, incubation time, incubation temperature, introduction of 10% fetal calf serum to the incubation solution, shaking. Different in size and shape nanoparticles based on orthovanadate gadolinium europium were used in the experiment: spherical $GdYVO_4: Eu^{3+}$ (1-2 nm) and spindle-shaped $GdVO_4: Eu^{3+}$ (25×8 nm).

Results and discussion. The study results showed that incubation of cells with nanoparticles for 60 minutes at 22°C was sufficient for binding nanoparticles of various shapes and sizes with PK-15 cells. At 0°C incubation conditions, shaking was necessary to facilitate the contact of cells with nanoparticles. The use of incubation solutions containing fetal calf serum turned out to be inexpedient, since under these conditions no nanoparticle fluorescence was observed. This may be due to the fact that fetal calf serum prevents the interaction of nanoparticles with cell membranes. The prospect of the research is a more detailed study of the interaction of nanoparticles with the membrane of cells enriched with the Gal- α -1,3-Gal epitope. Particularly relevant is the study of the possibility of its deactivation or masking by binding to nanoparticles.

Conclusions. At a temperature of 22 ° C for interaction of cells of the line PK-15 from the LF 60 minutes is sufficient time for incubation, while constant shaking is irrelevant. When using the incubation time of 60 minutes at 0 ° C, shaking is necessary to facilitate the contact of cells from the LF. The use of incubation solutions containing 10% fetal calf serum is not feasible, since under these conditions there is no fluorescence of the LF that binds to the cells.

Keywords: nanoparticles, gadolinium orthovanadate, PK-15 cell line, cultivation, fluorescence.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 06.03.2019 р.
Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування