

PACS numbers: 78.20.Ci, 87.16.-b, 87.17.-d, 87.19.xn, 87.55.dk, 87.85.Lf, 87.85.Rs

Вплив наночастинок золота на кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини

Н. О. Волкова, М. С. Юхта, А. М. Гольцев

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська 23,
61016 Харків, Україна*

Сумісне застосування наночастинок і стовбурових клітин може значно поліпшити результати терапії, і хоча потенціал цього є значним, все ще є багато проблем, які необхідно вирішити, перш ніж прийняти їх до клінічного застосування. В дослідженні проведено порівняльну оцінку морфофункціональних характеристик кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин (КрМСК) з жирової та хрящової тканин за умов взаємодії їх із наночастинками золота (AuNPs). КрМСК з досліджених джерел інкубували з AuNPs у скінченних концентраціях 4, 6, 10, 20 мкг/мл протягом 1 години, після чого оцінювали цілісність мембрани, стан процесів апоптозу/некрозу, морфологічні характеристики та проліферативну активність. Контролем були КрМСК без впливу AuNPs (0 мкг/мл). Встановлено, що AuNPs у концентраціях 4 та 6 мкг/мл не впливали на цілісність мембрани, проліферативну активність і процеси апоптозу/некрозу в КрМСК із жирової та хрящової тканин. AuNPs у концентрації 10 мкг/мл призводили до пониження показника цілісності мембрани, проліферативної активності, а також збільшення відсотка клітин у стані апоптозу в КрМСК з жирової тканини. При застосуванні AuNPs у концентрації 20 мкг/мл визначали пониження кількості клітин з цілісною мембраною, проліферативної активності їх та збільшення відсотка клітин у стані апоптозу/некрозу в КрМСК з жирової та хрящової тканин. Одержані результати можуть бути використані для обґрунтування та розробки методик застосування КрМСК у поєднанні з AuNPs у клінічній практиці для лікування уражень тканин опорно-рухового апарату.

A combined use of nanoparticles and stem cells can significantly improve the results of therapy, and although their potential is significant, there are still many problems, which are need to be solved before they can be accepted for clinical use. The study carried out a comparative assessment of the morphological and functional characteristics of cryopreserved mesenchymal stem cells (CrMSCs) from adipose and cartilaginous tissues in

the conditions of their interaction with gold nanoparticles (AuNPs). CrMSCs cells from the studied sources were incubated with AuNPs at final concentrations of 4, 6, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ for 1 hour, after that the integrity of the membrane, the state of apoptosis/necrosis processes, morphological characteristics, and proliferative activity are assessed. The control is CrMSCs without the influence of AuNPs (0 $\mu\text{g/ml}$). As found, 4 and 6 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs in CrMSCs of the adipose and cartilage tissues did not affect studied parameters. The cell viability is decreased in adipose-derived CrMSCs incubated with 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs and in cartilage-derived CrMSCs incubated with 20 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs. Using of 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs also results in an increase in the amount of Annexin $V^+/7AAD^-$ adipose-derived CrMSCs by 1.6 and 2.4 times, respectively, relative to a control. The percentage of Annexin $V^+/7AAD^+$ + Annexin $V^-/7AAD^+$ adipose-derived CrMSCs exceeds the corresponding control value by 1.3 times when incubated with 20 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs. An increase in the number of cartilage-derived CrMSCs in the state of early apoptosis and late apoptosis/necrosis is observed by 1.3 and 2 times, respectively, after incubation with 20 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs. The results of light microscopy show that 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs lead to a decrease in proliferative activity and changes in the morphological characteristics (cytoskeletal dystrophy, cytoplasmic granulation, and nuclei vacuolization) of adipose-derived CrMSCs relative to a control. In cultures of cartilage-derived CrMSCs, a decrease in proliferative activity and morphological changes (cytoskeleton degenerative changes, detachment of cells) are observed only after incubation with 20 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs. The obtained results can be used to substantiate and develop methods of combined use of CrMSCs and AuNPs in clinical practice for the treatment of tissue damages of the musculoskeletal system.

Ключові слова: наночастинки золота, кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини, жирова тканина, хрящова тканина, проліферація, апоптоз, некроз.

Key words: gold nanoparticles, cryopreserved mesenchymal stem cells, adipose tissue, cartilage tissue, proliferation, apoptosis, necrosis.

(Отримано 4 березня 2021 р.)

1. ВСТУП

В галузі медицини золото використовується протягом тривалого часу. Завдяки унікальним фізичним і хемічним властивостям і загальноприйнятій методи синтези наночастинки золота (AuNPs) є дуже привабливими для використання в біомедичній продукції. Багато підходів у розвитку технологій наномедичного сектору зроблено на базі AuNPs. У ряді робіт показано, що наночастинки (НЧ) металів (золота, срібла, платини) можуть бути застосовані у якості редуцентів оксидативного стресу в тканинах [1, 2]. Тому застосування НЧ металів у якості компонентів клітинної терапії

є перспективним напрямом створення новітніх наномедичних технологій.

Фізичні та хемічні властивості нанорозмірних матеріалів можуть змінюватися залежно від їхньої концентрації. Тим не менш, як і раніше, є серйозна нестача інформації про біологічну активність нанорозмірного золота в тканинах ссавців. Останні складаються з великої кількості спеціалізованих типів клітин, наприклад, епідермальні клітини шкіри, мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) кісткового мозку, нейрональні клітини чи то клітини імунної системи тощо. Процес, який веде до появи різних типів клітин, — диференціація. Під час цього процесу відбувається активізація одних генів і деактивація інших, що приводить до появи спеціалізованих структур і виробництва білків, специфічних для даного типу клітин. Проте, в організмі не всі клітини здатні до проліферації та диференціації. Взагалі, тільки стовбурові клітини та клітини-попередники мають властивість до диференціації в спеціалізовані типи клітин. Стовбурові клітини, одержані з тканин ембріонів або дорослих організмів, здатні відтворювати себе протягом обмеженого періоду часу. Таким чином, якщо вплив НЧ на стовбурові клітини призведе до непередбачених наслідків, то останні будуть зберігатися до тих пір, поки всі клітини, що виникли в процесі поділу первинних стовбурових клітин не припинять свого існування. Тому в даному дослідженні МСК жирової та хрящової тканин щурів були обрані в якості модельного об'єкта для вивчення впливу AuNPs на стовбурові клітини — потенційне джерело клітинної терапії. Як повідомлялося [3], AuNPs мають розмірозалежну цитотоксичність і тільки НЧ, менші ніж 15 нм, вважаються токсичними. Проте з'ясування наявності/відсутності цитотоксичних ефектів AuNPs залишається перспективним напрямом нанобіотехнологічних досліджень.

Відомо, що НЧ металів, таких як золото та срібло, при взаємодії з клітинами здатні впливати на їхню ферментативну активність, проявляти антиоксидантні й антимікробні властивості [4, 5]. Тому застосування НЧ у якості складової комбінованої терапії може значно поліпшити результати лікування, і хоча потенціал цього є значним, все ще є багато проблем, які необхідно вирішити, перш ніж прийняти їх до клінічного застосування.

Мета роботи — дослідження впливу наночастинок золота на морфофункціональний стан кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітинах із жирової та хрящової тканин.

2. МАТЕРІЯЛИ ТА МЕТОДИ

В дослідженні використовували МСК із жирової та хрящової тканин нелінійних щурів ($n = 10$, маса — 150 ± 25 г). Усі маніпу-



Рис. 1. Схема експерименту. Примітка: AuNPs — наночастинки золота; МСК — мезенхімальні стовбурові клітини; КрМСК — кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини.¹

ляції з тваринами проводили згідно з міжнародними біоетичними нормами, законодавчими документами України, матеріалами IV Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [6], і протоколом комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (№2014-02). Схему експерименту наведено на рис. 1.

Первинну суспензію клітин одержували з жирової та хрящової тканин шляхом ферментативної дезагрегації. Для цього зразки тканин промивали розчином Хенкса (РАА, Австрія) з гентаміцином (150 мкг/мл) (Фармак, Україна) та інкубували у розчині колагенази II типу (1,5 мг/мл) (ПанЕко, Росія) за температури у 37°C протягом 18 год. Клітини виділяли з біоптатів шляхом ресуспендування з наступним центрифугуванням (1000g, 3 хв.). До осаду додавали середовище культивування та висівали на культуральний пластик. Густина посіву клітин становила $1 \cdot 10^4 / \text{см}^2$ культурального флакону.

Живильне середовище культивування в усіх випадках містило: середовище IMDM (РАА, Австрія), 10% ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби (HyClone, США), канаміцин (150 мкг/мл) (Фармак, Україна) та амфотерицин Б (5 мкг/мл) (РАА, Австрія). Середовище культивування змінювали кожні 3 доби. У роботі були використані стандартні умови культивування за 37°C в атмосфері 5% CO_2 з використанням інкубатора (Biosan, Литва). По досягненні моношару культури клітин пасивували (0,25% ро-

зчин трипсину та розчин версену у співвідношенні 1:1).

Кріоконсервування культур МСК здійснювали на 2-му пасажі під захистом 10% ДМСО (ПанЕко, Росія) з додаванням 20% ЕС. Розчин кріопротектора готували на живильному середовищі. Суспензію ($1 \cdot 10^6$ клітин/мл) у середовищі кріоконсервування вміщували по 1 мл у кріопробірки Nunc (США). Швидкість охолодження складала $1^\circ\text{C}/\text{хв.}$ до -70°C з подальшим зануренням у рідкий азот [7]. Відігрів здійснювали на водяній бані за температури у 40°C до появи рідкої фази. Видалення кріопротектора проводили шляхом додавання 1:9 розчину Хенкса з наступним центрифугуванням (1000g, 5 хв.). Одержані клітини використовували у подальших дослідках.

В роботі було використано колоїдний розчин AuNPs (Sigma-Aldrich, США). Середній розмір AuNPs становив 15 нм. AuNPs були введені в кріоконсервовані МСК (КрМСК) методом пасивної дифузії (інкубація за 37°C протягом 1 години). AuNPs додавали до $1 \cdot 10^6$ КрМСК у скінченних концентраціях 4, 6, 10, 20 мкг/мл. Контролем були КрМСК без впливу AuNPs (0 мкг/мл).

Після інкубації з AuNPs визначали життєздатність клітин за цілісністю їхньої мембрани експрес-тестом на виключення трипанового синього та стан процесів апоптозу/некрозу методом проточної цитофлюориметрії за допомогою барвників Annexin-V-FITC (Annexin V) (BD) та 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) (BD). Міряння проводили на проточному цитофлюориметрі FACS Calibur ('BD Biosciences'). Результати аналізували за допомогою програми Win MDI v.2.8.

Для визначення проліферативної активності КрМСК після інкубації з AuNPs у досліджених концентраціях клітини висівали в культуральні 12-лункові планшети (РАА, Австрія). Застосовували ті ж самі умови культивування, що і для первинних культур МСК. Для проведення МТТ-тесту [7] на термінах культивування у 1, 5, 7, 10 діб з кожної лунки планшета відбирали по 1 мл середовища та вносили по 0,5 мл розчину МТТ (Fluka, Німеччина) в концентрації у 5 мг/мл. Через 3 год. інкубації ($5\% \text{CO}_2$, 37°C) з кожної лунки повністю видаляли середовище та робили розчинення утвореного формагану за допомогою ДМСО (1 мл/лунку). Від осаду, що утворюється в результаті преципітації білків у ДМСО, звільнялися шляхом центрифугування протягом 10 хв. із 1000g. Міряння оптичної густини розчину формагану в супернатанті проводили на біохемічному аналізаторі СЕМ 7 («ЕРВА», Чеська Республіка) на довжині хвилі у 540 нм. В якості бланку використовували середовище без клітин.

Перевірка нормальності розподілу кількісних ознак проводилася з використанням спільного критерію перевірки на симетричність і нульовий коефіцієнт ексцесу. За нормального розподілу

змінних достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою Ст'юдентового t -критерію. Статистичні параметри, що наводяться далі у вигляді $M \pm m$, мають такі позначення: M — середнє, m — стандартна помилка середнього, n — обсяг аналізованої групи, p — рівень значущості (критичне значення рівня значущості бралось рівним 0,05). Аналізу даних проводили з використанням пакетів програм «Microsoft Excel» і «Statistica 8». Всі експерименти проводили в чотирьох паралелях та у триразовому повторі.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що за температури у 37°C AuNPs потрапляють у клітину пасивно разом з іншими речовинами шляхом ендоцитозу — процесу втягування ділянки плазматичної мембрани з наступним формуванням всередині клітини везикул з позаклітинним вмістом [8]. В наших попередніх дослідженнях було встановлено, що AuNPs за умов додавання до середовища культивування зосереджуються на мембранах МСК кісткового мозку та за високих концентрацій (від 9 мкг/мл) адсорбуються на мембрані ядра [9, 10]. Для одержання порівняльної картини дії НЧ на різні типи культивованих клітин досліджували зміни стану КрМСК з жирової та хрящової тканин у присутності AuNPs.

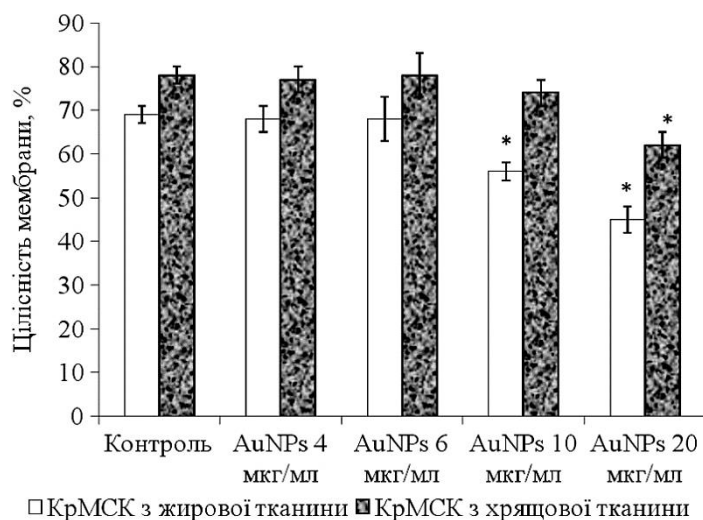


Рис. 2. Вплив AuNPs на цілісність мембрани КрМСК з жирової та хрящової тканин. Примітки: AuNPs — наночастинки золота; КрМСК — криоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини; * — відмінності достовірні у порівнянні з відповідним контролем, $p < 0,05$.²

Першим етапом роботи було проведення досліджень впливу AuNPs на цілісність мембрани КрМСК з жирової та хрящової тканин після 1 год. інкубації. Одержані результати представлено на рис. 2.

В контрольній групі КрМСК з жирової тканини $69,2 \pm 5,8\%$ клітин мали цілісну мембрану за тестом на виключення трипанового синього. Інкубація протягом 1 год. з AuNPs у концентраціях 4 та 6 мкг/мл не впливала на цілісність мембрани КрМСК жирової тканини. Застосування концентрацій НЧ 10 і 20 мкг/мл призводило до пониження показника життєздатності в 1,2 та 1,5 рази відповідно щодо контролю.

В контрольній групі КрМСК з хрящової тканини $78,2 \pm 5,8\%$ клітин мали цілісну мембрану. Використання AuNPs у концентраціях 4, 6 і 10 мкг/мл не приводило до достовірних змін у дослідженому показнику. Проте після інкубації з AuNPs у концентрації 20 мкг/мл кількість клітин з цілісною мембраною була пониженою в 1,3 рази щодо контрольних зразків.

Наші результати показали, що життєздатність клітин обернено пропорційна концентрації AuNPs. Ці результати узгоджуються з роботою [3], в якій показано пониження життєздатності клітин після впливу AuNPs розміром у 200 та 500 нм. Паралельно з цим не повідомлялося, що AuNPs змінюють клітинні функції після двох тижнів інкубації [11], в той час як життєздатність МСК знижується.

Однчасне фарбування Annexin V і 7AAD уможливило виявити як некротичні клітини, так і клітини, які вступили на шлях апоптозу. На ранній стадії апоптозу цілісність клітинної мембрани зберігається, проте відбувається перебудова її фосфоліпідних компонентів, і на поверхні клітини з'являється фосфатидилсерин. Annexin V — білок, який має високу спорідненість до фосфатидилсерину і зв'язується з клітинами, що експресують його тільки на зовнішній поверхні мембрани.

Для вирішення питання активізації процесів апоптозу/некрозу в КрМСК жирової та хрящової тканин як реакції на взаємодію з AuNPs вже в перші часи суспензію клітин інкубували з AuNPs протягом 1 години. Аналіза одержаних результатів показала, що застосування AuNPs у концентраціях 4 та 6 мкг/мл не приводило до активізації процесів апоптозу та некрозу в КрМСК жирової тканини (табл. 1). Використання AuNPs в концентраціях 10 і 20 мкг/мл приводило до збільшення кількості Annexin V⁺/7AAD⁻ клітин, тобто тих, що знаходяться на ранній стадії апоптозу, в 1,6 і 2,4 рази відповідно щодо контролю. Відсоток Annexin V⁺/7AAD⁺ + Annexin V⁻/7AAD⁺-клітин (пізні стадії апоптозу, некроз) за інкубації з AuNPs у концентрації 20 мкг/мл достовірно перевищував відповідний показник у контрольних зразках в 1,3

ТАБЛИЦЯ 1. Цитофлюориметрична аналіза КрМСК жирової тканини після інкубації з AuNPs протягом 1 години; фарбування Annexin V і 7AAD.³

Зразок/регіон	Annexin V ⁻ /7AAD ⁻	Annexin V ⁺ /7AAD ⁻	Annexin V ⁺ /7AAD ⁺ + Annexin V ⁻ /7AAD ⁺
Контроль	71,35 ± 2,71	5,29 ± 1,15	23,36 ± 1,22
AuNPs_4 мкг/мл	72,06 ± 2,81	5,01 ± 1,04	22,93 ± 1,41
AuNPs_6 мкг/мл	71,93 ± 1,93	5,33 ± 0,92	22,74 ± 1,54
AuNPs_10 мкг/мл	65,34 ± 6,73*	8,25 ± 1,21*	26,41 ± 1,35
AuNPs_20 мкг/мл	58,35 ± 6,73*	12,14 ± 1,05*	29,51 ± 1,27*

Примітки: * — вірогідність різниці у порівнянні з контролем, $p < 0,05$; AuNPs — наночастинки золота.

ТАБЛИЦЯ 2. Цитофлюориметрична аналіза КрМСК хрящової тканини після інкубації з AuNPs протягом 1 години; фарбування Annexin V і 7AAD.⁴

Зразок/регіон	Annexin V ⁻ /7AAD ⁻	Annexin V ⁺ /7AAD ⁻	Annexin V ⁺ /7AAD ⁺ + Annexin V ⁻ /7AAD ⁺
Контроль	73,88 ± 1,45	5,80 ± 0,65	20,32 ± 1,52
AuNPs_4 мкг/мл	73,48 ± 0,98	5,91 ± 0,71	20,61 ± 1,18
AuNPs_6 мкг/мл	72,62 ± 1,04	5,84 ± 0,75	21,54 ± 0,82
AuNPs_10 мкг/мл	70,05 ± 1,12	7,12 ± 0,65	22,83 ± 0,75
AuNPs_20 мкг/мл	62,03 ± 0,73*	10,84 ± 0,47*	27,13 ± 0,85*

Примітки: * — вірогідність різниці у порівнянні з контролем, $p < 0,05$; AuNPs — наночастинки золота.

рази.

Дослідження стану процесів апоптозу/некрозу в КрМСК хрящової тканини за взаємодії з AuNPs (табл. 2) показали, що активізація їх не відбувається за застосування концентрацій у 4, 6 і 10 мкг/мл. У зразках з додаванням AuNPs (20 мкг/мл) спостерігали збільшення кількості клітин у стані раннього апоптозу (Annexin V⁺/7AAD⁻) та пізнього апоптозу/некрозу (Annexin V⁺/7AAD⁺ + Annexin V⁻/7AAD⁺) у 1,3 та 2 рази відповідно щодо контролю.

Таким чином, дані стосовно розподілу клітин після фарбування 7AAD й Annexin V свідчать про відсутність розвитку процесів апоптозу/некрозу в КрМСК з обох досліджених джерел лише після інкубації з AuNPs у концентраціях 4 та 6 мкг/мл.

Наступним етапом роботи було проведення порівняльної оцінки впливу AuNPs на проліферативну активність КрМСК жирової тканини за допомогою МТТ-тесту. Одержані результати наведено

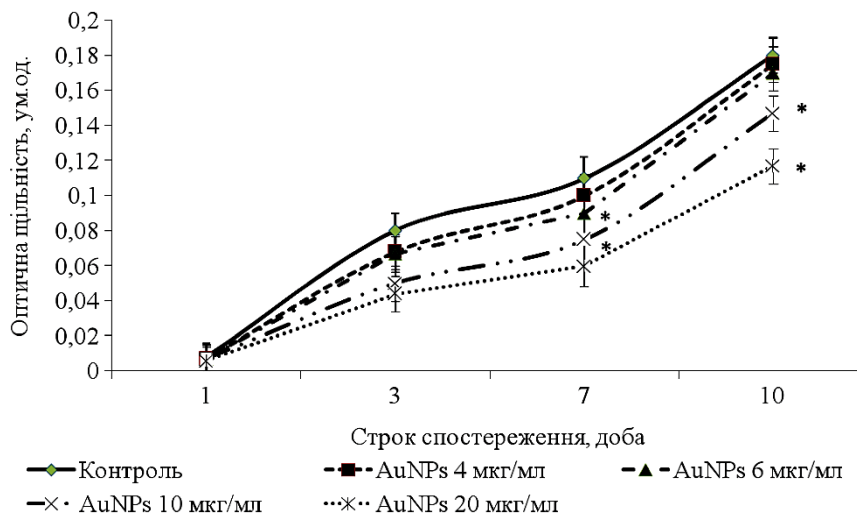


Рис. 3. Вплив AuNPs на проліферативну активність КрМСК жирової тканини. Примітки: * — вірогідність різниці у порівнянні з контролем, $p < 0,05$; AuNPs — наночастинки золота.⁵

на рис. 3. Встановлено, що застосування AuNPs у концентрації 10 і 20 мкг/мл приводило до вірогідного пониження приросту популяції КрМСК жирової тканини, починаючи з 3-ї доби культивування, відповідно в 1,6 і 1,8 разу, на 7-му добу — в 1,5 і 1,8 разу та на 10-ту добу — в 1,3 та 1,5 разу стосовно контролю. Додавання AuNPs у концентраціях 4 та 6 мкг/мл не викликало вірогідних змін у дослідженому показнику протягом всього строку спостереження. Результати світлової мікроскопії показали, що застосування AuNPs у концентраціях 10 і 20 мкг/мл призводило до змін у морфологічних характеристиках КрМСК з жирової тканини щодо контрольних зразків, а саме, з'являлися ознаки дистрофії цитоскелету, зернистість цитоплазми та вакуолізація ядер.

Проліферативну активність КрМСК хрящової тканини після взаємодії з AuNPs теж вимірювали за допомогою МТТ-тесту (рис. 4). Додавання AuNPs у концентрації 20 мкг/мл в культурі КрМСК хрящової тканини викликало пониження проліферативної активності на 3-ю добу культивування в 1,5 разу, на 7-му добу — в 1,7 разу, а на 10-ту добу — в 1,6 разу щодо контролю. Досліджений показник у КрМСК з хрящової тканини після взаємодії з AuNPs (4, 6 і 10 мкг/мл) не відрізнявся від контролю впродовж експерименту. Також слід зазначити, що використання AuNPs у концентрації 20 мкг/мл приводило до відкріплення клітин від підложжя, переважно клітин полігональної форми, в

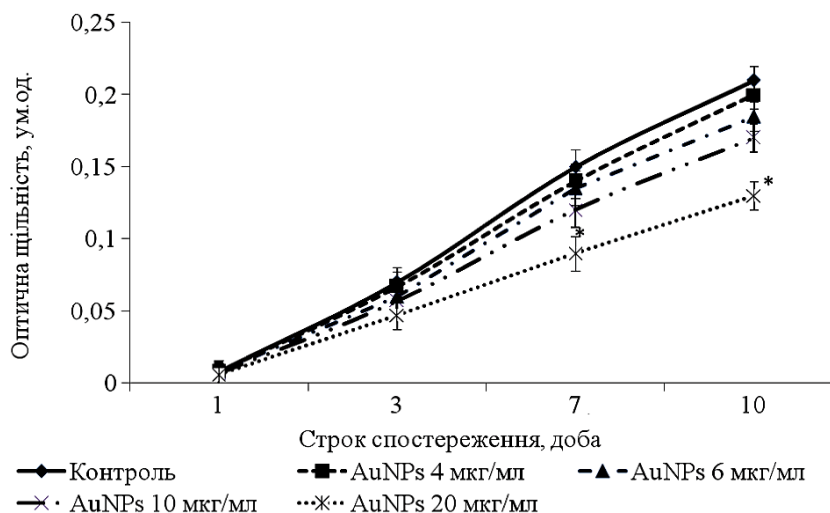


Рис. 4. Вплив AuNPs на проліферативну активність КрМСК хрящової тканини. Примітки: * — вірогідність різниці у порівнянні з контролем, $p < 0,05$; AuNPs — наночастинки золота.⁶

яких спостерігали дегенеративні зміни в цитоскелеті.

На сьогодні дослідження властивостей наноматеріалів і наночастинок, що стрімко розвиваються, ставлять завдання вивчити їхній вплив на живі системи, як на рівні всього організму, так і на окремі клітини та клітинні структури. Але виявлення клітинних ефектів є особливо важливим внаслідок нанорозмірності діючих агентів, які безпосередньо впливають на клітинні структури. В представленій роботі нами було проведено порівняльну оцінку морфофункціональних характеристик кріоконсервованих МСК з жирової та хрящової тканин за умов їхньої взаємодії з AuNPs. Аналіза одержаних результатів показала, що AuNPs у концентрації 4 та 6 мкг/мл не впливають на життєздатність, морфологічні характеристики, проліферативну активність і процеси апоптозу/некрозу в КрМСК з жирової та хрящової тканин. У дослідженні впливу AuNPs у концентрації 10 мкг/мл на КрМСК жирової тканини показано пониження проліферативної активності та збільшення відсотка клітин у стані апоптозу. Із застосуванням AuNPs у концентрації 20 мкг/мл у КрМСК з обох досліджених джерел визначали пониження кількості клітин з цілісною мембраною та їхньої проліферативної активності, морфологічні зміни, а також активізацію процесів апоптозу/некрозу.

Одержані дані узгоджуються з раніше проведеними нами дослідженнями, в яких було показано, що AuNPs є безпечними для МСК кісткового мозку у концентрації 1,5–6 мкг/мл, тоді як збі-

льшення останньої до 9 мкг/мл має токсичну дію та проявляється у активізації апоптозу, зменшенні проліферативної активності, колонієутворювального потенціалу, синтезу колагену I типу та здатності до спрямованої диференціації [9]. Порівнюючи одержані дані, можна стверджувати, що МСК кісткового мозку та жирової тканини проявляють подібну чутливість до AuNPs, тоді як клітини із хрящової тканини мають більшу резистентність і не виявляють ознак цитотоксичного впливу під час культивування у присутності AuNPs у концентрації 10 мкг/мл. Така властивість МСК хрящової тканини напевно пов'язана з пристосуванням метаболізму цих клітин до особливостей існування в умовах їхньої природної ніші (аваскулярність, алімфотичність, відносно низька напруга кисню, постійні механічні навантаження).

В роботі [12] показано, що проліферативна активність, синтез колагену II типу та глікозаміногліканів КрМСК з хрящової тканини не зазнавали змін під впливом чинника росту фібробластів та трансформувального ростового фактора β , проте характеризувалися порівняно більшою активністю синтетичних процесів відносно КрМСК з кісткового мозку та жирової тканини. В процесі тривалого культивування МСК в залежності від джерела також по-різному можуть зберігати здатність до диференціації та проліферації [13]. Виходячи з вищенаведеного, зрозуміло, що подібна тенденція розповсюджується і на резистентність МСК з різних джерел до цитотоксичного впливу AuNPs, що обов'язково потрібно враховувати при роботі з цими об'єктами.

Розвиток нанобіотехнологій ґрунтується на дослідженні взаємодії наночастинок з біологічними системами, біобезпеці використання наноструктурних інертних матеріалів, що може знайти застосування у розробці та створенні новітніх біосенсорних систем. Одержані результати відносяться до галузі прикладних нанобіотехнологій, які поширюються на клінічну медицину, насамперед, створення спрямованої доставки ліків до клітин-мішеней або органів.

4. ВИСНОВКИ

Використання AuNPs у концентраціях 4 та 6 мкг/мл не впливає на цілісність мембрани, проліферативний потенціал, морфологічні характеристики та стан процесів апоптозу/некрозу в КрМСК з жирової та хрящової тканин.

Застосування AuNPs у концентрації 10 мкг/мл призводить до пониження проліферативної активності, появи ознак дистрофії цитоскелету, зернистості цитоплазми та вакуолізації ядер, а також сприяє збільшенню відсотка клітин у стані апоптозу/некрозу у випадку КрМСК жирової тканини.

Використання AuNPs у концентрації 20 мкг/мл викликає пониження кількості клітин з цілісною мембраною, проліферативного потенціалу, збільшує відсоток клітин у стані апоптозу та некрозу в КрМСК з жирової та хрящової тканин.

За сукупністю проведених тестів встановлено, що культури КрМСК з хрящової тканини мають більшу резистентність до впливу AuNPs, аніж КрМСК жирової тканини.

Одержані результати можуть бути використані для обґрунтування та розробки методик застосування КрМСК у поєднанні з AuNPs у клінічній практиці для лікування уражень тканин опорно-рухового апарату.

Роботу проведено в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» (договір № 2.2.6.132/20).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. A. P. Muller, G. K. Ferreira, A. J. Pires, G. B. Silveira, D. L. Souza, J. A. Brandolfi, C. T. de Souza, M. M. S. Paula, and P. C. L. Silveira, *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.*, **77**: 476 (2017); <https://doi.org/10.1039/B806051G>
2. D. Di Bella, J. P. S. Ferreira, R. N. O. Silva, C. Echem, A. Milan, E. H. Akamine, M. H. Carvalho, and S. F. Rodrigues, *J. Nanobiotechnol.*, **19**: 52 (2021); <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00796-6>
3. S. J. Soenen, B. Manshian, J. M. Montenegro, F. Amin, B. Meermann, T. Thiron, M. Cornelissen, F. Vanhaecke, S. Doak, W. J. Parak, S. De Smedt, and K. Braeckmans, *ACS Nano*, **6**, No. 7: 5767 (2012); <https://doi.org/10.1021/nn301714n>
4. A. Shrestha and A. Kishen, *J. Endod.*, **42**, No. 10: 1417 (2016); <https://doi.org/10.1016/j.joen>
5. M. M. Mihai, M. B. Dima, B. Dima and A. M. Holban, *Materials (Basel)*, **12**, No. 13: 2176 (2019); <https://doi.org/10.3390/ma12132176>
6. N. Volkova, M. Yukhta, and A. Goltsev, *Cell and Organ Transplantation*, **5**, No. 2: 170 (2017); <https://doi.org/10.22494/COT.V5I2.75>
7. T. Mossman, *J. Immunol. Methods*, **65**, Nos. 1–2: 55 (1983); [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
8. N. Khlebtsov and L. Dykman, *Chem. Soc. Rev.*, **40**, No. 3: 1647 (2011). <https://doi.org/10.1039/c0cs00018c>
9. N. Volkova, O. Pavlovich, O. Fesenko, O. Budnyk, S. Kovalchuk, and A. Goltsev, *J. Nanomater.*, **2017**: 6934757 (2017); <https://doi.org/10.1155/2017/6934757>
10. A. M. Alkilany and C. J. Murphy, *J. Nanopart. Res.*, **12**, No. 7: 2313 (2010); <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>
11. L. M. Ricles, S. Y. Nam, K. Sokolov, S. Y. Emelianov, and L. J. Suggs, *Int. J. Nanomedicine*, **6**: 407 (2011); <https://doi.org/10.2147/IJN.S16354>
12. N. Volkova, M. Yukhta, and A. Goltsev, *Fiziol. Zh.*, **65**, No. 2: 12 (2019) (in Ukrainian); <https://doi.org/10.15407/fz65.02.012>

13. U. Kozłowska, A. Krawczyński, K. Futoma, T. Jurek, M. Rorat, D. Patrzalek, and A. Klimczak, *World J. Stem Cells*, **11**, No. 6: 347 (2019); <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i6.347>

*Institute of Cryobiology and Cryomedicine, N.A.S. of Ukraine,
23, Pereyaslavska Str.,
UA-61016 Kharkiv, Ukraine*

¹ **Fig. 1.** Experimental scheme. Note: AuNPs—gold nanoparticles; MCK—mesenchymal stem cells; КрМСК—cryopreserved mesenchymal stem cells.

² **Fig. 2.** Influence of AuNPs on the membrane integrity of the CrMSCs of adipose and cartilage tissues. Notes: AuNPs—gold nanoparticles; КрМСК—cryopreserved mesenchymal stem cells; *—differences are significant in comparison with the corresponding control, $p < 0.05$.

³ **TABLE 1.** Cytofluorimetric analysis of CrMSCs of adipose tissue after incubation with AuNPs for 1 hour, staining of Annexin V and 7AAD.

⁴ **TABLE 2.** Cytofluorimetric analysis of CrMSCs of cartilage tissue after incubation with AuNPs for 1 hour, staining of Annexin V and 7AAD.

⁵ **Fig. 3.** The effect of AuNPs on the proliferative activity of CrMSCs of adipose tissue. Notes: *—differences are significant in comparison with control, $p < 0.05$; AuNPs—gold nanoparticles.

⁶ **Fig. 4.** The effect of AuNPs on the proliferative activity of CrMSCs of cartilage tissue. Notes: *—differences are significant in comparison with control, $p < 0.05$; AuNPs—gold nanoparticles.