

Для цитирования: Ложкомоев А.С., Бакина О.В., Казанцев С.О., Иванова Л.Ю., Августинович А.В., Афанасьев С.Г., Спирина Л.В., Добродеев А.Ю. Цитотоксические свойства нанолитовых структур на основе оксидных и гидроксидных фаз алюминия в отношении опухолевых клеток. Сибирский онкологический журнал. 2021; 20(4): 73–83. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-4-73-83

For citation: Lozhkomoev A.S., Bakina O.V., Kazantsev S.O., Ivanova L.Yu., Avgustinovich A.V., Afanasyev S.G., Spirina L.V., Dobrodeev A.Yu. Cytotoxic properties of nanostructures based on aluminum oxide and hydroxide phases in relation to tumor cells. Siberian Journal of Oncology. 2021; 20(4): 73–83. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-4-73-83

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЛИТОВЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ ОКСИДНЫХ И ГИДРОКСИДНЫХ ФАЗ АЛЮМИНИЯ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

А.С. Ложкомоев¹, О.В. Бакина¹, С.О. Казанцев¹, Л.Ю. Иванова¹,
А.В. Августинович², С.Г. Афанасьев², Л.В. Спирина², А.Ю. Добродеев²

Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Россия, 634055, г. Томск, пр. Академический, 2/4. E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский

медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Россия, 634009. г. Томск, пер. Кооперативный, 5²

Аннотация

Введение. Применение наночастиц и наноструктур в качестве компонентов терапии опухолей является предметом большого количества научных исследований. Одним из наиболее перспективных подходов подавления жизнеспособности опухолевых клеток является изменение величины водородного показателя pH их микроокружения при добавлении наночастиц и наноструктур. Гидроксиды и оксиды алюминия имеют ряд преимуществ перед другими частицами благодаря развитой поверхности, низкой токсичности и термической стабильности. **Целью исследования** явилось изучение влияния кислотно-основных свойств нанолитовых структур на основе гидроксидов алюминия с различным фазовым составом на жизнеспособность широкого спектра опухолевых клеток: HeLa, MDA, PyMT, A549, B16F10. **Материал и методы.** В качестве прекурсора для получения наноструктур различного фазового состава использовали наночастицы алюмонитридной композиции. Наночастицы алюминия были получены электрическим взрывом алюминиевой проволоки в атмосфере азота. Такие наночастицы реагируют с водой уже при температуре 60 °С. В результате формируются пористые наноструктуры, которые представляют собой агломераты нанолитов с планарным размером до 200 нм и толщиной 5 нм. Фазовый состав наноструктур варьировали температурой прокаливания. Изменение фазового состава наноструктур приводило к изменению кислотно-основного покрова их поверхности. Для оценки количества кислотных и основных центров на поверхности наноструктур использовали адсорбцию индикаторов Гаммета. Количество адсорбированных красителей определяли спектрофотометрически. **Результаты.** Отличия кислотно-основных характеристик поверхности синтезированных наноструктур приводят к изменению их цитотоксичности в отношении опухолевых клеток. У гидроксида алюминия в фазе $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ основных центров было в 6,5 раза больше, чем кислотных, что обуславливает его способность проявлять более выраженные антацидные свойства, т.е. дольше нейтрализовать протоны, выделяемые опухолевыми клетками. Данный образец обладает наибольшей активностью в отношении всех клеточных линий. **Заключение.** Противоопухолевая активность синтезированных наноструктур обусловлена не только повышением величины pH микроокружения клеток, но и возможностью дольше поддерживать щелочность микроокружения за счет адсорбции протонов, выделяемых опухолевыми клетками.

Ключевые слова: наноструктуры, цитотоксичность, кислотно-основные свойства, опухолевые клетки.

CYTOTOXIC PROPERTIES OF NANOSTRUCTURES BASED ON ALUMINUM OXIDE AND HYDROXIDE PHASES IN RELATION TO TUMOR CELLS

A.S. Lozhkomoev¹, O.V. Bakina¹, S.O. Kazantsev¹, L.Yu. Ivanova¹,
A.V. Avgustinovich², S.G. Afanasyev², L.V. Spirina², A.Yu. Dobrodeev²

Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2/41, Akademicheskoy Ave., 634055, Tomsk, Russia¹. E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru¹
Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences², 5, Kooperativny per., 634009, Tomsk, Russia²

Abstract

Background. Currently, the use of nanoparticles and nanostructures as components of tumor therapy is the subject of numerous scientific articles. To change the parameters of cell microenvironment in presence of nanoparticles and nanostructures is a promising approach to reducing the tumor cell viability. Aluminum hydroxides and oxides have a number of advantages over other particles due to their porous surface, low toxicity, and thermal stability. **The purpose of the study** was to investigate the influence of the acid-base properties of aluminum hydroxide structures with different phase composition on the tumor cell viability (HeLa, MDA, PyMT, A549, B16F10). **Material and Methods.** AlN/Al nanoparticles were used as a precursor for obtaining structures with various phase compositions. The nanoparticles were produced by electric explosion of an aluminum wire in a nitrogen atmosphere. Such nanoparticles interact with water at 60 °C, resulting in formation of porous nanostructures. They are agglomerates of nanosheets with a planar size of up to 200 nm and a thickness of 5 nm. The phase composition of the structures was varied by the calcination temperature. A change in the phase composition of nanostructures led to a change in the acid-base properties of their surface. To estimate the number of acidic and basic centers on the surface of nanostructures, the adsorption of Hammett indicators was used. The amount of adsorbed dyes was determined spectrophotometrically. **Results.** It was found that the differences in the acid-base characteristics of the surface of the nanostructures led to a change in their antitumor activity. $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ had 6.5 times more basic centers than acidic ones, which determined its ability to exhibit more pronounced antacid properties, i.e. longer to neutralize protons secreted by tumor cells. This sample had the highest antitumor activity against all tested cell lines. **Conclusion.** The antitumor activity of synthesized structures was found to be related not only to an increase in the pH of the cell microenvironment, but also to the ability to maintain the alkalinity of the microenvironment for a longer time due to the adsorption of protons released by tumor cells.

Key words: nanostructures, antitumor activity, acid and base properties, cell microenvironment.

Введение

Уникальные свойства наночастиц и наноструктур открывают новые перспективы для лечения злокачественных новообразований. Для противоопухолевой терапии были разработаны многочисленные системы на основе наночастиц в качестве носителей лекарств для целевой терапевтической доставки [1–6] и проводники для создания гипертермии [7]. Кроме того, наночастицы с определенным размером, морфологией, фазовым составом и другими физико-химическими свойствами могут оказывать прямое влияние на биологические функции раковых клеток [8–10]. Одним из перспективных подходов в борьбе с опухолевыми клетками может стать подавление их жизнеспособности через изменение параметров микроокружения клеток, в том числе изменение водородного показателя pH. В работе Y. Li et al. [11] показаны перспективы использования металлфуллереновых наночастиц $\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}$ при воздействии на опухоль через

ингибирование ангиогенеза, антиоксидантной и иммунной активации. В экспериментах *in vitro* показана возможность подавления пролиферации клеток оксидом магния (MgO) повышением pH микроокружения клеток [12, 13]. Известно, что кислотность опухолевых клеток вызвана увеличением генерации протонов в результате анаэробного метаболизма за счет сверхэкспрессии димерного изофермента пируваткиназы M2-PK [14]. Благодаря этому опухоли имеют значительно более низкий внеклеточный водородный показатель ($\text{pH} \sim 6,5\text{--}7,1$) по сравнению с нормальными тканями ($\text{pH} = 7,4$) [15–17]. Разница кислотности микроокружения нормальных и опухолевых клеток также используется для направленной доставки и контролируемого высвобождения химиотерапевтических препаратов в опухоли [18–21].

Благодаря кислому микроокружению опухолевые клетки в большей степени устойчивы ко многим стандартным лекарственным средствам,

которые являются слабыми основаниями. Препараты быстро нейтрализуются кислым микроокружением опухолевой клетки. Для нейтрализации кислотности внеклеточной среды в настоящее время используются ингибиторы протонного насоса (*PPIs*), с помощью которых увеличивается эффективность химиотерапии [22]. Последние исследования показывают, что изменение внеклеточного pH убивает опухолевые клетки, уменьшает метастазирование и снижает устойчивость опухолевых клеток к лекарственным препаратам [23]. Это позволяет рассматривать данный подход в качестве перспективного метода лечения рака, в том числе при использовании субоптимальных концентраций химиопрепаратов.

Перспективными материалами для нейтрализации кислого pH микроокружения клеток могут стать наноструктуры на основе оксидов и гидроксидов алюминия. Известно, что гидроксиды алюминия являются нейтрализаторами кислот и адъювантами. Кроме того, они обладают высокой адсорбционной емкостью и пористостью. В зависимости от способа получения можно синтезировать наноструктуры на основе оксидных и гидроксидных фаз алюминия, обладающие различной формой, размером, кислотно-основными свойствами, фазовым составом, дзета-потенциалом и др. Изменение фазового состава наноструктур – это основной фактор, регулирующий кислотно-основной покров поверхности. В настоящей работе фазовый состав наноструктур варьировали температурой прокаливания. Кроме того, было изучено влияние агломератов нанолитовых структур на основе гидроксидов алюминия с различным фазовым составом на жизнеспособность опухолевых клеток.

Цель исследования – изучение влияния кислотно-основных свойств нанолитовых структур на основе гидроксидов алюминия с различным фазовым составом на жизнеспособность широкого спектра опухолевых клеток: HeLa, MDA, PyMT, A549, B16F10.

Материал и методы

Синтез нанолитовых структур на основе гидроксидов алюминия осуществляли окислением водой нанопорошка AlN/Al, полученного методом электрического взрыва алюминиевой проволоки в атмосфере азота [24, 25]. Для этого навеску порошка массой 10 г помещали в емкость с дистиллированной водой объемом 1000 мл и нагревали суспензию при постоянном перемешивании при 60 °C в течение 60 мин. В результате нагрева суспензии происходит гидролиз и окисление наночастиц AlN/Al. После реакции осадок отфильтровывали при помощи мембраны с диаметром пор 0,44 мкм и сушили при 120 °C в течение 2 ч. После сушки порошок разделяли на три части, одну из которых оставляли неизменной, вторую

прокаливали в муфельной печи при 650 °C, третью – при 900 °C.

Морфологию синтезированных образцов нанолитовых структур исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии ПЭМ (JEM-2100, Япония) и сканирующей электронной микроскопии СЭМ (Zeiss Ultra-Plus FEG-SEM, Германия). Метод тепловой десорбции азота использовали для определения площади удельной поверхности и распределения пор по размеру. Измерения дзета-потенциала проводили с использованием анализатора Zetasizer Nano ZSP (Великобритания). Изменение pH водных суспензий наноструктур в зависимости от количества добавленной кислоты изучали с помощью многофункциональной системы автоматического титрования MPT-2 (Великобритания), интегрированной с прибором Zetasizer Nano ZSP. Рентгеноструктурный анализ (РФА) проводили на дифрактометре Shimadzu XRD 6000 (Япония), работающем с CoK α -излучением при 40 кВ и 30 мА. Качественный анализ был выполнен с использованием базы данных PDF-2 Release 2014. Свойства поверхности образцов исследовали методом ИК-спектроскопии с помощью спектрометра Nicolet 5700, США. Измерения pH проводили с помощью pH-метра Мультитест ИПЛ-103 (Россия).

Концентрацию кислотных и основных центров на поверхности нанолитовых структур определяли с помощью адсорбции одноосновных красителей (индикаторов Гаммета) спектрофотометрическим методом. Анализ позволяет определить содержание активных центров с данным значением рКа на поверхности исследуемого образца по формуле

$$g = \frac{C_{ind} * V_{ind}}{D_0} * \left| \frac{|D_0 - D_1|}{m_1} \pm \frac{|D_0 - D_2|}{m_2} \right|,$$

где D_0 – оптическая плотность исходного водного раствора индикатора заданной концентрации; D_1 – оптическая плотность водного или спиртового раствора индикатора, содержащего навеску заданной массы исследуемого вещества после адсорбции в течение 24 ч; D_2 – водный или спиртовой раствор содержащего навеску заданной массы исследуемого вещества с добавленным через 24 ч индикатором; C_{ind} – концентрация индикатора в растворе; V_{ind} – объем раствора индикатора, взятый для анализа; m_1 и m_2 – массы соответствующих навесок; знак « $\pm$ » соответствует разнонаправленному изменению D_1 и D_2 относительно D_0 .

Для изучения адсорбции кислотных и основных индикаторов образцы нанолитовых структур массой $m_i = 0,1 \pm 0,001$ г помещали в сухие емкости, заливали 3 мл раствора индикатора с определенной концентрацией, перемешивали и выдерживали в течение 24 ч. После этого разбавляли 2 мл дистиллированной воды, выдерживали 10 мин и измеряли значение оптической плотности (D_i) при

Таблица 1/Table 1

Основные характеристики индикаторов Гаммета

Main characteristics of Gammet indicators

Название/Name	Молекулярная масса/ Molecular mass	Константа диссоциации (pK_a)/ Dissociation constant (pK_a)	Длина волны в максимуме по- глощения (λ_{max})/ The wavelength at the absorption maximum (λ_{max})
Метиловый фиолетовый/ Methyl violet	364,91 г/моль	0,3	585 нм
Бриллиантовый зеленый/ Brilliant green	482,64 г/моль	1,3	610 нм
Метилоранж/ Methyl orange	327,33 г/моль	3,5	464 нм
Метиловый красный/ Methyl red	269,3 г/моль	5,2	530 нм
Бромтимоловый синий/ Bromothymol blue	669,97 г/моль	7,3	540 нм
Ализариновый красный/ Alizarin red	240,2 г/моль	10,5	425 нм
Индигокармин/Indigocarmine	422,38 г/моль	12,8	610 нм

Таблица 2/Table 2

Основные характеристики тестовых клеточных культур

Main characteristics of test cell cultures

Название/ Name	Описание/Description	Условия культивирования/Cultivation conditions
HeLa	Карцинома шейки матки, морфология клеток эпителиальная/ Cervical carcinoma, epithelial cell morphology	Питательная среда MEM с добавлением 10 % фе- тальной бычьей сыворотки, 2мМ L-глутамин и 1 % пенициллин/стрептомицина/
A549	Аденокарцинома, морфология клеток эпителиальная/ Adenocarcinoma, epithelial cell morphology	MEM culture medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 1 % penicillin / streptomycin
PyMT	Первичные клетки опухоли молочной железы/ Primary breast tumor cells	Питательная среда DMEM с добавлением 10 % фе- тальной бычьей сыворотки, 2мМ L-глутамин и 1 % пенициллин/стрептомицина/
MDA	Аденокарцинома, морфология клеток эпителиальная/ Adenocarcinoma, epithelial cell morphology	DMEM culture medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 1 % penicillin / streptomycin
B16F10	Меланома, клетки веретенообразные и эпителиальные/ Melanoma, fusiform and epithelial cells	

длине волны (λ_{max}), соответствующей максимуму поглощения каждого индикатора. Параллельно брали навеску структур (m_2) помещали в сухую емкость, заливали 2 мл дистиллированной воды и выдерживали в течение 24 ч. После чего раствор декантировали в другую емкость и приливали 3 мл раствора индикатора, выдерживали 10 мин и измеряли значение оптической плотности (D_2). В сухую емкость приливали 3 мл раствора индикатора и приливали 2 мл дистиллированной воды. Выдерживали 10 мин и измеряли значение оптической плотности (D_0). Оптическую плотность растворов определяли в кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Для исследований применяли ряд красителей Гаммета (табл. 1), которые позволяют регистрировать кислотно-основные центры в диапазоне pK_a от 0,3 до 12,8. Кроме того, использованы различные линии опухолевых клеток (табл. 2), полученные

из Американской коллекции типовых культур. Культивирование клеток проводили в 96-луночных планшетах при температуре 37 ± 1 °C и 5 % CO_2 в течение 24 ч. Конечная концентрация клеток составила 1×10^4 клеток/100 мкл в лунке 96-луночного планшета.

Анализ жизнеспособности клеток *in vitro* проводили при помощи теста PrestoBlue™ Cell Viability Reagent, основанного на использовании ароматического соединения резазурина, который при добавлении к живым клеткам восстанавливается в розовый флуоресцирующий резозулин. Суспензии наночастиц в клеточной среде подготавливали в концентрациях от 0,001 мг/мл до 10 мг/мл. Клетки со структурами инкубировали в 96-луночных микропланшетах при температуре 37 ± 1 °C и 5 % CO_2 в течение 24 ч. После инкубирования питательную среду осторожно удаляли при помощи аспиратора и два раза промывали клетки

раствором фосфатного буфера Дульбекко. Для проведения теста в каждую лунку добавляли по 100 мкл питательной среды и по 10 мкл раствора PrestBlue. Проводили инкубацию при 37 ± 1 °C и 5 % CO₂ в течение 1 ч, затем определяли флуоресценцию при помощи микропланшетного фотометра Tecan (Австрия). Дополнительно токсичность исследовали при помощи метода CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. Анализ проводили аналогично, за исключением того, что планшеты использовались непрозрачные. В обоих экспериментах контрольной группой служили клетки без добавления структур.

Количественные данные представлены как средние и стандартные ошибки. Статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты

В результате окисления водой электровзрывного порошка AlN/Al был получен образец в фазе бемита AlOOH, представляющий собой складчатые нанолиты псевдобемита, равномерно собранные в агломераты размером 0,5–2 мкм с морфологией наноцветов (рис. 1а, б). Планарный размер отдельных нанолитов агломератов достигал 200 нм, толщина нанолитов до 5 нм. При дальнейшем прокаливании образца AlOOH при 650 °C происходило удаление адсорбированной и кристаллизационной воды и был получен образец γ -Al₂O₃, морфология нанолитов бемита практически не изменялась (рис. 1в, г). При прокаливании образца AlOOH при 1000 °C получали образец θ -Al₂O₃. Для данного образца происходило уменьшение планарного размера нанолитов до 100 нм (рис. 1д, е).

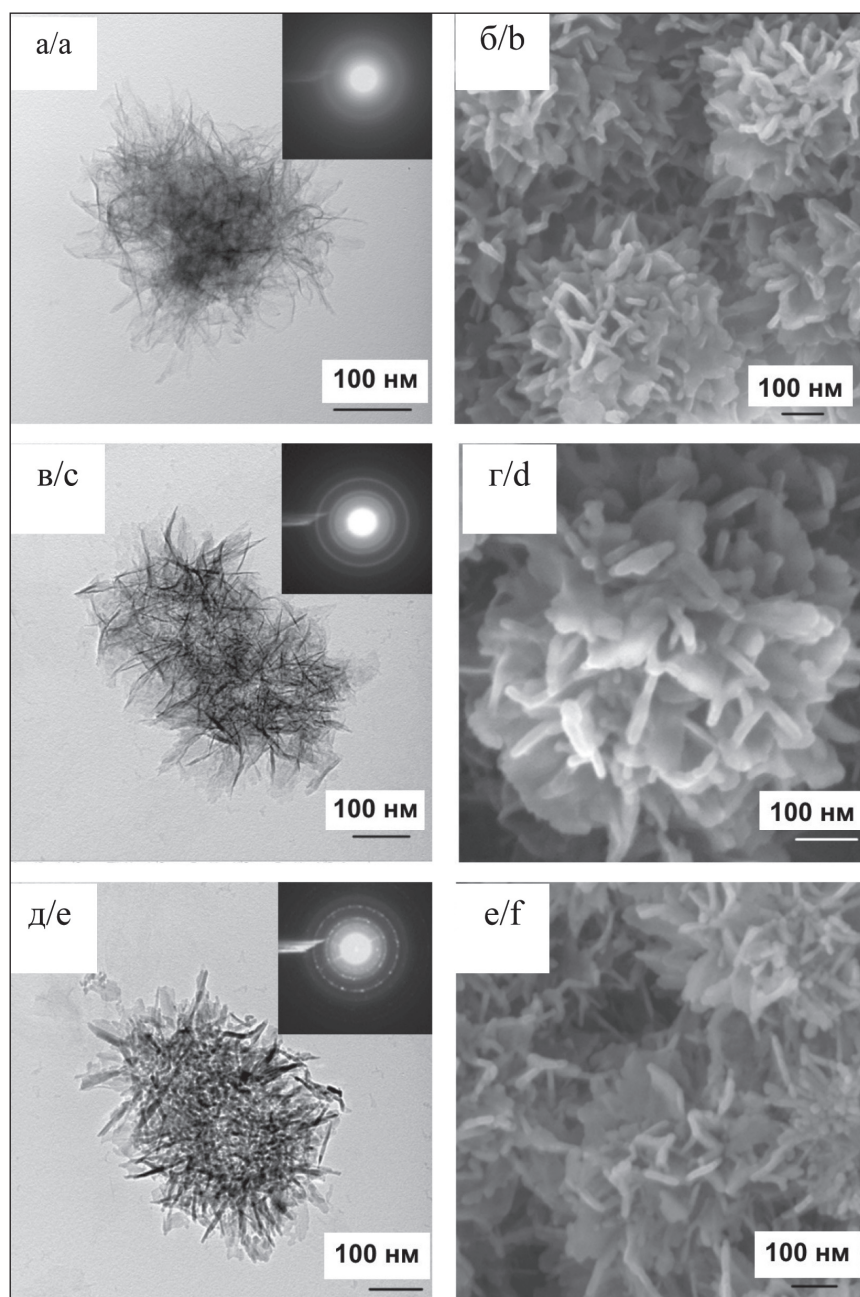


Рис. 1. Изображения образцов, полученные при помощи ПЭМ (а, в, д) и СЭМ (б, г, е) нанолитовых структур: AlOOH (а, б); γ -Al₂O₃ (в, г)
Fig. 1. Images of samples obtained using TEM (a, c, e) and SEM (b, d, f) of nanosheet structures: AlOOH (a, b); γ -Al₂O₃ (c, d)

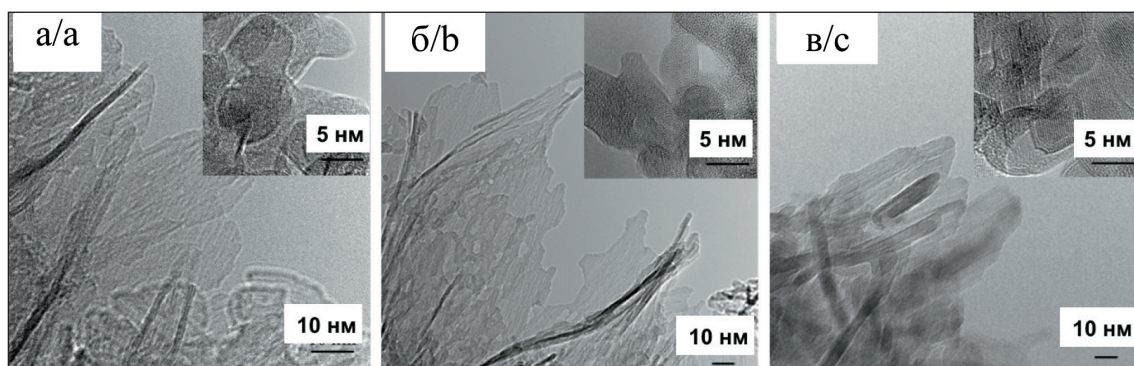


Рис. 2. ПЭМ-изображения нанолистовых структур: AlOOH (а); γ -Al₂O₃ (б) и θ -Al₂O₃ (в)
Fig. 2. TEM images of nanosheet structures: AlOOH (a); γ -Al₂O₃ (b) and θ -Al₂O₃ (c)

При детальном исследовании морфологии образцов при помощи ПЭМ высокого разрешения (рис. 2) установлено, что в то время как для образцов AlOOH (рис. 2а) и γ -Al₂O₃ (рис. 2б) толщина нанолитов не изменялась и составляла 2–5 нм, в образце θ -Al₂O₃ тонкие фрагменты нанолитов (2–5 нм) практически полностью исчезали и толщина нанолитов увеличивалась до 20 нм (рис. 2в). При этом на вставках к рис. 2 видно, что форма и размер доменов, из которых состоят нанолиты, не изменялись. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, описанными в работе S.V. Tsybulya et al. [26], где показано, что при прокаливании низкотемпературных форм оксида алюминия первичная структура и размер доменов сохраняются.

По данным рентгенофазового анализа синтезированных образцов основные пики на дифрактограмме образца AlOOH (рис. 3а) соответствуют кристаллическому бемиту (PDF № 00-05-0190). В результате термической обработки структур AlOOH происходят фазовые переходы, характерные для оксидов и гидроксидов алюминия. На рентгенограмме образца, прокаленного при 650 °С (рис. 3б), появляется новый набор рефлексов, относящийся к фазе γ -Al₂O₃ (PDF № 00-029-0063). При дальнейшем повышении температуры до 1000 °С происходит переход γ -Al₂O₃ в новое фазовое состояние. На рентгенограмме образца, прокаленного при 1000 °С (рис. 3в), основные рефлексы соответствуют θ -Al₂O₃ (PDF № 00-035-0121). Отсутствие кристаллических линий и рефлексов на картине электронной микродифракции AlOOH (рис. 1а) и γ -Al₂O₃ (рис. 1в), а также уширение пиков, на соответствующих рентгенограммах (рис. 3а, б), свидетельствуют об отсутствии дальнего порядка в расположении атомов и аморфной структуре образцов. Для θ -Al₂O₃ характерна более упорядоченная структура. Однако на картине микродифракции θ -Al₂O₃ (рис. 1д) наблюдались рефлексы, принадлежащие плоскостям с разной ориентацией, что говорит о сохранении слоистой структуры θ -Al₂O₃.

Таким образом, в результате прокаливании синтезированных нанолитовых структур сохраняется

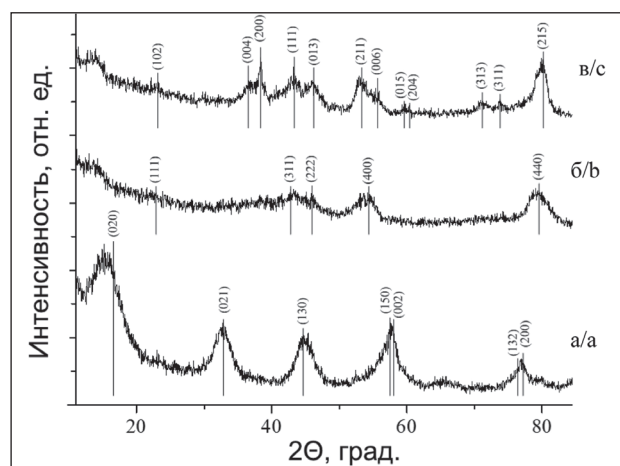


Рис. 3. Рентгеноструктурный анализ образцов нанолитовых структур: AlOOH (а); γ -Al₂O₃ (б) и θ -Al₂O₃ (в)
Fig. 3. X-ray structural analysis of samples of nanosheet structures: AlOOH (a); γ -Al₂O₃ (b) and θ -Al₂O₃ (c)

морфология образцов, при этом изменяется фазовый состав и увеличивается степень кристалличности. В результате прокалывания также происходит снижение величины удельной поверхности. Удельная поверхность AlOOH, рассчитанная методом БЭТ, составила 284 м²/г, для γ -Al₂O₃ – 246 м²/г, для θ -Al₂O₃ – 199 м²/г. Кроме того, с увеличением температуры прокалывания происходило уменьшение объема пор и увеличение их среднего размера с 4 до 12 нм. Вероятно, это обусловлено удалением кристаллической воды из межслоевого пространства и спеканием нанолитов.

Поверхность образцов была исследована методом ИК-спектроскопии (рис. 4). Для γ -Al₂O₃ и θ -Al₂O₃ наблюдались изменения в области 3700–3000 см⁻¹, которая соответствует валентным колебаниям OH-групп. Для AlOOH, помимо широкой полосы в области 3200–3500 см⁻¹, обусловленной валентными колебаниями OH-групп в молекулах H₂O, характерны поверхностные OH-группы, связанные с тремя атомами алюминия (3090 см⁻¹), входящими в состав краевых фрагментов плоскости (201). Для образцов γ -Al₂O₃ и θ -Al₂O₃ полоса

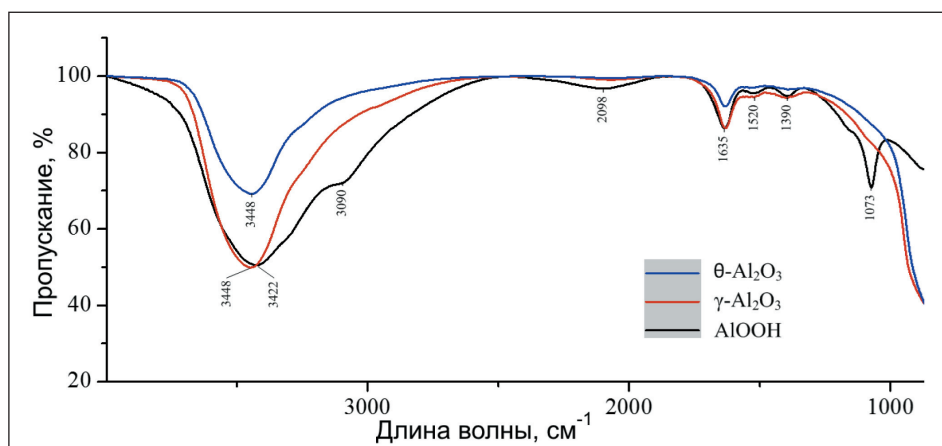


Рис. 4. ИК-спектры образцов нанолитовых структур
Fig. 4. IR spectra of samples of nanosheet structures

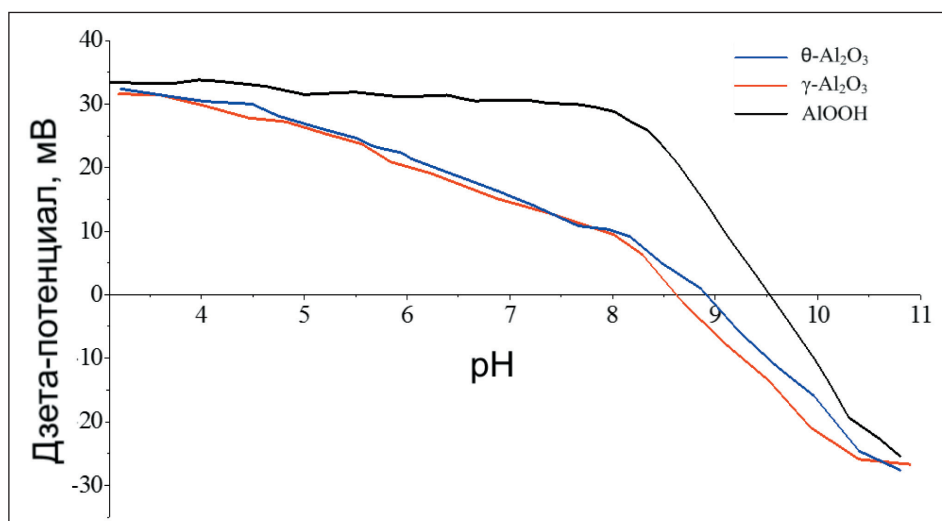


Рис. 5. Дзета-потенциал образцов нанолитовых структур
Fig. 5. Zeta potential of samples of nanosheet structures

поглощения для ОН-групп, связанных с тремя атомами алюминия, и полоса поглощения в области 1073 см^{-1} , обусловленная деформационными колебаниями ОН-групп, отсутствовали. Снижение интенсивностей полос для $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ и $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ может быть связано с частичным удалением поверхностных ОН-групп при прокаливании.

Величина дзета-потенциала наночастиц и наноструктур определяет эффективность их взаимодействия с биологическими объектами. На рис. 5 представлены зависимости дзета-потенциала синтезированных нанолитовых структур от pH среды. Все синтезированные наноструктуры при $\text{pH}=7,2$ и температуре 37°C имели положительный дзета-потенциал. Дзета-потенциал AlOOH составил $30,8 \pm 0,2\text{ мВ}$, $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ и $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ – $12,5 \pm 0,3\text{ мВ}$. Следует отметить, что дзета-потенциал AlOOH практически не изменялся в широком диапазоне pH (от 3 до 8), в то время как дзета-потенциал $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ и $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ уменьшался с увеличением pH в приведенном диапазоне. Синтезированные наноструктуры также характеризуются различным pH изoelectricного состояния ($\text{pH}_{\text{ТНЗ}}$). Для псевдобемита $\text{pH}_{\text{ТНЗ}}=9,52$, для $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ $\text{pH}_{\text{ТНЗ}}=8,61$, для $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ $\text{pH}_{\text{ТНЗ}}=8,92$. Как видно, дзета-потенциал $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ и $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$, а также $\text{pH}_{\text{ТНЗ}}$ меньше, чем у AlOOH, что может быть обу-

словлено появлением большего числа основных центров или уменьшением числа кислотных центров на поверхности данных оксидов в результате термообработки.

В экспериментах по исследованию цитотоксичности *in vitro* на примере 5 клеточных линий опухолевых клеток было установлено, что все синтезированные нанолитовые структуры подавляли жизнеспособность опухолевых клеток (рис. 6, кривые AlOOH). Следует отметить, что синтезированные структуры имели довольно крупные размеры ($0,4\text{--}2,5\text{ мкм}$), не позволяющие им проникать внутрь клетки [27, 28].

Подавление жизнеспособности клеточных линий достигалось при использовании концентрации структур в питательной среде от 1 мг/мл . В меньшей концентрации нанолитовые структуры не оказывали цитотоксического действия и даже стимулировали рост клеток (рис. 6). При исследовании изменения pH клеточной среды в присутствии нанолитовых структур было установлено, что все синтезированные структуры практически в равной степени изменяли pH питательной среды. При концентрации наноструктур 5 мг/мл величина pH питательной среды увеличивается с увеличением времени выдержки по параболическому закону и

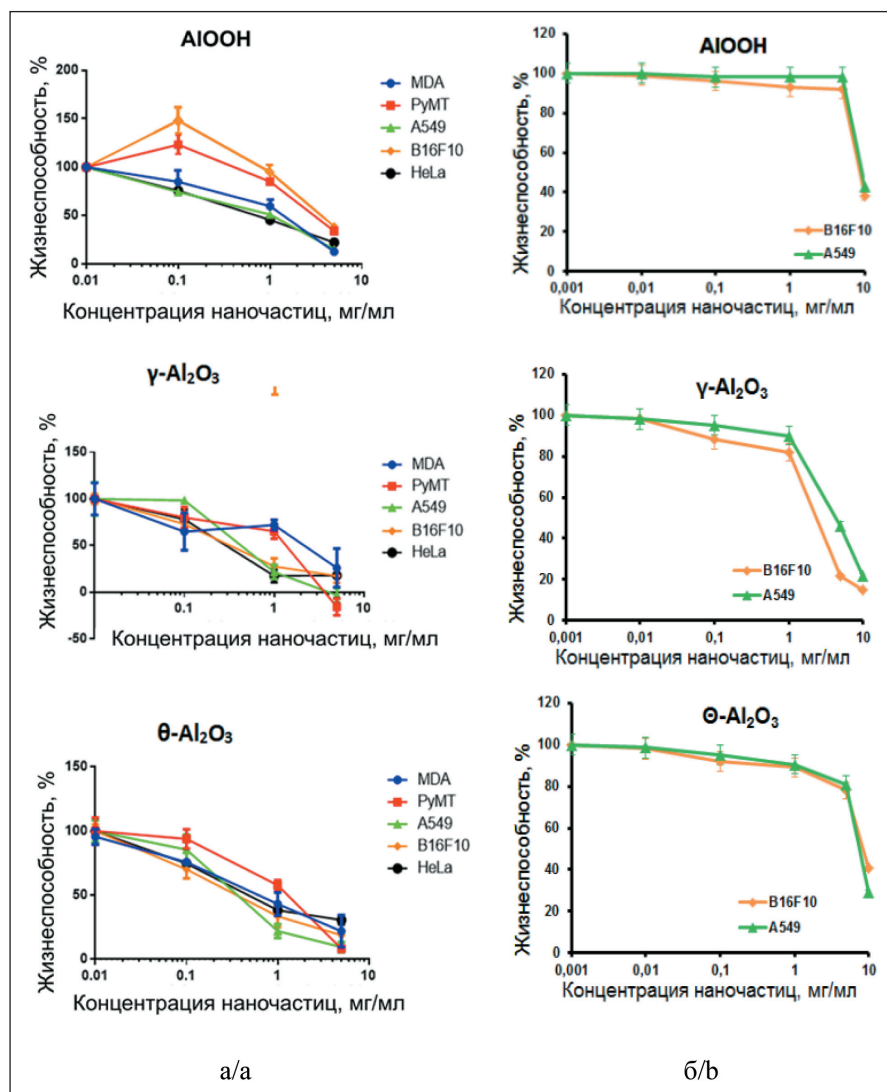


Рис. 6. Цитотоксичность нанолисто-
вых структур, определенная при по-
мощи тестов PrestoBlue™ Cell Viability
Reagent (а) и CellTiter-Glo (б)
Fig. 6. Cytotoxicity of nanosheet struc-
tures determined using the Presto-
Blue™ Cell Viability Reagent (a) and
CellTiter-Glo (b) tests

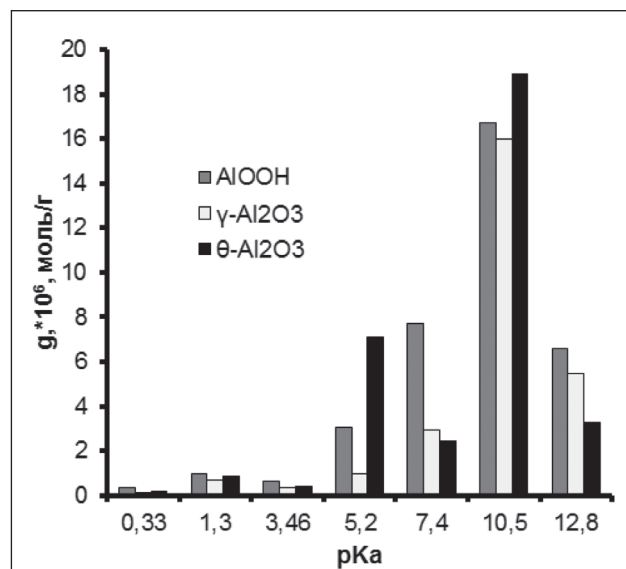


Рис. 7. Распределение кислотно-основных центров на по-
верхности нанолистовых структур
Fig. 7. Distribution of acid-base centers on the surface of nano-
sheet structures

выходит на постоянные значения pH через 8 ч экс-
позиции. Это свидетельствовало о том, что синтези-
рованные структуры в питательной среде проявляли
основные свойства. При этом в начальный момент
времени (до 40 мин) скорость роста pH была мак-
симальной в присутствии AlOOH и минимальной
в присутствии θ -Al₂O₃. После 40 мин экспозиции
скорость роста pH питательной среды становилась
максимальной в присутствии γ -Al₂O₃. Через
500 мин экспозиции AlOOH поднимал pH питатель-
ной среды до 9,04, γ -Al₂O₃ – до 9,12, θ -Al₂O₃ – до
9,05. Полученные данные коррелировали с данными
адсорбции индикаторов на поверхности синтезиро-
ванных структур (рис. 7).

Анализ результатов цитологических экспе-
риментов показывает, что наибольшее влияние
на жизнеспособность клеточных линий оказали
структуры γ -Al₂O₃. Такой эффект может реали-
зовываться за счет ряда механизмов или их со-
вокупности и включать повреждение клеточной
мембраны, недостаток питательных веществ за
счет их адсорбции на пористых структурах, депо-
ляризацию мембраны.

На поверхности всех полученных структур присутствовали основные брэнстедовские центры 3 типов: слабоосновные (близкие к нейтральным) с рК 7,4; основные центры средней силы с рК 10,5 и сильные основные центры с рК 12,8. Количество слабоосновных центров на поверхности было значительно больше у структур AlOOH ($7,7 \times 10^{-6}$ моль/г). Основные центры средней силы незначительно преобладали на поверхности $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ ($18,9 \times 10^{-6}$ моль/г) по сравнению с $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ($16,01 \times 10^{-6}$ моль/г) и AlOOH ($16,7 \times 10^{-6}$ моль/г). Сильноосновные центры преобладали на поверхности AlOOH ($6,6 \times 10^{-6}$ моль/г) по сравнению с $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ($5,4 \times 10^{-6}$ моль/г) и $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ ($3,2 \times 10^{-6}$ моль/г). Кислотных центров Брэнстеда на поверхности синтезированных структур было значительно меньше, чем основных. Стоит отметить, что на поверхности находились преимущественно слабокислотные центры в концентрациях: $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ – $7,09 \times 10^{-6}$ моль/г, $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ – $0,99 \times 10^{-6}$ моль/г и AlOOH – $3,05 \times 10^{-6}$ моль/г.

Обсуждение

Согласно полученным в исследовании данным, цитотоксический эффект нанолитовых структур прежде всего связан со свойствами их поверхности, такими как заряд, высокая удельная поверхность, адсорбционные и кислотно-основные свойства. Все вышеперечисленные свойства способны нарушить ионный баланс и кислотность микроокружения опухолевых клеток. Главное отличие кислотно-основных характеристик поверхности

синтезированных наноструктур заключалось в том, что отношение суммарного количества основных центров на поверхности структур $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ в 11 раз больше, чем кислотных. Основных центров AlOOH в 6,5 раза больше, чем кислотных, у $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ основных центров в 3 раза больше, чем кислотных. Это обстоятельство свидетельствует о том, что разница в противоопухолевом действии синтезированных наноструктур, представленная выше, может быть обусловлена способностью $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ проявлять более выраженные антацидные свойства, т.е. дольше нейтрализовать протоны, выделяемые опухолевыми клетками.

Таким образом, активность в отношении опухолевых клеток синтезированных структур обусловлена не только повышением величины рН микроокружения клеток, но и возможностью дольше поддерживать щелочность микроокружения за счет адсорбции протонов, выделяемых опухолевыми клетками.

Заключение

Проведенные исследования показали, что синтезированные нанолитовые структуры на основе оксидных и гидроксидных фаз алюминия подавляют жизнеспособность опухолевых клеток. Установлено, что наноструктуры $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ обладают наибольшей цитотоксичностью благодаря наибольшему показателю, выражающему отношение суммарного количества основных центров на поверхности структур к кислотным центрам.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Davis M.E., Chen Z.G., Shin D.M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Sep; 7(9): 771–82. doi: 10.1038/nrd2614.
2. Cho Y., Lee J.B., Hong J. Controlled release of an anti-cancer drug from DNA structured nano-films. *Sci Rep.* 2014 Feb 12; 4: 4078. doi: 10.1038/srep04078.
3. Shu Y., Shu D., Haque F., Guo P. Fabrication of pRNA nanoparticles to deliver therapeutic RNAs and bioactive compounds into tumor cells. *Nat Protoc.* 2013 Sep; 8(9): 1635–59. doi: 10.1038/nprot.2013.097.
4. Hauert S., Bhatia S.N. Mechanisms of cooperation in cancer nanomedicine: towards systems nanotechnology. *Trends Biotechnol.* 2014 Sep; 32(9): 448–55. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.06.010.
5. Mikhaylov G., Klimpel D., Schaschke N., Mikac U., Vizovisek M., Fonovic M., Turk V., Turk B., Vasiljeva O. Selective targeting of tumor and stromal cells by a nanocarrier system displaying lipidated cathepsin B inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014 Sep 15; 53(38): 10077–81. doi: 10.1002/anie.201402305.
6. Mikhaylov G., Mikac U., Magaeva A.A., Itin V.I., Naiden E.P., Psakhie I., Babes L., Reinheckel T., Peters C., Zeiser R., Bogyo M., Turk V., Psakhie S.G., Turk B., Vasiljeva O. Ferri-liposomes as an MRI-visible drug-delivery system for targeting tumours and their microenvironment. *Nat Nanotechnol.* 2011 Aug 7; 6(9): 594–602. doi: 10.1038/nnano.2011.112.
7. Kumar C.S., Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 Aug 14; 63(9): 789–808. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.008.
8. Verma A., Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small.* 2010 Jan; 6(1): 12–21. doi: 10.1002/smll.200901158.
9. Patra H.K., Dasgupta A.K. Cancer cell response to nanoparticles: criticality and optimality. *Nanomedicine.* 2012 Aug; 8(6): 842–52. doi: 10.1016/j.nano.2011.10.009.
10. Petros R.A., DeSimone J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Aug; 9(8): 615–27. doi: 10.1038/nrd2591.
11. Li Y., Tian Y., Nie G. Antineoplastic activities of $\text{Gd@C}(\text{OH})$ nanoparticles: tumor microenvironment regulation. *Sci China Life Sci.* 2012 Oct; 55(10): 884–90. doi: 10.1007/s11427-012-4387-7.
12. Li M., Ren L., Li L., He P., Lan G., Zhang Y., Yang K. Cytotoxic Effect on Osteosarcoma MG-63 Cells by Degradation of Magnesium. *J Materials Scien Technol.* 2014; 30(9): 888–93. doi: 10.1016/j.jmst.2014.04.010.
13. Zhang Y., Ren L., Li M., Lin X., Zhao H., Yang K. Preliminary study on cytotoxic effect of biodegradation of magnesium on cancer cells. *J Materials Scien Technol.* 2012; 28(9): 769–72. doi: 10.1016/S1005-0302(12)60128-5.
14. Sonveaux P., Végran F., Schroeder T., Wergin M.C., Verrax J., Rabbani Z.N., De Saedeleer C.J., Kennedy K.M., Diepart C., Jordan B.F., Kelley M.J., Gallez B., Wahl M.L., Feron O., Dewhirst M.W. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 2008 Dec; 118(12): 3930–42. doi: 10.1172/JCI36843.
15. Gillies R.J., Raghunand N., Garcia-Martin M.L., Gatenby R.A. pH imaging. A review of pH measurement methods and applications in cancers. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2004; 23(5): 57–64. doi: 10.1109/memb.2004.1360409.
16. De Milito A., Canese R., Marino M.L., Borghi M., Iero M., Villa A., Venturi G., Lozupone F., Iessi E., Logozzi M., Della Mina P., Santinami M., Rodolfo M., Podo F., Rivoltini L., Fais S. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer.* 2010 Jul 1; 127(1): 207–19. doi: 10.1002/ijc.25009.
17. Spugnini E.P., Buglioni S., Carocci F., Francesco M., Vincenzi B., Fanciulli M., Fais S. High dose lansoprazole combined with metronomic chemotherapy: a phase I/II study in companion animals with spontaneously occurring tumors. *J Transl Med.* 2014 Aug 21; 12: 225. doi: 10.1186/s12967-014-0225-y.
18. Meng H., Mai W.X., Zhang H., Xue M., Xia T., Lin S., Wang X., Zhao Y., Ji Z., Zink J.I., Nel A.E. Codelivery of an optimal drug/siRNA combination using mesoporous silica nanoparticles to overcome drug resistance in breast cancer in vitro and in vivo. *ACS Nano.* 2013; 7(2): 994–1005. doi: 10.1021/nn3044066.
19. Khawar I.A., Kim J.H., Kuh H.J. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. *J Control Release.* 2015 Mar 10; 201: 78–89. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.018.
20. Kim S.S., Rait A., Kim E., Pirollo K.F., Chang E.H. A tumor-targeting p53 nanodelivery system limits chemoresistance to temozolomide

prolonging survival in a mouse model of glioblastoma multiforme. *Nano-medicine*. 2015 Feb; 11(2): 301–11. doi: 10.1016/j.nano.2014.09.005.

21. *Kanamala M., Wilson W.R., Yang M., Palmer B.D., Wu Z.* Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review. *Biomaterials*. 2016 Apr; 85: 152–67. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.061.

22. *Taylor S., Spugnini E.P., Assaraf Y.G., Azzarito T., Rauch C., Fais S.* Microenvironment acidity as a major determinant of tumor chemoresistance: Proton pump inhibitors (PPIs) as a novel therapeutic approach. *Drug Resist Updat*. 2015 Nov; 23: 69–78. doi: 10.1016/j.drug.2015.08.004.

23. *Walsh M., Fais S., Spugnini E.P., Harguindeguy S., Abu Izneid T., Scacco L., Williams P., Allegrucci C., Rauch C., Omran Z.* Proton pump inhibitors for the treatment of cancer in companion animals. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 Sep 4; 34(1): 93. doi: 10.1186/s13046-015-0204-z.

24. *Bakina O.V., Svarovskaya N.V., Glazkova E.A., Lozhkomoev A.S.* Flower-shaped ALOOH nanostructures synthesized by the reaction of an

AlN/Al composite nanopowder in water. *Advanced Powder Technology*. 2015; 26(6): 1512–19. doi: 10.1186/s13046-015-0204-z.

25. *Lerner M.I., Pervikov A.V., Lozhkomoev A.S., Bakina O.V.* Synthesis of Al nanoparticles and Al/AlN composite nanoparticles by electrical explosion of aluminum wires in argon and nitrogen. *Advanced Powder Technology*. 2016; 29(5): 307–314. doi: 10.1016/j.powtec.2016.04.005.

26. *Tsybulya S.V., Kryukova G.N.* Nanocrystalline transition aluminas: Nanostructure and features of x-ray powder diffraction patterns of low-temperature Al₂O₃ polymorphs. *Physical Review B*. 2008; 77(2): 024112–024125. doi: 10.1103/PhysRevB.77.024112.

27. *Zhang S., Li J., Lykotrafitis G., Bao G., Suresh S.* Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv Mater*. 2009; 21: 419–424. doi: 10.1002/adma.200801393.

28. *Jiang W., Kim B.Y., Rutka J.T., Chan W.C.* Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol*. 2008 Mar; 3(3): 145–50. doi: 10.1038/nnano.2008.30.

Поступила/Received 04.03.2021
Принята в печать/Accepted 18.06.2021

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ложкомоев Александр Сергеевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: asl@ispms.tsc.ru. Researcher ID (WOS): O-3024-2013. Author ID (Scopus): 26664893000. ORCID: 0000-0002-1564-0858.

Бакина Ольга Владимировна, кандидат химических наук, научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 9002-1344. Researcher ID (WOS): A-3184-2014. Author ID (Scopus): 57200860509.

Казанцев Сергей Олегович, младший научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 25290738. Researcher ID (WOS): A-9259-2019. Author ID (Scopus): 56985661000. ORCID: 0000-0002-1728-7947.

Иванова Людмила Юрьевна, младший научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия). AuthorID (РИНЦ): 745429. Researcher ID (WOS): E-5777-2014. Author ID (Scopus): 55793393700. ORCID: 0000-0003-1953-307X.

Августинович Александра Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 2952-6119. Researcher ID (WOS): D-6062-2012. Author ID (Scopus): 56392965300. ORCID: 0000-0001-7301-7581.

Афанасьев Сергей Геннадьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением абдоминальной онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: afanasievsg@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 9206-3037. Researcher ID (WOS): D-2084-2012. Author ID (Scopus): 21333316900. ORCID: 0000-0002-4701-0375.

Спирина Людмила Викторовна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 1336-8363. Researcher ID (WOS): A-7760-2012. Author ID (Scopus): 36960462500. ORCID: 0000-0002-5269-736X.

Добродеев Алексей Юрьевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения абдоминальной онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 5510-4043. AuthorID (РИНЦ): 312703. ORCID: 0000-0002-2748-0644. Researcher ID (WOS): B-5644-2017. Author ID (Scopus): 24832974200.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ложкомоев Александр Сергеевич: литературный обзор, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Бакина Ольга Владимировна: разработка концепции статьи, статистическая обработка, составление черновика рукописи.

Казанцев Сергей Олегович: сбор и обработка данных.

Иванова Людмила Юрьевна: сбор и обработка данных.

Августинович Александра Владимировна: разработка концепции научной работы, составление черновика рукописи.

Афанасьев Сергей Геннадьевич: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Спирина Людмила Викторовна: сбор и обработка данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Добродеев Алексей Юрьевич: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания ИФПМ СО РАН, тема номер FWRW-2019-0033.

ABOUT THE AUTHORS

Aleksandr S. Lozhkomoev, PhD, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: asl@ispms.tsc.ru. Researcher ID (WOS): O-3024-2013. Author ID (Scopus): 26664893000. ORCID: 0000-0002-1564-0858.

Olga V. Bakina, DSc, Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): A-3184-2014. Author ID (Scopus): 57200860509.

Sergey O. Kazantsev, Junior Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): A-9259-2019. Author ID (Scopus): 56985661000. ORCID: 0000-0002-1728-7947.

Lyudmila Yu. Ivanova, Junior Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): E-5777-2014. Author ID (Scopus): 55793393700. ORCID: 0000-0003-1953-307X.

Aleksandra V. Avgustinovich, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Abdominal Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): D-6062-2012. Author ID (Scopus): 56392965300. ORCID: 0000-0001-7301-7581.

Sergey G. Afanasyev, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Abdominal Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID: D-2084-2012. Author ID (Scopus): 21333316900. ORCID: 0000-0002-4701-0375.

Lyudmila V. Spirina, DSc, Senior Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): A-7760-2012. Author ID (Scopus): 36960462500.

Alexey Yu. Dobrodeev, MD, DSc, Leading Researcher, Department of Abdominal Oncology, Oncology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: dobrodeev@oncology.tomsk.ru. ORCID: 0000-0002-2748-0644. Researcher ID (WOS): B-5644-2017. Author ID (Scopus): 24832974200.

AUTHOR CONTRIBUTION

Aleksandr S. Lozhkomoev: literature review, study analysis, critical revision of manuscript for important intellectual content.

Olga V. Bakina: study conception, statistical analysis, drafting of the manuscript.

Sergey O. Kazantsev: data collection and analysis.

Lyudmila Y. Ivanova: data collection and analysis.

Aleksandra V. Avgustinovich: study conception, drafting of the manuscript.

Sergey G. Afanasyev: study analysis, critical revision of manuscript for important intellectual content.

Lyudmila V. Spirina: data collection and analysis, critical revision of manuscript for important intellectual content.

Alexey Yu. Dobrodeev: study analysis, critical revision of manuscript for important intellectual content.

Funding

The work was carried out within the framework of the state assignment of the ISPMS SB RAS (FWRW-2019- 0033).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.