

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НИЗКОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР ОКСИДА АЛЮМИНИЯ ДЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

М.С. Коровин^{1,2}, А.Н. Фоменко^{1,2}, О.В. Бакина^{1,2}, М.И. Лернер^{1,2}

Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения Российской академии наук, г. Томск¹

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск², 634055, г. Томск, пр. Академический, 2/4. E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru¹

Аннотация

Введение. В последнее время наноразмерные материалы привлекают внимание исследователей в связи с их потенциальной возможностью использования в медицине. Физические механизмы взаимодействия наноструктур с опухолевыми клетками позволят разработать новые методы борьбы с опухолевыми заболеваниями. Последние исследования показывают, что такие физико-химические характеристики наноструктур, как форма и размер, являются важным фактором их биологической активности и токсичности. **Цель исследования** – выявление роли формы наноструктур оксида алюминия при их токсическом воздействии на опухолевые клетки. **Материал и методы.** С использованием наночастиц алюминия синтезированы положительно заряженные низкоразмерные структуры на основе оксида алюминия, обладающие различной формой: агломераты нанопластинок, нанопластинки, конусовидные наноагрегаты. Полученные частицы были охарактеризованы методами просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции. Цитотоксическое действие структур определяли при помощи МТТ-теста на культурах базальных клеток HeLa, A549, MDA и РумТ. **Результаты.** Показано, что наиболее выраженным токсическим действием по отношению к исследованным линиям клеток обладают агломераты нанопластинок оксида алюминия, в то время как нанопластинки и конусовидные наноагрегаты не токсичны. **Заключение.** Токсическое действие агломератов нанопластинок связано с их формой, а именно с наличием у них множественных краев и дефектов поверхности.

Ключевые слова: оксид алюминия, наноструктуры, агломераты нанопластинок, нанопластины, конусовидные наноагрегаты, МТТ-тест, опухолевые клетки, токсичность.

Нanomатериалы находят своё применение для обнаружения и разрушения опухолевых клеток [1, 2]. Преимущество наночастиц обусловлено их уникальными свойствами, такими как высокая поверхностная энергия, устойчивая сорбция биомолекул, изменение физико-химических свойств под действием физических полей, малые размеры, сопоставимые с биомолекулами, наличие магнитных свойств и биосовместимость. Эти особенности открывают новые перспективы применения нанопрепаратов в терапии онкологических заболеваний. Различные исследования посвящены использованию наноматериалов различного химического состава для направленного воздействия на клетки [3]. Особый интерес представляют системы на основе магнитных наночастиц [4] и частиц оксидов металлов, таких как алюминий [5] или кремний [6, 7], обладающих низкой токсичностью и развитой поверхностью.

Одним из перспективных материалов является наноструктурный оксид алюминия (НОА), характеризующийся невысокой цитотоксичностью, простыми методами синтеза и разнообразием структурных форм. Оксиды алюминия нанометро-

вых размеров благодаря развитой поверхности и высокой способности к сорбции могут осуществлять функцию антигенного депо, а также неспецифически усиливать фагоцитоз и использоваться в векторных вакцинах [8]. Наноструктурный оксид алюминия находит применение в процессах разделения белковых молекул при помощи фильтрации [9], адсорбции и деградации молекул TNF- α (tumor necrosis factor), выделяющихся при инфицировании, поступлении в организм бактериальных эндотоксинов [10]. Частицы НОА способны проникать через мембраны клеток линий L929 и BJ [11], а при воздействии на клетки линий VERO, HEP 2, MDA MB 231 и A549 с ростом концентрации НОА от 2 до 500 мкг/мл наблюдалось снижение скорости пролиферации клеток [12]. Заметно меньшее цитотоксическое воздействие оказывали частицы НОА со средним размером 10 нм по сравнению с наночастицами размером около 50 нм [13]. В случае TiO₂ большей цитотоксичностью обладали наноструктуры дендритной и веретенообразной формы по сравнению со сферическими [14]. При этом у частиц дендритной формы цитотоксичность связана с количеством граней. Поверхность на-

ночастиц оксидов является активной при наличии большого количества углов и краев, т.е. дефектов на поверхности частиц. На примере структур ZnO концентрация поверхностных дефектов снижалась в ряду: нанопластины, наноленты, агрегаты наночастиц [15]. Поверхностные дефекты приводили к возникновению окислительно-восстановительных реакций с адсорбированными молекулами воды с образованием гидроксильного радикала и супероксид анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$). В результате этих реакций в живых клетках индуцировался окислительный стресс, вызываемый генерацией H_2O_2 [16]. Описанный механизм генерации H_2O_2 может также реализовываться при воздействии НОА различной формы на нормальные и опухолевые клетки, что может приводить к подавлению их жизнедеятельности. С другой стороны, одним из возможных механизмов подавления пролиферации клеток НОА может служить адсорбция молекул и ионов из микроокружения клеток на поверхности наноструктур [17].

Целью исследования явилось определение роли формы НОА при их воздействии на опухолевые клетки линий HeLa, A549, MDA и PyMT. Для выявления цитотоксичности наночастиц с различной формой были синтезированы наноструктуры оксида алюминия, обладающие гранями и краями, а также изучено их цитотоксическое действие на клетки.

Материал и методы

Для синтеза наноструктурного оксида алюминия (НОА) различной формы в качестве прекурсора использовали нанопорошок алюминия, полученный электрическим взрывом алюминиевой проволоки в атмосфере аргона [18]. Порошок алюминия был предоставлен компанией «Передовые порошковые технологии» (г. Томск, Россия). Окислением нанопорошка алюминия дистиллированной водой при 60°C и атмосферном давлении был получен НОА в виде агломератов нанолентов [19]. Гидротермальной обработкой синтезированных агломератов нанолентов в автоклаве гидродинамического синтеза PTE 05L (Weihai Global Chemical Machinery MFG Co., LTD, Китай) в течение 6 ч при 200°C был синтезирован НОА в виде нанопластинок. Окислением нанопорошка алюминия водяным паром в эксикаторе при постоянной влажности 80 % и температуре 60°C был получен НОА в форме конусовидных агрегатов [20]. Форму и размер синтезированных структур исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (JEOL JEM-2100, Япония) [21]. Фазовый состав структур определяли при помощи дифрактометра (XRD-6000, Shimadzu, Япония, Cu-K α излучение, длина волны 1.54056 Å) [22], удельную поверхность определяли методом тепловой десорбции азота (Сорбтомер М, Россия) [23] и рассчитывали по методу БЭТ (Брунауэра–Эммета–Теллера). Заряд поверхности структур оценивали по их ξ -потенциалу (Zetasizer Nano ZSP, Malvern, Великобритания).

Цитологические исследования проводили на базе Института Джозефа Стефана (г. Любляна, Словения). Цитотоксическое действие НОА определяли при помощи МТТ-теста [24] на культурах базальных клеток альвеолярной аденокарциномы человека A549, культурах клеток рака шейки матки человека HeLa, культурах аденокарциномы лёгкого человека MDA, предоставленных Американской коллекцией типовых культур (ATCC), и на культурах PyMT клеток – первичных клетках, выделенных из опухоли мышей. Конечная концентрация клеток составила 1×10^4 клеток/100 мкл в лунке 96-луночного микропланшета. Клетки A549 и HeLa культивировали в виде монослоя в среде MEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Nucclone, Великобритания) и 1 % пенициллин/стрептомицина (Биолот, Россия). Культивирование клеток проводили при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 5 % CO_2 в течение 24 ч. После инкубирования питательную среду осторожно удаляли и два раза промывали клетки раствором натрий-фосфатного буфера Дульбекко DPBS (Lonza, Швейцария). Для определения цитотоксичности использовали суспензии наноструктур в клеточной среде в концентрациях от 0,001 мг/мл до 10 мг/мл. Клетки с НОА инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 5 % CO_2 в течение 24 ч. Для проведения МТТ-теста питательную среду удаляли и два раза промывали клетки раствором DPBS. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл питательной среды и по 10 мкл раствора МТТ 3–4,5-диметилтиазол-2,5 дифенил тетразолия бромид (Sigma-Aldrich, США). Инкубирование с раствором МТТ проводили в течение 2 ч при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 5 % CO_2 . По окончании инкубирования питательную среду осторожно удаляли и добавляли в каждую лунку по 100 мкл диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США) для растворения кристаллов формазана. Через 15 мин определяли оптическую плотность на микропланшетном спектрофотометре TecanInfiniteM1000 PRO (Tecan, Австрия) при длине волны 570 нм. Далее вычисляли долю живых клеток (C_L , %) по формуле

$$C_L = \frac{A_s}{A_c} \times 100 \%$$

где A_s – оптическая плотность исследуемого образца, A_c – оптическая плотность контрольного образца.

Контрольной группой служили клетки без добавления частиц НОА. Для статистической обработки данных использовались параметрические методы с уровнем достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При окислении водой нанопорошка алюминия (рис. 1а) формируются пористые структуры (НОА), представляющие собой агломераты нанолентов

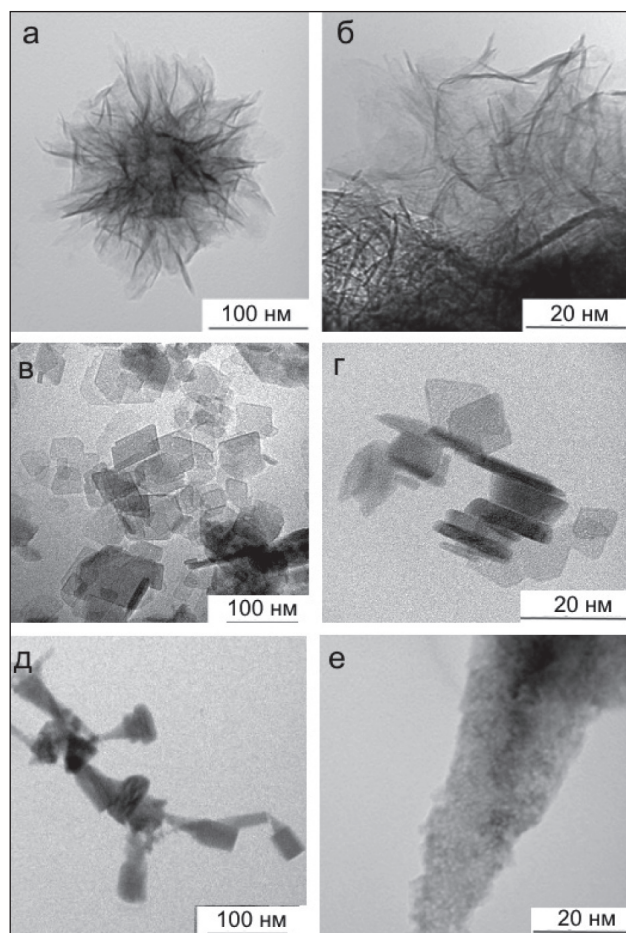


Рис. 1. Электронно-микроскопические изображения частиц, полученных окислением в воде (а, б), при гидротермальной обработке (в, г), во влажном воздухе (д, е)

в фазе бемита, кристаллической модификации оксида алюминия, соответствующей химической формуле AlOOH , элементарная ячейка имеет состав $\text{Al}_4\text{O}_4(\text{OH})_4$, что соответствует 4 молекулам AlOOH . Образующиеся агломераты обладают практически сферической формой с удельной поверхностью $300 \text{ м}^2/\text{г}$ и размером $0,5\text{--}3 \text{ мкм}$ и состоят из отдельных листов толщиной $5\text{--}10 \text{ нм}$ и планарным размером около $150\text{--}300 \text{ нм}$ (рис. 1б). Агломераты нанолитов имеют развитую поверхность и множество краев, образованных отдельными нанолитами. При обработке синтезированных агломератов нанолитов в гидротермальных условиях образуются гладкие нанопластины бемита размером $40\text{--}100 \text{ нм}$ и толщиной $4\text{--}15 \text{ нм}$ (рис. 1б, в). Удельная поверхность структур составила $124 \text{ м}^2/\text{г}$. При окислении нанопорошка алюминия парами воды образуются конусовидные агрегаты в фазе байерита $\text{Al}(\text{OH})_3$ с явно выраженной кристаллизацией. Элементарная ячейка имеет состав $4\text{Al}(\text{OH})_3$. Размер агрегатов достигает 100 нм (рис. 1г, д), удельная поверхность $16 \text{ м}^2/\text{г}$.

Все синтезированные образцы имеют положительный заряд поверхности, противоположный заряду клеток, что может повысить их биоактивность за счет взаимного притяжения и довольно крупных размеров, которые не позволяют им проникать внутрь клеток [25], соответственно, их токсический эффект будет, прежде всего, зависеть от формы их поверхности. Наименьший токсический эффект HeLa клеток во всём диапазоне исследуемых концентраций оказали конусовидные агрегаты и нанопластинки (рис. 2а). Их слабое токсическое действие было также отмечено для РумТ клеток (рис. 2б). Концентрация НОА не влияла на количество живых клеток.

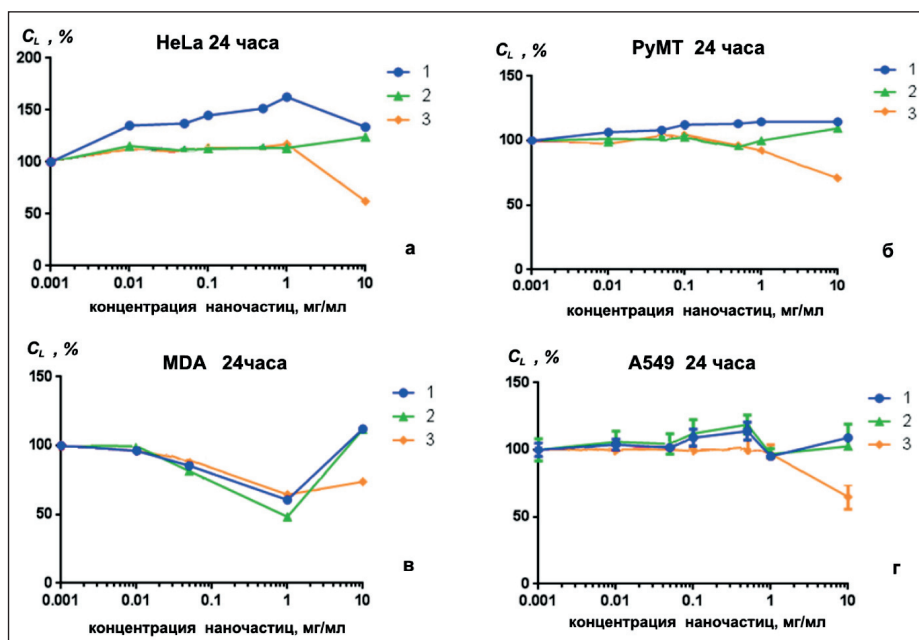


Рис. 2. Влияние низкоразмерных структур оксида алюминия на клетки A549 (а), клетки HeLa (б), клетки MDA (в), клетки РумТ (г): 1 – нанопластины; 2 – конусовидные агрегаты; 3 – агломераты нанолитов

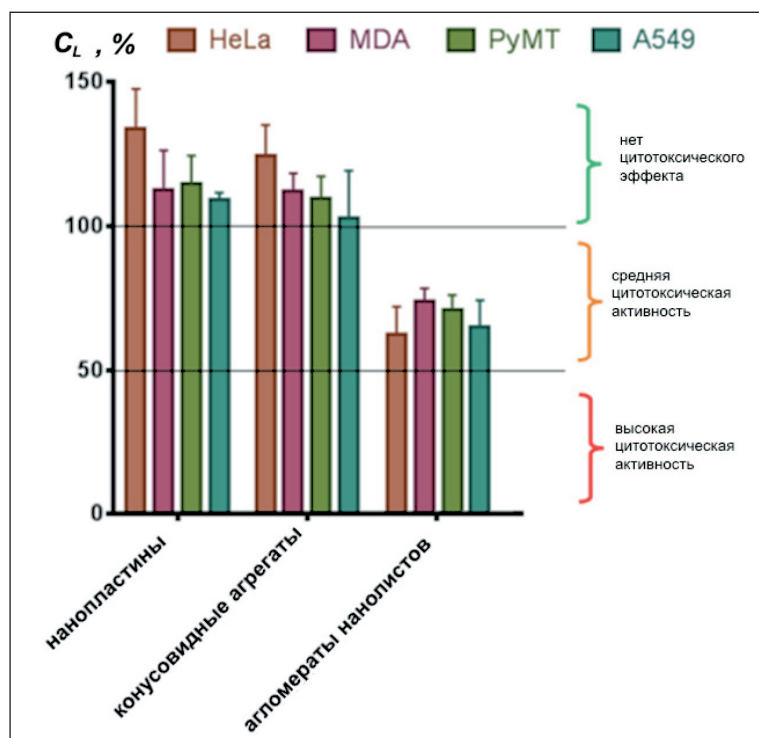


Рис. 3. Жизнеспособность клеток (24 ч, 10 мг/мл)

Наноструктуры вне зависимости от дефектности поверхности оказали токсическое действие на клетки линии MDA (рис. 2в) в диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мг/мл. Количество жизнеспособных клеток было снижено на 20–30 %. Токсическое действие НОА заметно уменьшилось при концентрации образцов 10 мг/мл. Это может быть связано с каскадом окислительно-восстановительных реакций, индуцирующих окислительный стресс в живых клетках [26], активирующий оксидант-чувствительные факторы транскрипции, которые, в свою очередь, приводят к устойчивости опухолевых клеток к действию антиоксидантов [27]. Нанопластинки и конусовидные агрегаты оказали слабое токсическое действие на клетки линии A549 (рис. 2г) во всем диапазоне концентраций. По сравнению с другими НОА агломераты нанолентов оказали токсическое действие на все линии клеток в диапазоне концентраций 1–10 мг/мл (рис. 2 а–г). Гистограммы, наглядно демонстрирующие величину токсического действия синтезированных НОА при концентрации 10 мг/мл, представлены на рис. 3.

Нанопластинки и конусовидные агрегаты нетоксичны для исследованных линий клеток. Наибольший токсический эффект оказали агломераты нанолентов, не подавляя жизнеспособность клеток полностью. По этой причине их действие на исследованные линии клеток можно определить как среднетоксическое. За счёт большого количества граней агломераты нанолентов обладают большим числом поверхностных дефектов по сравнению с другими наноструктурами. Вероятно, эти центры служат сосредоточением генерации супероксид-

ных радикалов, гидроксильных радикалов и пероксида водорода и являются определяющими в индуцировании токсичности [19].

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что цитотоксичность наноструктур на основе оксида алюминия наряду с другими факторами определяется их формой, а конкретно наличием и количеством краев и граней у наноструктур. При исследовании воздействия наноструктур на линии опухолевых клеток A549, HeLa, MDA, PyMT показано, что с увеличением числа краев у наноструктур их токсическое действие усиливается. Нанопластинки и конусовидные наноагрегаты не являются токсичными, в то время как агломераты нанолентов со множественными краями в диапазоне концентраций 1–10 мг/мл оказывают среднетоксическое действие. Полученные данные поддерживают ранее предложенный в литературе механизм подавления жизнедеятельности клеток вследствие образования перекиси водорода на поверхностных дефектах наноструктур. Дальнейшее изучение влияния формы частиц на клетки приведет к созданию новых соединений с противоопухолевой активностью, использование которых позволит повысить эффективность лечения онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Грант № 14-23-00096). Наночастицы алюминия получены в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rao W., Wang H., Han J., Zhao S., Dumbleton J., Agarwal P., Zhang W., Zhao G., Yu J., Zynger D., Lu X., He X. Chitosan-Decorated Doxorubicin-Encapsulated Nanoparticle Targets and Eliminates Tumor Reinitiating Cancer Stem-like Cells. *ACS Nano*. 2015 Jun 23; 9 (6): 5725–40. doi: 10.1021/nn506928p.
2. Min Y., Caster J.M., Eblan M.J., Wang A.Z. Clinical Translation of Nanomedicine. *Chemical Review*. 2015; 115: 11147–11190. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00116.
3. Gowda R., Jones N.R., Banerjee S., Robertson G.P. Use of Nanotechnology to Develop Multi-Drug Inhibitors For Cancer Therapy. *J Nanomedicine & Nanotechnology*. 2013; 184–189. doi: 10.4172/2157-7439.1000184.
4. Mikhaylov G., Mikac U., Magaeva A.A., Itin V.I., Naiden E.P., Psakhie I., Bogoyo M. 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.
5. Xifré Pérez E., Guaita-Esteruelas S., Baranowska M., Marsal L.F. In Vitro Biocompatibility of Surface-Modified Porous Alumina Particles for HepG2 Tumor Cells: Toward Early Diagnosis and Targeted Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Aug 26; 7 (33): 18600–8. doi: 10.1021/acsami.5b05016.
6. Shahabadi N., Falsafi M., Mansouri K. Improving antiproliferative effect of the anticancer drug cytarabine on human promyelocytic leukemia cells by coating on Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 May 1; 141: 213–22. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.01.054.
7. Cheng Y.J., Luo G.F., Zhu J.Y., Xu X.D., Zeng X., Cheng D.B., Li Y.M., Wu Y., Zhang X.Z., Zhuo R.X., He F. Enzyme-Induced and Tumor-Targeted Drug Delivery System Based on Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 May 6; 7 (17): 9078–87. doi: 10.1021/acsami.5b00752.
8. Singh S., Shi T., Duffin R., Albrecht C., van Berlo D., Hohn D., Fubini B., Martra G., Fenoglio I., Borm P.J., Schins R.P. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Jul 15; 222 (2): 141–51.
9. Xuebin K., Yiming H., Dargaville T.R., Yiqun F., Zhanfeng C., Huaiyong Z. Modified alumina nanofiber membranes for protein separation. *Separation and Purification Technology*. 2013; 120: 239–244.
10. Paillex M., Boudard D., Pourchez J., Forest V., Grosseau P., Cottier M. New insight into artifactual phenomena during in vitro toxicity assessment of engineered nanoparticles: study of TNF- α adsorption on alumina oxide nanoparticle. *Toxicol In Vitro*. 2013 Apr; 27 (3): 1049–56. doi: 10.1016/j.tiv.2013.01.022.
11. Radziun E., Dudkiewicz W.J., Książek I., Nowak K., Anuszevska E.L., Kunicki A., Olszyna A., Zabkowski T. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicol In Vitro*. 2011 Dec; 25 (8): 1694–700. doi: 10.1016/j.tiv.2011.07.010.
12. Arul Prakash F., Dushendra Babu G.J., Lavanya M., Vidhya K.S., Devasena T. Toxicity Studies of Aluminium Oxide Nanoparticles in Cell Lines. *Int J Nanotechnol Applications*. 2011; 5: 99–107.
13. Zhang Q.L., Li M.Q., Ji J.W., Gao F.P., Bai R., Chen C.Y., Wang Z.W., Zhang C., Niu Q. In vivo toxicity of nano-alumina on mice neurobehavioral profiles and the potential mechanisms. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Jan-Mar; 24 (1 Suppl): 23S–29S.
14. Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang T., Ma Y., Jia G., Gao Y., Li B., Sun J., Li Y., Jiao F., Zhao Y., Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*. 2007 Jan 30; 168 (2): 176–85.
15. Ramani M., Ponnusamy S., Muthamizhchelvan C., Marsili E. Amino acid-mediated synthesis of zinc oxide nanostructures and evaluation of their facet-dependent antimicrobial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 May 1; 117: 233–9. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.017.
16. Padmavathy N., Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles – an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2008; 9 (3): 035004–035010.
17. Tsukanov A.A., Psakhie S.G. Energy and structure of bonds in the interaction of organic anions with layered double hydroxide nanosheets: A molecular dynamics study. *Sci Rep*. 2016 Jan 28; 6: 19986. doi: 10.1038/srep19986.
18. Lerner M.I., Glazkova E.A., Lozhkomoev A.S., Svarovskaya N.V., Bakina O.V., Pervikov A.V., Psakhie S.G. Synthesis of Al nanoparticles and Al/AlN composite nanoparticles by electrical explosion of aluminum wires in argon and nitrogen. *Powder Technology*. 2016; 295: 307–314.
19. Lozhkomoev A.S., Glazkova E.A., Bakina O.V., Lerner M.I., Gotman I., Gutmanas E.Y., Kazantsev S.O., Psakhie S.G. Synthesis of core-shell AlOOH hollow nanospheres by reacting Al nanoparticles with water. *Nanotechnology*. 2016 May 20; 27 (20): 205603. doi: 10.1088/0957-4484/27/20/205603.
20. Lozhkomoev A.S., Glazkova E.A., Svarovskaya N.V., Bakina O.V., Kazantsev S.O., Lerner M.I. Specific features of aluminum nanoparticle water and wet air oxidation. *AIP Conference Proceedings*. 2015; 1683: 020128.
21. Шиммель Г. Методика электронной микроскопии. М.: Мир. 1972; 300.
22. Хохлов А.Ф., Попов П.В. Физика твердого тела. М.: Высшая школа. 2001; 484.
23. ГОСТ 23401-90. Порошки металлические. Катализаторы и носители. Определение удельной поверхности. М.: Изд-во стандартов; 12.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16; 65 (1–2): 55–63.
25. Zhang S., Li J., Lykotrafitis G., Bao G., Suresh S. Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv Mater*. 2009; 21: 419–424.
26. Alarifi S., Ali D., Alkahtani S. Nanoalumina induces apoptosis by impairing antioxidant enzyme systems in human hepatocarcinoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2015 May 25; 10: 3751–60. doi: 10.2147/IJN.S82050.
27. Pani G., Galeotti T., Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Jun; 29 (2): 351–78. doi: 10.1007/s10555-010-9225-4.

Поступила 14.08.16

Принята в печать 30.10.16

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Коровин Матвей Сергеевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения Российской академии наук (ИФПМ СО РАН), Национальный исследовательский Томский политехнический университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: msk@ispms.tsc.ru.

Фоменко Алла Николаевна, инженер, Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения Российской академии наук (ИФПМ СО РАН), Национальный исследовательский Томский политехнический университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: alserova@ispms.tsc.ru. SPIN-код: 4435-8053.

Бакина Ольга Владимировна, кандидат химических наук, научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения Российской академии наук (ИФПМ СО РАН), Национальный исследовательский Томский политехнический университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru. SPIN-код: 9002-1344.

Лернер Марат Израильевич, доктор технических наук, профессор, заведующий лабораторией, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирского отделения Российской академии наук (ИФПМ СО РАН), Национальный исследовательский Томский политехнический университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: lerner@ispms.tsc.ru. SPIN-код: 3247-9864.

ASSESSMENT OF CYTOTOXIC EFFECT OF LOW-DIMENSIONAL ALUMINUM OXIDE STRUCTURES ON TUMOR CELLS

M.S. Korovin^{1,2}, O.V. Bakina^{1,2}, A.N. Fomenko^{1,2}, M.I. Lerner^{1,2}

Institute of Strength Physics and Materials Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia²

2/4, pr. Akademicheskii, 634021-Tomsk, Russia. E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru¹

Abstract

Nano-dimensional materials have recently attracted much attention of researchers with respect of their potential role in medicine. Physical mechanisms of interaction of nanostructures with tumor cells will help to develop new approaches to treatment of cancer. Recent studies have shown that the physicochemical properties of nanostructures, such as shape and size, are the important factors of their biological activity and toxicity. **The purpose of the study** was to determine the role of the shape of aluminum oxide nanostructures in their toxic effects on tumor cells. **Material and methods.** Based on aluminum oxide phases, positively charged low-dimensional structures having different shapes (agglomerates of nanosheets, nanoplates, and cone-shaped nanoaggregates) were synthesized with the help of aluminum nanoparticles. The resulting particles were characterized by transmission electron microscopy and X-ray diffraction. The toxicity effect of low-dimensional aluminum oxide structures was assessed by MTT assay using A549, HeLa, MDA and PyMT cell lines. **Results.** Agglomerates of nanosheets were shown to have the most pronounced toxic effect on the examined cell lines, while nanoplates and cone-shaped nanoaggregates were non-toxic. **Conclusion.** The toxic effect of agglomerates of nanosheets is correlated with their shape, mainly the presence of multiple edges.

Key words: aluminum oxide, nanostructures, agglomerates of nanosheets, nanoplates, cone-shaped nanoaggregates, MTT assay, tumor cells, toxicity.

REFERENCES

1. Rao W., Wang H., Han J., Zhao S., Dumbleton J., Agarwal P., Zhang W., Zhao G., Yu J., Zynger D., Lu X., He X. Chitosan-Decorated Doxorubicin-Encapsulated Nanoparticle Targets and Eliminates Tumor Reinitiating Cancer Stem-like Cells. *ACS Nano*. 2015 Jun 23; 9 (6): 5725–40. doi: 10.1021/nn506928p.
2. Min Y., Caster J.M., Eblan M.J., Wang A.Z. Clinical Translation of Nanomedicine. *Chemical Review*. 2015; 115: 11147–11190.
3. Gowda R., Jones N.R., Banerjee S., Robertson G.P. Use of Nanotechnology to Develop Multi-Drug Inhibitors For Cancer Therapy. *J Nanomedicine & Nanotechnology*. 2013; 184–189. doi: 10.4172/2157-7439.1000184.
4. Mikhaylov G., Mikac U., Magaeva A. A., Itin V.I., Naiden E.P., Psakhye I., Bogvo M. 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.
5. Xifré Pérez E., Guaita-Esteruelas S., Baranowska M., Marsal L.F. In Vitro Biocompatibility of Surface-Modified Porous Alumina Particles for HepG2 Tumor Cells: Toward Early Diagnosis and Targeted Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Aug 26; 7 (33): 18600–8. doi: 10.1021/acsami.5b05016.
6. Shahabadi N., Falsafi M., Mansouri K. Improving antiproliferative effect of the anticancer drug cytarabine on human promyelocytic leukemia cells by coating on Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 May 1; 141: 213–22. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.01.054.
7. Cheng Y.J., Luo G.F., Zhu J.Y., Xu X.D., Zeng X., Cheng D.B., Li Y.M., Wu Y., Zhang X.Z., Zhuo R.X., He F. Enzyme-Induced and Tumor-Targeted Drug Delivery System Based on Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 May 6; 7 (17): 9078–87. doi: 10.1021/acsami.5b00752.
8. Singh S., Shi T., Duffin R., Albrecht C., van Berlo D., Hohn D., Fubini B., Martra G., Fenoglio L., Borm P.J., Schins R.P. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Jul 15; 222 (2): 141–51.
9. Xuebin K., Yiming H., Dargaville T. R., Yiqun F., Zhanfeng C., Huaiyong Z. Modified alumina nanofiber membranes for protein separation. *Separation and Purification Technology*. 2013; 120: 239–244.
10. Pailleux M., Boudard D., Pourchez J., Forest V., Grosseau P., Cottier M. New insight into artifactual phenomena during in vitro toxicity assessment of engineered nanoparticles: study of TNF- α adsorption on alumina oxide nanoparticle. *Toxicol In Vitro*. 2013 Apr; 27 (3): 1049–56. doi: 10.1016/j.tiv.2013.01.022.
11. Radziun E., Dudkiewicz W.J., Książek I., Nowak K., Amuszeńska E. L., Kunicki A., Olszyna A., Ząbkowski T. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicol In Vitro*. 2011 Dec; 25(8): 1694–700. doi: 10.1016/j.tiv.2011.07.010.
12. Arul Prakash F., Dushendra Babu G.J., Lavanya M., Vidhya K.S., Devasena T. Toxicity Studies of Aluminium Oxide Nanoparticles in Cell Lines. *International J Nanotechnology and Applications*. 2011; 5: 99–107.
13. Zhang Q.L., Li M.Q., Ji J.W., Gao F.P., Bai R., Chen C.Y., Wang Z.W., Zhang C., Niu Q. In vivo toxicity of nano-alumina on mice neurobehavioral profiles and the potential mechanisms. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Jan-Mar; 24 (1 Suppl): 23S-29S.
14. Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang T., Ma Y., Jia G., Gao Y., Li B., Sun J., Li Y., Jiao F., Zhao Y., Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*. 2007 Jan 30; 168 (2): 176–85.
15. Ramani M., Ponnusamy S., Muthamizhchelvan C., Marsili E. Amino acid-mediated synthesis of zinc oxide nanostructures and evaluation of their facet-dependent antimicrobial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 May 1; 117: 233–9. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.017.
16. Padmavathy N., Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles – an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2008; 9 (3): 035004–035010.
17. Tsukanov A.A., Psakhie S.G. Energy and structure of bonds in the interaction of organic anions with layered double hydroxide nanosheets: A molecular dynamics study. *Sci Rep*. 2016 Jan 28; 6: 19986. doi: 10.1038/srep19986.
18. Lerner M.I., Glazkova E.A., Lozhkomoiev A.S., Svarovskaya N.V., Bakina O.V., Pervikov A.V., Psakhie S.G. Synthesis of Al nanoparticles and Al/AlN composite nanoparticles by electrical explosion of aluminum wires in argon and nitrogen. *Powder Technology*. 2016; 295: 307–314.
19. Lozhkomoiev A.S., Glazkova E.A., Bakina O.V., Lerner M.I., Gotman I., Gutmanas E.Y., Kazantsev S.O., Psakhie S.G. Synthesis of core-shell AlOOH hollow nanospheres by reacting Al nanoparticles with water. *Nanotechnology*. 2016 May 20; 27 (20): 205603. doi: 10.1088/0957-4484/27/20/205603.
20. Lozhkomoiev A.S., Glazkova E.A., Svarovskaya N.V., Bakina O.V., Kazantsev S.O., Lerner M.I. Specific features of aluminum nanoparticle water and wet air oxidation. *AIP Conference Proceedings*. 2015; 1683: 020128.

21. *Shimmel G.* Methods of Electron Microscopy. M., 1972; 300. [in Russian]
22. *Khokhlov A.F., Popov P.V.* Solid state physics. M., 2001; 484. [in Russian]
23. State Standard 23401-90. Metallic powders. Catalysts and carriers. Determination of the specific surface. 12. [in Russian]
24. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16; 65(1–2): 55–63.
25. *Zhang S., Li J., Lykotrafitis G., Bao G., Suresh S.* Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. Adv Mater. 2009; 21: 419–424.
26. *Alarifi S., Ali D., Alkahtani S.* Nanoalumina induces apoptosis by impairing antioxidant enzyme systems in human hepatocarcinoma cells. Int J Nanomedicine. 2015 May 25; 10: 3751–60. doi: 10.2147/IJN.S82050.
27. *Pani G., Galeotti T., Chiarugi P.* Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. Cancer Metastasis Rev. 2010 Jun; 29 (2): 351–78. doi: 10.1007/s10555-010-9225-4.

Received 14.08.16

Accepted 30.10.16

ABOUT THE AUTHORS

Korovin Matvei S., PhD, Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: msk@ispms.tsc.ru.

Fomenko Alla N., engineer, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: alserova@ispms.tsc.ru. SPIN-code: 4435-8053.

Bakina Olga V., PhD, Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru. SPIN-code: 9002-1344.

Lerner Marat I., Professor, Head of Laboratory, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: lerner@ispms.tsc.ru. SPIN-code: 3247-9864.