

Л.А. НАЛЕСКИНА, Н.Ю. ЛУК'ЯНОВА,
Л.М. КУНСЬКА, Д.В. ДЕМАШ, В.Ф. ЧЕХУН

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ
E-mail: chekhun@onconet.kiev.ua

ВІЗУАЛІЗАЦІЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ РОЗПОДІЛУ І НАКОПИЧЕННЯ НАНОЧАСТИНОК ЗАЛІЗА У ЧУТЛИВИХ ТА РЕЗИСТЕНТНИХ ДО ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ РІЗНИХ ТЕРМІНІВ КУЛЬТИВУВАННЯ ІЗ ФЕРОМАГНЕТИКОМ У ЛІПОСОМНІЙ ФОРМІ



Досліджено можливості світлооптичної візуалізації, а також особливості розподілу, локалізації та динаміки накопичення ліпосомної форми феромагнетиту в клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7, чутливих та резистентних до цисплатину та доксорубіцину, після різних термінів їхнього культивування із наночастинками заліза. На підставі аналізу отриманих даних висловлено припущення, що найбільш ймовірним шляхом надходження наночастинок заліза у клітини всіх досліджених субліній є рецептор-опосередкований ендцитоз, оскільки через 24 год після інкубації інкорпороване залізо переважно виявляється у вигляді відокремлених гранул, локалізованих біля цитоплазматичної мембрани. Разом з цим показано, що через 48 та 72 год поряд із збільшенням кількості залізопозитивних клітин зростає відсоток пухлинних клітин із великим вмістом феромагнетиту за рахунок утворення щільних структур із цитоплазматичною та навколоядерною локалізацією. Доведено, що динаміка накопичення та вивільнення феромагнетиту із клітин пов'язані з їхньою чутливістю до протипухлинних препаратів та тривалістю інкубації з наночастинками заліза.

© Л.А. НАЛЕСКИНА, Н.Ю. ЛУК'ЯНОВА, Л.М. КУНСЬКА,
Д.В. ДЕМАШ, В.Ф. ЧЕХУН, 2011

Вступ. Немає сумніву, що наближається час, коли лікування хворих на рак стане настільки ефективним, що навіть при наявності пухлин, резистентних до цитостатиків, будуть отримані бажані результати. Така впевненість пов'язана з тим, що останні десятиріччя ознаменувались стрімким розвитком нанотехнологій [1], які не залишили байдужою жодну галузь науки, в тому числі онкологію [2–4]. Завдяки розробці та впровадженню сучасних наноматеріалів з'явилась можливість створення магнітокерованих протипухлинних лікарських наноконструкцій [5], які при застосуванні специфічних наночастин здатні надходити безпосередньо у пухлину, уникаючи дії мембранної помпи [6], що є гарантією безпечності і максимальної концентрації препарату в клітинах. Найбільш перспективною складовою при створенні наноконструкцій адресної доставки лікарських засобів вважаються феромагнітні рідини, які містять наночастинки оксиду заліза (Fe_3O_4 або γFe_3O_4) із розмірами в діапазоні величин від 15 до 75 нм [7], що стало поштовхом до розробки технології переведення наноферочастинок у колоїдний стан [8].

Доцільність використання у магнітокерованих композитах наночастинок заліза обумовлена тим, що при певному температурному режимі вони набувають фізичних та хімічних властивостей, які не притаманні більшим за розміром часточкам того самого металу, зокрема магнітних [9, 10].

Вивчення можливостей цілеспрямованої доставки активних агентів у пухлину є фундаментальною частиною загального проекту щодо розробки багатокомпонентних лікарських нанозасобів, який спрямований на накопичення експериментальних даних для наукового обґрунтування необхідності їхнього використання у клінічній практиці як нового ефективного методологічного підходу до лікування онкологічних хворих [11–13]. Увага дослідників з різних напрямків цієї проблеми повинна зосереджуватись на вирішенні певних конкретних питань. Одним з них є необхідність візуалізації у пухлинних клітинах наноконструкції, що містить феромагнетити, для об'єктивізації його проникнення у внутрішньоклітинні структури із використанням маркерного тесту, оснований на

специфічному забарвленні наночастинок заліза.

«Золотим стандартом» серед доказових методів медико-біологічних досліджень нині залишається цитоморфологічний метод [14], який дає можливість скласти об'єктивне уявлення про морфологічні особливості дослідженого об'єкта і на цій підставі представити його конкретні характеристики.

З врахуванням зазначеного, нами проведено світлооптичне цитоморфологічне дослідження, спрямоване на візуалізацію та з'ясування особливостей накопичення локалізації феромагнетика у ліпосомній формі в пухлинних клітинах лінії MCF-7 раку молочної залози людини, чутливих та резистентних до цисплатину і доксорубіцину, після різних термінів культивування із наноконкомпозитом.

Матеріал та методи. Робота є експериментальним дослідженням, виконаним на культурах клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7, чутливих (MCF-7/S) та резистентних до цисплатину (MCF-7/CP) і доксорубіцину (MCF-7/Dox). Клітини вихідної лінії (чутливі до протипухлинних препаратів) культивували у культуральному модифікованому середовищі Dulbecco ISCOVE («Sigma», Німеччина) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки («Сангва», Україна) при температурі 37 °C та насиченням повітря 5 % CO₂. Клітини пересівали двічі на тиждень з щільністю 2–4 · 10⁴ клітин на 1 см² поверхні. З вихідної клітинної лінії одержували резистентні до протипухлинних препаратів варіанти: MCF-7/CP – резистентні до цитотоксичного впливу цисплатину та MCF-7/Dox – до доксорубіцину. Резистентні до дії протипухлинних препаратів клітинні лінії були отримані шляхом вирощування клітин у культуральному середовищі з додаванням зростаючих концентрацій цисплатину або доксорубіцину. Кожні два місяці проводили тестування досліджуваних клітин для встановлення рівня їхньої резистентності за допомогою проліферативного методу з використанням 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду (MTT). На час проведення дослідження рівень резистент-

ності клітин лінії MCF-7 становив 4 для цисплатину та 8 – для доксорубіцину.

Для світлооптичної візуалізації феромагнетика клітини лінії MCF-7/S, MCF-7/CP та MCF-7/Dox вирощували на покривних скельцях одну добу. Потім клітини досліджуваних ліній культивували із феромагнетиками – оксид заліза (Fe₃O₄), стабілізованими біологічно активними сурфактантами та полімерами [15] протягом 24, 48 та 72 год в концентрації 100 мкг/мл.

Для світлооптичної візуалізації феромагнетика у досліджених клітинах ми скористались гістохімічним методом Ліллі [16], який використовується для ідентифікації заліза у гістологічних зрізах за допомогою феро- та феріціаніду калію, удосконаливши і адаптувавши його до цитологічних препаратів, та запропонували для використання на моделях клітин в системі *in vitro* [17]. Інкорпоровані та візуалізовані за цим методом наночастинок заліза забарвлені у темно-синій колір. При позитивному забарвленні наночастинок феромагнетика оцінювали їхню форму, локалізацію по відношенню до внутрішньоклітинних структур та відсоток клітин із візуалізованим наноферомагнетиком.

Результати дослідження та їх обговорення. Обзорний перегляд та оцінка всього дослідженого цитологічного матеріалу після проведеної реакції на залізо за модифікованим методом Ліллі дозволив визначити та систематизувати існуючі форми інкорпорованих наноферочастинок та встановити особливості їхньої локалізації у клітинах. За морфологічними характеристиками зафарбовані у синій колір наночастинок заліза розподілені наступним чином: відокремлено розташовані частинки, невеликі агреговані скупчення, щільні компактизовані конгломерати. У частині клітин великі компактизовані скупчення повністю займали всю їхню площину, через що внутрішньоклітинні структури не визначались.

Зафарбовані наночастинок мали різну локалізацію: на внутрішньоклітинній поверхні цитоплазматичної мембрани, біля цитоплазматичної оболонки, в цитоплазмі на різній відстані між ядром і цитоплазматичною мембраною, у насколядерній зоні у вигляді орео-

ла або асиметричного скупчення наночастинок біля одного із полюсів ядра.

При мікроскопічному дослідженні культур, які знаходились у контакті із феромагнетиком, встановлено, що вже через 24 год культивування у клітинах всіх трьох ліній (вихідна, резистентні до цисплатину та доксорубіцину) спостерігається активна інкорпорація інтенсивно забарвлених у синій колір наночастинок заліза (рис. 1).

Кількість клітин із накопиченням феромагнетика в чутливих, резистентних до цисплатину та доксорубіцину лініях відповідно становила 69, 75 та 82 % (таблиця).

Переважає більшість візуалізованого у цей період феромагнетика — це відокремлені гранули, які локалізуються у клітинах біля цитоплазматичної оболонки або вільно у цитоплазмі, менша частина — мозаїчно розташовані різної величини скупчення наночастинок та окремі щільні сполуки (рис. 2–4).

Через 48 год культивування клітин із феромагнетиком у всіх трьох лініях поряд із збільшенням кількості клітин, які накопичують наночастинок заліза, спостерігається збільшення загального вмісту феромагнетика в клітинах за рахунок появи великої кількості щільних його скупчень. Агреговані феромагнетичні частинки визначаються у різних ділянках цитоплазми, у значній кількості клітин вони муфтоподібно оточують навколоядерну зону (рис. 2–4).

Слід зазначити, що у клітинах, резистентних до цисплатину та доксорубіцину, визначаються значно грубіші скупчення наночастинок заліза з утворенням великих щільних конгломератів. Іноді спостерігається тотальне заповнення клітин компактизованою масою специфічно зафарбованого заліза. На 48-му годину відсоток клітин, у яких візуалізується залізо, становить 74 у вихідній лінії, 81 — у резистентній до цисплатину, 86 — у резистентній до доксорубіцину (таблиця і рис. 2).

Закономірності щодо морфологічних особливостей візуалізованого заліза та його розташування у клітинах, зазначені після 48-годинного культивування, виявились більш вираженими у всіх культурах через 72 год їхнього культивування із феромагнетиком.

Позитивно забарвлений в синій колір феромагнетик визначається у вигляді агрегованих

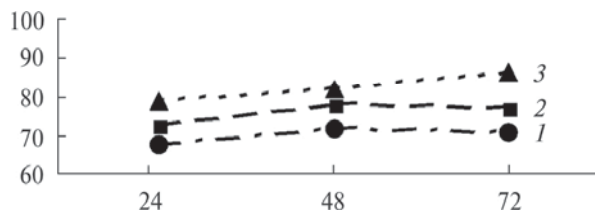


Рис. 1. Графічне зображення динаміки накопичення феромагнетика (по вертикалі, %) у пухлинних клітинах лінії MCF-7 в залежності від чутливості до протипухлинних препаратів та термінів культивування (по горизонталі, год): 1 — чутливі; 2 — резистентні до цисплатину; 3 — резистентні до доксорубіцину

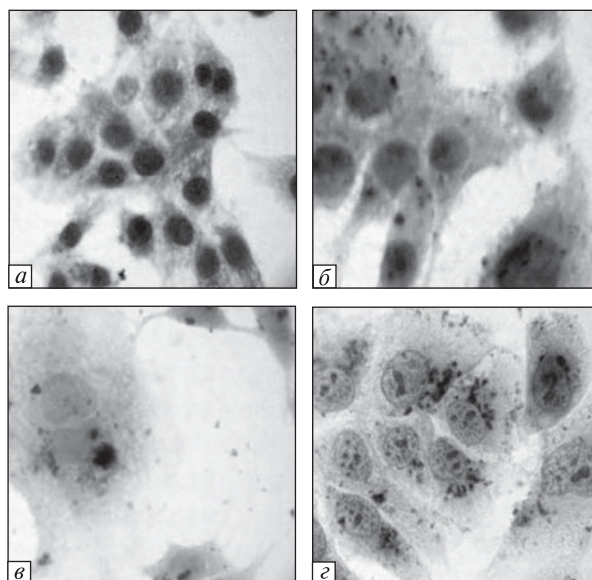


Рис. 2. Накопичення та локалізація наночастинок феромагнетика в клітинах лінії MCF-7/S після культивування протягом: 24 (б), 48 (в) та 72 год (г); а — контроль. Забарвлення за модифікованим методом Ліллі. 36. ×100, імерс.

Динаміка накопичення феромагнетика у клітинах лінії MCF-7 з різною чутливістю до протипухлинних препаратів, %

Клітини лінії MCF-7	Терміни культивування клітин, год		
	24	48	72
Чутливі	69	74	73
Резистентні до цисплатину	75	81	80
Резистентні до доксорубіцину	82	86	91

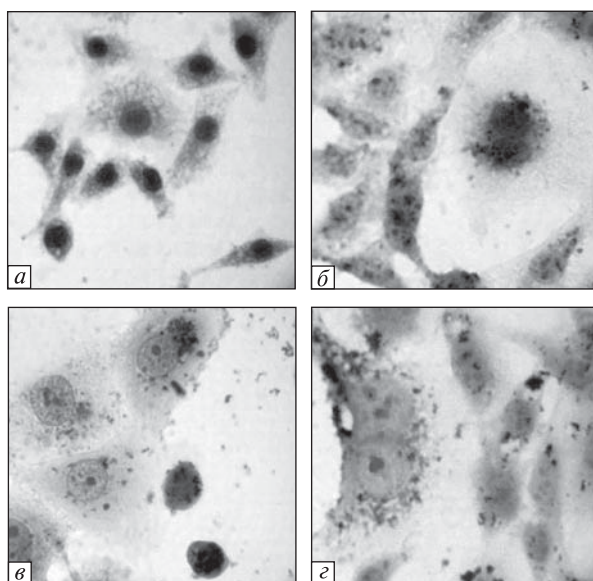


Рис. 3. Варіанти накопичення та локалізації наночастинок феромагнетиту в клітинах лінії MCF-7/CP після культивування протягом: 24 (б), 48 (в) та 72 год (г); а — контроль. Забарвлення за модифікованим методом Ліллі. Зб. $\times 100$, імерс.

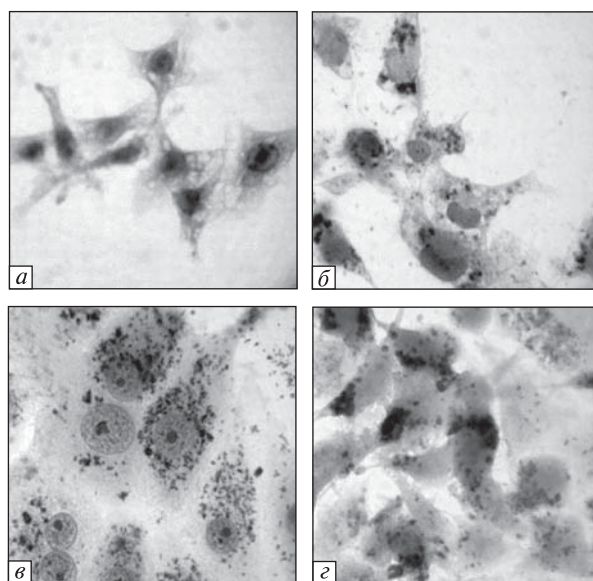


Рис. 4. Різні варіанти накопичення та локалізації наночастинок феромагнетиту в клітинах лінії MCF-7/Dox після культивування протягом: 24 (б), 48 (в) та 72 год (г); а — контроль. Забарвлення за модифікованим методом Ліллі. Зб. $\times 100$, імерс.

компактизованих скупчень. В одних клітинах вони утворюють «ореоли» у навколоядерній

зоні, в других у вигляді асиметричних скупчень, схожих на ковпачок, розташовуються біля одного з полюсів ядра (рис. 2–4).

В той же час серед клітин лінії MCF-7, резистентних до доксорубіцину, на відміну від чутливих і резистентних до цисплатину, визначається біля 14 % клітин, у яких кількість гранул заліза не перевищує 10, і навіть такі (9 %), у яких залізо зовсім не інкорпоровалося.

Звертає на себе увагу той факт, що через 48 год культивування клітин із феромагнетиком і в значній мірі через 72 год визначається втрата міжклітинних контактів. Частина вільно розташованих клітин збільшується у розмірах, приймає округлу форму, з'являються ознаки вакуольної дистрофії цитоплазми та ядер, «набухання» хроматину, збільшення величини ядер у клітинах із великим вмістом заліза. Для деяких клітин характерна втрата поверхневого натягу цитоплазматичної мембрани, проявом чого є поява фестончастості та відшнуровування окремих її фрагментів. Значна кількість заліза спостерігається у гігантських одно- та багатоядерних клітинах, а також у тих, що гинуть.

Кількісний підрахунок клітин із інкорпорованим залізом на 72-гу годину культивування свідчить про стабілізацію процесу накопичення заліза у клітинах вихідної лінії (73 %) та чутливої до цисплатину (80 %) і незначну тенденцію до подальшого включення наночастинок (91 %) у клітинах резистентної лінії до доксорубіцину (таблиця і рис. 1).

Зазначені закономірності проведеного нами дослідження узгоджуються із результатами інших фрагментів комплексної теми відділу механізмів протипухлинної терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, зокрема даними електронної мікроскопії, які свідчать про наявність прямого зв'язку між термінами культивування клітин всіх ліній із феромагнетиком та кількістю визначених фаголізосом із електроннощільним вмістом, а також із даними атомно-адсорбційної спектроскопії та електронно-парамагнітного резонансу щодо загального вмісту заліза у клітинах цих ліній.

На підставі аналізу власних даних світлооптичної візуалізації розподілу і локалізації наночастинок феромагнетиту в клітинах до-

сліджених ліній та зіставлення їх із поодинокими відомостями літератури щодо культур клітин макрофагально-фагоцитарного ряду, також культивованих із ліпосомною формою заліза, ми вважаємо, що найбільш ймовірним шляхом надходження феромагнетика в клітини є рецептор-опосередкований ендцитоз [18–20]. Підставою для цього є те, що через 24 год після культивування інкорпороване залізо переважно виявляється у вигляді відокремлених гранул, локалізованих на цитоплазматичній мембрані або біля неї. Поряд з цим ми припускаємо, що збільшення відсотка клітин із великим вмістом заліза через 48 та 72 год культивування з феромагнетиком за рахунок утворення щільних залізовмісних сполук із цитоплазматичною та навколоядерною локалізацією може бути свідченням лізосомального шляху метаболізму оксиду заліза. Це також узгоджується із даними літератури [20] та результатами, отриманими групою електронної мікроскопії.

Таким чином, проведене цитоморфологічне дослідження дозволило візуалізувати та охарактеризувати особливості накопичення і локалізації феромагнетика в клітинах із різною чутливістю до протипухлинних препаратів і на цій підставі систематизувати ці показники за морфологічними ознаками, а також визначити динаміку накопичення у досліджених клітинах заліза в залежності від термінів культивування.

Висновки. В системі *in vitro* показано, що об'єктивним способом контролю проникнення феромагнетика в пухлинні клітини є візуалізація його за допомогою модифікованого нами гістохімічного методу Ліллі. Інкорпорація феромагнетика клітинами раку молочної залози людини лінії MCF-7 має певні відмінності, які залежать від чутливості цих клітин до протипухлинних препаратів та часу інкубування з ним. Наночастинок заліза, візуалізовані у клітинах лінії MCF-7 раку молочної залози людини із різною чутливістю до протипухлинних препаратів, мають певні відмінності як за морфологічними характеристиками та формою накопичення, так і локалізацією у пухлинних клітинах. Через 24 год після культивування із феромагнетиком у пухлинних

клітинах всіх трьох ліній – чутливих та резистентних до цисплатину і доксорубіцину – спостерігається значне накопичення наночастинок заліза. Кількість клітин із накопиченим залізом продовжує зростати до 48-ї години культивування, при цьому збільшується відсоток таких, що характеризуються великим вмістом інкорпорованого феромагнетика. Динаміка накопичення заліза на 72-гу годину відрізняється стабілізацією цього процесу у чутливих і резистентних до цисплатину пухлинних клітинах та тенденцією до подальшого зростання у клітинах, резистентних до доксорубіцину. Отже доведено, що наночастинок феромагнетика в ліпосомній формі здатні надходити в значній кількості як у чутливі, так і резистентні до протипухлинних препаратів клітини, і це є обнадійливим результатом щодо конструювання керованих магнітозалежних залізовмісних наноконструкцій.

Робота підтримана договором № 5.18.3.53 на виконання проекту «Біологічна активність та безпека наноматеріалів, що можуть бути використані при створенні векторних систем протипухлинних препаратів» відповідно до Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» на 2010–2014 рр.

*L.A. Naleskina, N.Yu. Lukyanova,
L.N. Kunskeya, D.V. Demash, V.F. Chekhun*

VISUALIZATION OF IRON NANOPARTICLES
ACCUMULATION AND DISTRIBUTION
FEATURES IN SENSITIVE
AND RESISTANT TO ANTITUMOR
DRUGS HUMAN BREAST CANCER CELLS
AFTER DIFFERENT TIME INTERVALS
OF CULTIVATION WITH LIPOSOMAL
FERROMAGNETIC

It was shown *in vitro* that visualization of iron nanoparticles by histochemical Lilly method, modified by authors for cytomorphological studies, could be a certain control of ferromagnetic income to human breast cancer MCF-7 cells with different sensitivity to antitumor drugs (doxorubicin and cisplatin). The form of the visualized iron nanoparticles, their localization and distribution towards intracellular structures was studied. It was shown that localization, dynamics of accumulation and release of ferromagnetic from cells were connected to their sensitivity to antitumor drugs and time of incubation with iron nanoparticles.

Л.А. Налескіна, Н.Ю. Лук'янова,
Л.Н. Кунська, Д.В. Демаш, В.Ф. Чехун

**ВИЗУАЛІЗАЦІЯ ОСОБЕННОСТЕЙ
РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И НАКОПЛЕНИЯ
НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА В ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ
И РЕЗИСТЕНТНЫХ К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ
ПРЕПАРАТАМ КЛЕТКАХ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ
РАЗНЫХ ВРЕМЕННЫХ ИНТЕРВАЛОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ФЕРРОМАГНЕТИКОМ
В ЛИПОСОМНОЙ ФОРМЕ**

В экспериментах *in vitro* установлено, что надежным контролем поступления ферромагнетика в опухолевые клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 с разной чувствительностью к противоопухолевым препаратам (цисплатину и доксорубину) является визуализация наночастиц железа с помощью модифицированного авторами гистохимического метода Лилли для цитоморфологических исследований. Охарактеризована форма визуализированных наночастиц железа, их локализация и распределение в клетках по отношению к внутриклеточным структурам. Показано, что локализация, динамика накопления и высвобождения ферромагнетика из клеток связаны с их чувствительностью к противоопухолевым препаратам и временем инкубирования с наночастицами железа.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мальцев П.П. Нанотехнологии. Наноматериалы. Наносистемная техника. — М.: Техносфера, 2008. — 432 с.
2. Чехун В.Ф. Нанотехнологии в онкологии: перспективы развития и непредвиденные трудности // *Lancet Oncology Ukrainian edition*. — 2010. — № 4 (14). — С. 2–3.
3. Чехун В.Ф. Роль інноваційних технологій у розв'язанні проблем онкології // *Вісн. НАН України*. — 2008. — 9. — С. 38–42.
4. Nie S., Xing Y., Kim G.J., Simons J.W. Nanotechnology applications in cancer // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* — 2007. — 9. — P. 257–288.
5. Головенко М.Я. Наномедицина: досягнення та перспективи розвитку новітніх технологій у діагностиці та лікуванні (огляд літератури) // *Журн. АМН України*. — 2007. — 13, № 4. — С. 617–635.
6. Baum C., Hegewisch-Becker S., Sckert N.G. et al. Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells // *J. Virol.* — 1995. — 69, № 6. — P. 7541–7547.
7. MacKenzie E.L., Iwazaki K., Tsuji Y. Intracellular mechanisms to health implications // *Antioxid. Redox. Signal.* — 2008. — 10, № 6. — P. 997–1030.
8. Мовчан Б.А. Электронно-лучевая нанотехнология

- и новые материалы в медицине — первые шаги // *Вісн. фармакології та фармацевції*. — 2007. — 12, № 5. — С. 5–13.
9. Михайлов Г.А., Васильева О.С. Технология будущего: использование магнитных наночастиц в онкологии // *Бюл. СО РАМН*. — 2008. — 131, № 3. — С. 18–22.
 10. Губин С.П., Кокшаров Ю.А., Хомутов Г.Б. и др. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства // *Усп. химии*. — 2005. — 74, № 4. — С. 539–574.
 11. Налескіна Л.А., Бородай Н.В., Чехун В.Ф. Сьогоднішня та перспективи створення наносистем спрямованої доставки лікарських препаратів до пухлинних клітин // *Онкологія*. — 2009. — 11, № 3(41). — С. 166–173.
 12. Lammers T., Hennink W.E., Storm G. Tumour-targeted nanomedicines; principles and practice // *Brit. J. Cancer*. — 2008. — 99, № 3. — P. 392–397.
 13. Kumar A., Jena P.K., Behera S. et al. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery // *Nanomed., Nanotechn., Biol. and Med.* — 2010. — 6. — P. 64–69.
 14. Пальцев М.А., Северин Е.С., Иванов А.А. Патологическая анатомия и молекулярная диагностика // *Арх. патологии*. — 2006. — 68, № 4. — С. 3–7.
 15. Пат. України на корисну модель № 47930. Спосіб отримання стабілізованого розчину наночастинок магнетиту для адресної доставки протипухлинних препаратів / Чехун В.Ф., Хаєцький І.К., Куратов Ю.А., Дідікін Г. Г., Литвин Б.О., Патон Б.Є. — Заявл. 08.10.09; опубл. 25.02.10. — Бюл. № 4.
 16. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. — М.: Мир, 1969. — С. 377–378.
 17. Пат. України на корисну модель № 10785/1. Спосіб світлооптичної візуалізації залізовмісних наночастинок у клітинах в системі *in vitro* / Налескіна Л.А., Лук'янова Н.Ю., Демаш Д.В., Кунська Л.М., Чехун В.Ф. — Заявл. 10.06.10; опубл. 08.10.10.
 18. Schulze E., Ferrucci J.T., Poss K. et al. Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label *in vitro* // *Invest. Radiol.* — 1995. — 30, № 10. — P. 604–610.
 19. Moore A., Weissleder R., Bogdanov A. Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages // *J. Magn. Reson. Imaging*. — 1997. — 7, № 6. — P. 1140–1145.
 20. Raynal I., Prigent P., Peyramaure S. et al. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of Ferumoxides and Ferumoxtran-10 // *Invest. Radiol.* — 2004. — 39, № 1. — P. 56–53.

Надійшла 08.10.10