

PACS numbers: 81.16.Fg, 87.15.hg, 87.15.K-, 87.19.xj, 87.64.kv, 87.64.mk, 87.85.Rs

Ефективність протипухлинної дії гібридних наноконкомплексів залежить від часу їхньої взаємодії з клітинами аденокарциноми Ерліха

А. М. Гольцев¹, Ю. В. Малюкін², Н. М. Бабенко¹, Ю. О. Гаєвська¹,
М. О. Бондарович¹, М. В. Останков¹, І. Ф. Коваленко¹, В. К. Клочков²

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23,
61016 Харків, Україна

²Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України,
просп. Науки, 60,
61001 Харків, Україна

Показано значимість часу інкубації пухлинних клітин з гібридними наноконкомплексами (НК) на основі наночастинок ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$ і холестерину в забезпеченні ефективності пригнічення росту аденокарциноми Ерліха (АКЕ). Клітини АКЕ інкубували з НК упродовж 1, 2, 3 і 4 годин, після чого оцінювали їхнє накопичення в клітинах за допомогою конфокального лазерного мікроскопа LSM 510 META, показники мітохондріального дихання (МТТ-тест) і кількість апоптотичних/некротичних клітин. Використання конфокальної мікроскопії уможливило визначити динаміку та ступінь накопичення НК в різних субпопуляціях клітин АКЕ. Встановлено, що НК здатні зв'язуватися лише з окремими субпопуляціями АКЕ. Інтенсивність флуоресценції НК у клітинах АКЕ досягала максимуму на третю годину інкубації. У цей же термін встановлено максимальне порушення дихальної функції мітохондрій і статистично значуще збільшення кількості клітин у стані пізнього апоптозу (An^+/PI^+) і некрозу (An^-/PI^+) в порівнянні з контролем. Такі зміни в клітинах АКЕ *in vitro* сприяли максимальній реалізації НК протипухлинного ефекту *in vivo*, судячи з показника інгібіції росту пухлини, який саме після трьох годин інкубації був максимальним і складав близько 70%. Встановлено переважне накопичення НК у $CD44^+$ -субпопуляції АКЕ з надвисокою інтенсивністю експресії цього маркера ($CD44^{high}$ -клітини). Це підтверджує, що реалізації антипроліферативних властивостей гібридних НК можуть здійснюватися шляхом інгібіції функції пухлинних клітин зі стовбуровим потенціалом. Здатність НК до одночасної візуалізації туморогенних клітин пухлини й інгібіції її росту уможливають розглядати цей тип наноматеріалів у якості перспективних тераностичних засобів.

The significance of an incubation time of tumour cells with hybrid nanocomplexes (NCs) based on nanoparticles of orthovanadates of the rare-earth elements $GdYVO_4$; Eu^{3+} and cholesterol in inhibiting the growth of Ehrlich's adenocarcinoma (EAC) is shown. The EAC cells were incubated with NCs for 1, 2, 3, and 4 hours, afterwards, their accumulation in cells was evaluated using a LSM 510 META confocal laser microscope, and there were assessed mitochondrial respiration (MTT test) as well as number of apoptotic/necrotic cells. Using confocal microscopy, it is possible to determine the dynamics and degree of accumulation of NCs in different subpopulations of EAC cells. It is established that NCs are able to contact only individual EAC subpopulations. The fluorescence intensity of NCs in EAC cells approaches the maximum at 3 hours of incubation, which is accompanied by a significant decrease in cell mitochondrial respiration and a statistically significant increase in late apoptosis (An^+/PI^+) and necrosis (An^-/P^+) cells compared with the control. Such changes in EAC cells *in vitro* contributed to the maximum implementation of the NCs antitumour effect *in vivo*, judging by the inhibition of tumour growth, were maximal after about three hours of incubation and were about 70%. The predominant accumulation of NCs in the $CD44^+$ subpopulation of EAC with ultrahigh expression intensity of this marker ($CD44^{high}$ -cells) is established. This confirms that the implementation of the antiproliferative properties of hybrid NCs can be accomplished by inhibiting the function of tumour cells with stem potential. The ability of NCs to simultaneously visualize tumour cells and inhibit its growth makes it possible to consider this type of nanomaterials as promising theranostic agents.

Ключові слова: клітини аденокарциноми Ерліха, наноконплекси, конфокальна мікроскопія.

Key words: Ehrlich's adenocarcinoma cells, nanocomplexes, confocal microscopy.

(Отримано 11 грудня 2019 р.)

1. ВСТУП

Останнім часом методи нанобіотехнології знайшли широке застосування в діагностиці та лікуванні раку, що привело до розвитку нового наукового напрямку — наноонкології. Є загальна тенденція до створення багатофункціональних наноконпозитів, які поєднують у собі діагностичні та терапевтичні можливості, що є однією з основних задач «нанотераностики».

Можливість використання наночастинок (НЧ) в таргетній терапії раку ґрунтується на існуванні ефекту «посилення проникності і утримування — the enhanced permeability and retention (EPR) effect» [1]. Загальне пояснення даного явища полягає в тому, що активна проліферація пухлинних клітин стимулює посилений ангіогенез пухлинного сайту за рахунок підвищення продукування

чинника росту ендотелію судин та інших чинників росту. Для капілярів пухлин характерні великі пори між ендотеліальними клітинами (від 380–780 нм до 1,2 мкм залежно від типу пухлини), що приводить до підвищеної проникності пухлинних капілярів у порівнянні з капілярами в нормальних тканинах [1]. Крім того, в тканині пухлини ефективний лімфатичний дренаж зазвичай відсутній, що призводить до спотворення лімфатичного відтоку й утримання біомолекул в пухлинному сайті. Це є передумовою вибіркового проникнення та таргетного накопичення НЧ або наноконтейнерів з лікарськими засобами в пухлині, сприяючи реалізації ними протипухлинної дії.

Здатність ортованадатів та інших сполук ванадію до гальмування росту пухлини на сьогоднішній день доведено як в експерименті, так і в клініці. До переваг сполук ванадію відносять низький показник IC₅₀ (напівмаксимальної інгібувальної концентрації), наявність антипроліферативного та проапоптотичного ефектів, що продемонстровано на злоякісних клітинах меланоми [2]. Встановлено протипухлинний ефект катіона Ванадію (у вигляді ванаділсульфату), а також аніона (ортованадату) щодо інтенсивності росту лінії гепатоми щурів [3], різних ліній карциноми людини (легенів, нирок, простати) [4].

Похідні ванадію здатні викликати селективне окиснення піримідинових основ, що перешкоджає комплементарному скручуванню ДНК [5]. До цього особливо схильні пухлинні клітини, які характеризуються порушеннями системи репарації ДНК. Іншим ймовірним механізмом протипухлинної дії сполук ванадію є порушення проникності мембран мітохондрій пухлинних клітин за рахунок генерації активних форм кисню (АФК) [6]. Шкідливий вплив АФК, перш за все, призводить до порушень структури мембран мітохондрій, вивільнення цитохрому С, пошкодження мітохондріальної та ядрової ДНК, пероксидації ліпідів плазматичних мембран клітин. Такі деструктивні зміни з боку АФК відіграють одну з ключових ролей у розвитку та регуляції апоптотичної програми загибелі клітин [7].

Раніше в наших роботах за допомогою метода спектральної аналізи було показано здатність НЧ ортованадатів рідкісноземельних елементів до візуалізації *in vitro* стовбурових ракових клітин (СРК) аденокарциноми Ерліха (АКЕ) [8]. Так, сферичні НЧ ортованадату виявляли тропність до пухлиноіндукувальних CD44⁺-клітин АКЕ, що зумовило можливість використання наноструктур для ідентифікації цих клітин з метою діагностики та гальмування пухлинного процесу [8].

Незважаючи на те що сполуки ванадію і мають переважну тропність до пухлинних тканин, в ряді робіт вказується на токсичну дію цих сполук не тільки на клітини пухлини, а і на здорові тканини [9, 10]. Підвищення таргетного зв'язування НЧ переважно з клітинами

пухлин може бути здійснено шляхом створення гібридних наноконструкцій (НК) на основі НЧ ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$ і холестерину [11]. Ідеологія створення таких НК базується на підвищенні їхньої протипухлинної дії за рахунок наявності в складі НК холестерину, який має спорідненість до мембран пухлинних клітин-мішеней. Відомо, що холестерин активно «вилучається» з кровотоку проліферувальними клітинами пухлини для побудови біомембран завдяки наявності великої кількості SR-B1- (від англ. scavenger receptor, class B type I) і кавеолін-1- (Cav-1) рецепторів, які можуть зв'язуватися з вільним холестерином [12].

Попередні дослідження довели, що додавання холестерину до НЧ підвищує ефективність таргетної протипухлинної дії сформованих НК [13, 14, 15]. Однак час взаємодії клітин з НК в цих дослідженнях був підібраний згідно з даними, одержаними на клітинах здорової печінки [16]. При цьому відомо, що ефективність протипухлинної дії наноматеріалів залежить від ряду параметрів, у тому числі й часу інкубації їх з клітинами, що досліджуються [17].

З'ясування динаміки накопичення НК всередині клітини можливе за допомогою лазерного сканувального мікроскопа. Використання методи оптичних зрізів і подальшої 3D-реконструкції уможливорює проаналізувати розподіл наноматеріалів в клітині в динаміці часу за трьома вимірами: довжина, ширина, глибина [18].

Крім того, залишається нез'ясованим питання щодо переважного накопичення НК в тій чи іншій субпопуляції пухлинних клітин. Вирішення цього питання є надважливим з огляду на те, що АКЕ є гетерогенною за фенотиповим складом пухлиною, кожна із субпопуляцій котрої здатна до реалізації власних функцій. Так, встановлено, що підвищеним туморогенним потенціалом *in vivo* у порівнянні з загальним пулом АКЕ володіють $CD44^+$ -клітини [15]. Є всі передумови вважати, що серед них клітинам з надвисоким рівнем флуоресценції ($CD44^{high}$) притаманні ознаки СРК [15]. Відповідь на ці питання уможливить наблизитися до розуміння механізму реалізації протипухлинного ефекту НК.

З огляду на вищезазначене метою цього дослідження було визначення залежності характеру протипухлинного впливу гібридних НК від терміну їхньої взаємодії з клітинами АКЕ і з'ясування можливості селективного накопичення НК в $CD44^+$ -субпопуляції.

2. МАТЕРІЯЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти були виконані на восьмимісячних самках мишей лінії BALB/c. Клітини АКЕ вводили інтраперитонеально в дозі $3 \cdot 10^6$ клітин/мишу в 0,3 мл фізіологічного розчину і культивували протягом 7 діб *in vivo*. Тварини були виведені з експерименту під легким ефірним наркозом. Клітини АКЕ одержували з перитонеальної

порожнини (ПП) за допомогою шприца, який попередньо промивали стерильним фізіологічним розчином з гепарином, через товсту голку № 10 з внутрішнім діаметром у 2,69 мм.

Одержання гібридних наноконкомплексів. У роботі були використані сферичні наночастинки (НЧ) на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів (Gd, Y), активованих Європієм GdYVO₄:Eu³⁺ (концентрація НЧ у розчині 5% глюкози — 1,3 г/л), які були синтезовані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України за описаною раніше методикою [19]. Гібридні наноконкомплекси, що містять сферичні наночастинки ортованадатів рідкісноземельних елементів GdYVO₄:Eu³⁺ (1,3 г/л) і холестерин (0,55 г/л) (Acros organics, Бельгія), одержували відповідно до методики [10].

Обробка клітин АКЕ гібридними наноконкомплексами. Інкубацію клітин АКЕ з НК проводили *in vitro* з розрахунку 100 мкл водного розчину НК на 900 мкл клітин АКЕ (10⁷ кл/мл у фізіологічному розчині) за кімнатної температури упродовж 1, 2, 3 і 4 годин. Потім клітини АКЕ тричі відмивали 5%-розчином глюкози шляхом центрифугування (300g). У якості контролю використовували клітини АКЕ, які інкубували в розчині 5%-глюкози без додавання НК.

Подвійне забарвлення клітин АКЕ гібридними наноконкомплексами та моноклональними антитілами до CD44-структури. Інкубацію клітин АКЕ з НК проводили згідно з вищенаведеною методикою. По закінченню терміну інкубації до кожної проби (100 мкл) додавали моноклональні антитіла CD44 ('BD Pharmingen', США, №553133, клон ІМ7) та витримували 30 хвилин за кімнатної температури згідно з протоколом виробника. Потім клітини відмивали 5%-розчином глюкози шляхом центрифугування (300g). Клітини з середнім значенням інтенсивності флюоресценції CD44-маркера понад 10³ (за логаритмічною шкалою) відносили до CD44^{high}-субпопуляції.

Ідентифікація гібридних НЧ наноконкомплексів у клітинах АКЕ. Облік кількості клітин, що зв'язалися з НК, здійснювали за допомогою конфокального лазерного сканувального мікроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина). Для збудження флюоресценції був використаний діодний лазер з довжиною хвилі у 405 нм потужністю у 10 мВт. Для спостереження флюоресценції використовували фільтр емісії для НЧ 583–636 нм. Апертурна діяфрагма (pinhole) — 404 мкм. Зображення записувалися для одного конфокального зрізу в середній частині кожної клітини. Інтенсивність флюоресценції НЧ (умов.од.) визначали з використанням програмного забезпечення до конфокального мікроскопа Axio Examiner (Carl Zeiss, Німеччина). Коротко: клітини, що знаходилися в полі зору мікрофотографії, обводилися колами, які обмежували площу кожної клітини; інтенсивність флюоресценції в межах цих полів розраховувалася за допомогою відповідного програмного забезпечення.

Після закінчення терміну інкубації *in vitro* проводили підрахунок

наступних характеристик:

а) концентрації клітин в суспензії АКЕ, одержаної на фізіологічному розчині, у камері Горяєва;

б) життєздатності клітин шляхом суправітального фарбування трипановим синім (Trypan blue solution, Sigma, США);

в) рівня мітохондріального дихання клітин за допомогою набору Cell growth determination kit MTT based (Stock No. CGD-1, Sigma, США) відповідно до інструкції виробника; методу засновано на здатності мітохондріальних ферментів живої клітини перетворювати розчинний синій 3-[3,5 диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-2Н-тетразоліум бромід, — сіль жовтого кольору, — в нерозчинний формазан, що має фіолетовий колір, який кристалізується в цитоплазмі клітини; за допомогою органічного розчинника (ізопропанол) формазан переходить у розчинений стан; інтенсивність накопичення формазану характеризує ступінь окиснювально-відновних процесів у досліджуваних клітинах і є непрямою характеристикою кількості живих клітин; детектування результатів здійснювали шляхом міряння оптичної густини зразків за допомогою спектрофотометра (СФ-46 «ЛОМО») за довжини хвилі у 560 нм.

г) кількості апоптотичних і некротичних клітин за допомогою анексину-V-An (BD, США, кат. № 556419) та пропідіум-йодиду-PI (Sigma, США, кат. № 81845-25MG) на проточному цитометрі FACS Calibur Becton-Dickinson; визначали частку живих клітин (An⁻/PI⁻), апоптотичних клітин (An⁺/PI⁻), некротичних клітин (An⁻/PI⁺) і клітин в стані постапоптотичного некрозу (An⁺/PI⁺).

Після попередньої інкубації з НК клітини АКЕ вводили інтраперитонеально мишам лінії BALB/c і через 7 діб культивування *in vivo* оцінювали наступні показники росту пухлини:

а) абсолютну кількість клітин (АКК) визначали за формулою: АКК = Vol·Сonc, де Vol — об'єм асцитичної рідини в ПП тварин (мл), Сonc — концентрація пухлинних клітин, які підраховували в камері Горяєва ($\times 10^7$ кл/мл);

б) інтенсивність росту пухлини (ІРП) обчислювали за формулою: $IP = (AKK \text{ (дослід)} / AKK \text{ (контроль)}) \times 100\%$, де АКК (дослід) — абсолютна кількість пухлинних клітин у перитонеальній порожнині тварин з АКЕ, яка була ініційована обробленими НК клітинами; АКК (контроль) — абсолютна кількість клітин в ПП тварин з АКЕ, яка була ініційована необробленими НК клітинами;

в) ступінь інгібіції росту пухлини (Сі) обчислювали за формулою: $Si = IP \text{ (контроль)} - IP \text{ (дослід)}$, де ІР (контроль) — інтенсивність росту пухлини контрольної групи; ІР (дослід) — інтенсивність росту пухлини дослідної групи. За 100% бралася інтенсивність росту нативних клітин АКЕ.

Статистична обробка даних, одержаних у процесі дослідження, проводилася з використанням електронних таблиць Microsoft Excel

2010 і програми Statistica 10.0 ('StatSoft', США). Кількісні дані було представлено у вигляді $M \pm \delta$, де M — середнє значення, δ — стандартний відхил. Порівняння декількох незалежних вибірок проводилося методом Краскела–Уолліса. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$. Попарне порівняння груп проводилося з використанням непараметричного тесту Манна–Уїтні з виправленням за Бонферроні. Для множинного порівняння зв'язаних вибірок був використаний критерій Фрідмана з наступним застосуванням критерію Вілкоксона для попарного порівняння.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інкубація клітин АКЕ з НК упродовж 1, 2, 3 і 4 годин привела до поступового зменшення кількості клітин в усіх експериментальних групах відносно контрольних значень, але статистично значущої різниці між ними протягом усього часу спостереження встановлено не було (рис. 1, а). Подібна динаміка спостерігалася й стосовно кількості життєздатних клітин (рис. 1, б), однак після 3 годин інкубації було відзначено статистично значуще пониження цього показника в порівнянні з контрольною групою. Таким чином, вже на першому етапі атестації показано пониження життєздатності клітин АКЕ після тригодинної інкубації їх з НК.

За допомогою методи конфокальної мікроскопії показано, що клітини без інкубації з НК (контроль) мали інтенсивність флюоресценції у $15,33 \pm 3,28$ умов.од. протягом всього терміну спостереження, що відповідає рівню електронних шумів детектора (рис. 2). Інтенсивність флюоресценції загального пулу клітин АКЕ після ін-

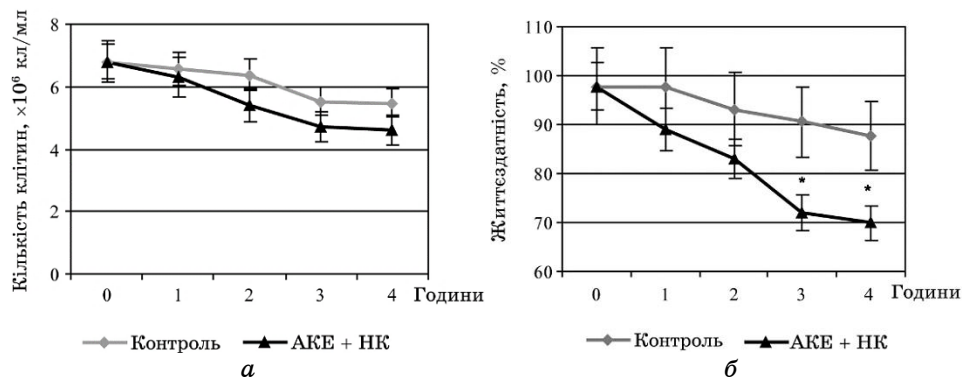


Рис. 1. Кількість клітин АКЕ (а) та їхня життєздатність (б) до і після інкубації з НК. Примітка: * різниця є статистично значущою порівняно з аналогічними показниками клітин АКЕ без інкубації з НК (контроль) ($p < 0,05$).¹

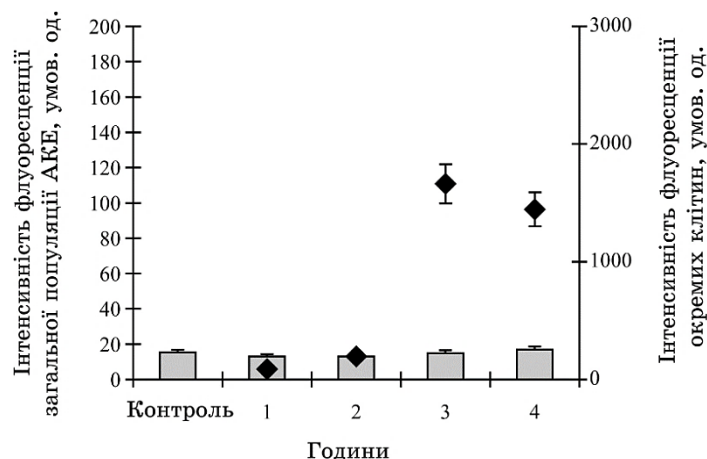


Рис. 2. Інтенсивність флюоресценції загальної популяції клітин АЖЕ (прямокутні стовпці) та флюоресценція окремих клітин (маркер) після інкубації з НК протягом 1, 2, 3 і 4 годин.²

кубації з НК (1–4 годин) практично не змінювалася і не мала статистично значущої різниці з контрольними показниками (рис. 2).

При цьому, починаючи з 1-го часу інкубації, відзначено появу окремих клітин з надвисоким рівнем інтенсивності флюоресценції ($89 \pm 5,72$ умов.од.), яка досягала максимальних значень після 3 годин інкубації ($1662 \pm 33,89$ умов.од.) (рис. 2). На 4-у годину інкубації інтенсивність флюоресценції окремих клітин з надвисоким рівнем світіння статистично значущим чином не змінювалася, залишаючись на достатньо високому рівні ($1445 \pm 11,70$ умов.од.).

Кількість клітин з надвисоким рівнем інтенсивності флюоресценції поступово зростала від 0,2% у першу годину до 1% від загальної кількості клітин на другу годину інкубації, залишаючись на цьому рівні протягом всього часу спостереження (рис. 3). При цьому інтенсивність такого роду флюоресценції клітин досягала максимуму на третю годину інкубації з НК.

Таким чином, встановлено, що серед загального пулу клітин АЖЕ існують лише окремі клітини, з якими НК селективно зв'язуються з підвищеною здатністю, зумовлюючи їхню надвисоку флюоресценцію.

З'ясування, до якої саме популяції АЖЕ за фенотиповими ознаками належать клітини з надвисоким рівнем флюоресценції, було здійснено шляхом одночасного оброблення клітин НК та моноклональними антитілами до CD44-структури (рис. 4). Обґрунтування цього підходу став раніше встановлений нами факт, що саме CD44⁺-клітини мають підвищений в порівнянні з загальним пулом АЖЕ проліферативний потенціал, оцінений за інтенсивністю росту пухлини *in vivo*, і відіграють найважливішу роль у туморогенезі [15].

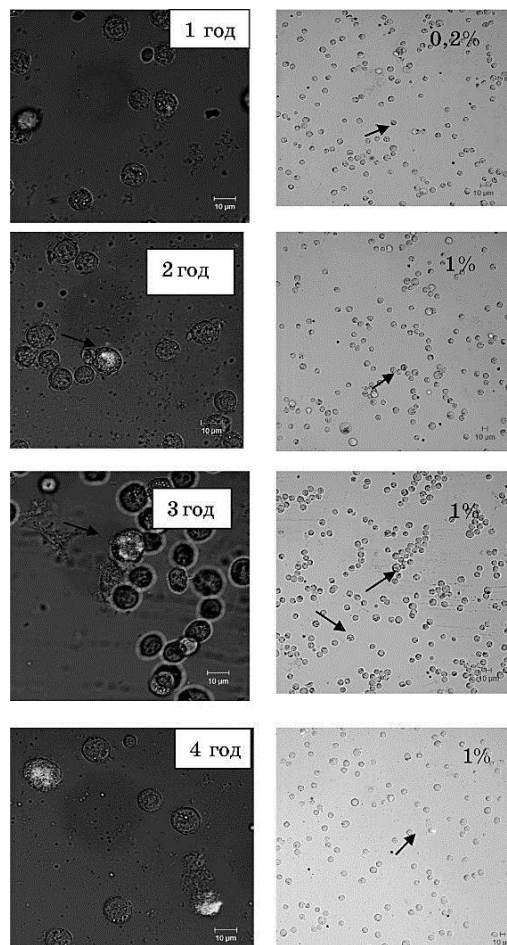


Рис. 3. Конфокальна мікроскопія клітин АЖЕ після інкубації з НК протягом 1, 2, 3 і 4 годин (зліва — зб.40, праворуч — зб.10). *Примітка:* на фото праворуч наведено кількість клітин з надвисоким рівнем інтенсивності флюоресценції.³

Даними конфокальної мікроскопії підтверджено (табл. 1), що кількість $CD44^+$ -клітин, які мали зелену флюоресценцію, становила $7,00 \pm 0,58\%$ від загального пулу АЖЕ. Однак встановлено, що ці клітини мали різний рівень інтенсивності флюоресценції. Так, $5,83 \pm 0,63\%$ $CD44^+$ -клітин мали інтенсивність флюоресценції у $300,25 \pm 96$ умов.од. В той час, лише $1,17 \pm 0,10\%$ $CD44^+$ -клітин мали надвисокий рівень флюоресценції ($1297,29 \pm 46$ умов.од.) і можуть бути віднесені до $CD44^{\text{high}}$ -клітин. Достеменно відомо, що саме вони є стовбуровими раковими клітинами та мають найбільший пухлиноіндукувальний потенціал [15].

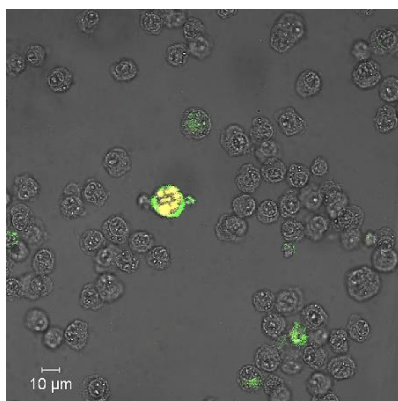


Рис. 4. Подвійне забарвлення клітин АКЕ гібридними наноконкомпексами та моноклональними антитілами до CD44-структури.⁴

ТАБЛИЦЯ 1. Показники інтенсивності флюоресценції клітин АКЕ після подвійного забарвлення їх.⁵

Кількість клітин від загального пулу АКЕ, %	Тип забарвлення		
	CD44	НК	CD44 + НК
Рівень флюоресценції, умов.од.	7,00 ± 0,58%	1,20 ± 0,13%	1,20 ± 0,13%
— з них із надвисоким рівнем флюоресценції, %	1,17 ± 0,10%	1,20 ± 0,13%	1,20 ± 0,13%
— рівень флюоресценції, умов.од.	1297,29 ± 46	1662 ± 33,89	—
— з них із середнім рівнем флюоресценції, %	5,83 ± 0,63%	—	—
— рівень флюоресценції, умов.од.	300,25 ± 96	—	—

При подвійному забарвленні клітин АКЕ гібридними наноконкомпексами та моноклональними антитілами до CD44-структури накопичення НК відзначено лише у $1,20 \pm 0,13\%$ клітин загального пулу АКЕ. При цьому CD44⁺-клітини, які були здатні накопичувати НК, мали надвисокі показники флюоресценції цього маркера — на рівні $1297,29 \pm 46$ умов.од. Це збігається з раніше одержаними даними щодо фенотипового складу пухлини, які свідчать, що у загальній популяції АКЕ кількість CD44-клітин з підвищеним рівнем флюоресценції, — CD44^{high}, — є найменш чисельною та складає біля $0,37 \pm 0,02\%$ [20].

Таким чином, можна стверджувати, що накопичення гібридних НК відбувається переважно у субпопуляції пухлинних клітин зі стовбуровим потенціалом (CD44^{high}-клітини) і що саме вони є мі-

шенню для реалізації антипроліферативних властивостей НК.

Одним з можливих шляхів протирадикальної дії наноматеріалів на основі ортованадатів є генерація активних форм кисню з подальшим ушкодженням функції мітохондрій та індукцією загибелі клітин шляхом апоптозу/некрозу [7]. Було визначено показники активності мітохондріального дихання клітин і типу їхньої загибелі після закінчення кожного терміну інкубації клітин з НК (1–4 години). За результатами дослідження вже після першої години інкубації клітин АКЕ з НК встановлено тенденцію до пониження рівня мітохондріального дихання (на 13% у порівнянні з контролем; рис. 5), що є відображенням функції НАДФ-Н-залежних оксидоредуктазних ферментів мітохондрій. Після 2 годин інкубації різниця з контролем була статистично значущою (на 27%). На третю годину спостереження оптична густина розчину формазау досягла мінімальних значень, залишаючись на цьому рівні і на четверту годину інкубації (рис. 5). Тобто максимальну інгібіцію мітохондріального дихання клітин АКЕ відзначено вже після тригодинної інкубації їх з НК.

Одержані результати уможливають припустити, що гальмування мітохондріального дихання через пошкодження ферментативної системи мітохондрій є ранньою ознакою прояву токсичної дії використаних в роботі НК щодо клітин АКЕ, що згодом може призводити до їхньої загибелі.

Мітохондрії вважаються основною ланкою, що інтегрує різні сигнали, які беруть участь у реалізації апоптозу — програмованої загибелі клітин [7, 21]. Одночасне фарбування за допомогою анексина-V і PI уможливає визначити тип загибелі клітин. Анексин-V в

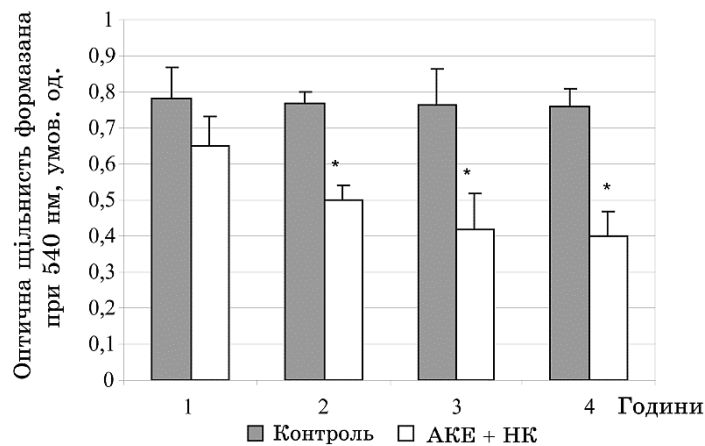


Рис. 5. Метаболічна активність клітин АКЕ до і після інкубації з НК. Примітка: * різниця є статистично значущою порівняно з аналогічними показниками клітин АКЕ без інкубації з НК (контроль) ($p < 0,05$).⁶

присутності йонів Ca^{2+} і Mg^{2+} взаємодіє з фосфатидилсерином, який на ранніх стадіях апоптозу переходить з внутрішньої мембрани клітини на зовнішню. Клітинна мембрана живих клітин непроникна для PI. Однак при незворотньому пошкодженні клітини (некроз) PI проходить через клітинну мембрану та здатен до інтерналізації з дефрагментованою ДНК. Подвійне фарбування анексіном-V і пропідій-йодидом свідчить про пізні стадії апоптозу.

Встановлено, що в контрольних зразках, незалежно від часу інкубації, кількість живих клітин (An^-/PI^-) становила $90 \pm 2,3\%$, раннього апоптозу (An^+/PI^-) — $1,34 \pm 0,67\%$, пізнього апоптозу (An^+/PI^+) — $1,26 \pm 0,13\%$, а некрозу (An^-/PI^+) — $3,16 \pm 0,42\%$.

Додавання НК до клітин АКЕ призвело до поступового пониження частки живих клітин (An^-/PI^-) протягом усього періоду спостереження (від $83,32 \pm 5,45$ після 1 часу до $70,10 \pm 3,78\%$ після 4 годин інкубації). При цьому кількість клітин, які знаходились у стані раннього апоптозу (An^+/PI^-), практично не змінювалася протягом 1–4 годин і вірогідно не відрізнялася від значень контролю.

Показано, що НК здатні вже через 1 годину інкубації викликати статистично значуще збільшення кількості пухлинних клітин у стані пізнього апоптозу (An^+/PI^+) та некрозу (An^-/PI^+) (рис. 6). Це узгоджується з даними Rehm M. та співавторів [22], що початкова фаза апоптозу, яка передбачає деполяризацію мітохондрій, є відносно швидким процесом. Час між деполяризацією мітохондрій та активацією низки каспаз, що є ознакою пізнього апоптозу, зазвичай становить близько 30 хвилин [22].

Пролонгація впливу НК зумовила різну динаміку: кількість клітин в стані пізнього апоптозу (An^+/PI^+) поступово зменшувалася з $9,58 \pm 7,54\%$ (1 час інкубації) до $2,79 \pm 0,32\%$ на третю годину, за-

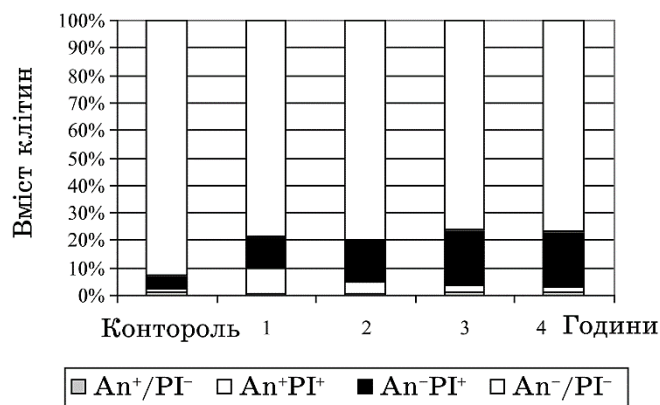


Рис. 6. Співвідношення апоптотичних/некротичних клітин, які були виявлені шляхом фарбування анексіну-V/PI у клітинах АКЕ до (А) та після (Б) інкубації з НК протягом 1, 2, 3 і 4 годин.⁷

лишаючись на цьому рівні до 4-ї години ($2,06 \pm 0,11\%$).

Навпаки, протягом всього терміну спостереження встановлено збільшення відсотка некротичних клітин (Ap^-/PI^+) у порівнянні з контролем (рис. 6). Цей показник досягав максимальних значень після трьох годин інкубації ($19,29 \pm 2,43\%$; рис. 6).

Отже, одержані дані уможливають висловити припущення, що НК належать до тих унікальних сполук, які одночасно можуть викликати кілька видів загибелі клітин. Сполуки, що діють подібним чином, відомі [23]. Автори пов'язують це з одночасним ушкодженням як внутрішньої, так і зовнішньої мітохондріальної мембрани. При порушенні внутрішньої мембрани мітохондрій змінюється мембранний потенціал, що є передумовою загибелі клітин шляхом некрозу. З іншого боку, при пошкодженні зовнішньої мітохондріальної мембрани відбувається звільнення цитохрому С, що викликає апоптоз. Вищенаведені власні експериментальні дані стосовно порушення функції мітохондрій протягом усього часу спостереження свідчать про те, що подібним чином можуть діяти й застосовані гібридні НК.

Звертає на себе увагу той факт, що інкубація пухлинних клітин протягом трьох годин спричинила найбільшу загибель клітин шляхом некрозу, і це супроводжувалося максимальним пониженням метаболічної активності мітохондрій. Це має важливе значення для подальшого розвитку/інактивації пухлинного процесу. Вважається, що однією з причин неефективності протипухлинної імунної відповіді організму та формування імунологічної толерантності при злоякісних пухлинах є саме активація загибелі клітин шляхом апоптозу [24]. Відомо, що саме апоптотичний шлях загибелі клітин призводить до активації фагоцитозу без наслідків для організму у вигляді альтерації та запалення [25]. У разі загибелі пухлинних клітин шляхом некрозу відбувається вивільнення ДНК, РНК і пухлиноспецифічних білків, які є DAMPs (damage-associated molecular patterns) і розпізнаються імунною системою, ініціюючи специфічну для пухлини імунну відповідь [26]. Вивільнення DAMPs і загибелі клітин шляхом некрозу призводять до активації сигнального шляху TLR4, що сприяє посиленню напрацювання транскрипційного фактора NF- κ B, що зумовлює посилення продукування прозапальних цитокінів і розвиток імунозапального процесу [27].

Отже, залежно від способу загибелі клітин, в організмі пухлинноносія може розвиватися як імунозапальний, так і імуносупресивний стан. Це свідчить про необхідність перегляду лікувальних стратегій і націлювання їх на «перемикання» механізму загибелі пухлинних клітин з апоптотичного на некротичний. Вищенаведені дані свідчать про те, що ці НК здатні до вирішення саме цього завдання.

Це припущення отримало експериментальне підтвердження *in vivo* шляхом оцінки інтенсивності розвитку АКЕ з клітин, які попередньо були проінкубовані з НК протягом різного часу (1–4 годи-

ни) (табл. 2). Статистично значуще пониження абсолютної кількості клітин, що сформувалися у ПП тварин, відзначено лише після двогодинної інкубації клітин АКЕ з наноконплексами. Цей показник досягав мінімальних значень у групах з індукцією онкопатології клітинами, які були проінкубовані з НК не менш трьох годин. Це зумовило пониження інтенсивності росту пухлини *in vivo* під дією НК в усіх дослідних групах у порівнянні з контролем. Найбільш істотне пониження цього показника спостерігалось після 3 і 4 годин інкубації з НК ($33,16 \pm 4,67\%$ і $31,95 \pm 3,81$ відповідно). Істотно, що показник ступеня інгібіції росту АКЕ, який є дзеркальним відображенням інтенсивності росту пухлини, мав найбільші показники після чотирогодинного оброблення НК, залишаючись на тому ж рівні, що і після трьох годин інкубації.

Таким чином, одержані дані свідчать про те, що тільки після тригодинної інкубації НК з клітинами АКЕ відмічено прояв ними значного протипухлинного ефекту. Успішна реалізація такої здатності створених гібридних НК передбачає реалізацію багатоступінчастого каскадного процесу, а саме, їх проникнення, накопичення

ТАБЛИЦЯ 2. Показники інтенсивності росту культури АКЕ після оброблення НК.⁸

Група	Об'єм асциту, мл	Концентрація пухлинних клітин в мл, $\times 10^7$	Абс. кількість клітин в ПП, $\times 10^7$	Інтенсивність росту пухлини, %	Ступінь інгібіції росту пухлини, %
АКЕ (контроль)	$5,84 \pm 0,77$	$9,54 \pm 1,55$	$55,09 \pm 7,56$	100	—
АКЕ + НК 1 година	$4,5 \pm 0,64^{4,5}$	$11,10 \pm 0,84^{4,5}$	$49,5 \pm 3,74^{4,5}$	$89,85 \pm 6,87^{4,5}$	$18,15 \pm 2,56^{4,5}$
АКЕ + НК 2 години	$3,8 \pm 0,72^1$	$10,75 \pm 0,94^{4,5}$	$40,66 \pm 5,41^{4,5}$	$73,81 \pm 8,23^{4,5}$	$22,14 \pm 3,67^{4,5}$
АКЕ + НК 3 години	$2,9 \pm 0,43^{1,2}$	$6,37 \pm 0,72^{1,2,3}$	$18,27 \pm 1,23^{1,2,3}$	$33,16 \pm 4,67^{2,3}$	$66,84 \pm 4,50^{2,3}$
АКЕ + НК 4 години	$3,1 \pm 0,27^{1,2}$	$5,68 \pm 0,64^{1,2,3}$	$17,6 \pm 1,58^{1,2,3}$	$31,95 \pm 3,81^{2,3}$	$68,05 \pm 5,78^{2,3}$

Примітка: різниця є статистично значущою порівняно з показниками: 1 — клітин АКЕ без попередньої інкубації з НК (контроль), 2 — клітин АКЕ, інкубованих з НК 1 годину, 3 — клітин АКЕ, інкубованих з НК 2 години, 4 — клітин АКЕ, інкубованих з НК 3 години, 5 — клітин АКЕ, інкубованих з НК 4 години ($p < 0,05$).

всередині клітин, порушення функції мітохондрій з подальшою індукцією апоптотичних і некротичних змін. Абсолютно не виключене існування «альтернативних» механізмів реалізації протипухлинної дії НК. Як було встановлено у попередніх наших дослідженнях, оброблення клітин АКЕ гібридними НК приводило до формування пулу клітин пухлини з пониженим ступенем експресії генів плюріпотентності, в першу чергу, NANOG, що є ключовим у визначенні самопідтримки СРК [13]. В цілому, одержані результати доповнюють уявлення про механізми реалізації протипухлинної терапії гібридними НК на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів і ті чинники, які можуть впливати на них.

4. ВИСНОВКИ

1. Встановлено залежність прояву протипухлинного ефекту наноконкомплексів на основі наночастинок ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$ і холестерину від часу їхньої попередньої взаємодії з клітинами пухлини.
2. Максимальну реалізацію протипухлинного впливу гібридних НК виявлено після трьох годин інкубації їх з клітинами АКЕ, що передбачає проникнення, накопичення всередині клітин, ушкодження функції мітохондрій з подальшою індукцією апоптотичних і некротичних змін. Встановлений факт загибелі клітин пухлини під дією НК переважно шляхом некрозу має важливе значення для подальшої інактивації пухлинного процесу.
3. Подвійне забарвлення клітин АКЕ гібридними наноконкомплексами та моноклональними антитілами до CD44-структури уможливило встановити переважне накопичення НК у CD44^{high}-субпопуляції, яка має найбільший туморогенний потенціал. Це підтверджує, що реалізація антипроліферативних властивостей гібридних НК може здійснюватися шляхом інгібіції функції стовбурових пухлинних клітин.
4. В експериментальних умовах *in vivo* обґрунтовано можливість використання гібридних наноконкомплексів з метою ідентифікації стовбурових ракових клітин і пригнічення росту пухлини, що уможливорює віднести дані наноконкомпозити до перспективних препаратів діагностики та лікування злоякісних новоутворень.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. K. Greish, *Methods Mol. Biol.*, **624**: 25 (2010); <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-23>.
2. C. Rozzo, D. Sanna, E. Garribba, M. Serra, A. Cantara, G. Palmieri, and M. Pisano, *J. Inorg. Biochem.*, **174**: 14 (2017); <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.010>.
3. A. M. Kordowiak, A. Klein, A. Goc, and W. Dabroś, *Pol. J. Pathol.*, **58**, No. 1: 51

- (2007).
4. P. Holko, J. Ligeza, J. Kisielewska et al., *Pol. J. Pathol.*, **59**: 3 (2008).
 5. J. J. Rodriguez-Mercado, R. A. Mateos-Nava, and M. A. Altamirano-Lozano, *Toxicol. In Vitro*, **25**: 1996 (2011); [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00432-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00432-5).
 6. M. S. Molinuevo, D. A. Barrio, A. M. Cortizo, and S. B. Etcheverry, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **53**, No. 2: 163 (2004); <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0708-7>.
 7. J. Korbecki, I. Baranowska-Bosiacka, I. Gutowska, and D. Chlubek, *Acta Biochim. Pol.*, **59**, No. 2: 195 (2012).
 8. A. N. Goltsev, N. N. Babenko, Y. A. Gaevskaya, N. A. Bondarovich, M. V. Ostantkov, O. V. Chelombytko, T. G. Dubrava, V. K. Klochkov, N. S. Kavok, and Yu. V. Malyukin, *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, **11**, No. 4: 729 (2013) (in Russian); А. Н. Гольцев, Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская, Н. А. Бондарович, М. В. Останков, О. В. Челомбитко, Т. Г. Дубрава, В. К. Клочков, Н. С. Кавок, Ю. В. Малюкин, *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*, **11**, № 4: 729 (2013); https://www.imp.kiev.ua/nanosys/en/articles/2013/4/nano_vol11_iss4_p0729p0739_2013_abstract.html.
 9. A. Wilk, D. Szypulska-Koziarska, and B. Wiszniewska, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **71**: 850 (2017); <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.4783>.
 10. A. M. Goltsev, N. M. Babenko, Y. O. Gaevska, T. G. Dubrava, M. V. Ostantkov, M. O. Bondarovich, O. V. Chelombytko, Yu. V. Malyukin, V. K. Klochkov, and N. S. Kavok, *Integrativna Antropologija*, No. 1: 77 (2017) (in Ukrainian); А. М. Гольцев, Н. М. Бабенко, Ю. О. Гаевська, Т. Г. Дубрава, М. В. Останков, М. О. Бондарович, О. В. Челомбитко, Ю. В. Малюкин, В. К. Клочков, Н. С. Кавок, *Інтегративна антропологія*, No. 1: 77 (2017).
 11. V. K. Klochkov, *Method for Producing Water Dispersion of Cholesterol* (Patent 10801 U IPC (2015.01), A61K 9/10 (2006.01), A61K 47/02 (2006.01), C07J 9/00. (Bulletin No. 5) (2015)) (in Ukrainian); В. К. Клочков, *Спосіб отримання водної дисперсії холестерину* (Патент на винахід 10801 Україна МПК (2015.01), А61К 9/10 (2006.01), А61К 47/02 (2006.01), С07J 9/00. (Бюл. № 5) (2015)).
 12. A. Al-Jarallah and B. L. Trigatti, *Biochim. Biophys. Acta*, **1801**, No. 12: 1239 (2010); <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2010.08.006>.
 13. A. N. Goltsev, N. N. Babenko, Y. A. Gaevskaya, O. V. Chelombytko, N. A. Bondarovich, T. G. Dubrava, M. V. Ostantkov, A. Yu. Dimitrov, V. K. Klochkov, N. S. Kavok, and Yu. V. Malyukin, *Genes and Cells*, **10**, No. 2: 54 (2015) (in Russian); А. Н. Гольцев, Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская, О. В. Челомбитко, Н. А. Бондарович, Т. Г. Дубрава, М. В. Останков, А. Ю. Димитров, В. К. Клочков, Н. С. Кавок, Ю. В. Малюкин, *Гены и клетки*, **10**, № 2: 54 (2015).
 14. A. N. Goltsev, Yu. V. Malyukin, T. G. Dubrava, N. N. Babenko, Y. A. Gaevskaya, O. V. Chelombytko, N. A. Bondarovich, L. V. Ostankova, A. Yu. Dimitrov, V. K. Klochkov, and N. S. Kavok, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, **47**, Nos. 2–3: 156 (2016); <https://doi.org/10.1002/mawe.2016004571>.
 15. A. N. Goltsev, N. N. Babenko, Y. A. Gaevskaya, N. A. Bondarovich, T. G. Dubrava, M. V. Ostantkov, O. V. Chelombytko, Y. V. Malyukin, V. K. Klochkov, and N. S. Kavok, *Nanoscale Res. Lett.*, **12**, No. 1: 415 (2017);

- <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2175-9>.
16. V. Klochkov, N. Kavok, G. Grygorova, O. Sedyh, and Y. Malyukin, *Mater. Sci. Eng. Biol. Appl.*, **33**, No. 5: 2708 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.046>.
 17. J. D. Trono, K. Mizuno, N. Yusa, T. Matsukawa, K. Yokoyama, and M. Uesaka, *J. Radiat. Res.*, **52**, No. 1: 103 (2010); <https://doi.org/10.1269/jrr.10068>.
 18. *LSM 510 and LSM 510 META. Laser Scanning Microscopes: Operating Manual*. Release 3.2.
 19. V. K. Klochkov, *Nanostruktturnoye Materialovedenie*, No. 2: 3 (2009) (in Ukrainian); B. K. Клочков, *Наноструктурное материаловедение*, № 2: 3 (2009).
 20. A. M. Goltsev, M. O. Bondarovich, N. M. Babenko et al., *Cell Tissue Bank.*, **20**, No. 3: 411 (2019); <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09780-9>.
 21. I. R. Indran, G. Tufo, S. Pervaiz, and C. Brenner, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, No. 6: 735 (2011); <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.03.010>.
 22. M. Rehm, H. Dussmann, R. U. Janicke, J. M. Tavaré, D. Kogel, and J. H. Prehn, *J. Biol. Chem.*, **277**, No. 27: 24506 (2002).
 23. S. Arakawa, I. Nakanomyo, Y. Kudo-Sakamoto, H. Akazawa, I. Komuro, and S. Shimizu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **467**, No. 4: 1006 (2015); <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.022>.
 24. S. Fulda, *Front. Oncol.*, **3**: 29 (2013); <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00029>.
 25. S. Nagata and M. Tanaka, *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, No. 5: 333 (2017); <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>.
 26. N. J. Sathianathen, S. Krishna, J. K. Anderson, C. J. Weight, S. Gupta, B. R. Konety, and T. S. Griffith, *Immunotargets Ther.*, **6**: 83 (2017); <https://doi.org/10.2147/ITT.S134850>.
 27. J.-L. Luo, H. Kamata, and M. Karin, *J. Clin. Invest.*, **115**, No. 10: 2625 (2005); <https://doi.org/10.1172/JCI26322>.

¹*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, N.A.S. of Ukraine, 23, Pereyaslavs'ka Str., UA-61016 Kharkiv, Ukraine*

²*Institute for Scintillation Materials, N.A.S. of Ukraine, 60, Nauky Ave., UA-61001 Kharkiv, Ukraine*

¹ Fig. 1. The number of EAC cells (a) and their viability (b) before and after incubation with NCs. Note: * the difference is statistically significant compared to similar indicators of EAC cells without incubation with NCs (control) ($p < 0.05$).

² Fig. 2. Fluorescence intensity of the general population of EAC cells (rectangular columns) and fluorescence of individual cells (marker) after incubation with NCs for 1, 2, 3 and 4 hours.

³ Fig. 3. Confocal microscopy of EAC cells after incubation with NCs for 1, 2, 3 and 4 hours (on the left, magnification is 40; on the right, magnification is 10). Note: the photo on the right shows the number of cells with ultra-high level of fluorescence intensity.

⁴ Fig. 4. Double colouring of EAC cells with both hybrid NCs and monoclonal antibodies to CD44 structure.

⁵ TABLE 1. Indicators of the intensity of fluorescence of EAC cells after their double coloration.

⁶ Fig. 5. Metabolic activity of EAC cells before and after incubation with NCs. Note: * the difference is statistically significant compared to similar indicators of EAC cells without incubation with NCs (control) ($p < 0.05$).

⁷ Fig. 6. The ratio of apoptotic/necrotic cells, which were detected by staining Annexin V/PI in EAC cells before (A) and after (B) incubation with NCs for 1, 2, 3 and 4 hours.

⁸ TABLE 2. Indicators of the intensity of EAC culture growth after processing with NCs.