

УДК: 616-006.04: 577.352:(615+544.7)

ВПЛИВ ФУЛЕРЕНІВ C₆₀ НА ВИЖИВАНІСТЬ КЛІТИН MCF-7 РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЗА ТРИВАЛОЇ ІНКУБАЦІЇ

І. І. Гринюк¹О. М. Перепелиціна²С. В. Прилуцька¹Л. В. Гарманчук¹Н. М. Храновська³О. П. Матишевська¹М. В. Сидоренко²¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка²Відділення біотехнічних проблем діагностики

Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

³Національний інститут раку, Київ, Україна

E-mail: igrynyuk@yahoo.com

Досліджено вплив пристінних фулеренів C₆₀ (10⁻⁵ М) на виживаність клітин MCF-7 раку молочної залози за тривалої інкубації без заміни культурального середовища. Встановлено, що на початковому етапі інкубації після внесення фулеренів C₆₀ у середовище культивування відбувається збільшення кількості клітин у S-фазі, однак у подальшому спостерігається затримка клітин у фазі G₂/M, втрата здатності до формування відростків та зниження вмісту життєздатних клітин у популяції. За дії фулеренів C₆₀ у субпопуляції, що виживає через 6 дб, збільшується вміст клітин у S-фазі.

Ключові слова: фулерени C₆₀, клітини MCF-7 раку молочної залози.

На сьогодні активно вивчаються можливості застосування модуляторів виживання пухлинних клітин з метою пригнічення їх проліферації. Здатність до проліферації, метастазування та міграції злоякісно трансформованих клітин значною мірою залежить від їхніх адгезивних властивостей та участі позаклітинного матриксу в регуляції клітинного циклу.

Раніше нами було виявлено, що можливими модифікаторами адгезивного потенціалу пухлинних клітин MCF-7 можуть бути фулерени C₆₀ [1]. Завдяки малим розмірам та гідрофобності фулерени C₆₀ здатні взаємодіяти з біологічними молекулами, вбудовуватись у мембрани та виявляти біологічні ефекти [2]. Вплив фулеренів C₆₀ на клітинні мембрани здійснюється різними шляхами — адсорбуванням на поверхні, вбудовуванням у ліпідний бішар та/або зв'язуванням із мембранними протеїнами [2–4]. Існують дані щодо впливу фулеренів C₆₀ на взаємодію епітеліальних клітин з елементами позаклітинного матриксу [5], експресію адгезивного протеїну ICAM-1 в ендотеліальних клітинах [6], проведення регуляторних сигналів у клітинах гепатоми [7].

Одним із підходів до пошуку сполук, здатних впливати на показники життєздатності пухлинних клітин, зокрема клітин MCF-7 аденокарциноми молочної залози, є тривале інкубування без заміни культурального середовища (модель «unfed culture») [8, 9]. Клітини MCF-7 характеризуються високим клоногенним і метастатичним потенціалом та здатністю до прогресії за умов нестачі живильних субстратів. Метою роботи було оцінити вплив фулеренів C₆₀ на виживаність, розподіл за фазами клітинного циклу та морфологічний стан клітин MCF-7 у динаміці їх тривалої інкубації без заміни культурального середовища.

Матеріали і методи

Клітинна лінія та умови культивування. Дослідження виконано на клітинній лінії MCF-7 (рак молочної залози людини), наданій доктором І. Гутом (Людвіговський раковий інститут, Лондон). Клітини (180 ± 6 тис./мл) висаджували у 24-лункові планшети та інкубували в середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 15% FCS (Sigma, США) і 40 мкг/мл гентаміцину

за стандартних умов, в атмосфері 100% вологості та 5% CO₂. Через 24 год адаптивного періоду до клітин додавали фулерени C₆₀ (кінцева концентрація 10⁻⁵ М) та інкубували упродовж іще 5 діб без заміни культурально-го середовища. Клітини в контролі інкубували без внесення фулеренів C₆₀.

Стабільні водні колоїдні розчини пристінних фулеренів C₆₀ (72 мкг/мл, чистота >99,5%) було виготовлено в хімічній лабораторії Технічного університету Ільменау (Німеччина) [3] й люб'язно надано професором П. Шарффом.

Оцінювання кількості життєздатних клітин упродовж інкубаційного періоду здійснювали з використанням стандартного тесту виключення барвника трипанового синього. Загальну кількість клітин у суспензії визначали після їх відкріплення від субстрату з використанням розчину Версена [10]. Підрахунок кількості клітин виконували в камері Горяєва.

Аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу здійснювали з використанням обладнаного аргоним лазером ($\lambda_{\text{збуд}} = 488 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{еміс}} = 585/40 \text{ нм}$) протокового цитофлуориметра (Becton Dickinson, США). Відкріплені від субстрату клітини відмивали у середовищі RPMI 1640 та оцінювали (10 тис. клітин) за показниками світлорозсіювання з метою виключення дебрису. Після додавання розчину, що містив йодистий пропідій (10 мкг/мл), 0,1% -й тритон X-100 та РНК-азу А (2,5 мкг/мл), проби аналізували із застосуванням програми Mod Fit LT 3.0 (BDIS, USA), як описано в [11].

Морфологічні показники. Для оцінювання морфологічного стану клітини (180 ± 6 тис/мл) висаджували на предметні скельця, які вміщували в 6-лункові планшети. Після інкубації клітини фіксували на скельцях упродовж 30 хв при кімнатній температурі з використанням суміші спирт-формальдегід (1:3), промивали 0,9% -м NaCl, профарбовували розчином азур-еозину та гематоксилін-еозину (1:1) упродовж 10–20 хв. Фотографування препаратів клітин проводили застосовуючи цифрову фотокамеру Digital Still Camera з об'єктивом Carl Zeiss Vario-Sonar (32-кратне збільшення).

Статистичну обробку результатів здійснювали за критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Зображена на рис. 1 крива 1 демонструє кінетику виживаності клітин MCF-7 у контролі в досліджуваній термін інкубації. Упро-

довж трьох діб після висаджування кількість клітин у популяції значно збільшується, це узгоджується з тривалістю клітинного циклу клітин MCF-7, який коливається у межах 33–75 год залежно від умов культивування [12]. У подальший термін інкубації (3–4 доби) спостерігається уповільнення росту клітин, про що свідчить також зменшення кількості клітин у S-фазі та збільшення — у G₂-фазі (рис. 2, Б). Після чотирьох діб культивування клітини гинуть через нестачу поживних речовин у культуральному середовищі.

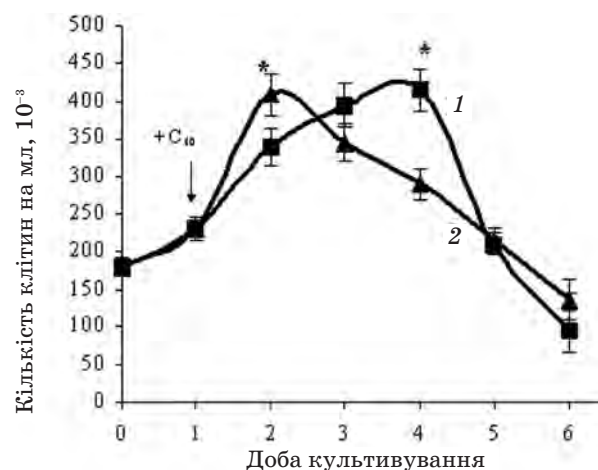


Рис. 1. Виживаність клітин MCF-7 упродовж культивування у контролі (1) та після додавання фулеренів C₆₀ (10⁻⁵ М) (2)

*P < 0,05 порівняно з контролем, n = 6

Фулерени C₆₀ впливають на виживаність клітин MCF-7 та їх розподіл за фазами клітинного циклу. Так, на початковому етапі інкубації після внесення фулеренів C₆₀ у середовище спостерігається прискорення росту клітин (рис. 1) та збільшення кількості клітин, які перебувають на стадії реплікативного синтезу ДНК (рис. 2, А). Проте у подальший термін інкубації виявляється цитотоксичний ефект фулеренів C₆₀ — через 3 доби після внесення фулеренів C₆₀ у середовище культивування кількість живих клітин знижується на 30% порівняно з контролем (рис. 1). Нами встановлено також, що в цей термін інкубації після внесення фулеренів C₆₀ у популяції підвищується вміст мертвих клітин (36 ± 4 тис/мл) порівняно з контролем (22 ± 3 тис/мл).

Виявлені наслідки дії фулеренів C₆₀ можуть бути пов'язані зі змінним проходженням клітин MCF-7 через мітотичний цикл. Дані, отримані через 2 доби після внесення C₆₀ у культуральне середовище, вказують на

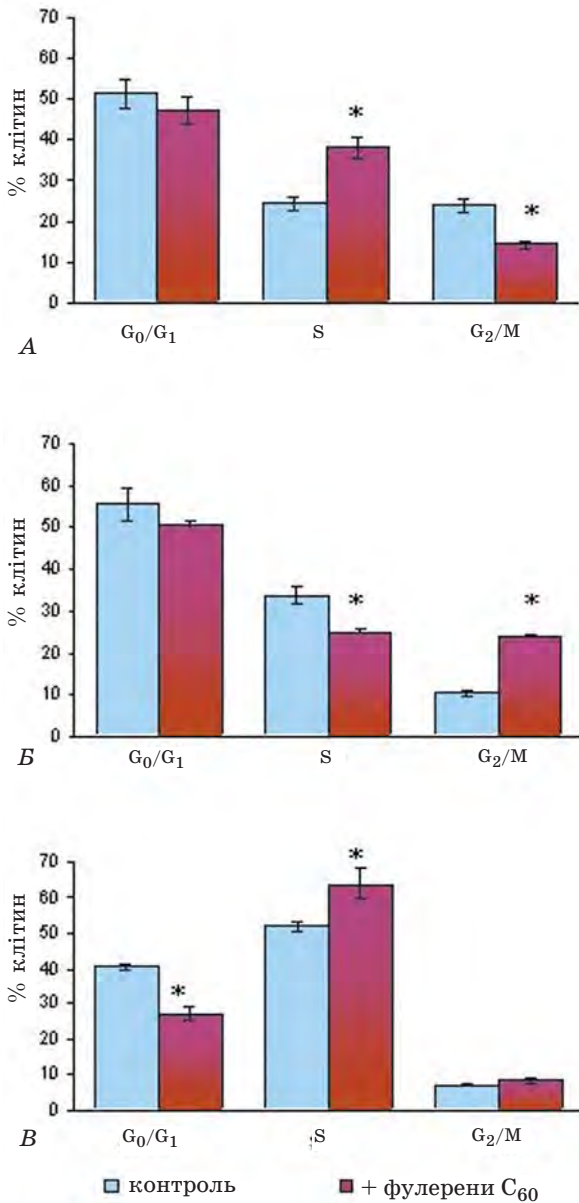


Рис. 2. Розподіл клітин MCF-7 за фазами клітинного циклу через 1 (А), 2 (Б), та 5 (В) діб після внесення фулеренів C₆₀ у культуральне середовище.

Контроль — клітини, інкубовані за відсутності C₆₀; *P < 0,05 порівняно з контролем, n = 5

те, що входження клітин у S-фазу пригнічується, а клітини, що завершили синтез ДНК і вступили в G₂/M, зазнають затримки у цій фазі. Так, вміст в G₂/M-фазі клітин, інкубованих із C₆₀, удвічі перевищує показник у контролі (рис. 2, Б). Слід зазначити, що блокування клітинного циклу у фазі G₂/M з подальшою індукцією загибелі клітин є характерним виявом дії протипухлинних препаратів [13, 14, 15].

Необхідною умовою проліферації *in vitro* клітин MCF-7 є формування фокусів адгезії,

яке залежить від експресії специфічних мембранних адгезивних протеїнів. На третю добу культивування у популяції контрольних клітин виявляються розпластані на субстраті клітини, що формують видовжені відростки (позначено стрілками на рис. 3, А). Під час інкубації у присутності фулеренів C₆₀ клітини стають округлішими і не утворюють відростків (рис. 3, Б). Такі результати морфологічного аналізу узгоджуються з раніше отриманими нами даними щодо зниження показника адгезії до субстрату клітин MCF-7 через 2 доби після інкубації з фулеренами C₆₀ [1] і демонструють взаємозв'язок між зміною адгезивних властивостей клітин MCF-7 та їх проходженням через клітинний цикл за дії фулеренів C₆₀.

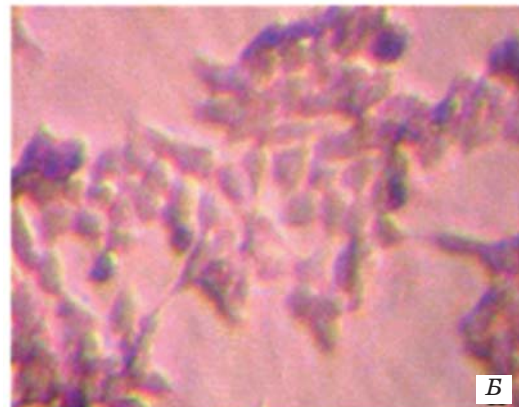
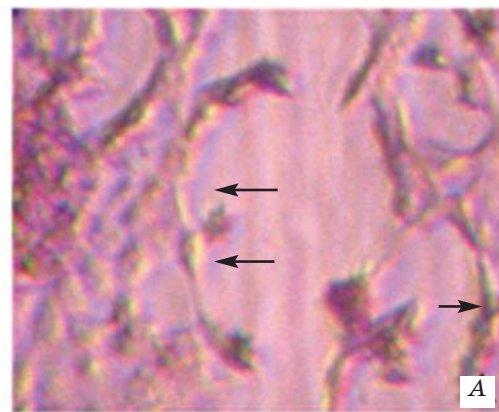


Рис. 3. Мікрофотографії клітин MCF-7 через 3 доби культивування у контролі (А) та за умови внесення фулеренів C₆₀ (Б)

Кількість клітин, що вижили через 6 діб культивування, є незначним — 95 ± 11 тис./мл, а вміст мертвих становить 145 ± 15 тис./мл. Клітини, що вижили, характеризуються значним проліферативним потенціалом, оскільки 51% перебуває у S-фазі (рис. 2, В).

Після внесення фулеренів C_{60} вміст мертвих клітин у цей термін підвищується до 215 ± 18 тис./мл. Водночас за дії фулеренів C_{60} спостерігається підвищення кількості клітин у S-фазі. Виявлений ефект фулеренів C_{60} може бути використаний для прискорення переходу $G_0/G_1 \rightarrow S$ клітин MCF-7 у клоногенній субпопуляції, що виживає за умов нестачі поживних речовин у мікрооточенні, з метою подальшого цільового впливу на цю субпопуляцію протипухлинних агентів.

Механізм дії фулеренів C_{60} ще не з'ясовано. Він може бути реалізованим на декількох рівнях впливу — на елементи позаклітинного матриксу, на структурно-функціональний стан плазматичної мембрани або ж на механізми проведення регуляторних сигналів шляхом активації/інактивації циклізуючих кіназ чи інших внутрішньоклітинних медіаторів прогресії клітинного циклу [6, 7].

Таким чином, отримані дані свідчать про вплив фулеренів C_{60} на показники життєздатності клітин MCF-7 за умов культивування без заміни культурального середовища. На початковому етапі інкубації після внесення фулеренів C_{60} у середовище культивування спостерігається прискорення росту клітин та збільшення кількості клітин у S-фазі. Однак у подальшому відбувається затримка клітин у фазі G_2/M , втрата здатності до формування відростків та зниження вмісту життєздатних клітин MCF-7 у популяції. За дії фулеренів у субпопуляції, що виживає упродовж тривалої інкубації, збільшується вміст клітин у S-фазі, що є важливим для пошуку шляхів підвищення ефективності дії протипухлинних препаратів.

Роботу виконано за підтримки Національної академії наук України в рамках програми «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології», договір № 127/08-Н.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гарманчук Л. В., Перепелиціна О. М., Гринюк І. І. та ін. Фулерени C_{60} змінюють адгезивні властивості клітин раку молочної залози MCF-7 // Доп. НАНУ. — 2009. — №4. — С. 164–167.
2. Foley S., Crowley C., Smaih M. et al. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2002. — V. 294. — P. 116–119.
3. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Matyshevska O. P. et al. Biological effects of C_{60} fullerenes *in vitro* and *in a model* system // Mol. Cryst. Liq. Cryst. — 2007. — V. 468. — P. 265–274.
4. Higgins M. J., Polcik M., Fukuma T. et al. Structured water layers adjacent to biological membranes // Biophys. J. — 2006. — V. 91 (7). — P. 2532–42.
5. Straface E., Natalini B., Monti D. et al. C3-fullerene-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell adhesion ability // FEBS Lett. — 1999. — V. 454 (3). — P. 335–40.
6. Gelderman M. P., Simakova O., Clogston J. D. et al. Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ induced tissue factor and ICAM-I membrane expression and apoptosis *in vitro* // Int. J. Nanomed. — 2008. — V. 3(1). — P. 59–68.
7. Huang Y. L., Shen C. R., Luh T. Y et al. Blockage of apoptotic signaling of transforming growth factor-beta in human hepatoma cells by carboxyfullerene // Eur. J. Biochem. — 1998. — V. 254 (1). — P. 38–43.
8. Sheridan J. W., Bishop C. J., Simmons R. J. Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human melanoma cell line // J. Cell Sci. — 1981. — V. 49. — P. 119–137.
9. Pyaskovskaya O. N., Kolesnik D. L., Kolobov A. V. et al. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture // Exp. Oncol. — 2008. — N4. — P. 269–275.
10. Garmanchuk L. V., Pyaskovskaya O. N., Yanish Yu. V. et al. Influence of aconitine-containing herbal extract BC1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells // Ibid. — 2005. — V. 27 (4). — P. 262–266.
11. Кульчигов А. Е., Моложавая О. С., Скачкова О. В. и др. Сравнительное изучение иммунокорригирующего действия нейропептидных препаратов при острой экспериментальной цереброваскулярной патологии // Цитокины и воспаление. — 2009. — №3. — С. 18–23.
12. Cos S, Sanchez-Barcelo E. J. Melatonin inhibition of MCF-7 human breast-cancer cells growth: influence of cell proliferation rate // Cancer Lett. — 1995. — V. 93 (2). — P. 207–212.
13. Alhasan S. A., Pietraszkiewicz H., Alonso M. D. et al. Genistein-induced cell cycle arrest and apoptosis in a head and neck squamous cell carcinoma cell line // Nutr. Cancer. — 1999. — V. 34. — P. 12–19.
14. Lee T. K., Lau T. C., Ng I. O. Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines // Canc. Chemoth. Pharm. — 2002. — V. 49. — P. 78–86.
15. Tanaka Y., Fujiwara K., Tanaka H. et al. Paclitaxel inhibits expression of heat shock protein 27 in ovarian and uterine cancer cells // Int. J. Gynecol. Canc. — 2004. — V. 14. — P. 616–620.

**ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНОВ C₆₀
НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК
MCF-7 РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ИНКУБАЦИИ**

*И. И. Гринюк¹
Е. М. Перепелицина²
С. В. Прилуцкая¹
Л. В. Гарманчук¹
Н. Н. Храновская³
О. П. Матишевская¹
М. В. Сидоренко²*

¹Київський національний університет
імені Тараса Шевченка

²Отделение биотехнических проблем
диагностики Института проблем
криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

³Національний інститут рака, Київ

E-mail: igrynyuk@yahoo.com

Изучено влияние изначальных фуллеренов C₆₀ (10⁻⁵ М) на выживаемость клеток линии MCF-7 рака молочной железы при длительном культивировании без замены культуральной среды. Показано, что на начальном этапе инкубации после внесения фуллеренов C₆₀ в среду культивирования происходит увеличение количества клеток в S-фазе. При дальнейшем культивировании наблюдается задержка клеток в фазе G₂/M, потеря способности к формированию отростков и снижение содержания жизнеспособных клеток в популяции. При действии фуллеренов C₆₀ в субпопуляции, выжившей через 6 суток, увеличивается содержание клеток в S-фазе.

Ключевые слова: фуллерены C₆₀, клетки MCF-7 рака молочной железы.

**INFLUENCE OF FULLERENES C₆₀
ON THE SURVIVABILITY OF BREAST
CANCER CELL LINE MCF-7 DURING
LONG-TERM INCUBATION**

*I. I. Grynyuk¹
O. M. Perepelytsina²
S. V. Prylutska¹
L. V. Garmanchuk¹
N. N. Khranovska³
O. P. Matyshevska¹
M. V. Sydorenko²*

¹Kyiv National Taras Shevchenko University

²Institute for Problem of Cryobiology
and Cryomedicine of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

³Kyiv National Institute of Cancer

E-mail: igrynyuk@yahoo.com

Effects of pristine fullerenes C₆₀ on breast cancer cells MCF-7 survivability during long-term cultivation were studied. Treatment with fullerenes C₆₀ (10⁻⁵ M) resulted in increasing of the number of cells in G₂/M phase, changes in cells morphology, decreasing of the number of survival cells and their synchronization in S-phase.

Key words: fullerenes C₆₀, breast cancer cells MCF.