

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 57.04+57.085.23

ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА C_{60} НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЛИНИИ СПЭВ

И. В. БЕЛОЧКИНА¹, И. О. ИЩЕНКО¹, С. В. ПРИЛУЦКАЯ², Е. И. БОГУЦКАЯ²,
В. В. ЧЕРЕПАНОВ³, Б. П. САНДОМИРСКИЙ¹, Ю. И. ПРИЛУЦКИЙ¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: bsan38@yahoo.com;

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев;
e-mail: prylut@ukr.net;

³Институт физики НАН Украины, Киев

Исследовано влияние водного коллоидного раствора фуллерена C_{60} на активность окислительно-восстановительных и пролиферативных процессов в клетках линии СПЭВ (перевиваемая линия клеток почки эмбриона свиньи). Показано, что присутствие фуллерена C_{60} (127 мкМ) в среде культивирования клеток линии СПЭВ на протяжении 48 ч не изменяет их способности к восстановлению нетоксичного редокс-индикатора AlamarBlue и их пролиферативной активности.

Ключевые слова: водный коллоидный раствор фуллерена C_{60} , культура клеток линии СПЭВ, метаболическая и пролиферативная активность, атомно-силовая микроскопия.

Перспективы использования фуллерена C_{60} в медицинской практике требуют всестороннего изучения возможных проявлений его токсического действия как на уровне целого организма, так и на уровне изолированных клеток. Сотни публикаций по этой проблеме за последние 20 лет свидетельствуют, с одной стороны, о постоянном интересе исследователей к биологическим эффектам этой уникальной по структуре и химическим свойствам аллотропной форме нанокристалла углерода [1–3], а с другой, – о значительной противоречивости сведений о его токсичности [4]. Известно, что токсичный эффект фуллерена C_{60} существенно зависит от концентрации, модификации поверхности его молекулы, условий синтеза и обработки [5]. Токсический эффект фуллерена C_{60} и его производных значительно отличается по отношению к различным клеточным линиям [5, 6]. Предполагается, что основными механизмами их цитотоксического действия являются вызванные ими пероксидное окисление липидов, развитие оксидативного стресса и, как следствие, генотоксичность и некроз [7]. В то же время имеются данные о способности фуллерена C_{60} предотвра-

щать развитие окислительного стресса в тимоцитах [8]. Благодаря наноразмеру и гидрофобности фуллерен C_{60} способен взаимодействовать с биомолекулами [9], встраиваться/проникать в мембраны клеток [10, 11] и обнаруживать специфические биологические эффекты, например, противоопухолевые [12–14], включающие модификацию адгезивного потенциала клеток и связанную с ним способность к делению [15].

Монослойная культура эпителиальных клеток, например, СПЭВ (перевиваемая линия клеток почки эмбриона свиньи), может рассматриваться как модель эпителиальной ткани-мишени для фуллерена C_{60} . В связи с этим целью настоящей работы было исследование влияния водного коллоидного раствора фуллерена C_{60} (ВКРФ) на метаболическую и пролиферативную активность клеток линии СПЭВ в культуре.

Материалы и методы

Получение ВКРФ и его характеристика. Для приготовления ВКРФ использовали насыщенный раствор чистого фуллерена C_{60} (~0,7 нм в диаметре) в толуоле (чистота >99,5%), концентрация C_{60} фуллерена соответствовала

максимальной растворимости $\sim 2,9$ мг/мл, и такой же объем дистиллята в открытом стакане [16, 17]. Две полученные фазы подвергали ультразвуковому воздействию. Процедуру продолжали до полного испарения толуола и до появления желтого цвета водной фазы. Фильтрацией отделяли нерастворившийся фуллерен C_{60} водной фазы раствора и получали нужный продукт. С помощью этого метода удается получить различные концентрации фуллерена C_{60} в воде – от 0,1 до 1,2 мг/мл. Полученный таким образом ВКРФ с исходной концентрацией фуллерена C_{60} ~ 127 мкМ является стабильным на протяжении 12 месяцев при температуре 4 °С.

Для подтверждения присутствия фуллерена C_{60} в воде измеряли его спектр поглощения (SQ-4802; UNICO, США) в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм при комнатной температуре, используя полиметилакрилатную кювету (1 см).

Агрегацию фуллерена C_{60} контролировали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ; коммерческая система Solver Pro M; NT-MDT, Россия). Каплю ВКРФ объемом $\sim 0,01$ мкл наносили на поверхность свежесколотой слюды (V-1 Grade, SPI Supplies) так, чтобы после растекания раствор покрывал только ограниченную часть подложки (диаметр пятна $\sim 0,8$ мм). Измерения с помощью АСМ проводили с использованием зондов NSG10 (NT-MDT) после полного испарения растворителя. Визуализацию образцов проводили в полуконтактном режиме.

Культивирование клеток линии СПЭВ и AlamarBlue-тест. Для оценки биоактивности ВКРФ при исходной концентрации в нем фуллерена C_{60} 127 мкМ использовали культуру линии СПЭВ. Клетки культивировали в 24-луночных планшетах (РАА, Австрия) с посевной дозой 10^4 клеток/см² в среде DMEM (РАА, Австрия), с добавлением 5%-го раствора эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (РАА, Австрия), пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл).

Контроль метаболической активности клеток при культивировании в среде, содержащей ВКРФ, проводили при помощи нетоксичного редокс-индикатора AlamarBlue (AbD Serotec, Великобритания), который восстанавливается в присутствии метаболически активных клеток с образованием флуоресцирующего продукта [18].

Через одни сутки культивирования в лунки вносили среду с ВКРФ и оставляли в CO_2 -

инкубаторе при 37 °С на 48 ч. После этого в среду культивирования добавляли AlamarBlue до концентрации 10% и инкубировали 2 ч при 37 °С. Флуоресценцию AlamarBlue оценивали с использованием планшетного спектрофлуориметра Tecan GENios (Tecan Inc., Австрия) при волне возбуждения 550 нм и эмиссии 590 нм. Обработку данных проводили с помощью программы XFLUOR4 v.4.50. Результаты представляли как разницу между флуоресценцией опытной и холостой (без клеток) пробы и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ). В качестве холостой пробы использовали 10%-ый раствор AlamarBlue в среде культивирования без добавления (проба 1) и с добавлением ВКРФ (проба 2).

Визуальный контроль культур проводили с помощью фазово-контрастного инвертированного микроскопа (Meiji Techno, Япония), оснащенного видеокамерой и компьютером. Количество клеток в лунке определяли с помощью программы BioVision 4.0 путем их подсчета в 10 полях зрения и последующего пересчета на площадь лунки с использованием соответствующих калибровок.

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим и непараметрическим методами [19] с использованием программы SPSS Statistics 17.0.

Результаты и обсуждение

Структурная характеристика ВКРФ. На рис. 1 представлен УФ/ВИД спектр поглощения ВКРФ фуллерена C_{60} (127 мкМ) при комнатной температуре. Как видно, доминируют три интенсивные широкие полосы поглощения с максимумами при 208, 265 и 347 нм в УФ-области спектра, что хорошо согласуется с результатами [16, 20]. Важно заметить, что с увеличением концентрации фуллерена C_{60} в ВКРФ в видимой области спектра появляются дополнительные слабые по интенсивности полосы поглощения при 450 и 622 нм [16].

Данные по динамическому рассеянию света [21] свидетельствуют, что при концентрации фуллерена C_{60} 127 мкМ в ВКРФ основная фракция светорассеивающих сфероподобных частиц по диаметру распределяется в диапазоне от 140 до 260 нм. Поэтому для отделения крупных частиц ВКРФ предварительно (перед экспериментом) центрифугировали 10 мин при 15 000 об./

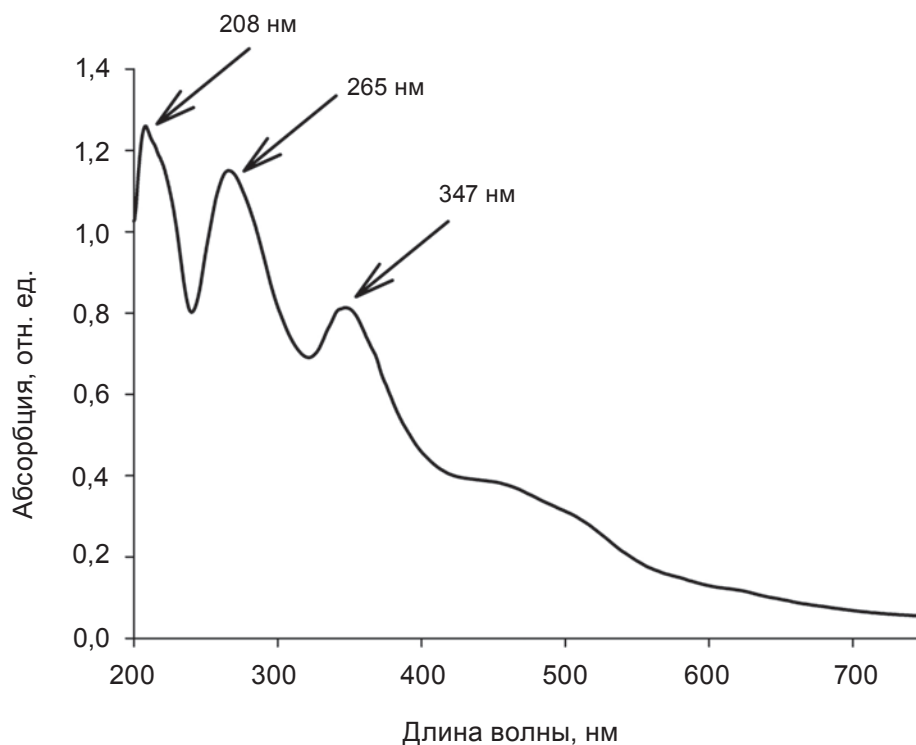


Рис. 1. Спектр поглощения ВКРФ фуллерена C_{60} (127 мкМ)

мин (5424R, Eppendorf, Германия). В результате обработки коллоидная взвесь изменяла цвет с насыщенно-желтого до почти бесцветного. Полученные изображения АСМ демонстрируют

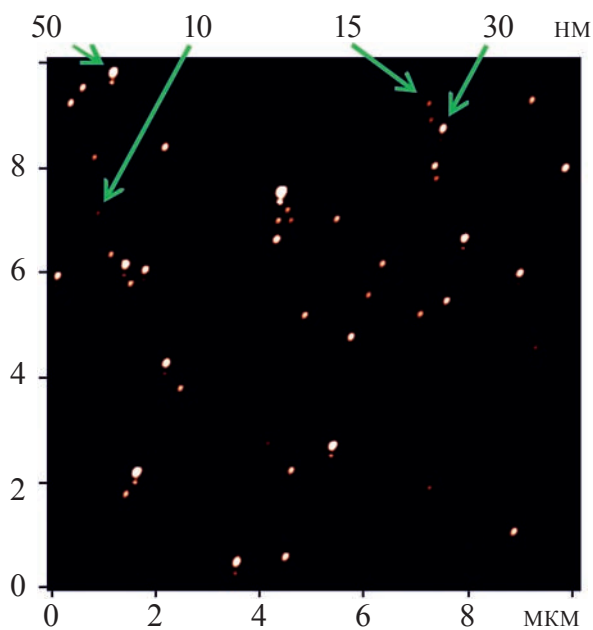


Рис. 2. АСМ изображение агрегатов фуллерена C_{60} 127 мкМ в ВКРФ на слюде (полуконтактный режим)

как отдельные молекулы фуллерена C_{60} [21], так и их агрегаты с характерным размером 10–50 нм (рис. 2), присутствующие в ВКРФ, что хорошо согласуется с теоретическими расчетами [21–23] и данными нейтронной спектроскопии [16].

Метаболическая и пролиферативная активность клеток СПЭВ в культуре. Результаты оценки активности клеток по тесту с AlamarBlue в присутствии фуллерена C_{60} (127 мкМ) представлены в таблице. Как видно, значения интенсивности флуоресценции красителя до добавления ВКРФ свидетельствуют о высокой метаболической активности клеток. Через двое суток после внесения ВКРФ интенсивность свечения восстановленной формы AlamarBlue в контроле и опыте достоверно не различается и увеличивается примерно на 80% по сравнению с таковой после суток культивирования, что говорит об увеличении количества клеток в культуре.

Параллельно с оценкой уровня восстановления AlamarBlue, являющегося интегральным показателем активности пролиферации и метаболизма клеток, определяли также количество клеток в лунках планшета. В контрольной пробе и в пробе, содержащей фуллерен C_{60} , в процес-

Изменение интенсивности свечения продукта восстановления красителя AlamarBlue и количества клеток в процессе их культивирования в присутствии фуллерена C_{60} (127 мкМ)

Пробы	Интенсивность флуоресценции (УЕФ)		Прирост интенсивности флуоресценции, %	Прирост количества клеток, %
	До введения ВКРФ	Через 48 ч после введения ВКРФ		
Контроль	14262 ± 985	26181 ± 1247	83	73
Фуллерен C_{60} *	13455 ± 1037	23949 ± 1327	78	69
Проба 1**	565 ± 42	565 ± 42	–	–
Проба 2**	548 ± 51	548 ± 51	–	–

*При всех условиях эксперимента различия статистически незначимы относительно соответствующего контроля; ** интенсивность флуоресценции питательной среды без добавления ВКРФ (проба 1) и через 2 ч после добавления ВКРФ (проба 2).

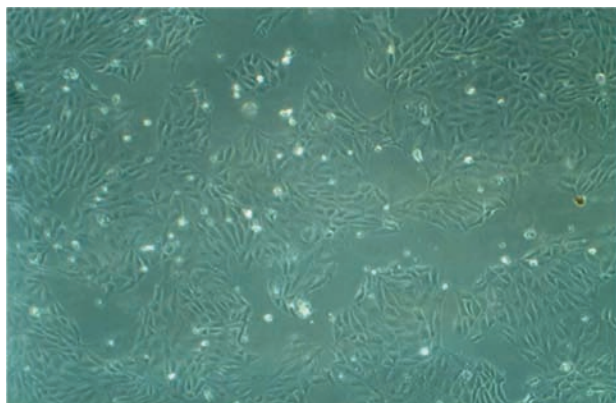


Рис. 3. Клетки линии СПЭВ в культуре после 48 ч контакта с фуллереном C_{60} (127 мкМ); фазовый контраст, $\times 100$

се культивирования наблюдалось увеличение количества клеток в среднем на 70%, что коррелирует с ростом интенсивности флуоресценции продукта восстановления AlamarBlue.

Клетки линии СПЭВ имеют эпителиальную природу и в условиях культивирования отличаются, как правило, стабильной, типичной для эпителия морфологией с отсутствием тяжей и отростков. Однако фаза деления для любой клетки сопровождается округлением с частичным снижением адгезии клетки к субстрату, а затем – восстановлением характерного вида двух новых клеток. После добавления ВКРФ в среду культивирования не обнаружено видимых изменений клеток (рис. 3). Тем не менее, нельзя исключать факт взаимодействия фуллерена C_{60} с мембранами клеток [11]. По-видимому, предполагаемая модификация мембран клеток СПЭВ

не является критичной для реализации их пролиферативных свойств, по крайней мере, на протяжении 48 ч контакта с фуллереном C_{60} .

ВПЛИВ ФУЛЕРЕНУ C_{60} НА МЕТАБОЛІЧНУ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КЛІТИН ЛІНІЇ СПЕВ

І. В. Белочкіна¹, І. О. Іценко¹,
С. В. Прилуцька², К. І. Богущька²,
В. В. Черепанов³, Б. П. Сандомирський¹,
Ю. І. Прилуцький²

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: bsan38@yahoo.com;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ;
e-mail: prylut@ukr.net;

³Інститут фізики НАН України, Київ

Досліджено вплив водного колоїдного розчину фулерену C_{60} (ВКРФ) на активність окислювально-відновлювальних і проліферативних процесів у клітинах лінії СПЕВ (перещеплювана лінія клітин нирки ембріона свині). Зокрема, встановлено, що присутність фулерену C_{60} (127 мкМ) в середовищі культивування клітин лінії СПЕВ упродовж 48 год не змінює здатності їх до відновлення нетоксичного редокс-індикатора AlamarBlue та проліферативної активності.

К л ю ч о в і с л о в а: водний колоїдний розчин фулерену C_{60} , культура клітин лінії СПЕВ, метаболічна та проліферативна активність, атомно-силова мікроскопія.

EFFECT OF C₆₀ FULLERENE ON METABOLIC AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF PKE CELL LINE

I. V. Belochkina¹, I. O. Ishchenko¹,
S. V. Prylutska², K. I. Bogutska²,
V. V. Cherepanov³, B. P. Sandomirskiy¹,
Yu. I. Prylutskiy²

¹Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv;
e-mail: bsan38@yahoo.com;

²Taras Shevchenko National University of Kyiv;
e-mail: prylut@ukr.net;

³Institute of Physics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

The effect of C₆₀ fullerene aqueous colloid solution (C₆₀FAS) on activity of redox and proliferative processes in PKE (transplantable cell line of pig kidney embryo) cells has been studied. In particular, it was established that the presence of C₆₀ fullerene (127 μM) in culturing medium of PKE cells during 48 h did not change their ability to reduce non-toxic AlamarBlue redox indicator and proliferative activity.

Key words: C₆₀ fullerene aqueous colloid solution, PKE cell culture, metabolic and proliferative activity, atomic-force microscopy.

1. *Fullerenes. Principles and Applications* / eds.: Langa de la Puente F., Nierengarten J. F. – Cambridge: RSC Edition, 2007. – 400 p.
2. *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*. Series: Carbon Materials: Chemistry and Physics / F. Cataldo, T. Da Ros (eds.). – Netherlands: Springer, 2008. – Vol. 1. – 408 p.
3. Прилуцька С. В., Кічмаренко Ю. М., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 3. – С. 9–17.
4. Johnston H. J., Hutchison G. R., Christensen F. M. et al. // *Toxicol. Sci.* – 2010. – 114, N 2. – P. 162–182.
5. Прилуцька С. В., Ротко Д. М., Прилуцький Ю. І., Рибальченко В. К. // Сучасні проблеми токсикології. – 2012. – № 4. – С. 49–57.
6. Su Y., Xu J. Y., Shen P. et al. // *Toxicology*. – 2010. – 269, N 2–3. – P. 155–159.
7. Rouse J. G., Yang J., Barron A. R., Monteiro-Reviere N. A. // *Toxicol. in vitro*. – 2006. – 20, N 8. – P. 1313–1320.
8. Гребіник С. М., Гринюк І. І., Прилуцька С. В., Матишевська О. П. // Укр. біохім. журн. – 2012. – 84, № 2. – С. 48–52.
9. Andreichenko K. S., Prylutska S. V., Medynska K. O. et al. // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, № 2. – P. 20–26.
10. Foley S., Crowley C., Smaili M. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – 294, N 1. – P. 116–119.
11. Prylutska S., Bilyy R., Overchuk M. et al. // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2012. – 8, N 3. – P. 522–527.
12. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutskiy Yu. I. et al. // *Exp. Oncol.* – 2011. – 33, N 3. – P. 162–164.
13. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Klymenko P. P. et al. // *Cancer Nanotechnol.* – 2011. – 2, N 1. – P. 105–110.
14. Didenko G., Prylutska S., Kichmarenko Y. et al. // *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* – 2013. – 44, N 2–3. – P. 124–128.
15. Гринюк І. І., Перепелиціна О. М., Прилуцька С. В. та ін. // Біотехнологія. – 2010. – 3, № 4. – С. 75–79.
16. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L. et al. // *Carbon*. – 2004. – 42, N 5–6. – P. 1203–1206.
17. Prylutska S. V., Matyshevska O. P., Grynyuk I. I. et al. // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* – 2007. – 468. – P. 265–274.
18. Petrenko Yu. A., Gorokhova N. A., Tkachova E. N., Petrenko A. Yu. // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 5. – P. 100–105.
19. Лакін Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
20. Bulavin L., Adamenko I., Prylutskiy Yu. et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2000. – 2, N 8. – P. 1627–1629.
21. Prylutskiy Yu. I., Buchelnikov A. S., Voronin D. P. et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – 15, N 23. – P. 9351–9360.
22. Prilutski Yu. I., Durov S. S., Yashchuk V. N. et al. // *Europ. Phys. J. D.* – 1999. – 9, N 1–4. – P. 341–343.
23. Prylutskiy Yu. I., Durov S. S., Bulavin L. A. et al. // *Inter. J. Thermophys.* – 2001. – 22, N 3. – P. 943–956.

Получено 26.06.2013