



УДК 616-006.04:577.352:(615+544.7)

© 2009

Л. В. Гарманчук, О. М. Перепелиціна, І. І. Гринюк,
С. В. Прилуцька, О. П. Матишевська, М. В. Сидоренко

Вплив фулеренів C_{60} на адгезивні властивості клітин раку молочної залози MCF-7

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костериним)

Досліджено вплив фулеренів C_{60} на адгезивні властивості клітин раку молочної залози MCF-7. Виявлено, що фулерени C_{60} у концентрації 10^{-5} М у середовищі інкубації знижують показник адгезії клітин до субстрату на 2-гу, 5-ту та 7-му добу культивування клітин без заміни середовища в порівнянні з аналогічним контролем.

Клітини різних типів мають певні адгезивні властивості, які визначають їх взаємодію між собою та з позаклітинним матриксом. Механізми адгезії відіграють важливу роль у багатьох клітинних процесах — ембріональному розвитку, формуванні морфологічних ознак, міграції клітин, експресії генів, а також у процесах малігнізації клітинної популяції [1, 2].

Формування фокусів адгезії за умови культивування клітин *in vitro* залежить як від біологічних властивостей клітини (наявності специфічних інтегральних мембранних адгезивних протеїнів), так і від фізичних та хімічних властивостей субстрату [3, 4]. Модифікаторами процесів адгезії можуть бути фулерени C_{60} — нанорозмірні вуглецеві гідрофобні сферичні структури, які не виявляють токсичних властивостей в діапазоні низьких концентрацій [5]. Завдяки малим розмірам та гідрофобності C_{60} здатні взаємодіяти з біологічними молекулами, вбудовуватися в мембрани та спричиняти біологічні ефекти [6]. Вплив фулеренів C_{60} на клітинні мембрани може відбуватись за різними механізмами — шляхом адсорбування на поверхні, вбудовування в ліпідний бішар та/або зв'язування з мембранними білками [6, 7].

У модельних експериментах з використанням планарної бішарової ліпідної мембрани (БЛМ) (фосфатидилхолін:холестерол) показано, що фулерени C_{60} у концентрації 10^{-5} М здатні проникати в БЛМ та утримуватись упродовж певного терміну, локально посилюючи провідність мембрани [8]. Існують також дані щодо здатності фулеренів C_{60} впливати на взаємодію епітеліальних клітин з елементами позаклітинного матриксу [9], змінювати експресію адгезивного протеїну ICAM-I в ендотеліальних клітинах [10], модифікувати проведення регуляторних сигналів у клітинах гепатоми [11].

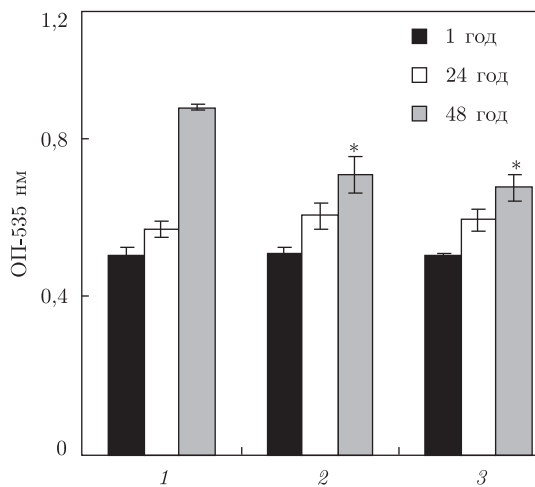


Рис. 1. Показник адгезії клітин MCF-7 при їх інкубації протягом 1, 24 та 48 год у контролі (1) і в присутності фулеренів C_{60} у концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ М (2) та 10^{-5} М (3) у культуральному середовищі.

* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем без C_{60}

Ми ставили собі за мету оцінити вплив фулеренів C_{60} на показники адгезії пухлинних клітин MCF-7 за умов їх тривалого культивування.

У дослідженнях використано клітинну лінію MCF-7 (рак молочної залози людини), люб'язно надану доктором І. Гуттом (Людвіговський раковий інститут, Лондон). Клітини інкубували у 96- або 24-лункових планшетах ("Nunc", Данія) за стандартних умов при 5% CO_2 , 100 % вологості в середовищі RPMI ("Sigma"), забуференому 1 М розчином HEPES ("Sigma"), рН 7,4, та з 15% ЕТС ("Sigma") за відсутності фулеренів C_{60} (контроль) та за їх наявності. Водні колоїдні розчини фулеренів C_{60} (10^{-4} М) приготовлені в хімічній лабораторії Технічного університету Ільменау (Німеччина) як описано в роботі [8].

Для оцінки адгезивних властивостей клітин залежно від терміну інкубації та від концентрації фулеренів C_{60} клітини ($30 \cdot 10^3$ на лунку) інкубували у 96-лункових планшетах протягом 1, 24, 48 год за відсутності C_{60} у культуральному середовищі (контроль) або в їх присутності в концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ та 10^{-5} М. Для дослідження впливу фулеренів C_{60} на адгезивні властивості MCF-7 в умовах unfed culture клітини ($150 \cdot 10^3$ на лунку) інкубували в 24-лункових планшетах як описано вище протягом 10 діб без заміни культурального середовища, у певний термін інкубації клітини ($30 \cdot 10^3$ на лунку) відбирали та інкубували в 96-лункових планшетах протягом ще 1 год. Показником адгезії вважали кількість клітин, що прикріпились до субстрату, яку оцінювали після профарбовування кристалічним фіолетовим за оптичним поглинанням ($\lambda = 535$ нм), що вимірювали на мультилунковому спектрофотометрі (Labsystems Multiskan MS, Фінляндія) [12].

Статистичну обробку результатів проводили за критерієм Стьюдента.

На рис. 1 наведено результати порівняльної оцінки кількості клітин MCF-7, що прикріпились до субстрату через 1, 24 та 48 год інкубації, у контролі та після додавання фулеренів C_{60} у концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ та 10^{-5} М до культурального середовища. Адгезивні властивості клітин, інкубованих протягом 1 та 24 год, у контролі та в присутності фулеренів C_{60} були однаковими, натомість у разі подовження терміну інкубації до 48 год виявлявся пригнічувальний ефект фулеренів C_{60} — кількість адгезивних клітин при інкубації в присутності $5 \cdot 10^{-6}$ та 10^{-5} М C_{60} знижувалась порівняно з контролем у 1,3 та 1,4 раза відповідно.

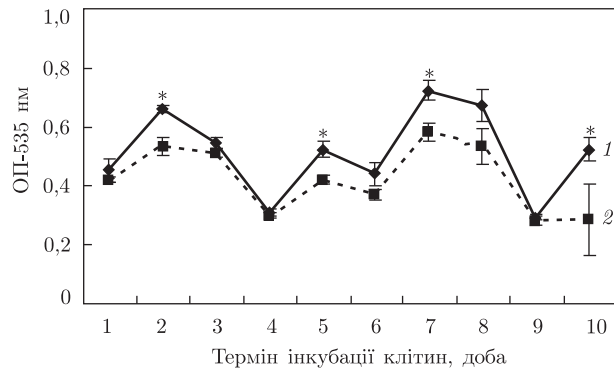


Рис. 2. Зміна показника адгезії клітин MCF-7 у динаміці їх інкубації в контролі (1) та в присутності 10^{-5} М фулеренів C_{60} (2) у культуральному середовищі.

* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем без фулеренів C_{60}

Оскільки клітини MCF-7 мають високий ступінь трансформованого фенотипу та клоногенності, становило інтерес з'ясувати, чи збережеться пригнічувальний вплив C_{60} у концентрації 10^{-5} М на адгезію клітин MCF-7 у разі подовження терміну їх інкубації до 10 діб без заміни культурального середовища. Для цього спочатку було оцінено показник адгезії клітин MCF-7 у динаміці їх інкубації в контролі. Як свідчать одержані дані (рис. 2), у досліджуваній період зміни клітинної адгезії носять фазовий характер — показник набуває максимальних значень на 2-гу, 5-ту, 7-му та 10-ту добу культивування. Відомо, що процеси адгезії тісно пов'язані з процесами проліферації — для вступу в мітотичний цикл прикріплені до субстрату клітини потребують відкріплення [2, 13]. Тому, на нашу думку, виявлений фазовий характер зміни показника адгезії може бути пов'язаний з тривалістю клітинного циклу клітин MCF-7, який становить приблизно 3 доби [13]. Крива зміни кількості прикріплених до субстрату клітин MCF-7 при їх інкубації в присутності 10^{-5} М C_{60} має такий самий характер, як і в контролі — максимальних значень показник набуває на 2-гу, 5-ту та 7-му добу культивування. Саме в ці терміни спостерігається приблизно однакове зниження показника адгезії (у 1,25 раза) попередньо інкубованих у присутності фулеренів C_{60} клітин порівняно з контролем, тоді як у інші терміни показник не відрізняється від контрольного.

Отже, у результаті проведеного дослідження встановлено, що фулерени C_{60} в концентрації 10^{-5} М у середовищі інкубації знижують показник адгезії клітин до субстрату на 2-гу, 5-ту та 7-му добу культивування клітин без заміни середовища в порівнянні з аналогічним контролем. Цей ефект можна пояснити неспецифічною взаємодією між гідрофобними ділянками поверхні фулерену C_{60} та мембранними структурами клітин.

Для з'ясування можливих механізмів пригнічувального ефекту фулеренів C_{60} на клітинну адгезію доцільними є подальші дослідження впливу C_{60} на морфологічні ознаки, перебіг клітинного циклу та проліферативну активність клітин MCF-7.

Робота підтримана НАН України в рамках програми "Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології", договір № 127/08-Н.

1. Robert J., Yu-Li Wang. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1997. – **94**. – P. 13661–13665.
2. Hynes R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion // Cells. – 1992. – **69**. – P. 11–25.
3. Csaderova L., Riehle M., McIntosh A., Robertson M. Cell Response to Microfabricated Surface Rigidity Patterns // Eur. Cells and Materials. – 2005. – **10**. – Suppl. 2.

4. Lang Sh. H., Stark M., Collins A. et al. Maitland Experimental Prostate Epithelial Morphogenesis in Response to Stroma and Three-Dimensional Matrigel Culture // Cell Growth Differ. – 2001. – **12**. – P. 631–640.
5. Прилуцька С. В., Гринюк І. І., Голуб О. А., Матишевська О. П. Оцінка параметрів цитотоксичності фулеренів C₆₀ та C₆₀-вмісних композитів in vitro // Доп. НАН України. – 2006. – № 1. – С. 163–167.
6. Foley S., Crowley C., Smaih M. et al. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 2002. – **294**. – P. 116–119.
7. Higgins M. J., Polcik M., Fukuma T. et al. Structured water layers adjacent to biological membranes // Biophys J. – 2006. – **91**, No 7. – P. 2532–2542.
8. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Matyshevska O. P. et al. Biological effects of C₆₀ fullerenes in vitro and in a model system // Mol. Cryst. and Liquid Cryst. – 2007. – **468**. – P. 265–274.
9. Straface E., Natalini B., Monti D. et al. C3-fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoxia by influencing cell adhesion ability // FEBS Lett. – 1999. – **454**, No 3. – P. 335–340.
10. Gelderman M. P., Simakova O., Clogston J. D. et al. Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: fullereneol C₆₀(OH)₂₄ induced tissue factor and ICAM-I membrane expression and apoptosis in vitro // Int. J. Nanomed. – 2008. – **3**, No 1. – P. 59–68.
11. 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. – **254**, No 1. – P. 38–43.
12. Бутаков А. А., Оганезов В. К., Пинегин Б. В., Черноусов А. Д. Спектрофотометрическое определение адгезивной способности полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови // Иммунология. – 1991. – № 5. – С. 71–72.
13. Sezgin C., Sanli U. A., Uslu R., Goker E. Arsenic trioxide has additive cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer line with taxanes // Turk. J. Med. Sci. – 2002. – **32**. – P. 439–444.

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка Надійшло до редакції 07.10.2008
 Відділення біотехнічних проблем діагностики
 Інституту проблем кріобіології та кріомедицини
 НАН України, Київ

**L. V. Garmanchouk, O. M. Perepelytsina, I. I. Grynyuk, S. V. Prylutska,
 O. P. Matyshevska, M. V. Sydorenko**

Fullerenes C₆₀ change adhesive characteristics of MCF-7 cells

The influence of fullerenes C₆₀ on adhesive characteristics of breast adenocarcinoma cells MCF-7 is studied. It is shown that fullerenes C₆₀ in concentration 10⁻⁵ M decrease the cells adhesion to substrate in 2, 5, and 7 days of the incubation of cells in unfed culture in comparison with control.