

Д. С. Єфременко, П. Г. Телегеєва, А. В. Яковенко, І. В. Василенко,
Г. Д. Телегеєв, член-кореспондент НАН України С. С. Малюта

Використання наночастинок CoFe_2O_4 для цільової доставки метотрексату в клітини остеосаркоми

Досліджено вплив наночастинок CoFe_2O_4 на проліферацію культури мишачих макрофагів J774 і оцінено можливість використання гіалуронової кислоти як ліганду для цільової терапії. Отримано деякі характеристики наночастинок, такі як значення токсичних концентрацій, здатність індукувати оксидативний вибух тощо. Також оцінено вплив наноконструкції CoFe_2O_4 –Метотрексат–Гіалуронова кислота на проліферативну активність культури остеосаркоми людини MG-63.

В останні десятиліття підходи з використанням наночастинок стали перспективним напрямком у боротьбі з онкологічними захворюваннями. Наночастинка — ізольований твердофазний об'єкт, що має чітко виражені кордони з навколишнім середовищем та розміри якого в усіх трьох вимірах становлять від 1 до 100 нм. Серед значної кількості наночастинок найбільший інтерес викликають феромагнітні наночастинки завдяки своїм фізичним властивостям. Зважаючи на їх здатність до генерації теплової енергії при опроміненні змінним магнітним полем, вони є перспективними для терапії різноманітних пухлин. Крім того, за допомогою постійного магнітного поля вони можуть бути сконцентровані в певних ділянках. Одним із актуальних напрямків використання феромагнітних наночастинок може бути їх таргетна доставка в онкотрансформовані клітини.

Відомо, що пухлини здатні до гіперекспресії різних типів поверхневих рецепторів. Це можуть бути як ембріональні рецептори, так і звичайні соматичні. Наприклад, остеосаркома людини гіперекспресує маркер CD44. Даний маркер є рецептором для гіалуронової кислоти. Сам по собі він не є високоспецифічним, але в поєднанні з локалізацією магнітним полем можна сконцентрувати наночастинки з хіміотерапевтичним препаратом в зоні пухлини.

Нами для цільової доставки в онкотрансформовані клітини наночастинки складу CoFe_2O_4 були модифіковані лікарським препаратом метотрексат (MT) та гіалуроновою кислотою (HA). Було оцінено вплив цих наночастинок на клітини остеосаркоми MG-63 та показано значне зниження рівня проліферативної активності культури MG-63 при інкубації з CoFe_2O_4 –MT–HA, що передбачає можливе використання даної наноконструкції в терапевтичних цілях.

Матеріали і методи. Наночастинки CoFe_2O_4 синтезували відповідно до описаного в [1] протоколу. Культуру мишачих макрофагів J774 інкубували в поживному середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) з 10% FBS (Fetal Bovine Serum) та рослили в 100 мм культуральних чашках Петрі при 37 °C з подачею 5% CO_2 .

Тест на цитотоксичність. Для дослідження цитотоксичності наночастинок клітини попередньо обробляли розчином наночастинок, інкубували 24 год та фарбували 0,4% розчином трипанового синього. Фарбовані клітини аналізували під світловим мікроскопом [2].

Оцінка фагоцитарного індексу. Фагоцитарний індекс (ФІ) оцінювали згідно з протоколом [3]. Для цього клітини попередньо фарбували розчином акридину оранжевого, інкубу-

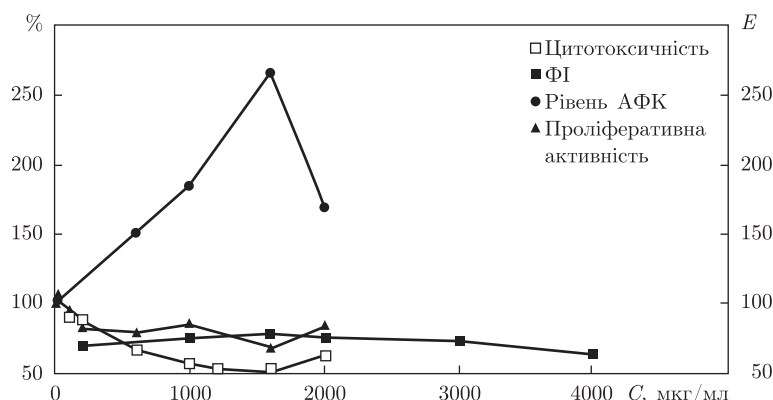


Рис. 1. Зіставлення даних рівня цитотоксичності, фагоцитарного індексу, рівня АФК та проліферативної активності. C — концентрація наночастинок; E — оптична густина (для НСТ тесту)

вали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв. Потім додавали певну кількість наночастинок та інкубували протягом 30 хв, після чого досліджували на флуоресцентному мікроскопі.

Визначення рівня активних форм кисню (АФК) в клітинах [4]. Для визначення рівня АФК в клітинах застосовували НСТ (нітросиній тетразолій) тест. Клітини інкубували з наночастинок протягом 1 год. Потім додавали 0,1% водного розчину НСТ і інкубували 4 год при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Клітини осаджували центрифугуванням, відбирали супернатант і сушили. Потім додавали DMSO та повторно інкубували при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 10 хв. Далі зразок досліджували методом оптичної спектрофотометрії при довжині хвилі $530(\pm 20)$ нм.

Визначення проліферативної активності. Для визначення проліферативної активності клітини інкубували з наночастинок протягом 24 і 48 год. У кожному лунку додавали 12 мМ 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію (МТТ) і інкубували 4 год при температурі $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для лізису клітин та розчинення формагану додавали DMSO.

Визначення акумуляції наночастинок в клітинах [5]. Клітини інкубували з наночастинок протягом 1 год. Після інкубації проводили відмивку частинок, що не інтернализували. Клітини фіксували 8% розчином формальдегіду фарбували розчином фероціаніду калію з еквімолярною кількістю 1Н НСІ.

Результати та обговорення. Важливим моментом у використанні наночастинок є їх відносна нетоксичність для клітин організму. Саме тому нами було проаналізовано цитотоксичність феромагнітних наночастинок при різних значеннях концентрації. Встановлено, що концентрації до 100 мкг/мл не викликають значного цитотоксичного ефекту. При концентрації 1600 мкг/мл спостерігається максимальна цитотоксичність — кількість життєздатних клітин становить $51 \pm 3,2\%$. При подальшому підвищенні концентрації наночастинок до 2000 мкг/мл рівень цитотоксичності знижується на 12% (рис. 1). Ці значення узгоджуються з літературними даними [6].

ФІ показує відсоток клітин, що поглинули певну частинку, в порівнянні із загальною кількістю клітин. Оцінка ФІ дає можливість визначити оптимальні концентрації наночастинок для застосування при онкологічних захворюваннях, при яких спостерігається фагоцитарна активність неопластичних клітин (наприклад, при деяких формах гострої лейкемії). Даний тест показав (див. рис. 1), що зі збільшенням концентрації наночастинок поступово збільшуються значення ФІ. Зростання ФІ відбувається до значення 1600 мкг/мл. При подальшому підвищенні концентрації наночастинок ФІ знижується. З цього факту можна

зробити висновок, що для фагоцитозу існують певні оптимальні концентрації наночастинок. Різними дослідниками було також показано, що для різноманітних наночастинок ФІ залежить від їх концентрації і при високих значеннях може знижуватися [7, 8].

З метою дослідження залежності рівня АФК від концентрації наночастинок нами було проведено НСТ тест. Для феромагнітних наночастинок властива стимуляція генерації АФК через реакцію Фентона. Ця особливість може бути використана для цільового знищення ракових клітин, оскільки вони мають дефектну антиоксидантну систему. З підвищенням концентрації наночастинок рівень АФК зростає. Максимальний рівень АФК спостерігається при концентрації 1600 мкг/мл, а потім поступово знижується (див. рис. 1). Як було зазначено вище, при концентрації 1600 мкг/мл максимальним є і показник ФІ.

Також було проведено визначення рівня проліферативної активності (див. рис. 1). Аналіз проводили в діапазоні концентрацій наночастинок 0–2000 мкг/мл. При концентраціях від 0 до 1000 мкг/мл проліферативна активність спочатку різко знижується (0–200 мкг/мл), але потім поступово вирівнюється і в діапазоні 600–1000 мкг/мл підвищується. Зі збільшенням концентрації наночастинок до 1600 мкг/мл рівень проліферації наближається до свого мінімуму. В діапазоні 1600–2000 мкг/мл проліферативна активність знову зростає, що корелює зі зменшенням рівня АФК, ФІ та цитотоксичністю наночастинок.

Якщо чотири графіки (див. рис. 1) накласти відносно концентрації на одну координатну вісь, то прослідковується залежність між даними. Умовно поділивши графік на три зони за концентрацією наночастинок, можна зробити такі висновки. В діапазоні 0–1000 мкг/мл поступово зростає кількість наночастинок, збільшується ФІ та рівень АФК, знижується число живих клітин та проліферативна активність. Зі збільшенням кількості поглинених наночастинок підвищується рівень АФК (порівняно з контролем), а це призводить до загибелі клітин. Також фактором, що стимулює зростання рівня АФК, може бути підсилення фагоцитозу. При концентрації 1000–1600 мкг/мл кількість мертвих клітин, рівень АФК та ФІ досягають максимуму. Судячи з різкого зростання рівня АФК, ефективність роботи антиоксидантної системи різко знижується. На концентрації 1600 мкг/мл пересікаються максимуми та мінімуми усіх показників. У діапазоні 1600–2000 мкг/мл поступово знижується ФІ, рівень АФК, збільшується кількість живих клітин.

Модифікація наночастинок гіалуроновою кислотою. Існує декілька шляхів потрапляння лікарських препаратів в клітини. Одним із них є рецепторопосередкований ендоцитоз. В клітинах остеосаркоми виявлено підвищену експресію рецептора CD44 [9]. Лігандом для нього є НА. Саме її було використано для модифікації наночастинок та цільової доставки. Крім того, НА, на відміну від інших цільових лігандів, є економічно доступною. Для перевірки здатності клітин MG-63 поглинати наночастинок культуру інкубували з модифікованими наночастинами (CoFe₂O₄-НА) (рис. 2).

Модифікація наночастинок CoFe₂O₄-НА препаратом метотрексат. Наночастинок CoFe₂O₄-НА були модифіковані цитостатичним препаратом МТ. За механізмом дії даний препарат є антагоністом фолієвої кислоти. Наноконструкція мала таку будову: CoFe₂O₄-МТ-НА.

Структура типу “троянський кінь” має важливе значення. Ракова клітина зв’язується з НА та поглинає наночастинок з препаратом. Це дозволяє уникнути механізму стійкості до хіміотерапії. При потраплянні в лізосоми конструкція деградує і компоненти поступово дифундують в цитозоль. Для визначення цитотоксичності даної конструкції проводився МТТ тест. Найбільше зниження проліферативної активності спостерігається при концентрації 1000 мкг/мл (рис. 3). З подальшим збільшенням концентрації графік виходить на плато.

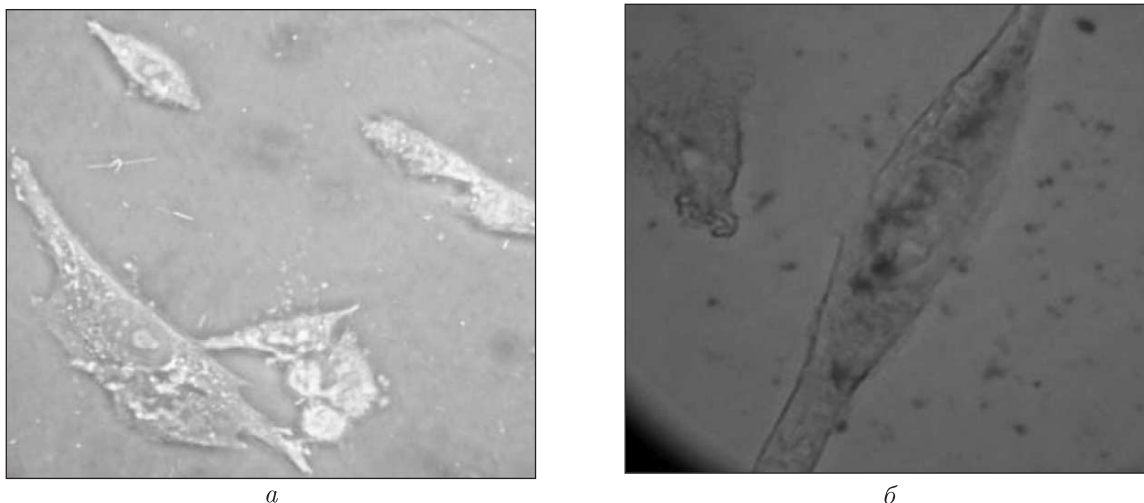


Рис. 2. Здатність клітин MG-63 поглинати наночастинки: *a* — контроль (без частинок); *б* — інкубація з наночастинками

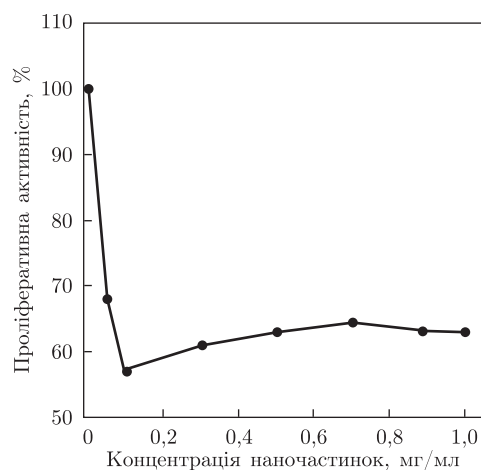


Рис. 3. Рівень проліферативної активності клітин MG-63 після інкубації з наночастинками $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MT-NA}$. Інкубація протягом 24 год

Таким чином, досліджено вплив наночастинок на культуру клітин J774, а саме: визначено цитотоксичність та здатність індукувати окисний вибух. Найвищу цитотоксичність та зростання рівня АФК відмічено при концентрації 1600 мкг/мм. Встановлено взаємозв'язок між рівнем цитотоксичності, рівнем АФК та ФІ. Показано здатність клітин MG-63 ефективно поглинати наночастинки $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-HA}$. Це свідчить про те, що гіалуронова кислота може виконувати роль ліганду для доставки наночастинок в клітини остеосаркоми. Виявлено ефективну цитотоксичну дію наночастинок складу $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MT-NA}$ на клітини остеосаркоми.

1. Василенко И. В., Гавриленко К. С., Котенко И. Е. и др. Влияние условий формирования на строение, морфологию и магнитные свойства наноразмерных ферритов $\text{MFeIII}_2\text{O}_4$ ($M = \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}$) и Fe_2O_3 // Теорет. и эксперим. химия. – 2007. – **43**, № 5. – С. 323–329.
2. Strober W. APPENDIX 3B Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability // Current Protocols in Immunology. – 2001. – DOI:10.1002/0471142735.ima03bs21.

3. Pruzanski W., Saito S. Comparative study of phagocytosis and intracellular bactericidal activity of human monocytes and polymorphonuclear cells // *Inflammation*. – 1988. – **12**, No 1. – P. 87–97.
4. Esfandiari N. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa // *J. Androl.* – 2003. – **24**. – P. 862–870.
5. Song M., Moon W. K. Kim Y. et al. Labeling efficacy of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to human neural stem cells: comparison of ferrumoxides, monocrystalline iron oxide, cross-linked iron oxide (CLIO) – NH₂ and tat-CLIO // *Korean J. Radiol.* – 2007. – **8**, No 5. – P. 365–371.
6. Kim D.-H., Kim K.-M., Kim K.-N. et al. In vitro & in vivo toxicity of CoFe₂O₄ for application to magnetic hyperthermia // *Nanotech.* – 2007. – **2**. – P. 748–751.
7. Bhattacharjee S., de Haan L. H. J., Evers N. M. et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells // *Particle and Fibre Toxicol.* – 2010. – **7**: 25. – DOI:10.1186/1743-8977-7-25.
8. Moghimi S. M. Modulation of lymphatic distribution of subcutaneously injected poloxamer 407-coated nanospheres: the effect of the ethylene oxide chain configuration // *FEBS Lett.* – 2003. – **540**. – P. 241–244.
9. Ma Q., Zhou Y., Ma B. et al. The clinical value of CXCR4, HER2 and CD44 in human osteosarcoma: A pilot study // *Oncol. Lett.* – 2012. – **3**, No 4. – P. 797–801.

Институт молекулярної біології і генетики

НАН України, Київ

Институт фізичної хімії ім. Л. В. Писаржевського

НАН України, Київ

Надійшло до редакції 16.11.2012

**Д. С. Ефременко, П. Г. Телегеева, А. В. Яковенко, И. В. Василенко,
Г. Д. Телегеев, член-корреспондент НАН Украины С. С. Малюта**

Использование наночастиц CoFe₂O₄ для целевой доставки метотрексата в клетки остеосаркомы

Исследовано влияние наночастиц CoFe₂O₄ на пролиферацию культуры мышинных макрофагов J774 и оценена возможность использования гиалуроновой кислоты в качестве лиганда для целевой терапии. Получены некоторые характеристики наночастиц, такие как значения токсических концентраций, способность индуцировать оксидативный стресс и т. д. Также оценено влияние наноконструкции CoFe₂O₄-Метотрексат-Гиалуроновая кислота на пролиферативную активность культуры остеосаркомы человека MG-63.

**D. S. Iefremenko, P. G. Telegeeva, A. V. Yakovenko, I. V. Vasilenko,
G. D. Telegeev, Corresponding Member of the NAS of Ukraine S. S. Maluta**

Using CoFe₂O₄ nanoparticles for targeted delivery of methotrexate in osteosarcoma cells

In order to develop the technology of targeted delivery therapy based on ferromagnetic nanoparticles CoFe₂O₄, we studied its influence on the biogenesis of mouse macrophage J774 cell culture and possibility to use hyaluronic acid as a ligand for target therapy. As a result, we have determined different characteristics of nanoparticles (such as the optimal non-toxic concentration of nanoparticles, ability of nanoparticles to induce oxidative stress) and estimated the influence of the nanoconstruction CoFe₂O₄-Methotrexate-Hyaluronic Acid on the proliferative activity of MG-63 cell culture.