

ВЛИЯНИЕ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК IN VITRO И IN VIVO

Шульгина О.Г.¹, Бахтин А.В.¹, Селютина О.Н.¹, Златник Е.Ю.¹, Загора Г.И.¹, Сидоренко И.П.¹, Сустретов В.А.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия (344037, Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63) e-mail: rnoi@list.ru

Проведено экспериментальное исследование действия коротких одностенных углеродных нанотрубок, функционализированных COOH- и NH₂-содержащими группами (ОУНТ COOH и ОУНТ NH₂), на жизнеспособность опухолевых клеток. При инкубации обоих вариантов ОУНТ с опухолевыми клетками, культивируемыми in vitro (U937) и в перитонеальной полости мышей (C37), показано усиление гибели клеток за счет как апоптоза, так и некроза при отсутствии дозо-зависимости эффекта. При перевивке мышам преинкубированных клеток C37 установлено 2-кратное повышение латентного периода при действии ОУНТ NH₂, но не ОУНТ COOH. Итак, в применяемых модельных системах ОУНТ NH₂, проявили более значительный противоопухолевый эффект, чем ОУНТ COOH.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, апоптоз, некроз, перевиваемая саркома

EFFECT OF FUNCTIONALIZED CARBON NANOTUBES ON VIABILITY OF TUMOR CELLS IN VITRO AND IN VIVO

Shulgina O.G.¹, Bakhtin A.V.¹, Selyutina O.N.¹, Zlatnik E.Y.¹, Zakora G.I.¹, Sidorenko I.P.¹, Sustretov V.A.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia (344037, Rostov-on-Don, 14 Line, 63) e-mail: rnoi@list.ru

An experimental study was performed to analyze the effect of short single-walled carbon nanotubes functionalized with -COOH and -NH₂ groups (SWCN COOH and SWCN NH₂) on viability of tumor cells. Incubation of both SWCN types with tumor cells cultivated in vitro (U937) and in the peritoneal cavity of mice (C37) showed an increased cell death due to both apoptosis and necrosis which was not dose-dependent. Transplantation of preincubated C37 cells to mice resulted in doubling of the latent period with SWCN NH₂ but not with SWCN COOH. Thus, SWCN NH₂ demonstrated a more significant anti-tumor effect in the used model systems than SWCN COOH.

Keywords: carbon nanotubes, apoptosis, necrosis, transplantable sarcoma

Углерод лежит в основе биологических макромолекул, что побуждает исследователей разрабатывать новые биосовместимые материалы углеродной природы: фуллерены, графены, нанотрубки [6, 10]. Функционализация этих структур различными химическими группами позволяет им вступать в реакции с биологическими макромолекулами и проявлять разнообразные виды биологической активности. Разработка и исследование эффектов наноразмерных частиц открывает новые возможности для биологии и медицины. Эти направления представляют особый интерес в онкологии, поскольку описано избирательное поглощение наночастиц опухолевыми клетками [7], показаны цитотоксические свойства некоторых из них, например, металлических [3]. Отмечен эффект угнетения роста культуры опухолевых клеток под действием одностенных углеродных нанотрубок (НТ) [9], хотя другие авторы сообщают об отсутствии у них цитотоксичности [2]. Проводятся разработки и экспериментальные исследования конъюгатов углеродных НТ с лекарственными

препаратами для их адресной доставки в опухоль [5, 8]. Однозначного ответа на то, обладают ли одностенные углеродные НТ цитотоксическим или антипролиферативным действием, литература не дает; по-видимому, их эффекты зависят от их длины, функционализации и других характеристик. Взаимодействие углеродных нанотрубок с биологическими, прежде всего белковыми, макромолекулами предполагает возможность связывания с амино- и карбоксильными группами последних, поэтому можно ожидать, что функционализация трубок этими группами позволит получить их активные формы, повышая при этом их растворимость в водных средах и уменьшая агрегацию.

Цель исследования: изучить действие одностенных углеродных нанотрубок, функционализированных аминогруппами и карбоксильными группами, на жизнеспособность опухолевых клеток.

Материалы и методы

В работе использованы одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), функционализированные COOH - и NH_2 -содержащими группами (длина около 200 нм, диаметр 10-30 нм), полученные электродуговым методом на предприятии ООО «Карбонлайт» (Москва). Процесс производства ОУНТ и характеристика их физико-химических свойств (размер, химический состав, ТЕМ-микроскопия) описаны В.Н. Алдобаевым и соавт. (2013) [1].

Для решения поставленной цели было выполнено два эксперимента: 1-й проводили *in vitro*, 2-й - *in vivo*.

В 1-м эксперименте в качестве опухолевых клеток были использованы культура лейкемической моноцитарной лимфомы человека U937 и клетки асцитной саркомы мышей С37. Клетки U937 культивировали в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640 с 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола, 2 мМ L-глутамина, 10 мМ буфера HEPES, 50 мкг/мл гентамицина. Клетки С37 культивировали в перитонеальной полости белых беспородных мышей. Для постановки эксперимента оба варианта опухолевых клеток осаждали средой RPMI-1640, доводили до концентрации $(1-1,5) \times 10^6$ /мл и инкубировали с COOH - и NH_2 -ОУНТ в течение 30 мин при 37°C ; контрольные пробы аналогично инкубировали с физиологическим раствором. В опыте с культурой U937 использовали две концентрации взвеси ОУНТ в физиологическом растворе (1 мкг/мл и 0,01 мкг/мл), пробы которой обрабатывали ультразвуком *ex tempore* для предотвращения агрегации.

По окончании инкубации определяли процент живых и погибших клеток в тесте с трипановым синим, а также в аннексиновом тесте (eBioscience Bender MedSystems), позволяющем оценить апоптотическую и некротическую гибель.

Во 2-м эксперименте изучали длительность латентного периода опухоли С37 при перевивке после преинкубации ее клеток с ОУНТ. Для этого инкубированные, как описано выше, пробы клеток С37 перевивали 20 белым беспородным мышам (самцы, масса 16-18 г) внутрибрюшинно, после чего определяли сроки визуально наблюдаемого образования опухоли. Опухолевый рост оценивали по накоплению асцита, а также по наличию пальпируемой солидной опухоли. Контрольной группе мышам перевивали С37, преинкубированную с физиологическим раствором.

Статистическую обработку результатов проводили параметрическими и непараметрическими методами (t-критерий Стьюдента, критерий Уилкоксона, метод непрямых разностей).

Результаты

Результаты исследования представлены на рис. 1 и в табл. 1, 2.

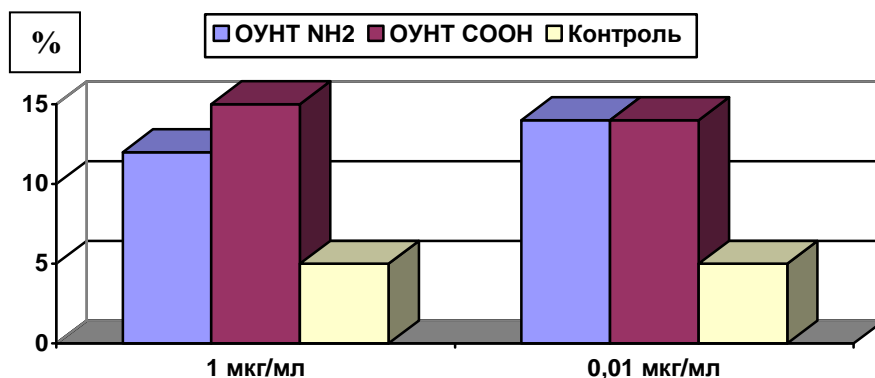


Рис. 1. Влияние ОУНТ при их различной функционализации и концентрации на жизнеспособность клеток культуры U937. По оси у – процент погибших клеток

Как видно из рис. 1, в контрольных пробах отмечена гибель $5,11 \pm 1,15\%$ клеток U937; обработка ОУНТ NH₂ в концентрациях 1 и 0,01 мкг/мл привела к возрастанию показателя до $12,44 \pm 1,26$ и $14,1 \pm 0,69\%$ соответственно, а преинкубация с ОУНТ COOH в тех же концентрациях вызвала ее повышение до $15 \pm 0,7$ и $14 \pm 0,92\%$ соответственно (во всех случаях отличия от контроля статистически достоверны; $p < 0,05$). Итак, оба вида ОУНТ в обеих использованных концентрациях вызывают 2,4-3-х-кратное повышение процента погибших клеток культуры; дозо-зависимого действия не установлено; количество живых клеток преобладало над погибшими во всех пробах.

Результаты исследования действия функционализированных ОУНТ на различные типы гибели, полученные на клетках саркомы 37, показали, что при инкубации *in vitro* под действием обоих видов ОУНТ происходит стимуляция как апоптоза, так и некроза (табл. 1).

Таблица 1

Действие функционализированных ОУНТ на апоптотическую и некротическую гибель клеток С 37

Пробы	Общее количество погибших клеток, %	Апоптоз, %	Некроз, %
ОУНТ NH ₂	64,1±5,6*	44,0±5,2*	17,2±1,9*
ОУНТ COOH	59,0±4,9*	34,2±5,0*	16,4±1,8*
Контроль	13,0±1,5	11,5±1,7	2,2±0,4

* - статистически достоверные отличия от контроля (p<0,05).

Как видно из табл. 1, инкубация клеток мышинной саркомы с обоими видами ОУНТ вызывает 3-4-х кратное повышение процента апоптотических и 8-кратное увеличение количества некротических клеток С37 по сравнению с контролем, при этом количество погибших клеток превышает количество живых. Статистически значимых различий эффекта ОУНТ в зависимости от функционализации амино- и карбоксильными группами, не отмечено.

Результаты 2-го эксперимента, проведенного *in vivo*, выявили различия между эффектами ОУНТ, функционализированными различными группами (табл.2). Как видно из данных, представленных в табл. 2, латентный период опухоли С37, перевитой мышам после преинкубации с ОУНТ NH₂, оказался статистически достоверно выше контроля. При этом после перевивки опухолевых клеток, преинкубированных с ОУНТ NH₂, отмечены более поздние сроки образования пальпируемой опухоли по сравнению с мышами после перевивки клеток, преинкубированных с ОУНТ COOH. Последние не демонстрировали статистически достоверных отличий от контроля.

Таблица 2

Латентный период опухоли С37 после преинкубации клеток с функционализированными ОУНТ

Группы мышей	Латентный период (сут)
ОУНТ NH ₂	28,2±2,2* **
ОУНТ COOH	18,6±2,6
Контроль	12,5±2,5

* - статистически достоверные отличия от контроля (p<0,05); ** - статистически достоверные отличия от ОУНТ COOH

Заключение

Итак, оба вида коротких углеродных одностенных нанотрубок проявляют сходную цитотоксичность *in vitro* по отношению к опухолевым клеткам, не зависящую от дозы, но зависящую от вида культуры клеток-мишеней, с включением механизмов, стимулирующих

как апоптоз, так и некроз, а торможение роста опухоли *in vivo* с пролонгацией латентного периода опухоли вызывают ОУНТ, функционализированные NH₂-, но не НТ COOH-содержащими группами.

Ранее подобные результаты в виде торможения опухолевого роста, сопровождающегося повышением продолжительности жизни опухоленосителей, были получены на модели перевиваемой лимфосаркомы крыс [4]. Подтверждение их на модели мышинной саркомы говорит об универсальном механизме эффекта ОУНТ, функционализированных NH₂-содержащими группами.

Установленное нами проявление различий эффектов исследованных видов функционализированных ОУНТ *in vivo* при их сходном действии *in vitro* может быть объяснено неодинаковыми условиями, складывающимися в микроокружении, в которое попадают преинкубированные с ОУНТ опухолевые клетки после перевивки, а также о неоднозначном вовлечении системных механизмов организма опухоленосителя, например, иммунологических.

Установленное нами проявление различий эффектов исследованных видов функционализированных ОУНТ *in vivo* при их сходном действии *in vitro* говорит о возможных различных их точках приложения в организме. Это может быть связано с зарядом ОУНТ, благодаря чему в микроокружении, в которое попадают преинкубированные с ними опухолевые клетки после перевивки, могут сложиться неодинаковые условия; по той же причине возможно неравнозначное вовлечение системных, например, иммунологических механизмов организма после перевивки клеток преинкубированных с ОУНТ разной функционализации.

Авторы выражают глубокую признательность Генеральному директору ООО «Карбонлайт», канд. физ-мат.наук С.П. Червонобродову за предоставление нанотрубок.

Список литературы

1. Алдобаев В. Н., Ерёменко Л. А., Мазанова А. А., Бикетова Д. Х., Дядищев Н. Р., Рыбалкин С. П., Квачева Л. Д., Бадун Г. А., Червонобродов С. П., Мурадян В. Е., Масликов А. А. Изучение распределения и оценка основных фармакокинетических параметров укороченных окисленных одностенных углеродных нанотрубок (УОУНТ-COOH) при многократном внутрижелудочном введении на модели аутбредных крыс // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2013. – Т.3, №2. – С. 307-316.
2. Бобринецкий И.И., Морозов Р.А., Селезнев А.С., Подчерняева Р.Я., Лопатина О.А. Исследования пролиферативной активности и жизнеспособности клеток фибробласта и

глиобластомы на различных типах углеродных нанотрубок // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т.153, №2. – С. 227-231.

3. Златник Е.Ю., Передреева Л.В. Экспериментальное изучение влияния наноразмерных частиц металлов на опухолевый рост и костномозговое кроветворение // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т.153, №1. – С. 113-117.

4. О.И. Кит, Е.Ю. Златник, Л.В. Передреева, С.П. Червонобродов. Торможение роста перевиваемой опухоли с помощью функционализированных коротких одностенных углеродных нанотрубок НТ // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.156, № 9. – С. 348-352.

5. Bhride Ashwin A. Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery / A. Bhride Ashwin, V. Patel, J. Gavard, et al. // ACS NANO. – 2009. Vol.3., №2. – P. 307-316.

6. Liangzhu F. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges / F. Liangzhu, Liu Z. et al. // Nanomedicine. – 2011. Vol.6., №2. – P. 317-324.

7. Iyer A.K. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting / A.K. Iyer, G. Khaled, J. Fang, H. Maeda et al. // Drug Discov.Today. – 2006. - №11. – P. 812-818.

8. Shi J. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to application / J. Shi, A.R. Votruba, O.C. Farokhzad et al. // Nanoletters. – 2010. - №10. – P. 3223-3230.

9. Mooney E. Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation / E. Mooney, P. Drockery, U. Greiser, M. Murphy et al. // Nanoletters. – 2008. Vol.8., №8. – P. 2137-2143.

10. Yongbin Z. Cytotoxicity effects of graphen and single-wall carbon nanotubes in neural phaechromacytoma-derived PC12 cells / Z. Yongbin, F. Syed Ali, E. Dervishi, et al. // ACS NANO. – 2010. Vol.4., №6. – P. 3181–3186.

Рецензенты:

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, ФГБУ «РНИОИ», г. Ростов-на-Дону;

Жукова Г.В., д.б.н., главный научный сотрудник ФГБУ «РНИОИ», г. Ростов-на-Дону.