

Функціональна активність клітин аденокарциноми Ерліха після обробки гібридними наноконструкціями

А.М. Гольцев¹, Н.М. Бабенко¹, Ю.О. Гаєвська¹, О.В. Челомбійко¹, М.О. Бондарович¹, Т.Г. Дубрава¹, М.В. Останков¹, В.К. Клочков², Н.С. Кавок², Ю.В. Малюкін²

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; ²Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, Харків; e-mail: cryopato@gmail.com

Розроблено методику отримання гібридних наноконструкцій, які містять наночастинки ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$, холестерин та люмінесцентний барвник DiI. Методом імунофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл до CD44, CD24, CD117 і Sca-1-маркерів встановлено зміну співвідношення пухлинних прекурсорів різного ступеня диференціювання в загальному пулі аденокарциноми Ерліха після обробки гібридними наноконструкціями. Суттєве зниження концентрації найбільш канцерогенних CD44^{hi}-клітин із одночасним збільшенням кількості CD117⁺-клітин підвищувало індекс CD44^{high}/CD117⁺-клітин. Показано, що застосування синтезованих гібридних наноконструкцій пригнічувало ріст пухлини майже на 80 %. Отримані результати підкреслюють значущість кооперативних взаємодій клітин із різними фенотиповими ознаками в підтримці росту пухлинних сайтів. Запроваджено використання індексу CD44^{high}/CD117⁺-клітин як одного із діагностичних і прогностичних показників розвитку та ступеня інактивзації пухлинного процесу при застосуванні різних видів протипухлинної терапії.

Ключові слова: стовбурові ракові клітини; наночастинки; аденокарцинома Ерліха; ортованадати.

ВСТУП

Нові способи протипухлинної терапії дають змогу вибірково інактивувати саме пухлинні клітини з мінімальним пошкодженням нормальних тканин [1–3]. Нині цю проблему можливо вирішити за допомогою наноматеріалів, а саме використовуючи наночастинки (НЧ) рідкісноземельних металів (зокрема, ванадію та його сполук). Так, показано, що дихлорид ванадію здатний значно інгібувати проліферацію клітин внаслідок акумуляції в ядерному гетерохроматині з подальшою індукцією мітотичних аберацій, транзиторною супресією мітозів, які призводять до накопичення клітин у пізній фазі S і G₂ [4]. Продемонстровано, що дихлорид ванадію і ацетілацетонат ванадію є ефективними терапевтичними антипроліферативними агентами при лікуванні гліобластоми і раку молочної залози людини [5].

© А.М. Гольцев, Н.М. Бабенко, Ю.О. Гаєвська, О.В. Челомбійко, М.О. Бондарович, Т.Г. Дубрава, М.В. Останков, В.К. Клочков, Н.С. Кавок, Ю.В. Малюкін

Попередні дослідження показали здатність НЧ зі складом $ReVO_4:Eu^{3+}$ ($Re=Y, Gd, La$, де Y – ітрій, Gd – гадоліній, La – лантан) на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів сферичної і веретеноподібної форм ідентифікувати пухлинні клітини-попередники *in vitro* [6] та інгібувати їхню проліферативну активність *in vivo* в експериментальній моделі аденокарциноми Ерліха (АКЕ) [7]. Встановлено, що пероральне та внутрішньоочеревинне введення мишам НЧ ванадату гадолінію, активованих європієм, не призводило до загибелі тварин, змін масових коефіцієнтів внутрішніх органів, морфології статевих клітин, що дало змогу віднести синтезовані зразки нанованадату до практично нетоксичних сполук (V клас токсичності) [8].

Для максимального лікувального ефекту протипухлинних засобів необхідна адресна доставка до цитоплазматичного або ядерного компартменту клітини, передумовою якої є

наявність у їхньому складі сполук, споріднених до мембран клітин-мішеней. Такою сполукою може бути холестерин, котрий активно «вилучається» з кровотоку проліферуючими раковими клітинами для побудови біомембран. Цьому може сприяти знаходження на поверхні клітин пухлини великої кількості SR - B1 (від англ. scavenger receptor, class B type I) і кавеолін-1 (Cav-1) рецепторів, які можуть зв'язуватися з вільним холестерином, що «вилучається» з кровоносного русла [9]. При цьому пухлина є не тільки «пасткою» холестерину в організмі, але і сама здатна його синтезувати *de novo*, причому з більшою швидкістю, ніж навколишні нормальні тканини [10].

Додавання до створених нанокомплексів флуоресцентних зондів, здатних до різнокольорового детектування, дає можливість оцінити кількісний вміст клітин-мішеней у тканині. У біологічних дослідженнях як флуоресцентний зонд використовується органічний карбоціаніновий ліпофільний барвник 1,1'-діоктадецил-3,3,3',3'-тетраметиліндокарбоціанін перхлорат (DiI, «Sigma», США). Відомо, що у розчинах він може перебувати у вигляді мономерів і агрегатів [11]. У експериментах *in vitro* моніторинг розподілу мономерної й агрегованої форм барвника надає можливість простежити за динамікою вбудовування комплексу в мембрану клітини за співвідношенням смуг люмінесценції мономера – «J-агрегату» [12].

Ініціація та розвиток пухлинного процесу зумовлені існуванням нечисленної популяції стовбурових ракових клітин (СПК), які здатні до самопідтримки, необмеженої проліферації, високої інвазивності і лікарської резистентності. Показано, що ознаки СПК молочної залози мають клітини з гіперекспресією CD44 молекули (CD44^{high}) та фенотипом CD44⁺CD24⁻ [13,14]. Показано, що через 5 міс після введення мишам усього 200 клітин із фенотипом CD44⁺CD24⁻/loESA⁺ формувалися солідні пухлини в 100 % випадків [13]. Клітини раку молочної залози з фенотипом

CD44⁺CD24⁺ є більш диференційованими порівняно з CD44⁺CD24⁻-субпопуляцією, вони здатні формувати нові пухлини в 30 % випадків при введенні $1 \cdot 10^5$ клітин на мишу [15].

Важливим є наявність серед цих клітин субпопуляцій з Sca-1⁺ і CD117⁺-маркерами. Показано, що Sca-1⁺-клітини існують і в тканині молочної залози здорових мишей, але їхня кількість не перевищує 20 %, тоді як при розвитку раку молочної залози трансгенних мишей із активацією онкогена Wnt-1 під контролем промотору вірусу MMTV їх було в 3 рази більше [16]. При цьому Sca-1⁺-клітини тканин пухлини мали підвищену пухлиноутворювальну активність порівняно зі Sca-1⁻-популяцією. Цей факт підтверджує, що Sca-1⁺-клітини пухлини дійсно можуть бути СПК із підвищеним інвазивним потенціалом.

Високий рівень експресії CD117 найчастіше спостерігається при раку яєчників, саме на акцесорних фібробластоподібних стромальних клітинах [17]. В нормі на епітеліальних клітинах молочної залози кількість клітин з високою експресією CD117 маркера достатньо висока [18]. При розвитку інвазивної форми раку молочної залози кількість його значно знижується аж до повного зникнення [19].

Для експериментального дослідження впливу різних факторів і терапевтичних засобів безпосередньо на ракові клітини зручно використовувати асцитну форму АКЕ, яка є лінією недиференційованих клітин раку молочної залози мишей, що перевивається *in vivo* [20]. Публікації щодо субпопуляційного складу АКЕ та їхньої значимості у підтримці онкопроцесу нечисленні. Так, підтверджено, що при розвитку цієї форми аденокарциноми підвищеним туморогенним потенціалом є фракція CD44⁺-клітин, отримана за допомогою імуномагнітного сортування [21]. В культурі АКЕ, яка була індукована CD44⁺-фракцією, відзначалося формування пухлин з переважним вмістом клітин із фенотипами CD44^{high} і CD44⁺CD24⁻. Але даних

щодо кількості інших субпопуляцій та їхніх співвідношень немає. Крім того, актуальним питанням є визначення кооперативних взаємодій клітин із різними фенотиповими ознаками в підтримці росту пухлинних сайтів після використання таких лікувальних засобів, як наноматеріали.

Метою нашої роботи було дослідити вплив гібридних наноконкомплексів, які містять неорганічні сферичні НЧ ортованадатів рідкісноземельних елементів складу $GdYVO_4:Eu^{3+}$, холестерину та барвника DiI, на функціональну активність клітин АКЕ.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 8-місячних самцях мишей лінії Balb/C масою 18 г, яких утримували в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків). Усі маніпуляції з тваринами виконували відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом з біоетики (Київ, 2013) і погоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Первинною культурою були кріоконсервовані клітини АКЕ [22], які після розморожування тричі перевивали *in vivo* для нівелювання впливу факторів заморожування–відігрівання і набуття ними морфологічних та функціональних ознак нативних клітин [23]. «Стабілізовані» таким чином клітини вводили мишам внутрішньоочеревинно в дозі $3 \cdot 10^6$ клітин в 0,3 мл фізіологічного розчину та культивували протягом 7 діб у перитонеальній порожнині. Через 7 діб асцитичну рідину з неї отримували шприцем через голку №10 з внутрішнім діаметром 2,69 мм, попередньо вводячи тварин у легкий ефірний наркоз. Абсолютну кількість клітин визначали за об'ємом накопиченої в ній асцитичної рідини з урахуванням концентрації клітин

АКЕ. Розвиток цієї форми аденокарциноми вважали достатнім, якщо у перитонеальній порожнині мишей загальна кількість клітин становила не менше ніж $3,5 \cdot 10^8$ [23].

Гібридні комплекси, що містять сферичні НЧ ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$ у концентрації 1,3 г/л, холестерин («Acros organics», Бельгія) у концентрації 0,55 г/л та люмінесцентний барвник DiI у концентрації $2,2 \cdot 10^{-5}$ ммоль/л, були розроблені співробітниками відділу нанокристалічних матеріалів Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України та отримували за методом Клочкова [24]. Сферичні НЧ синтезовані за описаною раніше методикою [25].

Концентрацію компонентів, які входять до створеного наноконкомпозиту, обирали згідно з рекомендаціями розробника. Розподіл кількості НЧ у складі гібридного комплексу за розмірами визначали методом динамічного розсіювання світла $\lambda=659$ нм на приладі ZetaPALS / BI-MAS («Brookhaven Instruments Corp.», США) при куті розсіювання 90° . Вимірювання проводили в спеціальних полістиролових кюветах («BI-SCP», США). Перед їх початком розчини витримували у термостаті при 25°C .

В усіх досліджуваних варіантах інкубацію 900 мкл клітин АКЕ з наноконкомпозитами проводили при кімнатній температурі протягом 3 год, що є оптимальним для зв'язування наноконкомплексів із мембранами клітин [12]. Варіанти обробки АКЕ: 1 – 100 мкл сферичних НЧ у концентрації 1,3 г/л; 2 – 100 мкл сферичних НЧ у концентрації 1,3 г/л та водна суспензія холестерину в концентрації 0,55 г/л; 3 – 100 мкл гібридного комплексу; контроль – клітини АКЕ без обробки наноконкомпозитами.

Перед внутрішньоочеревинним введенням мишам суспензію клітин АКЕ досліджуваних варіантів тричі відмивали фізіологічним розчином (1:1) для видалення надлишків наноконкомпозитів через центрифугування при 400 g.

Фенотип клітин АКЕ оцінювали з використанням моноклональних антитіл («BD Biosciences», США) до CD44 (FITC) (№ 553133, клон IM7), CD117 (FITC) (№ 553352, клон 2B8), Sca-1 (FITC) (№ 553333, клон E13-161.7), а також CD24 (PE) (№ 553262, клон M1/69). Імуноглобуліни тих самих фенотипів (за каталогом № 553988, клон A95-1 і № 553989, клон A95-1; «BD Biosciences», США) були використані як контроль. За допомогою CD44 (FITC) и CD24 (FITC) моноклональних антитіл проводили подвійне імунофенотипове фарбування. Клітини з середнім значенням флуоресценції CD44-маркера більше ніж 10^3 (за логарифмічною шкалою), відносили до CD44^{high}-субпопуляції. Концентрацію вищевказаних субпопуляцій клітин у зразках АКЕ визначали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur («BD, США»). Для мінімізації помилок у пробах аналізували не менше 10 000 подій. Облік і аналіз результатів здійснювали за допомогою програми «WinMDI 2.8». Індекс CD44^{high} / CD117⁺-клітин визначали як співвідношення відсотка цих клітин в асцитичній рідині з перитонеальної порожнини тварин кожної з досліджуваних груп.

Ступінь інгібіції росту АКЕ обчислювали за формулою: $C_i = ((V(k) - V(d)) / V(k)) \cdot 100\%$, де $V(k)$ – абсолютна кількість клітин АКЕ в перитонеальній порожнині контрольної

групи; $V(d)$ – у дослідній групі тварин (варіанти 1–3). Інтенсивність росту АКЕ дослідних груп ($I_{рд}$) визначали за формулою: $I_{рд} = I_{рк} - C_i$, де $I_{рд}$ – інтенсивність росту пухлини дослідної групи; $I_{рк}$ – інтенсивність росту пухлини контрольної групи, C_i – ступінь інгібіції росту АКЕ дослідної групи тварин. При розвитку АКЕ інтенсивність росту пухлини приймалася за 100 %, при цьому ступеня інгібіції росту АКЕ не було.

Для статистичної обробки результатів застосовували критерій t Стьюдента й комп'ютерну програму «Excel» («Microsoft», США). Результати приводили у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення. Відмінності вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створені гібридні наноконкомплекси мали середній гідродинамічний діаметр 77 нм (рис.1, а). Схематичну будову комплексу представлено на рис.1, б. Додавання до створених наноконкомплексів барвника DiI дає змогу простежити за динамікою вбудовування комплексу в мембрану клітини [11]. Раніше ми показали, що наноконкомплекси були здатні до візуалізації практично всіх клітин із фенотипом CD44⁺, до складу яких входить CD44^{high}-популяція,

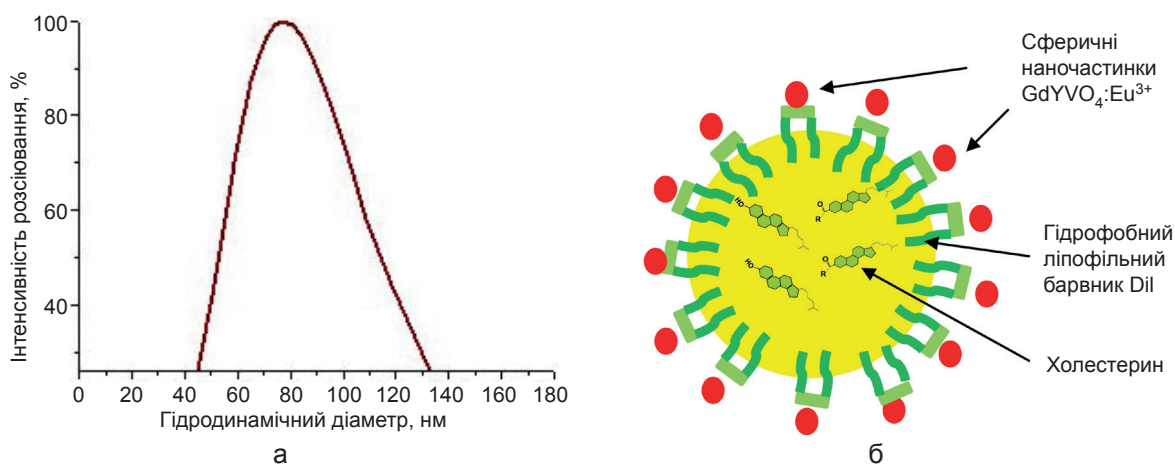


Рис.1. Гібридний наноконкомплекс: а – розподіл за розміром гібридних наноконкомплексів у воді, б – схематична будова комплексу

що має усі ознаки СРК [12]. Саме барвник DiI забезпечував можливість ідентифікації СРК у клітинах АКЕ після інкубації з наноконкомплексами, що було підтверджено методами люмінесцентної мікро- та спектроскопії. Отже, можна вважати, що гібридні наноконкомплекси – агенти таргетного маркування канцерогенних клітин-попередників [12].

З точки зору використання наноконкомплексів такого складу в терапії злоякісних пухлин важлива оцінка їхньої інактивуючої дії на СРК в умовах *in vivo*. Встановлено, що АКЕ (контроль) є гетерогенною популяцією, у якій наявні клітини з такими фенотиповими маркерами: CD44^{high}, CD44⁺CD24⁻, CD44⁺CD24⁺, CD44⁻CD24⁺, CD117⁺, Sca-1⁺ (таблиця).

В умовах розвитку онкопатології дія хімічних агентів або радіації може перерозподіляти субпопуляційний склад пухлини зі включенням каскадів активації/інгібіції проліферативної активності стовбурових клітин. Очікувано, що обробка клітин АКЕ синтезованими наноконкомпозитами виражено перерозподіляла субпопуляції клітин-попередників із різним фенотипом, тобто різним рівнем диференціювання порівняно з контр-

олем (див. таблицю). Виняток – субпопуляція клітин із маркером Sca-1, кількість яких була досить високою у контролі (87,11±4,23) та істотно не змінювалася при всіх видах обробки.

Інкубація клітин АКЕ зі сферичними НЧ (варіант 1) знижувала удвічі порівняно з контролем концентрацію CD44^{high}-клітин. Концентрація СРК з фенотипом CD44⁺CD24⁻ ще більше зменшувалася, а саме у 4,5 раза. При цьому збільшувалася концентрація диференційованих CD44⁺CD24⁻, CD44⁻CD24⁺- та CD117⁺-клітин порівняно з контролем. Деякими авторами підвищення рівня експресії CD117 вважається можливим тестом ефективності протипухлинної терапії [26]. У такому разі відзначене нами підвищення концентрації CD117⁺-клітин удвічі порівняно з контролем на тлі пригнічення росту АКЕ на 58,24±3,45% може бути взаємозумовлюючим та свідчити про позитивний ефект цієї терапії (див. таблицю).

Обробка клітин АКЕ НЧ із холестерином (варіант 2) майже 9-кратно знижувала концентрацію CD44^{high}-клітин порівняно з контролем (див. таблицю). Важливо, що концентрація всіх інших субпопуляцій клітин

Зміна компонентного складу та функціональної активності культивованих *in vivo* клітин аденокарциноми Ерліха (АКЕ) після обробки гібридними наноконкомплексами та їхніми складовими (M±m, n = 5)

| Варіанти обробки клітин | Концентрація клітин з вказаним фенотипом, % | | | | | | Абсолютна кількість клітин у перитонеальній порожнині x10 ⁷ кл | Ступінь інгібіції росту АКЕ, % |
|--|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------|---|--------------------------------|
| | CD44 ^{high} | CD44 ⁺ CD24 ⁻ | CD44 ⁺ CD24 ⁺ | CD44 ⁻ CD24 ⁺ | CD117 ⁺ | Sca-1 ⁺ | | |
| Контроль АКЕ <i>per se</i> | 0,17± | 3,38± | 2,08± | 1,23± | 2,65± | 87,11± | 34,8± | - |
| АКЕ та сферичні наночастинки (варіант 1) | 0,03 | 0,21 | 0,22 | 0,14 | 0,23 | 4,23 | 1,27 | |
| АКЕ, сферичні наночастинки та холестерин (варіант 2) | 0,09± | 0,75± | 2,75± | 6,18± | 5,04± | 81,82± | 14,53± | 58,24± |
| АКЕ та гібридний комплекс (варіант 3) | 0,01 ^{*,**,*} | 0,05 ^{*,**,*} | 0,28 ^{*,**,*} | 0,32 [*] | 0,32 ^{*,**,*} | 5,28 | 0,72 ^{*,**,*} | 3,45 ^{*,**,*} |
| | 0,02± | 0,40± | 9,77± | 7,85± | 10,47± | 83,77± | 8,80± | 74,70± |
| | 0,001 ^{*,**} | 0,02 ^{*,**,*} | 0,62 ^{*,**,*} | 0,44 ^{*,**} | 0,83 ^{*,**} | 5,73 | 0,25 ^{*,**} | 4,38 ^{**} |
| | 0,01± | 0,35± | 8,14± | 7,01± | 9,29± | 87,95± | 8,14± | 76,61± |
| | 0,001 ^{*,**,*} | 0,02 ^{*,**} | 0,36 ^{*,**} | 0,28 [*] | 0,68 ^{*,**} | 6,45 | 0,27 ^{*,**} | 4,70 ^{**} |

*P < 0,05 відносно контролю, ** відносно варіанту 1, *** відносно варіанту 2, **** відносно варіанту 3.

(виключаючи Sca-1⁺) після такої обробки максимально підвищувалася порівняно з контролем. Такий характер перерозподілу субпопуляційного складу АКЕ супроводжувався посиленням інгібіції росту пухлини порівняно з варіантом 1 (74,70±4,38 і 58,24±3,45 % відповідно, P < 0,05).

Після введення в комплекс барвника DiI (варіант 3) встановлено зниження кількості тільки CD44^{high}-клітин (порівняно з варіантом 2). Інші показники після обробки клітин АКЕ суттєво не змінювалися. Такий незначний перерозподіл субпопуляцій практично не вплинув і на ступінь пригнічення росту пухлини (76,61±4,70 і 74,70±4,38% відповідно).

Таким чином, можна припустити, що протипухлинна дія синтезованих гібридних наноконкомплексів зумовлена наявністю в їхньому складі сферичних НЧ. Раніше нами була доведена їхня здатність до гальмування росту АКЕ *in vivo* внаслідок максимального зниження концентрації CD44^{high}-клітин [6]. Слід зазначити, що додавання холестерину до НЧ підсилює їхню інгібувальну активність завдяки його спорідненості до мембран клітин

пухлини. Дані аналізу структури і принципів функціонування мембран пухлинних клітин свідчать на користь цього припущення [27]. Автори зробили висновок, що вбудовування холестерину в мембрани клітин пухлини є передумовою адресної доставки ліпосом із терапевтичними речовинами безпосередньо всередину клітини.

Зміна концентрацій усіх популяцій клітин АКЕ після обробки наноконкомплексам дає підставу вважати, що їх мішенню можуть бути майже всі клітини загального пула цієї аденокарциноми (за винятком Sca-1⁺), але насамперед – СРК із фенотипом CD44^{high}. Зниження концентрації CD44^{high}-клітин суттєво впливає на інтенсивність росту АКЕ. Крім того, виявилось, що особливу роль у рості пухлини відіграє співвідношення субпопуляцій CD44^{high}- і CD117⁺-клітин (індекс CD44^{high} / CD117⁺). При всіх видах обробки АКЕ зменшення індексу CD44^{high} / CD117⁺ супроводжувалося зниженням інтенсивності росту пухлини, що обумовлювало збільшення кількості тварин, які вижили до 20-ї доби розвитку АКЕ (рис.2).

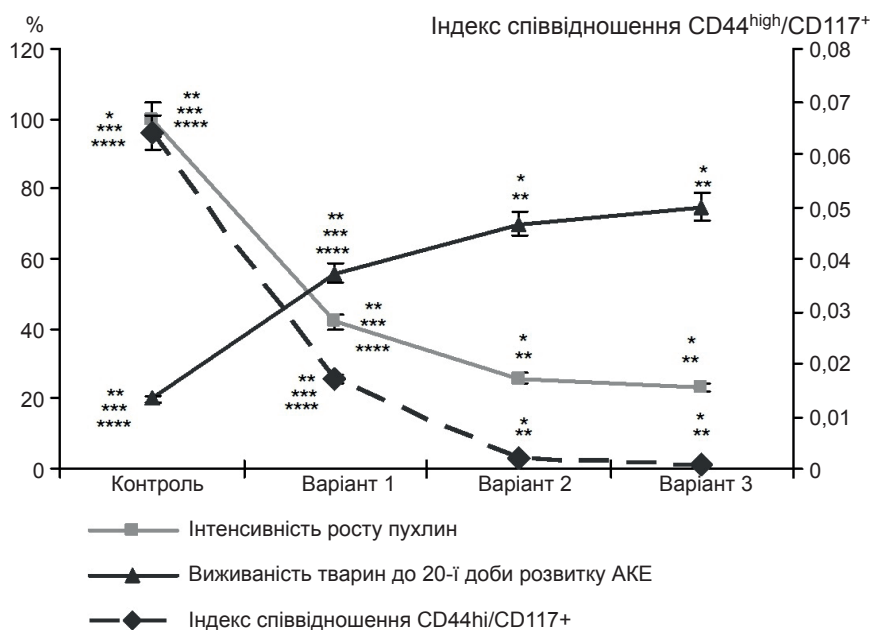


Рис.2. Показники інтенсивності росту аденокарциноми Ерліха, виживаності тварин та індекс співвідношення субпопуляцій клітин CD44^{high}/CD117⁺ після інкубації з наноконкомпозитами. *P < 0,05 відносно контролю, ** відносно варіанту 1, *** відносно варіанту 2, **** відносно варіанту 3

Отже, встановлена здатність синтезованих гібридних наноконкомплексів на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів до інгібіції росту пухлини ($76,61 \pm 4,70$ %) на тлі істотної зміни кількісного співвідношення клітин-попередників із різним фенотипом у загальному пулі АКЕ. Кожна зі складових гібридного комплексу робила свій внесок у інгібіцію росту пухлини. Так, сферичні НЧ були здатні значно пригнічувати ріст АКЕ (ступінь інгібіції $58,24 \pm 3,45$ %). Додавання холестерину до наноконкомплексу ампліфікувало протипухлинну дію НЧ, зменшуючи інтенсивність росту пухлини (ступінь інгібіції $74,70 \pm 4,38$ %), а введення в комплекс барвника DiI, хоча й не статистично значуще, але збільшувало цей показник до $76,61 \pm 4,70$ %. При всіх видах обробки АКЕ знижувалася концентрація CD44^{high}-клітин та одночасно підвищувалася кількість CD117⁺-клітин, тому індекс співвідношення CD44^{high}/CD117⁺ може бути запропонований як один із діагностичних і прогностичних показників розвитку та ступеня інактивації онкопроцесу при різних видах протипухлинної терапії.

А.Н. Гольцев, Н.Н. Бабенко, Ю.А. Гаевская, О.В. Челомбитко, Н.А. Бондарович, Т.Г. Дубрава, М.В. Останков, В.К. Клочков, Н.С. Кавок, Ю.В. Малукин

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ГИБРИДНЫМИ НАНОКОМПЛЕКСАМИ, СОДЕРЖАЩИХ ОРТОВАНДАТЫ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ, ХОЛЕСТЕРИН И ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ КРАСИТЕЛЬ

Разработана методика получения гибридных наноконкомплексов, содержащих ортованадаты редкоземельных элементов GdYVO₄:Eu³⁺, холестерин и люминесцентный краситель DiI. Методом иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD44, CD24, CD117 и Sca-1 маркерам установлено изменение соотношения опухолевых предшественников разного уровня дифференцировки в общем пуле аденокарциномы Эрлиха после обработки гибридными наноконкомплексами. Существенное снижение концентрации наиболее канцерогенных CD44^{high}-клеток с одновременным увеличением

количества CD117⁺-клеток повышало индекс соотношения CD44^{high} / CD117⁺-клеток. Показано, что применение гибридных наноконкомплексов подавляло рост опухоли почти на 80 %. Доказана значимость кооперативных взаимодействий клеток с разными фенотипическими признаками в поддержании роста опухолевых сайтов. Предлагается использование индекса соотношения CD44^{high} / CD117⁺-клеток как одного из диагностических и прогностических показателей развития и степени инактиваации опухолевого процесса при применении различных видов противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: стволовые раковые клетки; наночастицы; аденокарцинома Эрлиха; ортованадаты.

A.N. Goltsev¹, N.N. Babenko¹, Yu.A. Gaevskaya¹, O.V. Chelombitko¹, N.A. Bondarovich¹, T.G. Dubrava¹, M.V. Ostankov¹, V.K. Klochkov², N.S. Kavok², Yu.V. Malyukin²

FUNCTIONAL ACTIVITY OF EHRlich CARCINOMA CELLS AFTER TREATMENT WITH HYBRID NANOCOMPLEXES CONTAINING ORTHOVANADATES OF RARE-EARTH ELEMENTS, CHOLESTEROL AND LUMINESCENT DYE

Tumor development is the consequence of expanding the population of low differentiated cells with unlimited self-maintenance potential, i.e. cancer stem cells (CSCs). Application of new forms of nanocomposites capable of binding to CSCs and inducing the tumor destruction is perspective direction for treating this pathology. There have been developed the methods of obtaining hybrid nanocomplexes containing rare-earth orthovanadates GdYVO₄:Eu³⁺, cholesterol and luminescent dye DiI. By immune fluorescence method using monoclonal antibodies to CD44, CD24, CD117 and Sca-1 markers there has been established the change in the ratio of tumor progenitors of various differentiation levels in a general pool of Ehrlich carcinoma (EC) after treatment with hybrid nanocomplexes. Essential reduction in the concentration of the most tumorigenic CD44^{high} cells with simultaneous rise in the number of CD117⁺-cells resulted in an increased index of CD44^{high} / CD117⁺ ratio. It has been demonstrated that application of hybrid nanocomplexes suppressed the tumor growth almost by 80%. The value of cooperative interactions of the cells with different phenotype signs in tumor sites has been proved. The index of CD44^{high} / CD117⁺ ratio can be used as one of diagnostic and prognostic parameters of development and inactivation rate of tumor process when using different types of anti-tumor therapy.

Key words: cancer stem cells; nanoparticles; Ehrlich carcinoma; orthovanadates.

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov;

²Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

REFERENCES

- Ambasta RK, Sharma A, Kumar P. Nanoparticle mediated targeting of VEGFR and cancer stem cells for cancer therapy. *Vasc Cell*. 2011 Nov;3:26. doi: 10.1186/2045-824X-3-26.
- Prylutska SV, Burlaka AP, Prylutskyi YI, Ritter U, Scharff P. Pristine C(60) fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp Oncol*. 2011 Sep;33(3):162–4.
- Panchuk RR, Prylutska SV, Chumak VV, Skorokhlyd NR, Lehka LV, Evstigneev MP, Prylutskyi YuI, Berger W, Heffeter P, Scharff P, Ritter U, Stoika RS. Application of C60 fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment in vitro and in vivo *J Biomed. Nanotechnol*. 2015 July;11(7):1139–52 DOI:10.1166/jbn.2015.2058.
- Kopf-Maier P, Krahl D. Tumor inhibition by metallocenes: ultrastructural localisation of titanium and vanadium, in treated tumor cells by electron energy loss spectroscopy. *Chem Biol Interact*. 1983 Jun;44(3):317–28.
- Navara CS, Benyumov A, Vassilev A, Narla RK, Ghosh P, Uckun FM. Vanadocenes as potent anti-proliferative agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2001 Apr;12(4):369–76.
- Goltsev AN, Babenko NN, Gayevskaya YuA, Bondarovich NA, Ostankov MV, Chelombytko OV, Dubrava TG, Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. Capability of orthovanadate-based nanoparticles to in vitro identification and in vivo inhibition of cancer stem cells. *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies*. 2013; 11(4): 729–39. [Ukrainian].
- Goltsev AN, Chelombitko OV, Babenko NN, Gayevskaya YuA, Dubrava TG, Bondarovich NO, Ostankov MV, Dimitrov AYu, Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. Functional activity of Ehrlich carcinoma cancer stem cells after treatment by orthovanadate-based nanoparticles. *Ann Oncol*. 2014; 25(suppl 4):iv569. doi: 10.1093/annonc/mdl359.20 *Annals of oncology*.
- Karpenko NA, Malukin YuV, Koreneva E M, Klochkov VK, Kavok NS, Smolenko NP, Pochernyaeva SS. The effects of chronic intake of nanoparticles of cerium dioxide or gadolinium ortovanadate into aging male rats. *Proceedings of the 3rd Int. Conf. «Nanomaterials: Applications and Properties '2013»*, September 16-21, 2013: Abstract book - Alushta (Ukraine), 2013; 2(4):04NAMB28-1–04NAMB28-4.
- Al - Jarallah A, Trigatti BL. A role for the scavenger receptor, class B type I in high density lipoprotein dependent activation of cellular signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec; 1801(12):1239-48. doi: 10.1016/j.bbali.2010.08.006.
- Clayman RV, Bilhartz LE, Buja LM, Spady DK, Dietsch JM. Renal cell carcinoma in the Wistar-Lewis rat: a model for studying the mechanisms of cholesterol acquisition by a tumor in vivo. *Cancer Res*. 1986 Jun;46(6):2958–63.
- Lebed AS, Efimova SL, Guralchuk GYa, Sorokin AV, Borovoy IA. Study of complex formation processes in “fluorescent probe - surface active agent” system in aqueous solutions at the concentration of surface active agents below and under CCM. *Biophysical bulletin*. 2010; 24(1):46-55. [Ukrainian].
- Goltsev AN, Babenko NN, Gayevskaya YuA, Dubrava TG, Ostankov MV, Chelombitko OV, Klochkov VK, Kavok NS. Identification of tumour cells with hybrid complexes based on non-organic nanoparticles and organic biologically active compounds: Collection of 16th International Scientific and Practical Conference “Fundamental and Applied Research, Design and Application of High Technologies in Industry and Economy”, St. Petersburg, December 5-6, 2013. St. Petersburg: Publishing House of Polytechnic University, P.121-31 [Russian].
- Al-Hajj M., Clarke M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 2004 Sep 20;23(43):7274-82.
- Ghebeh H, Sleiman GM, Manogaran PS, Al-Mazrou A, Barhoush E, Al-Mohanna FH, Tulbah A, Al-Faqeeh K, Adra CN. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44high/CD24low phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. *BMC Cancer*. 2013; 13:289. doi: 10.1186/1471-2407-13-289.
- Yan W, Chen Y, Yao Y, Zhang H, Wang T. Increased invasion and tumorigenicity capacity of CD44⁺/CD24⁻ breast cancer MCF7 cells in vitro and in nude mice. *Cancer Cell Int*. 2013 Jun 24;13(1):62. doi: 10.1186/1475-2867-13-62.
- Li Y, Welm B, Podypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X, Rowlands T, Egeblad M, Cowin P, Werb Z, Tan LK, Rosen JM, Varmus HE. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(26):15853–8.
- Huang R, Wu D, Yuan Y, Li X, Holm R, Trope CG, Nesland JM, Suo Z. CD117 expression in fibroblasts-like stromal cells indicates unfavorable clinical outcomes in ovarian carcinoma patients. *PLoS One*. 2014; 9 (11):e112209.
- Chui X, Egami H, Yamashita J, Kurizaki T, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M. Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer*. 1996 May;73(10):1233-6.
- Kondi-Pafiti A, Arkadopoulos N, Gennatas C, Michalaki V, Frangou-Plegmenou M, Chatzipantelis P. Expression of c-kit in common benign and malignant breast lesions. *Tumori*. 2010 Nov-Dec;96(6):978-84.
- Ozaslan M, Karagoz I D, Kilic I H, Guldur ME. Ehrlich ascites carcinoma. *African J Biotechnology*. 2011 March; 10(13): 2375–8.
- Goltsev AN, Chelombytko OV, Bondarovich NA, Ostankov MV, Dimitrov AYu. Cryopreservation effect on pluripotency gene expression in Ehrlich carcinoma cells cells: Abstracts Annual Scientific Conference & AGM of the Society for Low Temperature Biology (STBL) «Freezing biological time 50th Anniversary Celebration». London, UK, October 8-10, 2014, P.84.
- Goltsev AM, Safranchuk OV, Bondarovich MO, Ostankov MV. Change in cryolability of tumour stem cells depending

- on adenocarcinoma growth phase. Fiziol Zh. 2011; 57(4): 68–76 [Ukrainian].
23. Goltsev AM, Safranchuk OV, Bondarovich MO, Ostankov MV, Babenko NN, Gayevskaya YuA, Chelombitko OV. Methodical approaches to the stabilization of structural and functional states of cryopreserved cells of Ehrlich carcinoma. Reports National Acad Sci of Ukraine. 2012; (8):115-22. [Ukrainian].
24. Klochkov VK, 2015. Method of obtaining of an aqueous dispersion of cholesterol. Ukraine. The decision on handing over of UA patent 14.01.2015. [Ukrainian] .
25. Klochkov VK. Aqueous colloid solutions of nanoluminophores $n\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = Y, Gd, La). Material Science of Nanostructures. 2009; (2):3–8. [Ukrainian].
26. Charpin C, Giusiano S, Charfi S, Secq V, Carpentier S, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Garcia S. Quantitative immunohistochemical expression of c-Kit in breast carcinomas is predictive of patients' outcome. Br J Cancer. 2009 Jul 7; 101(1): 48–54. doi: 10.1038/sj.bjc.6605113.
27. Betker JL, Kullberg M, Gomez J, Anchordoquy TJ. Cholesterol domains enhance transfection. Ther Deliv. 2013 Apr;4(4):453-62. doi: 10.4155/tde.13.16.

*Матеріал надійшов
до редакції 23.03.2015*