

Л. С. Рєзнїченко, С. І. Шпильова, Т. Г. Грузїна, С. М. Дибкова,  
З. Р. Ульберг, академік НАН України В. Ф. Чехун

## Контактна взаємодія наночастинок золота з пухлинними клітинами: вплив розміру та концентрації

*Встановлена виражена концентраційна та розмірна залежність контактної взаємодії наночастинок золота з пухлинними клітинами лінії U937 і величини акумуляції цих частинок даним типом клітин. Процеси характеризуються швидкою кінетикою: максимум зв'язування наночастинок золота пухлинними клітинами досягається протягом 3–5 хв. Візуальне підтвердження цих процесів отримано методами конфокальної мікроскопії та трансмісійної електронної мікроскопії. Концентраційний оптимум взаємодії наночастинок золота з клітинами лінії U937 знаходиться в діапазоні  $\sim (0,1-1,0)$  нг металу/кл. для частинок усіх досліджених розмірів ( $\sim 10$ ,  $\sim 20$ ,  $\sim 30$ ,  $\sim 45$  нм). Найактивнішою є акумуляція наночастинок золота розміром  $\sim 30$  нм.*

Аналіз механізмів взаємодії наночастинок металів із біологічними системами відкриває нові перспективи щодо фундаментального розуміння їх впливу на стан та функціональну активність біологічних клітин, а також дозволяє ефективно використовувати наночастинки у всіх сферах діяльності людини. Особливо актуальним є їх медичне застосування [1, 2].

Серед усього різноманіття синтезованих на цей час наночастинок металів особливу увагу привертають наночастинки золота, використання яких у створенні засобів діагностики та терапії захворювань різної етіології, як векторів для цільової доставки біологічних і фармацевтичних речовин та ін., стає все більш поширеним [3–5]. Разом з тим особливості взаємодії наночастинок золота з біологічними клітинами, особливо їх розмірна та концентраційна залежність, є недостатньо дослідженими.

Мета проведеного нами дослідження полягала у вивченні особливостей контактної взаємодії наночастинок золота різного розміру та концентрації з пухлинними клітинами.

Дослідження проводили з використанням клітин лінії гістіоцитарної лімфоми людини U937 з колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували в середовищі RPMI 1640 (“Sigma”, США), що містило 10% ембріональної телячої сироватки (“Gibco”, США). Життєздатність клітин оцінювали із застосуванням 0,4% водного розчину трипанового синього. Кількість живих клітин під час проведення експериментів становила не менш ніж 90%.

Сферичні частинки золота із середнім розміром 10, 20, 30 та 45 нм синтезовані шляхом відновлення водного розчину золотохлористоводневої кислоти за методом Девіса [6]. Розмір отриманих наночастинок обчислено методом лазерно-кореляційної спектроскопії (Zetasizer-3, “Malvern Instruments Ltd”, Великобританія) та трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1230, “JEOL”, Японія).

Процеси контактної взаємодії досліджували методом мембранного фільтрування (фільтри № 4 та № 5 МФА, “Владипор”, Росія). Візуальне підтвердження взаємодії клітин лінії U937 з наночастинками золота отримано методами конфокальної мікроскопії (LSM 510 META, “Carl Zeiss”, Німеччина) та трансмісійної електронної мікроскопії.

Статистичну обробку результатів проводили як описано в посібнику [7] із застосуванням критерію Стьюдента.

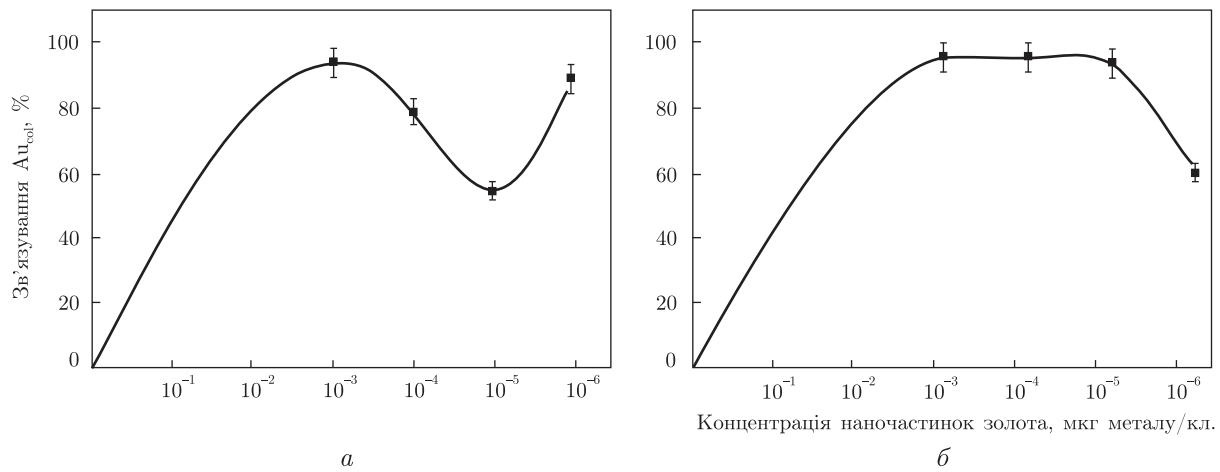


Рис. 1. Контактна взаємодія наночастинок золота розміром  $\sim 10$  нм (а) та  $\sim 30$  нм (б) з клітинами лінії U937

Отримані результати дозволили встановити виражений вплив концентрації та розміру наночастинок золота на процеси контактної взаємодії з клітинами лінії U937 і їх акумуляцію цими клітинами. Так, у діапазоні концентрацій  $10^1$ – $10^6$  кл./мл, або відповідно до концентрації наночастинок золота  $1 \cdot 10^{-1}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  мкг металу/кл. (кількість металу на одну клітину), є наявними чіткі концентраційні максимуми зв'язування близько  $10^3$ – $10^4$  кл./мл ( $10^{-3}$ – $10^{-4}$  мкг металу/кл.) для наночастинок усього розмірного діапазону.

На рис. 1 наведені криві, що характеризують процеси контактної взаємодії наночастинок золота розміром  $\sim 10$  та  $\sim 30$  нм з клітинами лінії U937.

Різкі зміни ефективності контактної взаємодії, які спостерігаються щодо всіх розмірних діапазонів наночастинок золота, найбільш імовірно пов'язані: в області малих концентрацій клітин — з токсичним впливом наночастинок золота, в області високих концентрацій клітин — із зменшенням площі активної поверхні контакту клітин з наночастинок у зв'язку з переважною міжклітинною взаємодією. Тобто існує певна критична концентрація компонентів у системі “наночастинок золота — клітини”, яка визначає ефективність зв'язування. Концентраційний оптимум взаємодії наночастинок золота з клітинами лінії U937 знаходиться в діапазоні  $\sim (0,1-1,0)$  нг металу/кл. для частинок усіх досліджених розмірів.

Процеси контактної взаємодії та акумуляції наночастинок характеризуються швидкою кінетикою: максимум зв'язування наночастинок золота пухлинними клітинами в усіх досліджених розмірних діапазонах частинок досягається протягом 3–5 хв (рис. 2). Найбільш ефективно зв'язування наночастинок золота, майже 100%, виявлено у розмірному діапазоні  $\sim 20$  та  $\sim 30$  нм, ефективність процесу для наночастинок розміром  $\sim 45$  нм становила близько 80%. Для частинок розміром  $\sim 10$  нм після досягнення певного критичного значення має місце зворотний ефект, можливим механізмом якого є здатність пухлинних клітин до активного викиду (“efflux”) токсичних для них речовин (див. рис. 2, а).

Експериментальні дані, отримані методами конфокальної та трансмісійної електронної мікроскопії (рис. 3, 4), підтверджують виражене накопичення наночастинок золота як на поверхні, так і в середині клітини. Так, найбільш виражена спорідненість наночастинок золота до клітин лінії U937 виявляється для розміру  $\sim 30$  нм (див. рис. 3, б). Незначна кількість акумульованих наночастинок золота розміром  $\sim 10$  нм та збереження цілісності структури клітини (див. рис. 3, а) вказують на ймовірний активний “викид” наночастинок

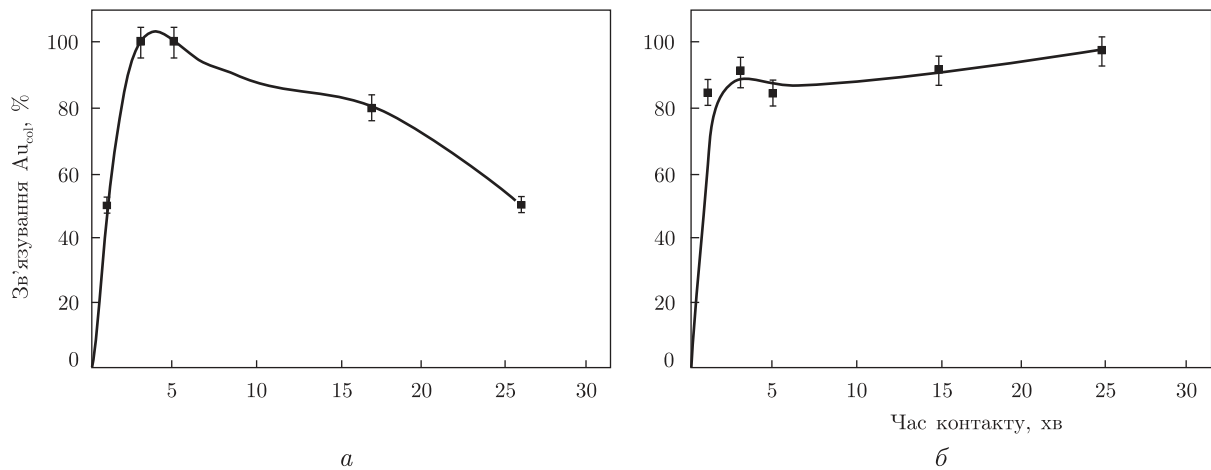


Рис. 2. Кінетика процесу контактної взаємодії клітин лінії U937 з наночастинками золота розміром  $\sim 10$  нм (а) та  $\sim 30$  нм (б)



Рис. 3. Контактна взаємодія наночастинок золота розміром  $\sim 10$  нм (а) та  $\sim 30$  нм (б) з клітинами лінії U937 за даними конфокальної мікроскопії (LSM 510 META, "Carl Zeiss", Німеччина)

золота цього розміру даним типом клітин, механізм якого подібний до протидії пухлинних клітин хіміотерапевтичним препаратам [8].

На користь зробленого припущення свідчать дані електронної мікроскопії (див. рис. 4). Так, при контакті клітин з наночастинками розміром  $\sim 10$  та  $\sim 20$  нм виявлено їх переважне накопичення у вакуолях, більш виражене для частинок розміром  $\sim 10$  нм, без помітних змін їх зовнішнього вигляду та форми (див. рис. 4, а). Однак наночастинки розміром  $\sim 30$  нм акумулюються переважно лізосомами — органелами, які виконують літичні функції та беруть участь у перетравлюванні екзогенних речовин [9]. Про активну біотрансформацію наночастинок золота розміром  $\sim 30$  нм свідчать також зміни форми та розміру тих частинок, які контактують з лізосомами (див. рис. 4, б).

Таким чином, встановлено чітку концентраційну та розмірну залежність впливу наночастинок золота на клітини лінії U937, а також швидку кінетику цього процесу з концентраційним оптимумом взаємодії наночастинок золота в діапазоні  $\sim (0,1-1,0)$  нг металу/кл. для частинок усіх досліджених розмірів. Найбільш вираженою є акумуляція наночастинок золота клітинами лінії U937 у розмірному діапазоні  $\sim 30$  нм. Взаємодія з пухлинними клітинами наночастинок розміром  $\sim 10$ ,  $\sim 20$  і  $\sim 45$  нм є значно менш ефективною. Для

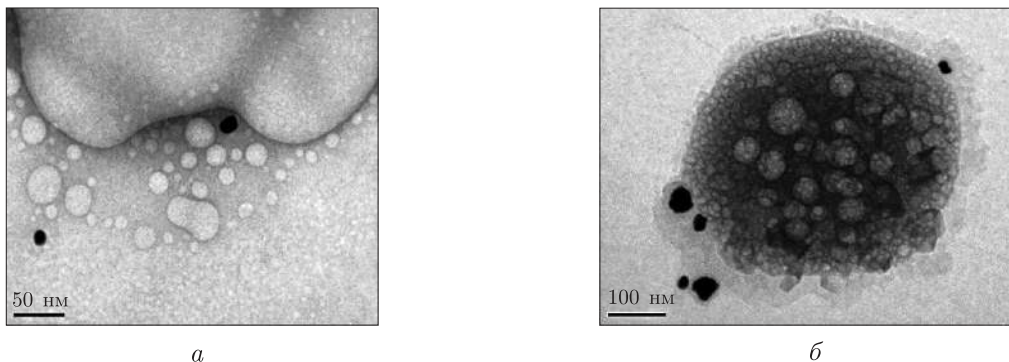


Рис. 4. Контактна взаємодія наночастинок золота розміром  $\sim 10$  нм (а) та  $\sim 30$  нм (б) з клітинами лінії U937 за даними трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1230, “JEOL”, Японія)

наночастинок розміром  $\sim 10$  нм це може бути обумовлено існуванням механізму “викиду” в пухлинних клітинах. Наведені результати є необхідними при використанні наночастинок золота у нанотехнологіях створення високоефективних засобів діагностики та цільової терапії онкозахворювань.

*Колектив авторів висловлює подяку канд. фіз.-мат. наук, ст. наук. співр. В. Ф. Горчеву за допомогу в проведенні лазерно-кореляційної спектроскопії та конфокальної мікроскопії і пров. інженеру З. О. Паніній за допомогу в проведенні електронної мікроскопії зразків.*

*Робота виконана за фінансової підтримки КПФД НАН України “Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології”, проект № 01 080 005 964.*

1. Jain K. K. Nanotechnology-based drug delivery for cancer // Technol. Cancer Res. and Treatment. – 2005. – 4, No 4. – P. 407–416.
2. Otsuka H., Nagasaki Y., Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications // Adv. Drug Delivery Rev. – 2003. – 55. – P. 403–419.
3. Jahnen-Dechent W., Simon U. Function follows form: shape complementarity and nanoparticles toxicity // Nanomedicine. – 2008. – 3, No 5. – P. 601–603.
4. Chen P. C., Mwakwari S. C., Oyelere A. K. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing // Nanotechnology, Sci. and Appl. – 2008. – 1. – P. 45–66.
5. Дыкман Л. А., Богатырев В. А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии // Успехи химии. – 2007. – 76, № 2. – С. 199–213.
6. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / Под ред. А. В. Перцова. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 132 с.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. специальностей ВУЗов. – Москва: Высш. шк., 1990. – 352 с.
8. Chekhun V. F., Kulik G. I., Yurchenko O. V. et al. Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells // Cancer Lett. – 2006. – 231, No 1. – P. 87–93.
9. Ролан Ж.-К., Селюши А., Селюши Д. Атлас по биологии клетки / Под ред. Ю. С. Ченцова. – Москва: Мир, 1978. – 119 с.

*Інститут біологічної хімії  
ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ  
Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології  
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ*

*Надійшло до редакції 04.06.2009*

L. S. Rieznichenko, S. I. Shpyleva, T. G. Gruzina, S. N. Dybkova, Z. R. Ulberg,  
Academician of the NAS of Ukraine V. F. Chekhun

### **Cancer cells—gold nanoparticles contact interaction determined by their size and concentration**

*It is shown that the gold nanoparticle size and concentration significantly influence its interaction with and the accumulation by U937 tumor cells. The cell-particle interaction is characterized by the fast kinetics and the maximum linkage during 3–5 min. The confocal and transmission electron microscopy methods were used for the visual confirmation of the contact interaction of gold nanoparticles and their accumulation by U937 cells. The concentration optimum for the interaction is  $\sim (0.1\text{--}1.0)$  ng metal/cell for the particles of all examined sizes. The most effective accumulation of gold nanoparticles by U937 cells is observed for particles with the average dimension  $\sim 30$  nm.*