

УДК: 544.525:612.014.3:535.21+612.014.48

Г. Й. Лавренчук¹✉, Ю. Б. Шевченко², А. Л. Петрановська³, В. С. Асмолкова⁴,
В. М. Оксамитний¹, І. В. Козловська¹, О. Г. Яворська¹

¹Державна установа "Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України", 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна

²Інститут ядерних досліджень НАН України, проспект Науки, 47, м. Київ, 03680, Україна

³Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, вул. Генерала Наумова, 17, м. Київ, 03164, Україна

⁴Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна

ВПЛИВ НАНОРОЗМІРНИХ МАГНІТОЧУТЛИВИХ КОМПОЗИТІВ, ЩО МІСТЯТЬ ГАДОЛІНІЙ-157, НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИН *IN VITRO*

Мета роботи – дослідити вплив нейтронозахватних агентів (магнітокерованих нанокомпозитів, що містять гадоліній-157) на морфофункціональні властивості клітин.

Матеріали і методи. Робота виконана на перещеплюваній культурі клітин лінії L₉₂₉. Досліджувались нанокомпозити на основі магнетиту, модифікованого функціональними аміногрупами, хімічно закріпленими діетилентриамінпентаоцтовою кислотою і гадолінієм (Fe₃O₄/γ-АПС/ДТПК-Gd) (реагент 1), мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою (Fe₃O₄/ДМСК-Gd), яка зв'язується з гідроксильною групою поверхні магнетиту (реагент 2); гадоліній адсорбували з розчину сульфату гадолінію. Реагентом 3 слугувала магнітна речовина Fe₃O₄ з олеатом натрію. Морфофункціональні характеристики культури клітин оцінювали у різні терміни культивування за загальноприйнятими показниками життєздатності: проліферативна і мітотична активність, кількість гігантських багатоядерних клітин, апоптоз.

Результати і висновки. За результатами експериментального дослідження встановлено високу біосумісність до клітин магнітокерованих нанокомпозитів з гадолінієм, модифікованих діетилентриамінпентаоцтовою кислотою та мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою: при інкубації клітин з такими нейтронозахватними агентами не спостерігали проявів токсичності, окрім максимальних концентрацій, водночас відмічали зменшення адгезивних властивостей клітин та зменшення їх мітотичної активності на тлі контрольної щільності популяції клітин. Виявлено, що стабілізований олеатом натрію ферит викликав деструктивні зміни в клітинах тільки за концентрації 500 мкг/мл, і призводив до зменшення їх мітотичної активності у 3–5 разів у всьому діапазоні концентрацій. Показано, що магнітокеровані нанокомпозити індукували апоптоз у культурі клітин в залежності від концентрації реагента.

Ключові слова: нейтронозахватна терапія, магнітокеровані нанокомпозити, проліферація, апоптоз.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 419–430.

✉ Лавренчук Галина Йосипівна, e-mail: hl20071956@ukr.net

H. Y. Lavrenchuk¹✉, Y. B. Shevchenko², A. L. Petranovska³, V. S. Asmolkova⁴, V. M. Oksamytnyi¹, I. V. Kozlovska¹, O. H. Yavorska¹

¹State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

²Institute of Nuclear Research of Ukraine NAS of Ukraine, Prospect Nauki, 47, Kyiv, 03680, Ukraine

³Institute of Surface Chemistry. AA Chuiko NAS of Ukraine, str. General Naumov, 17, Kyiv, 03164, Ukraine

⁴Palladin Institute of Biochemistry NAS of Ukraine, str. Leontovycha, 9, Kyiv, 01601, Ukraine

Impact of gadolinium-157 containing nanoscale magnetosensitive composites on morfofunctional properties of cells *in vitro*

Objective – to investigate the morfofunctional cells properties under the action of magneticallybased nanocomposites containing gadolinium-157.

Materials and methods. Experimental studies are performed in cell culture line L929 Nanocomposites based on magnetite modified by functional amino groups chemically fixed by diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and gadolinium – ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-APS/DTPA-Gd}$) were studied (1), also by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) – ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{DMSA-Gd}$), which binds to the hydroxyl group of magnetite surface (2); gadolinium was adsorbed from a solution of gadolinium sulfate. Reagent 3 – magnetic substance Fe_3O_4 with sodium oleate. Morfofunctional characteristics of cell culture were evaluated in various terms by standard indicators of sustainability: proliferative and mitotic activity and the number of giant multinuclear cells, apoptosis.

Results and conclusions. We established that magnetdriven nanocomposites with gadolinium modified by DTPA and DMSA, were more biocompatible to cells: incubation of cells with neutron capture agents (NCA) in the studied range of concentrations showed no toxicity, except maximum concentration, while decreasing cells adhesive properties. For all nanocomposites we observed decrease in mitotic activity in the background of the control cell population density, which may indicate synchronization of cell division. We found that the stabilized by sodium oleate ferrite caused destructive changes in cell culture only at concentrations of 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$, but reduced mitotic activity in cell culture in 3-5 times in the whole range of concentrations. It is shown that magnetdriven nanocomposites induce different levels of apoptosis in cultured cells depending on the concentration of the reactants.

Key words: neutron capture therapy, magnetdriven nanocomposites, proliferation, apoptosis.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:419-430.

ВСТУП

Магнітні однодоменні частинки, зокрема, наночастинки магнетиту, широко застосовують в якості рентгеноконтрастних, сорбційних і транспортних засобів, а також для магнітної гіпертермії. Особливо актуальними є роботи в області діагностики і терапії онкозахворювань. Фіксація та депонування носіїв лікарських препаратів магнітним полем в ділянці пухлини [1–5] дає можливість значно зменшити їх загальну терапевтичну дозу, а використання локальної гіпертермії дозволяє проводити терапію онкозахворювань без застосування хімічних препаратів. Магнетит характеризується низькою токсичністю, високим рівнем мутагенної безпеки, відсутністю негативних реакцій організму при внутрішньовенних, внутрішньоартеріальних та внутрішньом'язових введеннях магніточутливого колоїду [6]. Окрім того, на основі нанодисперсного магнетиту можуть бути синтезовані магнітокеровані композитні терапевтичні агенти для нейтронозах-

INTRODUCTION

Single-domain magnetic particles, in particular nanoparticles of magnetite are widely used as an opaque, sorption and transport vehicles as well as for magnetic hyperthermia. Particularly relevant is the work in cancer diagnostics and treatment field. Fixing and deposition of drugs carriers by magnetic field in the tumor [1–5] makes it possible to reduce significantly their overall therapeutic dose. Usage of local hyperthermia in cancer therapy allows to avoid chemicals usage. Magnetite is characterized by low toxicity, high mutagenic security, lack of adverse reactions after intravenous, intraarterial and intramuscular administration of magnetosensitive colloid [6]. In addition, magnetdriven composite therapeutic agents for neutron capture therapy (NCT) based on nanodispersed magnetite can be synthesized [7, 8]. The presence of gadolini-

ватної терапії (НЗТ) [7, 8]. Присутність гадолінію (^{157}Gd) в препаратах дозволяє поєднувати нейтронозахватну терапію пухлин і МРТ-діагностику. Тому отримання нейтронозахватних агентів (НЗА) – ^{157}Gd -вмісних нанокompatитів на основі нанорозмірного магнетиту як перспективного засобу для комбінованої діагностики в МРТ і селективного накопичення ^{157}Gd на тканинному рівні для використання в нейтронозахватній терапії – є важливим і актуальним.

МЕТА РОБОТИ

Дослідити вплив нейтронозахватних агентів (магнітокероаних нанокompatитів, що містять гадоліній-157) на морфофункціональні властивості клітин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні дослідження виконані на культурі клітин лінії L_{929} (NCTC-clone 929, Clone of strain L) [9], яка морфологічно є фібробластоподібною. Культура використовується в основному для імунологічних, радіобіологічних, токсикологічних досліджень. Отже, клітини L_{929} були обрані для дослідження через свою здатність до перманентного поділу, з метою створення моделі проліферативної тканини *in vitro*. Клітини культивували в повному поживному середовищі RPMI-1640, що містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамами [10]. Клітини вирощували при постійній температурі 37 °C на покривних скельцях розмірами (16 × 8) мм, які знаходилися на дні скляних пляшечок, до конфлуентного стану моношару (1–6 діб).

Досліджували вплив нанокompatитів на основі магнетиту, модифікованого функціональними аміногрупами, хімічно закріпленими діетилентриамінпентаоцтовою кислотою (ДТПК) і гадолінієм ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}/\text{ДТПК-Gd}$) (реагент 1). У реагента 2 проведено модифікацію поверхні *meso*-2,3-димеркаптосукциновою кислотою (ДМСК) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ДМСК-Gd}$), що зв'язується з гідроксильною групою поверхні магнетиту; гадоліній адсорбували з розчину сульфату гадолінію. Реагентом 3 слугувала магнітна речовина Fe_3O_4 з олеатом натрію. Методами рентгеноструктурного аналізу, рентгенівської фотоелектронної спектроскопії, електронної мікроскопії колоїди охарактеризовані як полідисперсні, що складаються з частинок розмірами від 2 до 22 нм (при максимальному вмісті фракції в 7,5 нм). Всі НЗА додавали в культуральне середовище через 24 год після посадки клітин (щоб вони не впливали на адгезію та розплатання клітин на скляній підложці) в кінцевих концен-

um in the drug can allows to combine neutron capture therapy of tumors and MRI diagnostics. So getting neutroncapture agents (NCA) – ^{157}Gd -containing nanocomposites based on nanodimension magnetite is a promising tool for combined diagnostics by MRI and selective accumulation of ^{157}Gd at the tissue level for usage in neutron capture therapy is important and relevant.

OBJECTIVE

To investigate the morphological and functional properties of cells under the action of magnetite containing gadolinium-157.

MATERIALS AND METHODS

Experimental studies are performed in cell culture line L_{929} (NCTC-clone 929, Clone of strain L) being morphologically the fibroblast-like one [9]. This culture is mainly used for immunological, radiobiological and toxicological studies. So, L_{929} cells were selected for study because of the ability to permanent division to create a model of proliferative tissue *in vitro*. Cells culturing was carried out in a full nutrient medium composition: RPMI-1640, that contained 4 mmol/l L-glutamine, 10 % – fetal bovine serum, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicine according to standard methods of work with cell strains [10]. Cells were grown to confluent monolayer state at a constant temperature of 37 °C on coating glass slides size 8 × 16 (mm) placed at the bottom of the glass bottles (1–6 days).

Nanocomposites based on magnetite modified by functional aminogroups (γ -aminopropyltriethoxysilane, γ -APS) chemically fixed by diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and gadolinium ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}/\text{DTPA-Gd}$) were studied – reagent 1. Reagent 2 held surface modification by *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{DMSA-Gd}$), which binds to the hydroxyl group of magnetite surface; gadolinium was adsorbed from a solution of gadolinium sulfate. Reagent 3 – magnetic substance Fe_3O_4 with sodium oleate. By X-ray analysis, X-ray photoelectron spectroscopy, electron microscopy of colloids were described as polydispersities consisting of particles ranging in size from 2 to 22 nm (with a maximum content of fractions ~ 7.5 nm). All NCA were added to the culture medium 24 h after planting cells (so they do not affect the adhesion and spreading cells on a glass substrate) at final concen-

нтраціях 0,005; 0,05; 0,5; 5; 50 та 500 мкг/мл. Культивування клітин в присутності НЗА здійснювали упродовж 5 діб. Морфофункціональні характеристики культури клітин оцінювали у різні терміни культивування клітин за загальноприйнятими показниками життєздатності: проліферативна і мітотична активність та кількість гігантських багатоядерних клітин. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту. Під оптичним мікроскопом "Axioscop" (West Germany) при збільшенні у 1000 разів у межах сітки підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість гігантських багатоядерних (2 і більше ядер) клітин. Мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів розраховувалися на 1000 клітин (%). Фото отримані за допомогою цифрової камери DIGITAL CAMERA for Microscope ScienceLab DCM320 (USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels. У тих же культурах клітин, в яких досліджували проліферативну та мітотичну активність, визначали кількість апоптотичних клітин. Для цього клітини, які залишилися на дні флакона після відбору покривного скла, промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), 10 хв витримували у розчині Версену для відкріплення їх від скла, потім заміщували його ЗФР і ресуспендували. 1 мл суспензії клітин центрифугували у ЗФР (1500 об/хв протягом 5 хв). Супернатант зливали. Процедуру відмивання повторювали 3 рази. Потім до осаду у пробірку додавали 1 мл розчину пропідію йодиду (5 мг PI, 0,1 % цитрату Na та 0,1 % Triton X-100) та інкубували протягом 1 год при температурі 4 °C. Аналіз апоптозу проводили на протоковому цитофлюориметрі FACStar Plus фірми "Becton Dickinson" (США) [11].

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами з використанням t-критерію Стьюдента та за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel та Biostat.

При виконанні експериментальних досліджень було проаналізовано 425 препаратів культур клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для вивчення ефектів у клітинах без впливів нейроендокринної системи організму використали модель культури перещеплюваних клітин лінії L₉₂₉. В контролі (рис. 1, А) клітини утворювали щільний моношар з типових фібробластоподібних клітин веретеноподібної або полігональної форми. Більшість клітин мали два відростки. Цитоплазмі цих клітин притаманні світлі вакуолі та маленькі гранули. Ядра клітин відносно великі, зустрічалися окремі двоя-

trations of 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50 and 500 µg/ml. Culturing cells in the presence of NCA was carried out for 5 days. Morphofunctional characteristics of cell culture were evaluated in various terms by standard indicators of sustainability: proliferative and mitotic activity and the number of giant multinuclear cells. Proliferative activity of the cells was assessed by growth kinetics. Under the optical microscope "Axioscop" (West Germany) within the grid with an increase in 1000 the total number of cells, the number of mitoses and the number of giant multi (2 or more nuclei) cells were counted. Mitotic index and the index of polykaryocytes were calculated on 1000 cells (%). Photo images were taken at the DIGITAL CAMERA for Microscope ScienceLab DCM320 (USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels. The number of apoptotic cells was assayed in the same cell cultures, which were tested for proliferative and mitotic activity. In this regard the cells remaining at the bottom of the bottle after selection of cover glass were washed with buffered saline and kept for 10 minutes in a Versen solution to detach them from the glass. Then it was replaced with buffered saline and cells were resuspended. 1 ml of cell suspension in buffered saline was centrifuged (1500 RPM for 5 min). The supernatant was poured. Procedure was repeated 3 times. Then the sediment was added 1 ml of propidium iodide (PI 5 mg, 0.1% Na citrate and 0.1% Triton X-100) in a test tube and incubated for 1 h at 4 °C. In the same cell cultures, which were examined for proliferative and mitotic activity, we determined the number of apoptotic cells in ductal cytometer FACStar Plus ("Becton Dickinson", USA) [11].

The experimental data was treated with conventional statistical methods using Student t-test and using software packages Microsoft Excel and Biostat.

In carrying out experimental studies we have analyzed 425 cell culture preparations.

RESULTS AND DISCUSSION

The model of inoculated culture cell line L₉₂₉ was used to study the effects in cells without affecting the body's neuroendocrine system. In control (Fig. 1, A) cells formed a dense monolayer of typical fibroblastlike cells with fusiform or polygonal shape. Most cells had two processes. The cytoplasm of these cells is characterized by light vacuoles and small granules. Cells nuclei relatively large, some dual and hyperchromic cells can be

дерні, а також гіперхромні клітини. У полі зору спостерігали 2–5 клітин на стадії поділу.

Дослідження кінетики росту контрольних культур клітин (рис. 1, Б) показало, що для них характерне збільшення проліферативної активності протягом 1–4 діб культивування (фаза логарифмічного росту) з поступовим виходом на плато на 5–6-ту добу (фаза стаціонарного росту). У ці терміни щільність моношару клітин досить висока. Максимум мітотичної активності спостерігався на 3-тю добу культивування. У подальшому мітотичний індекс зменшувався за рахунок контактної інгібування мітозу та конфлюентного стану культури клітин. Індекс гігантських полікаріоцитів в контролі становив 8–17 %.

Таким чином, асинхронна перещеплювана культура клітин лінії L₉₂₉ завдяки доступності, легкості у культивуванні та відтворюваності результатів може бути адекватною моделлю для експериментальних досліджень показників її виживання та життєздатності при дії на неї чинників різної природи.

При інкубації клітин з гадолінійвмісним наноконкомпозитом, синтезованим на основі фериту та модифікованим γ-АПС та ДТПК – реагентом 1 не ви-

met. In the sight of watching usually 2–5 cells are met in a cell division phase.

Control cell cultures growth kinetics study (Fig. 1, B) showed that they are characterized by increased proliferative activity within 1–4 days of cultivation (logarithmic growth phase) with a gradual release of the plateau at 5-6th day (stationary growth phase). In these terms cell density in monolayer is high enough. The maximum of mitotic activity was observed on the 3rd day of cultivation. Subsequently, mitotic index decreased by mitosis contact inhibition and confluent condition of cell culture. Index of giant polykaryocytes in control was 8–17%.

Thus, asynchronous inoculated culture cell line L₉₂₉ due to affordability, ease of cultivation and reproducible results can be an adequate model for experimental studies of survival and sustainability under the action of factors of different nature.

When incubating cells with gadolinium containing nanocomposites synthesized on the base of ferrite and modified γ-APS and DTPA – reagent 1 no

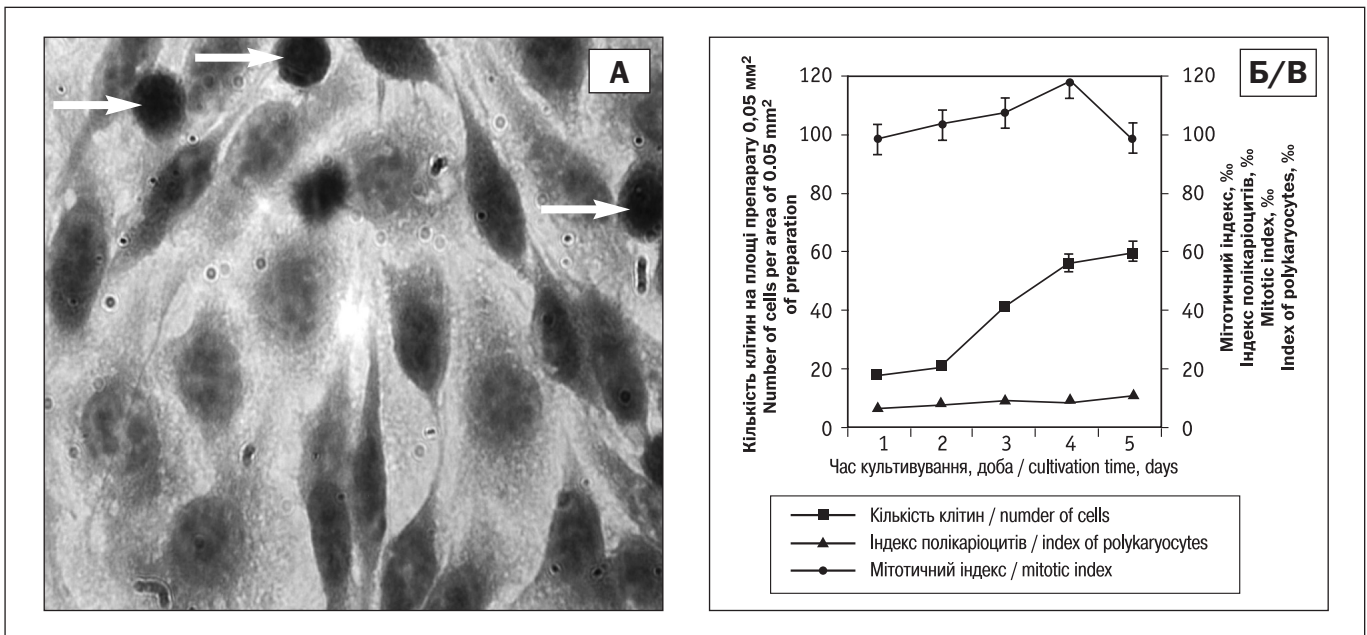


Рисунок 1. Культура трансформованих фібробластів лінії L₉₂₉ на 5-ту добу культивування в контролі (А).

Клітини переважно полігональної та веретеноподібної форми. Цитоплазма клітин щільна, в деяких клітинах – слабовакуолізована. Ядра клітин округло-овальні, мають центральне положення з чітко вираженими ядерцями. У полі зору значна кількість мітотичних клітин, які позначені білими стрілками. Фарбування гематоксиліном-еозином, збільшення ×1000.

Б – Кінетика показників життєздатності (проліферативна, мітотична активність та кількість гігантських багатоядерних клітин) інтактної (контрольної) культури клітин лінії L₉₂₉.

Figure 1. Control culture of transformed fibroblasts L₉₂₉ line on the 5th day of cultivation (A).

Mostly polygonal and fusiform cells. Dense cells cytoplasm, lightly vacuolated in some. Cells nuclei is rounded-oval, with a central position and distinct nucleoli. Of A large number of mitotic cells in the view, marked with white arrows. Hematoxylin-eosin coloring, increase ×1000.

B – kinetics parameters of cells viability (proliferation, mitotic activity and the number of giant polynuclear cells) of intact (control) culture cell line L₉₂₉.

явлено статистично достовірних змін щільності популяції клітин лінії L₉₂₉ (рис. 2, А – Е). Морфологічно структура клітинної культури була подібна до контролю: веретеноподібні та полігональні клітини з центрально розміщеними ядрами. Цитоплазма клітин мала сітчасту структуру. В міжклітинному просторі і в цитоплазмі деяких клітин помітно багато дрібних часток, які, ймовірно, є наночастинками. Мітотичний індекс мав тенденцію до зниження за концентрацій 0,05; 0,5 та 50 мкг/л та був статистично достовірно знижений за концентрацій 5 та 500 мкг/л. За найменшої концентрації спостерігали підвищену у 1,5 раза кількість полікаріоцитів. Зустрічалась значна кількість апоптотичних клітин.

Культивування клітин в присутності реагента 2 (гадолінійвмісний ферит, модифікований ДМСК) теж не викликало істотних деструктивних змін в культурі (рис. 3, А–Е). Спостерігали щільний рівномірний моношар клітин та досить багато клітин на різних стадіях поділу. Слід відмітити, що полікаріоцити мали 4–6 і більше ядер, проти 2–3 – у контролі. За всіх досліджуваних концентрацій відмітили деяке підвищення кількості клітин на площі препарата за рахунок ослаблення адгезивних властивостей клітин, що призвело до їх нашарування. Водночас інкубація клітин з НЗА в дозах 0,5 та 5 мкг/мл призвела до підвищення кількості гігантських багатоядерних клітин, що видно на рис. 3, Б та Г.

Істотніші порушення в клітинах *in vitro* викликала магнітна речовина, модифікована олеатом натрію – реагент 3 (рис. 4, А–Е), особливо за концентрації 500 мкг/мл. При інкубації клітин з реагентом 3 спостерігали деградацію клітинного моношару, відсутність мітозів та полікаріоцитів. За менших концентрацій спостерігали зміну форми клітин: з'явилися округлі та овальні клітини, змінилось ядерно-цитоплазматичне співвідношення, зменшився об'єм цитоплазми. Наразі слід відмітити, що зменшення мітотичної активності у 2–5 разів спостерігали за концентрацій 0,05–50 мкг/мл. Очевидно, що попадання нанокompозиту в клітину інгібувало поділ клітин та, ймовірно, індукувало апоптоз.

Таким чином, аналіз морфофункціональних характеристик клітин в культурі, яку обрали в якості моделі пухлинного росту, за умов впливу магнітокерованих нанокompозитів з різною структурою (реагенти 1–3) в широкому діапазоні концентрацій показав, що всі досліджувані субстанції, потрапляючи в клітину, змінювали певні характеристики культури клітин: викликали інтерфазну чи репродуктивну загибель, пригнічували або підвищували мітотичну ак-

statistically significant changes in proliferative and mitotic activity in cell culture line L₉₂₉ were shown (Fig. 2, A-F). Morphological structure of the cell culture was similar to control: spindlelike and polygonal cells with centrally placed nuclei. Cytoplasm had networklike structure. In the intercellular space and cytoplasm of some cells many small particles can be noticed, probably nanoparticles. Mitotic index was tended to decrease in concentrations of 0.05, 0.5 and 50 µg/l and was significantly decreased at concentrations of 5 and 500 µg/l. Also we observed 1.5 times increase of polykaryocytes number under the lowest concentration. There were apoptotic cells.

Culturing cells in the presence of reagent 2 (gadolinium containing ferrite modified by DMSA) also did not cause significant destructive changes in culture (Fig. 3, A–E). There were a dense uniform monolayer of cells and a lot of cells in various stages of division. Note that polykaryocytes had 4–6 and more nuclei against 2–3 – in control. For all investigated concentrations we noted a slight increase in the number of cells in the area of observation as a result of decreased adhesive properties of cells. However, cells incubation with NCA at doses of 0.5 and 5 µg/ml led to an giant multinuclear cells number increase, as seen in Fig. 3, B and G.

Much more essential abnormalities in cells *in vitro* caused a magnetic substance, modified by sodium oleate – reagent 3 (Fig. 4, A–F), especially at a concentration of 500 µg/ml: we observed cell monolayer degradation, the absence of mitosis and polykaryocytes. At the lower concentrations we observed cell shape changes: round and oval cells appeared, the nuclear-cytoplasmic ratios had changed: amount of cytoplasm decreased. It should be noted that the decrease in mitotic activity in 2–5 times was observed in concentrations of 0.05–50 µg/ml. It is obvious that nanocomposite in cell inhibits cell division and probably induces apoptosis.

Thus, analysis of the morphological characteristics of cells in culture chosen as tumor growth under the influence of magnetdriven nanocomposites with different structures (reagents 1–3) over a wide concentration range showed that all the investigated substance that reached the cell more or less change certain characteristics of cell culture: cause reproductive or interphase cell death, inhibit or enhance mitotic activity, induce

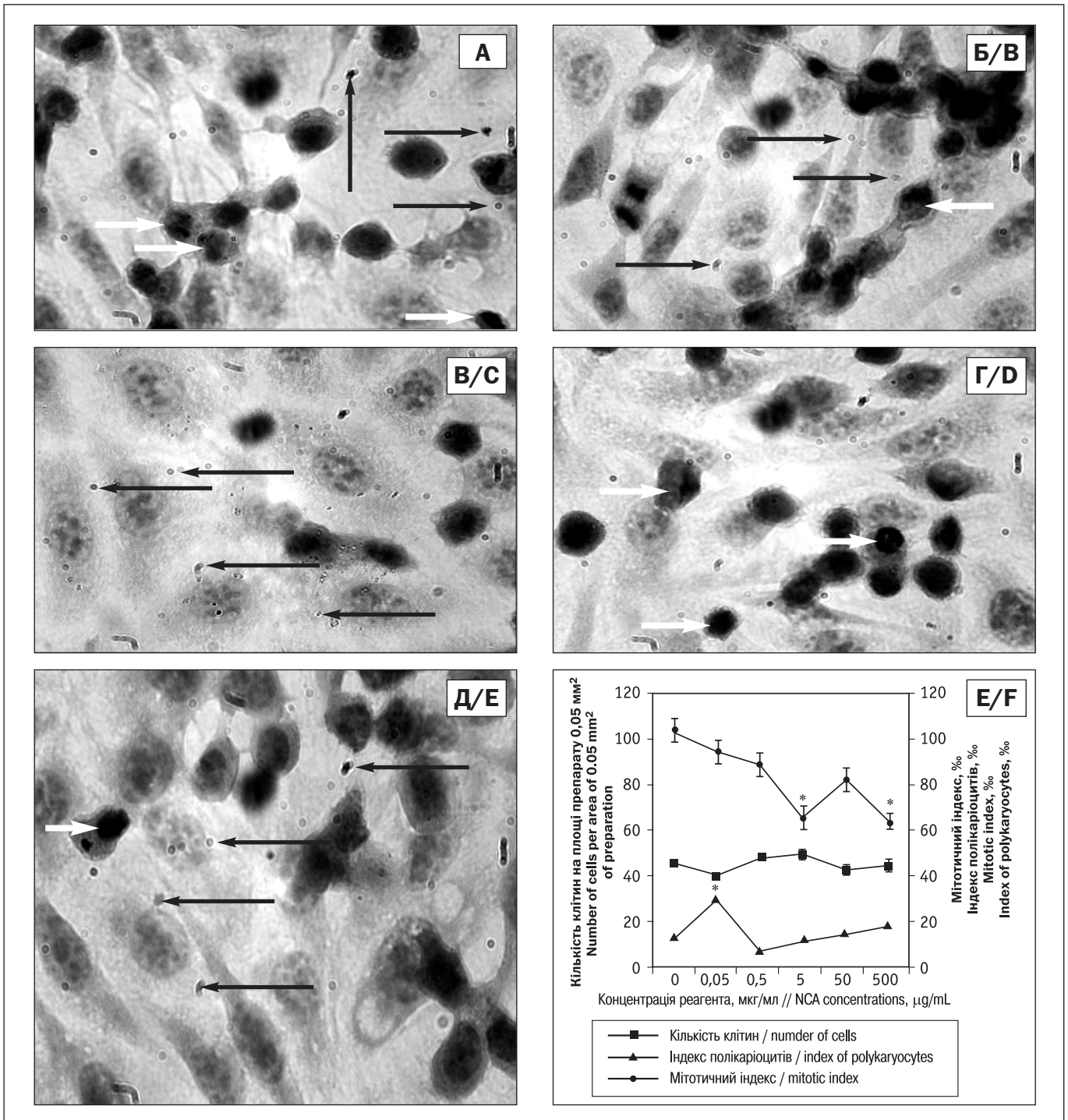


Рисунок 2. Морфофункціональні характеристики культури клітин лінії L929 на 5-ту добу при інкубації з НЗА (реагент 1) в концентраціях 0,05 мкг/мл (А), 0,5 мкг/мл (Б), 5 мкг/мл (В) 50 мкг/мл (Г) та 500 мкг/мл (Д).

Білими стрілками позначені апоптотичні клітини, чорними – частинки НЗА. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення $\times 1000$.

Залежність показників життєздатності клітин лінії L929 від концентрації реагента 1 (Е).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Figure 2. Morphofunctional characteristics of culture cell line L929 on the 5th day of incubation with NCA (reagent 1) at concentrations of 0.05 µg/ml (A), 0.5 µg/ml (B), 5 µg/ml (C) 50 µg/ml (D) and 500 µg/ml (E).

White arrows indicate apoptotic cells, black – the NCA particles. Hematoxylin-eosin coloring. Magnification $\times 1000$.

Dependence of indicators of L929 cell viability from reagent 1 concentration (F).

Note. * – significant difference vs. control, $p \leq 0.05$.

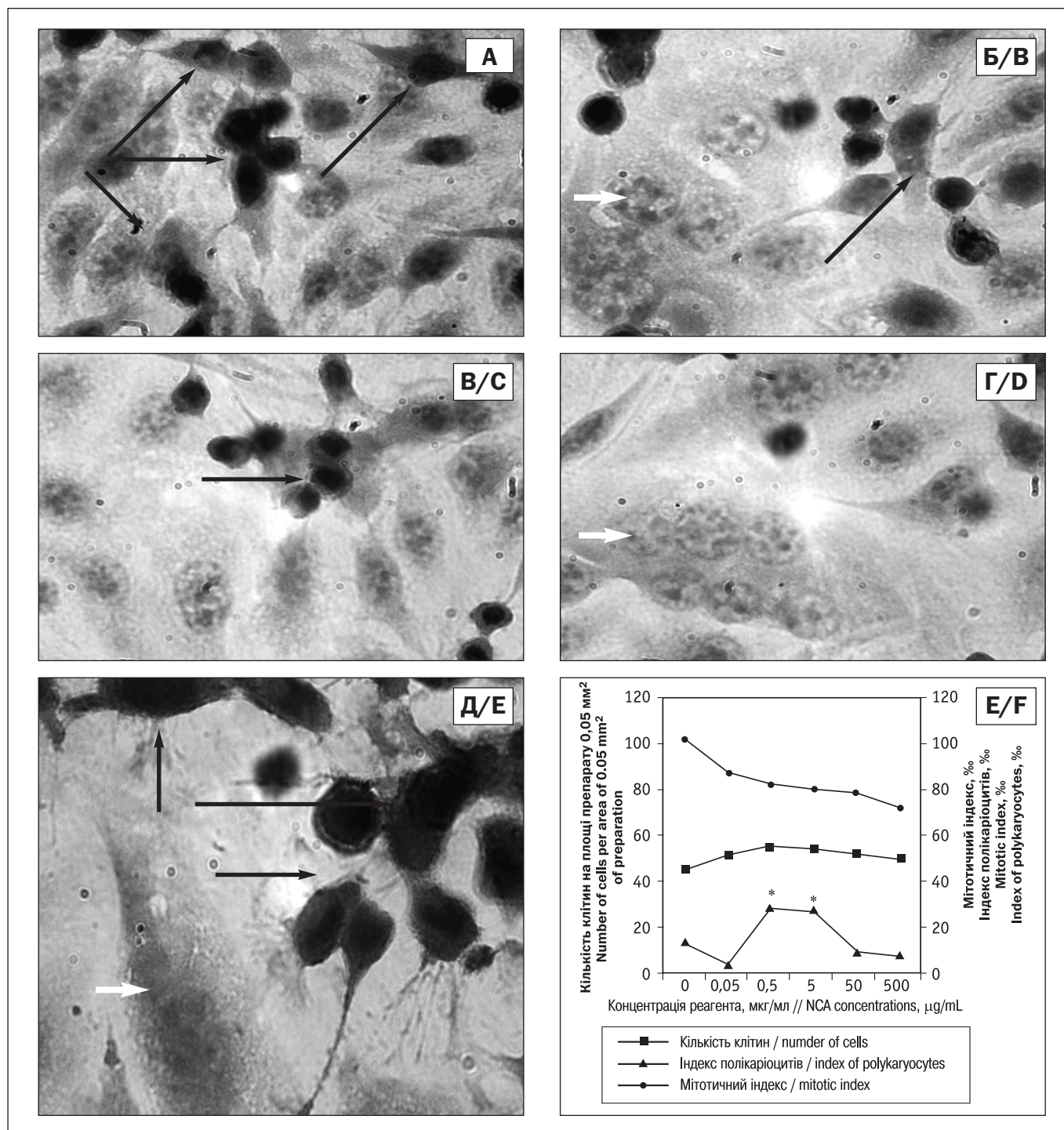


Рисунок 3. Морфофункціональні характеристики культури клітин лінії L929 на 5-ту добу при інкубації з НЗА (реагент 2) в концентраціях 0,05 мкг/мл (А), 0,5 мкг/мл (Б), 5 мкг/мл (В), 50 мкг/мл (Г) та 500 мкг/мл (Д).

Білими стрілками позначені полікаріоцити, чорними – нашарування клітин з меншою адгезивною здатністю. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення $\times 1000$.

Залежність показників життєздатності клітин лінії L929 від концентрації реагента 2 (Е).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Figure 3. Morphofunctional characteristic of L929 culture cell line on the 5th day of incubation with NCA (reagent 2) at concentrations of 0.05 µg/ml (A), 0.5 µg/ml (B), 5 µg/ml (C) 50 µg/ml (D) and 500 µg/ml (E).

White arrows mark polykaryocytes, black – layers of cells with less adhesive ability. Hematoxylin-eosin coloring. Magnification $\times 1000$.

Concentration dependence of the morphological characteristics of L929 cell culture line on the 5th day in the control (C) and during the incubation with NCA (reagent 2) (F).

Note. * – significant difference vs. control, $p \leq 0.05$.

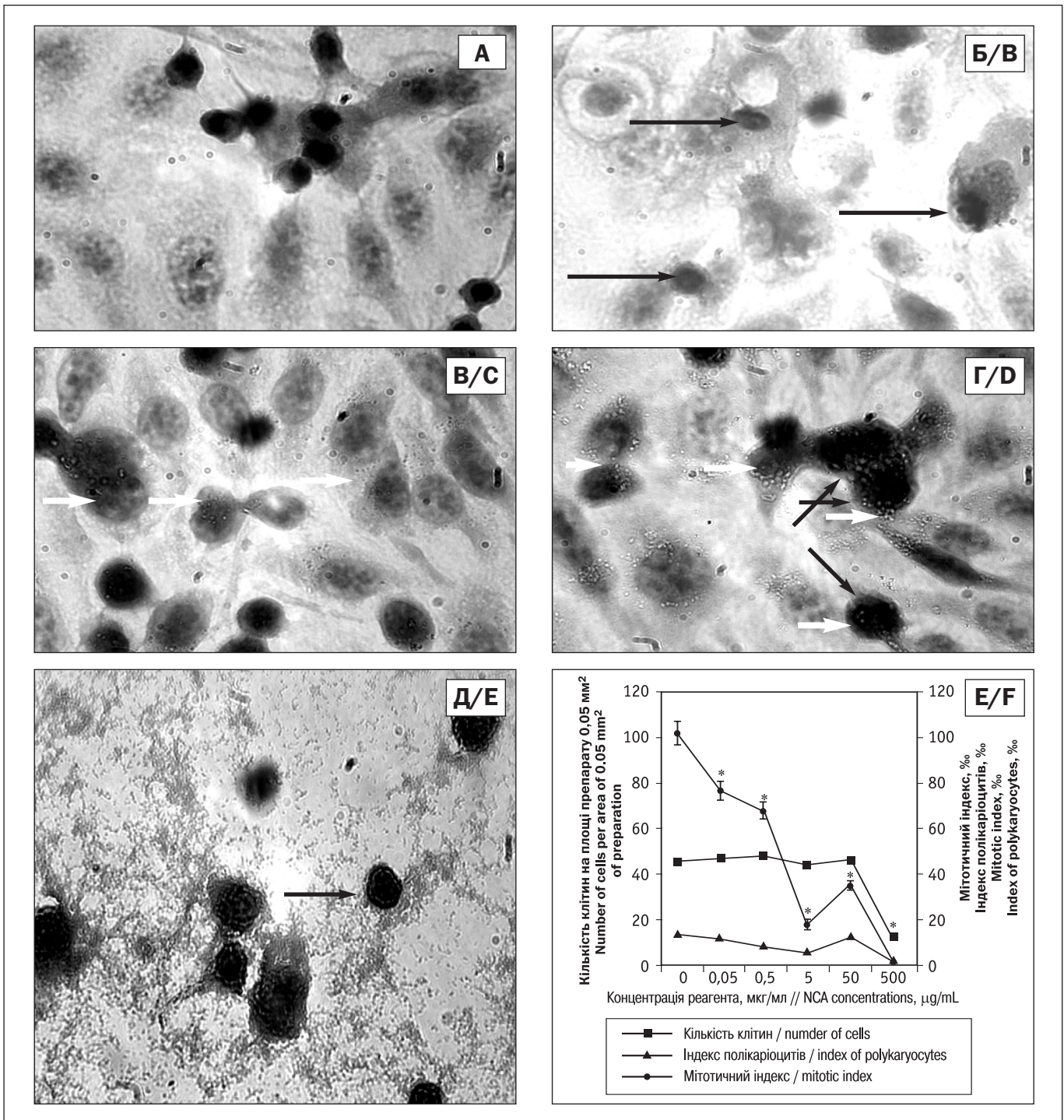


Рисунок 4. Морфофункціональні характеристики культури клітин лінії L929 на 5-ту добу при інкубації з реагентом 3 в концентраціях 0,05 мкг/мл (А), 0,5 мкг/мл (Б), 5 мкг/мл (В), 50 мкг/мл (Г) та 500 мкг/мл (Д). Білими стрілками показано розміщення субстанції в клітинах, чорними - апоптотичні клітини. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення $\times 1000$.

Залежність показників життєздатності клітин лінії L929 від концентрації реагента 3 (Е).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Figure 4. Morphofunctional characteristic of L929 culture cell line on the 5th day during the incubation with the reagent 3 at concentrations of 0.05 µg/ml (A), 0.5 µg/ml (B), 5 µg/ml (C) 50 µg/ml (D) and 500 µg/ml (E).

White arrow shows a substance in cells, black - apoptotic cells. Hematoxylin-eosin coloring. Magnification $\times 1000$.

Concentration dependence of (F) morphological characteristics of L929 cell culture lines on the 5th day in the control (C) and during the incubation with the reagent 3.

Note. * – significant difference vs. control, $p \leq 0.05$.

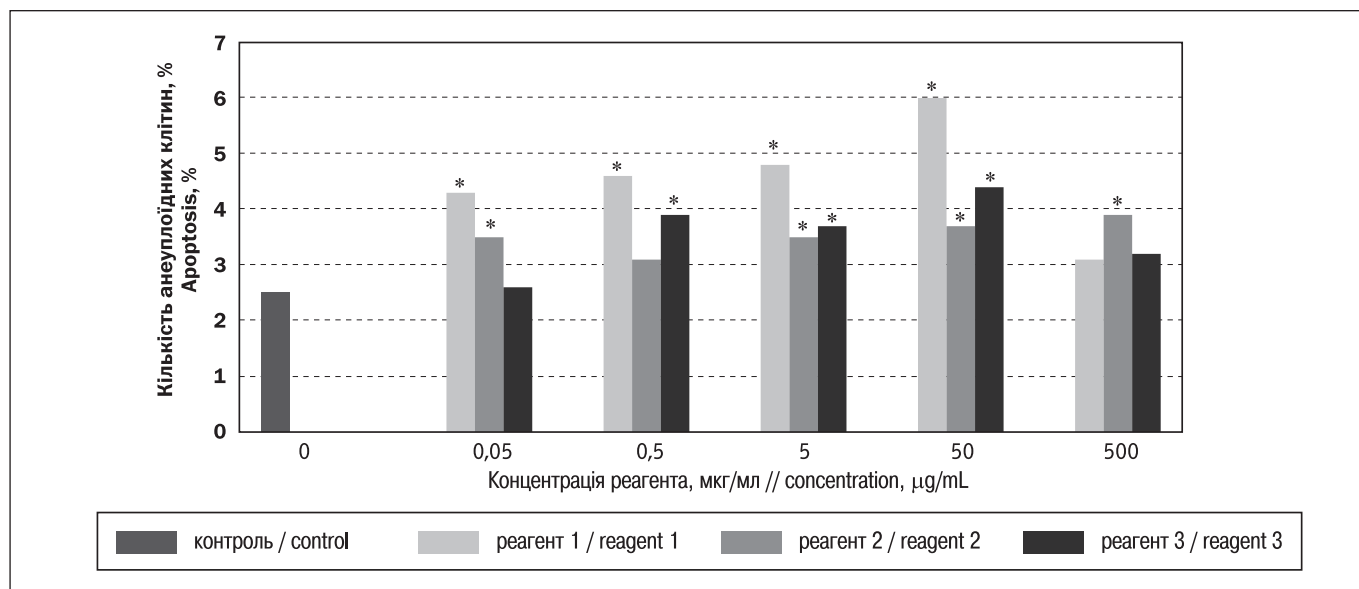


Рисунок 5. Апоптоз у культурі клітин лінії L929 на 5-ту добу культивування з реагентами 1–3 в різних концентраціях.

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Figure 5. Apoptosis in L929 cell culture line on the 5th day of cultivation with reagents 1–3 at various concentrations.

Note. * – significant difference vs. control, $p < 0.05$.

тивність, індукували утворення атипичних клітин, послаблювали адгезивні властивості клітин.

Відомо, що апоптоз відбувається за фізіологічних умов, це – контрольований процес, спрямований на підтримання гомеостазу тканин. Апоптоз ініціюється при дії екстремальних факторів, таких зокрема, як іонізуюча радіація, а також під впливом таких сполук, як оксиданти та радіоміметики антиканцерогенної дії [12, 13]. У цьому випадку роль апоптозу у підтриманні гомеостазу тканин є менш вираженою, однак припускається, що першочергового значення набуває селективне видалення клітин, виживання яких загрозливе для цілого організму.

В науковій літературі не виявлено даних щодо індукції апоптозу досліджуваними НЗА. Результати експериментальних досліджень показали, що магнітокеровані нанокompозити, що містили нейтронозахватний агент (гадоліній-157), індукували апоптоз у культурі клітин (рис. 5) в залежності від концентрації реагента: підвищення концентрації НЗА викликало збільшення кількості апоптотичних клітин в культурі клітин у порівнянні з контролем.

Для реагента 1 спостерігали найбільшу кількість апоптотичних клітин: за концентрації 50 мкг/мл більш, ніж у 2 рази порівняно з контролем, проте за найвищої концентрації реагента 1 їх кількість різко зменшувалась. Інкубація клітин з реагентом 2 призвела до поступового підвищення апоптозу в 1,2–1,5

the formation of abnormal cells decreasing cells adhesive properties.

It is known that apoptosis occurs under physiological conditions as a controlled process of maintaining tissues homeostasis. Apoptosis is triggered when exposed to extreme factors such as ionizing radiation and the effects of such compounds as oxidants, action of anti-cancer radiomimetics [11, 12]. In this case, the role of apoptosis in tissue homeostasis is less significant, but it is assumed that its primary importance is selective removal of cells, survival of which is threatening to the whole organism.

Information about studied NCA induced apoptosis was not found. The results of experimental studies have shown that magnetodrivered nanocomposites that contained neutroncaptured agent (gadolinium-157), more or less induced apoptosis in cultured cells (Fig. 5), depending on the reagent concentration: NCA concentration increase caused an increase in the number of apoptotic cells compared to control.

We observed the highest number of apoptotic cells with the reagent 1: under the concentration of 50µg/ml almost 2 times more compared to control; while at highest concentration – the level of apoptosis in culture decreased. Cells incubation at the presence of reagent 2 caused apoptosis decrease at

раза при збільшенні концентрації реагента. Слід окремо звернути увагу на рівень апоптозу при інкубації клітин з магнітною речовиною (реагент 3), яка в структурі не мала гадолінію чи бору: в найнижчій концентрації кількість апоптотичних клітин не відрізнялась від контрольних показників, але за концентрацій в межах 0,5–500 мкг/мл їх кількість підвищена у порівнянні з контролем.

ВИСНОВКИ

1. В експериментальному дослідженні модифікуючого впливу магнітокерованих наноконструктивів, що містили гадоліній-157, у тест-системі культури клітин лінії L₉₂₉ встановлені характер та особливості зміни морфофункціональних характеристик клітин.
2. Магнітокеровані гадолінійвмісні наноконструктиви, модифіковані ДТПК та ДМСК, показали високу біосумісність до клітин. При інкубації клітин з такими НЗА не спостерігали проявів токсичності, окрім максимальних концентрацій, водночас відмічали зменшення адгезивних властивостей клітин та зменшення їх мітотичної активності на тлі високої щільності популяції клітин.
3. При інкубації клітин з магнітною рідиною деструктивні зміни в клітинах спостерігали тільки за концентрації 500 мкг/мл, проте мітотична активність в культурі клітин зменшувалась у 3–5 разів у всьому діапазоні концентрацій.
4. Дія магнітокерованих наноконструктивів підвищувала апоптоз у культурі клітин в залежності від концентрації реагента.
5. Найбільш перспективним для подальших розробок та тестування наноконструктивних препаратів для потреб нейтронозахватної терапії є наноконструктив на основі магнетиту, модифікованого функціональними аміногрупами, хімічно закріпленими діетилентриамінпентаоцтовою кислотою (ДТПК) і гадолінієм (Fe₃O₄/γ-АПС/ДТПК-Gd) – реагент 1.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства / С. П. Губин, Ю. А. Кокшаров, Г. Б. Хомутов, Г. Ю. Юрков // Успехи химии. – 2005. – Т. 74, № 4. – С. 539–574.
2. Пул Ч. Нанотехнологии / Ч. Пул, Ф. Оуэнс. – М. : Техносфера, 2004. – 327 с.
3. Гусев А. И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии / А. И. Гусев. – М. : Физматлит, 2005. – 410 с.
4. Наноконструктиви медико-біологічного призначення на основі ультрадисперсного магнетита / А. П. Шпак, П. П. Горбик, В. Ф. Чехун [и др.] // Фізико-хімія наноматеріалів і супрамолекулярних структур / под ред. А. П. Шпака, П. П. Горбика. – К. : Наук. думка, 2007. – Т. 1. – С. 45–87.

1.2–1.5 times under the reagent concentration decrease. We should pay attention to the apoptosis level in cells that were incubated with a magnetic substance (reagent 3) with no gadolinium or boron in structure: at lowest concentration – the number of apoptotic cells did not differ from control numbers, but at concentrations within 0.5–50 μg/ml apoptotic level was increased compared to control.

CONCLUSIONS

1. The nature and features of cellular morphology changes under the modifying influence of magnet-driven nanocomposites, containing gadolinium-157, were studied in the culture cell line L₉₂₉ test system.
2. Magnetically driven nanocomposites with gadolinium, modified by DTPA and DMSA showed high biocompatibility to cells: incubation of cells with such NCA showed no toxicity, except maximum concentrations, the same time reducing adhesive properties of cells. All nanocomposites were shown to decrease mitotic activity compared to control cell population density.
3. Stabilized by sodium oleate ferrite caused destructive changes in cell culture only at concentrations of 500 μg/ml, but reduced mitotic activity in cell culture in 3–5 times in the whole range of concentrations.
4. Magnet-driven nanocomposites induced apoptosis in cultured cells, depending on the reagent concentration.
5. The nanocomposite based on magnetite modified by functional amino groups chemically fixed by diethylenetriaminepentaacetic acid and gadolinium (Fe₃O₄/γ-APS/DTPA-Gd) i.e. the reagent 1 is the most promising substance for perspective research and development of nanocomposite preparations for the neutron capture therapy.

REFERENCES

1. Gubin SP, Koksharov YuA, Khomutov GB, Yurkov GYu. [Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties]. *Uspekhi khimii*. 2005;74(4):539-74. Russian.
2. Pul Ch, Ouens F. [Nanotechnology]. Moskva: Tekhnosfera; 2004. 327 p. Russian.
3. Gusev AI. [Nanomaterials, nanostructures, nanotechnology]. Moskva: Fizmatlit; 2005. 410 p. Russian.
4. Shpak AP, Gorbik PP, Chekhun VF, et al. [Nanocomposites of medical and biological purposes on the basis of ultrafine magnetite]. In: Shpak AP, Gorbik PP, editors. [Physical and chemistry of nanomaterials and supramolecular struc-

5. Можливість використання магнітних наночастинок як засобів транспорту і утримання лікарських препаратів в організмі / Л. Г. Гречко, П. П. Горбик, Л. Б. Лерман, О. О. Чуйко // Доп. НАН України. – 2006. – № 2. – С. 181–185.
6. Превращение частиц ультрадисперсного порошка железа в организме / Т. А. Байтукалов, Н. Н. Глущенко, И. П. Ольховская [и др.] // Труды 11 Международной Плесской конференции по магнитным жидкостям. – Иваново : [б. и.], 2004. – С. 276–280.
7. Pilipchuk E. V. The creation of magnetite based, neutron capture nanocomposites / E. V. Pilipchuk, V. M. Mischenko, A. L. Petranovska // International Symposium devoted to the 80th anniversary of academician O.O.Chuiko Abstracts Book of International Symposium “Modern problems of surface chemistry and physics” : abstracts (18–21 May 2010, Kyiv, Ukraine) / Chuiko Institute of Surface Chemistry NAS of Ukraine. – Kyiv : [s. n.], 2010. – P. 502–503.
8. Thach C. V. Size controlled magnetite nanoparticles and their drug loading ability / C. V. Thach, N. H. Hai, N. Chau // J. Korean Phys. Soc. Journal of the Korean Physical Society. – 2008. – Vol. 52, No. 5. – P. 1332–1335.
9. L₉₂₉ Cell Line from mouse (mouse C3H/An connective tissue) L-929 (NCTC-clone929, CloneofstrainL) (Connective tissue, mouse) [Electronic resource]. – (21 грудня) 2009. Режим доступу Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/85011425?lang=en®ion=UA> <http://www.viomed.com/services/product/l929.htm>. – Title from the screen.
10. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л. П. Дьяконова. – М. : “Спутник+”, 2009. – 656 с.
11. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [Electronic resource] / C. Riccardi, I. Nicoletti. – Available from: <http://www.nature.com/natureprotocols>. – Title from the screen.
12. Владимирская Е. Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия / Е. Б. Владимирская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 11. – С. 25–32.
13. Матышевская О. П. Биохимические аспекты вызванного радиацией апоптоза / О. П. Матышевская // Укр. биохим. журн. – 1998. – Т. 70, № 5. – С. 15–29.
5. Grechko LG, Gorbik PP, Lerman LB, Chujko OO. [The possibility of magnetic nanoparticles usage as method of transport and drugs retention in target-organ]. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2006;(2):181-5. Ukrainian.
6. Bajtukalov TA, Glushchenko NN, Ol'khovskaya IP, et al. [Transformation of ultrafine iron powder particles in the body]. In: Proceedings of the 11th International Plessoj Conference on Magnetic Fluids; Ples, RU. Ivanovo: [publisher unknown]; 2004. p. 276-80. Russian.
7. Pilipchuk EV, Mischenko VM, Petranovska AL. The creation of magnetite based, neutron capture nanocomposites. In: Modern Problems of Surface Chemistry and Physics. Abstracts book of International Symposium devoted to the 80th anniversary of academician O.O.Chuiko; 2010 May 18-21, Kyiv, UA. Kyiv: [publisher unknown]; 2010. p. 502-3.
8. Thach CV, Hai NH, Chau N. Size controlled magnetite nanoparticles and their drug loading ability. J. Korean Phys. Soc. 2008;52(5):1332-5.
9. L₉₂₉ Cell line from mouse (mouse C3H/An connective tissue) [Internet]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/85011425?lang=en®ion=UA>.
10. D'yakonov LP, editor. [Animal cell in culture (Methods and application in biotechnology)]. Moskva: Sputnik+; 2009. 656 p. Russian.
11. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [Electronic resource]. Available from: <http://www.nature.com/natureprotocols>. – Title from the screen.
12. Vladimirskaia EB. [Apoptosis and its role in the regulation of cell balance]. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2002;(11):25-32. Russian.
13. Matyshevskaya OP. [Biochemical aspects of radiation-induced apoptosis]. Ukr Biokhim Zh. 1998;70(5):15-29. Russian.

Стаття надійшла до редакції 19.06.2014

Received: 19.06.2014