

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОТИПУХЛИННОЇ ДІЇ НАНОКОМПЛЕКСІВ НА ОСНОВІ НАНОЧАСТИНОК $GdYEuVO_4$ І ХОЛЕСТЕРИНУ

А.М. Гольцев^{1,2}, М.О. Бондарович¹, Ю.О. Гаєвська^{1*}, Н.М. Бабенко¹, Т.Г. Дубрава¹, М.В. Останков¹

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

²Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН та МОЗ України, Харків, Україна

*Corresponding author: cryopato@gmail.com

Received 31 December 2023; Accepted 9 May 2024

Проблематика. Експериментальне вивчення протираковинної дії наноконкомплексів (НК), що складаються з наночастинок $GdYEuVO_4$ і холестерину, свідчить про доцільність їх використання в онкологічній практиці. Механізм реалізації протираковинної дії НК може бути пов'язаний з утворенням під їхнім впливом активних форм кисню (АФК), які зумовлюють загибель ракових клітин.

Мета. Вивчення прооксидантних і протираковинних властивостей НК, що складаються з наночастинок $GdYEuVO_4$ і холестерину, в системі *in vitro*.

Методика реалізації. Експерименти проводили на клітинах асцитної аденокарциноми Ерліха (АКЕ), які перешеплювали внутрішньочеревно мишам лінії BALB/c. На 7-му добу розвитку АКЕ клітини виділяли та *in vitro* обробляли НК протягом 3 год. Контролем були клітини, не оброблені НК. Формування внутрішньоклітинних АФК визначали методом проточної цитометрії з використанням набору Fluorometric Intracellular ROS Kit, рівень метаболічної активності клітин АКЕ – за допомогою МТТ-тесту колориметричним методом, кількість клітин у стані апоптозу або некрозу оцінювали з використанням проточної цитометрії та набору реагентів FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I.

Результати. Інкубація клітин АКЕ з НК приводить до більш ніж трикратного посилення порівняно з контролем формування АФК. Під впливом НК також відбувається майже двократне пригнічення метаболічної активності клітин АКЕ, що супроводжувалося зменшенням на 25 % кількості життєздатних клітин АКЕ. Показано, що НК належать до тих унікальних сполук, які одночасно можуть викликати кілька видів загибелі клітин, але загибель ракових клітин після обробки НК відбувалася переважно унаслідок некрозу.

Висновки. Цитотоксична дія НК відносно клітин АКЕ реалізується за рахунок їхніх прооксидантних властивостей. Отримані результати можуть бути враховані при створенні нових стратегій терапії злоякісних новоутворень.

Ключові слова: наноконкомплекс; клітини асцитної аденокарциноми Ерліха; активні форми кисню; апоптоз; некроз; сполуки ванадію.

Вступ

Пошук ефективних засобів лікування онкологічних захворювань є одним із пріоритетних напрямів медицини та фармації. На жаль, традиційні методи лікування раку (хіміо- або променева терапія) мають низку суттєвих недоліків, основними з яких є невибіркове знищення всіх активно проліферуючих клітин організму. Це викликає деякі серйозні побічні ефекти, включаючи пригнічення функції гемопоетичних тканин організму, алопецію, шлунково-кишкові розлади [1]. Тому досі триває пошук лікарських засобів, здатних таргетно руйнувати ракові клітини [2, 3]. У зв'язку з цим заслуговують на увагу нові способи протираковинної терапії за допомогою наноматеріалів, які дають змогу селективно інактивувати ракові клітини з мінімальним пошкодженням

нормальних тканин [2, 4]. Перспективним у цьому плані є використання рідкісноземельних металів, зокрема ванадію та його сполук. Сполуки ванадію завдяки специфічним субклітинним біомолекулярним взаємодіям здатні викликати загибель ракових клітин [3, 5]. Наночастинкам (НЧ) на основі ортованадатів рідкісноземельних металів $GdYEuVO_4$ притаманна здатність досить швидко проникати і поширюватися в організмі з одночасною візуалізацією та інгібіцією функції ракових клітин. Крім того, для лікування злоякісних новоутворень можуть бути використані наноконкомплекс (НК), що складаються з НЧ і холестерину. Ці НК були створені у відділі наноструктурних матеріалів імені члена-кореспондента НАН України Ю.В. Малюкіна Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України [6]. Ідеологія створення таких НК базується на досягненні максимального лікувально-

го ефекту протипухлинних засобів за рахунок наявності в їхньому складі сполук, що мають спорідненість до мембран клітин-мішеней з одночасною можливістю їх візуалізації. Відомо, що клітини злоякісних пухлин мають підвищену метаболічну активність і здатні до вибіркового захоплення холестерину, який активно “вилучається” з кровотоку проліферуючими раковими клітинами для побудови біомембран [7]. Цьому сприяє наявність на поверхні клітин пухлини великої кількості SR-B1 (scavenger receptor, class B, type I) та кавеолін-1 (Cav-1) рецепторів, які можуть зв'язуватися з вільним холестерином кровоносного русла [8]. З огляду на це комплексування НЧ із холестерином є передумовою успішної цільової доставки їх до пухлинних клітин. Дійсно, результати наших попередніх досліджень свідчать, що НЧ були здатні значно пригнічувати ріст аденокарциноми Ерліха (АКЕ) (за даними накопичення кількості клітин у черевній порожнині) – ступінь інгібіції становив $58,24 \pm 3,45\%$ [9]. Використання НК на основі НЧ і холестерину сприяло ще більшому гальмуванню росту АКЕ – ступінь інгібіції був на рівні $74,70 \pm 4,38\%$. Більше того, було встановлено здатність НК до гальмування росту пухлини внаслідок зниження концентрації найбільш канцерогенних клітин із фенотипами $CD44^{\text{high}}$ і $CD44^+CD24^-$ [9, 10].

Одним із основних механізмів прояву токсичної дії НК може бути генерація активних форм кисню (АФК) завдяки ванадію, який входить до їхнього складу [11–13]. Відомо, що АФК є реакційноздатними молекулами, які формуються за рахунок збудження й одновалентного відновлення молекулярного кисню (O_2), внаслідок чого утворюються супероксид ($O_2^{\cdot -}$), гідроксильний радикал (OH^*) і перекис водню (H_2O_2). АФК виробляються в клітинах декількома оксидазами і можуть діяти як вторинні месенджери, що контролюють різні шляхи передачі сигналу. Відповідно до теорії реостата [14], АФК визначають долю клітин (вижити-загинути) у дозозалежний спосіб. У фізіологічних умовах завданням АФК є передача сигналів клітинам і підтримка внутрішнього гомеостазу. Збільшення вироблення АФК до рівня, що перевищує детоксикаційну здатність біологічної системи, призводить до окисного стресу та пошкодження клітин.

Відомо, що активовані європієм НЧ на основі ортованадатів рідкісноземельних металів можуть залучатися до різних (залежно від властивостей мікрооточення) окисно-відновних про-

цесів і впливати на рівень АФК [15]. Це обумовлено унікальними фізико-хімічними характеристиками НЧ, а саме наявністю в кристалічній решітці іонів зі змінною валентністю, що робить їх редокс-активними. Таким чином, завдяки наявності в їхньому складі перехідних металів, НЧ на основі ортованадатів рідкісноземельних металів можуть індукувати синтез АФК, на чому і заснована одна із концепцій і стратегій лікування онкозахворювань. В основі цієї стратегії лежить здатність деяких сполук підвищувати рівень АФК у злоякісних клітинах до такої міри, яка перевищує можливості їхньої антиоксидантної (захисної) системи. Це своєю чергою приводить до активації перекисного окиснення ліпідів і, як наслідок, до загибелі ракових клітин.

Поряд із протипухлинними властивостями, як було показано в експериментальних умовах *in vivo* на моделі АКЕ, суттєвою перевагою використання таких НЧ є висока їхня біосумісність, тобто здатність виконувати свої функції, не викликаючи істотних негативних реакцій у живому організмі [16], й можливість одночасного таргетування пухлинних клітин та інгібіції їх проліферативної активності [17].

Таким чином, метою нашого дослідження було вивчення прооксидантних і протипухлинних властивостей НК, що складаються з наночастинок $GdYEuVO_4$ і холестерину, в системі *in vitro*.

Матеріали і методи

Експерименти були виконані на мишах лінії BALB/c, самицях, віком 8 місяців, вагою 20–25 г, що утримувались в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України (кімнатна температура $20 \pm 2^\circ C$, відносна вологість 50–70 %, цикл світло-темрява 12:12 год). Дослідження проводилися відповідно до Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (3447-IV від 21.02.2006 р.) і положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.). Експериментальна частина роботи виконана відповідно до висновку Комітету з біоетики при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

НК були синтезовані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України, як повідомлялося [6]. Наноконплекси є водною дисперсією

холестерину (0,55 г/л) (Acros organics, Бельгія) з використанням як речовини-стабілізатора НЧ ортованадатів рідкоземельних металів $GdYEuVO_4$ у концентрації 1,30 г/л. Для отримання НК у хімічну склянку ємністю 50 мл наливають 10 мл 0,1 М розчину холестерину в 96 % етанолі (співвідношення 1:1), додають 5 мл водного колоїдного розчину НЧ $GdYEuVO_4$ з розмірами 2-3 нм, перемішують на магнітній мішалці 10 хв. До отриманого розчину додають 15 мл дистильованої води і знову перемішують 5 хв. Потім отриманий розчин переливають у круглодонну колбу й упарюють на роторному випарнику до об'єму 5 мл. Отримані НК містять стабілізовані НЧ $GdYEuVO_4$ дисперсні частинки холестерину розміром 60–100 нм. У НК негативно заряджені НЧ локалізуються по периферії частинок холестерину внаслідок Ван-дер-Ваальсових і гідروفобних взаємодій. Розмір використаних НЧ не перевищував 3 нм у діаметрі, оскільки використання НЧ більшого розміру знижує вірогідність їх локалізації на поверхні дисперсних частинок холестерину і не забезпечує достатнього значення величини їхнього електрокінетичного потенціалу (заряду), а отже, не сприяє їх агрегативній стабілізації в розчині [6].

Синтез водних колоїдних розчинів НЧ $GdYEuVO_4$ проведено за методикою, описаною в [18]. Для отримання водних колоїдних розчинів НЧ використовувалися хлориди рідкісноземельних металів гадолінію, ітрію (99,9 %) (Acros organics, Бельгія), метаванадату натрію (96 %) (Acros organics, Бельгія), трилону Б (99,8 %) цитрат натрію (Acros organics, Бельгія), вода дистильована. Водні колоїдні розчини хлоридів рідкісноземельних елементів змішували з динатрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти в еквівалентному співвідношенні. Потім в отриманий розчин додавали еквівалентну кількість ортованадату натрію. Розчин ретельно перемішували на магнітній мішалці до знебарвлення. Розчин НЧ нагрівали у термостаті за температури 90 °С протягом 30–90 хв, після чого проводили діаліз із використанням мембран Cellu Sep H1, 3.5 KDa. Застосована методика колоїдного синтезу дає змогу отримувати агрегативно стійкі гідрозолі НЧ із контрольованими геометричними параметрами твердої фази.

У роботі використовували експериментальну модель пухлинного росту – асцитну форму аденокарциноми Ерліха (АКЕ). У 1932 р. Р. Ehrlich і Н. Apolant виділили пухлинні клітини у самок мишей зі спонтанним розвитком раку молочної залози [19]. Дослідники вводили

ці клітини підшкірно від миші до миші, тобто перещеплювали солідну форму карциноми. Н. Loewenthal і G. Jahn отримали рідку форму цієї пухлини шляхом введення ракових клітин у черевну порожнину, внаслідок чого накопичувалися клітини карциноми в асцитній рідині. Цю пухлину назвали “асцитна карцинома Ерліха” [20]. АКЕ перещеплювали 10-ти мишам шляхом внутрішньочеревного введення пухлинних клітин у дозі 5×10^6 клітин/мишу в 0,3 мл фізіологічного розчину. На 7-му добу розвитку АКЕ пухлинні клітини отримували за допомогою шприца з голкою 21G, двічі відмивали фізіологічним розчином (АТ “Галичфарм”, Україна) шляхом центрифугування (200 g). Робоча концентрація клітин АКЕ становила 1×10^7 клітин/мл. З клітин АКЕ, отриманих із кожної миші, було сформовано по два дослідних зразки: клітини АКЕ до інкубації з НК (контроль) ($n = 5$) і клітини АКЕ після інкубації з НК ($n = 5$).

Інкубацію клітин із НК проводили *in vitro* із розрахунку 100 мкл водного розчину НК на 900 мкл клітин АКЕ (10^7 клітин у фізіологічному розчині, АТ “Галичфарм”, Україна) за умов кімнатної температури протягом 3 год. Такий час інкубації було раніше визначено як оптимальний для проникнення НК усередину клітин, що було підтверджено за допомогою конфокальної мікроскопії [17]. Потім клітини одноразово відмивали фізіологічним розчином протягом 10 хв при 300 g. У дослідних зразках проводили визначення:

а) кількості клітин АКЕ у камері Горяєва;
б) життєздатності клітин шляхом суправітального фарбування 4 % розчином трипанового синього (Sigma, США);

в) формування внутрішньоклітинних АФК за методом проточної цитометрії з використанням набору Fluorometric Intracellular ROS Kit (№ MAK142, Sigma-Aldrich, США). Fluorometric Intracellular ROS Kit забезпечує чутливий одноетапний флуорометричний аналіз для виявлення внутрішньоклітинних ROS (особливо супероксидних і гідроксильних радикалів) у життєздатних клітинах. АФК реагують із флуорогенним сенсором, локалізованим у цитоплазмі, у результаті чого утворюється флуорометричний продукт, пропорційний кількості наявних АФК (АФК⁺-клітин). Для визначення цього показника у пробірки Фалькон вносили 1×10^6 клітин/мл, додавали 1 мкл 500× ROS Detection Reagent Stock Solution та інкубували 30 хв за 37 °С. Детекцію результатів здійснювали через вимірювання інтенсивності флуоресценції на проточному

цитофлуориметри FACS Calibur (BD, США), $\lambda_{\text{ex}} = 640/\lambda_{\text{em}} = 675$. Облік і аналіз результатів здійснювали за допомогою програми WinMDi 2.9 (Joseph Trotter, La Jolla, США);

г) метаболічної активності клітин за допомогою аналізу МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід) (№ CGD-1, Sigma, США), оскільки лише життєздатні клітини мають функціональні ферменти мітохондріальної дегідрогенази, які можуть відновлювати МТТ до формазану. МТТ-реагент у концентрації 5 мг/мл вносили до дослідних зразків і після 3-годинної інкубації за 37 °С додавали МТТ-розчинник (ізопропанол). Детекцію результатів здійснювали через вимірювання оптичної щільності зразків за допомогою спектрофотометра (СНЕМ 7, ERBA, Чехія) за довжини хвилі 560 нм;

д) кількості апоптотичних і некротичних клітин, що визначали за допомогою набору FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (№ 556547, BD, США) на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (BD, США). Клітини АКЕ (10^6 клітин/мл) осаджували центрифугуванням, ресуспендували в холодному фосфатно-сольовому буфері (4 °С, Merck, Німеччина). У пробірку переносили по 100 мкл суспензії (10^5 клітин) і додавали по 5 мкл реагентів: FITC Annexin V та PI (пропідій-йодид). Після інкубування проб протягом 15 хв за кімнатної температури (25 °С) у темряві додавали по 400 мкл буфера й аналізували за допомогою проточної цитофлуориметрії. Визначали частку життєздатних клітин (Annexin V⁻/PI⁻), клітин у стані раннього апоптозу (Annexin V⁺/PI⁻), некрозу (Annexin V⁻/PI⁺) та пізнього апоптозу (Annexin V⁺/PI⁺).

Статистична обробка даних проводилася з використанням електронних таблиць Microsoft Excel 2010 і програми Statistica 10.0 (StatSoft, США). Кількісні дані обробляли методом варіаційної статистики з обчисленням медіани та інтерквартильного розмаху Me [25; 75]. Порівняння незалежних вибірок проводилося методом Манна–Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

Отримані дані свідчать, що інкубація клітин АКЕ з НК протягом 3 год не призводила до зменшення кількості клітин відносно контрольних значень (таблиця). Було встановлено зменшення на 25% кількості життєздатних клітин (за умов фарбування трипановим синім) після інкубації з НК порівняно з контролем.

Одним із можливих шляхів протипухлинної дії НК є індукція загибелі клітин завдяки прооксидантним властивостям ванадію [19]. За умов застосування флуориметричного аналізу було виявлено кількість внутрішньоклітинних АФК (супероксидних і гідроксильних радикалів) у життєздатних клітинах АКЕ до та після інкубації з НК. Встановлено, що кількість клітин АКЕ, які виробляли АФК до обробки НК, становила 12,3 [11,46; 12,73] % (рис. 1а). Після інкубації клітин АКЕ з НК вміст АФК-позитивних клітин становив 38,73 [36,41; 39,52] % (рис. 1б). Тобто обробка клітин АКЕ НК збільшувала серед них кількість АФК-позитивних клітин більш ніж у 3 рази порівняно з цим показником до обробки (контроль).

Одним із механізмів розвитку ушкоджень у клітинах після впливу НК може бути дисфункція мітохондрій. Порушення функцій цих органел має багатогранний ефект на внутрішньоклітинні процеси: спричиняє розвиток дефіциту енергії, окисного стресу, активізує механізми програмованої загибелі клітини. Результати дослідження впливу НК на метаболічну активність клітин АКЕ, визначену за МТТ-тестом, показали, що відбувається майже двократне зниження цього показника порівняно з контролем (див. таблицю). Тобто виявлено зміну у функціонуванні мітохондріальних дегідрогеназ і підвищення концентрації АФК-позитивних клітин після впливу НК.

Методом проточної цитофлуориметрії було досліджено вміст клітин АКЕ з ознаками апоптозу та некрозу в зразках до та після інкубації з НК (рис. 2). Встановлено, що в контрольних зразках (до інкубації з НК) вміст життєздатних

Таблиця: Показники клітин асцитної карциноми Ерліха до і після інкубації з наноконцентраціями, $n = 5$

Показник	До інкубації з наноконцентраціями (контроль) (Me [25; 75])	Після інкубації з наноконцентраціями (Me [25; 75])
Кількість, $\times 10^7$ клітин/мл	4,93 [4,72; 5,31]	4,67 [4,63; 4,87]
Життєздатність, %	97,00 [96,00; 98,00]	73,00 [68,00; 75,00]*
Метаболічна активність (МТТ-тест), ум. од.	0,73 [0,62; 0,77]	0,42 [0,37; 0,47]*

* – різниця є статистично значущою порівняно з аналогічними показниками контролю, $p < 0,05$.

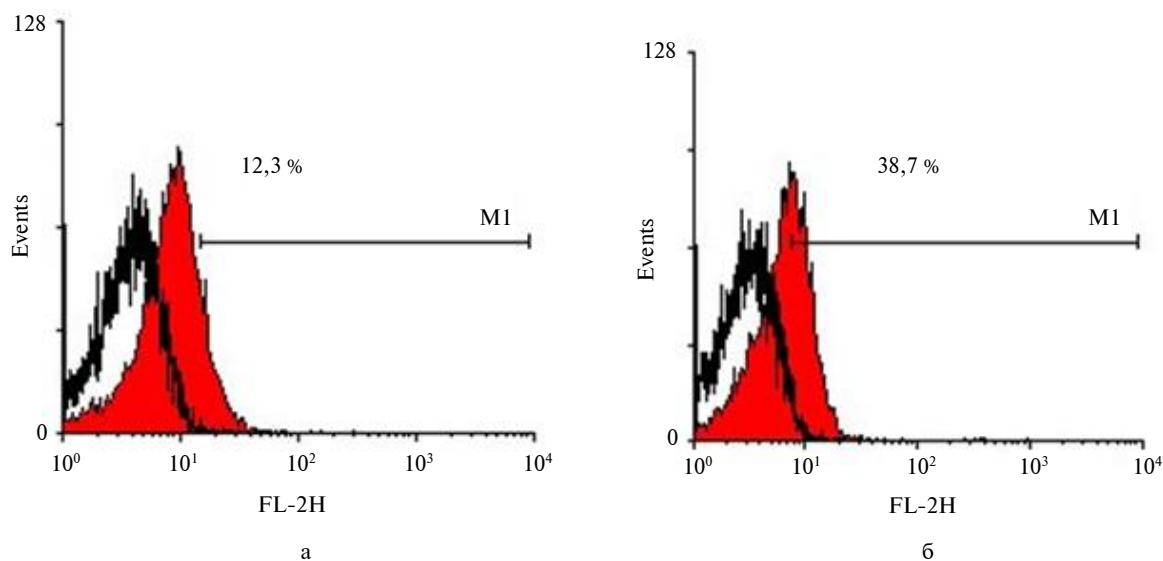


Рисунок 1: Кількість клітин аденокарциноми Ерліха з підвищеним вмістом активних форм кисню (а) до (контроль) та (б) після інкубації з наноконкомпексами за даними проточної цитофлуориметрії, $n = 5$

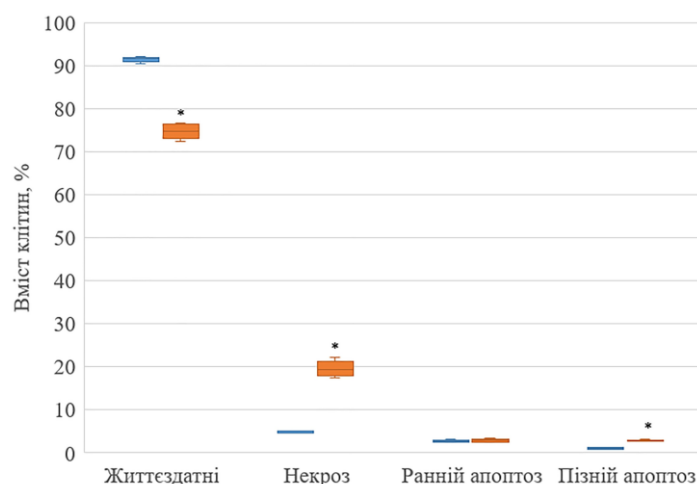


Рисунок 2: Кількість апоптотичних і некротичних клітин, які були виявлені шляхом фарбування аннексином V/пропідійодидом у клітинах асцитної карциноми Ерліха до (■) та після (■) інкубації з наноконкомпексами, $n = 5$

клітин (An^-/PI^-) становив 91,63 [91,36; 91,84] %, клітин з ознаками раннього апоптозу (An^+/PI^-) – 2,64 [2,53; 2,78] %, некрозу (An^-/PI^+) – 4,63 [4,62; 4,87] % та пізнього апоптозу (An^+/PI^+) – 1,13 [0,92; 1,27] %. Обробка клітин АКЕ наноконкомпексами приводила до статистично значущого зниження ($p < 0,05$) вмісту життєздатних клітин (An^-/PI^-) порівняно з контролем (74,65 [73,58; 76,10] та 91,63 [91,36; 91,84] % відповідно). Суттєво, що переважно загибель пухлинних клітин після обробки НК відбувалась унаслідок некрозу (19,32 [18,32; 20,37] та 4,63 [4,62; 4,87] % відповідно). При цьому вміст

клітин, які перебували в стані раннього апоптозу (An^+/PI^-), вірогідно не відрізнявся від значень контролю. В той же час НК викликали статистично значуще збільшення ($p < 0,05$) вмісту пухлинних клітин у стані пізнього апоптозу (An^+/PI^+) (2,82 [2,74; 2,85] % порівняно з 1,13 [0,92; 1,27] % у контролі).

Обговорення

Одним із фундаментальних патофізіологічних механізмів канцерогенезу є оксидативний стрес [22, 23], початковим етапом якого є над-

мірне утворення АФК, здатних чинити пряму та опосередковану цитотоксичну дію [24, 25]. У роботах [26, 27] автори продемонстрували підвищений рівень АФК у пухлинних клітинах порівняно з нормальними. Помірно підвищений рівень АФК може сприяти проліферації та виживанню пухлинних клітин, тоді як надмірне утворення АФК, що досягає токсичного порога, може спричинити їх загибель [28]. Таким чином, високий рівень АФК і, як наслідок, змінений окисно-відновний статус пухлинних клітин формує їхню “специфічну” підвищену вразливість, яку можна використовувати для розробки терапевтичних підходів до лікування онкозахворювань. Наразі активно обговорюються можливі підходи до терапії злоякісних новоутворень шляхом модуляції активності продукції АФК, що можуть бути спрямовані як на зниження їх рівня для запобігання активації онкогенів (терапія на основі антиоксидантів), так і на зростання вище певного рівня для селективного знищення пухлинних клітин (прооксидативна терапія) [5, 29, 30]. Використані нами в роботі НК можна віднести до сполук прооксидативної дії. Для вивчення дії проти-пухлинних препаратів, що є індукторами АФК в експериментальних моделях пухлинного росту, широко використовують Fluorometric Intracellular ROS Kit [31–33]. У нашому дослідженні виявлення внутрішньоклітинних АФК оцінювали до та після інкубації клітин АКЕ з НК. При використанні НК спостерігали підвищення в 3 рази кількості АФК-позитивних клітин у загальній популяції АКЕ порівняно з показником до обробки (контроль) (див. рис. 1). Як наслідок, це призводило до зниження на 25 % кількості життєздатних клітин АКЕ (див. таблицю). Отримані дані узгоджуються з результатами J.X. Wu та співавт. [34], якими було встановлено, що метаванадат натрію (NaVO_3) чинить антипроліферативний ефект на клітинні лінії раку підшлункової залози людини AsPC-1, викликаючи зупинку клітинного циклу G2/M, а також приводить до окисного стресу за рахунок збільшення рівнів АФК усередині клітин. Y. Xiaogai та співавт. [26] також встановили здатність сполук ванадію індукувати більш значне підвищення АФК у тих клітинних лініях (PC-3 і DU-145) раку передміхурової залози людини, у яких початковий рівень цього показника був більшим. Це приводило до більшої інгібіції їх росту *in vivo*. Тобто можна висловити припущення, що пухлинні клітини (АКЕ) завдяки високому базальному рівню продукції

АФК (у клітинах кісткового мозку здорових мишей він становив 6 %, дані не наведені) є більш вразливими до подальшого окисного стресу, спричиненого сполуками ванадію, що індукують утворення АФК. Отже, сполуки ванадію, зокрема використані нами в НК, можуть селективно знищувати пухлинні клітини за рахунок підвищення рівня в них базальних АФК. Однак це припущення потребує додаткових досліджень у системі *in vivo*.

Слід підкреслити, що здатність індукувати генерацію активних форм кисню мають також НЧ оксиду цинку [35]. Інкубування ракових клітин людини MDA-MB-231 із НЧ срібла здатне прискорювати продукцію АФК і значно сповільнювати ріст клітин залежно від дози [36]. Однак перевагою НК на основі НЧ ортованадтів рідкісноземельних металів GdYEuVO_4 і холестерину, застосованих у нашому дослідженні, є їх здатність проникати в клітини АКЕ за рахунок холестерину, який входить до їхнього складу.

Результати дослідження впливу НК на метаболічну активність клітин АКЕ, визначену за МТТ-тестом, показали майже двократне зниження цього показника порівняно з контролем (див. таблицю). Це може бути відображенням функції НАДФ-Н-залежних оксидоредуктазних ферментів мітохондрій після інкубації клітин АКЕ з НК. Отримані результати дають можливість припустити, що гальмування метаболічної активності клітин через пошкодження ферментативної системи мітохондрій є ранньою ознакою прояву токсичної дії НК, що зумовлює подальшу загибель пухлинних клітин. Активні форми кисню є пусковим фактором індукції програмованої загибелі клітин (апоптозу) за рахунок розкриття під їх дією каналів клітинної мембрани для виходу білка (цитохрому C), який знаходиться в міжмембранному просторі [37]. Крім того, АФК не тільки викликають смертельне пошкодження клітини, а й діють як сигнальні молекули індукції та розвитку подальших подій. Мітохондрії вважаються основною ланкою, що інтегрує різні сигнали, які беруть участь у реалізації апоптозу [21, 38]. Слід зазначити, що АФК впливають на різні шляхи ініціації апоптичної програми (рецепторний, ядерний), а не тільки на мітохондріальний, безпосередньо або через внутрішньоклітинні редокс-залежні сигналпередавальні системи [39].

Одночасне фарбування за допомогою анексину V і пропідій-йодиду (PI) дає змогу визначити тип загибелі клітин. Анексин V за наяв-

ності іонів Ca^{2+} і Mg^{2+} взаємодіє з фосфатидилсерином, який на ранніх стадіях апоптозу переходить із внутрішньої мембрани клітини на зовнішню. Мембрана життєздатних клітин непроникна для PI. Однак при незворотному пошкодженні клітини (некрозі) PI проходить крізь клітинну мембрану і здатен до інтерналізації з дефрагментованою ДНК. Подвійне фарбування клітин анексином V і PI свідчить про розвиток у них пізнього апоптозу. Тобто такий методичний підхід дає можливість ідентифікувати клітини в різних станах свого структурного та функціонального перебування після дії АФК. Інкубація клітин АКЕ з НК приводила до загибелі пухлинних клітин шляхом апоптозу, але переважно загибель відбувалася унаслідок некрозу. Таким чином, отримані дані дають змогу зробити висновок, що НК належать до тих унікальних сполук, які одночасно можуть викликати кілька видів загибелі клітин (див. рис. 2). Подібною здатністю характеризуються також НЧ золота, що продемонстровано на клітинах раку легенів, та НЧ полістиролу – на лінії клітин епітеліальної карциноми людини A431 [40, 41]. Автори пов'язують це з одночасним ушкодженням під впливом НЧ як внутрішньої, так і зовнішньої мітохондріальних мембран. При порушенні внутрішньої мембрани мітохондрій змінюється мембранний потенціал, що є передумовою загибелі клітин шляхом некрозу. З іншого боку, при пошкодженні зовнішньої мембрани мітохондрій відбувається звільнення цитохрому C, під впливом якого індукується розвиток каскаду апоптозу [42].

Отримані нами експериментальні дані показали, що при використанні НК найбільша загибель пухлинних клітин відбувається шляхом некрозу. Це має важливе значення для поглиблення розуміння інактивації онкопроцесу, а також взаємодії пухлинних структур із системами протипухлинного захисту організму. У разі загибелі клітин шляхом некрозу відбуваються розрив мембрани та швидке вивільнення клітинних компонентів, таких як ДНК, РНК, білки теплового шоку, сечова кислота, які здатні стимулювати й активувати дендритні клітини [43]. Вивільнення DAMPs (damage-associated molecular patterns) при загибелі клітин шляхом некрозу приводить до активації сигнального шляху TLR2 та TLR4, що сприяє посиленню напрацювання транскрипційного фактора NF- κ B, який зумовлює посилення про-

дукції прозапальних цитокінів і розвиток імунозапального процесу [44, 45].

Наноконплекси, що складаються з НЧ GdYEuVO_4 і холестерину, мають деякі переваги над іншими наноконпозитами за умов їх використання при онкологічних захворюваннях. НЧ ортованадатів рідкісноземельних металів GdYEuVO_4 , які входять до складу НК, здатні не тільки інгібувати пухлинний рост, але й візуалізувати стовбурові ракові клітини [10, 17, 46]. Застосовані НК як потенційні протипухлинні препарати продемонстрували селективність щодо ракових клітин і низьку токсичність до здорових клітин [4, 10].

Висновки

Одним із можливих шляхів протипухлинної дії наноконплексів на основі ортованадатів рідкісноземельних металів GdYEuVO_4 є генерація активних форм кисню з подальшим ушкодженням під їх впливом функції мітохондрій. Загибель пухлинних клітин після обробки їх наноконплексами реалізується переважно шляхом некрозу. Залежно від шляху загибелі пухлинних клітин в організмі пухлиноносія може розвиватися як імунозапальний, так і імносупресивний стан. Це свідчить про необхідність перегляду лікувальних стратегій і націлювання їх на “перемикання” механізму загибелі пухлинних клітин з апоптотичного на некротичний. Отримані нами дані свідчать про те, що досліджувані наноконплекси здатні проявляти цитотоксичний ефект на пухлинні клітини через їх прооксидантні властивості, що важливо враховувати при розробці методологічних підходів до підвищення ефективності протипухлинної терапії.

Розкриття інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Автори висловлюють щиру подяку старшому науковому співробітнику Володимирі Кириловичу Клочкову (відділ наноструктурних матеріалів імені Ю.В. Малюкіна, ІСМА НАН України, м. Харків) за надані для досліджень наноконплекси.

References

- [1] Zraik IM, Heß-Busch Y. Management von Nebenwirkungen der Chemotherapie und deren Langzeitfolgen [Management of chemotherapy side effects and their long-term sequelae]. *Urologe A*. 2021 Jul; 60(7):862-71. DOI: 10.1007/s00120-021-01569-7
- [2] Xu X, Li T, Jin K. Bioinspired and biomimetic nanomedicines for targeted cancer therapy. *Pharmaceutics*. 2022 May;14(5):1109. DOI: 10.3390/pharmaceutics14051109
- [3] Kowalski S, Wyrzykowski D, Inkielewicz-Stepniak I. Molecular and cellular mechanisms of cytotoxic activity of vanadium compounds against cancer cells. *Molecules*. 2020;25:1757. DOI: 10.3390/molecules25071757
- [4] Goltsev AM, Dubrava TG, Gaevska YO, Babenko NM, Bondarovich MO, Lutsenko OD. Functional activity of animal bone marrow cells after their treatment with nanocomplexes. *Ukr J Radiol Oncol*. 2021;29(2):9-21. DOI: 10.46879/ukroj.2.2021.9-21
- [5] Crans DC, Yang L, Haase A, Yang X. Health benefits of vanadium and its potential as an anticancer agent. In: Sigel A, Sigel H, Freisinger E, Sigel RKO, editors. *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents*. De Gruyter; 2018. DOI: 10.1515/9783110470734-015
- [6] Klochkov VK, inventor; ISMA NAS of Ukraine, assignee. Method for producing water dispersion of cholesterol. Ukraine patent 108011. 2015 March 10.
- [7] Shen L, Zhang C, Cui K, Liang X, Zhu G. Low-density lipoprotein contributes to endometrial carcinoma cell proliferation, migration, and invasion by activating the JAK-STAT signaling pathway. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2023 Oct; 2023:4015167. DOI: 10.1155/2023/4015167
- [8] 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;1801(12):1239-48. DOI: 10.1016/j.bbailip.2010.08.006
- [9] Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YA, Chelombitko OV, Bondarovich NA, Dubrava TG, et al. Functional activity of Ehrlich carcinoma cells after treatment with hybrid nanocomplexes containing orthovanadates of rare-earth elements, cholesterol and luminescent dye. *Fiziol Zh*. 2015;61(6):60-8. DOI: 10.15407/fz61.06.060
- [10] Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YA, Bondarovich NA, Dubrava TG, Ostankov MV, et al. Nanotechniques inactivate cancer stem cells. *Nanoscale Res Lett*. 2017 Dec;12(1):415. DOI: 10.1186/s11671-017-2175-9
- [11] Aureliano M, De Sousa-Coelho AL, Dolan CC, Roess DA, Crans DC. Biological consequences of vanadium effects on formation of reactive oxygen species and lipid peroxidation. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar;24(6):5382. DOI: 10.3390/ijms24065382
- [12] Ścibior A, Kurus J. Vanadium and oxidative stress markers - in vivo model: a review. *Curr Med Chem*. 2019;26(29):5456-500. DOI: 10.2174/0929867326666190108112255
- [13] Kumar S, Kumari S, Karan R, Kumar A, Rawal R.K., Gupta P.K. Anticancer perspectives of vanadium complexes. *Inorganic Chemistry Communications*. 2024;161:112014. DOI: 10.1016/j.inoche.2023.112014
- [14] Raimondi V, Ciccarese F, Ciminale V. Oncogenic pathways and the electron transport chain: a dangerROS liaison. *Br J Cancer*. 2020 Jan;122(2):168-81. DOI: 10.1038/s41416-019-0651-y
- [15] Yefimova SL, Maksimchuk PO, Hubenko KO, Omieliaeva VV, Kavok NS, Klochkov VK, et al. Light-triggered redox activity of GdYVO₄:Eu³⁺ nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2020 Dec;242:118741. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118741
- [16] Goltsev A, Babenko N, Gaevska Y, Bondarovich M, Dubrava T, Ostankova L, et al. Toxicity of nanocomplexes containing gadolinium orthovanadate nanoparticles and cholesterol. *Biol Trace Elem Res*. 2022;200(10):4339-54. DOI: 10.1007/s12011-021-03019-z
- [17] Goltsev AM, Malyukin YV, Babenko NM, Gaevska YO, Bondarovich MO, Dubrava TG, et al. Antitumor activity of spherical nanoparticles GdYVO₄: Eu³⁺ depends on pre-incubation time. *Appl Nanosci (Switzerland)*. 2020;10(8):2749-58. DOI: 10.1007/s13204-020-01284-3
- [18] Klochkov VK. Aqueous colloid solutions of nanoluminophores nReVO₄:Eu³⁺ (Re = Y, Gd, La). *Mater Sci Nanostruct*. 2009;2:3-8.
- [19] Ehrlich P, Apolant H. Beobachtungen über Maligne Mäusen tumoren. *Berlin Klin Wschr*. 1905;28:871-4.
- [20] Ozaslan M, Karagos ID, Kilic IH, Guldur ME. Erlich ascites carcinoma. *Afr J Biotechnol*. 2011;10:2375-8.
- [21] Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochim Pol*. 2012;59(2):195-200.
- [22] Kruk J, Aboul-Enein HY. Reactive oxygen and nitrogen species in carcinogenesis: implications of oxidative stress on the progression and development of several cancer types. *Mini Rev Med Chem*. 2017;17(11):904-19. DOI: 10.2174/1389557517666170228115324
- [23] Moskalenko AM, Lukyanchuk OV, Badiuk NS, Vasiuk VL, Gozhenko AI. Oxidative stress at tumors. *Visnyk Morskoi Medytsyny*. 2019;4(85):134-42. DOI: 10.5281/zenodo.3608275
- [24] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 2002 Sep;7(9):405-10. DOI: 10.1016/s1360-1385(02)02312-9
- [25] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012 May;24(5):981-90. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008

- [26] Xiaogai Y. Vanadium compounds induce stronger growth suppression in PTEN-deficient prostate cancer cells by ROS-mediated mechanism. *J Chin Pharmaceut Sci.* 2017;26 (6):432-9. DOI: 10.5246/jcps.2017.06.047
- [27] Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med.* 2020 Feb;52(2):192-203. DOI: 10.1038/s12276-020-0384-2
- [28] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(7):579-91. DOI: 10.1038/nrd2803
- [29] Luo M, Zhou L, Huang Z, Li B, Nice EC, Xu J, et al. Antioxidant therapy in cancer: Rationale and progress. *Antioxidants (Basel).* 2022 Jun;11(6):1128. DOI: 10.3390/antiox11061128
- [30] Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol.* 2020;30:440-51. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.03.002
- [31] Hwang HJ, Hong SH, Moon HS, Yoon YE, Park SY. Ginsenoside Rh2 sensitizes the anti-cancer effects of sunitinib by inducing cell cycle arrest in renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2022 Nov;12(1):19752. DOI: 10.1038/s41598-022-20075-0
- [32] Leventic M, Opacak-Bernardi T, Rastija V, Matic J, Pavlovic Saftic D, Ban Z, et al. The mechanism of anti-tumor activity of 6-morpholino- and 6-amino-9-sulfonyl-purine derivatives on human leukemia cells. *Molecules.* 2023 Aug;28(16):6136. DOI: 10.3390/molecules28166136
- [33] Mehdad A, Brumana G, Souza AA, Barbosa J, Ventura MM, de Freitas SM. A Bowman-Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. *Cell Death Discov.* 2016 Mar;2:15067. DOI: 10.1038/cddiscovery.2015.67
- [34] Wu JX, Hong YH, Yang XG. Bis(acetylacetonato)-oxidovanadium(IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer AsPC-1 cells. *J Biol Inorg Chem.* 2016 Dec;21(8):919-29. DOI: 10.1007/s00775-016-1389-0
- [35] Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine.* 2011 Apr;7(2):184-92. DOI: 10.1016/j.nano.2010.10.001
- [36] Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Jeyaraj M, Kim JH. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Biomed Res Int.* 2013;2013:535796. DOI: 10.1155/2013/535796
- [37] Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 2002 Feb-Mar;84(2-3):131-41. DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01369-x
- [38] Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jun;1807(6):735-45. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.03.010
- [39] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012 May;24(5):981-90. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008
- [40] Liu M, Gu X, Zhang K, Ding Y, Wei X, Zhang X, et al. Gold nanoparticles trigger apoptosis and necrosis in lung cancer cells with low intracellular glutathione. *J Nanopart Res.* 2013;5(8):1745. DOI: 10.1007/s11051-013-1745-8
- [41] Phuc LTM, Taniguchi A. Polystyrene nanoparticles induce apoptosis or necrosis with or without epidermal growth factor. *J Nanosci Nanotechnol.* 2019 Aug;19(8):4812-7. DOI: 10.1166/jnn.2019.16347
- [42] Myshunina TM, Kalinichenko OV, Tron'ko MD. Mechanism of apoptosis in the thyroid cells under thyroid pathology. *Fiziologichnyi Zhurnal.* 2009;55(6):90-102.
- [43] Sathianathen NJ, Krishna S, Anderson JK, Weight CJ, Gupta S, Konety BR, et al. The current status of immunobased therapies for metastatic renal-cell carcinoma. *Immunotargets Ther.* 2017 Dec;6:83-93. DOI: 10.2147/ITT.S134850
- [44] Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death-a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2625-32. DOI: 10.1172/JCI26322
- [45] Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017 May;17(5):333-40. DOI: 10.1038/nri.2016.153
- [46] Goltsev AN, Malyukin YV, Dubrava TG, Babenko NN, Gaevskaya YA, Chelombytko OV, et al. Nanocomposites specifically penetrate and inhibit tumor cells. *Mat-wiss u Werkstofftech.* 2016;47(2-3):156-64. DOI: 10.1002/mawe.201600457

A.M. Goltsev^{1,2}, M.O. Bondarovich¹, Y.O. Gaevska¹, N.M. Babenko¹, T.G. Dubrava¹, M.V. Ostankov¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine.

²Interdepartmental Research Center of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, AMS of Ukraine and Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE IMPLEMENTATION OF THE ANTI-TUMOR EFFECT OF NANOCOMPLEXES BASED ON GdEuVO₄ NANOPARTICLES AND CHOLESTEROL

Background. An experimental study of the antitumor effect of nanocomplexes (NCs) consisting of GdYEuVO₄ nanoparticles and cholesterol indicates their potential use in oncological practice. The mechanism of the antitumor effect of NCs may be associated with the formation of reactive oxygen species (ROS), leading to subsequent tumor cell death.

Objective. To study the pro-oxidant and antitumor properties of NCs consisting of GdYEuVO₄ nanoparticles and cholesterol in an *in vitro* system.

Methods. Experiments were performed on Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells, which were introduced intraperitoneally into BALB/c mice. On the 7th day of EAC development, cells were isolated and treated with NCs for 3 hours *in vitro*. Untreated cells served as the control. The formation of intracellular ROS was quantified by flow cytometry using the Fluorometric Intracellular ROS Kit. The metabolic activity of EAC cells was assessed using the colorimetric MTT test. The number of cells undergoing apoptosis or necrosis was evaluated using flow cytometry and the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I.

Results. Incubation of EAC cells with NCs resulted in more than a 3-fold increase in ROS formation compared to the control. NCs also caused almost a two-fold inhibition of the metabolic activity of EAC cells, accompanied by a 25% decrease in the number of viable EAC cells. It was shown that NCs are unique compounds capable of simultaneously inducing several types of cell death, with necrosis being the predominant mode of tumor cell death after NC treatment.

Conclusions. The cytotoxic effect of NCs on tumor cells is mediated through their pro-oxidant properties. These results can be considered when developing new cancer therapy strategies.

Keywords: nanocomplexes; Ehrlich adenocarcinoma cells; reactive oxygen species; apoptosis; necrosis; vanadium compounds.