

УДК 577.32:537.662

В.Ф. Чехун¹, С.В. Горобець², О.Ю. Горобець², І.В. Дем'яненко²¹Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького м. Київ, вул. Васильківська, 45, Україна, 03022²Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут» м. Київ, пр-т Перемоги, 37, Україна, 03056

МАГНІТОЧУТЛИВІ НАНОСТРУКТУРИ ЕНДОГЕННОГО ПОХОДЖЕННЯ У КЛІТИНАХ КАРЦИНОМИ ЕРЛІХА

Ключові слова: карцинома Ерліха, магнітна фаза, сканувальна зондова мікроскопія, наноструктура, кристал

Пухлинні клітини карциноми Ерліха, вихідні та піддані впливу постійного магнітного поля індукцією 160 мТл протягом 15 хв і 1 год, досліджено методом магнітно-силової мікроскопії задля детекції структурної організації магнітної фази ендогенного походження. На кожній клітині, експонованій у магнітному полі, виявлено утворення численних магніточутливих елементів, зібраних у ланцюжки різної довжини.

Вступ

Магніточутливі наноструктури ендогенного походження є об'єктом інтенсивних досліджень протягом останніх трьох десятиліть. Відомо, що до складу живих організмів, зокрема мікроорганізмів (бактерій, дріжджів, грибів тощо), входять сполуки, які належать до різних магнітних класів – діа-, пара-, феро-, антиферо- та феримагнетиків (феритів). До того ж феро-, антиферо- й феримагнетики є магнітовпорядкованими речовинами. Відсоткове співвідношення речовин та елементів із різними магнітними властивостями визначає ступінь відгуку біологічних об'єктів на зовнішнє магнітне поле.

Найбільшу магнітну сприйнятливність мають біосистеми, що накопичують у своєму складі магнітовпорядковані наноструктури, зокрема магнетит Fe_3O_4 у формі наночастинок [1–8]. Так, у 1975 р. у складі ряду прокаріот [1, 2] було виявлено внутрішньоклітинний намагнетит у вигляді кристалічних формувань, що називаються магнітосомами та утворюють ланцюжки з десятків окремих гранул, кожна з яких покрита оболонкою. Магнітосома – це внутрішня органела клітини, яка має набір білків, потрібний для синтезу магнітних кристалів мікро- й нанорозміру. Кількість гранул та розмір їх (від 10 до 40 нм; за іншими даними, від 35 до 120 нм) залежать від виду бактерій. За утворення органел-магнітосом відповідають так звані магнітосомні острівці, що містять специфічні гени, завданням яких і є формування магнітосом. Такі кристали характеризуються морфологічним і складовим розмаїттям, що залежить від ступеня

© В.Ф. ЧЕХУН, С.В. ГОРОБЕЦЬ,
О.Ю. ГОРОБЕЦЬ,
І.В. ДЕМ'ЯНЕНКО, 2011

біологічного контролю. Молекулярні дослідження показали, що у процесі біомінералізації магнітосом головну роль відіграють білки, пов'язані із синтезом магнітних наночастинок. Виявлено, що синтез магнітосом передбачає кілька процесів – формування пухирця органели, накопичення заліза та кристалізацію оксиду заліза. У роботі [9] наведено широкий функціональний аналіз генів магнітоаксисної бактерії *magneto-spirillum magneticum AMB-1*, які містяться в магнітосомному острівці. У роботах [4–8, 10–12] висунуто гіпотезу стосовно того, що магнітосоми та магніточутливі наноструктури (МЧНС) мають різне призначення: вони не лише визначають напрямок руху бактерій уздовж силових ліній магнітного поля (магнітоаксис), а й дають клітині додаткову енергію.

Пізніші дослідження продемонстрували, що в багатьох організмах відбувається біохімічний синтез не тільки біогенного магнетиту, але й інших феромагнітних сполук заліза, таких як магеміт Fe_2O_3 [10, 11, 13–17] та грейгіт Fe_2S_4 , який має магнітний момент утричі менший порівняно з магнетитом [18, 19]. Біомінералізований магнетит виявлено у викопних рештках організмів, вік яких можна датувати починаючи від докембрійської ери [20], у молюсках [15], членистоногих [16], рибах [18], тваринах [15–

18, 20], у тканинах мозку [22–25] та в інших органах людини [28]. Зокрема біогенний магнетит знайдено в тканинах та органах акул, дельфінів, багатьох перелітних птахів, равликів, шершнів, бджіл і т. ін. [8, 24, 25].

Так, у роботі [21] завдяки використанню ультраручутливого надпровідного магнітометра було показано, що феритові наночастинки (магнетит і магеміт) наявні в складі багатьох тканин мозку людини в кількості від 5 до 100 млн нанорозмірних кристалів на 1 г м'якої чи твердої мозкової оболонки. Розподіл цих частинок за розмірами має два максимуми: в околі малих частинок із середнім розміром $33,4 \pm 15,2 \text{ нм}$, які збираються у групи по 50–100, а також у діапазоні розмірів від 90 нм до 200 нм. Перехід від суперпарамагнітного до однодомного стану для магнетиту відбувається в діапазоні розмірів наночастинок від 25 до 30 нм [26], тому в мозку людини присутні як суперпарамагнітна, так і однодомна компоненти.

Також у роботах [26–30] досліджено роль феримагнітного ендогенного магнетиту при неврологічних та нейродегенеративних захворюваннях, таких як хвороба Альцгеймера й епілепсія. У роботі [27] показано, що в пухлинній тканині мозку людини приблизно в 10 разів більше наночастинок магнетиту, аніж у здоровій.

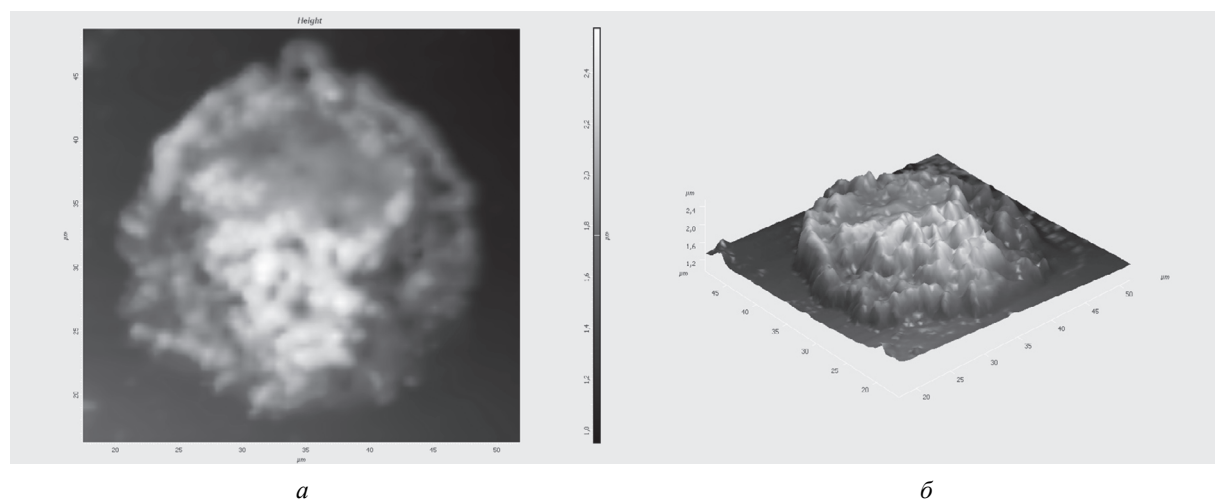


Рис. 1. АСМ-зображення клітини карциноми Ерліха (контрольний зразок): 2D-структура (а), 3D-структура (б)

Незважаючи на інтенсивне дослідження властивостей ендogenous феритових наночастинок, питання щодо фізіологічного походження та функціонального призначення їх у багатоклітинних організмах донині залишається відкритим.

Експериментальна частина

У цій роботі досліджено пухлинні клітини карциноми Ерліха, культивовані без магнітного по-

ля (контрольний зразок), та клітини, які зазнали впливу постійного магнітного поля індукцією 160 мТл протягом 15 хв (зразок 1) і 1 год (зразок 2) за допомогою сканувального зондового мікроскопа «Solver PRO-M». Зазначену культуру клітин надав Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького. Метою роботи було вивчення можливості існування магніточутливих наноструктур ендogenous походження та дослідження впливу магніт-

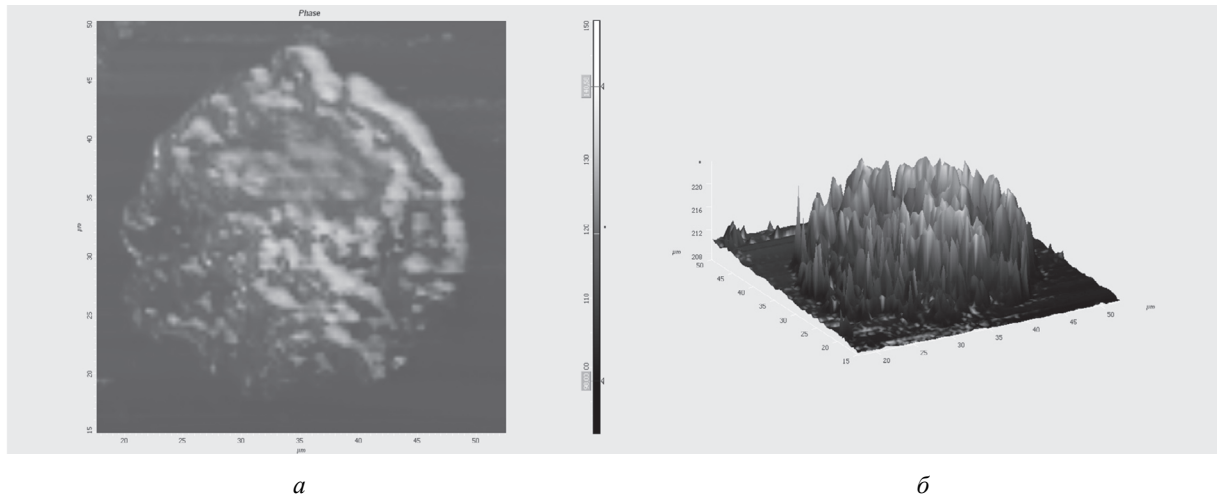


Рис. 2. МСМ-зображення клітини карциноми Ерліха (контрольний зразок): 2D-структура (а), 3D-структура (б)

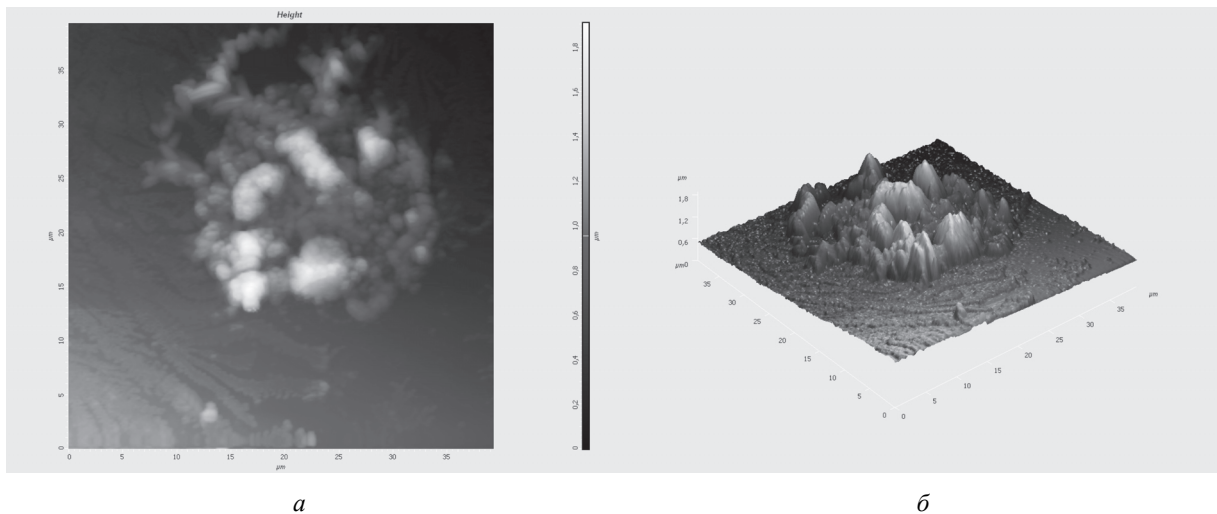
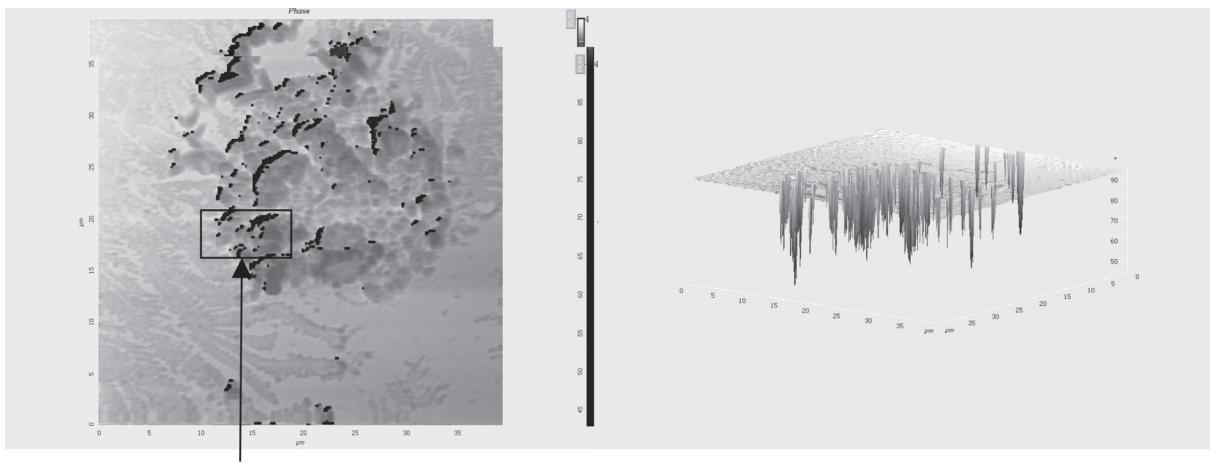
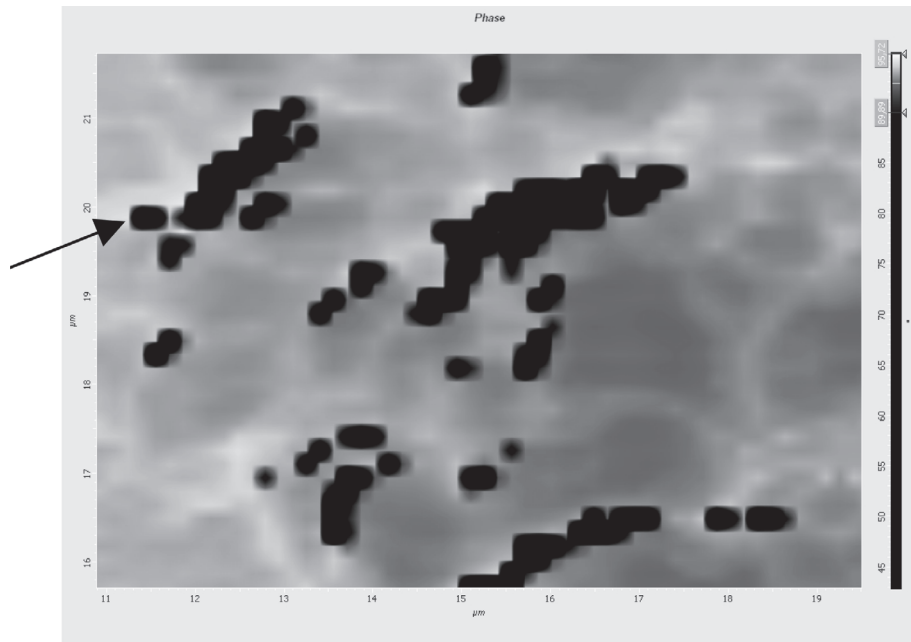


Рис. 3. АСМ-зображення клітини карциноми Ерліха, підданій впливу магнітного поля (зразок 1): 2D-структура (а), 3D-структура (б)



а

б



в

Рис. 4. МСМ-зображення клітини карциноми Ерліха, підданій впливу магнітного поля (зразок 1): 2D-структура (а), 3D-структура (б), фрагмент, що містить ендогенну магніточутливу наноструктуру (в); стрілкою показано окремий локалізований елемент магніточутливої наноструктури ендогенного походження

ного поля на самоорганізацію їх у клітинах карциноми Ерліха.

Зразки досліджено методами атомно-силової мікроскопії (АСМ) напівконтактним способом та

магнітно-силової мікроскопії (МСМ). Режим сканування – напівконтактний або магнітний, тип зонда – магнітний кобальтовий (NSG01/Co), відстань від зонда до поверхні клітини – 80 нм.

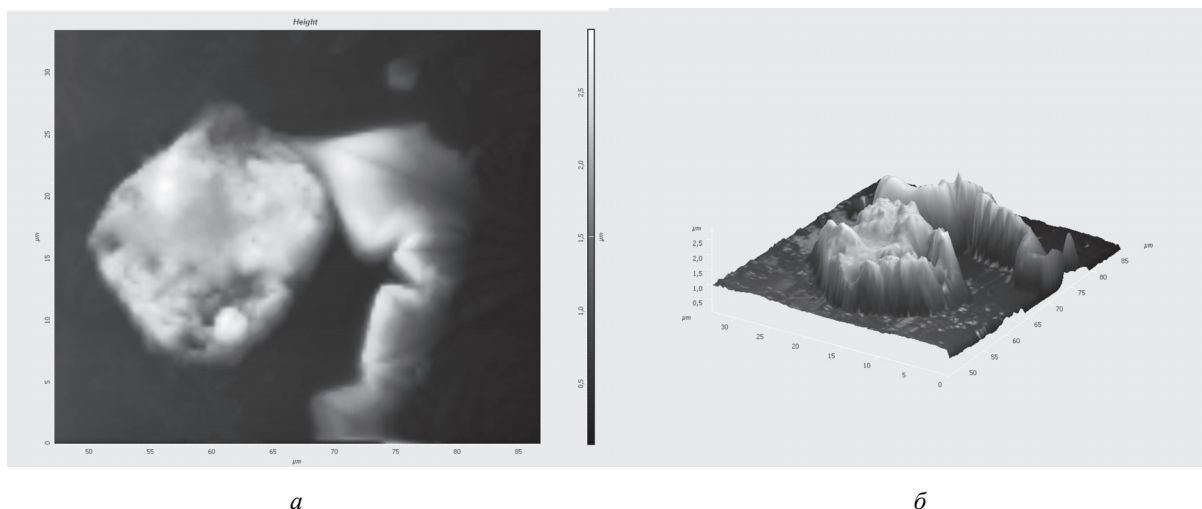


Рис. 5. АСМ-зображення клітини карциноми Ерліха, підданій впливу магнітного поля (зразок 2): 2D-структура (а), 3D-структура (б)

На рис. 1 і 2 наведено зображення типової клітини карциноми Ерліха, культивованої без впливу магнітного поля.

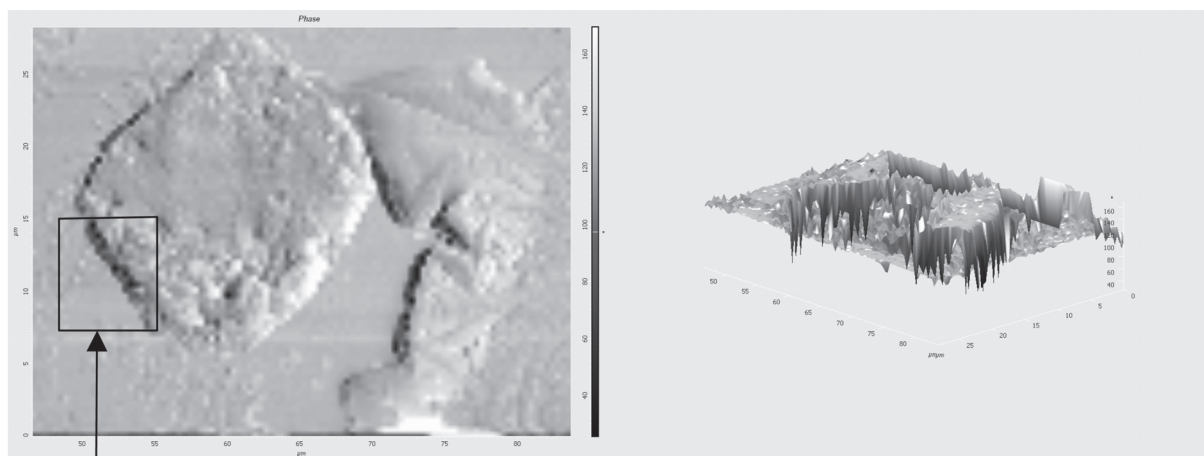
На рис. 3 й 4 наведено зображення типової клітини карциноми Ерліха, яка зазнала впливу магнітного поля індукцією 160 мТл протягом 15 хв (зразок 1).

Проаналізувавши отримані МСМ-зображення зразка 1 (рис. 4а та 4в) та зразка 2 (рис. 6а та 6в), можна зробити висновок, що клітини, які зазнали впливу магнітного поля, містять магніточутливу фазу, тобто магніточутливу наноструктуру ендегенного походження. Окремий локалізований елемент магніточутливої наноструктури ендегенного походження являє собою кластер ендегенних феритових наночастинок. У зразку 1 окремі елементи розташовано досить хаотично по периметру клітини у вигляді коротких (2–5 ланок) і довгих (10–20 ланок) ланцюжків. Натомість у зразку 2 елементи локалізовано по контуру клітини у вигляді ланцюжків, які охоплюють майже весь периметр МСМ-зображення клітини. За допомогою вбудованих функцій програми «Nova», яка є стандартним комп'ютерним забезпеченням сканувального зондового мікроскопа «Solver PRO-M», було оцінено приблизні характерні розміри окремих локалізованих елементів магніточутливої нано-

структури (r_{\max}) із використанням геометричних вимірювань відстані між центрами окремих сусідніх елементів у ланцюжку на МСМ-зображенні клітини. Зазначений розмір елементів зразка 1 становить близько 100 нм, зразка 2 – 500 нм.

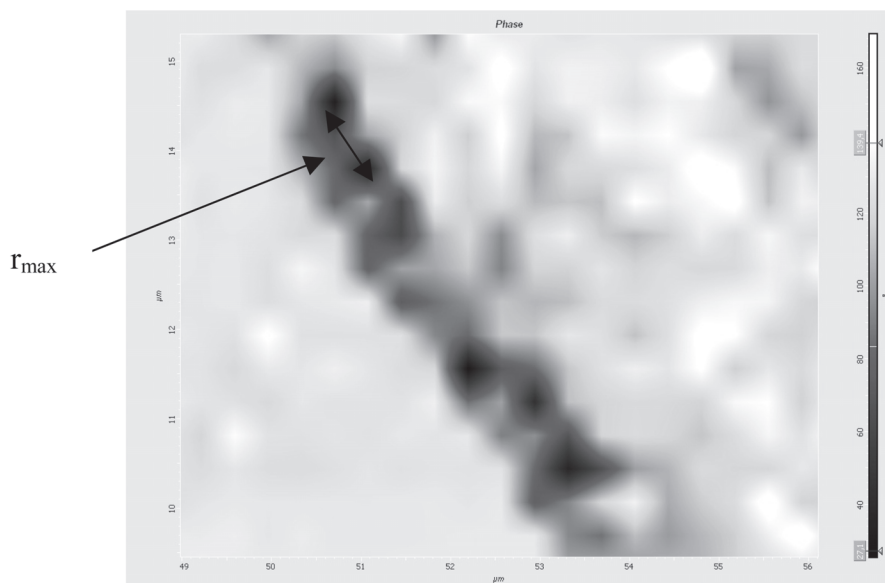
Висновки

У роботі продемонстровано, що магнітна силова мікроскопія є ефективним методом детекції магнітовпорядкованих наноструктур у клітинах. Уперше встановлено, що в клітинах карциноми Ерліха існують магніточутливі наноструктури ендегенного походження у вигляді сукупності окремих локалізованих нанорозмірних елементів із характерними розмірами від 100 до 500 нм. Порядком розміру окремого нанорозмірного елемента магніточутливої наноструктури узгоджується з літературними даними щодо розмірів кластерів ендегенних феритових наночастинок [25]. Однак унаслідок обмеження роздільної здатності мікроскопа «Solver PRO-M» у магнітно-силовому режимі не встановлено наявності субструктурної організації окремого нанорозмірного елемента магніточутливої наноструктури, яка характеризує кількість магнітних наночастинок у кластері.



a

б



в

Рис. 6. МСМ-зображення клітини карциноми Ерліха, підданій впливу магнітного поля (зразок 2): 2D-структура (*a*), 3D-структура (*б*), фрагмент, що містить ендогенну магніточутливу наноструктуру (*в*)

У культурі клітин, культивованих без магнітного поля, спостерігається не більш від одного-двох окремих магніточутливих елементів максимально у перерахунку на 1 клітину, тоді як при експозиції клітин під впливом магнітного поля

індукцією 160 мТл протягом 15 хв та 1 год спостерігається утворення на кожній клітині сотень локалізованих магніточутливих елементів ендогенного походження, зібраних у довгі та короткі ланцюжки.

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що експозиція пухлинних клітин карциноми Ерліха в постійному магнітному полі суттєво впливає на процес формування магніточутливих наноструктур ендегенного походження та на розміри, кількість і структурну організацію окремих нанорозмірних магніточутливих елементів у клітині. На підставі аналізу літературних даних та МСМ-зображень магніточутливих наноструктур ендегенного походження у клітинах карциноми Ерліха висунуто гіпотезу стосовно того, що окремі елементи цих структур можуть являти собою кластери магнітних наночастинок.

Опухолевые клетки карциномы Эрлиха, исходные и подвергнутые влиянию постоянного магнитного поля индукцией 160 мТл в течение 15 мин и 1 ч, исследованы методом магнитно-силовой микроскопии для детекции структурной организации магнитной фазы эндогенного происхождения. На каждой клетке, экспонированной в магнитном поле, выявлено образование многочисленных магниточувствительных элементов, собранных в цепочки разной длины.

Ключевые слова: карцинома Эрлиха, магнитная фаза, сканирующий зондовый микроскоп, наноструктура, кристалл

In this work were investigated Ehrlich carcinoma, which were cultivated without magnetic field, and the cells that were exposed in magnetic field with magnetic induction near 160 mT during 15 min and 1 h by magnetic-force microscopy for the detection of organization of magnetic phase of endogenous origin. During the investigation were detected that every cell that were exposed in magnetic field had many magnetosensitive elements of endogenous origin. This elements were organized in long and short chains.

Key words: Ehrlich carcinoma, magnetic phase, scanning probe microscopy, nanostructures, crystal

1. *Blakemore R.P.* Magnetotactic bacteria // *Science*. – 1975. – **190**. – P. 377–379.
2. *Верховцева Н.В.* Образование бактериями магнетита и магнитотаксис // *Успехи микробиологии*. – 1992. – **25**, вып. 1. – С. 51–79.
3. *Vazylinski D.* Controlled biomineralisation of magnetic minerals by magnetotactic bacteria // *Chemical Geology*. – 1995. – 132. – P. 191–198.
4. *Вайнштейн М.Б., Сузина Н.Е., Сорокин Е.Б.* К разнобразию магнитотактных бактерий // *Микробиология*. – 1998. – **67**, № 6. – С. 807–814.
5. *Magnetic Characterization of Bacterial Magnetic Particles / Nishio H., Takahashi T., Taguchi H. et al.* // *Journal de Physique IV FRANCE*. – 1997. – 7. – P. 663–666.
6. *Schuler D., Baeuerlein E.* Iron Transport and Magnetite Crystal Formation of the Magnetic Bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* // *Journal de Physique IV FRANCE*. – 1997. – 7. – P. 647–650.
7. *Верховцева Н.В.* Трансформация соединений железа гетеротрофными бактериями // *Микробиология*. – 1995. – **64**, № 4. – С. 473–478.
8. *Frankel R.B., Blakemore R.P., Wolfe R.S.* Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria // *Science*. – 1979. – **203**. – P. 1355–1356.
9. *Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle / D. Murat, A. Quinlan, H. Vali, A. Komeili* // *PNAS Early Edition*. – 2010. – **107**, N 12. – P. 5593–5598.
10. *Magnetite and Magnetotaxis in Algae / F.F. Torres de Araujo, M.A. Pires, R.B. Frankel, C.E.M. Bicudo* // *Biophys. J.* – 1995. – **50**. – P. 375–378.
11. *Vainshtein M.B., Suzina N.E., Sorokin V.V.* A new type of magnetsensitive inclusions in cells of photosynthetic purple bacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1997. – **20**. – P. 182–186.
12. *Lowenstam H.A.* Magnetic material in European eel (*Anguilla anguilla* L.) // *Geol. Soc. Am. Bull.* – 1962. – **73**. – P. 435–438.
13. *Gould J.L., Kirschvink J.L., Deffeyes K.S.* Bees have magnetic remanence // *Science*. – 1978. – **202**. – P. 1026–1028.
14. *Walcott C., Gould J.L., Kirschvink J.L.* Magnetite biomineralization in the human brain // *Science*. – 1979. – **184**. – P. 180–182.
15. *Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception / S. Mann, N.H.C. Sparks, M.M. Walker, J.L. Kirschvink* // *J. Exp. Biol.* – 1988. – **140**. – P. 35–49.
16. *Kirschvink J.L., Jones D.S., MacFadden B.J.* Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism // New York; London: Plenum Press. – 1985. – **5**. – P. 405.
17. *Controlled Biomineralization of Magnetite (Fe₃O₄) and Greigite (Fe₃S₄) in a Magnetotactic Bacterium / Heywood D.R., Bazylinski D.A., Garrattreed A. et al.* // *Naturwissenschaften*. – 1990. – **77**. – P. 536–538.
18. *Cat Faber* Living Lodestones: Magnetotactic bacteria // *Strange Horizons*. – 2001. – 7. – P. 2.
19. *Chang S.R., Kirschvink J.L.* Magnetofossils, the magnetization of sediments, and the evolution of magnetite biomineralization. // *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* – 1989. – **17**. – P. 169–195.

20. *Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B.J.* Magnetite biomineralization in the human brain. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1992. – **89**. – P. 7683–7687.
21. *Evocation of epileptiform activity by weak D.C. magnetic fields and iron biomineralization in the human brain / Dobson J.P., Fuller M., Moser S. et al.* // Biomagnetism: Fundamental Research and Applications, eds. C. Baumgartner, L. Deecke, G. Stroink, S.J. Williamson. Elsevier, Amsterdam. – 1995. – P. 16–19.
22. *Dobson J.P., Grassi P.* Magnetic Properties of Human Hippocampal Tissue-Evaluation of Artefact and Contamination Sources. Brain Res. Bull. – 1996. – **39**. – P. 255–259.
23. *Schultheiss-Grassi P.P., Heller F., Dobson J.* Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver. BioMetals. – 1997. – **10**. – P. 351–355.
24. *Сильные и сверхсильные магнитные поля и их применение / Под ред. Ф. Херлаха.* – М.: Мир, 1988. – 456 с.
25. *Surface and internal spin canting in gamma-Fe₂O₃ nanoparticles / Morales M.P., Veintemillas-Verdaguer S., Montero M.I. et al.* // Chem. Mat. – 1999. – **11**. – P. 3058–3064.
26. *Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue / Brem F., Hirt A.M., Winklhofer M. et al.* // Journal of the Royal Society Interface. – 2006. – **3**. – P. 833–841.
27. *Study of the localization of iron, ferritin and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level / Quintana C., Bellefqih S., Laval J.Y. et al.* // J. Struct. Biol. – 2006. – **153**. – P. 42–54.
28. *On the sensitivity of the human brain to magnetic-fields—evocation of epileptiform activity / M. Fuller, J. Dobson, H.G. Wieser, S. Moser* // Brain Res. Bull. – 1995. – **36**. – P. 155–159.
29. *Schultheiss-Grassi P.P., Dobson J.* Magnetic analysis of human brain tissue // Biometals. – 1999. – **12**. – P. 67–72.
30. *Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue / D. Hautot, Q.A. Pankhurst, N. Khan, J. Dobson* // Proc. R. Soc. B. – 2003. – **270**. – S62–S64.