



УДК 542.05:678.746:577.164.1

**И. Б. Демченко, Н. А. Галатенко, Л. В. Макеева, Р. А. Рожнова,
Л. Ф. Наражайко, И. И. Гладырь**

Биологическая активность фолат-конъюгированного ферроцена

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины А. И. Вовком)

Исследована биологическая активность фолат-конъюгированного ферроцена методом тканевой культуры. Установлено, что фолат-конъюгированный ферроцен, внесенный в тканевую культуру, стимулирует рост фибробластических и гистиоцитарных элементов на всех этапах культивирования.

Получить представление об эффективности, т. е. о положительном комплексе запрограммированного воздействия на организм новых биологически активных соединений можно только в результате многочисленных, зачастую весьма длительных экспериментов. На основе общепринятых методов исследований на лабораторных животных определить возможность использования новых химических соединений нередко затруднительно в связи с мобилизацией защитных систем организма. Поэтому большое значение приобретают исследования влияния различных факторов на клеточном уровне. В настоящее время клеточные и тканевые культуры широко применяются в различных отраслях медицины и биологии, а именно для определения степени токсичности биологически активных веществ [1–4], полимерных материалов, в том числе медицинского назначения [5–10], лекарственных препаратов [11–13] и так далее.

Спектр используемых клеточных и тканевых культур весьма разнообразен. Нами для оценки биологической активности нового химического соединения — фолат-конъюгированного ферроцена (ФКФ), была использована подкожная клетчатка белых крыс, которая имеет ряд преимуществ: высокая чувствительность и воспроизводимость, а также надежность контроля качества проведения исследований.

ФКФ синтезирован с целью получения эффективного биологически активного вещества, обладающего, прежде всего, иммуностимулирующими свойствами. Известно использование ферроцена в медицинской практике как магниточувствительного материала в гипертермии злокачественных новообразований. Конъюгация ферроцена фолиевой кислотой позволит получить соединение, которое в дальнейшем может быть использовано в хирургии для

© И. Б. Демченко, Н. А. Галатенко, Л. В. Макеева, Р. А. Рожнова, Л. Ф. Наражайко, И. И. Гладырь, 2013

селективного транспорта магниточувствительной частицы к опухолевым клеткам, что повысит эффективность локальной гипертермии.

В настоящей работе приведены результаты исследования биологической активности ФКФ методом тканевой культуры.

Синтез ФКФ проводили в три стадии [14] путем функционализации ферроцена через стадию синтеза ферроценкарбоновой кислоты по методу [15] (схема 1).

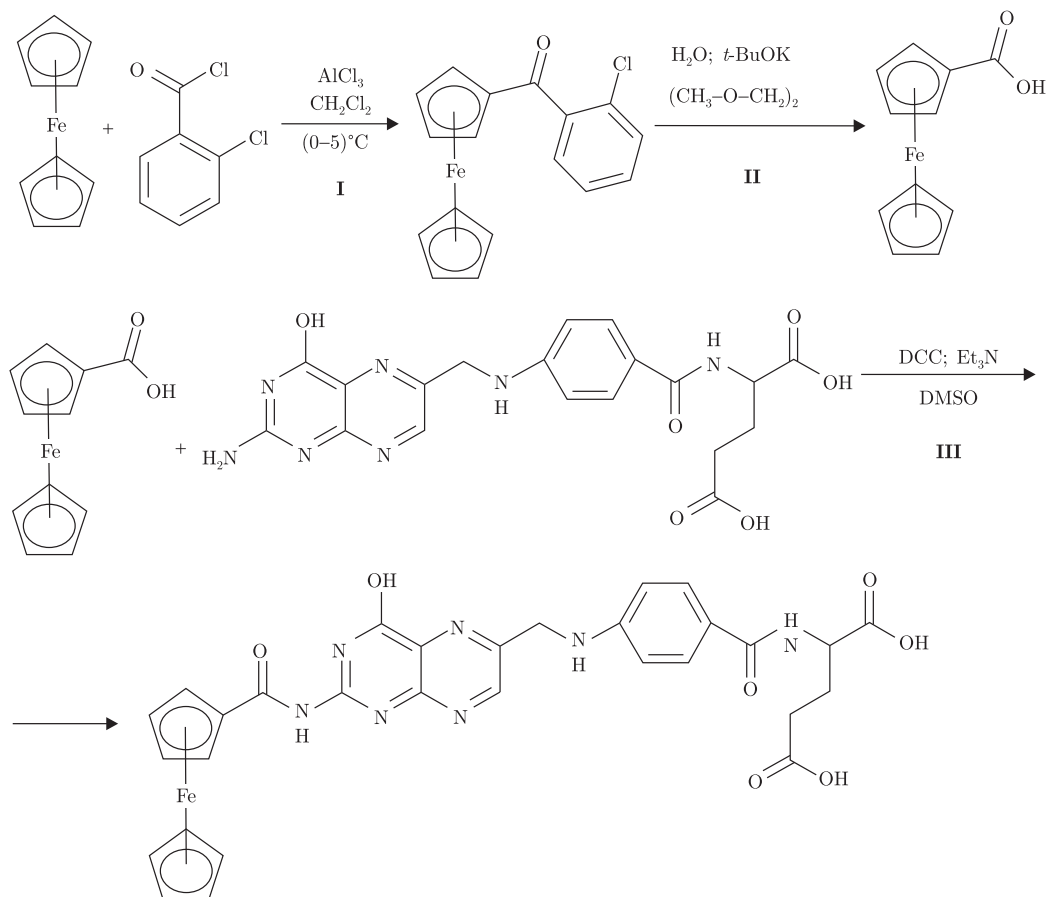


Схема 1. Синтез фолат-конъюгированного ферроцена

ФКФ был получен (выход продукта — 48,5%) в виде нерастворимых в воде коричневых кристаллов, которые и являлись материалом для исследования в тканевой культуре.

В зависимости от условий культивирования, состава питательной среды, эксплантируемого материала, возраста животных, выбранных для экспериментов, изменяются время прохождения основных фаз развития культуры клеток, а также характер формирования площадей зон роста. Поэтому в начале эксперимента были изучены и установлены общие закономерности роста и развития клеточных элементов подкожной клетчатки белых крыс для использования их в качестве контроля при различных воздействиях на данную культуру.

В качестве основного способа культивирования был использован метод эксплантации в сгустке плазмы (твердая фаза) во флаконах Карреля с добавлением питательной смеси (жидкая фаза). Эксплантируемым материалом служила подкожная клетчатка белых беспородных крыс обоего пола 3-месячного возраста [11]. Культуры инкубировали при 37°C . Смену жидкой фазы питательной среды проводили каждые 3 сут.

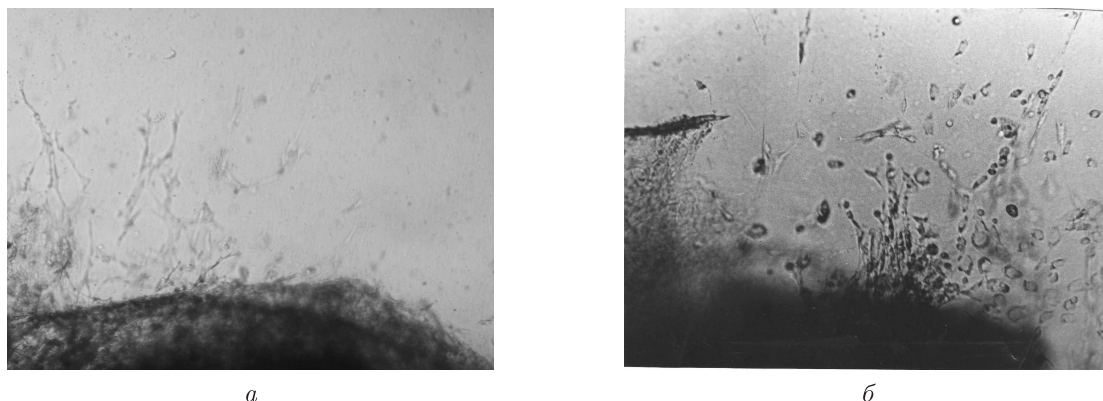


Рис. 1. Миграция фибробластических элементов на 3-и сутки культивирования в контроле (а) и при внесении в среду ФКФ (б). $\times 100$

Наблюдения за тканевыми культурами показали, что в большинстве случаев латентный период (время, необходимое для адаптации эксплантата к условиям культивирования до начала миграции клеток) длился в среднем 2–2,5 сут. На 3-и сутки после эксплантации отмечалась миграция единичных фибробластических элементов, которые имели в основном веретенообразную форму и в некоторых участках формировали тяжи, состоящие из 3–4 клеток (рис. 1, а). В этот период наблюдалась также довольно активная миграция в питательную среду единичных макрофагальных элементов, представленных более крупными, чем фибробласты, клетками неправильной, нередко полигональной формы. Некоторые из них смещались на более значительное расстояние от эксплантата, остальные располагались близко к нему. Как правило, рост фибробластов и миграция гистиоцитарных элементов происходили примерно с одинаковой интенсивностью по всему периметру эксплантата. Однако в некоторых случаях рост клеточных элементов наблюдался только с одной стороны кусочка культивируемой ткани. Иногда рост клеток вокруг эксплантата не обнаруживался на протяжении всего периода инкубации культур.

На 5-е сутки вокруг эксплантатов отмечалось разделение зон роста на две части: компактную и сетевидную. Компактная зона состояла из клеток веретенообразной и полигональной формы, плотно прилегающих друг к другу. Здесь кроме фибробластических элементов встречались фибробластоподобные клетки более крупных размеров неправильной формы. За компактной зоной формировались пучки и тяжи клеток, располагающихся сетевидно. Здесь отмечалось значительное количество делящихся клеток (рис. 2, а).

На 7-е сутки зона роста отчетливо разделялась на три: компактную, сетевидную и зону единичных мигрирующих клеток. Строение первых двух к этому времени существенно не изменялось, лишь увеличивалось количество клеток. В отличие от предыдущего срока наибольшее количество делящихся клеток отмечено в третьей зоне.

На 10-е сутки после эксплантации во всех трех зонах обнаруживались признаки дегенеративных изменений как фибробластических элементов, так и фибробластоподобных клеток. Эти изменения проявлялись в виде усиленной вакуолизации из цитоплазмы, округления тел клеток с исчезновением отростков, в результате чего происходило разобщение клеток сетевидной зоны (рис. 3, а). Дегенеративные изменения были более выражены в компактной зоне.

На 14-е сутки популяция клеток вступала в стадию выраженной дегенерации, проявляющейся в резкой вакуолизации цитоплазмы и зернистом ее перерождении (рис. 4, а). Зна-

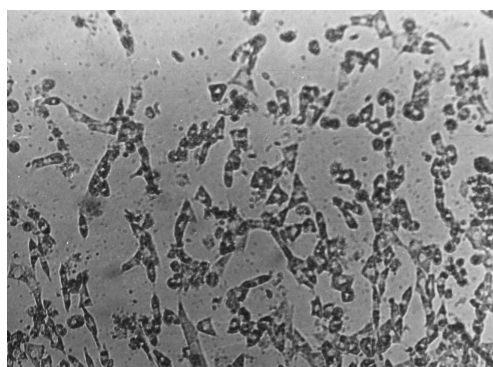


a

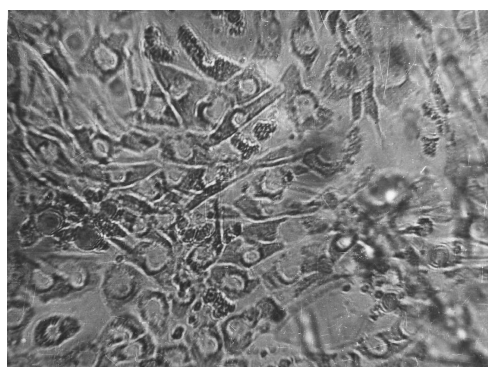


б

Рис. 2. Компактная и сетевидная зоны роста фибробластических элементов на 5-е сутки культивирования в контроле (*a*; $\times 100$) и тканеподобный рост клеток при внесении в среду ФКФ (*б*; $\times 100$)

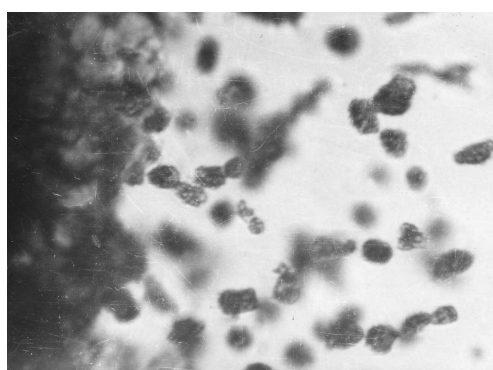


a

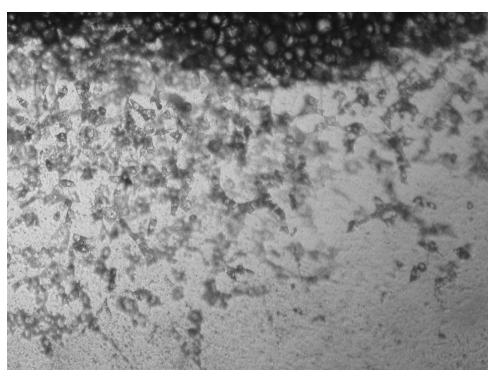


б

Рис. 3. Разобщение клеток сетевидной зоны роста фибробластических элементов на 10-е сутки в контроле (*a*; $\times 150$) и компактная зона роста фибробластоподобных клеток полигональной формы при внесении в среду культивирования ФКФ (*б*; $\times 200$)



a



б

Рис. 4. Зернистое перерождение цитоплазмы клеток на 14-е сутки в контроле (*a*; $\times 150$) и начало дегенеративных изменений в компактной зоне роста при внесении в среду ФКФ (*б*; $\times 100$)

чительно увеличилось также количество гистиоцитарных элементов, утративших обычную структуру. Кроме того, окончательно нарушилась архитектура компактной и сетевидной зон роста.

Представленные данные о характере роста и превращениях клеточных элементов подкожной соединительной ткани белых беспородных крыс в основном сходны с результатами, полученными другими исследователями при использовании других вариантов питательных сред, условий культивирования и животных различного возраста [12, 13].

ФКФ вносили в жидкую фазу культуральной среды при эксплантации в начале культивирования в количестве 0,1%. Наблюдения за тканевыми культурами с ФКФ показали, что миграция фибробластических элементов, так же как и в контроле, начиналась на 3-и сутки в виде тяжей и единичных клеток, расположенных в основании перпендикулярно к поверхности эксплантата. Следует отметить большую вариабельность клеточных форм от веретеновидных до полигональных и большее количество изолированно лежащих клеток полигональной формы в отдалении от эксплантата (см. рис. 1, б).

На 5–7-е сутки культивирования во флаконах Карреля, так же как и в контроле, формировались три зоны роста: компактная, сетевидная и зона единичных мигрирующих клеток. Следует отметить, что зоны роста клеток были значительно шире по сравнению с контролем. В сетевидной зоне в некоторых случаях появлялись участки роста клеток полигональной формы, плотно прилегающие друг к другу. Наблюдался так называемый тканеподобный рост (см. рис. 2, б). Зона роста единичных мигрирующих клеток была более обширной, чем в контроле, и отличалась большим разнообразием клеточных форм.

На 10-е сутки исследования дегенеративные изменения в компактной и сетевидной зонах роста клеток не обнаружены. Значительно увеличилась площадь тканеподобного роста клеток полигональной формы (см. рис. 3, б). Также расширилась зона роста единичных клеток.

На 14-е сутки культивирования зоны роста клеточных элементов во флаконах с ФКФ значительно отличалось от контрольных культур. Характерным было отсутствие выраженных дегенеративных изменений в виде вакуолизации и зернистого перерождения цитоплазмы фибробластических и гистиоцитарных элементов. Зоны роста были представлены широкими полями клеток полигональной формы, в основном макрофагальными элементами. Отмечалась зона роста единичных мигрирующих клеток в виде фибробластов веретеновидной формы.

На 21-е сутки в контроле наблюдалась полная дегенерация зон роста, в то же время в опытных флаконах только наступала фаза дегенерации в компактной зоне роста, наряду с продолжениями миграции фибробластических элементов в зоне роста единичных мигрирующих клеток (см. рис. 4, б).

Анализируя результаты исследования, можно сделать заключение о том, что ФКФ, внесенный в тканевую культуру, стимулирует рост фибробластических и гистиоцитарных элементов на всех этапах культивирования. На поздних этапах культивирования происходит значительный рост макрофагальных и гистиоцитарных элементов, что свидетельствует о биологической активности синтезированного соединения в условиях тканевой культуры. Таким образом, можно со всей определенностью утверждать, что ФКФ будет проявлять биологическую активность при использовании на целостном организме.

1. Ильницкий А. П. Некоторые вопросы тканевых культур в токсикологическом эксперименте // Гигиеническая оценка химических факторов внешней среды. – Москва, 1966. – С. 41–45.
2. Wemborg A., Hasselgren G., Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on Millipore filters // J. Biomed. Mater. Res. – 1979. – **13**, No 1. – P. 109–120.
3. Ekwall B. Screening of toxic compounds in tissue culture // Toxicology. – 1969. – **17**, No 12. – P. 127–142.

4. Галатенко Н. А., Кулеш Д. В., Пінчук В. Д., Нарожайко Л. Ф., Карпик Е. Н. Аналіз біосумісності силіконових ендопротезів методом культури тканин та за допомогою імплантаційного тесту // Доп. НАН України. – 2011. – № 12. – С. 132–137.
5. Кулеш Д. В., Зленко А. Б., Демченко І. Б., Галатенко Н. А. Аналіз кваліфікаційних випробувань гідрофільного гелю “Aquafilling” // Там само. – 2012. – № 7. – С. 153–157.
6. Галатенко Н. А., Кебуладзе І. М., Нарожайко Л. Ф. Изучение биосовместимости нового полиакриламидного геля “Ринапласт” // Пласт. та реконструкт. хірургія. – 2009. – № 2(13). – С. 49–54.
7. Moynard I. R., Heckman C. A., Pitlick N. A. et al. Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells // J. Clin. Invest. – 1975. – **55**, No 4. – P. 814–824.
8. Sisco R. L. Responses of epithelial-like cells in tissue culture to implant materials // J. Dental Research. – 1967. – No 46. – P. 248–252.
9. Имшенецкий А. А., Касатки И. Д., Солнцева Л. И. и др. Применение метода культуры тканей для определения токсичности фибролитических препаратов // Изв. АН СССР. – 1977. – № 4. – С. 36–38.
10. Rena S. D., Hughes R. S. Fibronectin-plasmamembrane interactions in the adhesion and speeding of hamster fibroblasts // Nature. – 1978. – **276**, No 5683. – P. 70–83.
11. Токсиколого-гігієнічні та доклінічні дослідження полімерних матеріалів і виробів на їх основі медичного призначення. Методичні вказівки. – Київ: Наук. думка. – 2009. – 98 с.
12. Культуры животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фрешни. – Москва: Мир, 1989. – 326 с.
13. Залкинд Р. Я., Юрская Г. Б. Проблемы дифференцировки и детерминации культивируемых вне организма клеток // Успехи соврем. биологии. – 1970. – № 4. – С. 85–106.
14. Макеєва Л., Гладир І., Рожнова Р., Демченко І. Синтез фолат-кон'югованих фероценів // IV наук.-техн. конф. “Поступ в нафтогазопереробній та нафтохімічній промисловості”: Зб. тез доповідей, Львів, 25–28 квітня 2012 р. – Львів, 2012. – С. 230.
15. Reeves P. C. Carboxylation of aromatic compounds: ferrocenecarboxylic acid // Org. Synth. – 1988. – **6**. – P. 625.

Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 09.07.2012

**І. Б. Демченко, Н. А. Галатенко, Л. В. Макеєва, Р. А. Рожнова,
Л. Ф. Нарожайко, І. І. Гладир**

Біологічна активність фолат-кон'югованого фероцену

Досліджено біологічну активність фолат-кон'югованого фероцену методом культури тканин. Встановлено, що фолат-кон'югований фероцен, введений до культури тканин, стимулює ріст фібробластичних і гістіоцитарних елементів на усіх етапах культивування.

**I. B. Demchenko, N. A. Galatenko, L. V. Makeieva, R. A. Roznova,
L. F. Narazhayko, I. I. Gladyr**

Bioactivity of folate-ferrocene conjugate

Bioactivity of folate-ferrocene conjugate is investigated by the tissue culture method. It is established that folate-ferrocene conjugate, which is introduced into tissue culture, stimulates the growth of fibroblastic and histiocytaric elements during all stages of the cultivation.