

ФРАКЦІОНУВАННЯ КЛІТИННИХ ПОПУЛЯЦІЙ СУПЕРПАРАМАГНІТНИМИ ЧАСТИНКАМИ ІЗ ЗАДАНИМИ ФУНКЦІОНАЛЬНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ПОВЕРХНІ

*М. Д. Луцик*¹

*Н. М. Бойко*¹

*Н. Є. Мітіна*²

*О. Ю. Ключівська*¹

*М. М. Луцик*³

*Т. Є. Константинова*⁴

*О. С. Заіченко*²

*Р. С. Стойка*¹

¹Інститут біології клітини НАН України, Львів

²Львівський національний політехнічний університет, Україна

³Львівський національний медичний університет

ім. Данила Галицького, Україна

⁴Донецький інститут фізики та інженерії ім. О. О. Галкіна, Україна

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Отримано 15.05.2013

Вивчено можливості застосування нових суперпарамагнітних частинок із біосумісною полімерною оболонкою і заданими функціональними властивостями для ідентифікації та ізолювання субпопуляцій специфічних клітин ссавців. Описано метод синтезу нанорозмірних частинок на основі заліза (III) оксиду (Fe_2O_3 , магеміт) та покриття їх полімерною оболонкою, що містить реакційноздатні олігопероксидні групи, придатні для іммобілізації лігандів. За допомогою суперпарамагнітних частинок з іммобілізованим на поверхні лектином арахісу — PNA — здійснено препаративне розділення популяції асцитних клітин лімфоми NK/Ly миші на PNA^+ і PNA^- субпопуляції. В експериментах іншого типу вивчено поглинання частинок, опсонізованих протеїнами сироватки крові ембріонів корів, культивованими мишачими макрофагами лінії J774.2. Фракцію «навантажених» частинками макрофагів ефективно відділяли від «вільних» клітин за допомогою магніту. Одержані суперпарамагнітні частинки із функціоналізованою поверхнею є зручним інструментом для фракціонування клітинних популяцій незалежно від способу взаємодії частинок із клітинами шляхом зв'язування з поверхнею клітин або поглинанням їх клітинами.

Ключові слова: суперпарамагнітні частинки, фракціонування клітин, лімфома NK/Ly, макрофаги J774.2

Нано- і мікророзмірні матеріали дедалі ширше застосовують у медицині та біотехнології як носії для адресного доставлення лікарських речовин або генів, флуоресцентні зонди для ідентифікації клітин, а також як засоби для фракціонування клітинних популяцій [1–5]. У зв'язку з цим актуальним є дослідження взаємодії різних типів клітин із біосумісними нано- і мікророзмірними матеріалами [6, 7].

На поверхні клітин ссавців містяться два основних типи молекулярних мішеней, здатних взаємодіяти з біофункціоналізованими композитами: 1) високоспецифічні протеїни і глікокон'югати, які слугують рецепторами у плазматичній мембрані клітини [8, 9]; 2) низькоспецифічні детермінанти ліпідів плазматичної мембрани, що експоновані на клітинній поверхні [10]. Синтезо-

вано низку композитів, переважно біфункціоналізовані наночастинки, придатні для ідентифікації клітин певного типу з метою їх ушкодження або знищення [11–13].

У роботі продемонстровано можливість розпізнавання та ізолювання специфічних типів клітин за допомогою нових біосумісних суперпарамагнітних частинок із заданими функціональними властивостями їхньої полімерної оболонки. Створені частинки застосовували з метою: 1) виявлення клітин певного типу в популяції клітин мишачої лімфоми NK/Ly (Nemeth-Kellner) із подальшим ізолюванням клітин цього типу як гомогенної субпопуляції; 2) оцінювання інтенсивності поглинання частинок макрофагами та ізолювання субпопуляції клітин, що активно фагоцитують. Суперпарамагнітні властивості цих частинок дають змогу легко

відділяти мічені частинками клітини за допомогою постійного магніту.

Матеріали і методи

Синтез суперпарамагнітних частинок.

У синтезі використовували такі реагенти: заліза(III) хлориду гексагідрат $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ і заліза(II) хлориду тетрагідрат $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (АВСР, Німеччина); 25% -й водний гідроксид амонію, 35% -й стабілізований водний пероксид водню, 1,4-діоксан (Acros Organics, США); гліцидилметакрилат (GMA, Fluka, Швейцарія, очищали вакуум-дистиляцією); 2-диметиламіноетил метакрилат (DMAEM), N-вініл-2-пірролідон (NVP, Merck, Німеччина, очищали вакуум-дистиляцією). Олігопероксидний модифікатор CPA-PVP-IBMB, структуру якого наведено на рис. 1, синтезували радикальною полімеризацією, як описано Horak et al. [14]. Речовина являє собою полі (N-вінілпірролідон) олігопероксид, який містить залишки 4-ціанопентанової кислоти (CPA) та 1-ізопропіл-3(4)-[1-(трет-бутилпероксид)-1-метилетил]бензолу (IBMB).

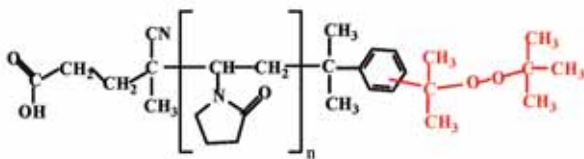
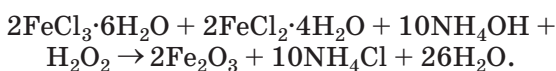


Рис. 1. Структура олігопероксидного модифікатора CPA-PVP-IBMB

Синтез суперпарамагнітного ядра частинок.

Суперпарамагнітним ядром слугували наночастинки магеміту (Fe_2O_3), які синтезували шляхом змішування розчинів солей Fe(II) і Fe(III) в присутності гідроксиду амонію згідно з реакцією [15]:



Молярне співвідношення $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ становило 2:3, гідроксид амонію у молярному надлишку для підтримання $\text{pH} > 11$. Водний розчин олігопероксидного модифікатора CPA-PVP-IBMB у кількості 1% щодо всієї водної фази вводили у реакцію разом із розчином аміаку. Процес проводили у тригорлій колбі з механічною мішалкою і зворотним холодильником за 90°C протягом 1,5 год. Після цього вносили 1M розчин HCl до нейтрального pH , утворений Fe_3O_4 оксидували до Fe_2O_3 10% -м розчином H_2O_2 . Синтезований магеміт ретельно промивали водою і зберігали у водній суспензії.

Синтез полімерної оболонки на суперпарамагнітних наночастинках магеміту проводили шляхом полімеризації суміші мономерів NVP і GMA, ініційованої наночастинками магеміту, що модифіковані CPA-PVP-IBMB. У реакційну колбу з механічною мішалкою вносили 70% -ну водну пасту частинок магеміту, модифікованих CPA-PVP-IBMB (вміст на частинках магеміту 3,9%), і суміш мономерів NVP і GMA (молярне співвідношення 7:3) у діоксані. Склад реакційної суміші: співвідношення магеміт/діоксан = 1:9, магеміт/суміш мономерів = 2:1. Полімеризацію здійснювали за 80°C упродовж 6 год, після чого частинки промивали діоксаном, водою і зберігали як водну суспензію за 4°C . Вміст приєднаного до частинки полімеру становив 10,8% (визначення проводили методом елементного аналізу), розмір елементарної частинки — 10,5 нм [за методами трансмісійної електронної мікроскопії (JEM200A, JEOL) і дифракції рентгенівських променів на приладі DRON-30 (CuK α -випромінювання)]. У суспензії елементарні частинки утворювали агрегати різного розміру.

В експериментах з клітинами використовували фракцію агрегатів розміром 1–2 мкм, яку одержували, обробляючи суспензію альбуміном сироватки крові бика з наступним диференціальним центрифугуванням. Для цього аліквоту суспензії частинок центрифугували при 2 000 g упродовж 10 хв, осад суспендували у двох об'ємах 5% -го розчину альбуміну бика (Miles Laboratories, США) в 0,01 M пірофосфаті натрію, $\text{pH} 9,0$, і витримували за 4°C 24 год, періодично перемішуючи. Частинки осаджували і двічі промивали забуференим ($\text{pH} 7,4$) фізрозчином (PBS) центрифугуванням при 2 000 g по 15 хв. Осад частинок суспендували в PBS до концентрації 2,5% із застосуванням гомогенізатора Поттера-Ельвеема і піддавали диференційному центрифугуванню. Збирали фракцію частинок, яку осаджували в інтервалі 500–2 000 g. Середній розмір частинок, за даними світлової мікроскопії, становив $1 \pm 0,5$ мкм, домішка більших агрегатів не перевищувала 5%.

Активування частинок для кон'югації з лігандами здійснювали розчином 2,5% -го глутарового альдегіду, $\text{pH} 7,4$, за кімнатної температури протягом 3 год. Після трикратного промивання PBS 50 мкл осаду частинок суспендували в 0,2 мл PBS, що містив 3 мг лектину арахісу (електрофоретично гомогенний лектин одержували за описаною методикою [16]), і суміш витримували 24 год

при 4 °С. Після цього частинки промивали фізрозчином, забуференим трис (TBS, 0,01 M трис, 0,15 M NaCl, рН 7,4), і зберігали у TBS із додатком 0,02 % азиду натрію. Перед вживанням частинки відмивали від азиду натрію розчином TBS або культуральним середовищем.

Використані в роботі клітини. Дослідження проводили з мишачими макрофагами лінії J774.2, одержаними з колекції Інституту ім. Вільяма Гарвея (Лондон, Англія). Клітини культивували в середовищі DMEM (Sigma, США) з 10% -ю сироваткою крові ембріонів корів (Sigma, США) у CO₂-інкубаторі при 5% CO₂ і вологості 100%. Клітини пересівали кожні 3 дні.

Клітини мишачої лімфоми NK/Ly одержували з асциту пухлини, яку підтримували на мишах лінії C57Bl внутрішньочеревною інюкуляцією 10⁷ пухлинних клітин на одну тварину. Штам пухлини отримали з колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України (Київ). Асцит забирали через 7–8 днів після інюкуляції пухлини, кількість клітин визначали в гемоцитометричній камері Горяєва. Роботу з тваринами (миші) проводили згідно з Європейською конвенцією захисту хребетних тварин (1987) і законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006).

Фракціонування популяції клітин NK/Ly проводили в середовищі TBS:асцитна рідина = 3:1 (концентрація протеїну в середовищі 4–6 мг/мл). До 2 мл суспензії клітин NK/Ly (1,5–2,0·10⁶/мл) у пеніциліновому флаконі додавали 10 мкл 20% -ї суспензії суперпарамагнітних частинок з іммобілізованим на поверхні лектином арахісу і витримували 15–20 хв за кімнатної температури. Флакон ставили на постійний магніт на 4–5 хв для осідання клітин з адсорбованими частинками, а також вільних частинок. Надосадову рідину акуратно відбирали, а притягнуті магнітом PNA⁺-клітини суспендували в 2 мл середовища і осаджували в магнітному полі. Процес переосадження повторювали тричі до відсутності клітин у надосадовій рідині. Клітини, які не адсорбували частинки (позначені як PNA⁻), збирали з об'єднаних надосадових рідин центрифугуванням при 1 500 об/хв упродовж 5 хв. Їх повторно піддавали дії постійного магнітного поля для видалення залишку клітин з адсорбованими частинками, після чого збирали з надосадової рідини центрифугуванням за зазначених вище умов. Гомогенність PNA⁺ і PNA⁻-субпопуляцій клітин визначали за зв'язуванням нативного лектину арахісу за допомо-

гою непрямого імуногістохімічного методу [17, 18]. Як другий імунореагент для виявлення зв'язаного з клітинами лектину арахісу застосовували анти-PNA-антитіла, мічені колоїдним золотом, які одержували імунізацією кроликів лектином арахісу на повному ад'юванті Фрейнда. Антитіла очищали афінною хроматографією на Т-гелі [19] і мітили колоїдним золотом за описаним методом [20]. Одержаний розчин мічених золотом антитіл зберігали при 4 °С як резервний (термін зберігання — до 1 року). З останнього готували *ex tempore* робочий розчин шляхом центрифугування 2 мл резервного розчину при 12 000 об/хв протягом 45 хв (центрифуга Jouan MR 1812) і розчинення осаду в 0,4 мл TBS із 0,02% полівінілпірролідону (20 кДа). Візуалізацію колоїдного золота під час світлової мікроскопії здійснювали методом фізичного проявлення ацетатом срібла [21]. Нижче наведено метод «забарвлення» клітин у суспензії лектином арахісу, як описано [18] у мікрomodифікації, яка полягала у проведенні всього процесу оброблення 0,5–1·10⁶ клітин в одній пробірці Еппендорф об'ємом 1,5 мл.

Клітини фіксували охолодженим розчином 0,2% -го глутарового альдегіду в PBS упродовж 20 хв, осаджували центрифугуванням протягом 2 хв за 1 500 об/хв і двічі промивали TBS. Суспензію клітин у TBS із додаванням 0,02% NaN₃ можна зберігати при 4 °С до трьох діб.

До 0,1 мл розчину лектину арахісу (концентрація 20 мкг/мл) у TBS із 1 mM CaCl₂ і MnCl₂ додавали 10 мкл 50% -ї суспензії фіксованих клітин і переносили суміш на внутрішню поверхню кришки пробірки Еппендорф. Пробірку закривали і закріплювали доверху дном у чашці Петрі (найпростіше фіксувати пробірку у такому положенні кулькою пластиліну).

Пробірки інкубували протягом 6–8 год при 4 °С, після чого клітини осаджували центрифугуванням за 1 500 об/хв упродовж 2 хв. Осад клітин промивали двічі по 0,2 мл холодним TBS, суспендували в 0,1 мл розчину колоїдного золота, сенсibilізованого антитілами до лектину арахісу, суспензію переносили у кришку пробірки Еппендорф та інкубували 40–50 хв при 4 °С, як зазначено вище. Клітини осаджували центрифугуванням, двічі промивали холодним TBS, суспендували у мінімальному об'ємі мишачої сироватки крові (можна застосовувати також сироватку крові бика) і готували мазки на предметних скельцях. Після процесу фізичного проявлення препаратів ацетатом срібла підраховували кількість клітин PNA⁺

і PNA⁻ на фотознімках кількох полів зору, відзнятих цифровою камерою Canon A-540.

Окремі зразки клітин PNA⁺, мічених суперпарамагнітними частинками, фіксували 2,5% -м глутаровим альдегідом, занурювали у смолу Епон 812 (Fluka, Швейцарія) і за допомогою ультрамікротома LKB (Швеція) виготовляли зрізи завтовшки 1,5 мкм. Зрізи забарвлювали сафраніном Т (Spofa, Чехія), як описано [22, 23] із невеликими змінами, а саме: на закріплені на предметному склі зрізи наносили краплю 0,5% -го розчину сафраніну Т в 0,01 М трис, витримували 15–30 хв (час встановлювали емпірично залежно від товщини зрізу), промивали водою, висушували і занурювали в кедрову олію.

Поглинання частинок макрофагами досліджували після опсонізації частинок протеїнами сироватки крові ембріонів корів шляхом інкубації протягом 24 год при 37 °С. Опсонізовані частинки вносили в культуру мишачих макрофагів лінії J774.2 до концентрації 0,25% і культивували в CO₂-термостаті протягом 24 год. Фракції клітин із поглинутими частинками й без них розділяли за допомогою постійного магніту (DynaI biotec). Обидві субпопуляції клітин досліджували методом фазовоконтрастної і флуоресцентної мікроскопії (флуорохромування акридиновим оранжевим, 0,3 мкг/мл, мікроскоп Люам Р-2, ЛОМО, Російська Федерація).

Результати та обговорення

Суспензія частинок, одержаних після завершення хімічного синтезу, виявляла виражену тенденцію до агрегації. Аби перешкодити такій агрегації та стабілізувати розміри агрегатів, а також для поліпшення біосумісності частинки обробляли бичачим сироватковим альбуміном або сироваткою крові ембріонів корів (за опсонізації). Без такої обробки фракціонування суспензії за розмірами частинок за допомогою диференційного центрифугування і виділення фракції частинок із розміром 1,5±0,5 мкм

було неможливим. Крім того, шар альбуміну на поверхні частинок після активування глутаровим альдегідом або іншими агентами можна використовувати для зв'язування бажаних лігандів: у нашому дослідженні таким способом на частинках іммобілізували лектин арахісу.

Раніше нами було виявлено гетерогенність асцитних клітин мишачої лімфоми NK/Ly за зв'язуванням лектинів — конканаваліну А, аглютинінів сочевиці, зародків пшениці та арахісу [17, 18]. У даній роботі показано можливість фракціонування популяції цих лімфомних клітин за допомогою суперпарамагнітних частинок, поверхня яких функціоналізована лектином арахісу. На рис. 2 наведено приклади цитологічних препаратів початкової популяції клітин NK/Ly та одержаних субпопуляцій клітин PNA⁺ і PNA⁻ після імуноцитохімічного забарвлення лектином арахісу. Підрахувавши типи клітин на препаратах, встановили, що в початковій популяції містилося 30,2±1,6% клітин PNA⁺ ($n = 4$), після фракціонування у субпопуляції, яка адсорбувала частинки, виявлено 92,4±0,9% клітин PNA⁺ ($n = 4$), а в субпопуляції, що не адсорбувала частинки, містилось 94,0±1,2% клітин PNA⁻ ($n = 4$). Адсорбцію суперпарамагнітних частинок, сенсibilізованих цим лектином, можна чітко виявити на поверхні клітин PNA⁺ у напівтонких зрізах (рис. 3).

У наступній серії дослідів вивчали можливість фракціонування макрофагів за їхньою здатністю до поглинання частинок за умов культури клітин. На рис. 4 подано приклад поглинання опсонізованих частинок мишачими макрофагами лінії J774.2, у яких добре виявляється функція фагоцитозу. Під мікроскопом чітко видно, що частинки містяться як на поверхні, так і всередині цих клітин. Максимум поглинання спостерігали під час інкубації протягом 24 год, при цьому основна маса клітин містила поглинуті частинки. За допомогою постійного магніту вдається ефективно відділити навантажені частинками макрофаги від вільних (рис. 4, в, г).

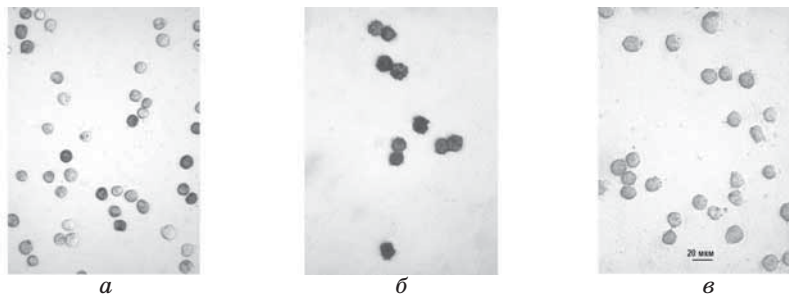


Рис. 2. Цитологічна картина асцитних клітин мишачої лімфоми NK/Ly, фракціонованих за допомогою суперпарамагнітних частинок з іммобілізованим лектином арахісу (PNA): а — початкова популяція клітин; б — субпопуляція клітин PNA⁺; в — субпопуляція клітин PNA⁻

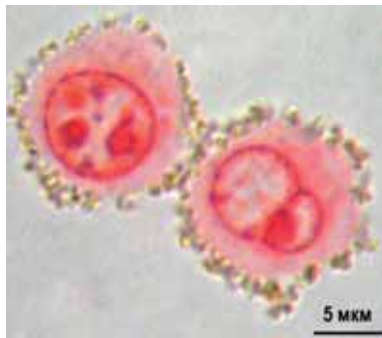


Рис. 3. Напівтонкий зріз (1,5 мкм) клітин PNA⁺ з адсорбованими на їхній поверхні частинками, функціоналізованими лектином арахісу. Забарвлення сафраніном Т

Отже, ми дослідили 2 аспекти застосування нових суперпарамагнітних мікрочастинок: 1) для фракціонування популяції клітин лімфоми NK/Ly за допомогою частинок із поверхнею, функціоналізованою лектином арахісу; 2) для визначення поглинальної активності культивованих мишачих макрофагів лінії J774.2 та ізолювання клітин, що активно фагоцитують.

У першому варіанті було виявлено, що за допомогою сенсibilізованих лектином арахісу частинок можна швидко одержати субпопуляцію PNA⁺-клітин із високим ступенем чистоти — 92,4±0,9% клітин PNA⁺ в очищеній субпопуляції проти 30,2±1,6% цих клітин у початковій суспензії. Дослідження клітин PNA⁺ становить інтерес, оскільки кількість їх в асцитній рідині зростає зі «старінням» пухлини, а також у популяції клітин гігантських розмірів, які виникають під впливом протипухлинних хіміопрепаратів вінбластину й доксорубіцину. Ми припускаємо, що клітини PNA⁺ є uszkodженою або деградованою формою цих лімфомних клітин,

на поверхні яких експоновано вуглеводну детермінанту Galβ1→3GalNAcα1→OSer(Thr) Protein (антиген TF), що утворюється у процесі десілування мембранних O-гліканів [24]. Наші подальші дослідження спрямовано на вивчення біологічних властивостей субпопуляцій клітин PNA⁺ і PNA⁻, зокрема ступеня їхньої злоякісності.

В експериментах другого типу продемонстровано можливість застосування суперпарамагнітних частинок як об'єкта поглинання для клітин, здатних до фагоцитозу. Для цього ми використали мишачі макрофаги лінії J774.2 з високою здатністю до поглинання об'єктів із позаклітинного середовища. Імовірно, синтезовані частинки можуть бути використані для оцінювання функціонального стану поліморфонуклеарних клітин крові, які забезпечують рівень неспецифічного імунітету. Магнітні властивості поглинутих частинок дають змогу одержати додаткову інформацію про стан клітин, що фагоцитують, застосувавши для цього методи магнітного резонансу [25]. Не виключено, що накладанням відповідно орієнтованого магнітного поля можна спрямувати міграцію макрофагів, навантажених суперпарамагнітними частинками, до місць uszkodження тканин, наприклад атеросклеротичних бляшок [25], вогнищ запалення тощо.

Варто також зазначити, що синтезовані нами суперпарамагнітні частинки характеризуються задовільною біосумісністю, не виявляють цитотоксичної дії щодо макрофагів і не спричиняють їх загибелі під час культивування *in vitro* упродовж 24 год. Це зумовлено відсутністю агресивних хімічних груп у полімерній оболонці частинок, а також присутністю на їхній поверхні протеїнів сироватки крові або нетоксичного лектину.

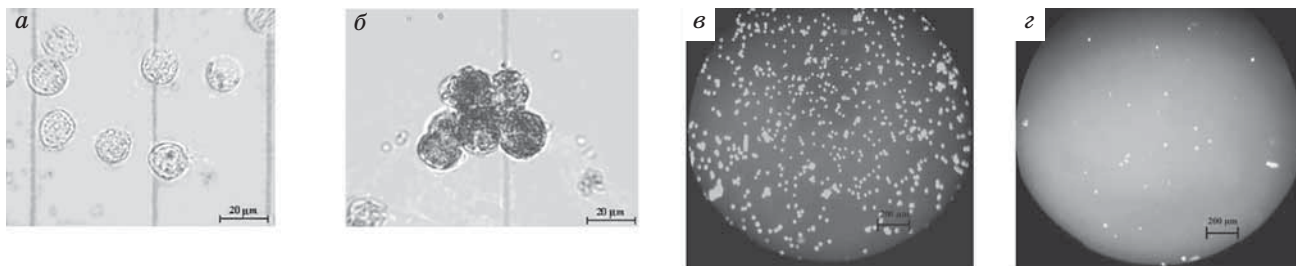


Рис. 4. Поглинання частинок, опсонізованих сироваткою крові ембріонів корів, культивованими клітинами макрофагів J774.2 та ізолювання клітин, що поглинули частинки, за допомогою магніту: а — інтактні макрофаги, контроль; б — макрофаги після інкубації з опсонізованими частинками; в — виділені за допомогою магніту макрофаги з поглинутими частинками; г — вільні від частинок макрофаги, які залишились у середовищі після виділення магнітом; в, г — флуоресцентна мікроскопія, флуорохромування акридиновим оранжевим

REFERENCES

1. *Lakhtin V. M., Afanasyev S. S., Lakhtin M. V.* Nanotechnologies and perspectives of their employment in medicine and biology. *Vestnik Ross. Akad. Med. Nauk.* 2008, N 4, P. 50–55. (In Russian).
2. *Galkin O. Yu., Bondarenko L. V., Grishyna A. S., Dugan O. M.* Directed drug delivery systems. Biotechnological aspects. *Biotechnologiya.* 2009, 2(1), 46–58. (In Ukrainian).
3. *Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T.* Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 2005, V. 100, 1–11.
4. *Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R.* Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol. Res.* 2010, V. 62, P. 144–149.
5. *Šponarová D., Horák D., Trchová M., Jendelova P., Herynek V., Mitina N., Zaichenko A.* The use of oligoperoxide-coated magnetic nanoparticles to label stem cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2011, V. 7. P. 384–394.
6. *Durniev A. D.* Toxicology of nanoparticles. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008, 145(1), 78–80. (In Russian).
7. *Didenko M. M., Stezhka V. A.* Effect of nanoparticles of amorphous highly dispersed SiO₂ on morphological structure of the rat's inner parts. *Biotechnologiya.* 2009, 2(1), 80–87. (In Russian).
8. *Solis D., Jimenez-Barbero J., Kaltner H., Romero A., Siebert H.-C.* Towards defining the role of glycans as hardware in information storage and transfer: basic principles, experimental approaches and recent progress. *Cel. Tissu. Org.* 2001, V. 168. P.5–23.
9. *Rudd P. M., Elliott T., Cresswell P., Wilson I., Dwek R.* Glycosylation and the immune system. *Science.* 2001, V. 291. P.2370–2376.
10. *Van Engeland M., Nieland L. J., Ramaekers F. C., Schutte B., Reutelingsperger C. P.* Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 1998, V. 31, P. 1–9.
11. *Pan X., Lee R. J.* Tumour-selective drug delivery via folate receptor-targeted liposomes. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2004, V. 1, P. 7–17.
12. *Xie Y., Bagby T. R., Cohen M., Forrest M. L.* Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009, V. 6, P. 785–792.
13. *Ningthoujam R. S., Vatsa R. K., Kumar A., Pandey B. N.* Functionalized magnetic nanoparticles: concepts, synthesis and application in cancer hyperthermia. *Funct. Mat. (Elsevier).* 2012, V. 6, P. 229–260.
14. *Horák D., Shagotova T., Mitina N., Trchová M., Boiko N., Babic M., Stoika R., Kovarova M.* Surface-initiated polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate from heterotelechelic oligoperoxide-coated γ -Fe₂O₃ nanoparticles and their engulfment by mammalian cells. *Chem. Mat.* 2011, V. 23, P. 2637–2649.
15. *Galicía J. A., Sandre O., Cousin F., Guemghar D., Menager C., Cabuil V.* Designing magnetic composite materials using aqueous magnetic fluids. *J. Phys. Condens. Mat.* 2003, V. 15, P. 1379–1402.
16. *Khomutovsky O. A., Lutsik M. D., Perederey O. F.* Electron histochemistry of cell membrane receptors. *Kyiv: Naukova dumka.* 1986, P. 25–26. (In Russian).
17. *Lutsyk M. M., Yashchenko A. M.* Characterization of carbohydrate determinants on the surface of murine lymphoma NK/Ly cells with the aid of native lectin binding and subsequent detection by indirect immunocytochemical method. *Biologiya Tvarin.* 2010, 12(1), 94–99. (In Ukrainian).
18. *Lutsyk M. M., Yashchenko A. M., Kovalishin V. I., Pridatko O. E., Stoika R. S., Lutsik M. D.* Heterogeneity of the population of lymphoma NK/Ly and leukemia L-1210 cells according to the carbohydrate structure of cell surfaces: immunocytochemical analysis of lectin binding. *Cytology and Genetics.* 2011, 45(2), 65–69.
19. *Hutchens T. W., Porath J.* Thiophilic adsorption of immunoglobulins — analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. *Anal. Biochem.* 1986, V. 159, P. 217–226.
20. *Geoghegan W., Ackerman A.* Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, WGA and goat anti-human immunoglobulin G on cell surface at the electron-microscopic level. *J. Histochem. Cytochem.* 1977, V. 25, P. 1187–1200.
21. *Hacker G. W., Grimelius L., Danscher G., Bernatzky G., Muss W., Adam H., Thurner J.* Silver acetate autometallography: an alternative enhancement technique for immunogold-silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues. *J. Histotechnol.* 1988, V. 11, P. 213–221.
22. *Weakly B.* Beginner's handbook in biological electron microscopy. *Moskwa: Mir.* 1975, 298 p. (In Russian).
23. *Paltsyn A. A., Konstantinova N. B.* A method for staining of semithin sections of the brain. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. 147(5), 598–600. (In Russian).
24. *Goldstein I., Hayes C.* The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem.* 1978, V. 35, P. 128–340.
25. *Tu C., Ng T. S., Sohi H. K., Palko H. A., House A., Jacobs R. E., Louie A. Y.* Receptor-targeted iron oxide nanoparticles for molecular MR imaging of inflamed atherosclerotic plaques. *Biomaterials.* 2011, V. 32, P. 7209–7016.

**ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ
КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
СУПЕРПАРАМАГНИТНЫМИ ЧАСТИЦАМИ
С ЗАДАНЫМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ
СВОЙСТВАМИ ПОВЕРХНОСТИ**

*М. Д. Луцук¹
Н. Н. Бойко¹
Н. Е. Митина²
О. Ю. Ключивская¹
М. М. Луцук³
Т. Е. Константинова⁴
А. С. Заиченко²
Р. С. Стойка¹*

¹Институт биологии клетки НАН Украины,
Львов

²Львовский национальный политехнический
университет, Украина

³Львовский национальный медицинский
университет им. Данила Галицкого, Украина

⁴Донецкий институт физики и инженерии
им. А. А. Галкина, Украина

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Изучены возможности применения новых суперпарамагнитных частиц с биосовместимой полимерной оболочкой и заданными функциональными свойствами для идентификации и изолирования субпопуляций специфических клеток млекопитающих. Описан метод синтеза наноразмерных частиц на основе железа (III) оксида (Fe_2O_3 , магемит), покрытых полимерной оболочкой с реакционноспособными олигопероксидными группами, пригодными для иммобилизации лигандов.

С помощью суперпарамагнитных частиц с иммобилизованным лектином арахиса — PNA — проведено препаративное разделение популяции асцитных клеток мышшиной лимфомы НК/Ly на субпопуляции клеток PNA^+ и PNA^- .

В исследованиях другого типа изучали поглощение частиц, опсонизированных протеинами сыворотки крови эмбрионов коров, культивируемыми мышшиными макрофагами линии J774.2. Фракцию «нагруженных» частицами макрофагов эффективно отделяли от «свободных» клеток с помощью магнита. Полученные суперпарамагнитные частицы с функционализированной поверхностью представляют собой удобный инструмент для фракционирования клеточных популяций независимо от способа взаимодействия частиц с клетками путем связывания с поверхностью плазматической мембраны или поглощения клетками.

Ключевые слова: суперпарамагнитные частицы, фракционирование клеток, лимфома НК/Ly, макрофаги J774.2.

**SEPARATION OF CELL POPULATIONS
BY SUPER-PARAMAGNETIC PARTICLES
WITH CONTROLLED SURFACE
FUNCTIONALITY**

*M. D. Lootsik¹
N. M. Boiko¹
N. E. Mitina²
O. Yu. Klyuchivska¹
M. M. Lutsyk³
T. E. Konstantinova⁴
A. S. Zaichenko²
R. S. Stoika¹*

¹Institute of Cell Biology of National Academy
of Sciences of Ukraine, Lviv

²Lviv National Polytechnic University, Ukraine

³Danylo Halytsky National Medical University,
Lviv, Ukraine

⁴Galkin Institute of Physics and Engineering
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Donetsk

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

The recognition and isolation of specific mammalian cells by the biocompatible polymer coated super-paramagnetic particles with determined surface functionality were studied. The method of synthesis of nanoscaled particles on a core of iron III oxide (Fe_2O_3 , magemit) coated with a polymer shell containing reactive oligoperoxide groups for attachment of ligands is described.

By using the developed superparamagnetic particles functionalized with peanut agglutinin (PNA) we have separated the sub-populations of PNA^+ and PNA^- cells from ascites of murine Nemeth-Kellner lymphoma.

In another type of experiment, the particles were opsonized with proteins of the fetal calf serum that improved biocompatibility of the particles and their ingestion by cultivated murine macrophages J774.2. Macrophages loaded with the particles were efficiently separated from the particles free cells by using the magnet. Thus, the developed surface functionalized super-paramagnetic particles showed to be a versatile tool for cell separation independent on the mode of particles' binding with cell surface or their engulfment by the targeted cells.

Key words: super-paramagnetic particles, cell selection, NK/Ly lymphoma, macrophages J774.2.