

ОЦІНКА ЦИТО- ТА ГЕНОТОКСИЧНОЇ ДІЇ НАНОФЕРОМАГНЕТИКА ТА ПОСТІЙНОГО МАГНІТНОГО ПОЛЯ В СИСТЕМІ *IN VIVO*

Проведено порівняльне дослідження цито- та генотоксичних ефектів дії різних концентрацій наночастинок феромагнетика (ФМ), постійного магнітного поля (ПМП) та їхнього поєднаного впливу через певні часові інтервали на клітини асцитної карциноми Ерліха, клітини еритроїдного ряду кісткового мозку і лімфоцити периферичної крові. Мікроядерний тест та метод «ДНК-комет» використано як маркери генотоксичного впливу. Встановлено, що межею незначно вираженої зміни цитоархітектоніки клітин асцитної карциноми Ерліха під впливом ФМ є концентрація 3 мг/кг. Із зростанням концентрації ФМ у пухлинних клітинах з'являються виражені ознаки блеббінгу цитоплазматичної мембрани, збільшується кількість мікроядер та «% ДНК у хвості комет» в клітинах асцитної карциноми Ерліха, клітинах кісткового мозку та лімфоцитах периферичної крові. Показано, що магнітне поле як самостійний чинник не спричиняє цито- та генотоксичні ефекти на досліджені клітини. При поєднаній дії ПМП з ФМ спостерігається феномен індукції наночастинок ФМ дії ПМП, що проявляється у зростанні сумарного впливу цих чинників на клітини. Мікроядерний тест та метод «ДНК-комет» можуть бути використані для визначення стабільності геному як пухлинних клітин, так і соматичних немалігнізованих при тестуванні генотоксичного впливу наноматеріалів при створенні векторних наносистем. Зазначено, що більшу чутливість щодо оцінки генотоксичної дії досліджених чинників має метод «ДНК-комет».

Вступ. Численні недоліки медикаментозної терапії онкологічних хворих, а саме неспецифічність та токсичність дії більшості препаратів на життєво важливі органи та системи організму, а також природна та набута резистентність пухлин до протипухлинних засобів потребують пошуків новітніх підходів для вирішення цих важливих проблем. Одним з них є застосування в клінічній практиці останніх здобутків нанотехнологій [1–4].

Встановлено, що завдяки конструюванню наночастинок з новими заданими фізико-хімічними властивостями можна прогнозувати певні процеси, які відбуватимуться у клітинах під їхнім впливом. Створення наноконструктивів на основі наночастинок феромагнетиків (ФМ) та біополімерів на прикладі ліпосом показало досить низьку токсичність і можливість цілеспрямованого транспорту таких комплексів до певної мішені [3]. Значну роль у спрямованому та керованому русі ФМ відводять застосуванню зовнішнього постійного магнітного поля (ПМП). Саме створення такої векторної системи керованої доставки ліків до пухлинних клітин з мінімальною токсичністю для всього організму і вивчення її дії в системах *in vitro* та *in vivo* слід вважати найважливішим завданням фундаментальних досліджень.

Відомо, що мішенями для ФМ та ПМП є макромолекули (ДНК, РНК, білки), біологічні мембрани і системи окислення – відновлення, проте невирішеним залишається питання комбінованого впливу зазначених чинників на ці системи [5, 6]. Дані сучасних досліджень свідчать, що ФМ можуть викликати запальні процеси та характеризуються нейро-, кардіо- та гепатотоксичністю, але досі не з'ясований можливий ризик гено- та цитотоксичності ФМ на організм людини [5–7]. Відсутність єдиної системи оцінки гено- та цитотоксичності ФМ на організм і низька інформативність існуючих відомостей потребують проведення ґрунтовних експериментальних досліджень щодо визначення його наслідків та всебічного аналізу отриманих результатів. Дані літератури свідчать, що класичним методом визначення генотоксичного впливу шкідливих чинників на живі організми є мікроядерний тест, а в останні роки широко визнаним став ще метод гель-електрофорезу ізольованих клітин («ДНК-комет») [8, 9].

Метою нашої роботи було оцінити цито- і генотоксичні наслідки дії ФМ, ПМП та комбінованого застосування їх в системі *in vivo*.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були нелінійні білі миші: інтактні та з перещепленою асцитною карциномою Ерліха (АКЕ) із розрахунку $2 \cdot 10^6$ клітин на тварину. Мишам з АКЕ та інтактним тваринам через 7 діб після перещеплення пухлини внутрішньочеревно вводили наночастинки ФМ, стабілізовані біологічно активними сурфактантами та полімерами, розміром 80–100 нм [10], які синтезовані спільно із співробітниками Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України (патент № 99211).

В залежності від вирішуваних задач у дослідженнях використовували такі концентрації ФМ: 0,5; 1,5; 3,0; 6,0 та 10 мг/кг. Оцінку генотоксичного ефекту ФМ, ПМП та їхньої комбінованої дії здійснювали на клітинах АКЕ, клітинах еритроїдного ряду кісткового мозку (КМ), лімфоцитах периферичної крові через 1, 24 та 48 год.

Враховуючи характер впливу застосованих чинників, мишей розподілили на чотири групи: 1) контрольна; 2) тварини, які отримували ФМ внутрішньочеревно; 3) миші, які впродовж 1 год зазнали дії ПМП з індукцією 150 мТл; 4) група тварин, які піддавались комбінованому впливу ПМП та ФМ. ПМП створювали за допомогою системи з двох постійних магнітів, розробленої співробітниками Інституту електродинаміки НАН України. Мишей забивали шляхом декапітації із дотриманням всіх норм біоетики щодо поводження з експериментальними тваринами.

Мікроядерний тест на клітинах АКЕ. Суспензію клітин АКЕ наносили на знежирені предметні скельця у вигляді крапель, декілька хвилин витримували на повітрі та фіксували у метанолі протягом 2 хв. Для визначення морфологічних особливостей пухлинних клітин цитологічні препарати фарбували за методом Гімза (5%-ний розчин азур-еозину у H_2O) 8 хв. Оцінювання кількості мікроядер (МЯ) проводили на препаратах, пофарбованих акридиновим жовтогарячим (3,0 мг/мл на фосфатному буфері, рН 6,4–6,5) із розрахунку на 1000 клітин АКЕ за допомогою світлового мікроскопа (40×10).

Умови визначення мікроядерного тесту на клітинах КМ. Зразки КМ отримували із стегнової кістки мишей і готували суспензію у середовищі RPMI. Після цього визначали концентрацію клітин і робили мазки. Цитологічні препарати підсушували при кімнатній температурі, фіксували у метанолі 2 хв і фарбували акридиновим жовтогарячим (12,5 мг/мл фосфатного буфера, рН 6,4...6,5) впродовж 1 хв. Ідентифікацію клітин КМ за морфологією проводили згідно з методом Hayashi [8, 9].

Досліджували клітини еритроїдного ряду КМ тварин – нормохроматофільні (НХЕ) та поліхроматофільні еритроцити (ПХЕ). Це обумовлено тим, що згідно з даними сучасної літератури МЯ краще визначати у клітинах без ядра, а саме у молодих ПХЕ та зрілих НХЕ [11]. У ряді повідомлень акцентовано увагу на певній складності в оцінці МЯ у клітинах еритроїдного ряду, яка пов'язана зі специфікою дозрівання цих клітин, а саме «видаленням» ядра з еритробласту, затримкою певних фрагментів ядра з подальшою їх елімінацією [12]. Саме тому при застосуванні МЯ пропонують досліджувати ПХЕ [13]. Ми скористалися визначенням мікроядерного тесту лише у клітинах КМ, оскільки за оцінками деяких авторів дослідження кількості МЯ та співвідношення ПХЕ та НХЕ у периферичній крові, на відміну від КМ, має ряд недоліків: низький вміст ПХЕ та можливість елімінації МЯ у НХЕ [13, 14]. Підрахунки МЯ проводили на флуоресцентному мікроскопі Micros MC-300 при загальному збільшенні приладу ×400 шляхом визначення кількості клітин з МЯ серед 1000 ПХЕ. Разом з цим оцінювали співвідношення ПХЕ та НХЕ як показника цитотоксичного ефекту (із розрахунку на 2000 клітин). ПХЕ згідно з методикою із застосуванням акридинового жовтогарячого мали помаранчеве забарвлення, НХЕ – зелене, а МЯ – яскраво-жовте. Слід зазначити, що МЯ, які виявлялись у НХЕ, були забарвлені у світло-зелений колір.

Метод лужного гелі-електрофорезу одиничних клітин («метод ДНК-комет»). Паралельно із застосуванням мікроядерного тесту генотоксичний ефект досліджених чинників вивчали за допомогою методу гелі-електрофорезу ізольованих клітин («ДНК-комет»), який за да-

ними літератури позначається як «% ДНК у хвості комет», на клітинах АКЕ та лімфоцитах периферичної крові піддослідних тварин. Для виділення лімфоцитів застосовували центрифугування у суміші фікол/урографін. Отриману суспензію клітин у 1%-ній легкоплавкій агарозі («Sigma», США) в концентрації $2 \cdot 10^6$ /мл наносили на предметні скельця з попередньо нанесеним шаром тугоплавкої агарози («Sigma», США). Після цього проводився лізис клітин впродовж 1 год та 20-хвилинна інкубація їх у буфері для лужного електрофорезу [15]. Горизонтальний електрофорез здійснювали протягом 30 хв (різниця потенціалів 24 В, сила струму 300 мА). Після цього клітини інкубували у нейтралізуючому буфері (Tris-HCl 0,2 М, рН 7,5), відмивали дистиллятом і фарбували флуоресцентним барвником SYBR Green («Sigma», США) [10].

Аналіз отриманих зображень здійснювали за допомогою програми CometScore. Значущість відмінностей між показниками різних груп оцінювали з використанням t-критерію Ст'юдента, відмінності вважали значущими при $p < 0,05$.

Статистичну обробку проводили за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6.0.

Результати досліджень та їх обговорення. Тестування цито- та генотоксичного впливу різних концентрацій ФМ на клітинах АКЕ та КМ із використанням МЯ-тесту. Першим етапом цього фрагменту досліджень було визначення на пухлинних клітинах тварин з АКЕ тієї мінімальної концентрації ФМ, за якої вже

спостерігається цитотоксичний ефект. Така передумова пов'язана з тим, що за даними літератури феромагнітні речовини мають властивість впливати на біологічні об'єкти навіть без поєднання їх дії з цитостатиком. Калібровка застосованих концентрацій ФМ розподілялась наступним чином: 0,5; 1,5; 3,0; 6,0 та 10 мг/кг маси тіла тварини (табл. 1). Наслідки дії цих чинників оцінювали через 24 та 48 год за допомогою світлової мікроскопії на препаратах, пофарбованих за методом Гімза, та за даними МЯ-тесту, отриманими при люмінесцентній мікроскопії. Результати цитоморфологічних досліджень представлені на рис. 1.

Аналіз особливостей цитоморфології пухлинних клітин АКЕ після дії зазначених концентрацій ФМ показав, що цитоархітектоніка клітин при інкубації їх з ФМ у концентрації 0,5 та 1,5 мг/кг не має істотних відмінностей від контролю.

За оцінкою впливу ФМ на генотоксичність у концентрації 0,5 та 1,5 мг/кг при тривалості дії 24 та 48 год встановлено, що цей чинник у вказаних концентраціях не спричиняє такої дії на пухлинні клітини незалежно від часу контакту з ними.

Лише при концентрації ФМ 3 мг/кг через 24 год і більшою мірою – через 48 год у пухлинних клітинах визначено прояви помірного цитотоксичного ефекту, якій полягав у зміні конфігурації цитоплазматичної мембрани. Остання набувала фестончатого вигляду, у незначній кількості клітин популяції через 24 год визначались ознаки формування блебінгу мембрани, а через 48 год в частині клітин зазначений феномен вже чітко простежувався. Разом з цим ФМ при даній концентрації викликав незначне зростання кількості МЯ, яке спостерігалось лише через 48 год порівняно з контролем, що свідчить про збільшення генотоксичного ефекту ФМ з подовженням часової експозиції (табл. 1). При концентрації 6 мг/кг, а особливо 10 мг/кг вплив цього агента позначався не лише на змінах з боку цитоплазми, але і ядер пухлинних клітин, що підтвердилось і набуло більшої інформативності при застосуванні цитогенетичних методів дослідження. Встановлено, що ФМ у концентраціях 6 та 10 мг/кг викликав значне зростання кількості МЯ у пухлинних клітинах тварин з

Таблиця 1
Кількісна оцінка МЯ (%) у пухлинних клітинах АКЕ після дії різних концентрацій ФМ

Концентрація ФМ, мг/кг	Час експозиції	
	24 год	48 год
Контроль	2,2 ± 0,25	2,0 ± 0,01
0,5	2,0 ± 0,66	2,0 ± 0,66
1,5	1,33 ± 0,33	2,0 ± 0,60
3	2,2 ± 0,25	3,6 ± 0,33
6	6,0 ± 0,01 *	6,0 ± 0,01 *
10	5,4 ± 0,33 *	6,5 ± 0,33 *

* $p < 0,05$ – достовірні зміни відносно значень контролю.

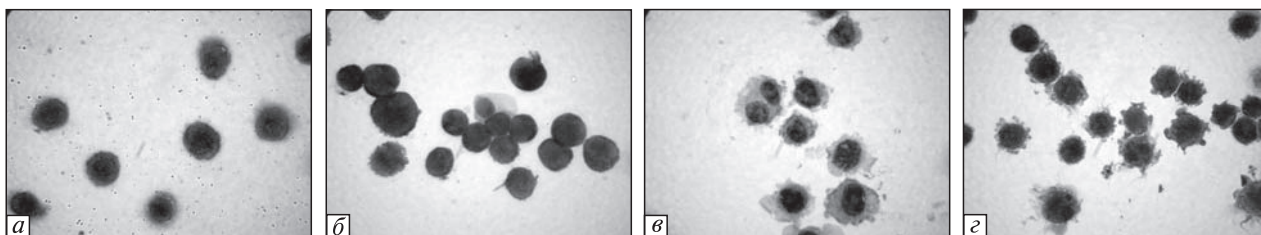


Рис. 1. Зміни цитоархітектоніки клітин АКЕ під впливом різних концентрацій ФМ: *a* – контроль, клітини АКЕ через 48 год культивування мають округлу форму, чітко окреслену цитоплазматичну мембрану та компактне розташування гетерохроматину в ядрах; *b* – клітини АКЕ після дії ФМ у концентрації 1,5 мг/кг протягом 48 год не відрізняються від контролю; *v* – зміна конфігурації цитоплазматичної мембрани клітин АКЕ після 48-годинної дії ФМ у концентрації 3 мг/кг; *z* – клітини АКЕ через 48 год культивування в середовищі з ФМ у концентрації 10 мг/кг характеризуються явищами блебінгу цитоплазматичної мембрани та вираженими змінами текстури хроматину, зокрема різними проявами його фрагментації. Забарвлення за Гімза. Масл. імерс. $\times 1000$

АКЕ, яке практично не змінювалось із подовженням часової експозиції. Морфологічні особливості МЯ клітин тварин з АКЕ після фарбування акридиновим жовтогарячим представлено на рис. 2. Аналогічним чином тестували генотоксичну дію на пухлинні клітини тих же концентрацій ФМ із застосуванням методу «ДНК-комет» (табл. 2).

Результати оцінки генотоксичного впливу ФМ у концентраціях 0,5 та 1, 5 мг/кг свідчать про відсутність цього ефекту у пухлинних клітинах, що збігається з даними дослідження мікроядерного тесту.

Достовірний генотоксичний ефект наноферромагнетика в пухлинних клітинах визначався лише при концентрації 3 мг/кг через 48 год його дії (табл. 2). Найбільш виражений генотоксичний вплив ФМ на клітини АКЕ спостерігався при дії наноконцентрату в концентраціях 6 та 10 мг/кг.

Оскільки на новому витку досліджень експериментальної онкології із впровадженням нанотехнологій постулат академіка Р.Є. Кавецького про взаємозв'язок між пухлиною та організмом залишається актуальним, аналогічним чином ми дослідили генотоксичний вплив ФМ на немалігнізовані клітини тварин з АКЕ, зокрема кісткового мозку.

Відомо, що клітини КМ є універсальною тест-системою, яка дає об'єктивну оцінку генотоксичної дії різних чинників на весь організм в цілому. Встановлено, що клітини КМ тварин першочергово реагують на введення в організм наночастинок, змінюючи свій



Рис. 2. Пухлинні клітини тварин з АКЕ: *a* – пухлинна клітина з МЯ; *b* – пухлинна клітина без МЯ. 36. $\times 400$. Забарвлення акридиновим жовтогарячим

Таблиця 2

Кількісна оцінка «% ДНК у хвості комет» пухлинних клітин тварин з АКЕ після дії різних концентрацій ФМ

Концентрація ФМ, мг/кг	Час експозиції	
	24 год	48 год
Контроль	6,51 \pm 0,52	6,38 \pm 1,21
0,5	5,72 \pm 0,66	5,33 \pm 1,41
1,5	7,96 \pm 1,32	6,49 \pm 1,00
3	8,24 \pm 1,43	9,02 \pm 1,65
6	19,80 \pm 1,14*	21,63 \pm 1,83*
10	21,47 \pm 1,86*	22,54 \pm 2,33*

* $p < 0,05$ – достовірні зміни відносно значень контролю.

клітинний склад та морфологічні характеристики. Дослідження показали, що ці зміни у клітинах КМ пов'язані з фізико-хімічними особливостями нанокompозиту, його концентрацією та розміром наночастинок [14]. Саме тому нами проведено аналіз морфології еритроїдного ряду клітин КМ тварин з АКЕ після введення обраних концентрацій ФМ та визначено мінімальну концентрацію цього чинника, при якій вже спостерігається гено- та цитотоксичний ефект (табл. 3).

Аналіз ФМ у концентраціях 0,5 та 1,5 мг/кг не виявив достовірного цито- та генотоксичного ефекту на клітини КМ відносно показників контролю (табл. 2). Дослідження впливу ФМ у концентрації 3,0 мг/кг на клітини КМ тварин показало достовірний, але порівняно з контролем слабо виражений цито- та генотоксичний ефект відносно значень попередніх груп (табл. 3). Це обумовлено невеликою кількістю МЯ у ПХЕ та повною відсутністю їх у НХЕ. На відміну від цього при дії ФМ у концентраціях 6 та 10 мг/кг МЯ спостерігались не лише у ПХЕ, а й у НХЕ, що є свідченням більш вираженого генотоксичного ефекту цих концентрацій на еритроїдний ряд клітин КМ, ніж у попередніх групах, який збільшувався з подовженням часової експозиції. Найбільший цито- та генотоксичний ефект у клітинах еритроїдного ряду КМ встановлено при концентрації ФМ 10 мг/кг.

Таким чином, дизайн наведеного дослідження дозволив визначитись з концентрацією

ФМ для використання у складі нанокompозитів, яка сама по собі спричиняє помірний цитотоксичний та генотоксичний ефекти і може бути використана у подальших дослідженнях щодо визначення модифікуючої цито- та генотоксичної дії при поєднанні з ПМП.

Комплексне дослідження генотоксичної дії ФМ, ПМП та комбінації цих чинників на клітини АКЕ. Згідно з сучасними уявленнями для створення цілеспрямованої векторної доставки ФМ до пухлинних клітин є обов'язковим застосування ПМП, однак надто мало дослідженою залишається проблема поєднаної дії ФМ і ПМП як на пухлинні клітини, так і на інші органи та системи організму.

Перш за все нами проведено порівняльний аналіз генотоксичної дії ФМ, ПМП та їхнього поєданого впливу на пухлинні клітини за даними мікроядерного тесту та методу «ДНК-комет» (табл. 4). Результати досліджень засвідчили про більш високу чутливість та інформативність методу «ДНК-комет», ніж мікроядерного тесту, при застосуванні їх для оцінки генотоксичного впливу ФМ на пухлинні клітини АКЕ без ПМП та на фоні ПМП. Встановлено, що «% ДНК у хвості комет» пухлинних клітин дещо підвищувався через 1 год інкубації та значно зростав у порівнянні з контролем через 24 год контактної взаємодії з ФМ на фоні ПМП та без нього. Натомість дані мікроядерного тесту не показали суттєвих змін кількості МЯ у пухлинних клітинах внаслідок дії ФМ на фоні ПМП та без ПМП при даних часових

Таблиця 3
Кількісна оцінка МЯ (%) та співвідношення ПХЕ/НХЕ у КМ тварин з АКЕ при різних концентраціях ФМ

Концентрація ФМ, мг/кг	Час експозиції					
	24 год			48 год		
	МЯ/ПХЕ	МЯ/НХЕ	ПХЕ/НХЕ	МЯ/ПХЕ	МЯ/НХЕ	ПХЕ/НХЕ
Контроль	1,93 ± 0,20	—	0,81 ± 0,05	—	—	—
0,5	1,66 ± 0,33	—	0,94 ± 0,07	1,66 ± 0,33	—	0,99 ± 0,07
1,5	2,33 ± 0,33	—	0,63 ± 0,02*	2,33 ± 0,33	—	0,58 ± 0,05*
3,0	3,60 ± 0,40*	—	0,44 ± 0,01*	3,86 ± 0,40	—	0,41 ± 0,02*
6,0	3,66 ± 1,00*	1,66 ± 0,33	0,48 ± 0,01*	3,76 ± 0,99*	2,10 ± 0,33	0,44 ± 0,01*
10	3,66 ± 1,00*	3,33 ± 0,33*	0,39 ± 0,01*	4,66 ± 0,66*	4 ± 0,66*	0,29 ± 0,06*

* p < 0.05 — достовірні зміни відносно значень контролю.

експозиціях. Проте, як було показано раніше, цей показник зростає після 48-годинної інкубації з нанокондитом (табл. 1). Слід зазначити, що при дослідженні дії ПМП як самостійного чинника тривалістю 1 та 24 год при застосуванні методу «ДНК-комет» і мікроядерного тесту достовірних змін у геномі пухлинних клітин не виявлено у порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Оцінка гено- та цитотоксичного впливу ФМ, ПМП та їх поєднаної дії із використанням МЯ-тесту на еритроїдний ряд клітин КМ інтактних тварин і тварин з асцитною карциномою Ерліха. Аналіз цитологічних препаратів, виготовлених з КМ інтактних тварин, дозволив завдяки відмінностям флуоресценції чітко визначити ПХЕ та НХЕ (рис. 3). МЯ добре простежувалися у ПХЕ та мали яскраво-жовтий колір (рис. 4). За даними літератури відомо, що зміни з боку морфології клітин КМ внаслідок впливу нанокондитів можна спостерігати вже через 1–2 год після їхнього введення [15, 16]. Саме тому вплив обраної нами концентрації ФМ 3 мг/кг на еритроїдний ряд клітин КМ оцінювали через 1 та 24 год після введення. При дослідженні гено- та цитотоксичного впливу ФМ на фоні ПМП та без нього у групі інтактних тварин не виявлено

Таблиця 4
Кількісна оцінка «% ДНК у хвості комет» та МЯ у пухлинних клітинах тварин з АКЕ, що зазнали впливу ФМ у концентрації 3 мг/кг, ПМП та одночасної дії цих чинників

Групи тварин	Час експозиції	
	1 год	24 год
	МЯ (%)	
Контроль	2,00 ± 0,01	2,20 ± 0,25
ПМП	2,20 ± 0,25	2,40 ± 0,25
ФМ	2,00 ± 0,01	2,20 ± 0,25
ФМ + ПМП	2,80 ± 0,55	3,60 ± 0,33
	% ДНК у хвості комет	
Контроль	6,50 ± 0,52	6,65 ± 0,54
ПМП	7,89 ± 1,29	6,50 ± 1,34
ФМ	8,15 ± 1,47	19,80 ± 1,14*
ФМ + ПМП	7,63 ± 1,35	21,40 ± 2,05*

* $p < 0,05$ – достовірні зміни відносно значень контролю.

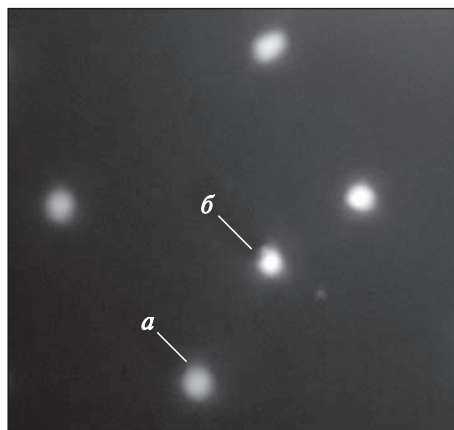


Рис. 3. Еритроцити КМ інтактних мишей: а – НХЕ, б – ПХЕ. Забарвлення акридиновим жовтогарячим. 36. ×400

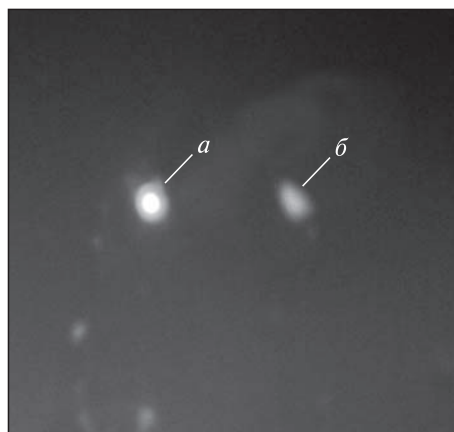


Рис. 4. Незрілі еритроцити КМ інтактних мишей: а – з МЯ у НХЕ, б – НХЕ без МЯ. Забарвлення акридиновим жовтогарячим. 36 ×400

достовірних змін в морфології еритроїдного ряду КМ через 1 год після дії застосованих чинників (табл. 3).

Простежується тенденція до незначного зростання кількості МЯ та співвідношення ПХЕ/НХЕ у інтактних підслідних тварин після одногодинної експозиції з ПМП. Аналогічна тенденція щодо зростання кількості МЯ та одночасного зниження співвідношення ПХЕ/НХЕ спостерігалась у групах тварин, які зазнали впливу ФМ та поєднаної дії ФМ і ПМП протягом 1 год (табл. 5). Істотне зростання кількості МЯ та співвідношення ПХЕ/НХЕ ($p < 0,05$) у КМ тварин визначено після 24-го-



Рис. 5. Гель-електрофорез лімфоцитів периферичної крові інтактних мишей (а) та мишей з АКЕ (б), а також клітин АКЕ після 24-годинного впливу ФМ (в). $\times 400$, SYBR Green I

Таблиця 5

Кількісна оцінка МЯ (%) та співвідношення ПХЕ/НХЕ у КМ інтактних тварин після дії ФМ, ПМП та їхнього одночасного впливу

Групи тварин	Час експозиції			
	1 год		24 год	
	МЯ/ПХЕ	ПХЕ/НХЕ	МЯ/ПХЕ	ПХЕ/НХЕ
Контроль	0,25 \pm 0,25	0,95 \pm 0,02	–	–
ПМП	0,50 \pm 0,25	1,00 \pm 0,04	0,75 \pm 0,25	1,05 \pm 0,06
ФМ	0,50 \pm 0,25	0,82 \pm 0,02	1,20 \pm 0,01*	0,65 \pm 0,02*
ФМ + ПМП	0,50 \pm 0,25	0,78 \pm 0,03	1,50 \pm 0,41*	0,69 \pm 0,02*

* $p < 0,05$ – достовірні зміни відносно значень контролю.

Таблиця 6

Кількісна оцінка МЯ (%) та співвідношення ПХЕ/НХЕ у КМ тварин з АКЕ після дії ФМ, ПМП та їхнього одночасного впливу

Групи тварин	Час експозиції			
	1 год		24 год	
	МЯ/ПХЕ	ПХЕ/НХЕ	МЯ/ПХЕ	ПХЕ/НХЕ
Контроль	1,93 \pm 0,20	0,81 \pm 0,05	–	–
ПМП	2,40 \pm 0,24	0,63 \pm 0,02	2,40 \pm 0,24	0,69 \pm 0,01*
ФМ	2,60 \pm 0,24	0,44 \pm 0,01	3,60 \pm 0,40*	0,44 \pm 0,01*
ФМ + ПМП	3,00 \pm 0,00	0,25 \pm 0,01	5,00 \pm 0,55*	0,23 \pm 0,02*

* $p < 0,05$ – достовірні зміни відносно значень контролю.

динного впливу ФМ та ПМП, що є свідченням підвищення geno- та цитотоксичного ефекту дії цих факторів через даний період часу.

Поряд з цим проаналізовано цито- та генотоксичний ефект дії ФМ, ПМП та їхнього комбінованого впливу на клітини еритроїдного ря-

ду КМ тварин з АКЕ. У цій групі тварин, як і в інтактній, вже через 1 год встановлено тенденцію до перерозподілу клітин еритроїдного ряду КМ під впливом цих агентів, проте більш суттєві зміни спостерігались у тварин через 24 год впливу, що підтверджується ві-

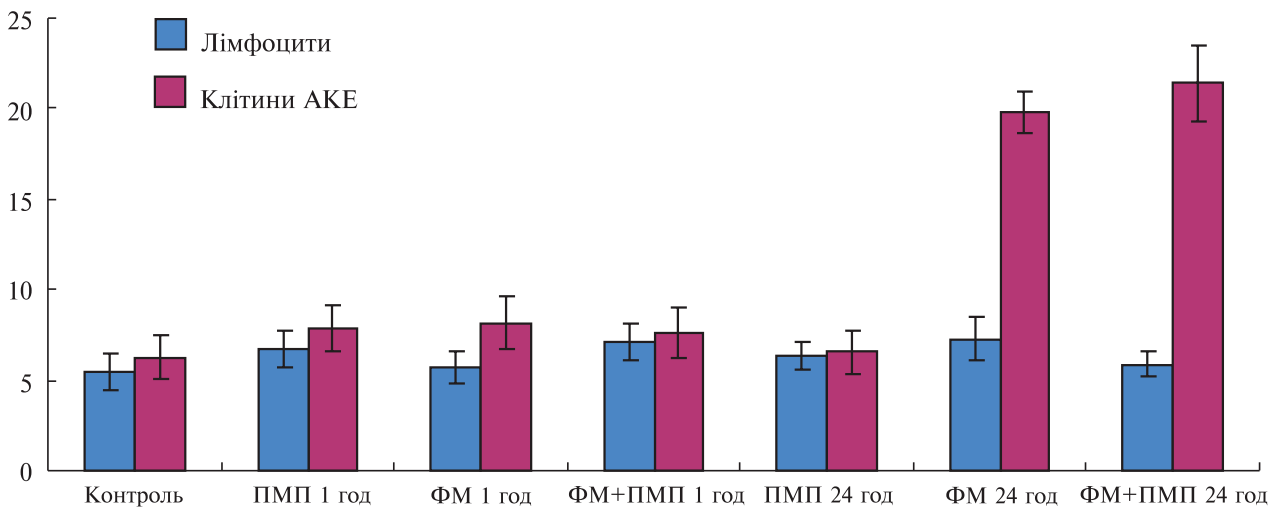


Рис. 6. Генотоксичний ефект ФМ у концентрації 3 мг/кг, ПМП та їхньої комбінації щодо лімфоцитів периферичної крові та клітин АКЕ: по вертикалі – «% ДНК у хвості комет»; по горизонталі – варіанти впливу; * $p < 0,05$ – достовірні зміни відносно значень контролю

рогідним зростанням кількості МЯ у ПХЕ ($p < 0,05$) і свідчить не лише про цитотоксичний, але і генотоксичний вплив цих чинників. Найбільш виражений цитотоксичний ефект щодо клітин КМ ($p < 0,05$) виявлено у групі тварин з АКЕ через 24 год одночасного впливу ФМ та ПМП (табл. 6). Порівняльний аналіз кількості МЯ у ПХЕ КМ інтактних тварин, що зазнали дії досліджених чинників, та аналогічної групи тварин з АКЕ виявив достовірне збільшення їх ($p < 0,05$) у тварин останньої. Наші дані узгоджуються з результатами інших дослідників і засвідчують, що кількість МЯ у ПХЕ значно зростає при наявності в організмі пухлинного процесу [11]. І це закономірно, оскільки відомо, що розвиток пухлинного процесу пов'язаний із змінами у геномі клітин організму, які відбуваються не тільки в пухлинних, але і в немалігнізованих клітинах [11, 12].

Враховуючи те, що збільшення кількості МЯ є відображенням порушень ДНК, а отримана за допомогою мікроядерного тесту інформація щодо зміни в ядрах за даними деяких джерел літератури цілком відповідає результатам дослідження каріотипу клітин, цей тест виправдано можна застосувати як маркер генотоксичного впливу різноманітних чинників [8, 11].

Існують дані інших експериментальних досліджень щодо зміни морфології клітин ери-

троїдного ряду КМ в системі *in vivo*, кількості МЯ та співвідношення ПХЕ/НХЕ внаслідок впливу різних чинників, зокрема отруйних речовин, цитостатиків, нанокompatитів та наночастинок [18–20, 22]. Показано, що низькі концентрації токсичних речовин лише викликають утворення МЯ та несуттєво змінюють ПХЕ/НХЕ, тоді як високі концентрації достовірно знижують кількість ПХЕ [20, 21]. Слід звернути увагу, що морфологія клітин еритроїдного ряду КМ та периферичної крові змінюється не лише під впливом концентрації, але і розміру наночастинок [16, 21]. Встановлено, що наночастинок Al_2O_3 з діаметром 30 нм володіли меншою гено- та цитотоксичною дією, ніж аналоги з діаметром 40 нм [21].

З позицій отриманих нами даних особливої уваги заслуговують неоднозначні відомості про зміни морфології клітин еритроїдного ряду КМ та периферичної крові внаслідок впливу ПМП. Вважається, що істотні зміни морфології цих клітин можна спостерігати лише при індукції ПМП від 1 Тл [23]. У деяких роботах показано зростання кількості МЯ у ПХЕ із збільшенням індукції та експозиції ПМП [22]. Згідно з результатами власних досліджень кількість МЯ та ПХЕ/НХЕ у КМ інтактних тварин та з АКЕ суттєво не змінюються внаслідок дії ПМП (150 мТл) через 1 та 24 год впливу, що підтверджується іншими даними літератури

[23], в той же час ми встановили, що генотоксичний ефект ФМ збільшується у комбінації з ПМП. Отже, отримані результати є свідченням цито- та генотоксичного ефектів у клітинах еритроїдного ряду КМ і можуть бути використані як показники нестабільності геному при дії ФМ, ПМП та їхньому комбінованому впливі на організм.

Визначення генотоксичного впливу ФМ, ПМП та їхньої комбінованої дії з використанням методу «ДНК-комет» на пухлинні клітини та лімфоцити периферичної крові. Порівняльний аналіз «% ДНК у хвості комет» в лімфоцитах периферичної крові та пухлинних клітинах мишей з АКЕ внаслідок дії ФМ у концентрації 3 мг/кг виявив достовірне зростання цього показника в обох типах клітин через 24 год після впливу.

Проте більш виражений генотоксичний ефект цієї концентрації зазначеного чинника спостерігався у трансформованих клітинах (рис. 5). В той же час встановлено, що внаслідок дії ПМП у пухлинних клітинах не відбувається достовірних змін цього показника незалежно від тривалості індукції. Однак доведено, що комбінований вплив ФМ та ПМП значно збільшував «% ДНК у хвості комет» в пухлинних клітинах через 24 год інкубації та у незначній мірі – в лімфоцитах периферичної крові. Отже результати проведених досліджень свідчать про те, що ПМП, ФМ та їхній комбінований вплив при 1- та 24-годинній експозиції не призводять до істотних змін цитогенетичних показників у лімфоцитах периферичної крові. Натомість через 24 год після внутрішньочеревного введення ФМ спостерігається достовірне ураження ДНК пухлинних клітин, не пов'язане з присутністю зовнішнього ПМП. Отримані дані свідчать про більш високу чутливість пухлинних клітин до дії ФМ, ніж лімфоцитів периферичної крові (рис. 6). Існують два можливих механізми, якими можна пояснити це явище: залізовмісні наночастинки можуть викликати ушкодження ДНК опосередковано, сприяючи розвитку оксидативного стресу, а також шляхом проникнення через мембрани ядра та безпосередньої взаємодії з ДНК [24–26].

Іони заліза, які вивільняються з наночастинки, можуть перетворювати внутрішньоклітинні продукти метаболізму кисню (пероксид водню та супероксид-аніони) на гідроксильні ради-

кали ОН, які здатні пошкоджувати ДНК, а також ініціювати зшивки між тиміном ДНК і тирозином гістонів у хроматині [26]. Таким чином, наночастинки, які містять залізо, можуть бути джерелом надлишку заліза в клітині, що призводить до генерування високореактивних гідроксильних радикалів [26, 27]. Наслідками взаємодії активних форм кисню з ДНК можуть бути одно- та дволанцюгові розриви, модифікації основ (наприклад, формування 8-гідроксидезоксигуанозинових похідних), формування поперечних зшивок тощо [27]. Причиною визначених у власному дослідженні відмінностей між показниками, що відображають ступінь ураження ДНК лімфоцитів периферичної крові та пухлинних клітин АКЕ, ми вважаємо те, що наночастинки ФМ вводили тваринам внутрішньочеревно, і тому концентрація ФМ в асцитній рідині була набагато більшою у порівнянні з його концентрацією при взаємодії з лімфоцитами.

Висновки. За результатами порівняльного тестування різних концентрацій ФМ на цито- та генотоксичність межею найменших проявів дії цього чинника на клітини АКЕ, клітини еритроїдного ряду КМ та лімфоцити периферичної крові є концентрація 3 мг/кг, що дозволяє рекомендувати її для застосування на всіх етапах експериментальних досліджень щодо створення векторних наносистем. Встановлено, що цито- та генотоксичні ефекти у пухлинних клітинах та клітинах організму – носія пухлин при дії ФМ, ПМП та їхньому поєднанні мають однотипну спрямованість – збільшення кількості МЯ, клітин з «% ДНК у хвості комет», зміну співвідношення ПХЕ/НХЕ, але ступінь прояву цих змін пов'язаний з концентрацією ФМ та тривалістю дії використаних чинників. Доведено, що ПМП не спричиняє істотного цито- та генотоксичного ефектів на пухлинні клітини, клітини еритроїдного ряду КМ та лімфоцити периферичної крові, в той же час при поєднаній його дії з ФМ зміни в цих клітинах набувають більш вираженого характеру, що є свідченням модифікуючого впливу ФМ як індуктора активності ПМП. Показано, що оцінка цито- та генотоксичного впливу ФМ, ПМП та комбінації цих чинників на пухлинні клітини, клітини КМ та лімфоцити периферич-

ної крові може здійснюватись з використанням як мікроядерного тесту, так і методу «ДНК-комет», які є інформативними та взаємно доповнюють один одного, але більшу чутливість має останній. Комплексне визначення цито- і генотоксичної дії ФМ як самостійного чинника та на фоні ПМП за допомогою мікроядерного тесту і методу «ДНК-комет» в системі *in vivo* може слугувати важливим критерієм оцінки стабільності геному не лише пухлинних клітин, але й немалігнізованих клітин організму – носія пухлини.

Робота виконана за підтримки договором № 5.18.3.53 Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» на 2010–2014 рр.

V.F. Chekhun, Yu.V. Lozovska, N.Yu. Lukyanova, D.V. Demash, I.N. Todor, L.A. Naleskina

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv
E-mail: chekhun@onconet.kiev.ua

EVALUATION OF CYTO- AND GENOTOXIC ACTION OF FERRONANOMAGNETIC AND CONSTANT MAGNETIC FIELD IN *IN VIVO* SYSTEM

Cyto- and genotoxic effects of nanoparticles on the basis of FM, CMF or their combination have been studied in AKE cells, BM cells of erythroid line, and peripheral blood lymphocytes with the use of MN test and «DNA-comet» assay. It has been shown that expression of mentioned effects is related to FM concentration and duration of tested agent action. It has been also demonstrated that action of CMF alone in the studied cells did not cause any changes in cell architectonics or affect MN counts which are associated with DNA damage. When FM and CMF were used in combination there has been observed the phenomenon of induction of CMF action with FM nanoparticles. The obtained results allow recommend MN test and «DNA-comet» assay as the markers of genome stability in the tests of genotoxic effects of nanomaterials for development of vector nanosystems.

В.Ф. Чехун, Ю.В. Лозовская, Н.Ю. Лукьянова, Д.В. Демаш, И.Н. Тодор, Л.А. Налескина

ОЦЕНКА ЦИТО- И ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОФЕРРОМАГНЕТИКА И ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В СИСТЕМЕ *IN VIVO*

Исследованы цито- и генотоксические эффекты действия наночастиц ферромагнетика (ФМ), постоянного магнитного поля (ПМП) и соединения этих агентов на клетки асцитной карциномы Эрлиха,

клетки эритроидного ряда костного мозга и лимфоциты периферической крови с помощью микроядерного теста и метода «ДНК-комет». Показано, что проявления указанных эффектов связаны как с концентрацией ФМ, так и продолжительностью действия тестированных факторов. Вместе с тем установлено, что действие ПМП как самостоятельного агента не вызывает в исследованных клетках изменений цитоархитектоники и количества микроядер, которые ассоциируются с повреждением ДНК. При совместном применении ФМ и ПМП наблюдается феномен индукции наночастицами ФМ действия ПМП. Полученные результаты дают основание рекомендовать микроядерный тест и метод «ДНК-комет» в качестве маркеров стабильности генома при тестировании генотоксического влияния наноматериалов при создании векторных наносистем.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Налескина Л.А., Бородай Н.В., Чехун В.Ф. Сьогодні та перспективи створення наносистем спрямованої доставки лікарських препаратів до пухлинних клітин // Онкологія. – 2009. – 11, № 3. – С. 166–173.
2. Головенко М.Я. Наномедицина: досягнення та перспективи розвитку новітніх технологій у діагностиці та лікуванні (огляд літератури) // Журн. АМН України. – 2007. – 13, № 4. – С. 617–635.
3. Чехун В.Ф. Нанотехнології в онкології: від теорії до молекулярної візуалізації та керованої терапії // Онкологія. – 2008. – 10, № 4. – С. 414–419.
4. Северин Е.С., Родина А.В. Проблемы и перспективы современной противоопухолевой терапии // Усп. биол. химии. – 2006. – 46. – С. 43–64.
5. Oberdoster G., Oberdoster E., Oberdoster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // Health. Persp. – 2005. – 113, № 7. – P. 823–839.
6. Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В. и др. Методические подходы к оценке безопасности наноматериалов. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ГУ НИИ биомед. химии им. В.Н. Ореховича РАМН, ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Гос. науч. центр РФ – Ин-т мед.-биол. проблем РАН, 2009. – С. 1–25.
7. Кундієв Ю.І., Демецька О.В., Кучерук Т.К., Мовчан В.О., Новиченко Н.Л., Налескіна Л.А. Біологічна активність частинки нанодіапазону в залежності від їх розміру // Онкологія. – 2008. – 10, № 2. – С. 217–224.

8. *Tinwell H., Ashby J.* Comparison of Acridine orange and Gimsa stains in several mouse bone marrow micronucleus assay-including a triple dose study // *Mutagenesis.* – 1989. – **6**, № 3. – P. 476–481.
9. *Dias V.M., Manelli-Oliveria R., Machado-Santelli G.M.* Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture // *Mutat. Res.* – 2005. – **565**, № 2. – P. 173–179.
10. *Михайленко В.М., Сорочинская А.Б.* Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // *Онкология.* – 2008. – **10**, № 3. – С. 303–309.
11. *Bonassi S., Znaor A., Ceppi M. et al.* An increased micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes predict the risk of cancer in humans // *Carcinogenesis.* – 2006. – **28**, № 3. – P. 625–631.
12. *Nersesyan A.K.* Biomonitoring of cytogenetic effect of antitumor therapy by means of micronucleus assay in exfoliated epithelial cells // *Cytology and Genetics.* – 2007. – **41**, № 6. – P. 385–390.
13. *Kovaleva O.A.* Cytogenetic anomalies and causes for their occurrence // *Cytology and Genetics.* – 2008. – **42**, № 1. – P. 48–59.
14. *Фирсова С.С., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. и др.* Изменение морфологических показателей костного мозга и периферической крови при длительном воздействии золотых наночастиц // *Изв. Саратов. ун-та. Сер. Физика.* – 2011. – **11**, вып. 2. – С. 54–57.
15. *Travlos G.S.* Normal structure, function and histology of bone marrow // *Toxicol. Path.* – 2006. – **34**, № 5. – P. 550–565.
16. *Candido-Bacani P. de M., dos Reis M.B., Serpeloni J.M. et al.* Mutagenicity and genotoxicity of isatin in mammalian cell *in vivo* // *Mutat. Res.* – 2011. – **719**, 1/2. – P. 47–51.
17. *Junior A.D., Mota L.G., Nunan E.A et al.* Tissue distribution evaluation of stealth Ph-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumour-bearing mice // *Life Sci.* – 2007. – **80**. – P. 659–664.
18. *Suzuki H., Ikeda N., Kobayashi K. et al.* Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assay with 9 chemicals using young rats a study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) // *Mutat. Res.* – 2005. – **583**, № 2. – P. 133–145.
19. *Celik A., Ogenler O., Comelekoglu U.* The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate // *Mutagenesis.* – 2005. – **20**, № 6. – P. 411–415.
20. *Wang Z.Y., Song J., Zhang D.S.* Nanosized As₂O₃/Fe₂O₃ complex combined with magnetic fluid hyperthermia selectively target liver cancer cell // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – **15**, № 24. – P. 2995–3002.
21. *Balasubramanyam A., Sailaja N., Mahboob M., Rahman M.R., Saber M.N.* In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test // *Mutagenesis.* – 2009. – **24**, № 3. – P. 245–251.
22. *Suzuki Y., Toyama Y., Miyakoshi Y. et al.* Effect of static magnetic field on the induction of micronuclei by some mutagens // *Environm. Health and Prevent. Med.* – 2006. – № 11. – P. 228–232.
23. *Suzuki Y., Ikehata M., Nakamura K. et al.* Induction of micronuclei in mice exposed in static magnetic fields // *Mutagenesis.* – 2001. – **216**, № 6. – P. 499–501.
24. *Ferrari M.* Cancer nanotechnology: opportunities and challenges // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – **5**, № 3. – P. 161–171.
25. *Altman S.A, Zastawny T.H, Randers-Eichhorn L. et al.* Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions // *Free Radic. Biol. Med.* – 1995. – **19**, № 6. – P. 897–902.
26. *Rouse R.L., Murhy G., Boudreaux M.J. et al.* Soot nanoparticles promote biotransformation, oxidative stress and inflammation in murine lungs // *Amer. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* – 2008. – **131**, № 1. – P. 40–41.

Надійшла 11.10.12