

## ОЦІНКА ГЕНО- ТА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК КОЛОЇДНОГО ЗОЛОТА НА КЛІТИНИ ЕРИТРОЇДНОГО РЯДУ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ПУХЛИНИ ТВАРИН З АСЦИТНОЮ КАРЦИНОМОЮ ЕРЛІХА

Ю.В. ЛОЗОВСЬКА, Л.А. НАЛЄСКИНА, Н.Ю. ЛУК'ЯНОВА, І.М. ТОДОР, В.Ф. ЧЕХУН

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ  
E-mail: Lozovskaya.2012@mail.ru

*Проведено порівняльне дослідження гено- та цитотоксичного ефекту наночастинок золота (НЧЗ) діаметром 5 нм у концентрації 30 та 60 мг/кг маси тіла тварини на еритроїдний ряд клітин кісткового мозку (КМ) та пухлинні клітини мишей з асцитною карциномою Ерліха (АКЕ). Паралельно у цих тварин оцінювали зміни трансмембранного мітохондріального потенціалу пухлинних клітин внаслідок дії обраних концентрацій НЧЗ. Як маркери генотоксичного впливу використано мікроядерний тест, для оцінки трансмембранного мітохондріального потенціалу пухлинних клітин – мітохондріальний флуоресцентний зонд JC-1. Показано достовірне зниження співвідношення поліхроматофілів/нормохроматофілів у КМ тварин на фоні одночасного зростання кількості мікроядер (МЯ) лише через 48 год після введення НЧЗ у концентрації 30 мг/кг. Доведено, що найбільш суттєвий гено- та цитотоксичний ефект на еритроцити КМ призводять НЧЗ у концентрації 60 мг/кг, і він більш виражений при подовженні часової експозиції. Поряд з цим виявлено зміни стабільності геному та мітохондріального трансмембранного потенціалу пухлинних клітин тварин з АКЕ внаслідок впливу НЧЗ у концентраціях 30 та 60 мг/кг. Зазначено найбільш достовірне зростання кількості МЯ на фоні одночасного зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій при використанні НЧЗ у концентрації 60 мг/кг та подальше їх збільшення з подовженням терміну дії. Отримані дані свідчать про те, що НЧЗ розміром 5 нм здатні в системі *in vivo* спричинити гено- та цитотоксичні ефекти як у пухлинних клітинах, так і клітинах еритроїдного ряду КМ, тому при високих концентраціях та тривалій дії цей чинник є небезпечним для застосування у медико-біологічних цілях.*

**Ключові слова:** асцитна карцинома Ерліха, пухлинні клітини, клітини еритроїдного ряду кісткового мозку, наночастинок золота, мікроядра, трансмембранний мітохондріальний потенціал.

**Вступ.** В останні роки у багатьох галузях медицини достатньо широке застосування знаходять різні за походженням металовмісні нано-

матеріали [1–6]. В той же час експериментальними дослідженнями *in vivo* показано, що наночастинок титану, срібла, алюмінію, цинку в залежності від їх розміру та концентрації спричиняють суттєвий гено- та цитотоксичний вплив на більшість органів та систем організму [7–9]. Встановлено, що наночастинок металовмісних матеріалів можуть спричинити пошкодуючу дію на геном ядра, змінювати функціональний стан мітохондрій тощо. У зв'язку з цим актуальним стало питання біорозподілу, токсичності та елімінації наночастинок на клітинному рівні.

Пріоритетним напрямком наномедицини останніх років є дослідження можливості використання в діагностиці та лікуванні найбільш поширених хвороб людини наночастинок золота (НЧЗ). Встановлено, що золото не підлягає окисленню на повітрі навіть при нагріванні, стійке до дії на нього води, не вступає в реакції з кислотами, лугами та солями. Останім часом в експериментах *in vitro* та *in vivo* розпочато серію досліджень для визначення токсичності НЧЗ з урахуванням їх форми та розміру [10]. В окремих роботах в системі *in vivo* наведено дані, згідно з якими НЧЗ у комбінації з лазерною та променевою терапією пригнічують розвиток злоякісних новоутворень [3–5]. В інших експериментальних дослідженнях на тваринах встановлено можливість інгібування НЧЗ ангиогенезу завдяки блокуванню функції VEGF, не спричиняючи при цьому токсичного впливу на клітини [11]. В той же час питання безпеки застосування НЧЗ щодо впливу як на пухлину, так і організм залишаються суперечливими і потребують подальших досліджень з урахуванням розмірів наночастинок.

Мета роботи полягала в оцінці безпеки застосування НЧЗ малих розмірів в медико-біологічних дослідженнях за показниками мікро-

ядерного тесту та трансмембранного потенціалу на моделі асцитної карциноми Ерліха.

**Матеріали та методи.** Дослідження проведено в системі *in vivo* на моделі асцитної карциноми Ерліха (АКЕ). Через 7 діб після перещеплення пухлини тваринам внутрішньочеревно вводили пегельовані НЧЗ розміром 5 нм, які здатні надходити до ядра через пори ядерної мембрани. НЧЗ такого розміру були придбані в компанії «Sigma» (Німеччина) для тестування з метою визначення їх гено- та цитотоксичних ефектів щодо встановлення безпечності і можливості використання в онкологічній практиці. Досліджена концентрація НЧЗ становила 30 та 60 мкг/кг.

Всіх тварин розподілено на п'ять груп: контрольна; тварини, які отримували НЧЗ у концентраціях 30 та 60 мкг/кг маси тіла тварини з урахуванням часової експозиції. Гено- та цитотоксичний вплив НЧЗ на еритроїдний ряд клітин кісткового мозку (КМ) та пухлинні клітини аналізували через 24 та 48 год після їх введення [12, 13]. Крім того, в пухлинних клітинах оцінювали зміну трансмембранного потенціалу мітохондрій внаслідок дії НЧЗ з урахуванням зазначеної часової експозиції, оскільки відомо, що наноматеріали можуть індукувати мітохондріальний шлях апоптозу за рахунок активації проапоптичних факторів [14–16].

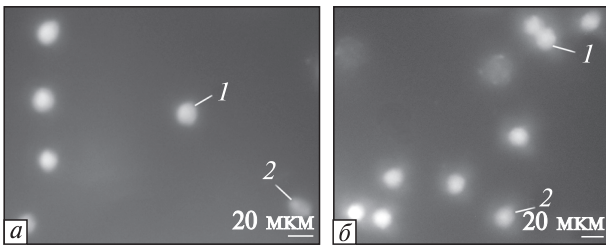
Тварин виводили із експерименту методом цервікальної дислокації з дотриманням загальноприйнятих норм біоетики. Зразки КМ отримували із стегнової кістки мишей і готували суспензію у середовищі RPMI. Цитологічні препарати підсушували при кімнатній температурі, фіксували у метанолі 2 хв і фарбували акридиновим жовтогарячим (12,5 мг/мл фосфатного буфера рН 6,4–6,5) протягом 1 хв. Ідентифікацію клітин КМ за морфологією проводили згідно з методом Hayashi [12]. Кількість мікроядер (МЯ) у клітинах еритроїдного ряду КМ визначали у двох субпопуляціях: нормохроматофільних (НХЕ) та поліхроматофільних еритроцитах (ПХЕ) із дотриманням існуючих в літературі рекомендацій [12, 13]. Результати оцінювали із розрахунку на 1000 клітин (у проміллі, ‰). Поряд з цим досліджували 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.

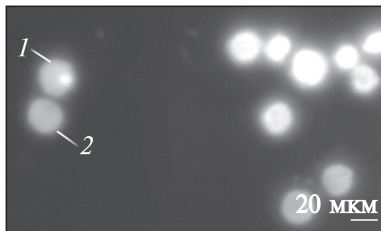
Для визначення морфологічних особливостей пухлинних клітин цитологічні препарати фарбували за методом Гімза (5%-ний розчин у  $H_2O$ ) 8 хв. Оцінювання кількості МЯ проводили на препаратах, пофарбованих акридиновим жовтогарячим (3,0 мг/мл на фосфатному буфері рН 6,4–6,5) із розрахунку на 1000 клітин АКЕ за допомогою світлового мікроскопа (40 × 10). [12, 13].

Оцінку мітохондріального потенціалу пухлинних клітин тварин з АКЕ здійснювали за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії із використанням мітохондріального зонду JC-1, який синтезований в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України (Харків). Цей метод базується на здатності барвника JC-1 акумулюватися у мітохондріях живих неушкоджених клітин, а також утворювати агрегати, що мають флуоресцентні властивості (так звані J-агрегати). Утворення агрегатів супроводжується зміною флуоресценції із зеленої на помаранчеву. Згідно з даними літератури деполіаризація мембран мітохондрій у апоптичних або ушкоджених клітинах призводить до дезагрегації барвника, тобто до зменшення співвідношення помаранчева/зелена флуоресценція [14–16]. Інкубацію клітин АКЕ ( $5 \cdot 10^5$  кл/мл) з барвником JC-1 (4 мкл розчину у ДМСО) проводили протягом 1,5 год, періодично перемішуючи. Збудження флуоресценції відбувалось при довжині хвилі 488 нм. Емісію спостерігали при довжині хвилі 530 нм (зелене світіння мономерів барвника, яке характерне для апоптичних клітин, FL1), та при довжині хвилі 590 нм (помаранчеве світіння неапоптичних, функціонально активних клітин, FL2). Результати оцінювали за відсотком пухлинних клітин з FL1 та FL2 флуоресценцією у кожному препараті [14–16]. Всі дослідження щодо гено- та цитотоксичних ефектів у клітинах еритроїдного ряду КМ та пухлинних клітинах тварин з АКЕ проведені за допомогою люмінесцентного мікроскопа Micros MC 300 (Австрія) при загальному збільшенні приладу ×400.

Достовірність між показниками різних груп визначали за допомогою t-критерію Ст'юдента, відмінності вважали значущими при  $p < 0,05$ .



**Рис. 1.** Клітини еритроїдного ряду КМ мишей: *a* – контрольна група мишей; *b* – після впливу НЧЗ у концентрації 60 мкг/кг через 48 год після введення: 1 – незрілі (поліхроматофільні) еритроцити; 2 – зрілі (нормохроматофільні) еритроцити. Забарвлення акридиновим жовтогогарячим



**Рис. 2.** Незрілі (поліхроматофільні) еритроцити кісткового мозку мишей з МЯ (1) та без МЯ (2). Забарвлення акридиновим жовтогогарячим

Статистичну обробку проводили за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6.0.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Гено- та цитотоксичні ефекти НЧЗ у концентрації 30 та 60 мкг/кг оцінювали за кількісними показниками змін цитоморфологічних характеристик клітин еритроїдного ряду КМ через 24 та 48 год після їх введення тваринам з АКЕ (табл. 1). Аналіз даних свідчить про те, що зростання кількості МЯ з одночасним зниженням співвідношення ПХЕ/НХЕ у КМ піддослідних тварин під впливом НЧЗ у концен-

трації 30 мкг/кг відбувається через 24 год після введення. Більш виражений гено- та цитотоксичний ефект НЧЗ із заданою концентрацією ( $p < 0,05$ ) спостерігається через 48 год і свідчить про достовірні зміни досліджуваних показників (табл. 1).

Проте більш істотні зміни цитоархітектоники клітин еритроїдного ряду КМ тварин з АКЕ спостерігали вже через 24 год після введення НЧЗ у концентрації 60 мкг/кг. Це підтверджується вірогідним зростанням кількості МЯ у ПХЕ ( $p < 0,05$ ) з одночасним зниженням співвідношення ПХЕ/НХЕ, що свідчить не лише про генотоксичний, але і цитотоксичний ефект цієї концентрації НЧЗ. Слід зазначити, що гено- та цитотоксичний ефект певною мірою посилювався з подовженням часової експозиції, тобто через 48 год після введення (табл. 1). Зіставлення цитологічної картини складу клітин еритроїдного ряду КМ тварин до та після введення НЧЗ у концентрації 60 мкг/кг показало зміну співвідношення ПХЕ/НХЕ із перерозподілом клітин з помаранчевим та зеленим забарвленням у напрямку збільшення кількості еритроцитів з помаранчевим світінням (рис. 1). Поряд з цим завдяки відмінностям у флуоресценції добре простежувалися МЯ у ПХЕ, що мали яскравий жовтий колір (рис. 2).

У сучасній літературі є незначна кількість публікацій щодо оцінки мутагенної активності НЧЗ на еритроїдний ряд клітин КМ з використанням мікроядерного тесту. Досить детально досліджено гено- та цитотоксичний ефект НЧЗ з урахуванням їх розмірів, способу введення піддослідним тваринам та терміну дії. Пероральне введення НЧЗ розміром 1–3 та 15 нм у концентрації 190 мкг/кг на добу впродовж 15 днів у незначній мірі призводило до збіль-

**Таблиця 1.** Зміна кількості МЯ (%) та співвідношення ПХЕ/НХЕ у КМ тварин з АКЕ внаслідок дії НЧЗ

Концентрація НЧЗ, мкг/кг	Час експозиції					
	24 год			48 год		
	МЯ/ПХЕ	МЯ/НХЕ	ПХЕ/НХЕ	МЯ/ПХЕ	МЯ/НХЕ	ПХЕ/НХЕ
Контроль	0,33 ± 0,09	–	0,85 ± 0,05	0,38 ± 0,34	–	0,82 ± 0,02
30	1,33 ± 0,33	0,66 ± 0,13	0,75 ± 0,05	3,00 ± 0,01 *	0	0,68 ± 0,03 *
60	3,00 ± 0,01 *	0,68 ± 0,16	0,66 ± 0,03 *	3,40 ± 0,15 *	0,66 ± 0,09	0,63 ± 0,04 *

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

шення кількості МЯ та викликало стимуляцію лімфоцитарного та міелоцитарного ростків кровотворення щурів [17]. Поряд з цим встановлено, що пероральне одноразове введення щурам НЧЗ діаметром 16 та 55 нм, стабілізованих поліетиленгліколем (ПЕГ), а також золотих наноболонок діаметром 160 нм у концентрації НЧЗ 0,25 мг/кг протягом 7 днів не викликало достовірних змін кількості МЯ у поліхроматофільних еритроцитах КМ тварин експериментальної групи [18]. Іншими дослідниками доведено, що інтраперитонеальне введення НЧЗ розміром 13,5 нм у діапазоні концентрацій 2200 мкг/кг призводило до зменшення кількості зрілих еритроцитів у КМ піддослідних тварин, а також до зниження загальної маси тіла тварин, селезінки та тимусу [19]. У культурі лімфоцитів людини при введенні НЧЗ діаметром 15–47 нм спостерігали достовірне зростання чисельності МЯ поряд із підвищенням проліферативного потенціалу клітин [20].

Більшість досліджень щодо біологічної дії НЧЗ в організмі експериментальних тварин присвячено їх біорозподілу в органах та тканинах залежно від способу введення, тривалості дії, концентрації та розміру наночастинок, проте вони мають суперечливий характер. При внутрішньовенному одноразовому введенні мишам НЧЗ розміром 13 нм, що були вкриті ПЕГ, у концентрації 0,17; 0,85; 4,26 мг/кг спостерігали ознаки гострого запалення та явища апоптозу у клітинах печінки [21]. Іншими дослідниками встановлено, що внутрішньочеревне введення мишам НЧЗ діаметром 3, 5, 50, 100 нм у концентрації 8 мг/кг на тиждень впливало на зміни з боку всіх органів та систем, тоді як введення НЧЗ у діапазоні розмірів 8–37 нм викликало зменшення ваги тіла, зниження у тварин апетиту [22]. Разом з тим в літературі представлені дані щодо біорозподілу та цитотоксичності НЧЗ розміром 12,5 нм (при їх внутрішньочеревному введенні мишам у концентраціях 0,04; 0,2; 0,4 мг/кг на добу протягом 7 днів), які свідчать про те, що жодних токсичних проявів впливу цих НЧЗ з урахуванням маси тіла тварин, виживаності, морфологічних змін органів та систем, біохімічних показників крові не виявлено [23, 24].

Отже, результати власних досліджень щодо генотоксичної дії НЧЗ малих розмірів на клі-

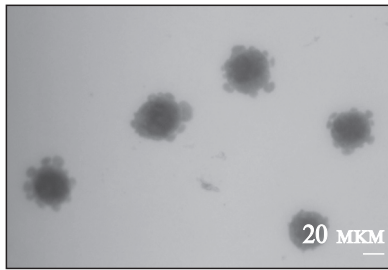
тини КМ піддослідних тварин як об'єкта оцінки змін на рівні організму, а також дані літератури, які базуються на дії НЧЗ середнього та великого розмірів, свідчать про те, що клітини КМ є досить чутливими до впливу наночастинок цього металовмісного матеріалу. Не менш чутливими виявились органи ретикуло-ендотеліальної системи [24]. Однак відомості щодо токсичного впливу НЧЗ малих розмірів на пухлинні клітини відсутні. В той же час за даними літератури наночастинок малих розмірів здатні через ядерні пори надходити до генетичного апарату клітин та безпосередньо впливати на нього. Саме тому дослідження НЧЗ з високим ступенем «біопроникності» є надзвичайно важливим для фундаментальних досліджень в онкології щодо підсилюючої їхньої дії на пухлинні клітини у поєднанні із цитостатиками при створенні сучасних лікарських наноконструктивів. З врахуванням цього нами проаналізовано генотоксичний ефект та зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій під впливом НЧЗ малого розміру у пухлинних клітинах тих же тварин з АКЕ, в яких було досліджено генотоксичні зміни у клітинах еритроїдного ряду КМ внаслідок дії зазначеного чинника.

Оцінку генотоксичного впливу НЧЗ на пухлинні клітини тварин з АКЕ проведено з урахуванням їх концентрації та часової експозиції. Так, аналіз генотоксичного ефекту НЧЗ у концентрації 30 мкг/кг на пухлинні клітини не виявив достовірного зростання кількості МЯ у цих клітинах незалежно від часової експозиції. Істотний генотоксичний ефект ( $p < 0,05$ ), а саме збільшення кількості МЯ у пухлинних клітинах, виявлений внаслідок впливу НЧЗ у кон-

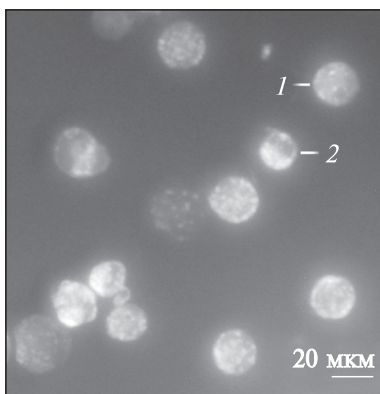
Таблиця 2. Зміни кількості МЯ у клітинах АКЕ внаслідок дії НЧЗ в залежності від концентрації та термінів експозиції

Концентрація НЧЗ, мкг/кг	Кількість МЯ у пухлинних клітинах, ‰	
	24 год	48 год
Контроль	0,33 ± 0,01	0,40 ± 0,02
30	1,33 ± 0,3	2,00 ± 0,1
60	3,33 ± 0,15 *	4,00 ± 0,2 *

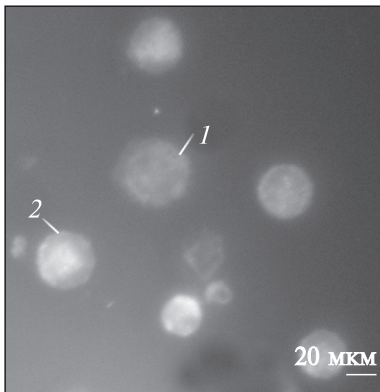
\*  $p < 0,05$  – достовірні зміни відносно значень контролю.



**Рис. 3.** Пухлинні клітини АКЕ з ознаками блебінгу цитоплазматичної мембрани. Забарвлення за Гімза



**Рис. 4.** Пухлинні клітини АКЕ, які не зазнали впливу НЧЗ (контроль), після інкубації з JC-1: 1 – пухлинні клітини з FL1-світінням; 2 – пухлинні клітини з FL2-світінням



**Рис. 5.** Пухлинні клітини АКЕ, інкубовані з JC-1, після впливу НЧЗ у концентрації 60 мкг/кг через 48 год спостереження. Зниження кількості клітин з помаранчевою флуоресценцією FL2 відносно показників контролю

центрації 60 мкг/кг. Цей ефект у незначній мірі зростав з подовженням часової експозиції (табл. 2).

Поряд з цим спостерігались зміни морфології пухлинних клітин тварин з АКЕ внаслідок впливу НЧЗ у концентрації 60 мкг/кг при 24- та 48-годинній експозиції. Визначено велику кількість клітин з блебінгом цитоплазматичної мембрани та значною гетерохроматинізацією (рис. 3).

Встановлений нами генотоксичний ефект дії НЧЗ розміром 5 нм, а саме зростання кількості МЯ при використанні рутинного цитогенетичного методу, підтверджується даними літератури з використанням генотоксичного скринінгу «ДНК-комет» щодо оцінки впливу НЧЗ середніх розмірів. Так, на клітинній лінії китайського хом'ячка СНО-К1 показано, що НЧЗ розміром 10 та 20 нм викликають фрагментацію ДНК за показником «% ДНК у хвості комет», рівень якої становить близько 15 %, що суттєво перевищує значення негативного контролю. Зазначено також, що НЧЗ розміром 10 та 20 нм у своїй більшості локалізуються у вакуолях, а НЧЗ 30 та 45 нм — у лізосомах пухлинних клітин. Активний «вихід» НЧЗ розміром 10 нм спостерігався з пухлинних клітин лінії U 937 [25–27].

Однак не тільки розмір та заряд НЧЗ грають важливу роль при безпосередньому впливі на структуру ДНК, але й заряд самої молекули ДНК та гістонових білків. Припускають, що взаємодія з НЧЗ може відбуватися за рахунок утворення електростатичних зв'язків між негативно зарядженими наночастинками та позитивно зарядженими аміногрупами гістонів. Саме ці зв'язки розцінюють як міцніші за ДНК-гістоновий комплекс, що і призводить до дестабілізації структури геному та загибелі клітин шляхом апоптозу [25, 28, 29]. Разом з тим відомо, що наночастинки металів можуть індукувати апоптоз через мітохондріальний шлях, змінюючи функціональний стан мітохондрій та відповідно їх трансмембранний потенціал. Саме тому нами паралельно з визначенням генотоксичної дії НЧЗ було досліджено зміну трансмембранного мітохондріального потенціалу ( $\Delta\psi_m$ ) пухлинних клітин АКЕ внаслідок впливу цього чинника із урахуванням різної концентрації та часу експозиції з використанням флуорохрому JC-1. Результати досліджень наведені у табл. 3.

Отримані дані свідчать про достовірне зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій (деполяризацію) внаслідок дії НЧЗ у концентрації 30 мкг/кг незалежно від часу експозиції, що є свідченням зниження функціональної активності мітохондрій пухлинних клітин (FL2-флуоресценція). Однак більш істотне зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій пухлинних клітин зазначено при дії НЧЗ у концентрації 60 мкг/кг відносно значень контрольної групи (рис. 4), яке не змінювалось з подовженням часової експозиції (рис. 5). Поясненням цього може бути встановлена здатність наночастинок металовмісних матеріалів індукувати у біологічних об'єктах реактивні форми кисню та призводити до оксидативного стресу, внаслідок чого порушується внутрішньоклітинна передача сигналів та вихід із мітохондрій білків, які здатні активувати апоптоз [29, 30].

Крім того, доведено, що мітохондрії можуть сприймати різноманітні сигнали з позаклітинного середовища, а також від інших клітинних структур (ядра, цитоскелету, ендоплазматичного ретикулу тощо) і в результаті формувати власний сигнал, який скеровує клітину до запрограмованої загибелі [31]. Тим більше, що результати наведених власних морфологічних досліджень показали формування блебінгу цитоплазматичної мембрани пухлинних клітин АКЕ внаслідок дії НЧЗ, який за даними літератури розцінюється як один із етапів загибелі клітин шляхом апоптозу. Ідентифікувати ці зміни можна завдяки інтенсивності флуоресценції JC-1. Зміна кольору флуоресценції відбувається внаслідок зворотного утворення

J-агрегатів барвника при зміні трансмембранного потенціалу [14–16, 31].

Для визначення особливостей взаємозв'язку між показниками geno- та цитотоксичного впливу НЧЗ на пухлинні клітини АКЕ проведено кореляційний аналіз отриманих власних даних. Зіставлення кількісних значень мікроядерного тесту та мітохондріального потенціалу пухлинних клітин показало достовірну обернену кореляційну залежність між падінням  $\Delta\psi_m$  та зростанням кількості МЯ в пухлинних клітинах тварин з АКЕ внаслідок дії НЧЗ у концентраціях 30 мкг/кг через 24 год ( $r = -0,46$ ) та 48 год ( $r = -0,54$ ). Більш виражену зворотну кореляційну залежність між зниженням  $\Delta\psi_m$  та зростанням кількості МЯ у пухлинних клітинах АКЕ виявлено внаслідок впливу НЧЗ у концентрації 60 мкг/кг через 24 та 48 год:  $r = -0,56$  та  $r = -0,61$  відповідно. Отже, кореляційний аналіз показав, що зниження трансмембранного потенціалу спостерігається паралельно із суттєвими генотоксичними змінами, які проявляються у підвищенні кількості МЯ. Тому ми вважаємо, що не випадково деякі дослідники розцінюють зміну трансмембранного потенціалу не лише як характеристику мітохондріальної функції, але і стану клітини в цілому [31–33].

Лише незначна кількість робіт присвячена дослідженню змін трансмембранного потенціалу мітохондрій під впливом металовмісних наночастинок малого та середнього розмірів та їх ролі у розвитку оксидативного стресу. Доведено, що внаслідок оксидативного стресу змінюється трансмембранний потенціал мітохондрій [33–37]. Так, на прикладі клітинної лінії

Таблиця 3. Зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій клітин АКЕ внаслідок впливу НЧЗ з урахуванням різної концентрації та часу експозиції

Концентрація НЧЗ, мкг/кг	Тривалість експозиції та кількість пухлинних клітин з FL1 та FL2 емісією, %			
	24 год		48 год	
	FL1	FL2	FL1	FL2
Контроль	39,0 ± 1,7	61,0 ± 1,7	39,3 ± 1,3	60,6 ± 1,3
30	52,2 ± 1,4 *	48,0 ± 1,6 *	51,0 ± 0,7 *	49,0 ± 0,7 *
60	56,3 ± 2,2 *	43,6 ± 2,3 *	55,30 ± 3,2 *	44,6 ± 3,1 *

Примітка. FL1 – реєстрація емісії при довжині хвилі 530 нм, FL2 – при довжині хвилі 590 нм. \* $p < 0,05$  – зміни достовірні відносно значень контролю.

НеLa встановлено, що НЧЗ діаметром 1,4 нм у концентрації 100 мкг викликають некроз, оксидативний стрес та ушкодження мітохондрій. Крім цього, у порівняльному аспекті показано, що НЧЗ середнього розміру (діаметром 15 нм) є менш гено- та цитотоксичними, ніж з діаметром 1,4 нм. На моделі цієї клітинної лінії завдяки методу проточної цитофлуориметрії та спеціальної кольорової індикації детально проаналізовано утворення та накопичення у клітинах активних форм кисню внаслідок дії НЧЗ різних за розміром та часовою експозицією. Дослідники вважають, що пошкодження функціонування мітохондрій може відбуватись завдяки збільшенню проникності внутрішньої мембрани мітохондрій [38].

На клітинній лінії HaCaT підтверджено токсичну дію НЧЗ малого розміру (діаметром 1,5 нм) в залежності від концентрації наночастинок. Встановлено, що НЧЗ такого розміру у концентрації 10 мкг/мл не викликали істотного зниження мітохондріального потенціалу та рівня внутрішньоклітинного Ca<sup>+</sup>, тоді як при концентрації НЧЗ 25 мкг/мл спостерігались достовірні зміни цих показників [39].

У нашому експерименті НЧЗ, розмір яких становив 5 нм у концентрації 30 мкг/кг, а особливо 60 мкг/кг, призводили до зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій у пухлинних клітинах АКЕ, що узгоджується з даними літератури та доводить їх генотоксичність, обумовлену розмірами та концентрацією наночастинок.

**Висновки.** Встановлено, що проявом цитотоксичного впливу НЧЗ на клітини еритроїдного ряду КМ тварин з АКЕ є зміна співвідношення ПХЕ/НХЕ із зменшенням частки незрілих еритроцитів та зростання кількості МЯ, більш виражені при вищій концентрації наноматеріалу та тривалій його дії. У пухлинних клітинах тварин з АКЕ внаслідок дії НЧЗ відбувається зміна цитоархітекtonіки, підвищення кількості МЯ, зниження трансмембранного мітохондріального потенціалу, які пов'язані із концентрацією та тривалістю дії чинника. Отримані дані свідчать про те, що досліджені НЧЗ розміром 5 нм поряд з цито- та генотоксичними ефектами у пухлинних клітинах викликають зміни у клітинах еритроїдного ряду КМ, тобто на рівні організму, і це

є застереженням щодо широкого застосування їх у медичних цілях. Результати визначення гено- та цитотоксичної дії наночастинок колоїдного золота у системі *in vivo* із застосуванням комплексу критеріїв: цитоморфологічних характеристик клітин еритроїдного ряду КМ, включаючи відсоток МЯ, а також цитоархітекtonіки пухлинних клітин поряд із МЯ-тестом та трансмембранним мітохондріальним потенціалом дають підставу вважати, що сукупність зазначених показників може слугувати тест-системою для оцінки токсичності наноматеріалів різного походження, використання яких передбачається в онкологічній практиці.

*Робота виконана в рамках договору № 5.18.3.53 Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» на 2010–2014 рр.*

#### RATING GENO- AND CYTOTOXIC ACTION OF COLLOIDAL GOLD NANOPARTICLES ON THE ERYTHROID CELLS OF THE BONE MARROW AND TUMORS IN ANIMALS WITH ASCITIC EHRlich CARCINOMA

*Yu.V. Losovska, L.A. Naleskina, N.Yu. Lukyanova, I.M. Todor, V.F. Chekhun*

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv  
E-mail: Lozovskaya.2012@ mail.ru

There have been studied the genotoxic and cytotoxic effects of gold nanoparticles (GNP) with diameter of 5 nm administered at doses of 30 and 60 µg/kg toward erythroid lineage cells from bone marrow (BM) and tumor cells from mice with Ehrlich ascites carcinoma (EAC). Simultaneously in these animals treated with mentioned GNP doses, the changes of transmembrane potential of tumor cells have been analyzed. It has been shown that significant alterations of cell morphology of erythroid lineage BM cells from animals with EAC could be observed upon the action of 30 µg/kg GNP in 48 hours after GNP administration, and the most significant ones – at GNP dose of 60 µg/kg independently on duration of exposure. Also it has been revealed that GNP at a dose of 60 µg/kg causes significant increase of micronuclei (MN) in tumor cells at the background of simultaneous decrease of transmembrane mitochondrial potential and these effects enhance along with increase of treatment duration period. These results allow propose a combined approach for evaluation of biotoxicity of materials during their trials *in vitro* and *in vivo* for generation of vector nanosystems.

ОЦЕНКА ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА НА КЛЕТКИ ЭРИТРОИДНОГО РЯДА КОСТНОГО МОЗГА И ОПУХОЛИ ЖИВОТНЫХ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА

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

Исследованы гено- и цитотоксические эффекты наночастиц золота (НЧЗ) диаметром 5 нм в концентрации 30 и 60 мкг/кг массы тела животного на клетки эритроидного ряда костного мозга (КМ) и опухолевые клетки мышей с асцитной карциномой Эрлиха (АКЭ). Одновременно оценивали изменения трансмембранного потенциала опухолевых клеток. Показано, что достоверные изменения морфологии клеток эритроидного ряда КМ животных с АКЭ наблюдаются при воздействии НЧЗ в концентрации 30 мкг/кг через 48 ч после введения, а наиболее значимые – в концентрации 60 мкг/кг независимо от временной экспозиции. Вместе с тем установлено, что НЧЗ в концентрации 60 мкг/кг вызывают в опухолевых клетках достоверное увеличение количества микроядер, сопряженное с продолжительностью воздействия на фоне одновременного снижения трансмембранного потенциала митохондрий. Полученные результаты являются основой для комплексного подхода к тестированию биотоксичности наноматериалов в системе *in vitro* и *in vivo* при создании векторных наносистем.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Налескіна Л.А., Бородай Н.В., Чехун В.Ф. Сьогодення та перспективи створення наносистем спрямованої доставки лікарських препаратів до пухлинних клітин // Онкологія. – 2009. – **11**, № 3. – С. 166–173.
2. Посвалюк Н.Э., Савин С.З. Перспективы использования нанозолота в онкологии и неврологии // Междунар. журн. прикл. и фундамент. исследований. – 2011. – № 5. – С. 107–108.
3. Weibo C., Ting G., Hao H. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology // Nanotechnol. Sci. Appl. – 2008. – **1**. – P. 17–32.
4. Puvanakrishnan P., Park J., Chatterjee D. et al. In vivo tumor targeting of gold nanoparticles: effect of particle type and dosing strategy // Int. J. Nanomed. – 2012. – **7**. – P. 1251–1258.
5. Jain S., Hirst D.G., O'Sullivan J.M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy // Brit. J. Radiol. – 2012. – **85**. – P. 101–113.
6. Чехун В.Ф. Нанотехнології в онкології: від теорії до молекулярної візуалізації та керованої терапії // Онкологія. – 2008. – **10**, № 4. – С. 414–419.
7. Kang S.J., Lee Y.J., Kim B.M. Cytotoxicity and

genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in UVA-irradiation normal peripheral blood lymphocytes // Drug. Chem. Toxicol. – 2011. – **34**, № 3. – P. 277–284.

8. Asharani P.V., Grace Low Kah Mun, Manoor P. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells // Amer. Chem. Soc. – 2009. – **3**, № 2. – P. 279–290.
9. Wang Z.Y., Song J., Zhang D.S. Nanosized As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> complex combined with magnetic fluid hyperthermia selectively target liver cancer cell // World J. Gastroenterol. – 2009. – **15**, № 24. – P. 2995–3002.
10. Wang S., Lu W., Tovmachenko O. et al. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes // Chem. Phys. Lett. – 2008. – **463**. – P. 145–149.
11. Mukhejee P., Bhattacharya R., Wang P. et al. Antigenic properties of gold nanoparticles // Clin. Cancer Res. – 2005. – **11**, № 9. – P. 3530–3534.
12. Hayashi M., Sofuni T., Ishidate M. Jr. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test // Mutat. Res. – 1983. – **120**, № 4. – P. 241–247.
13. Dias V.M., Oliveria R.M., Machado-Santelli G.M. Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture // Mutat. Res. – 2005. – **565**. – P. 173–179.
14. Smiley S.T., Reers M., Mottola-Hartshorn C. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1991. – **88**. – P. 3671–3675.
15. Salvioli S., Ardizzone A., Franceschi C. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess ΔΨ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis // FEBS Lett. – 1997. – **411**. – P. 77–82.
16. Legrand O., Perrot J.-Y., Simonin G. JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult acute myeloid leukemia // Blood. – 2001. – **97**, № 2. – P. 502–508.
17. Фурсова 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.
18. Джумагазиева Д.С., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б. и др. Исследование мутагенного действия золотых наночастиц в микроядерном тесте // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – № 6. – С. 677–680.
19. Zhang X.D., Wu H.-Y., Wu D. et al. Toxicologic ef-



- fect of gold nanoparticles in vivo by different administration routes // *Int. J. Nanomed.* – 2010. – **5**. – P. 771–773.
20. *Vujacic A., Vodnik V., Joksic G. et al.* Particle size and concentration depend cytotoxicity of citrate capped gold nanoparticles // *Digest J. Nanomaterials and Biostructures.* – 2011. – **6**, № 3. – P. 1367–1376.
  21. *Cho W.S., Cho M., Jeong J. et al.* Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2009. – **236**, № 1. – P. 16–24.
  22. *Chen Y.S., Hung Y.C., Liao I., Huang G.S.* Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles // *Nanoscale Res. Lett.* – 2009. – **4**, № 3. – P. 858–864.
  23. *Lasagna-Reeves C., Gonzales-Romero D., Barria M.A. et al.* Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration on mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – **393**, № 4. – P. 649–655.
  24. *Zhang X.D., Wu D., Shen X. et al.* Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles // *J. Nanomedicine.* – 2011. – **6**. – P. 2071–2081.
  25. *Дибкова С.М., Романько М.Є., Грузіна Т.Г. та ін.* Визначення ушкоджень ДНК наночастинками металів, перспективних для біотехнології // *Біотехнологія.* – 2009. – **2**, № 3. – С. 80–85.
  26. *Бычковский П.М., Кладиев А.А., Щеголев С.Ю. и др.* Коллоидные частицы золота как средство направленной доставки проспидина // *Рос. биотерапевт. журн.* – 2010. – **9**, № 3. – С. 3.
  27. *Резниченко Л.С., Шпильва С.І., Грузіна Т.І. та ін.* Контактна взаємодія наночастинок золота з пухлинними клітинами: вплив розміру та концентрацій // *Доп. НАН України.* – 2010. – № 2. – С. 170–174.
  28. *Rout M.P., Aitchison J.D.* The nuclear pore complex as a transport machine // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, № 20. – P. 16593–16596.
  29. *Sharma V., Anderson D., Dhowan A.* Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2) // *Apoptosis.* – 2012. – **17**, № 8. – P. 852–870.
  30. *Mohd I.K., Akbar M.B., Govil P.A. et al.* Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles // *Biomaterials.* – 2012. – **33**. – P. 1477–1488.
  31. *Schaeublin N.M., Braydich-Stolle L.K., Schrand A.M. et al.* Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity // *Nanoscale.* – 2011. – **3**. – P. 410–420.
  32. *Donaldson K., Poland C.A., Schins P.F.* Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies // *Nanotoxicology.* – 2010. – **4**, № 4. – P. 414–420.
  33. *Аверченко Е.А., Кавок Н.С., Степаненко А.М. и др.* Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса // *Біофіз. вісн.* – 2009. – № 22. – С. 49–56.
  34. *Singh N., Jenkins G.J.S., Asadi R., Doak S.H.* Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) // *Nano Rev.* – 2010. – **1**. doi: 103402/nano.v1i0.-5358.
  35. *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.
  36. *Ferrari M.* Cancer nanotechnology: opportunities and challenges // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – **5**, № 3. – P. 161–171.
  37. *Toyokuni S.* Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation // *Biotherapy.* – 1998. – **11**. – P. 2–3.
  38. *Pan Yu., Leifert A., Ruau D. et al.* Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage // *Small.* – 2009. – **5**, № 18. – P. 2067–2076.
  39. *Schaeublin N.M., Braydich-Stolle L.K., Schrand A.M. et al.* Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity // *Nanoscale.* – 2011. – **3**, № 2. – P. 410–420.

Надійшла 09.09.13