

Взаємодія наночастинок оксиду заліза з клітиною та компонентами біомембрани

І.С. Чекман, А.М. Дорошенко

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ

У статті проаналізовано дані літератури щодо різних аспектів взаємодії наночастинок оксиду заліза (НОЗ) із клітинами та клітинними структурами, а також вплив на їх функції. Показано, що взаємодія наночастинок заліза із клітиною залежить від розміру, форми, складу, поверхневого покриття, заряду, концентрації та часу експозиції наночастинок, а також від типу клітин. Головним механізмом цитотоксичності НОЗ вважається утворення реактивних сполук кисню у реакції Фентона. Можливі й інші механізми, зокрема прямий вплив наночастинок на подвійний ліпідний шар клітинної мембрани. Згідно зі стандартними токсикологічними і фармакологічними випробуваннями деяких препаратів на основі НОЗ, ці наночастинок виявилися достатньо безпечними при застосуванні у людей. НОЗ переважно менш токсичні порівняно із солями заліза (хлоридом і сульфатом), а також іншими наночастинками оксидів металів.

Ключові слова: наночастинок оксиду заліза, взаємодія, цитотоксичність, біомембрана, реакція Фентона, реактивні сполуки кисню.

Наночастинок — частинки, які мають розмір зазвичай менше 100 нм — об'єкт досліджень багатьох вчених світу у зв'язку з їх унікальними хімічними, фізичними, біологічними, фармакологічними властивостями (Чекман І.С., 2009; Faraji M. et al., 2010). З одного боку, уміле застосування наночастинок відкриває нові можливості у багатьох напрямках діяльності людини: створення надпотужних комп'ютерів, надміцних матеріалів, розробка високоефективних антибактеріальних засобів, методів лікування онкологічних захворювань тощо. Однак, з іншого боку, поспішне впровадження наночастинок у повсякденну життєдіяльність людини беззаперечно може нести загрозу для здоров'я. Тому науковий пошук багатьох дослідників спрямований на вивчення впливу наноматеріалів на біологічні об'єкти на різних рівнях організації живого, зокрема на субклітинному, клітинному, органному, цілому організмі. Переважно маловідомими залишаються тонкі механізми взаємодії наночастинок із клітиною та її компонентами, а також вплив на виконувані ними функції (Hoet P.H. et al., 2004; Gwinn M.R., Vallyathan V., 2006; Buzza S. et al., 2007; Seaton A. et al., 2010).

Наночастинок оксиду заліза (НОЗ), неорганічні нанорозмірні частинки магнетиту (Fe_3O_4) та/чи маггеміту (γFe_2O_3) за певних умов мають суперпарамагнітні властивості й тому також називаються суперпарамагнітними НОЗ (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs). Такі НОЗ можуть впливати на повздовжню (спін-решітчасту, T1) та поперечну (спін-спінову, T2) релаксацію оточуючих ядер і поліпшувати контрастність зображення при магнітно-резонансній томографії (МРТ). Також завдяки магнітним властивостям НОЗ ці наночастинок можна спрямовувати в певні ділянки організму, нагрівати, застосовуючи магнітне поле. Вищенаведене робить мож-

ливим застосування НОЗ у багатьох галузях медицини, зокрема різних технологіях розділення клітин, розробці контрастних агентів для МРТ, створенні систем для доставки лікарських засобів, магнітної гіпертермії для лікування при злоякісних новоутвореннях тощо (Laurent S. et al., 2008; Чекман І.С., Дорошенко А.М., 2010; Faraji M. et al., 2010; Lin M.M. et al., 2010).

Більше того, залізо, яке в організмі вивільняється з НОЗ, бере участь в обмінних процесах і включається у загальний пул заліза, в тому числі у гем гемоглобіну, що дає підґрунтя до застосування цих наночастинок для лікування пацієнтів із залізодефіцитною анемією (Briley-Saebo K. et al., 2004; Landry R. et al., 2005; Provenzano R. et al., 2009; Schwenk M.H., 2010).

Згідно зі стандартними токсикологічними і фармакологічними дослідженнями препарати на основі НОЗ є достатньо безпечними при застосуванні у людей, тому ці засоби впроваджуються у практичну медицину (Weissleder R. et al., 1989; Corot C. et al., 2006; Singh A. et al., 2008).

Незважаючи на те, що перспективні ідеї щодо застосування НОЗ у медицині та біології втілюються в життя, все ж деякі ключові аспекти залишаються без остаточного вирішення, зокрема:

- 1) запобігання неконтрольованій агрегації НОЗ у фізіологічних рідинах;
- 2) механізми, на основі яких відбувається захоплення НОЗ клітинами;
- 3) специфічна абсорбція НОЗ до субклітинних компонентів-мішеней після проникнення у клітину;
- 4) коротко- і довготривалий вплив на функцію різних за фенотипом клітин, навантажених НОЗ, зокрема фагоцитів, ендотеліальних клітин (Hofmann-Arntjenbrink M. et al., 2009).

У наведеній роботі проаналізовано дані літератури щодо вивчення різних аспектів

взаємодії НОЗ із клітинами: цитотоксичність НОЗ та її механізми, залежність цитотоксичності від різних факторів, вплив НОЗ на будову та функції спеціалізованих клітин.

Дослідження цитотоксичності НОЗ

Важливим кроком до вивчення того, як наночастинок впливають на живий організм, є дослідження *in vitro* із застосуванням культур клітин. Порівняно із дослідженнями на тваринах ці методики менш етично неоднозначні, більш керовані та відтворювані, а також менш затратні. Першочерговим завданням під час вивчення наноматеріалів є визначення їх цитотоксичності *in vitro*, тому ці дослідження зараз досить поширені. Велика кількість дослідів щодо цитотоксичності заснована на колориметричних методах, які можна розподілити на ті, які визначають цілісність цитоплазматичної мембрани, і ті, які ґрунтуються на визначенні активності мітохондрій (Lewinski N. et al., 2008).

Вплив певних цитотоксичних речовин може фокусуватися на цитоплазматичній мембрані, призводячи до виходу внутрішньоклітинного вмісту назовні. На цьому принципі заснований тест із нейтральним червоним (толуїленовим червоним). Цей слабкий катіонний барвник може проходити через цитоплазматичну мембрану шляхом дифузії та накопичуватися у лізосомах. Якщо клітинна мембрана ушкоджується, захоплення нейтрального червоного зменшується і барвник може потрапляти назовні, що дозволяє розрізняти живі та мертві клітини. Цитотоксичність кількісно вимірюється за допомогою спектрофотометричного дослідження (Borenfreund E., Puernerger J., 1985). Кальцеїн ацетоксиметил і гомодимер етидію є барвниками для живих і мертвих клітин відповідно. Кальцеїн аце-

токсиметил проникає через цитоплазматичну мембрану і перетворюється естеразами живої клітини на кальцеїн, який дає зелене флуоресцентне забарвлення. Якщо клітина пошкоджена або мертва, то виникає червоне забарвлення внаслідок взаємодії з нуклеїновими кислотами непроникного для нормальної клітини гомодимеру етидію (Gupta A.K., Wells S., 2004; Pisanic T.R. 2nd et al., 2007). На визначенні цілісності клітинної мембрани заснований також тест із лактатдегідрогеназою (ЛДГ), яка виходить із клітини через ушкоджену цитоплазматичну мембрану (Haslam G. et al., 2000).

За допомогою ряду інших колориметричних досліджень цитотоксичності визначають механізм загибелі клітин. Мітохондріальна активність може бути визначена за допомогою солей тетразолію. Лише активні мітохондрії містять дегідрогенази, які здатні розщеплювати кільце тетразолію, внаслідок чого реакція відбувається лише в живих клітинах (Mosmann T., 1983). Одним із найбільш поширених тестів є МТТ-аналіз. МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)2,5-дифенілтетразоліум бромід) у розчині має блідо-жовте забарвлення, тоді як в живих клітинах ця сполука перетворюється на формазан темно-синього кольору (Gupta A.K., Gupta M., 2005; Zhang S. et al., 2009). Існують також інші методи на основі тетразолію, зокрема WST-8. Чутливість цього методу вища від МТТ-аналізу (Tomimaga H. et al., 1999).

Окисний стрес у культурах клітин можна визначити, застосовуючи дослідження з глутатіоном. Рівень цього трипептиду визначають за допомогою реактиву Елмана (5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти), який реагує із сульфгідрильними групами глутатіону з утворенням 5-тіо-2-нітробензойної кислоти, продукту жовтого кольору (Vandeputte C. et al., 1994). Перекисне окиснення ліпідів плазматичної мембрани можна виявити за допомогою тесту із тіобарбітуровою кислотою, який полягає у визначенні малонового діальдегіду, токсичного продукту перекисного окиснення ліпідів (Halliwell B., Chirico S., 1993). Дослідження за допомогою нітросинього тетразолію (nitro-blue tetrazolium — NBT) мають на меті визначення супероксидних аніонів, які вказують на «окисний вибух». При цьому NBT перетворюється на формазан (Müller K. et al., 2007).

Концентрацію НОЗ у середовищі клітин під час дослідження цитотоксичності *in vitro* вибирають відповідно до передбачуваного дозування препарату на основі цих наночастинок у медичній практиці. Зокрема ferumoxtrap-10, препарат на основі НОЗ для поліпшення візуалізації за допомогою МРТ, дозується із розрахунку 2,6 мг заліза/кг, а тому після введення в організм його концентрація в плазмі крові може становити приблизно 0,037 мг заліза/мл. Оскільки період напіввиведення цього препарату близько 30 год, то з часом його концентрація в організмі знижується (Müller K. et al., 2007). Препарати для лікування залізодефіцитної анемії потребують вищих доз за-

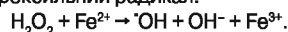
ліза. Зокрема, відомий препарат на основі НОЗ для лікування залізодефіцитної анемії у хворих із хронічною нирковою недостатністю ferumoxhol (Feraheme™) можна вводити по 17 мл (що відповідає 510 мг заліза) двічі з проміжком у 3–8 діб (Feraheme [Package insert], 2009).

Механізми токсичної дії заліза та нанозаліза

Ключовим етапом взаємодії наночастинок із біомембраною є проникнення у клітину. Причому проникнення може бути фагоцитарним чи нефагоцитарним і залежить від розміру, заряду і концентрації наночастинок (Thorek D.L.J., Tsourkas A., 2008). Припускається, що механізм, за допомогою якого наночастинок проникають у клітини без специфічних рецепторів на їх зовнішній поверхні, ґрунтується на пасивному захопленні чи адгезивній взаємодії. Таке захоплення може ініціюватися силами Ван дер Ваальса, електростатичними зарядами, стеричною взаємодією чи ефектами поверхневого натягу і не призводить до утворення везикул. Після такого типу захоплення наночастинок не обов'язково локалізуються у фагосомах, які забезпечують певний захист інших органел клітини від взаємодії з наночастинок. Тому при такому типі захоплення можливе вільне переміщення наночастинок у клітині, що робить їх небезпечними внаслідок можливості прямого впливу на цитоплазматичні білки і органели. Саме тому внаслідок нефагоцитарного захоплення наночастинок можуть виявлятися в різних ділянках всередині клітини, таких як зовнішня клітинна мембрана, цитоплазма, мітохондрії, ліпідні везикули, вздовж ядерної мембрани чи всередині ядра. Залежно від локалізації всередині клітини наночастинок можуть уражати органели чи ДНК, призводити до загибелі клітини (Buzea S. et al., 2007).

Розміщення частинки всередині клітини залежить від розміру наночастинок. Так, частинки розміром 2,5–10 мкм накопичуються у великих цитоплазматичних вакуолях, тоді як менші (100 нм) частинки виявляються в органелах, зокрема мітохондріях, призводячи до порушення будови цих органел (Li N. et al., 2003).

Залізо є «мечем із двома лезами». З одного боку, унікальна здатність заліза змінювати ступінь окиснення, окисно-відновний потенціал і конфігурацію електронного спіну у відповідь на присутність різноманітних лігандів робить його багатofункціональним кофактором білків у контрольованих окисно-відновних реакціях. З іншого боку, залізо виступає у ролі потенційного токсину за відсутності захисту біомолекул, сприйнятливих до окиснення, що вресіт-решт може призводити до розвитку окисного стресу. В основі токсичної дії заліза лежить реакція Фентона — потужна окисно-відновна реакція між перекисом водню і Fe(II) у ролі каталізатора, в результаті якої перекис водню розщеплюється на іон гідроксиду і вільний гідроксильний радикал:



Гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$) належить до реактивних сполук кисню (РСК) і володіє

дуже високою реакційною здатністю: мають короткий період напівжиття (10^{-9} с), ця сполука може пошкоджувати розміщені навколо біологічні молекули. Утворення гідроксильних радикалів внаслідок реакції Фентона є безперервним процесом у більшості живих організмів. Вільні електрони передаються від однієї молекули до іншої, запускаючи, таким чином, каскад пошкоджувальних реакцій (Geisser P., 1997). Однак варто зазначити, що РСК утворюються і у разі нормального обміну речовин у реакціях, які каталізуються такими ферментами, як ксантиноксидаза, циклооксигеназа, цитохром Р450, при транспорті електронів дихальним ланцюгом у мітохондріях (Cadenas E., 2004).

Важливим механізмом токсичної дії наночастинок вважається утворення РСК за допомогою таких джерел:

1) безпосередньо на поверхні наночастинок, коли і окисники, і вільні радикали присутні на поверхні наночастинок;

2) наночастинок перехідних металів, в тому числі заліза, сприяють утворенню РСК у ролі каталізаторів у реакціях типу реакції Фентона;

3) через порушення наночастинок функції мітохондрій;

4) шляхом активації наночастинок прозапальних клітин, зокрема макрофагів, нейтрофілів гранулоцитів (Risom L. et al., 2005).

Цитотоксичність НОЗ, яка виявляється у експериментальних дослідженнях, переважно пов'язується з утворенням РСК у реакції Фентона (Müller K. et al., 2007; Arora P.L. et al., 2009). Зокрема, A. Stroh та співавтори (2004) показали, що інкубація макрофагів щурів (RAW) у середовищі з НОЗ призводила до тимчасового підвищення рівня малонового діальдегіду та карбонілів білків у клітинах. Однак застосування хелатора заліза дефероксаміну спричиняло значне зменшення проявів окисного стресу до рівня контрольних клітин (Stroh A. et al., 2004). A.S. Arbab та співавтори (2003b) показали, що комплекс НОЗ ferumoxides з полі-L-лізіном у досліджуваних клітинах викликав помірно тимчасове підвищення утворення РСК. Однак не виявлено впливу на довготривалу життєздатність, проліферацію і апоптоз мезенхімальних стовбурових клітин і клітин HeLa порівняно з контрольними клітинами (Arbab A.S. et al., 2003b).

Не виключена можливість існування інших значущих механізмів впливу наночастинок, у тому числі НОЗ, на клітину, адже тонкі механізми взаємодії наночастинок із клітинами залишаються маловідомими. У деяких роботах описуються можливі механізми впливу наночастинок на подвійний ліпідний шар, який, як відомо, лежить в основі біологічних мембран. Y. Roiter та співавтори (2008) досліджували утворення пор у подвійних ліпідних шарах з L- α -диміристоїлфосфатидилхоліну за допомогою гідрофільних наночастинок кремнезему діаметром 1–140 нм. Показано, що саме наночастинок діаметром 1,2–22 нм утворювали пори у ліпідному бішарі товщиною близько 5 нм. Крім того, пори утворю-

валися і більшими наночастинками з нерівною високоскривленою поверхнею. Кривизна цих «нерівностей» відповідає діаметру частинок близько 1–10 нм. Наночастинки, які мали розміри понад 22 нм чи менше 1,2 нм, пор у мембранах не утворювали. Таким чином Y. Roiter та співавтори зробили висновок, що вплив наночастинок на ліпідні мембрани залежить від розміру та особливостей поверхні наночастинок (2008).

Електричний заряд наночастинок у розчині також є важливою складовою взаємодії наночастинок з ліпідними мембранами. В. Wang та співавтори (2008) показали, що від'ємно заряджені аніонні наночастинки викликають конформаційні зміни молекул фосфатидилхоліну, зменшуючи кут між гідрофільною і гідрофобною частинами молекули, при цьому підвищувалася щільність ліпідної мембрани і відбувався перехід у гелеву фазу. Цей процес в цілому призводить до скорочення ліпідного бішару. Під дією позитивно заряджених наночастинок відбуваються протилежні конформаційні зміни у молекулах фосфатидилхоліну зі зниженням щільності мембрани в цілому і переходом у рідку фазу (золь) (Wang B. et al., 2008).

Приєднання магнітних наночастинок до поверхні клітин і застосування зовнішнього магнітного поля дає можливість керувати функціями клітин і контролювати їх (Dobson J., 2008).

Фактори, які визначають цитотоксичність НОЗ

Цитотоксичність НОЗ залежить від наявності поверхневого покриття. Якщо «голі» НОЗ проявляють деякі цитотоксичні ефекти, то наночастинки із поверхневим покриттям виявляються відносно нетоксичними. А.К. Gupta та S. Wells (2004) показали, що наночастинки розміром 40–50 нм, покриті поліетиленгліколем (polyethylene glycol — PEG), були біосумісними, оскільки понад 99% клітин залишилися життєздатними порівняно з контролем при найвищій концентрації НОЗ 1 мг/мл. З іншого боку, НОЗ без поверхневого покриття розміром 10–15 нм викликали 25–50% зменшення життєздатності фібробластів при концентрації наночастинок 250 мг/мл (Gupta A.K., Wells S., 2004). В іншому дослідженні А.К. Gupta та М. Gupta (2005) встановили дозозалежність цитотоксичності НОЗ розміром 13,6 нм без поверхневого покриття: при нижчих концентраціях НОЗ (0,05 мг/мл) спостерігалось зменшення життєздатності клітин лише на 20%, тоді як вплив вищої концентрації НОЗ (2,0 мг/мл) проявлявся у скороченні життєздатності клітин на 60%. У цьому дослідженні НОЗ розміром 45 нм, покриті пулуланом (pullulan), практично не мали токсичного впливу на культури клітин: 92% клітин залишалися життєздатними при концентрації наночастинок 2,0 мг/мл. Вчені пов'язали низьку токсичність цих наночастинок із поверхневим покриттям з пулулану, яке запобігало взаємодії ядра НОЗ із компонентами клітини (Gupta A.K., Gupta M., 2005). М. Mahmoudi та співавтори (2009) пока-

зали, що фібробласти миші (L929), які інкубувалися з покритими полівініловим спиртом (polyvinyl alcohol — PVA) НОЗ, демонстрували високу життєздатність, тоді як непокриті НОЗ викликали значний апоптоз цих клітин (Mahmoudi M. et al., 2009).

Застосовуючи різні покриття на основі PEG, W.W. Yu та співавтори (2006) виявили, що НОЗ, покриті PMAO-PEG (poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene)-PEG), є відносно нетоксичними і при концентрації 400 нмоль/л зменшують життєздатність клітин SK-BR-3 лише на 9%. Зменшення життєздатності клітин також дозозалежне (Yu W.W. et al., 2006).

А. Petri-Fink та співавтори (2005) не спостерігали цитотоксичного ефекту на клітинах меланоми людини протягом 2 год під дією НОЗ розміром 9 нм, покритих полівініловим спиртом, функціоналізованим аміногрупами (аміно-PVA) для всіх співвідношень полімер/залізо, які досліджувались. Однак після 24 год експозиції спостерігалася цитотоксична дія при високих концентраціях полімеру (Petri-Fink A. et al., 2005). НОЗ розміром 9–10 нм, покриті аміно-PVA, досліджувалися також F. Cengelli та співавторами (2006). Ці наночастинки виявилися нетоксичними щодо клітин мікроглії N11, тому що захоплення клітинами досліджуваних наночастинок не призводило до утворення оксиду азоту (Cengelli F. et al., 2006).

Цитотоксичність НОЗ залежить також від складу поверхневого покриття. S. Wan та співавтори (2007) тестували вплив НОЗ із трьома поверхневими покриттями і виявили, що НОЗ, покриті метоксиполі(етиленгліколь)-оліго(аспарагіновою кислотою), майже не мали цитотоксичності при досліджуваній концентрації. Однак НОЗ, покриті метокси (поліетиленгліколь)-полі(акриловою кислотою) і полі(акриловою кислотою), значно зменшували життєздатність клітин (до 16%) при концентрації наноалюмінату 400 мг/мл. Непокриті НОЗ також значно скорочували життєздатність клітин (Wan S. et al., 2007).

Іншою групою вчених проводилося дослідження впливу концентрації та часу експозиції суперпарамагнітних НОЗ із середнім розміром 23,8 нм за даними трансмісійної електронної мікроскопії, покритих карбоксиметил курдланом (carboxymethyl curdlan) (СМС-НОЗ), на життєздатність клітинної лінії раку молочної залози В16F10. Після інкубації протягом 24 год токсичність не проявлялася і при найвищій досліджуваній концентрації наночастинок 5 ммоль/л. Однак при інкубації понад 48 год, коли концентрація СМС-НОЗ становила понад 1 ммоль/л, життєздатність клітин знижувалася до 81,03%. Автори вважають, що покриття НОЗ карбоксиметил курдланом знижує цитотоксичність наночастинок (Lee C.M. et al., 2009).

У деяких роботах вивчається вплив розміру частинок на їх взаємодію із клітинами. H.L. Karlsson та співавтори (2009) на клітинній лінії людини А549 не виявили чіткої різниці у цитотоксичності між НОЗ і мікрочастинками оксидів заліза. У цьому дослідженні також показано, що наночас-

тинки CuO значно токсичніші, ніж мікрочастинки CuO, а мікрметрові частинки TiO₂ викликають більше пошкодження ДНК порівняно із наночастинками TiO₂. На основі цих даних вчені зробили висновок про те, що не завжди наночастинки токсичніші за мікрочастинки (Karlsson H.L. et al., 2009).

При дослідженні впливу НОЗ розміром 33,4; 53,5; 107; 207; 289 і 1430 нм при концентрації 10; 50 і 100 мг/мл на Т-клітини протягом 4 год інкубації виявилось, що усі наночастинки проявляли незначний вплив на життєздатність клітин. Винятком були НОЗ розміром 107 нм, які демонстрували несприятливий вплив на клітини навіть при 10 мг/мл. На думку вчених, висока рушійна сила для проникнення наночастинок у Т-клітини, яка визначається позитивним поверхневим зарядом НОЗ, може призводити до загибелі клітин (Thorek D.L., Tsourkas A., 2008).

Взаємодія НОЗ із клітинами залежить не лише від особливостей наночастинок, а й від різновиду клітин. Y. Liu та співавтори (2010) систематизовано оцінили біологічну сумісність НОЗ розміром 11 нм, покритих димеркаптосукциніною кислотою (dimercapto succinic acid — DMSA), із шістьма клітинними лініями ссавців, а саме: RAW264.7, THP-1, Нера-1-6, НерG2, HL-7702, HeLa. Клітини інкубували з шістьма концентраціями НОЗ (0; 20; 30; 40; 50; 100 мг/мл) протягом 48 год. Результати свідчили, що всі клітини ефективно мітилися наночастинками, причому проліферація усіх типів клітин в усіх випробуваних концентраціях значно не пригнічувалася, за винятком НерG2 при концентрації НОЗ 100 мг/мл. Під час дослідження показників окисного стресу виявилось, що рівні загальної супероксиддисмутази і ксантиноксидази значно не змінювалися в усіх піддослідних клітинах, однак рівень активності малонового альдегіду значно зріс. Наночастинки не мали значного впливу на клітинний цикл при всіх дослідних концентраціях, окрім клітин THP-1 та НерG2, у яких НОЗ значно більше призводило до апоптозу при найвищій концентрації 100 мг/мл. Особливо привертає увагу, що при концентрації 30 мг/мл, яка застосовується у дослідженнях внутрішньосудинних контрастних агентів для МРТ, зокрема ferumoxtran-10 (Combidex), на людях, спостерігалось ефективне мічення усіх досліджуваних клітин, при цьому значного впливу на життєздатність клітин, клітинний цикл, апоптоз і оксидативний стрес не виявлено (Liu Y. et al., 2010).

Вплив НОЗ на функції спеціалізованих клітин

Клітини нервової системи. Відсутність негативного впливу НОЗ на клітини мікроглії встановили F. Cengelli та співавтори (2006). T.R. Pinsanic та співавтори (2007) показали, що експозиція зростаючих концентрацій НОЗ з аніонним покриттям із DMSA призводила до дозозалежного зниження здатності клітин феохромоцитоми щурів (PC12) до диференціації у відповідь на нервовий ростовий фактор. Відзначалося також залежне від концент-

рації наночастинок і часу експозиції зниження життєздатності клітин. Загибель більшості клітин відбувалася протягом перших 48 год експозиції. Якщо за концентрації HO_3 у середовищі $0,15$ ммоль/л життєздатними на 2-гу добу експозиції були 70% (у контролі 80%) клітин, то за концентрації 15 ммоль/л — менше 20% клітин. Під дією наночастинок спостерігалися зміни у клітинній морфології у вигляді сферичної форми клітин та порушення цитоскелета (Pisanic T.R. 2nd et al., 2007). HO_3 із поверхневим покриттям, які застосовували для мічення мезенхімальних стовбурових клітин з метою вивчення їх міграції, не погіршували життєздатності й не порушували будови клітин, а також їх потенціал до остеогенної чи нейрональної диференціації (Delcroix G.J. et al., 2009).

Ендотеліальні клітини. Зміни проникності ендотеліальних клітин відіграють важливу роль не лише в патогенезі серцево-судинних захворювань, запаленні чи онкологічних захворюваннях, але також мають визначну дію на доставку лікарських засобів до певних клітин, тканин і органів (Davda J., Labhassetwar V., 2002; Mehta D., Malik A.V., 2006). P.L. Арора та співавтори (2009) застосовували наночастинок магнетиту з діаметром $100\text{--}700$ нм і середнім діаметром 298 нм у концентраціях $12,5\text{--}100$ мкг/мл з метою вивчення їх впливу на проникність ендотеліальних клітин мікроциркуляторного русла. Дані конфокальної мікроскопії, вимірювання трансендотеліального електричного опору свідчать, що HO_3 дозозалежно підвищували проникність моношару з ендотеліальних клітин. Інтактні ендотеліальні клітини приєднуються одна до одної щільно із незначними міжклітинними проміжками. Однак під дією HO_3 цільний моношар розривався і клітини відокремлюються одна від одної з утворенням міжклітинних проміжків, які є критерієм зростання проникності. Вченими показано, що HO_3 викликають полімеризацію і перерозподіл мікротрубочок шляхом утворення РСК у ендотеліальних клітинах. Результати свідчать, що під дією HO_3 відбувається індукція активації протеїнкінази В (Akt) і пригнічення кінази глікогенсинтази β (GSK- β) через фосфоінозитид-3-кіназу (PI3-кіназу) (Арора P.L. et al., 2009). GSK- β — ключова кіназа, яка регулює деполімеризацію мікротрубочок шляхом фосфорилування деяких білків, асоційованих із мікротрубочками. Фосфорилування серину-9 у GSK- β протеїнкіназою В (Akt) пригнічує активність першої і призводить до стабілізації мікротрубочок (Salinas P.C., 2007).

Клітини гладких м'язів. S. Zhang та співавтори (2009) досліджували вплив HO_3 на клітини гладких м'язів. Застосовували три типи HO_3 із подібними кристалічною структурою, магнітними властивостями і розміром (близько 10 нм), які були покриті 3-димеркаптосукциновою кислотою (DMSA- HO_3), 3-амінопропілтриетоксисиланом (APTS- HO_3) або L-глутаміновою кислотою (GLU- HO_3). Захоплення HO_3 клітинами залежало від концентрації наночастинок у середовищі і від часу експозиції,

а також від типу поверхневого покриття. Значно краще клітинами захоплювалися аніонні DMSA- HO_3 на рівні $8,98$ мкг/мг білка; APTS- HO_3 та GLU- HO_3 захоплювалися менше ($3,72$ та $4,6$ мкг/мг білка відповідно). Захоплені наночастинок за даними трансмісійної електронної мікроскопії розташовувалися у лізосомах. Цитотоксичність досліджували за допомогою тесту з МТТ при діапазоні концентрацій DMSA- HO_3 $0,001\text{--}0,5$ мг/мл. DMSA- HO_3 не зумовлювали прозапальної дії, на що вказував визначений рівень фактора некрозу пухлини (ФНП)- α , однак дозозалежно, а також залежно від часу експозиції ($0\text{--}96$ год), пригнічували життєздатність клітин гладких м'язів. Відзначимо, що вплив на життєздатність клітин гладких м'язів (загалом зниження на 20%) не мав статистичної різниці, коли клітини інкубувалися з трьома типами наночастинок при однакових концентраціях $0,1$ мг/мл і періоді експозиції 24 год. Автори зробили висновок, що властивості наночастинок, які застосовувалися в експериментах, наряд чи впливають на життєздатність клітин гладких м'язів (Zhang S. et al., 2009).

Фагоцити. За даними експериментальних досліджень HO_3 після внутрішньовенного введення переважно накопичуються в органах, які належать до моноцитарно-макрофагальної системи (Weissleder R. et al., 1989; Briley-Saebø K. et al., 2004). Фагоцити моноцитарно-макрофагальної системи, виконуючи своє біологічне призначення в організмі, одними з перших контактують із чужорідними речовинами, якими є і HO_3 . Тому дослідження багатьох вчених були спрямовані на вивчення взаємодії моноцитів-макрофагів із цими наночастинами.

Першим питанням, яке цікавить дослідників, є **визначення цитотоксичності HO_3 щодо моноцитів-макрофагів.** Результати багатьох досліджень вказують на низьку цитотоксичність HO_3 . Ferumoxtran-10 (покрите декстраном ультрамалі суперпарамагнітні HO_3 із гідродинамічним розміром до 50 нм) не був токсичним для клітин-попередників гемопоєзу людини після 24 год інкубації при концентрації $0,25$ мг/мл (Daldrup-Link H.E. et al., 2003). Покриті декстраном монокристалічні HO_3 із гідродинамічним розміром 20 нм були нетоксичними для фагоцитарних клітин C6 при концентрації $0,73$ м Fe протягом 10 днів (Schulze E. et al., 1995). Мишачі макрофаги, мічені ferumoxides (кристалами магнетиту $4,3\text{--}4,8$ нм, покритими декстраном із гідродинамічним розміром частинок приблизно $120\text{--}180$ нм), мали вміст заліза близько 18 пг/клітину за відсутності ознак токсичності (Arbab A.S. et al., 2004). Не спостерігалося зростання апоптозу у свіжоізольованих моноцитах людини, навантажених наночастинами ferrixan (Resovist®) — покриті карбоксидекстраном HO_3 із гідродинамічним розміром близько 60 нм, або ferumoxides до $27,92$ і $8,9$ пг/клітину (Metz S. et al., 2004).

K. Müller та співавтори (2007) детально вивчали вплив ferumoxtran-10 на моноцити-макрофаги людини. Дослідження гострої

цитотоксичності HO_3 показали, що за концентрації $0,0001\text{--}1$ мг/мл протягом 72 год наночастинок не спричиняють токсичних ефектів на моноцити-макрофаги людини, однак помірна цитотоксичність виявляється при концентрації 10 мг/мл (70–80% життєздатних клітин). Дослідження довготривалої токсичності HO_3 шляхом 2-тижневого спостереження за моноцитами-макрофагами людини, попередньо інкубованими протягом 4 діб у середовищі із вмістом наночастинок у концентрації $0,4$ мг/мл, виявило помірне (до 80%) зниження життєздатності клітин (Müller K. et al., 2007).

Однак, на противагу зазначеному, є результати досліджень, які свідчать про негативний вплив HO_3 щодо фагоцитів та клітин гемопоєзу. Ferumoxides індукуював апоптоз у моноцитах людини після 4 год взаємодії при концентрації $\geq 0,5$ мг/мл (Metz S. et al., 2004). Мічення мезенхімальних стовбурових клітин наночастинами ferumoxides при концентрації $0,1\text{--}0,25$ мг/мл протягом 48 і 72 год призводило до зростання загибелі клітин (Arbab A.S. et al., 2003a).

Вплив HO_3 на функції моноцитів-макрофагів

Вивчення впливу HO_3 на функції моноцитів-макрофагів, таких як утворення цитокінів, хемотаксис, фагоцитоз, є не менш важливим для більш повного розуміння взаємодії наночастинок з організмом.

Проведені дослідження вказують на відсутність прозапальної активації моноцитів-макрофагів під дією HO_3 . При інкубації макрофагів очеревини мишей з ferumoxtran-10 при концентраціях 100 і 500 мкг/мл протягом 48 год не спостерігалася індукція значного утворення інтерлейкіну (IL)-1. Інкубація з ferumoxides зумовлювала незначне підвищення утворення IL-1, яке все одно залишалося значно нижчим, ніж те, яке спостерігалось під дією ліполісахариду (ЛПС) (Raynal I. et al., 2004). Інкубація макрофагів щурів лінії RAW 264.7 у середовищі з HO_3 , покритих цитратом, при концентрації $1,5$ чи $3,0$ ммоль/л протягом 90 хв приводила до внутрішньоклітинного накопичення заліза приблизно $2,5\text{--}4$ пг Fe у клітині. При цьому концентрація внутрішньоклітинного малонового діальдегіду, біомаркера окисного стресу, зросла тимчасово, але через 24 год повернулася до нормального рівня. Навантаження клітин RAW 264.7 наночастинами не впливало на їх проліферацію (Stroh A. et al., 2004). Нейтрофільні гранулоцити людини інкубувалися *in vitro* з частинками магнетиту, покритими полістиреном (середній діаметр — 800 нм), до внутрішньоклітинного навантаження залізом приблизно 6 пг Fe у клітині. Це призводило до незначного підвищення продукції супероксидного аніону, яке, однак, було значно нижчим, ніж при стимуляції 4-форбол-12-мірїстат-13-ацетатом. Однак виявлено, що із зростанням навантаження клітин залізом спостерігається зниження хемотаксису щодо стандартного хемотрактанта форміл-метіоніл-лейцил-

фенілаланіну (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine — fMLP) (Krieg F.M. et al., 1995).

K. Müller та співавтори (2007) встановили, що ferumoxtran-10 не індукував підвищення утворення моноцитами-макрофагами людини цитокінів ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6 чи -12, або утворення супероксид-аніону. Це привело до висновку, що моноцити-макрофаги не активувалися наночастинками ferumoxtran-10. Цей препарат не мав хемоатрактантної активності для моноцитів-макрофагів людини при концентрації 0,1 нг/мл–10 мг/мл, тому маловірогідно, що ці наночастинки, розташовані позаклітинно, можуть притягувати моноцити *in vivo*. Більше того, клітини, попередньо навантажені наночастинками, демонстрували значний хемотаксис у напрямку fMLP, хоча він був зниженим порівняно з контрольними клітинами. При концентрації ferumoxtran-10 10 мг/мл спостерігалось значне зниження міграції моноцитів-макрофагів людини до 34,8%. На думку вчених, це зниження міграції, очевидно, викликане не внаслідок токсичності НОЗ, а внаслідок повільнішої міграції більш важких клітин, навантажених залізом. Присутність 0,1–5 мг/мл ferumoxtran-10 позаклітинно чи у високій концентрації внутрішньоклітинно (10 пг Fe на клітину) не перешкоджала Fc-опосередкованому фагоцитозу *E. coli in vitro* (Müller K. et al., 2007).

У дослідженні J.K. Hsiao та співавторів (2008) на макрофагах мишей, навантажених ферукарботраном (ferrihap, Resovist®), встановлено зниження фагоцитарної функції навіть при 10 мкг Fe/мл, тоді як інші функції, включаючи міграцію і утворення ФНП- α та NO, зросли при найвищій концентрації НОЗ 100 мкг Fe/мл. При цьому проліферація і життєздатність макрофагів не змінилася (Hsiao J.K. et al., 2008).

Взаємодія НОЗ із **еритроцитами** відбувається під час парентеральних медичних маніпуляцій із застосуванням цих наночастинок. Група вчених із Румунії за допомогою електронової абсорбційної спектроскопії та коливальної спектроскопії комбінаційного розсіювання (раманівської спектроскопії) досліджувала взаємодію між наночастинками магнетиту, стабілізованими лимонною кислотою, із середнім розміром 11,44 нм, за даними трансмісійної електронної мікроскопії, та еритроцитами. Виявлено, що внаслідок взаємодії з цими НОЗ із еритроцитів вивільнялася значно більша кількість гемоглобіну, порівняно з контролем. Отже, досліджувані наночастинки мали гемолітичний ефект, який виявився дозозалежним (Creangă D.E. et al., 2009).

Порівняльна цитотоксичність НОЗ з іншими наночастинками, а також із солями заліза

Порівняно з деякими іншими наночастинками НОЗ виявляють порівняно невисоку токсичність щодо культур клітин. S.M. Hussain та співавтори (2005) за допомогою дослідження з МТТ та ЛДГ порівню-

вали цитотоксичність цілого ряду наночастинок, зокрема: Ag (розміром 15 та 100 нм), MoO₃ (30 та 150 нм), Fe₃O₄ (30 та 47 нм), Al (103 нм), TiO₂ (40 нм), Cd (1000 нм), на культурі клітин печінки щурів BRL 3A. Вченими визначена величина EC₅₀, що відображає таку концентрацію наночастинок у середовищі, яка підвищувала витік ЛДГ з клітин до 50% (ЛДГ EC₅₀) або зменшувала відновлення МТТ на 50% (МТТ EC₅₀), а отже, чим нижче значення EC₅₀, тим токсичніші частинки. Найтоксичнішими виявилися частинки Cd 1000 нм, для яких EC₅₀ становила менше 1 мкг/мл. Наночастинки срібла, порівняно з іншими наночастинками, спричиняли несприятливий вплив на культуру клітин за відносно низьких концентрацій (10–50 мкг/мл). Для частинок срібла розміром 100 і 15 нм МТТ EC₅₀ була визначена на рівні 19±5,2 і 24±7,25 мкг/мл відповідно, а ЛДГ EC₅₀ — на рівні 24±9,25 і 50±10,25 мкг/мл відповідно. При цьому МТТ EC₅₀ та ЛДГ EC₅₀ для частинок Fe₃O₄ (30 та 47 нм), Al (103 нм) та TiO₂ (40 нм) виявилася понад 250 мкг/мл. Наночастинки MoO₃ зайняли проміжне положення (МТТ EC₅₀ приблизно 170 мкг/мл та ЛДГ EC₅₀ — приблизно 230 мкг/мл). Вчені показали, що токсичність наночастинок срібла пов'язана з надмірним накопиченням реактивних сполук кисню, можливо, за рахунок вичерпання кількості відновленого глутатіону (Hussain S.M. et al., 2005).

A. Gojova та співавтори (2007) виявили, що наночастинки Fe₂O₃ не викликали запальної відповіді в ендотеліальних клітинах аорти людини при досліджуваних концентраціях (0,001–50 мкг/мл), тоді як наночастинки оксиду ітрію (Y₂O₃) і оксиду цинку (ZnO) викликали виражену запальну реакцію вище порогової концентрації понад 10 мкг/мл (Gojova A. et al., 2007).

Вченими із Томського політехнічного університету також показано, що нанопорошки заліза, отримані шляхом електричного вибуху провідників в аргоні, менш токсичні порівняно із нанопорошками срібла і міді. При дослідженні *in vivo* у діапазоні доз 25–500 мкг/кг маси тіла при застосуванні нанопорошку заліза не загинула жодна лабораторна тварина (миші BALB/c). При цьому найбільш токсичною виявилася наномідь із ЛД₁₀₀ (доза, що викликає загибель всіх тварин піддослідної групи) на рівні 50–125 мкг/кг, дещо нижча токсичність у наносрібла із ЛД₁₀₀ на рівні 250–500 мкг/кг. По відношенню до пухлинних клітин K-562 найбільш цитотоксичними виявилися наномідь і наносрібло. Нанозалізо значно поступалося цитотоксичністю (Ильин А.П. и соавт., 2007).

Не меншу токсичність НОЗ порівняно із наночастинками міді та цинку виявили І.П. Арсентьева та співавтори (2007). Мінімальна доза препарату (МДП), ЛД₅₀ (доза, що викликає загибель 50% тварин піддослідної групи) і ЛД₁₀₀ для наночастинок заліза відповідно становили 1100; 2200 і 3200 мкг/кг, тоді як для міді та цинку 25; 45; 620 мкг/кг та 450; 700; 1200 мкг/кг відповідно. Крім цього, встановлено, що наночастинки металів менш токсичні, ніж сульфати цих металів. Так, МДП, ЛД₅₀ і ЛД₁₀₀ для FeSO₄

становлять 20; 60 і 90 мкг/кг відповідно. Отже, токсичність наночастинок заліза майже у 40 разів нижча порівняно із сульфатом заліза. Наночастинки міді у 7 разів, а наночастинки цинку — у майже 30 разів менш токсичні порівняно із сульфатами цих металів (Арсентьева І.П. и соавт., 2007).

Подібні результати отримані і для хлориду заліза. При порівнянні цитотоксичного впливу НОЗ (ferumoxtran-10) і FeCl₃ на макрофаги людини із застосуванням нейтрального червоного K. Müller та співавтори (2007) виявили, що FeCl₃ є значно токсичнішим: при концентрації FeCl₃ 0,0056 мг/мл життєздатність моноцитів-макрофагів людини зменшувалася до 64±27,1% після 24 год і до 44,7±24,2% — після 48 год. При цьому НОЗ навіть у концентрації 10 мг/мл і часі експозиції 72 год були помірно токсичними (виживаність клітин — приблизно 80%) (Müller K. et al., 2007).

Висновки

У основі токсичного впливу заліза і нанозаліза, в тому числі НОЗ, лежить утворення РСК переважно внаслідок реакції Фентона. Не виключений механізм прямої взаємодії наночастинок із клітинними мембранами. НОЗ, як свідчать результати досліджень багатьох учених, в цілому проявляють низьку цитотоксичність, що спонукає подальшу розробку на основі цих наночастинок біомедичних застосувань. На взаємодію між НОЗ та клітиною впливають розмір, форма, поверхневий заряд, склад НОЗ, наявність і хімічна будова поверхневого покриття, концентрація НОЗ у середовищі, а також тип клітин і час інкубації з цими наночастинками. Токсичність НОЗ нижча порівняно з іншими наночастинками оксидів, а також солями заліза, зокрема сульфатом та хлоридом. Перспективним є вивчення більш тонких механізмів взаємодії наночастинок із клітиною, зокрема подальше дослідження їх фагоцитарного і нефагоцитарного захоплення, комплексоутворення НОЗ із компонентами біологічних мембран, хроматину, вивчення довгострокової токсичності, зокрема канцерогенезу цих наноматеріалів, а також розвиток математичного прогнозування властивостей наночастинок.

Список використаної літератури

Арсентьева И.П., Глуценко Н.Н., Фолманис Г.Э. и др. (2007) Исследование наночастиц металлов в качестве биологически активных препаратов. Материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием «Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины» 11–12 октября 2007 года, Новосибирск (<http://nanosvit.com/public/docs/nanoparticles.ppt>).

Ильин А.П., Коршунов А.В., Толбанова Л.О., Астанкова А.П. (2007) Биологическая активность нанопорошков металлов, полученных с помощью электрического взрыва проводников. Материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием «Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины» 11–12 октября 2007 года, Новосибирск (http://nanosvit.com/public/docs/nanoparticles_1.pdf).

Чекман І.С. (2009) Наночастинки: властивості та перспективи застосування. Укр. біохім. журн., 81(1): 122–129.

- Чекман І.С., Дорошенко А.М.** (2010) Клініко-фармакологічні властивості наночастинок заліза. *Укр. мед. часопис*, 3(77): 44–50 (<http://www.umj.com.ua/article/2911>; <http://www.umj.com.ua/wp-content/uploads/archive/77/pdf/1537 ukr.pdf>).
- Аропа Р.І., Qian Y., Shao R. et al.** (2009) Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part. Fibre Toxicol.*, 6: 1.
- Arbab A.S., Bashaw L.A., Miller B.R. et al.** (2003a) Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation*, 76(7): 1123–1130.
- Arbab A.S., Bashaw L.A., Miller B.R. et al.** (2003b) Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*, 229(3): 838–846.
- Arbab A.S., Yocum G.T., Kalish H. et al.** (2004) Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood*, 104(4): 1217–1223.
- Borenfreund E., Puerner J.** (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.*, 24(2–3): 119–124.
- Briley-Saebo K., Bjørnerud A., Grant D. et al.** (2004) Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell Tissue Res.*, 316(3): 315–323.
- Buzea C., Blandino I.I.P., Robbie K.** (2007) Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4): MR17–MR71.
- Cadenas E.** (2004) Mitochondrial free radical production and cell signalling. *Mol. Aspects Med.*, 25(1–2): 17–26.
- Cengelli F., Maysinger D., Tschudi-Monet F. et al.** (2006) Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 318(1): 108–116.
- Corot C., Robert P., Idée J.M., Port M.** (2006) Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58(14): 1471–1504.
- Creangă D.E., Culea M., Nădejde C. et al.** (2009) Magnetic nanoparticle effects on the red blood cells. *J. Physics: Conference Series*, 170(1): 012019.
- Daldrup-Link H.E., Rudelius M., Oostendorp R.A. et al.** (2003) Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology*, 228(3): 760–767.
- Davda J., Labhasetwar V.** (2002) Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int. J. Pharm.*, 233(1–2): 51–59.
- Delcroix G.J., Jacquart M., Lemaire L. et al.** (2009) Mesenchymal and neural stem cells labeled with HEDP-coated SPIO nanoparticles: *in vitro* characterization and migration potential in rat brain. *Brain Res.*, 1255: 18–31.
- Dobson J.** (2008) Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.*, 3(3): 139–143.
- Faraji M., Yamini Y., Rezaee M.** (2010) Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *J. Iran. Chem. Soc.*, 7(1): 1–37.
- Feraheme [Package insert]** (2009) AMAG Pharma, Inc., Lexington, MA.
- Haslam G., Wyatt D., Kitos P.A.** (2000) Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology*, 32(1): 63–75.
- Geisser P.** (1997) Iron therapy and oxidative stress. *Met. Based Drugs.*, 4(3): 137–152.
- Gojova A., Guo B., Kota R.S. et al.** (2007) Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ. Health Perspect.*, 115(3): 403–409.
- Gupta A.K., Gupta M.** (2005) Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 26(13): 1565–1573.
- Gupta A.K., Wells S.** (2004) Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans. Nanobioscience*, 3(1): 66–73.
- Gwinn M.R., Vallyathan V.** (2006) Nanoparticles: health effects — pros and cons. *Environ. Health Perspect.*, 114(12): 1818–1825.
- Hallwell B., Chirico S.** (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(5 Suppl.): 715S–725S.
- Hoet P.H., Brüske-Hohfeld I., Salata O.V.** (2004) Nanoparticles — known and unknown health risks. *J. Nanobiotechnology*, 2(1): 12.
- Hofmann-Antenbrink M., von Rechenberg B., Hofmann H.** (2009) Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. In: M.C. Tan (Ed.) *Nanostructured materials for biomedical applications*, Transworld Research Network, Kerala, India, in press, 2009, p. 119–149.
- Hsiao J.K., Chu H.H., Wang Y.H. et al.** (2008) Macrophage physiological function after superparamagnetic iron oxide labeling. *NMR Biomed.*, 21(8): 820–829.
- Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M. et al.** (2005) *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*, 19(7): 975–983.
- Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Müller L.** (2009) Size-dependent toxicity of metal oxide particles — a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.*, 188(2): 112–118.
- Krieg F.M., Andres R.Y., Winterhalter K.H.** (1995) Superparamagnetically labelled neutrophils as potential abscess-specific contrast agent for MRI. *Magn. Reson. Imaging*, 13(3): 393–400.
- Landry R., Jacobs P.M., Davis R. et al.** (2005) Pharmacokinetic study of ferumoxytol: a new iron replacement therapy in normal subjects and hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.*, 25(4): 400–410.
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A. et al.** (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.*, 108(6): 2064–2110.
- Lee C.M., Jeong H.J., Kim E.M. et al.** (2009) Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles decorated with carboxymethyl curdlan. *Macromol. Res.*, 17(2): 133–136.
- Li N., Sioutas C., Cho A. et al.** (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.*, 111(4): 455–460.
- Lin M.M., Kim H.H., Kim H. et al.** (2010) Iron oxide-based nanomagnets in nanomedicine: fabrication and applications. *Nano Rev.*, 1: 4883.
- Liu Y., Chen Z., Wang J.** (2010) Systematic evaluation of biocompatibility of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles with six different mammalian cell lines. *J. Nanopart. Res.* (<http://www.springerlink.com/content/r73302516p2044w5/fulltext.pdf>).
- Lewinski N., Colvin V., Drezek R.** (2008) Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4(1): 26–49.
- Mahmoudi M., Simchi A., Vali H. et al.** (2009) Cytotoxicity and cell cycle effects of bare and poly(vinyl alcohol)-coated iron oxide nanoparticles in mouse fibroblasts. *Adv. Eng. Mater.*, 11(12): B243–B250.
- Mehta D., Malik A.B.** (2006) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.*, 86(1): 279–367.
- Metz S., Bonaterra G., Rudelius M. et al.** (2004) Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents *in vitro*. *Eur. Radio.*, 14(10): 1851–1858.
- Mosmann T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65(1–2): 55–63.
- Müller K., Skepper J.N., Posfai M. et al.** (2007) Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages *in vitro*. *Biomaterials*, 28(9): 1629–1642.
- Petri-Fink A., Chastellain M., Juillerat-Jeanneret L. et al.** (2005) Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials*, 26(15): 2685–2694.
- Pisanic T.R. 2nd, Blackwell J.D., Shubayev V.I. et al.** (2007) Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, 28(16): 2572–2581.
- Provenzano R., Schiller B., Rao M. et al.** (2009) Ferumoxytol as an intravenous iron replacement therapy in hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 4(2): 386–393.
- Raynal I., Prigent P., Peyramaure S. et al.** (2004) Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest. Radiol.*, 39(1): 56–63.
- Risom L., Möller P., Loft S.** (2005) Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.*, 592(1–2): 119–137.
- Roiter Y., Ornatska M., Rammoan A.R. et al.** (2008) Interaction of nanoparticles with lipid membrane. *Nano Lett.*, 8(3): 941–944.
- Salinas P.C.** (2007) Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends Cell Biol.*, 17(7): 333–342.
- Schulze E., Ferrucci J.T. Jr., Poss K. et al.** (1995) Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label *in vitro*. *Invest. Radiol.*, 30(10): 604–610.
- Schwenk M.H.** (2010) Ferumoxytol: a new intravenous iron preparation for the treatment of iron deficiency anemia in patients with chronic kidney disease. *Pharmacotherapy*, 30(1): 70–79.
- Seaton A., Tran L., Aitken R., Donaldson K.** (2010) Nanoparticles, human health hazard and regulation. *J. R. Soc. Interface*, 7(Suppl. 1): S119–129.
- Singh A., Patel T., Hertel J. et al.** (2008) Safety of ferumoxytol in patients with anemia and CKD. *Am. J. Kidney Dis.*, 52(5): 907–915.
- Stroh A., Zimmer C., Gutzeit C. et al.** (2004) Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic. Biol. Med.*, 36(8): 976–984.
- Thorek D.L., Tsourkas A.** (2008) Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*, 29(26): 3583–3590.
- Tominaga H., Ishiyama M., Ohseto F. et al.** (1999) A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, 36: 47–50.
- Vandeputte C., Guizon I., Genestie-Denis I. et al.** (1994) A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol. Toxicol.*, 10(5–6): 415–421.
- Wan S., Huang J., Guo M. et al.** (2007) Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticle dispersions stabilized with poly(ethylene glycol)-oligo(aspartic acid) hybrids. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 80(4): 946–954.
- Wang B., Zhang L., Bae S.C., Granick S.** (2008) Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(47): 18171–18175.
- Weissleder R., Stark D.D., Engelstad B.L. et al.** (1989) Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.*, 152(1): 167–173.
- Yu W.W., Chang E., Sayes C.M. et al.** (2006) Aqueous dispersion of monodisperse magnetic iron

oxide nanocrystals through phase transfer. *Nanotechnology*, 17(17): 4483–4487.

Zhang S., Chen X., Gu C. et al. (2009) The effect of iron oxide magnetic nanoparticles on smooth muscle cells. *Nanoscale Res. Lett.*, 4(1): 70–77.

Взаимодействие наночастиц оксида железа с клеткой и компонентами биомембраны

И.С. Чекман, А.М. Дорошенко

Резюме. В статье проанализированы данные литературы относительно различных аспектов взаимодействия наночастиц оксида железа (НОЖ) с клетками и клеточными структурами, а также влияние на их функции. Показано, что взаимодействие наночастиц железа с клеткой зависит от размера, формы, состава, поверхностного покрытия, заряда, концентрации и времени экспозиции наночастиц, а также от типа клеток. Главным механизмом цитотоксичности НОЖ считается образование реактивных соединений кислорода в реакции Фентона. Возможны и другие механизмы, в частности прямое влияние наночастиц на двойной

липидный слой клеточной мембраны. Согласно стандартным токсикологическим и фармакологическим испытаниям некоторых препаратов на основе НОЖ, эти наночастицы оказались достаточно безопасными при применении у людей. НОЖ преимущественно менее токсичны сравнительно с солями железа (хлоридом и сульфатом), а также другими наночастицами оксидов металлов.

Ключевые слова: наночастицы оксида железа, взаимодействие, цитотоксичность, биомембрана, реакция Фентона, реактивные соединения кислорода.

Interaction of iron oxide nanoparticles with cell and components of biomembrane

I.S. Chekman, A.M. Doroshenko

Summary. Literature data on investigation of different aspects of iron oxide nanoparticles (IONs) interaction with cells and cells structures, and influence on their functions are analyzed in present article. It was shown that nanoparticle-cell interaction depends on size, shape, composition, surface coat-

ing, surface charge, concentration and exposure time of nanoparticles, and also type of cells. It is considered that the main mechanism of IONs cytotoxicity is generation of reactive oxygen species in Fenton reaction. Other mechanisms, especially direct impact of nanoparticles on lipid bilayer of cell membrane, are also possible. According to standard toxicological and pharmacological tests of several preparations based on IONs, this nanoparticles show a satisfactory safety profile for human use. IONs are predominantly less toxic in comparison with iron salts (chloride and sulphate) and other metal oxide nanoparticles.

Key words: iron oxide nanoparticles, interaction, cytotoxicity, biomembrane, Fenton reaction, reactive oxygen species.

Адреса для листування:

Чекман Іван Сергійович
03057, Київ, просп. Перемоги, 34
Національний медичний університет
ім. О.О. Богомольця, кафедра
фармакології та клінічної фармакології
E-mail: chekman_iv@yahoo.co.uk

Реферативна інформація

Омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты против дегенерации сетчатки



Важная роль омега-3-полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний доказана при проведении нескольких крупных исследований (GISSI (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Insufficienza Cardiaca)-Prevenzione в 2006 г.; JELIS (Japan EPA Lipid Intervention Study) в 2007 г.; GISSI-HF (Heart Failure) в 2008 г.). Согласно рекомендациям Американской кардиологической ассоциации (American Heart Association) и Европейского общества кардиологов (European Society of Cardiology), даже здоровым людям рекомендуется включать в рацион жирную морскую рыбу 2 раза в неделю, чтобы получить необходимую дозу омега-3-ПНЖК (около 1 г/сут). Помимо того, изучается роль омега-3-ПНЖК в профилактике и лечении прочих заболеваний, в патогенезе которых важную роль играют циклооксигеназный (синтез простагландинов и тромбоксанов) и липооксигеназный (синтез лейкотриенов) пути метаболизма ПНЖК.

Элиот Л. Берсон (Eliot L. Berson) и его коллеги из Лаборатории Бермана — Гунда по изучению пигментных дегенеративных заболеваний сетчатки (Berman-Gund Laboratory for the Study of Retinal Degenerations) при Гарвардской медицинской школе (Harvard Medical School), Бостон, США, опубликовали результаты своего исследования по изучению влияния омега-3-ПНЖК как потенцирующего агента в комплексе с витамином А при пигментной дегенерации сетчатки (ПДС).

Напомним, ПДС — наследственное заболевание, отмечающееся с частотой около 1:4000 человек и связанное с измене-

ниями пигментного эпителия сетчатки глаза. Основные его проявления: нарушение сумеречного зрения в юном возрасте, сужение полей зрения в молодом; к 60 годам, по мере прогрессирования болезни, сохраняется лишь туннельное зрение или даже наступает слепота.

Американские ученые провели анализ данных, полученных в 3 клинических исследованиях (n=357), проходивших в 1884–1991 гг., 1996–2001 гг., 2003–2008 гг. Все пациенты с ПДС получали стандартную терапию ретинолом в высоких дозах (15 000 МЕ/сут), однако при этом те из них, кто одновременно принимал хотя бы 0,2 г омега-3-ПНЖК/сут, продемонстрировали замедление ежегодных темпов дегенерации остроты зрения на 40% и чувствительности центрального поля зрения — на 50%. Это может быть связано с тем, что для высвобождения активного метаболита витамина А из его комплекса с интерфоторецепторным ретиноидсвязывающим протеином (interphotoreceptor retinoid binding protein — IRBP) необходимо участие докозагексаеновой кислоты (одной из омега-3-ПНЖК, присутствующих в жирной морской рыбе).

Параллельно Э.Л. Берсон и его коллеги изучали информацию о возможных токсических эффектах высоких доз витамина А. Как оказалось, у пациентов без нарушений функции печени применение 15 000 МЕ ретинола ежедневно в течение 25 лет наблюдения не привело ни к каким проявлениям токсичности. Исключение составляют беременные с ПДС — из-за возможной фетотоксичности в этой группе пациентов суточная доза ретинола не должна превышать 10 000 МЕ.

Berson E.L., Rosner B., Sandberg M.A. et al. (2012) ω-3 Intake and Visual Acuity in Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Vitamin A. *Arch. Ophthalmol.*, Feb. 13 [Epub ahead of print].

Kelly J.C. (2012, February 13) High Omega-3 Boosts Vitamin A Effect in Retinitis Pigmentosa. *Medscape* (<http://www.medscape.com/viewarticle/758575>).

Алина Жигунова

© Picstudio / Dreamstime.com / Dreamstock.ru