

Ю.В. ЛОЗОВСЬКА<sup>1</sup>, І.М. ТОДОР<sup>1</sup>, Н.Ю. ЛУК'ЯНОВА<sup>1</sup>,  
С.Л. ЄФІМОВА<sup>2</sup>, І.А. БОРОВИЙ<sup>2</sup>, Ю.В. МАЛЮКІН<sup>2</sup>, В.Ф. ЧЕХУН<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

<sup>2</sup> Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, Харків

E-mail: Lozovskaya.2012@mail.ru

## ЗМІНА СТАБІЛЬНОСТІ ГЕНОМУ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ПУХЛИННИХ КЛІТИН У СИСТЕМІ *IN VIVO* ВНАСЛІДОК ВПЛИВУ НАНОФЕРОМАГНЕТИКІВ З РІЗНИМИ РОЗМІРАМИ НАНОЧАСТИНОК

*У системі in vivo досліджували трансмембранний мітохондріальний потенціал та стабільність геному пухлинних клітин внаслідок дії наноферромагнетиків з різними розмірами наночастинок. Оцінку генотоксичного впливу наноферромагнетиків на пухлинні клітини та зміну їхнього мітохондріального потенціалу проводили із застосуванням мікроядерного тесту та мітохондріального флуоресцентного зонду JC-1. Встановлено, що наноферромагнетики з діаметром наночастинок 40 та 100 нм у концентрації 3 мг/кг істотно не знижували трансмембранний потенціал мітохондрій та у незначній мірі збільшували частоту мікроядер пухлинних клітин. Зазначено, що наночастинок заліза у концентрації 6 мг/кг виявляли різнонаправлений характер змін мітохондріального потенціалу та частоти мікроядер в залежності від їхнього розміру. Доведено, що наночастинок заліза з меншим діаметром викликали суттєве зростання трансмембранного потенціалу мітохондрій пухлинних клітин на фоні незмінної кількості мікроядер, а з більшим діаметром – навпаки. Отримані дані можуть слугувати важливим критерієм для подальших досліджень у експериментальній онкології для створення оптимальної системи цілеспрямованої доставки протипухлинних препаратів до тканини-мішені.*

**Ключові слова:** наноферромагнетик, трансмембранний мітохондріальний потенціал, мікроядра, пухлинні клітини, наночастинок заліза, асцитна карцинома Ерліха.

**Вступ.** На сучасному етапі розвитку медикоментозної терапії для онкологічних хворих досить актуальним є застосування здобутків нанотехнологій [1–3].

Відомо, що завдяки наночастинкам із заданими фізико-хімічними властивостями можна змінювати певні процеси, що відбуваються на рівні клітини. Важливим етапом досліджень в експериментальній онкології залишається моде-

лювання та прогнозування програмованої клітинної смерті малігнізованої клітини. Апоптоз є складним процесом, при якому відбуваються зміни з боку ядра (фрагментація ДНК, конденсація хроматину, каріорексис та ін.), цитоплазми (збільшення площі ендоплазматичного ретикулуму з одночасною конденсацією його гранул, зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій), зміна проникності плазматичної мембрани для невеликих за розміром молекул, поява експресії фосфатидилсерину на поверхні мембрани та ін. [4]. Відомо, що апоптоз виконує важливу регулюючу функцію між процесами проліферації і диференціації та елімінацією пошкоджених і трансформованих клітин.

У сучасній літературі широко дискутується спектр можливих механізмів дії наночастинок (титану, срібла та заліза) на різні структури клітини: зміна трансмембранного потенціалу мітохондрій та пошкодження геному основного ядра [5, 6]. Саме тому дослідження цих змін у пухлинних клітинах внаслідок дії наноферромагнетика з урахуванням розмірів наночастинок може бути новим підходом до створення системи спрямованої (векторної) доставки ліків до пухлинних клітин із мінімальною токсичністю для всього організму.

Останнім часом при аналізі функціонального стану клітин використовують флуоресцентний зонд 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетилбензімідазолілкарбоцианін йодид (JC-1), органічний барвник, свічення якого є чутливим до зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій [7–9].

Як свідчать дані літератури, класичним методом визначення генотоксичного впливу шкідливих чинників на живі організми є мікроядерний тест та трансмембранний потенціал мітохондрій [10–12].

© Ю.В. ЛОЗОВСЬКА, І.М. ТОДОР, Н.Ю. ЛУК'ЯНОВА,  
С.Л. ЄФІМОВА, І.А. БОРОВИЙ, Ю.В. МАЛЮКІН,  
В.Ф. ЧЕХУН, 2013

Метою нашої роботи була оцінка стабільності геному та трансмембранного потенціалу мітохондрій пухлинних клітин внаслідок впливу наноферромагнетиків з різними розмірами наночастинок в системі *in vivo* із використанням двох методичних підходів – мікроядерного тесту та флуоресцентного зонду JC-1.

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були дві групи нелінійних білих мишей з перешпеленою асцитною карциномою Ерліха (АКЕ) по  $2 \cdot 10^6$  клітин на тварину. Через 7 діб після перешпелення АКЕ мишам внутрішньочеревно вводили наноферромагнетики (ФМ), синтезовані спільно із співробітниками Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України (патент № 99211). За розмірами наночастинок ФМ були розподілені на два види – ФМ-1 та ФМ-2.

Для ФМ-1 розмір наночастинок у ліпосомальній формі становив 300 нм, без неї – 80–100 нм. Ці наночастинок стабілізували біологічно активними сурфактантами та полімерами. ФМ-2 складався з вкритих олеатом натрію та ПЕГ наночастинок, розмір яких дорівнював 40–60 нм. Всі ФМ вводили внутрішньочеревно в дозі 3 та 6 мг/кг маси тіла тварини. Всіх тварин було розподілено на п'ять груп: контрольна група; групи тварин, які отримували ФМ-1 та ФМ-2 у концентрації 3 та 6 мг/кг.

Мишей декапітували із дотриманням всіх норм біоетики. Генотоксичний вплив ФМ-1 та ФМ-2 на пухлинні клітини аналізували через 24 та 48 год після внутрішньочеревного введення. У цих клітинах також оцінювали зміну трансмембранного потенціалу мітохондрій внаслідок дії ФМ-1 та ФМ-2 з урахуванням часової експозиції.

Суспензію клітин АКЕ наносили на знежирені предметні скельця у вигляді крапель, декілька хвилин витримували на повітрі та фіксували у метанолі протягом 2 хв. Оцінку кількості мікроядер (МЯ) проводили на препаратах, пофарбованих акридиновим жовтогарячим (3,0 мг/мл на фосфатному буфері рН 6,4–6,5) із розрахунку на 1000 клітин АКЕ за допомогою флуоресцентного мікроскопу Micros MC-300 (40×10) [11].

Оцінку мітохондріального потенціалу клітин здійснювали за допомогою флуоресцентної мікроскопії із використанням мітохондріального зонду JC-1. Метод заснований на здатності барв-

ника JC-1 акумулюватися у мітохондріях живих неушкоджених клітин, які мають потенціал та утворюють агрегати з флуоресцентними властивостями (так звані J-агрегати) [7–9], утворення яких супроводжується зміною сигналу флуоресценції із зеленої ( $\lambda_{\text{макс}} = 530$  нм, свічення мономерів барвника) на помаранчеву ( $\lambda_{\text{макс}} = 590$  нм, свічення агрегатів барвника). Деполяризація мітохондрій в апоптичних або ушкоджених клітинах призводить до деагрегації барвника, тобто до зменшення співвідношення помаранчева/зелена флуоресценція [7–9].

Клітини АКЕ ( $5 \cdot 10^5$  кл/мл) з барвником JC-1 у ДМСО (4 мкл/мл) інкубували у фізрозчині впродовж 1,5 год, періодично перемішуючи. Оцінку пухлинних клітин проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа Micros MC-300. Збудження флуоресценції відбувалось на довжині хвилі 488 нм. Емісію спостерігали при довжині хвилі 530 нм (свічення мономерів барвника, яке характерне для апоптичних клітин, FL1) та на довжині хвилі 590 нм (світіння неапоптичних, функціонально активних клітин, FL2). Оцінювали процентний вміст FL1 та FL2 на 100 клітин АКЕ [7–9, 12].

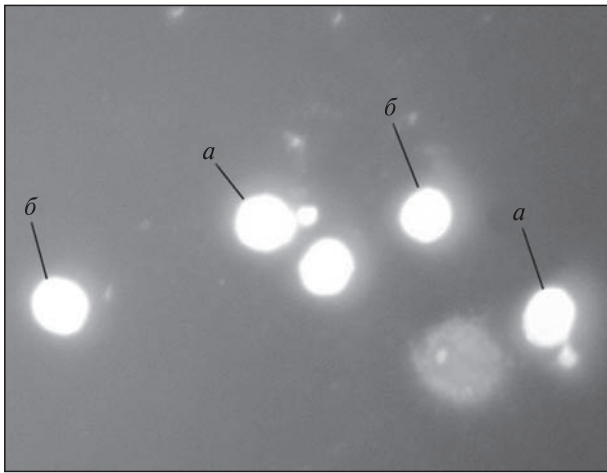
Відмінності між показниками різних груп оцінювали із застосуванням t-критерію Ст'юдента, значущими їх вважали при  $p < 0,05$ . Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6.0.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Кількісний аналіз МЯ та оцінка мітохондріального потенціалу пухлинних клітин внаслідок впливу ФМ-1. Аналіз цитологічних препаратів, виготовлених із пухлинних клітин тварин з АКЕ, дозволив чітко визначити МЯ (рис. 1).

Результати досліджень генотоксичного впливу ФМ-1 представлені у табл. 1.

Порівняльний аналіз генотоксичного ефекту ФМ-1 у концентрації 3 мг/кг на клітини АКЕ через 24 та 48 год після його введення виявив незначне зростання кількості МЯ у клітинах АКЕ через 48 год. Слід зазначити, що найбільш виражений генотоксичний ефект ФМ-1 показав при концентрації 6 мг/кг незалежно від часу експозиції.

Паралельно досліджували зміну трансмембранного мітохондріального потенціалу пухлинних клітин внаслідок впливу ФМ-1 з урахуванням різної концентрації та експозиції (табл. 2).



**Рис. 1.** Пухлинні клітини АКЕ: *а* – клітини з мікроядром, *б* – клітини без мікроядра. Забарвлення акридиновим жовтогарячим.  $\times 400$

Отримані результати свідчать про зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій (деполяризацію) внаслідок дії ФМ-1 у концентраціях 3 та 6 мг/кг незалежно від часу експозиції,

**Таблиця 1.** Кількісний аналіз МЯ у клітинах тварин з АКЕ внаслідок дії ФМ-1 із урахуванням концентрації та експозиції ( $n = 5$ )

Концентрація ФМ	Час експозиції та кількість МЯ, %	
	24 год	48 год
Контроль	2,20 $\pm$ 0,20	2,10 $\pm$ 0,20
3 мг/кг	2,40 $\pm$ 0,24	3,00 $\pm$ 0,32
6 мг/кг	6,00 $\pm$ 0,01*	6,00 $\pm$ 0,01*

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

**Таблиця 2.** Кількісна оцінка клітин АКЕ з FL1 та FL2 флуоресценцією, що зазнали впливу ФМ-1 у концентрації 3 та 6 мг/кг ( $n = 5$ )

Концентрація ФМ	Час експозиції та кількість пухлинних клітин з FL1 та FL2 флуоресценцією, %			
	24 год		48 год	
	FL1	FL2	FL1	FL2
Контроль	24,60 $\pm$ 1,63	75,40 $\pm$ 1,63	22,58 $\pm$ 1,54	77,42 $\pm$ 1,63
3 мг/кг	32,20 $\pm$ 1,50*	67,80 $\pm$ 1,50*	37,00 $\pm$ 0,45*	63,00 $\pm$ 0,45*
6 мг/кг	50,20 $\pm$ 3,40*	49,80 $\pm$ 3,40*	70,40 $\pm$ 3,26*	29,60 $\pm$ 3,26*

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

що є свідченням зниження функціональної активності пухлинних клітин за рахунок мітохондрій (вміст клітин з помаранчевою флуоресценцією, FL2). Однак слід зазначити, що при дії ФМ-1 у концентрації 6 мг/кг спостерігали найбільш суттєве зниження трансмембранного мітохондріального потенціалу, який значно зменшувався із збільшенням часу експозиції.

Встановлено також, що зі зростанням концентрації ФМ-1 із зазначеними фізико-хімічними параметрами наночастинок відбувається достовірне зниження трансмембранного потенціалу (деполяризація мембран) і одночасне зростання кількості МЯ. Однак більш істотну кореляційну залежність між зниженням трансмембранного мітохондріального потенціалу та кількістю МЯ виявлено в пухлинних клітинах внаслідок впливу ФМ-1 у концентрації 6 мг/кг через 48 год після введення ( $r = 0,64$ ), ніж при 24-годинній експозиції ( $r = 0,35$ ). Слід зазначити, що не спостерігали достовірної кореляційної залежності між цими показниками в пухлинних клітинах внаслідок дії ФМ-1 у концентрації 3 мг/кг (незалежно від часової експозиції).

*Кількісний аналіз мікроядер та оцінка трансмембранного мітохондріального потенціалу пухлинних клітин АКЕ внаслідок впливу ФМ-2.* Аналогічним чином проаналізовано генотоксичний ефект ФМ-2 на клітини АКЕ (МЯ-тест) з урахуванням концентрації і експозиції та оцінено зміну мітохондріального потенціалу цих клітин.

Дослідження генотоксичного ефекту ФМ-2 у концентраціях 3 та 6 мг/кг на клітини АКЕ через 24 та 48 год експозиції виявило лише тенденцію зростання кількості МЯ у клітинах

АКЕ при концентрації ФМ-2 6 мг/кг незалежно від часу експозиції. Слід зазначити, що зі збільшенням часу експозиції не встановлено зростання генотоксичного ефекту ФМ-2 у концентраціях 3 та 6 мг/кг (табл. 3).

Порівняльний аналіз результатів МЯ-тесту у клітинах АКЕ внаслідок впливу ФМ-1 та ФМ-2 виявив більш виражений генотоксичний ефект ФМ-1 незалежно від часу експозиції. Аналогічним чином проаналізовано зміну трансмембранного мітохондріального потенціалу цих клітин внаслідок впливу ФМ-2 із урахуванням його концентрації та експозиції (табл. 4). Встановлено, що ФМ-2 у концентрації 3 мг/кг не спричиняє істотних змін трансмембранного потенціалу мітохондрій у пухлинних клітинах навіть зі зростанням часу експозиції. Виявлено достовірну кореляційну залежність між трансмембранним мітохондріальним потенціалом та кількістю МЯ у даних клітинах внаслідок дії ФМ-2 в концентрації 3 мг/кг через 24 та 48 год  $r = 0,86$  та  $r = 0,74$  відповідно.

ФМ-2 у концентрації 6 мг/кг спричиняє зростання мітохондріального потенціалу (гіперполяризація) у пухлинних клітинах незалежно від часу експозиції, що підтверджується зростанням кількості мітохондрій з помаранчевим спектральним світінням – FL2 (рис. 2). Слід зазначити також більш високу інтенсивність та яскравість світіння у даній групі. Крім того, встановлено зворотний кореляційний зв'язок між зміною трансмембранного мітохондріального потенціалу та частотою МЯ внаслідок дії ФМ-2 у концентрації 6 мг/кг через 48 год експозиції ( $r = -0,46$ ). При 24-годинній експозиції він був відсутнім ( $r = 0,25$ ).

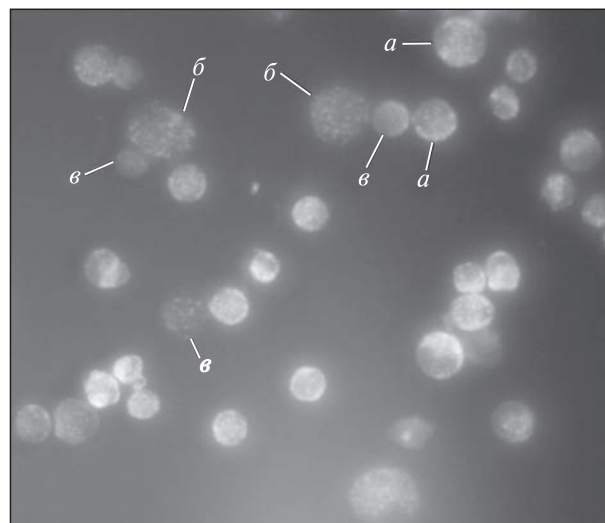


Рис. 2. Пухлинні клітини АКЕ, інкубовані з JC-1 після впливу ФМ-2 у концентрації 6 мг/кг: *a* – пухлинні клітини з FL2-флуоресценцією; *b* – зруйновані клітини із ознаками гіперполяризації мітохондріальної мембрани; *v* – пухлинні клітини з FL1-флуоресценцією.  $\times 400$

Таблиця 3. Кількісна оцінка МЯ в пухлинних клітинах, що зазнали впливу ФМ-2 у концентраціях 3 та 6 мг/кг ( $n = 5$ )

Концентрація ФМ	Час експозиції та кількість МЯ, %	
	24 год	48 год
Контроль	1,33 $\pm$ 0,66	1,66 $\pm$ 0,33
3 мг/кг	1,66 $\pm$ 0,33	1,66 $\pm$ 0,33
6 мг/кг	2,33 $\pm$ 0,33*	2,33 $\pm$ 0,33

Таблиця 4. Кількісна оцінка клітин АКЕ з FL1 та FL2 флуоресценцією, що зазнали впливу ФМ-2 у концентрації 3 та 6 мг/кг ( $n = 5$ )

Концентрація ФМ	Час експозиції та кількість пухлинних клітин з FL1 та FL2 флуоресценцією, %			
	24 год		48 год	
	FL1	FL2	FL1	FL2
Контроль	25,80 $\pm$ 2,37	74,20 $\pm$ 2,37	24,75 $\pm$ 1,63	75,25 $\pm$ 1,63
3 мг/кг	28,40 $\pm$ 6,66	71,40 $\pm$ 3,74	28,00 $\pm$ 3,74	72,00 $\pm$ 3,74
6 мг/кг	21,00 $\pm$ 1,00	79,00 $\pm$ 1,00	12,00 $\pm$ 1,00*	88,00 $\pm$ 1,00*

Примітка. FL1 – реєстрація емісії на довжині хвилі 525 нм, FL2 – реєстрація емісії на довжині хвилі 590 нм. \* $p < 0,05$  – зміни достовірні відносно значень контролю.



З літературних джерел відомо, що трансмембранний потенціал мітохондрій тісно пов'язаний з їх функціонуванням та виникає завдяки електрохімічному градієнту протонів по обидва боки мембрани. Він також характеризує мітохондріальну функцію та загальний стан клітини в цілому. Однак відомо, що трансмембранний мітохондріальний потенціал може варіювати в межах однієї клітинної популяції та навіть в межах однієї клітини [4, 12]. Досить детально досліджено зміну флуоресценції JC-1 на ізольованих гепатоцитах самців щурів при модулюванні окисного стресу [13].

Існує незначна кількість робіт, присвячених дослідженню трансмембранного потенціалу мітохондрій внаслідок впливу наночастинок. Так, на клітинній лінії A-549 показано, що наночастинок оксиду заліза  $Fe_2O_3$ , розмір яких становив 100–300 нм, характеризуються супермагнетизмом (SPION) та можуть індукувати генотоксичність через генерацію оксидативного стресу. У роботі детально проаналізовано надходження феромагнетика за допомогою ендцитозу з поступовим його вивільненням в цитоплазму у вигляді іонів  $Fe^{2+}$ . Надходження вільного іону  $Fe^{2+}$  призводить до вивільнення гідроксильних радикалів та  $Fe^{3+}$ , при цьому завдяки реакції Фентона запускається механізм оксидативного стресу. Ці зміни спричиняють пошкодження ДНК, структури протеїнів, полісахаридів та ліпідів. У даній роботі доведено, що одним з наслідків пошкодження геному є утворення мікроядер та фрагментацій ДНК і внаслідок оксидативного стресу змінюється трансмембранний потенціал мітохондрій [14]. Інші дослідження також вказують на роль наночастинок в опосередкованому пошкодженні ДНК завдяки розвитку оксидативного стресу [15–17]. Для оцінки зміни стабільності геному клітин у системах *in vivo* та *in vitro* внаслідок дії нанокомпозитів та наночастинок застосовують різні методичні підходи, одним із яких є МЯ-тест [5, 10, 11, 18]. Сучасні дослідники пропонують різні шляхи дії наноферомагнетиків в залежності від їхнього розміру і стабілізатора. Вивчення гено- та цитотоксичності наночастинок оксидів металів ( $TiO_2$ ,  $CuO$ ,  $Fe_2O_3$ ) на клітинній лінії A-549 виявило різнонаправлений характер змін цих показників в залежності від розміру та фізико-хіміч-

них властивостей цих сполук. Встановлено, що серед оксидів металів саме частинки  $CuO$  спричиняють найбільші пошкодження функції мітохондрій та ДНК. Порівняльний аналіз гено- та цитотоксичного ефектів частинок  $Fe_2O_3$  в залежності від їхніх розмірів (нано- та мікрометри) не виявив істотних відмінностей [19–21]. Однак малодослідженою проблемою залишається аналіз гено- та цитотоксичної дії частинок  $Fe_2O_3$  та  $Fe_3O_4$  в залежності від їхнього діаметра у нанометрах. Так, завдяки використанню 2',7'-дихлорфлуоресцеїндацетату встановлено збільшення продукції активних форм кисню (АФК) та незначну зміну стабільності геному на прикладі клітинної лінії A-549 внаслідок впливу наночастинок  $Fe_3O_4$ , розмір яких дорівнював 20–60 нм. Всі ці зміни досліджували лише через 24 год після введення наночастинок оксиду заліза [21].

На прикладі клітинної лінії Jukat показано рецептор-опосередкований сигнальний шлях апоптозу через активацію мітохондріального шляху (каспаза 8, Bid, tBid), що призводить до падіння трансмембранного мітохондріального потенціалу та виходу у цитозоль проапоптичних факторів. Встановлено, що на відміну від клітин Jukat інкубація клітин Jukat/A4 з вінкристином, гідроксисечовиною та циклогексимідом не призводить до падіння трансмембранного потенціалу мітохондрій, а цитозар, метотрексат та блеоміцин індукують гіперполяризацію мітохондріальних мембран [22].

Індуктори апоптозу спричиняють зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій завдяки збільшенню розміру пор. Зараз відомі різні фактори, що викликають розкриття цих пор –  $NAD(P)H$ , ADP, активні форми кисню та ін. Внаслідок розкриття мітохондріальних пор та розриву зовнішньої мембрани відбувається вивільнення апоптогенних факторів – цитохрому C, прокаспаз 2, 3, 9, білка AIF. Саме вплив ФМ-1 спричиняв зниження трансмембранного потенціалу та поступове вивільнення проапоптичних факторів з подальшою дестабілізацією геному ядра. Такий висновок підтверджується отриманими результатами, а саме зниження трансмембранного мітохондріального потенціалу пухлинних клітин внаслідок впливу ФМ-1 призводить до зростання кількості клітин зі FL1 (зелене спектральне сві-

чення) та поступового одночасного зростання кількості МЯ.

Однак збільшення розміру пор не завжди є єдиним механізмом вивільнення мітохондріальних міжмембранних білків у цитоплазму. Існує гіпотеза, що розрив зовнішньої мембрани мітохондрій може відбуватися завдяки гіперполяризації мембрани. Відомо також, що значне збільшення АФК може призводити до підвищення трансмембранного потенціалу мітохондрій, коли зменшується використання АТР [23]. Саме тому можна зробити припущення, що наночастинки оксиду заліза меншого розміру (ФМ-2) у більшій кількості накопичуються у цитозолі та індують утворення значної кількості вільних гідроксильних радикалів, Fe<sup>3+</sup> та АФК, що у свою чергу і призводить до гіперполяризації мембрани та загибелі клітин. Це припущення підтверджується фактом власних досліджень, що ФМ-2 у концентрації 6 мг/кг не викликав істотного збільшення МЯ (гіперполяризацію мітохондріальної мембрани та апоптоз). Отримані результати досліджень показали, що ФМ-1 та ФМ-2, які характеризуються різними розмірами наночастинок, мають дещо відмінні шляхи впливу на трансмембранний потенціал мітохондрій та на геном пухлинних клітин у системі *in vivo*.

**Висновки.** Виявлено різнонаправлений характер змін частоти МЯ та трансмембранного мітохондріального потенціалу пухлинних клітин у системі *in vivo* внаслідок впливу різних за розмірами наночастинок ФМ. Встановлено, що наноферромагнетик з діаметром наночастинок 40–60 та 100 нм у концентрації 3 мг/кг істотно не змінює трансмембранний потенціал мітохондрій та не викликає пошкодження геному ядра, про що свідчить незначне зниження Δψ<sub>m</sub> та незначне зростання кількості МЯ. Доведено інший характер змін трансмембранного потенціалу мітохондрій та частоти МЯ пухлинних клітин в системі *in vivo* внаслідок дії цих наноферромагнетиків у концентрації 6 мг/кг. Зазначено, що наноферромагнетик з більшим діаметром наночастинок спричиняв достовірне зниження мітохондріального потенціалу на фоні збільшення кількості МЯ. При дії наноферромагнетика з меншим розміром наночастинок на пухлинні клітини встановлено зростання трансмембранного мітохондріального потенціалу

при незмінних значеннях МЯ. Використаний підхід оцінки стабільності геному та мітохондріального потенціалу пухлинних клітин у системі *in vivo* внаслідок впливу наноферромагнетиків з різними розмірами наночастинок може слугувати важливим критерієм для подальших досліджень в експериментальній онкології для створення оптимальної системи цілеспрямованої доставки протипухлинних препаратів до тканини-мішені.

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

*Yu. V. Lozovskaya, I. N. Todor, N. Yu. Lukyanova, S. L. Yefimova, I. A. Borovoy, Y. V. Malyukin, V. F. Chekhun*  
R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine  
E-mail: Lozovskaya.2012@mail.ru

EVALUATION OF GENOME STABILITY AND MITOCHONDRIAL POTENTIAL OF TUMOR CELLS *IN VIVO* UPON THE ACTION OF NANOFERROMAGNETICS WITH DIFFERENT SIZES OF NANOPARTICLES

Genome stability and transmembrane potential of tumor cells from animals bearing ascite Ehrlich carcinoma upon the action of nanoferrromagnetics with different sizes of nanoparticles were studied in comparative aspect. It has been shown that nanoferrromagnetics with diameter of nanoparticles of 40 and 100 nm at the concentration of 3 mg/kg do not alter significantly mitochondrial transmembrane potential and tumor cell genome. Oppositely directed character of alteration of these indexes has been registered if nanoferrromagnetics at the concentration of 6 mg/kg have been used. It has been shown that iron nanoparticles of smaller sizes caused an increase of mitochondrial transmembrane potential in tumor cells on the background of unaltered quantity of micronuclei while these of larger diameter caused the opposite effects. The obtained results point on different ways of influence of iron nanoparticles dependent on their sizes on mentioned above indexes *in vivo*.

*Ю. В. Лозовская, И. Н. Тодор, Н. Ю. Лукьянова, С. Л. Ефимова, И. А. Боровой, Ю. В. Малукин, В. Ф. Чехун*

ИЗМЕНЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В СИСТЕМЕ *IN VIVO* ПОД ДЕЙСТВИЕМ НАНОФЕРРОМАГНЕТИКОВ С РАЗЛИЧНЫМИ РАЗМЕРАМИ НАНОЧАСТИЦ

В сравнительном аспекте исследована стабильность генома и трансмембранный потенциал опухолевых клеток животных с асцитной карциномой Эрлиха под действием наноферромагнетиков с раз-

ними размерами наночастиц. Показано, что наноферромагнетики с диаметром наночастиц 40 и 100 нм в концентрациях 3 мг/кг существенно не изменяют трансмембранный потенциал митохондрий и геном опухолевых клеток. Установлен разнонаправленный характер изменений этих показателей под действием наноферромагнетиков в концентрациях 6 мг/кг. Показано, что наночастицы железа меньшего диаметра вызывали увеличение трансмембранного потенциала митохондрий опухолевых клеток на фоне неизменяющегося количества митохондрий, а большего диаметра — наоборот. Полученные результаты дают возможность предполагать наличие различных путей действия наночастиц железа в зависимости от их размера на перечисленные показатели в системе *in vivo*.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Налескіна Л.А., Бородай Н.В., Чехун В.Ф.* Съогдення та перспективи створення наносистем спрямованої доставки лікарських препаратів до пухлинних клітин // *Онкологія*. — 2009. — **11**, № 3. — С. 166–173.
2. *Чехун В.Ф.* Нанотехнології в онкології: від теорії до молекулярної візуалізації та керованої терапії // *Онкологія*. — 2008. — **10**, № 4. — С. 414–419.
3. *Северин Е.С., Родина А.В.* Проблемы и перспективы современной противоопухолевой терапии // *Усп. биол. химии*. — 2006. — **46**. — С. 43–64.
4. *Жукова О.В.* Молекулярные механизмы нарушения апоптоза лимфоцитов при хронической вирусной инфекции // *Бюл. Сиб. медицины*. — 2006. — № 3. — С. 19–26.
5. *Asharani P.V., Mun G.L., Manoor P.* Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells // *Amer. Chem. Soc.* — 2009. — **3**, № 2. — P. 279–290.
6. *Wang Z.Y., Song J., Zhang D.S.* Nanosized  $As_2O_3/Fe_2O_3$  complex combined with magnetic fluid hyperthermia selectively target liver cancer cell // *World J. Gastroenterol.* — 2009. — **15**, № 24. — P. 2995–3002.
7. *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.
8. *Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C.* JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess  $\Delta\Psi$  changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis // *FEBS Lett.* — 1997. — **411**. — P. 77–82.
9. *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.
10. *Каркищенко Н.Н.* Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов // *Биомедицина*. — 2009. — № 1. — С. 5–27.
11. *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.
12. *Johnson L.V., Walsh M.L., Cheh L.B.* Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1980. — **77**. — P. 990.
13. *Аверченко Е.А., Кавок Н.С., Степаненко А.М.* Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса // *Биофиз. вісн.* — 2009. — № 22(1). — С. 49–56.
14. *Singh N., Jenkins G.J., Asadi R.J., Dook S.H.* Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) // *Nano Rev.* — 2010. — **1**, № 5358. — P. 1–15.
15. *Altman S.A., Randers-Eichhorn T.H.* 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.
16. *Ferrari M.* Cancer nanotechnology: opportunities and challenges // *Nat. Rev. Cancer*. — 2005. — **5**, № 3. — P. 161–171.
17. *Toyokuni S.* Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation // *Biotherapy*. — 1998. — **11**. — P. 2–3.
18. *Norppa H., Falck G.C.* What do human micronuclei contain? // *Mutagenesis*. — 2003. — **18**, № 3. — P. 221–233.
19. *Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P.* Size-dependent toxicity: of metal oxide particles — A comparison between nano- and micrometer size // *Toxicol. Lett.* — 2008. — **21**. — P. 1726–1732.
20. *Кундієв Ю.І., Демецька О.В., Кучерук Т.К.* Біологічна активність частинок нанодіапазону в залежності від їх розміру // *Онкологія*. — 2008. — **10**, № 2. — С. 217–224.
21. *Könzöl M., Ebeling S., Goldenberg E. et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide(magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK and NF- $\kappa$ B // *Chem. Res. Toxicol.* — 2011. — **24**, № 9. — P. 1460–1475.
22. *Блохин Д.Ю., Карпова Л.В., Власенкова Н.К.* Становление фенотипа множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток может определяться изменением свойств их митохондрией // *Рос. биотерап. журн.* — 2007. — **6**, № 1. — С. 3.
23. *Azbil R.D., Mu X., Bruce-Keller A.J.* Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activity // *Brain. Res.* — 1997. — **765**. — P. 283–290.

Надійшла 23.08.12