



УДК 577. 6:602.606:61. 542.8

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ТА МУТАГЕННОЇ ДІЇ НОВИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ГРЕБЕНЕПОДІБНИХ ПОЛІАМФОЛІТІВ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ У КЛІТИНИ-МІШЕНІ

**Н. С. Фінюк^{1, 3}, Є. З. Філяк¹, Н. М. Бойко¹,
Н. Є. Міміна², О. С. Заїченко², Р. С. Стойка^{1, 3}**

¹ Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

² Національний університет «Львівська Політехніка»
вул. С. Бандери, 12, Львів 79013, Україна

³ Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Створення нових наноматеріалів і бурхливий розвиток нанотехнологій зумовлюють не лише значні досягнення у сфері медицини, у різних галузях промисловості й точних технологій, але й небажані наслідки для здоров'я людини і навколишнього середовища. Нами досліджено токсичність за умов *in vitro* і мутагенну активність новосинтезованих поліамфолітних носіїв типу БГ-2, які плануються для використання як носії нуклеїнових кислот у клітини-мішені. Встановлено, що поліамфолітні носії з ряду БГ-2 у концентрації менше 0,01% не чинять цитотоксичного впливу на клітини ссавців. Не виявлено також їхньої здатності індукувати генні мутації у тесті Еймса. За відсутності метаболічної активації в клітинах-мішенях досліджувані носії не мали генотоксичного впливу. Додавання мікросомальної фракції печінки щура не супроводжувалося мутагенним ефектом носіїв щодо штамів TA98 і TA100 *Salmonella typhimurium*. Це свідчить про безпечність використання новосинтезованих поліамфолітних носіїв із ряду БГ-2 як засобів для доставки нуклеїнових кислот у клітини-мішені.

Ключові слова: поліамфолітні носії нуклеїнових кислот, цитотоксичність, мутагенність, тест Еймса.

ВСТУП

Наноматеріали і нанотехнології все ширше впроваджуються у різні сфери діяльності людини. Наноматеріали мають велике біомедичне значення, зокрема у фармакології та хіміотерапії. Наночастинки є основою засобів адресної доставки лікарських засобів, а також виявлення молекулярних біомаркерів у сучасній діагностиці [4, 5].

Проте бурхливий розвиток нанотехнологій пов'язаний не лише зі значними досягненнями у медицині, різних галузях промисловості й високоточних технологій, але й із небажаним впливом на здоров'я людини і стан навколишнього середовища [6, 8]. Тому розробка нових наноматеріалів для застосування у терапії та діагностиці повинна відбуватися у тісному зв'язку із вивченням можливих побічних негативних ефектів. Побічні ефекти є одними з основних проблем для нанофармакології та медицини.

Полімерні нанорозмірні носії ліків є одними із найбільш активно досліджуваних у сучасній нанофармакології. Суттєвою перевагою полімерних носіїв є зниження загальної токсичності ліків та оптимізація фармакокінетичних параметрів їхньої дії [2, 3].

Метою роботи було визначити токсичність за умов *in vitro* та мутагенну активність зразків новосинтезованих поліамфолітних носіїв ліків. Для цього було використано тест МТТ і тест Еймса у *Salmonella typhimurium* з метою виявлення індукованих генних мутацій за механізмами зсуву рамки зчитування та заміни пар нуклеотидних основ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використано нові поверхнево-активні поліамфолітні носії (ПН) гребенеподібної будови, синтезовані на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» за описаною методикою [9]. Ці ПН складаються із аніонного карбоксилвмісного основного ланцюга з молекулярною масою 2000 г/моль та прищеплених до нього 1-3 бічних ланцюгів, які містили аміногрупу (рис. 1). Основний ланцюг ПН – це олігопероксидний метало-комплекс (ОМК), до якого ковалентно прищеплені ланцюги кополімеру диметиламіноетилметакрилату (ДМАЕМ) і 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-іну (ВЕП). Характеристика синтезованих ко-полімерів наведена в табл. 1.

ПН розчинні при широкому діапазоні рН і здатні утворювати міжмолекулярні комплекси сольового типу між позитивно зарядженими бічними ланцюгами та негативно зарядженою молекулою ДНК. Наявність у структурі поліамфоліту гідрофобних фрагментів не лише забезпечує їхню поверхневу активність, але й сприяє взаємодії комплексу ПН/ДНК із плазматичною мембраною реципієнтних клітин.

Клітини та їхнє культивування. У досліджах використовували клітини ембріональної нирки людини (лінія HEK 293T), карциноми шийки матки людини (лінія HeLa), аденокарциноми молочної залози людини (лінія MCF-7), отримані з колекції Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького, Київ. Клітини культивували у середовищі Ігла в модифікації Дульбекко (DMEM, Sigma-Aldrich, США) із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma-Aldrich, США) та 50 мкг/мл гентаміцину. Клітини вирощували в CO₂-інкубаторі при температурі 37°C, концентрації CO₂ – 5% і відносній вологості – 100%. Пересів клітин проводили у співвідношенні 1:5 через 2–3 дні. Клітини від'єднували від поверхні дна культуральних чашок за допомогою розчину трипсин / ЕДТА (трипсин / етилендіамінтетраацетат): 137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,03 мМ Na₂HPO₄, 0,4 мМ KH₂PO₄, 4,5 мМ NaHCO₃, 0,53 мМ ЕДТА, 0,25% трипсин; рН 7,4.

Визначення цитотоксичної дії досліджуваних речовин. Клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети у середовищі DMEM за наявності 10% ембріональної телячої сироватки. Через 24 год до клітин додавали розчини досліджуваних

поліамфолітних носіїв БГ-2 ряду і поліетиленіміну (ПЕІ) (Polysciences, Inc., США) – комерційно доступного полімерного носія, який використовують для доставки ДНК у клітини, у концентраціях 0,001%; 0,01%; 0,1%.

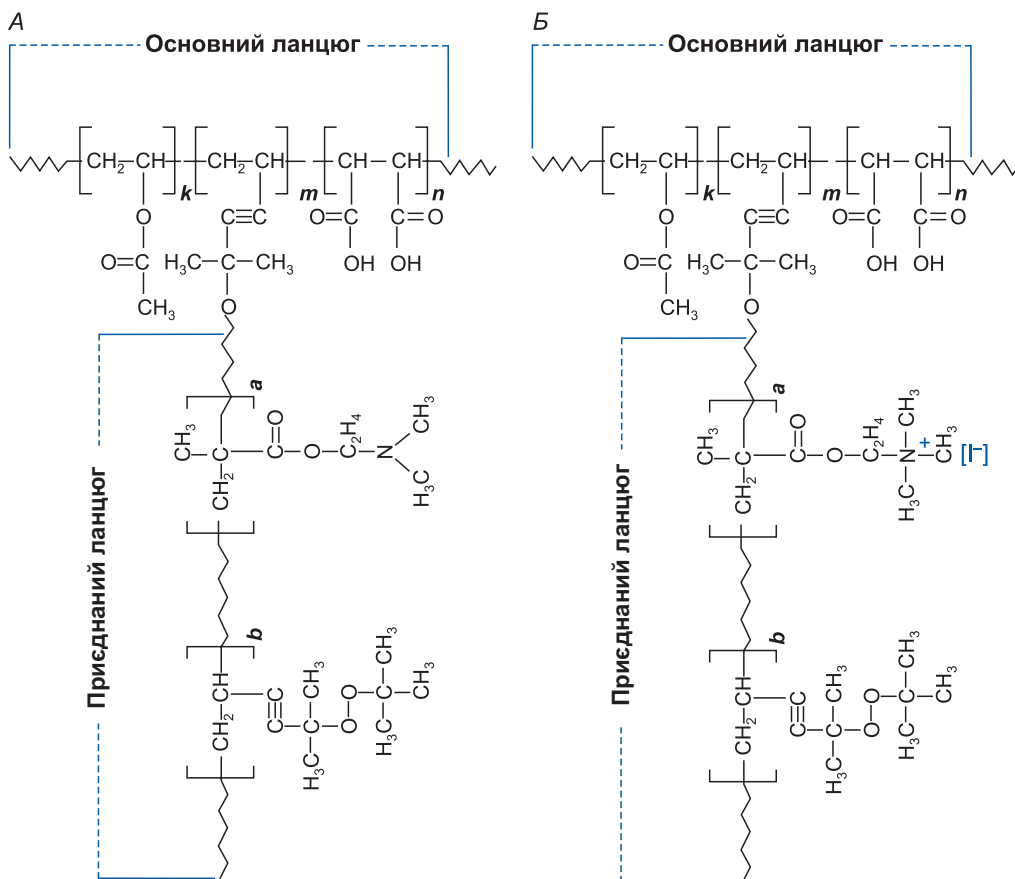


Рис. 1. Схематичне зображення структури гребенеподібних поліамфолітних носіїв типу БГ-2: А – БГ-2, БГ-2с; Б – БГ-2кв, БГ-2скв

Fig. 1. Schematic representation of chemical formula of BG-2 polyampholytic carriers: A – BG-2, BG-2c; Б – BG-2кв, BG-2скв

МТТ-аналіз функціональної активності клітин. Для визначення впливу різноманітних чинників на проліферативну активність клітини досліджуваних ліній висівали у кількості 5 000–10 000 клітин в лунку 96-лункового планшета та інкубували в повноцінному середовищі впродовж 12 год, щоб дати змогу клітинам прикріпитися до поверхні. Після цього клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (ФСБ, 137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 4,3 мМ Na₂HPO₄; 1,7 мМ KH₂PO₄, (pH 7,3). Потім змінювали середовище на дослідне й інкубували впродовж періоду часу, необхідного для експерименту. За 5 год до завершення періоду інкубації в середовище додавали МТТ-реагент, 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-диметилбромід тетразолію (Sigma-Aldrich, США), у кінцевій концентрації 500 мкг/мл. Після завершення періоду інкубації середовище відбирали, а в лунки додавали диметилсульфоксид для

розчинення фіолетових кристалів формазау, що утворилися внаслідок відновлення МТТ-реагенту редуктазами живих клітин. Концентрацію формазау в лунках визначали спектрофотометричним методом на апараті «Plate Reader BioTek» (США) за оптичним поглинанням при довжині хвилі 490 нм. Кількість живих клітин визначали у відсотках за співвідношенням оптичних густин, проміряних у лунках, в яких клітини інкубували з дослідним та контрольним середовищами.

Таблиця 1. Характеристика синтезованих поліамфолітних носіїв
(співвідношення (%) основного та прищеплених ланцюгів = 5:95)

Table 1. Principal characteristics of the polyampholytic carriers
(ratio (%) of main and grafted chains = 5:95)

#	Основний ланцюг								% основного ланцюга	Прищеплені ланцюги					% прищепленого ланцюга	Mn, kDa	σ, мН/м (1% р-н)
	Вміст мономерних ланок у ПН, %			Характеристика мікроструктури*						Вміст мономерних ланок у ПН, %		Характеристика мікроструктури					
	ВА k	ВЕР l	МА m	I _{BA}	I _{VER}	I _{MA}	R	[Cu ²⁺], % на основний ланцюг		ВЕР b	ДМАЕМ a	I _{VER}	I _{DMAEM}	R			
БГ-2	22,0	34,0	44,0	1,0	1,0	1,0	99,5	1,1	5,2	7,5	92,5	1,02	14,8	7,5	94,8	3,1	43,0
БГ-2с	22,0	34,0	44,0	1,0	1,0	1,0	99,5	1,1	4,0	6,9	93,1	1,00	15,3	9,0	96,0	6,5	43,0
БГ-2кв*	22,0	34,0	44,0	1,0	1,0	1,0	99,5	1,1	5,2	7,5	92,5	1,02	14,8	7,5	94,8	3,1	43,0
БГ-2 скв*	22,0	34,0	44,0	1,0	1,0	1,0	99,5	1,1	4,0	6,9	93,1	1,00	15,3	9,0	96,0	6,5	43,0

Примітки: * – БГ-2кв та БГ-2скв – четвертинні амонійні солі, отримані кватернізацією йодистим метилом третинних аміногруп у сполуках БГ-2 та БГ-2с; # – скорочена назва поліамфолітного носія (ПН); I – середня довжина блоків із ланок ко-мономеру; R – кількість блоків із однакових ланок на 100 ланок ко-полімеру; Mn – середньочисельна молекулярна маса, σ – поверхневий натяг.

Comments: * – БГ-2кв та БГ-2скв – quaternary ammonium salts derived after quaternization of tertiary amino groups in БГ-2 та БГ-2с compounds by iodide methyl; # – title of polyampholyte carrier (ПН); I – average length of the blocks from the corresponding monomer links; R – amount of the blocks from the same monomer links per 100 links in the copolymer; Mn – average molecular weight, σ – surface tension.

Флуоресцентна мікроскопія. Після 24 годин інкубації клітин з досліджуваними поліамфолітними носіями їх відмивали від культурального середовища 1 мл холодного (4°C) ФСБ.

Для візуалізації хроматину в ядрі клітин їх інкубували протягом 30 хв у ФСБ, що містив барвник Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США) до кінцевого розведення 1:500. Через 20 хв після інкубації клітин додавали барвник пропідію йодид (PI) (кінцеве розведення 1:500) (Sigma-Aldrich, США), за допомогою якого можна виявити некротичні клітини [5]. Після інкубації клітин із цими барвниками готували мікропрепарати і розглядали їх під флуоресцентним мікроскопом Zeiss AxioImager A1 (Karl Zeiss, Німеччина). Фотографували поля зору при збільшенні 40x. Подальшу обробку зображень проводили у програмі ImagePro.

Тест Еймса. Для виявлення індукованих генних мутацій застосовували тест Еймса у штамів *Salmonella typhimurium*, а саме TA98, який індукує мутації за механізмом зсуву рамки читування і TA100, який індукує мутації заміни пар нуклеотидних

основ. Аналіз проводили із використанням і без використання мікросомальної фракції печінки щура [1, 7]. Відповідно до рекомендацій [7, 10], мутагенний ефект прийнято вважати встановленим у тому випадку, коли співвідношення кількості колоній-ревертантів у досліді й контролі становить 2,0 і більше.

Статистична обробка результатів. Усі досліді повторювали тричі з трьома паралельними експериментами у кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, та ордината діаграм відповідає середньому значенню "M", розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів. На рисунках середня квадратична похибка "σ" представлена біля кожної точки вертикальною лінією, довжина якої відповідає величині "σ". Порівняння двох мінливих величин здійснювали на основі показника вірогідності різниці "t" (критерій Стюдента). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли ймовірність різниці "P" була меншою 0,05 (* – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження токсичності наноматеріалів *in vitro* на культурах клітин людини може бути цінною інформацією про ризики для живого організму та оточуючого середовища за експозиції цими матеріалами. Нами було проведено дослідження токсичної дії чотирьох поліамфолітних носіїв БГ-2 типу в концентрації 0,001% (визначена як оптимальна концентрація для трансфекції клітин ссавців); 0,01% та 0,1% на культурах людських клітин лінії HEK293T, MCF-7, HeLa.

Дослідження цитотоксичності поліамфолітних носіїв типу БГ-2 для клітин лінії HEK293T показало, що ці носії викликали незначну загибель клітин (приблизно 5%) у кінцевій концентрації 0,001% у лунці. У даній концентрації найбільший пошкоджувальний вплив на вказані клітини проявив носій БГ-2кв. Спостерігали стимульовальний вплив полімерів БГ-2с на клітини-мішені. Вплив інших носіїв типу БГ-2 зберігався на однаковому рівні – 1–3% мертвих клітин. Вказані речовини викликали достовірно більшу загибель клітин лінії HEK293T лише в концентраціях 0,01% та 0,1%, коли життєздатність клітин становила 32–47% (рис. 2). Поліетиленімін проявляв вищу цитотоксичність щодо клітин лінії HEK293T – життєздатність цих клітин становила 91% при дії PEI у концентрації 0,001%, 32,2% – при 0,01% PEI і 25,8% – при 0,1% PEI.

Вивчення цитотоксичного впливу поліамфолітних носіїв типу БГ-2 на клітини лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини показало, що в концентрації 0,001% носії БГ-2с, БГ-2кв і БГ-2скв проявили незначний пошкоджувальний вплив на вказані клітини (життєздатність клітин становила 98–99,3%) порівняно з контролем (рис. 3). У такій концентрації найбільший пошкоджувальний вплив на вказані клітини проявив носій БГ-2 (5,3% мертвих клітин). Найбільше поліамфолітні носії пошкоджували клітини у концентраціях від 0,01 до 0,1% (життєздатність клітин становила 27–57%) (рис. 3). У всіх досліджуваних концентраціях носіїв БГ-2 проявляв найбільшу цитотоксичну дію – до 73% мертвих клітин при дії носія у концентрації 0,1% порівняно з контрольними клітинами цієї ж лінії. Поліетиленімін проявляв незначно вищу цитотоксичність щодо клітин лінії MCF-7 – життєздатність клітин становила 92,6% за дії PEI у концентрації 0,001%, 31,6% – при 0,01% PEI і 27,2% – при 0,1% PEI.

Вивчення впливу поліамфолітних носіїв типу БГ-2 на культуру клітин лінії HeLa карциноми шийки матки людини показало, що за дії носіїв у концентрації 0,001%

найбільший цитотоксичний ефект проявив полімер БГ-2с (близько 10% мертвих клітин) (рис. 4). Інші полімери БГ-2 типу в досліджуваній концентрації виявляли незначний цитотоксичний ефект – життєздатність клітин становила 92,5–94,5%. Досліджувані речовини викликали достовірно більшу загибель клітин лінії HeLa у концентраціях 0,01% та 0,1% життєздатність клітин становила 66,3–83,3% і 47,5–59,7%, відповідно. Поліетиленімін проявляв вищу цитотоксичність щодо клітин лінії HeLa, життєздатність яких становила 82,5% при дії PEI у концентрації 0,001%, 62,9% – при 0,05% PEI і 42,1% – при 0,1% PEI.

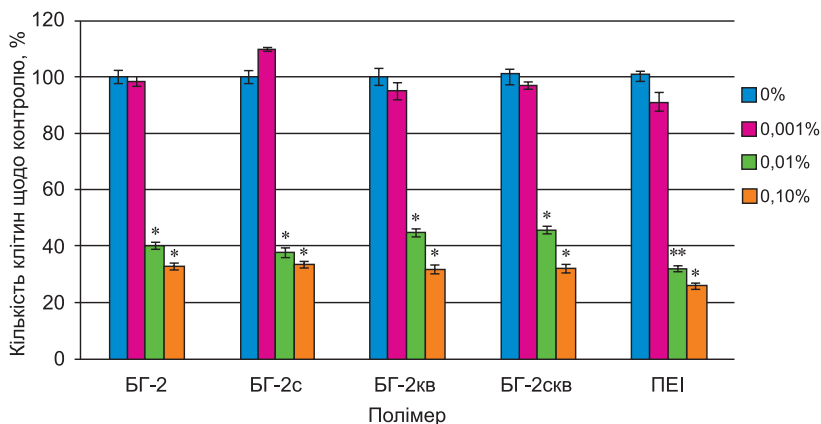


Рис. 2. Показник цитотоксичної дії поліамфолітних носіїв щодо клітин лінії HEK293T ембріональної нирки людини. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

Fig. 2. Cytotoxic activity of BG-2 polyampholytic carriers towards human embryonic kidney cells (HEK293T). * – $P \leq 0.05$; ** – $P \leq 0.01$

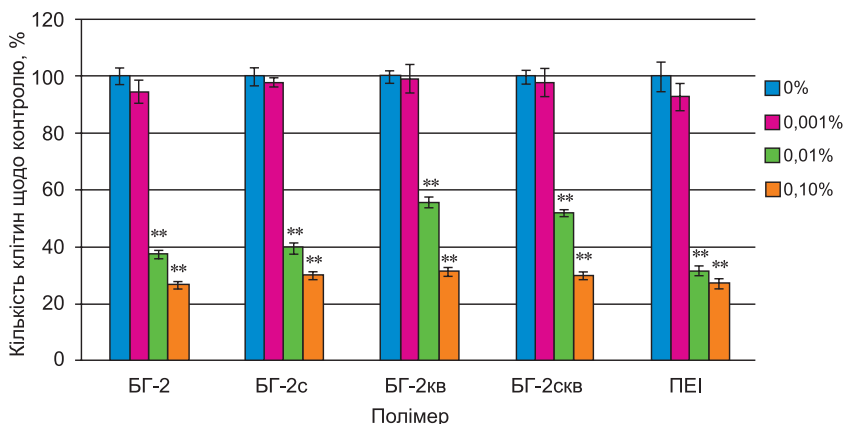


Рис. 3. Показник цитотоксичної активності поліамфолітних носіїв щодо клітин лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини. ** – $P \leq 0,01$

Fig. 3. Cytotoxic activity of BG-2 polyampholytic carriers towards human breast adenocarcinoma cells of MCF-7 line. ** – $P \leq 0.01$

Найбільший цитотоксичний вплив має носій БГ-2с щодо клітин лінії HeLa, носій БГ-2 – щодо клітин лінії MCF-7, носій БГ-2кв – щодо клітин лінії HEK293T. У той же час, носій БГ-2скв виявив найменшу цитотоксичну дію на клітини лінії HeLa,

носії БГ-2кв – на клітини лінії MCF-7, носії БГ-2с та БГ-2 – на клітини лінії HEK293T. Отже, новосинтезовані поліамфолітні носії типу БГ-2 у концентрації менше 0,01% майже не чинять цитотоксичного впливу на лінії клітин ссавців і можуть бути використані в експериментах *in vitro*.

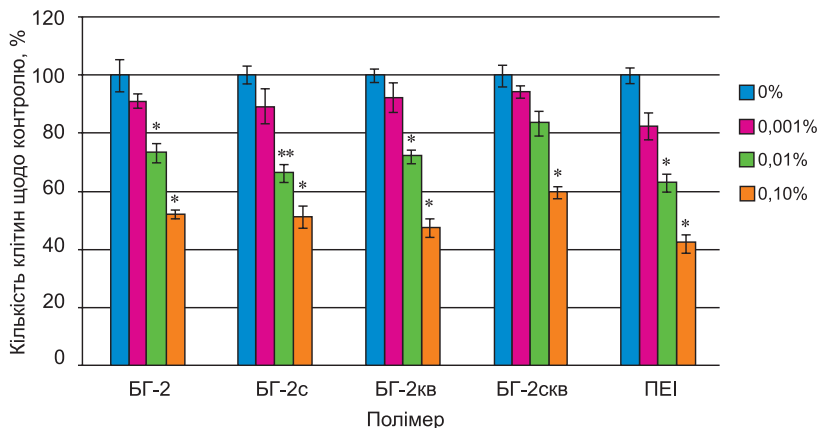


Рис. 4. Показник цитотоксичної дії поліамфолітних носіїв щодо клітин лінії HeLa карциноми шийки матки людини. * – $P \leq 0,05$.

Fig. 4. Cytotoxic activity of polyampholytic carriers towards human carcinoma cells of HeLa line. * – $P \leq 0.05$

Стан клітин за дії носіїв ліків оцінювали за морфологією ядра і цитоплазми. Вивчення морфології клітин лінії HEK293T ембріональної нирки людини, оброблених досліджуваними поліамфолітними носіями у різних концентраціях, не виявили відповідних змін (рис. 5). Це підтверджує наші результати тестування з МТТ про незначну токсичність носіїв ряду БГ-2 у концентрації менше 0,01%. Подвійне фарбування клітин лінії HEK293T за допомогою Hoechst 33342 і пропідію йодидом показало, що за дії високих концентрацій (0,001%) носіїв ряду БГ-2 не відбувається зростання індексу пропідію йодид-позитивних клітин (показник некрозу) через 24 год інкубації клітин з полімерами порівняно з контролем.

Нами також визначено мутагенну активність новосинтезованих поліамфолітних носіїв у штамів TA100 і TA98 *S. typhimurium*. На рис. 6 і 7 наведено результати дослідження мутагенної дії синтезованих наноматеріалів. За умов використання відомих мутагенних речовин як позитивних контролів (бензидин (100 мкг/чашку), нітрозогуанідин (1 мг/чашку) та натрію азид (1,5 мкг/чашку) спостерігали статистично значне зростання кількості генетичних реверсій у тест-штамів *S. typhimurium*. Показник перевищення кількості колоній на дослідних чашках щодо контрольних становив 2,69–3,14, що свідчить про чутливість цих штамів до дії мутагенів.

Носії БГ-2, БГ-2с та БГ-2кв, БГ-2скв не проявили мутагенної активності щодо *S. typhimurium*. При додаванні носіїв у досліджуваних концентраціях до клітин штаму TA100 максимальний показник перевищення кількості колоній на дослідних чашках щодо контрольних становив 1,25 (рис. 7). Отже, компоненти даних речовин не здатні викликати заміни пар нуклеотидних основ і зсуву рамки зчитування у чутливих штамів мікроорганізмів. Додавання фракції S9 не спричиняло зростання частоти появи колоній клітин-ревертантів порівняно зі спонтанним рівнем такого колонієутворення (рис. 6). Показник перевищення дослідних значень над контролем не перевищував 1,15, що вказує на відсутність генотоксичного ефекту даних носіїв.

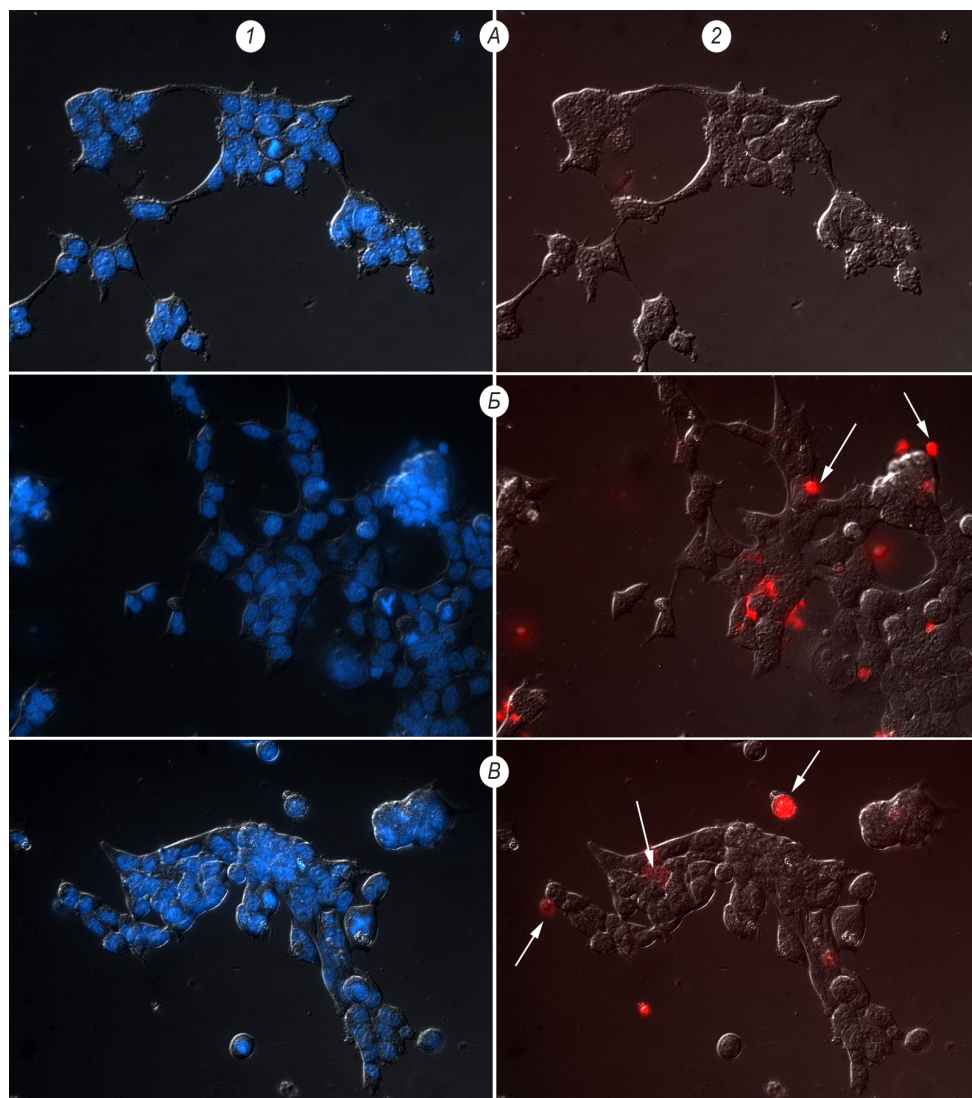


Рис. 5. Цитоморфологічне дослідження ультраструктури клітин лінії HEK293T ембріональної нирки людини за дії поліамфолітних носіїв (24 год, фарбування Hoechst 33342 – 1 та PI – 2): А – контроль; Б – PEI; В – носій БГ-2; ↓ – пошкоджені клітини

Fig. 5. Cytomorphological study of ultrastructure of human embryonic kidney cells (HEK293T) under the action of polyampholytic carriers (24 h, Hoechst 33342 – 1 and PI – 1 staining): А – control; Б – PEI; В – BG-2 carrier; ↓ – damaged cells

Отже, нами не виявлено здатності індукувати появу генних мутацій у тесті Еймса. За відсутності метаболічної активації дані носії в усіх досліджуваних дозах не виявили генотоксичного впливу. Після додавання фракції S9 не спостерігали мутагенного ефекту за дії носіїв у обох штамів. Це свідчить про відсутність у складі носіїв сполук, які у результаті метаболічних перетворень набувають здатності індукувати мутації типу заміни пар нуклеотидних основ і зсув рамки зчитування.

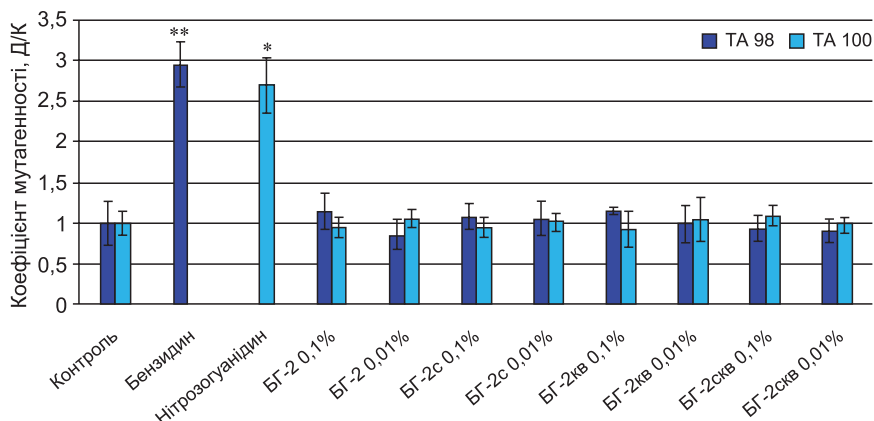


Рис. 6. Вплив поліамфолітних носіїв на ріст і спонтанний фон мутацій тест-штамів TA 98 і TA 100 *Salmonella typhimurium* за присутності мікросомальної фракції печінки щура. Як позитивні контролю використовували бензидин (100 мкг/чашку) і нітрозогуанідин (1 мкг/чашку). * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

Fig. 6. Action of polyampholytic carriers on *Salmonella typhimurium* TA 98 і TA 100 stains growth and spontaneous mutation background under microsomal activation. Benzidine (100 $\mu\text{g}/\text{plate}$) and nitrosoguanidine (1 mg/plate) were used as positive controls. * – $P \leq 0.05$; ** – $P \leq 0.01$

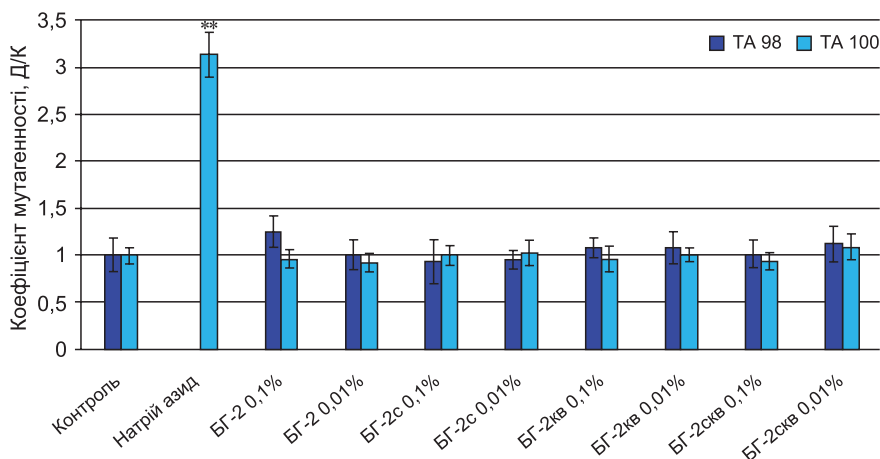


Рис. 7. Вплив поліамфолітних носіїв на ріст і спонтанний фон мутацій тест-штамів TA 98 і TA 100 *Salmonella typhimurium* за відсутності мікросомальної фракції печінки щура. Як позитивний контроль використовували Натрій азид (1,5 мкг/чашку). ** – $P \leq 0,01$

Fig. 7. Action of polyampholytic carriers on *Salmonella typhimurium* TA 98 і TA 100 stains growth and spontaneous mutation background without microsomal activation. Sodium azide (1.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) was used as positive control. ** – $P \leq 0.01$

ВИСНОВКИ

Дослідження цитотоксичності поліамфолітних носіїв типу БГ-2 щодо клітин ссавців показало, що ці носії призводять до незначної загибелі клітин (до 10%) у концентрації 0,001% у лунці. Вказані речовини викликають достовірно більшу загибель клітин лише в концентраціях 0,01% та 0,1%, що у 10 і 100 разів відповідно перевищують концентрації носіїв, рекомендовані для ефективної доставки ДНК у клітини-мішені.

У тесті Еймса за дії тестованих носіїв у всіх досліджуваних дозах (0,001%, 0,01% та 0,1%) не виявлено перевищення контрольних даних більш ніж удвічі, що дає підстави вважати дані носії потенційно немутагенними. Не виявлено мутагенного впливу досліджуваних носіїв на штаммах TA98 і TA100 після додавання активуючої мікросомальної фракції печінки. Отже, досліджувані поліамфолітні носії не містять у своєму складі мономерів з мутагенною активністю і можуть рекомендуватися до використання як носії для доставки ДНК у різні клітини-мішені.

ПОДЯКИ

Роботу виконано за фінансової підтримки гранту цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (Договір № 46). Автори висловлюють подяку доцентів кафедр генетики та біотехнології Львівського національного університету ім. Івана Франка к.б.н. Боднар Лідії Степанівні та аспірантові даної кафедри Боднар Іванні Василівні за сприяння у виконанні тесту Еймса.

1. Федоренко В.О., Остап Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. **Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів:** навчальний посібник для студентів біологічних факультетів університетів]. Львів, 2005. 278 с.
2. Dang J.M., Leong K.W. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2006; 58(4): 487–499.
3. Igarashi E. Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 2008; 229(1): 121–134.
4. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, 2008; 4(1): 26–49.
5. Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L., Haynes C.L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. **Analyst**, 2009; 134(3): 425–439.
6. Muller L., Riediker M., Wick P. et al. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. **J. R. Soc. Interface**, 2010; 7(1): 27–40.
7. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline for the Testing of Chemicals: **Bacteria Reverse Mutation Test Guideline 471**, 1997. (http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en;jsessionid=5bhtrq7mjnc0d.x-oecd-live-01).
8. Sayes C.M., Reed K.L., Warheit D.B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles. **Toxicology Science**, 2007; 97(1): 163–180.
9. Zaichenko A.S., Voronov S.A., Shevchuk O.M. et al. Kinetic features and molecular weight characteristics of terpolymerization products of the systems based on vinyl acetate and 5-tert-butyl-peroxy-5-methyl -1-hexene-3-yne. **J. of Applied Polymer Science**, 1997; 67: 1061–1066.
10. United States Food and Drug Administration. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Redbook 2000. IV.C.1. **Short-Term Tests for Genetic Toxicity**. College Park, MD: Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety, 2000. P. 1–5.

EVALUATION OF CYTOTOXIC AND MUTAGENIC ACTION OF NOVEL SURFACE ACTIVE COMB-LIKE POLYAMPHOLYTES THAT ARE USED FOR DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS TO TARGET CELLS

**N. S. Finiuk^{1,3}, Y. Z. Filyak¹, N. M. Boiko¹,
N. Y. Mitina², O. S. Zaichenko², R. S. Stoika^{1,3}**

¹ Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, 14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

² Lviv National Polytechnic University, 12, Bandera St., Lviv 79013, Ukraine

³ Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Rapid development of new nanomaterials and nanotechnologies is accompanied by significant achievements in various fields of medicine, industry and precise technology, as well as by undesirable effects on human health and environment. Our studies were focused on determination of toxicity *in vitro* and evaluation of the mutagenic activity of novel polyampholyte carriers of BG-2 type. It was shown that they did not exert cytotoxic and could be used in the *in vitro* experiments at a concentration less than 0.01%. The carriers were not capable of triggering gene mutations in the Ames test. At the absence of metabolic activation, all studied carriers lacked genotoxic effects. No mutagenic effect was observed for novel carriers after adding of the microsomal fraction of rat liver for both strains of *Salmonella typhimurium*, namely TA98 and TA100. This indicates a safety of novel polyampholyte carriers of BG-2 type as a tool for delivery of nucleic acids into target cells.

Keywords: polyampholytic carriers, cytotoxic impact, cultures of mammalian cells, Ames test.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ГРЕБНЕПОДОБНЫХ ПОЛИАМФОЛИТОВ, ИСПОЛЗУЕМЫХ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКИ-МИШЕНИ

**Н. С. Финюк^{1,3}, Е. З. Филяк¹, Н. Н. Бойко¹,
Н. Е. Митина², А. С. Заиченко², Р. С. Стойка^{1,3}**

¹ Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина

² Национальный университет «Львовская Политехника»,
ул. С. Бандеры, 12, Львов 79013, Украина

³ Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Создание новых наноматериалов и бурное развитие нанотехнологий приводят не только к значительным достижениям в сфере медицины, разных отраслях промышленности и точных технологий, но и к нежелательным последствиям для здоровья человека и окружающей среды. Проведенные нами исследования по определению токсичности в условиях *in vitro* и выявления мутагенной активности образцов новосинтезированных полиамфолитных носителей показали, что они не

оказывают цитотоксического и мутагенного воздействия. Установлено, что новосинтезированные полиамфолитные носители БГ-2 ряда в концентрации менее 0,01% не оказывают цитотоксического влияния на культуры клеток и могут быть использованы в экспериментах *in vitro*. Не обнаружена способность носителей вызывать появление генных мутаций в тесте Эймса. При отсутствии метаболической активации все исследуемые дозы данных носителей не выявили генотоксического воздействия. После добавления микросомальной фракции печени крысы не наблюдался мутагенный эффект при действии носителей на обоих штаммах *Salmonella typhimurium*, а именно: TA98 и TA100. Это свидетельствует о безопасности использования новосинтезированных полиамфолитных носителей БГ-2 ряда как средств доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени.

Ключевые слова: полиамфолитные носители, цитотоксичность, культура клеток, тест Эймса.

Одержано: 13.05.2013