

THE ROLE OF MULTIWALL CARBON NANOTUBES IN THE GENOME DESTABILIZATION OF 3T3 CELLS

Mikhailenko V.M., Kovaleva O.A., Stepanenko N.S., Makovetska L.I.

РОЛЬ БАГАТОШАРОВИХ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК У ДЕСТАБІЛІЗАЦІЇ ГЕНОМУ КЛІТИН ЛІНІЇ 3ТЗ



**МИХАЙЛЕНКО В.М.,
КОВАЛЬОВА О.А.,
СТЕПАНЕНКО Н.С.,
МАКОВЕЦЬКА Л.І.**

Институт експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ

УДК575.224.23:620.3:661.8...62

Ключові слова: вуглецеві наночастинки, багатощарові вуглецеві нанотрубки, мікроядра, хромосомні аберації, дестабілізація геному.

Перспективи використання нанотехнологій і наночастинок у побуті та медичній практиці значно підвищують ймовірність їх надходження до організму, накопичення та тривалий контакт з клітинами, що зумовлює актуальність досліджень їхньої токсичності і біосумісності. За даними BBC Research nanotechnology report, обсяг глобального ринку вуглецевих нанотрубок (ВНТ) у 2014 р. може скласти понад 1 млрд. доларів, з яких на частку багатощарових ВНТ (БшВНТ) припадає близько 90%. Якщо раніше ВНТ використовувалися переважно у виробництві електроніки, автомобільній, аерокосмічній та оборонній промисловості, то нині з'явилися такі нові сфери їх застосування, як одяг спеціального призначення, медицина та спортивні товари, на які сумарно припадатиме вже понад 30% від їхнього загального обігу.

Дані щодо біологічних ефектів ВНТ суперечливі. Вони мо-

жуть залежати від розміру, хімічного складу та модифікацій поверхні частинки. Розмір та форма наночастинки впливають на прояви специфічних фізико-хімічних та транспортних їхніх властивостей, нівелюючи або ж посилюючи поверхневі ефекти, хоча пріоритет у розвитку токсичних ефектів за малих доз належить саме формі частинки [1]. Так, нанорозмірний діаметр ВНТ та їхня голкоподібна форма роблять їх схожими на волокна азбесту, інгаляційна дія яких призводить до виникнення раку легень. Результати, отримані в експериментальних та епідеміологічних дослідженнях щодо впливу нанорозмірних забруднювачів повітря (пилу, мінеральних частинок та волокон), свідчать про високу ймовірність токсичної та/або канцерогенної дії новостворених наночастинок [2]. Їх медичне застосування та поширення у побуті і на робочому місці у комбінації з іншими шкідливими

РОЛЬ МНОГОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК В ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ГЕНОМА КЛЕТОК ЛИНИИ 3ТЗ

Михайленко В.М., Ковалева О.А., Степаненко Н.С., Маковецкая Л.И.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

Целью работы было исследование цитогенетических изменений в клетках эмбриональных фибробластов мыши линии 3ТЗ (клон 31), подвергшихся воздействию многослойных углеродных нанотрубок.

Материалы и методы исследования.

3ТЗ клетки обрабатывали многослойными углеродными нанотрубками в двух дозах (100 и 400 мкг/мл) в течение 24 и 48 часов. Цитогенетическое исследование включало анализ митотического режима, патологии митоза, подсчет клеток с преждевременной конденсацией хромосом, микроядрами, ядерными протрузиями. В метафазных пластинках были учтены модальный класс хромосом, полиплоидия, количество клеток

с хромосомными аберрациями и двойными минихромосомами, мультиаберрантные клетки.

Результаты. Выявлено, что многослойные углеродные нанотрубки оказывали выраженное генотоксическое действие на клетки эмбриональных фибробластов мыши линии 3ТЗ, проявлявшееся в формировании микроядер и различных аномалий формы ядра. Высокие дозы многослойных углеродных нанотрубок приводили к торможению пролиферативной активности на стадии G2/M клеточного цикла и накоплению хромосомных аберраций и мультиаберрантных клеток. Через 48 ч многослойные углеродные нанотрубки вызывали задержку клеточного деления в профазе и метафазе, при увеличении дозы этот эффект усиливался. Выявленные цитогенетические изменения свидетельствуют о формировании генетической нестабильности в клетках при действии углеродных наночастиц.

Ключевые слова: углеродные наночастицы, многослойные углеродные нанотрубки, микроядра, хромосомные аберрации, дестабилизация генома.

© Михайленко В.М., Ковалева О.А., Степаненко Н.С., Маковецкая Л.И. СТАТТЯ, 2014.

факторами можуть мати непередбачувані негативні наслідки для здоров'я, зокрема підвищувати ризик розвитку онкологічних захворювань.

БшВНТ здатні зв'язуватися з плазматичною мембраною макрофагів та порушувати цілісність мембран [3]. На клітинному рівні агрегати наночастинок спостерігають в ендосомах, мітохондріях та цитоплазмі, у тому числі і у насколярному просторі, що свідчить про переважно ендоцитозний шлях їх потрапляння. Певну кількість наночастинок було виявлено в ядрі та ядерці, де вони можуть взаємодіяти з ДНК. Наночастинок здатні викликати зміни енергетичного метаболізму, рівня вільних радикалів, пошкодження ДНК, прямо або опосередковано сприяючи розвиткові оксидативного стресу та запальної відповіді [4]. При накопиченні у цитоплазмі клітин вони можуть контактувати з ДНК під час мітозу, коли цілісність ядерної

мембрани порушується, викликаючи аберації хромосом та оксидативний стрес, інгібувати процеси реплікації і транскрипції ДНК [5].

Мета роботи: дослідити вплив БшВНТ на цитогенетичні характеристики клітин ембріональних фібробластів миші лінії 3Т3.

Матеріали та методи. БшВНТ були синтезовані в Інституті хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. Їх отримували у вигляді агломератів — переплутаних між собою трубок з розмірами 20-500 мкм, середній діаметр складав 10-20 нм, кількість шарів — 5-10. Для приготування суспензії БшВНТ гомогенізували у фізіологічному розчині за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-2.

Клітини лінії 3Т3 (фібробласти миші, клон А31) перебували у контакт з різними дозами суспендованих БшВНТ (100 мкг/мл (БшВНТ100) та 400 мкг/мл (БшВНТ400) протягом 24 та 48 годин.

Для цитогенетичного аналізу 3Т3 клітини інкубували 40 хв у гіпотонічному розчині КСІ (0,54%) ("Реахім", Україна) за температури +37°C. Клітини фіксували сумішшю метилового спирту ("Реахім", Україна) і оцтової кислоти ("Хімлаборреактив", Україна) (3:1), тричі змінюючи фіксатор. Усі фіксовані клітинні суспензії капали на холодні мокрі скельця, висушували і фарбували барвником Гім-

за ("Sigma", ФРН). Цитогенетичні препарати аналізували за допомогою бінокулярного мікроскопа Carl Zeiss, AxioStarPlus (ФРН) при збільшенні у 1000 разів.

Цитогенетична характеристика клітин передбачала визначення кількості мітозів, клітин з передчасною конденсацією хромосом (ПКХ), клітин з мікроядрами (КМЯ) та клітин з ядерними протрузіями (КЯП) (рис. 1), які розраховували на 1000 клітин і виражали у промілях (‰).

Мітотичний режим та патології мітозу розраховували на 300 мітозів і виражали у відсотках (%). У метафазних пластинках було враховано модальний клас хромосом, поліплоїдія, кількість клітин з хромосомними абераціями, подвійними мікрохромосомами та мультіаберагантні клітини.

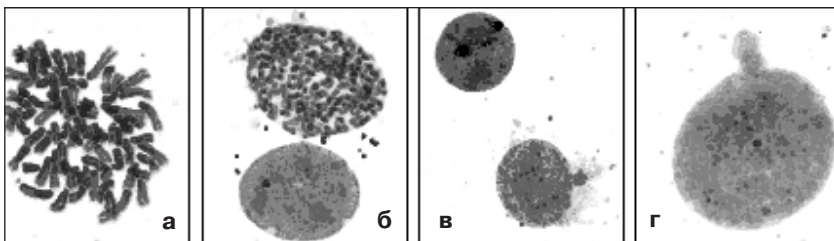
Статистичну достовірність оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та обговорення. Інтактні клітини лінії 3Т3 характеризуються цитогенетичною нестабільністю, яка виражається у підвищеному рівні клітин з мікроядрами та клітин з аномаліями форми ядра. За дії БшВНТ100 вже за 24 години спостерігали достовірне накопичення КМЯ та формування ядерних протрузій (табл. 1).

Відомо, що мікроядра утворюються у процесі клітинного поділу з ацентричних фрагментів, які виникають при розриві хромосом (кластогенний ефект), а також з відстаючих хромосом (анеугенний ефект). Мікроядра можуть також утворюватися шляхом немітотичної екструзії хроматину з інтерфазного ядра. Вони не містять ядерної оболонки, здатні до лізису або можуть включатися в ядро при подальшому мітозі. Накопичення КМЯ протягом 24 год не корелювало з дозою БшВНТ, однак більш тривала дія БшВНТ

Рисунок 1

Цитогенетичні характеристики клітин лінії 3Т3 за дії БшВНТ: а) мітоз, б) клітина з передчасною конденсацією хромосом, в) клітина з мікроядром, г) ядерна протрузія



Таблиця 1

Цитогенетичні характеристики клітин лінії 3Т3 за дії різних доз БшВНТ (‰)

	ІК		БшВНТ ₁₀₀		БшВНТ ₄₀₀	
	24 год.	48 год.	24 год.	48 год.	24 год.	48 год.
ПКХ (ПКХ/мітоз)	3,0±1,0 (13%)	5,7±1,5 (60%)	5,0±1,0 (21%)	4,3±0,6 (72%)	9,7±3,2* (43%)	2,3±0,6* (88%)
КМЯ	8,7±3,0	5,0±1,0	21,0±2,6*	9,7±2,0*	6,3±2,5	10,3±2,5*
Мітоз	20,3±4,5	3,7±1,2	17,3±2,5	1,7±0,6	13,0±1,7	0,3±0,6*
КЯП	12,7±0,5	15,3±2,5	43,0±4,5*	27,7±2,0*	31,3±2,0*	31,7±2,5*

Примітка: * — $P \leq 0,05$.

THE ROLE OF MULTIWALL CARBON NANOTUBES IN THE GENOME DESTABILIZATION OF 3T3 CELLS
Mikhailenko V.M., Kovaleva O.A., Stepanenko N.S., Makovetska L.I.

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv

The Objective to study the cytogenetic changes in the cells of mouse embryonic 3T3 fibroblasts (clone 31), exposed to multiwall carbon nanotubes.

Materials and methods. 3T3 cells were treated with multiwall carbon nanotubes in two doses (100 and 400 mkg/ml) during 24 and 48 hours. Cytogenetic study involved an analysis of the mitotic regime and pathology of mitosis, fraction of cells with premature chromosome condensation, micronuclei and nuclear protrusions. Metaphase plates were analyzed for modal class of chromosomes, polyploidy, the number of cells with chromosome aberrations, double minichromosomes and

multiaberrant cells.

Results. Multiwall carbon nanotubes have a pronounced genotoxic effect on mouse embryonic 3T3 fibroblasts, which was accompanied by formation of micronuclei and various abnormalities of nuclear shape. High doses of multiwall carbon nanotubes caused inhibition of the proliferative activity on phase G2/M of cell cycle and accumulation of chromosome aberrations and multiaberrant cells. Multiwall carbon nanotubes caused the dose-dependent delay of cell division in prophase and metaphase during 48 hours. Registered cytogenetic changes indicate the formation of genomic disorders and genomic instability in the cells exposed to carbon nanoparticles.

Keywords: carbon nanoparticles, multiwall carbon nanotubes, micronuclei, chromosome aberrations, genome destabilization.

супроводжувалася збільшенням кількості КМЯ майже вдвічі.

До ядерних протрузій належать ядра з центральною круговою насичкою, гантелеподібні ядра, ядра атипичної форми, ядерні структури за межами основного ядра, які з'єднуються з основним ядром. За даними літератури, знайдено пряму кореляційну залежність між частотою клітин з численними хромосомними аберациями і

клітинного циклу може призводити до збільшення частки анеуплоїдних клітин. Співвідношення клітин з ПКХ до загального пулу клітин, які діляться, було запропоноване як додаткова цитогенетична характеристика у прогнозі генетичної нестабільності клітинних популяцій [7]. У нашому дослідженні при збільшенні дози БшВНТ через 24 год відсоток клітин з ПКХ щодо загаль-

ної кількості мітозів збільшувався у 3,3 рази порівняно з контролем. Низька частота клітин з МЯ за високої дози БшВНТ може бути пов'язаною з затримкою клітинного поділу на стадії G2/M.

Більш тривала (48 год) експозиція клітин з БшВНТ призвела до дозозалежного пригнічення проліферативної активності 3Т3 клітин (табл. 1). Менша доза (100 мкг/мл) виклика-

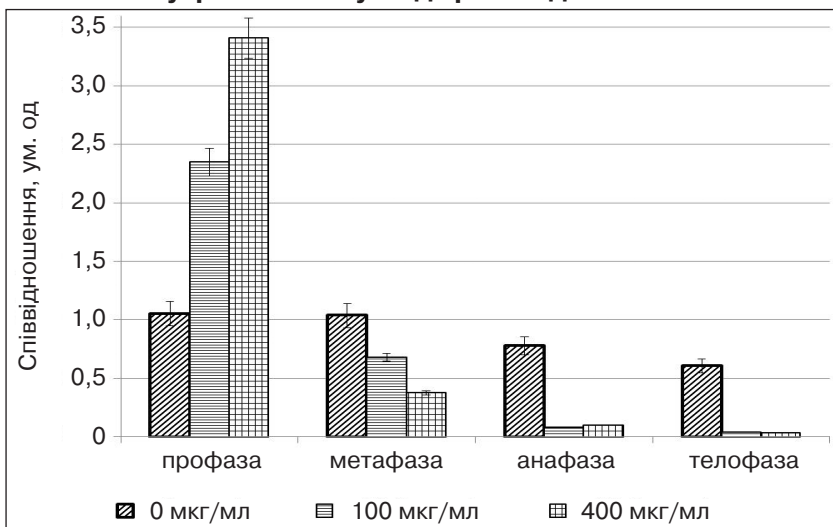
Таблиця 2
Мітотичний режим та частота патологій мітозу клітин лінії 3Т3 за дії різних доз БшВНТ (%)

	ІК		БшВНТ ₁₀₀		БшВНТ ₄₀₀	
	24 год.	48 год.	24 год.	48 год.	24 год.	48 год.
Профаза	24,7±1,5	26,3±2,6	24,7±3,8	58,3±2,6*	22,0±2,6	75,5±2,0*
Метафаза	61,7±5,5	64,3±2,5	60,3±4,6	41,6±1,2*	64,3±4,0	24,3±2,0*
Анафаза	10,3±2,5	8,0±1,0	12,3±0,6	1,3±0,6*	10,3±3,5	1,0
Телофаза	3,3±1,5	1,7±0,6	2,7±1,5	0,3±0,6	3,3±1,5	0,3±0,6
Патології мітозу	6,7±1,5	н.в.	5,7±1,2	н.в.	5,7±1,2	н.в.

Примітка: н.в. — не визначали; * — $P \leq 0,05$.

частотою клітин з аномальною формою ядра [6]. Ядерні вирости пов'язують з механізмами позбавлення клітин надлишкової ампліфікованої ДНК. За дії БшВНТ₄₀₀ протягом 24 годин достовірно збільшується частота ядерних протрузій та клітин з ПКХ порівняно з контролем. Поява клітин з ПКХ є одним з початкових етапів мітотичної катастрофи (МК), яка пов'язана з дефектом "точки перевірки" на стадії G2/M клітинного циклу (дисфункції білка p53, накопичення цикліну В1, активації cdc2 — циклін-залежної кінази) і є одним із джерел генетичної гетерогенності, іморталізації й адаптації клітинних популяцій пухлин до різних впливів. Ця патологія

Рисунок 2
Співвідношення (48/24 год) частки клітин лінії 3Т3 у фазах мітозу за дії різних доз БшВНТ



ла достовірно збільшення клітин з мікроядрами та ядерними протрузіями, однак не таке масове, як через 24 години, ймовірно, за рахунок затримки клітинного поділу. За дії більшої дози БшВНТ цитотоксичні та генотоксичні ефекти посилювалися.

При дослідженні мітотичного режиму інтактних клітин не виявлено змін у різні терміни їх культивування, як і не спостерігалось будь-яких змін у розподілі мітотичних клітин за фазами мітозу через 24 години експозиції клітин з різними дозами БшВНТ. Однак через 48 годин зі збільшенням дози БшВНТ збільшується частка клітин на стадії профазы, і, навпаки, зменшується частка клітин на стадіях метафазы та анафазы, а також майже зовсім не зустрічаються телофазні клітини (табл. 2, рис. 2).

Патології мітозу характеризували за наявністю кільцевих метафаз, відставанням однієї

або групи хромосом (Хр), розсіюванням, розтягуванням Хр, хроматидних мостів (рис. 3). Рівень патологій мітозу за дії різних доз БшВНТ через 24 год культивування майже не відрізнявся від значень в інтактних 3Т3 клітинах. У свою чергу, через 48 год культивування спостерігали досить низьку кількість мітозів і, таким чином, їхні патології не враховувалися.

Нами було також проведено аналіз каріотипових особливостей у метафазних пластинках лінії 3Т3 під впливом БшВНТ. За даними літератури (<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-92&Template=cellBiology>), лінія 3Т3 — гіпер-триплоїдна лінія миші (2N=40), модальний клас нечіткий, кількість хромосом на метафазу коливається від 60 до 75.

У контрольних умовах за каріотиповими характеристиками лінії 3Т3 відповідає даним літе-

ратури (68% метафаз містили від 62 до 74 Хр, а поліплоїдія складала 9%, (табл. 3, рис. 4, а).

У інтактних клітин лінії 3Т3 відмічено значний рівень хромосомних аберацій, до яких належать хромосомні, хроматидні аберації (рис. 5, а), кільцеві хромосоми, фрагменти (рис. 5, б), фрагментація Хр (рис. 5, в). Зустрічалися також метафазы з подвійними мікрохромосомами (рис. 5, в).

Згідно з даними літератури порушення нормальної структури хромосом і підвищений рівень рекомбінації у клітинах призводять до утворення даного типу аберацій [8]. З невисокою частотою у контрольній популяції зустрічаються також мультиабераційні метафазы (рис. 4, б, в).

За дії БшВНТ₁₀₀ вдвічі збільшувалася частота клітин з хромосомними аберациями та мікрохромосомами, а за дії БшВНТ₄₀₀ — частота клітин з хромосомними аберациями та кількістю мультиабераційних метафаз (табл. 3). Зі збільшенням дози звужувався модальний клас хромосом за рахунок збільшення кількості анеуплоїдних клітин.

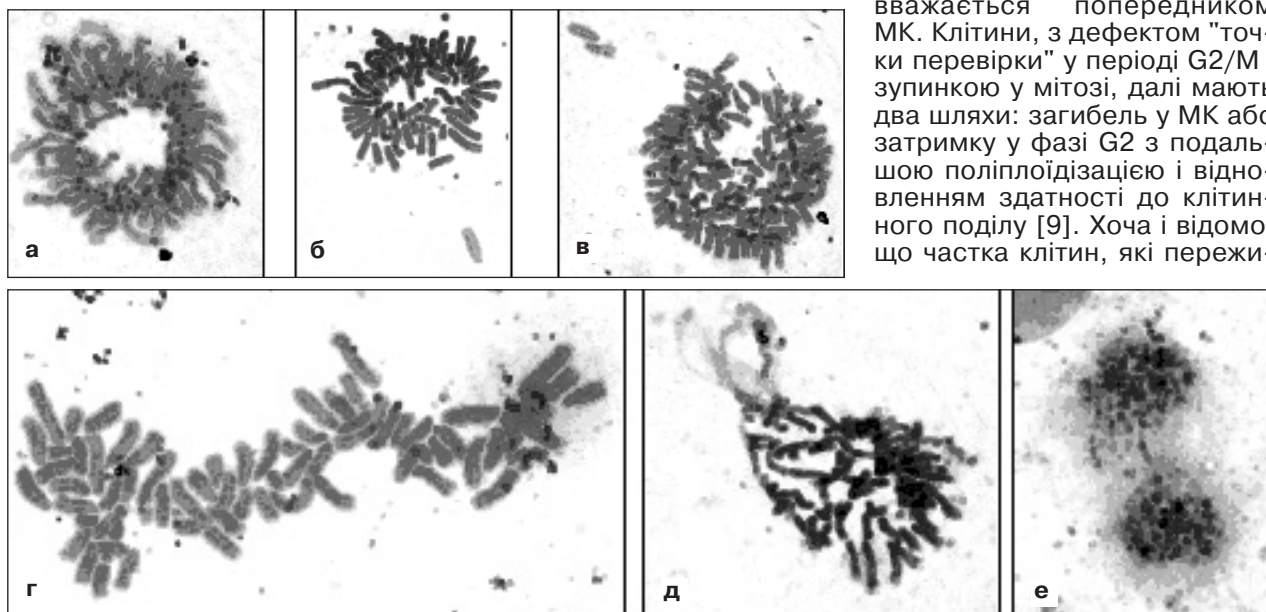
Отже, зміна клітинної морфології, поява мультиабераційних клітин, зростання рівня хромосомних аберацій, які відбуваються вже через 24 год після дії БшВНТ, відображають початок МК, що відбувається за допомогою інших, ніж при апоптозі, внутрішньоклітинних механізмів. Феномен ПКХ, який тісно пов'язаний з клітинною загибеллю, вважається попередником МК. Клітини, з дефектом "точка перевірки" у періоді G2/M і зупинкою у мітозі, далі мають два шляхи: загибель у МК або затримку у фазі G2 з подальшою поліплоїдизацією і відновленням здатності до клітинного поділу [9]. Хоча і відомо, що частка клітин, які пережи-

Таблиця 3
Цитогенетичні аномалії у метафазах клітин лінії 3Т3 за дії різних доз БшВНТ

24 год	ІК	БшВНТ ₁₀₀	БшВНТ ₄₀₀
Модальний клас	62-74Хр(68%)	67-74Хр(65%)	68-74Хр(45%)
Поліплоїдія	9%	9,3%	8%
Клітини з ХА	24%	52%*	49%*
Клітини з мікроХр	10%	20%*	12%
Мультиабераційні	3%	3%	13%*

Примітка: * — $P \leq 0,05$.

Рисунок 3
Патології мітозу у клітинах лінії 3Т3 за дії БшВНТ:
а) кільцева метафаза, б) відставання однієї Хр, в) відставання групи Хр, г) розсіювання Хр, д) розтягування Хр, е) хроматидний міст



ли блок у період G2/M клітинного циклу, дуже невелика, але феномен ПКХ може призвести до появи генетично гетерогенних популяцій, нових клонів з підвищеною стійкістю до зовнішніх умов.

Висновки

1. БшВНТ здійснювали виражений генотоксичний вплив на клітини ембріональних фібробластів миші лінії 3Т3, що проявлявся у формуванні мікроядер та різноманітних аномалій форми ядра. Високі дози БшВНТ викликали накопичення мультиаберантних клітин.

2. Тривала дія БшВНТ призводила до гальмування проліферативної активності за рахунок затримки клітинного поділу на стадії G2/M клітинного циклу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials / Magrez A., Kasas S., Salicio V. et al. // *Nano Lett.* — 2006. — Vol. 6. — P.1121-1125.

2. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes / A. Helland, P. Wick, A. Koehler et al. // *Environ Health Perspect.* — 2007. — Vol. 115 (8). — P. 1125-1131.

3. Hirano S. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages / S. Hirano, S. Kanno, A. Furuya-

ma // *Toxicology and Applied Pharmacology.* — 2008. — Vol. 232. — P. 244-251.

4. Carbon Nanoparticles Impact on Energy Metabolism, Genotoxicity and Free Radicals Level / V. Mikhailenko, L. Ieleiko, A. Glavin, J. Sorochinska // *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects* / D. Kozyrev, V. Slutsky (eds.). — Nova Science Publishers, Inc. — 2009. — P. 523-538.

5. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro / I. Papageorgiou, C. Brown, R. Schins et al. // *Biomaterials.* — 2007. — V. 28, № 19. — P. 2946-2958.

6. Ковалева О.А. Нехромосомный цитогенетический анализ соматических клеток млекопитающих / О.А. Ковалева, Н.А. Безденежных, Ю.И. Кудрявец // *Biopolymers and Cell.* — 2013. — Vol. 29, № 1. — P. 33-41.

7. Spontaneous premature condensation of chromosomes in normal and transformed mammal cells / O.A. Kovaleva, T.T. Glazko, T.P. Kochubey et al. // *Experimental oncology.* — 2007. — V. 29, № 1. — P. 18-22.

8. The consequences of structural genomic alterations in humans: genomic disorders, genomic instability and cancer /

Рисунок 4

Поліплоїдна клітина (а), мультиаберантна метафаза (б) та її фрагмент (в) у клітинах лінії 3Т3 за дії БшВНТ

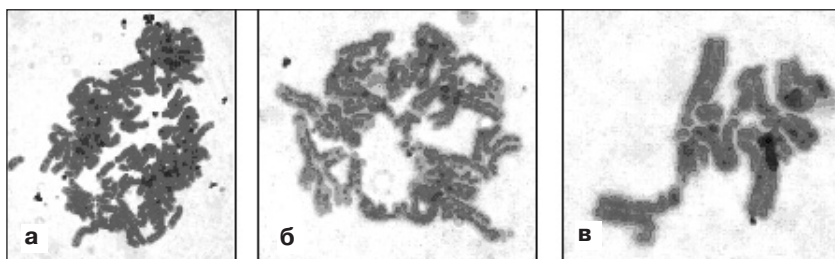
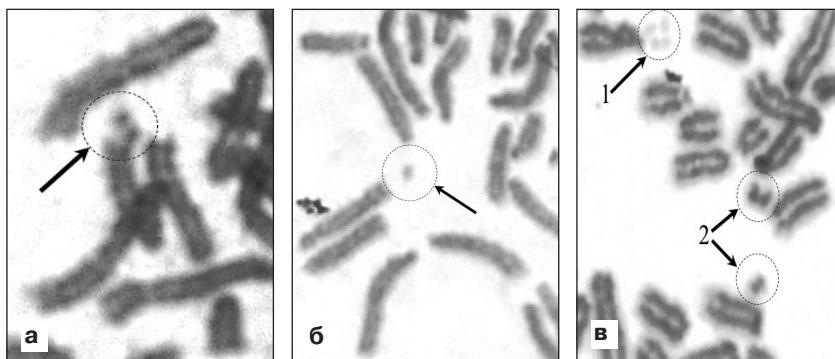


Рисунок 5

Фрагменти метафаз з хромосомними абераціями у клітинах лінії 3Т3 за дії БшВНТ: а) хроматичний розрив, б) фрагмент, в) фрагментація хромосоми (верхня стрілка), подвійні мініхромосоми (нижні стрілки)



R. Colnaghi, G. Carpenter, M. Volker, M. O'Driscoll // *Semin Cell Dev Biol.* — 2011. — Vol. 22, № 8. — P. 875-885.

9. Erenpreisa J. Mitotic death: a mechanism of survival? A review / J. Erenpreisa, M.S. Cragg // *Cancer Cell International.* — 2001. — V. 1. — P. 1-7.

REFERENCES

1. Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Jin Won Seo, Celio M. et al. *Nano Lett.* 2006; 6 : 1121-1125.

2. Helland A., Wick P., Koehler A., Schmid K., Som C. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(8) : 1125-1131.

3. Hirano S., Kanno S., Furuyama A. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2008; 232 : 244-251.

4. Mikhailenko V., Ieleiko L., Glavin A., Sorochinska Ju. *Carbon Nanoparticles Impact on Energy Metabolism, Genotoxicity and Free Radicals Level.* In: *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects* (Kozyrev D., Slutsky V., eds.). Nova Science Publishers, Inc.; 2009 : 523-538.

5. Papageorgiou I., Brown C., Schins R., Singh S., Newson R., Davis S.A., et al. *Biomaterials.* 2007; 28(19) : 2946-2958.

6. Kovaleva O.A., Bezdenezhnykh N.A., Kudriavez Yu.I. *Biopolymers and Cell.* 2013; 29 (1) : 33-41 (in Russian)

7. Kovaleva O.A., Glazko T.T., Kochubey T.P., Lukash L.L., Kudryavets Yu.I. *Experimental oncology.* 2007; 29 (1) : 18-22.

8. Colnaghi R., Carpenter G., Volker M., O'Driscoll M. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22(8) : 875-85.

9. Erenpreisa J., Cragg M.S. *Cancer Cell International.* 2001; 1 : 1-7.

Надійшла до редакції 17.05.2014

Роботу виконано за підтримки Державної цільової науково-технічної програми "Нанотехнології та наноматеріали", проект № 5.18.5.46.