

## ОЦІНКА ФІТОТОКСИЧНОГО ТА МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ НОВИХ ПОЛІМЕРНИХ НОСІЇВ ГЕНІВ НА ОСНОВІ ДМАЕМА

Н. ФІНЮК<sup>1,2</sup>, Н. РОМАНЮК<sup>2</sup>, Н. МІТІНА<sup>3</sup>, О. ЛОБАЧЕВСЬКА<sup>4</sup>, О. ЗАІЧЕНКО<sup>3</sup>, О. ТЕРЕК<sup>2</sup>, Р. СТОЙКА<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, 79005;

<sup>2</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005;

<sup>3</sup> Національний Університет «Львівська Політехніка», вул. Бандери, 12, м. Львів, 79013;

<sup>4</sup> Інститут екології Карпат НАН України, вул. Козельницька, 4, м. Львів, 79026.

E-mail: stoika.rostyslav@gmail.com

*Використання нових носіїв для доставки генів у клітини стрімко зростає, тому дослідження фітотоксичного і мутагенного потенціалу носіїв генів є важливим для виключення їх негативних побічних ефектів. Встановлено, що полі-ДМАЕМА носії в концентрації 0,0025 % володіють низьким рівнем токсичності щодо цибулі Allium сера. У вищій дозі (0,025 %) досліджувані носії незначно (на 26–55 %) підвищували каталазну активність, але не впливали на супероксиддисмутазну активність і вміст малонового діальдегіду в корені проростків А. сера. Результати ана-телофазного тесту на А. сера не виявили генотоксичної дії полі-ДМАЕМА носіїв в обох використаних концентраціях (0,0025 і 0,025 %). ПЕГ-вмісні полі-ДМАЕМА носії (БГП24 та БГП26) у 10-кратній концентрації (0,025 %) викликали достовірне підвищення рівня хромосомних аберацій у клітинах А. сера. Результати тесту Еймса (–S9 та +S9) свідчать про відсутність мутагенного потенціалу полімерів на основі ДМАЕМА. Отже, низька фітотоксичність і відсутність мутагенної дії нових полімерних носіїв на основі ДМАЕМА підтверджують їхній потенціал як перспективних носіїв для доставки генів у клітини рослин.*

**Ключові слова:** полі(2-диметиламіно)етил метакрилат, полімерний носій, ана-телофазний тест, тест Еймса, каталаза, супероксиддисмутаза, малоновий діальдегід.

**Вступ.** Наноматеріали широко використовують для доставки генетичного матеріалу в клітинні мішені. Катіонні полімери – перспективні системи доставки генетичного матеріалу в клітини для біотехнологічних і біомедичних потреб [1–4]. Серед полікатіонних носіїв слід відзначити полі(L-лізин) (ПЛЛ), полі(амідоамін) (ПАМАМ), полі(етиленімін) (ПЕІ), поліметакрилати (наприклад, полі(2-диметиламіно)етилметакрилат (ДМАЕМА)), які запропоно-

вані для доставки цільових генів у клітини [4–7]. Полімери на основі ДМАЕМА були ефективними при перенесенні цільових генів у клітини ссавців [8–11], дріжджів [12], рослин [13, 14]. Однак токсичність полімерних носіїв може бути перешкодою для їх ефективного застосування в генній терапії та біотехнології [8, 15, 16]. Встановлено, що наноматеріали можуть слугувати стресовими чинниками, які порушують окиснювальний статус і посилюють перекисне окиснення ліпідів у клітинах-мішенях [17, 18]. Тому розробка безпечних та ефективних носіїв генетичного матеріалу є важливою для розвитку генної інженерії і генної терапії.

Оцінка цитотоксичності полімерних носіїв є необхідною для виявлення потенційних ризиків їх застосування. Показано, що полімери на основі полі-ДМАЕМА володіють низькою токсичністю щодо клітин ссавців [5, 19]. Однак в літературі обмеженою є інформація щодо їхньої фітотоксичності і мутагенності [14].

Метою даної роботи було оцінити потенційні цитотоксичні і мутагенні ризики використання синтетичних носіїв генів на основі полі-ДМАЕМА. Для цього було досліджено вплив полімерів на пророщення насіння та ріст кореня цибулі *Allium сера* L., на вміст малонового діальдегіду (МДА), який вважають інтегративним показником перекисного окиснення ліпідів, а також на активність ключових ензимів антиоксидантного захисту – каталази (КАТ) та супероксиддисмутази (СОД). Ана-телофазний тест і тест Еймса використано для оцінки мутагенних ризиків застосування полі-ДМАЕМА носіїв для доставки генів у рослинні клітини.

**Матеріали та методи.** ДМАЕМА-вмісні гребенеподібні та блок-кополімери. Матеріали, що бу-

© Н. ФІНЮК, Н. РОМАНЮК, Н. МІТІНА,  
О. ЛОБАЧЕВСЬКА, О. ЗАІЧЕНКО, О. ТЕРЕК,  
Р. СТОЙКА, 2020

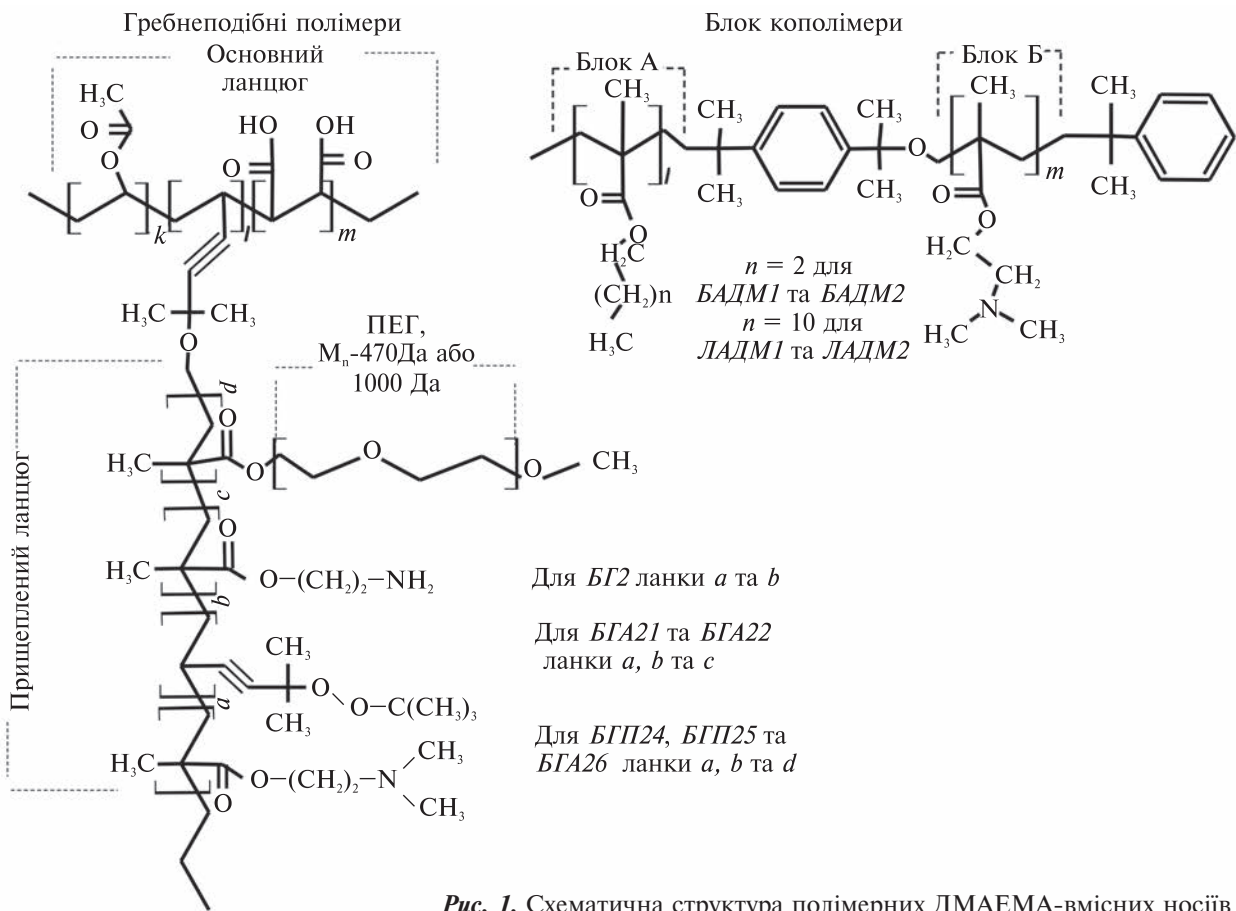


Рис. 1. Схематична структура полімерних ДМАЕМА-вмісних носіїв

ли використані для синтезу полімерів: 2-(диметиламіно) етилметакрилат (ДМАЕМА), 2-аміноетилметакрилат гідрохлорид (АЕМ), вінілацетат (ВА), малеїновий ангідрид (МА), бутилакрилат (БА), лаурилакрилат (ЛА), метакрилат полі(етиленгліколь) метилового етеру ( $M_n$  470 і 1000 г · моль<sup>-1</sup> (Да)) (ПЕЕМ470 і ПЕЕМ1000), ізопропілбензол (ІПБ) були придбані в Aldrich (Мілуокі, Вісконсин, США). N,N-диметилформамід (ДМФА), 1,4-діоксан, ацетон і н-гексан, придбані в Merck (Дармштадт, Німеччина). Пероксидний мономер 5-*трет*-бутилперокси-5-метил-1-гексен-3-іну (ВЕП) ((CH<sub>2</sub>=CH-C≡C-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-O-O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) був синтезований за методикою описаною в літературі [20] і мав наступні характеристики: [O] = 8,7 %,  $d_4^{20}$  = 0,867 г · мл<sup>-1</sup>,  $n_d^{20}$  = 1,4482. Пероксидний передавач ланцюга 1-ізопропіл-3(4)-[1-(*трет*-бутилперокси)-1-метилетил]бензол (монопероксін (МП)) синтезували з трет-бутилгідро-

ксіпероксиду і 2-(4-ізопропілфеніл)-2-пропанолу в розчині оцтової кислоти, як було описано раніше, і мав такі характеристики: [O] = 6,4 %,  $d_4^{20}$  = 0,9208 г · мл<sup>-1</sup>,  $n_d^{20}$  = 1,4811.

Нові гребенеподібні та блок-кополімери з ланками ДМАЕМА були синтезовані на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» (Львів, Україна). Гребенеподібні та блок кополімери синтезували в дві стадії, як описано раніше [21]: 1) синтез поліфункціональних макроініціаторів (олігопероксидний металокомплекс (ОМК) або телехелатних полібутил(лаурил)акрилат) з бічними або кінцевими пероксидними групами, і 2) синтез методом радикальної полімеризації прищеплювальних полікатионних ланцюгів [22]. ОМС з лігандом на основі кополімеру вінілацетату (ВА), ВЕП та малеїнового ангідриду (МА) (полі(ВА-*ко*-ВЕП-*ко*-МА) і катіоном – Cu<sup>2+</sup> ([Cu<sup>2+</sup>] = 1,1 % від ліганду), був використаний,

як ініціатор для синтезу гребенеподібних полімерів, за методикою описаною раніше [22]. Всі гребенеподібні полімери були синтезовані в ДМФА при 60 °С.

Телехелатні олігоперокси, такі як полібутилакрилат або полілаурилакритат із кінцевими пероксидними групами, були отримані методом радикальної полімеризації відповідних акрилатів ([алкілакрилат] = 1,5 моль · л<sup>-1</sup>), при ініціюванні азобіс-ізобутиронітрилом (АІБН) ([АІБН] = 0,06 моль · л<sup>-1</sup>), в присутності МП ([МП] = 0,1 моль · л<sup>-1</sup>). Отримані полімери були використані для синтезу блок-кополімерів, як макроініціатори радикальної полімеризації ДМАЕМА ([ДМАЕМА] = 1 моль · л<sup>-1</sup> при синтезі БАДМ1 і ЛАДМ1, 2 моль · л<sup>-1</sup> при синтезі БАДМ2 і ЛАДМ2), за методикою описаною раніше [21, 22]. Блок-кополімери були синтезовані в 1,4-діоксані при 90 °С. Структуру полімерів

визначали елементним [23] і функціональним аналізами [24]. Крім того, структура нових гребенеподібних і блок-кополімерів була підтверджена за допомогою <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії. Структури і склади полімерів наведені на рис. 1 і в табл. 1 і 2, відповідно.

У <sup>1</sup>H ЯМР полі(ВА-ко-ВЕР-ко-МА)-графт-полі(ВЕР-ко-ДМАЕМА) (БГ2) ланки в основному ланцюзі мали такі сигнали: скелетний СН<sub>2</sub> – 1,24 м.д., скелетний СН – 3,65 та 3,79 м.д.; ВА-ланки: СН<sub>3</sub>-С(О)-О- – 1,96 м.д.; ВЕР (залишкові) фрагменти: -С(СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 1,36 м.д. та МА-ланки: -С(О)ОН – 8,9 м.д.(слабкий). Сигнали прищеплених полімерних ланцюгів проявлялися для фрагментів -N(СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub> при 2,30 м.д.; -С(О)-СН<sub>2</sub>- при 4,1-4,1 м.д., СН<sub>3</sub>-С- при 1,34 м.д. (ланки ДМАЕМА) і -ОС(СН<sub>3</sub>)<sub>3</sub> при 1,18 м.д. (ВЕР-ланки). Для полімерів БГА21 і БГА22 нові сигнали протонів з'являлися при

Таблиця 1. Склад гребенеподібних полімерів, молекулярно-масові характеристики, а також заряд і розмір міцелоподібних структур, визначені за допомогою методу ДРС

Полімери	Основний ланцюг (M <sub>n</sub> = 2,0 кДа)			Прищеплені ланцюги					M <sub>n</sub> , кДа	Dh (нм)	ζ потенціал (мВ)
	ВА	ВЕР залишкові	МА	ДМАЕМА	ВЕР	АЕМ	ПЕЕМ 470	ПЕЕМ 1000			
	склад, % мол										
БГ2	0,34	0,55	0,71	91,3	7,1	–	–	–	8,5	22,5 ± 12	+30,6
БГА21	0,23	0,42	0,55	85,3	7,5	6,0	–	–	8,4	92,0 ± 20	+2,41
БГА22	0,23	0,42	0,55	86,3	8,7	3,8	–	–	8,9	109,0 ± 45	+6,86
БГП24	0,24	0,42	0,54	90,4	7,7	–	0,7	–	16,5	150,0 ± 11	+1,71
БГП25	0,24	0,42	0,54	92,7	4,3	–	1,8	–	17,9	225,0 ± 170	+1,05
БГП26	0,19	0,31	0,40	90,4	8,3	–	–	0,4	26,1	305,0 ± 260	+1,55
БГА 22(2ф)*										208,0 ± 20	+2,89

Примітка. \* змішані міцели, гребінеподібний полімер БГА22 + L-α-фосфатидилхолін.

Таблиця 2. Склад блок-кополімерів, молекулярно-масові характеристики, а також заряд та розмір міцелоподібних структур, визначені за допомогою методу ДРС

Полімери	Блок А				Блок Б		M <sub>n</sub> , кДа	Dh (нм)	ζ потенціал (мВ)
	БА	ЛА	МП залишкові	M <sub>n(А)</sub> , кДа	ДМАЕМА	ІПБ-фрагмент			
БАДМ1	49,3	–	0,5	6,5	50,0	0,2	13,0	430 ± 190	+3,8
БАДМ2	37,4	–	0,4	6,5	62,1	0,1	17,2	364 ± 130	+5,6
ЛАДМ1	–	26,0	0,6	6,0	73,2	0,2	18,0	300 ± 106	+3,3
ЛАДМ2	–	12,2	0,4	6,0	87,3	0,1	34,0	268 ± 75	+5,0

3,03 і 4,1 ч м.д. Вони відносяться до протонів  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-$  і  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})$  ланок АЕМ. Для полімерів БГП24, БГП25 і БГП26 нові сигнали з'явилися при 3,52 м.д. і відносяться до протонів  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$  фрагментів ПЕГ.

Для полі(БА)-блок-полі(ДМАЕМА)-ІБП і полі(ЛА)-блок-полі(ДМАЕМА)-ІБП в  $^1\text{H}$  ЯМР: протони в ланках ДМАЕМА мали такі сигнали: скелетний  $\text{CH}_2$  – при 1,8–2,0 м.д.,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  – при 2,29 м.д.,  $-\text{CH}_2-\text{N}-$  – при 2,7 м.д.; протони бензольного кільця проявлялися при 7,05–7,15 м.д.; протони фрагментів полі(БА) та полі(ЛА) мали такі сигнали:  $-\text{O}-\text{CH}_2$  – 3,9–4,0 м.д.;  $-\text{CH}_2-$  – 1,3–1,4 м.д. для полі(БА) та 1,2–1,35 м.д. для полі(ЛА);  $-\text{CH}_3$  – 0,88–0,91 м.д.

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектри записували на спектрометрі Bruker Avance DPX 300 (Bruker, Білгеріка, МА, США) на частоті 300,13 МГц.

Молекулярні маси полімерів визнали за допомогою ексклюзивної хроматографії (SEC) на хроматографі Waters 150С із вбудованим детектором показника заломлення (RI-детектор) (Waters Corporation, Мілфорд, МА, США) та колонкою Shodex 602 (Кавасакі, Японія), швидкість потоку змінювалася в діапазоні 0,5 та 2,5  $\text{cm}^3 \cdot \text{хв}^{-1}$ .

Вимірювання  $\zeta$ -потенціалу проводили на приладі Zetasizer Nano Particle (Malvern Instruments GmbH, Штутгарт, Німеччина) за фіксованої температури 25 °С. Розподіл за гідродинамічним діаметром ( $D_h$ ) міцелярних структур визначали методом динамічного світлорозсіювання (ДРС) на приладі DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, Санта-Барбара, США).

Для отримання вихідного розчину олігоелектролітів полімерні носії розчиняли у 0,3%-вому водному розчині  $\text{HCl}$ , щоб кінцева концентрація становила 1  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . За необхідності, додавали краплями розчин  $\text{NaOH}$  (0,05 М) для досягнення рН 7,2.

Для одержання змішаних міцелярних структур (зразок БГА22(2ф)) до 5 мл водного розчину БГА22 (1  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , рН 7,2) додавали краплями 0,5 мл 20%-вого хлороформного розчину L- $\alpha$ -фосфатидилхоліну (ф) (Sigma-Aldrich, Мілуокі, Вісконсин, США), а потім піддавали ультразвуковій диспергації впродовж 25 с. Хлороформ випарювали при перемішуванні впродовж 2 год при 60 °С й одержаний зразок вакуумували впродовж 1 год.

*Allium*-тест для виявлення гострої фітотоксичності полі-ДМАЕМА носіїв. Модифікований біотест з використанням *A. сера*, описаний Fiskesjo (1995) [25], був використаний для оцінювання гострої токсичності полімерів, а саме їхнього впливу на проростання насіння та ранній ріст кореня цибулі. Концентрації полімерів на основі ДМАЕМА були вибрані з урахуванням результатів наших попередніх досліджень: концентрація полімеру 0,0025 % була визначена оптимальною для трансформації рослин [14]. У дослідженнях використовували також полімери в концентрації 0,025 %, що в 10 разів перевищувала концентрацію, оптимальну для трансформації рослин. Поліетиленгліколь 6000 (ПЕГ-6000, LobaChemie, Австрія) є стандартним носієм, який використовують для трансформації протопластів рослин [26], і тому був позитивним контролем. Азид натрію (0,0025 %, Sigma-Aldrich, США) також використовували як позитивний контроль. Насіння *A. сера* сорту Штутгарт Різен (15 штук / варіант досліду) пророщували при температурі  $22 \pm 1$  °С в темряві на фільтрувальному папері з додаванням розчинів досліджуваних речовин. Наслідки впливу полімерів на проростання насіння і ріст кореня аналізували на 3-й день.

*Визначення активності ензимів антиоксидантного захисту.* Для визначення ензиматичної активності корені цибулі гомогенізували розтиранням рослинного матеріалу (300 мг), попередньо зафіксованого в рідкому азоті, у 50 мМ Tris- $\text{HCl}$  буфері (рН 7,8). Гомогенат центрифугували при 10 000 г впродовж 15 хв при +4 °С, надосадову рідину відбирали і зберігали при –20 °С для подальшого аналізу. Вміст білка у зразках визначали за допомогою методу Бредфорда [27, 28].

Каталазну активність (КАТ, КФ 1.11.1.6) визначали спектрофотометрично за здатністю молібдату амонію утворювати з пероксидом водню стійкий забарвлений комплекс, за зміною абсорбції суміші молібдат/ $\text{H}_2\text{O}_2$  при 410 нм [27]. Реакцію зупиняли додаванням 4%-вого молібдату амонію (Sigma-Aldrich, США). КАТ активність виражали як  $\text{mkmol} \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  білка.

Супероксиддисмутазну активність (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали, використовуючи раніше описану процедуру [28]. До реакційного сере-

довища (3 мл), що містить буфер фосфату калію (50 мМ, рН 7,8), додавали 13 мМ L-метіоніну (Sigma-Aldrich, США), 75 мкМ нітротетразолію синього (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ рибофлавіну (Sigma-Aldrich, США), 0,1 мМ ЕДТА (СфераСім, Україна). Скляні пробірки з реакційною сумішшю інкубували протягом 10 хв за освітлення (лампа Osram L 36W/77 FLUORA) при 25 °С з наступним перенесенням у темряву на 10 хв. Після цього зразки фотометрували при 540 нм. СОД активність виражали як мкмоль хв<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> білка.

**Визначення вмісту малонового діальдегіду.** Рівень малонового діальдегіду (МДА) визначали за допомогою модифікованого методу [28]. Екстракти рослинного матеріалу готували шляхом гомогенізації 300 мг коренів цибулі, оброблених досліджуваними речовинами, у 0,1%-вої трихлороцтової кислоти (ТХА, СфераСім, Україна), що містив 2 мМ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (СфераСім, Україна). Після чого зазки центрифугували при 10 000 г протягом 10 хв при +4 °С. До 1 мл надосадової рідини додавали 1 мл 10 % ТХА, що містить 0,5 % тіобарбітурової кислоти (ТБА, СфераСім, Україна), суміш нагрівали при 95 °С впродовж 30 хв. Після охолодження зразків на льоду вимірювали їхню оптичну густину при 532 нм. Рівень МДА (нмоль мг<sup>-1</sup> білка) розраховували за формулою: (оптична густина × коефіцієнт розведення × 1000)/(вміст білка × коефіцієнт екстинкції 155 мМ см<sup>-1</sup>).

**Ана-телофазний тест.** Ана-телофазний тест з використанням *A. cerea* проводили за модифікованою методикою, описаною Ранком і Нільсеном [29]. Метод базується на виявленні хромосомних аберацій, які виникають у клітинах меристеми кореня після дії на них досліджуваних речовин. Азид натрію (0,0025 %) використовували як позитивний контроль, а дистильовану воду – як негативний контроль. На 3-й день пророщення коріння фіксували протягом 24 год у розчині етанол : льодяна оцтова кислота (3 : 1) (СфераСім, Україна) та зберігали у 70%-вому етанолі. Коріння витримували протягом 6 хв в 1 М НСІ при кімнатній температурі, після чого фарбували протягом 15 хв у 2%-вому розчині ацетоорсеїну («Fluka», США). Чавлені препарати кінців кореня готували за допомогою сквош-техніки й аналізували під світловим мікроскопом (MikMed, Російська Федерація,

збільшення ×100). Мітотичний індекс (МІ, %) визначали за співвідношенням кількості клітин, що ділиться, до загальної кількості клітин [25]. Кількість аберованих ана-телофаз (%) обчислювали за співвідношенням суми аберованих ана- і телофаз до суми ана- і телофаз. У кожному варіанті досліді було проаналізовано близько 2000 клітин. Для виявлення блокуючого впливу досліджуваних речовин на певну фазу мітозу (поділу клітин) розраховували співвідношення кількості клітин у фазі метафази до суми клітин в анафазі і телофазі (М/А + Т), а також співвідношення кількості клітин у метафазі до кількості клітин у профазі (М/Р) [30].

**Тест Еймса.** Тест Еймса [31, 32] застосовували для виявлення потенційного мутагенного ефекту полімерів на основі ДМАЕМА. У досліді використовували плазмідні штами *Salmonella typhimurium* L. TA100 і TA98, які є ауксотрофами за гістидином, і за дії мутагенних чинників можуть ревертувати до прототрофного стану. Штам *S. typhimurium* TA98 (his D 3052, rfa, uvr B, +R, рKm 101), що дозволяє зафіксувати мутації типу зсуву рамки зчитування; TA 100 (his G46, rfa, uvrB bio, рKm 101) має мутацію у гістидиновому опероні (місенс-мутація his G46), що дозволяє зафіксувати точкові мутації типу заміни пар основ. Штами *S. typhimurium* були отримані з колекції мікроорганізмів кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка (Львів, Україна). Використовували напівкількісний метод із внесенням речовин у шар напіврідкого агару. В експерименті використовували «нічну» культуру *S. typhimurium*. Бактерії (1–2 × 10<sup>9</sup> клітин мл<sup>-1</sup>) інкубували протягом 30 хв при 37 °С з полі-ДМАЕМА носіями та ПЕГ-6000 у кінцевих концентраціях 0,0025 та 0,025%/чашку за додавання мікросомної активуючої суміші, виділеної із печінки щура (S9). Біоетична експертиза експериментів із лабораторними тваринами проведена на біологічному факультеті Львівського національного університету імені Івана Франка, протокол від 15 травня 2018 р. № 11052018. Культуру бактерій змішували з напіврідким агаром 37–42 °С (0,5 % агар (СфераСім, Україна), 0,5 % NaCl (СфераСім, Україна), 50 мкМ біотин («Sigma-Aldrich», США), 50 мкМ L-гістидин («Sigma-Aldrich», США), рН 7,4), після чого переносили на чашки Пе-

трі із мінімальним агаризованим середовищем (1,5 % агару, середовище Vogel-Bonner E, доповнене 2%-вою глюкозою (СфераСім, Україна)). Бензидин (100 мкг/чашку, Sigma-Aldrich, США) використовували як позитивний контроль (речовина-мутаген) для штаму TA98. Нітрозогуанідин (1 мг/чашку, Хімреактив, Російська Федерація) використовували як позитивний контроль для штаму TA100 за присутності S9, а азид натрію (1,5 мкг/чашку, «Sigma-Aldrich», США) – для штаму TA100 без додавання S9. Після 48 год інкубації чашок Петрі при 37 °С підраховували кількість колоній-ревертантів за L-гістидином. Мутагенну активність досліджуваних адечовин оцінювали, порівнюючи кількість колоній-ревертантів, які виростили на чашках Петрі з мінімальним агаром у дослід-

ному варіанті, з такою кількістю у негативному контролі (спонтанний мутагенний фон тестових штамів бактерій) [31, 32].

*Статистична обробка даних.* Усі дані досліджень представлені як середнє арифметичне (M) ± стандартне відхилення (SD) від трьох незалежних повторів досліду. Статистичний аналіз проводили за допомогою двостороннього тесту ANOVA (із тестом множинного порівняння Даннета) у програмі GraphPad Prism 6. Значення P < 0,05 прийнято статистично значущим.

**Результати та обговорення.** Вплив досліджуваних полімерних носіїв на ріст цибулі *A. сера*. Різні типи наночастинок і полімерних носіїв, які використовують для генетичної трансформації рослин, здатні проявляти токсичну дію щодо клітин-мішеней, індукувати оксидативний стрес,

Таблиця 3. Вплив полі-ДМАЕМА носіїв на проростання насіння цибулі *A. сера* і ріст кореня

Речовина	Концентрація, %	Довжина кореня, мм (M ± SD)	Показник інгібування росту кореня, % ± SD	Проростання насіння	
				% ± SD	% щодо контролю
Контроль		19,9 ± 4,9	0	91 ± 3,9	100
NaN <sub>3</sub>	0,0025	12,4 ± 2,4 ***	37,2 ± 0,5 ***	64 ± 3,9 **	71
БГ2	0,0025	17,5 ± 1,9	11,6 ± 0,6	84 ± 3,9	93
	0,025	15,1 ± 2,6 *	23,7 ± 0,5 *	76 ± 3,9 **	84
БГА21	0,0025	17,4 ± 1,8	12,2 ± 0,6	87 ± 6,7	95
	0,025	14,8 ± 2,1 **	25,5 ± 0,6 **	76 ± 3,9 **	83
БГА22	0,0025	17,5 ± 2,5	11,4 ± 0,5	84 ± 3,9	93
	0,025	15,6 ± 2,6 *	21,0 ± 0,5 *	78 ± 3,9 *	85
БГА22(2ф)	0,0025	16,9 ± 2,0	14,9 ± 0,2	80 ± 6,7	88
	0,025	14,3 ± 2,1 **	27,9 ± 0,2 **	73 ± 6,7 *	80
БГП24	0,0025	16,5 ± 1,5 *	16,7 ± 0,3 *	82 ± 3,9 *	90
	0,025	13,9 ± 3,1 **	29,8 ± 0,3 **	76 ± 3,9 **	83
БГП25	0,0025	16,4 ± 3,1 *	17,1 ± 0,3 *	82 ± 3,9 *	90
	0,025	13,8 ± 2,3 ***	30,2 ± 0,1 ***	73 ± 6,7 *	80
БГП26	0,0025	16,4 ± 1,3 *	17,4 ± 0,4 *	76 ± 3,9 **	83
	0,025	14,0 ± 1,7 **	29,3 ± 0,2 **	73 ± 6,7 *	80
БАДМ1	0,0025	17,6 ± 2,3	11,0 ± 0,5	84 ± 10,2	93
	0,025	15,0 ± 1,9	24,6 ± 0,6	78 ± 7,7	85
БАДМ2	0,0025	17,5 ± 2,7	10,6 ± 0,5	84 ± 7,7	93
	0,025	14,9 ± 2,2	24,7 ± 0,6	76 ± 3,9	83
ЛАДМ1	0,0025	17,9 ± 2,3	9,9 ± 0,5	87 ± 6,7	95
	0,025	15,0 ± 1,9	24,2 ± 0,6	78 ± 3,9	85
ЛАДМ2	0,0025	17,9 ± 2,9	8,7 ± 0,4	89 ± 3,9	98
	0,025	15,6 ± 2,5	21,5 ± 0,5	78 ± 3,9	85
ПЕГ	0,0025	12,8 ± 2,5 **	35,7 ± 0,2 **	71 ± 7,7 *	78
	0,025	11,0 ± 1,5 ***	44,4 ± 0,5 ***	64 ± 3,9 **	71

Примітка. \* – P < 0,05; \*\* – P < 0,01; \*\*\* – P < 0,001.

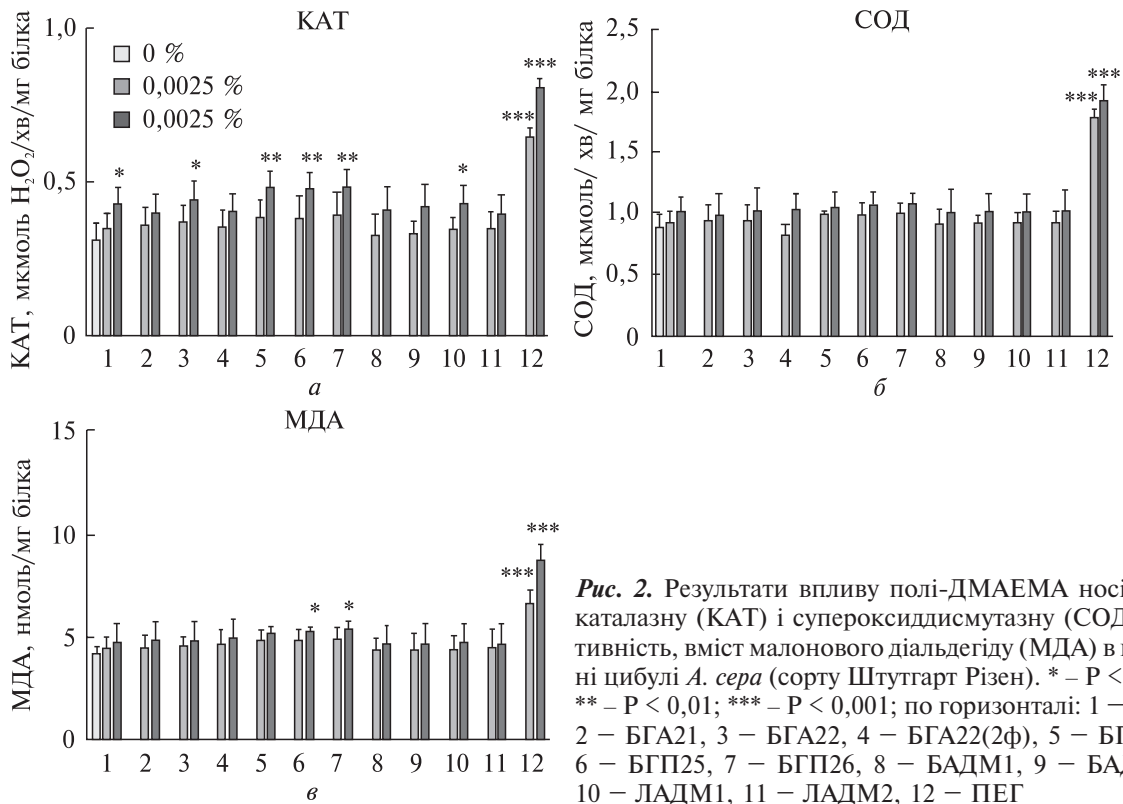


Рис. 2. Результати впливу полі-ДМАЕМА носіїв на каталазу (КАТ) і супероксиддисмутазу (СОД) активність, вміст малонового діальдегіду (МДА) в корені цибулі *A. sepa* (сорту Штутгарт Різен). \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ ; по горизонталі: 1 – БГ2, 2 – БГА21, 3 – БГА22, 4 – БГА22(2ф), 5 – БГП24, 6 – БГП25, 7 – БГП26, 8 – БАДМ1, 9 – БАДМ2, 10 – ЛАДМ1, 11 – ЛАДМ2, 12 – ПЕГ

пошкоджувати ДНК або закупорювати судини [1]. Рослини є ключовим компонентом екосистеми на Землі та її трофічних ланцюгів [33]. *Allium* тест широко застосовують для дослідження токсичних та генотоксичних потенціалів різних чинників, у тому числі наноматеріалів [34–36]. Одним із експрес-методів для виявлення мутагенної активності різних факторів є тест Еймса, який базується на використанні ауксотрофних за гістидином штамів *S. typhimurium*, здатних під дією мутагенів ревертувати до прототрофів [31, 37, 38]. Слід зазначити, що вищеперелічені тест-системи мають високу чутливість, а їх результати співвідносяться між собою. Фізіологічними показниками токсичної дії різних чинників є проростання насіння, довжина кореня проростків, кількість листя та біомаса [33]. Метою даних досліджень було виявити можливий токсичний та мутагенний потенціал полімерів на основі ДМАЕМА та ПЕГ-6000 (позитивний контроль).

Виявлено, що полімери на основі ДМАЕМА дозозалежно гальмують проростання насіння

цибулі та ріст кореня. Полімери ЛАДМ2 та ЛАДМ1, БГА21 в концентрації 0,0025 % мали мінімальний вплив на проростання насіння цибулі (98–95 % пророщеного насіння). Носії БАДМ2, БАДМ1, БГА22 у концентрації 0,0025 % знижували схожість насіння до 93 %. ПЕГ-вмісні полімери БГП24, БГП25 та БГП26 у вищезгаданій концентрації знижували схожість насіння до 90–83 % (табл. 3). Полімери на основі ДМАЕМА в концентрації 0,025 % демонстрували схожу тенденцію щодо зниження рівня проростання насіння цибулі (табл. 3).

При вирощуванні насіння цибулі *A. sepa* у розчині, що містив полімери у концентрації 0,0025 %, оптимальній для трансформації рослин, полі-ДМАЕМА носії пригнічували ріст кореня на 8,7–17,4 % (табл. 3). Зокрема, ЛАДМ2 мінімально (на 8,7 %) гальмував ріст кореня, тоді як полімери, що містять ПЕГ у структурі (БГП24, БГП25, БГП26), мали більш виражену токсичну дію – 16,7–17,4 % гальмування росту кореня. Однак найвищий рівень (30,3 %) пригнічення росту кореня цибулі спостерігали за

дії ПЕГ у вищезгаданій концентрації. Полімери БГА22 та ЛАДМ2 у концентрації 0,025 % демонстрували мінімальний ефект пригнічення росту кореня – 21,0 % та 21,5 %, а ПЕГ-вмісний носій БГП25 демонстрував максимальний ефект пригнічення росту кореня (30,2 %, табл. 3). ПЕГ-6000, як позитивний контрольний носій, проявив більш виражений інгібувальний ефект на проростання насіння і ріст кореня цибулі (табл. 3).

Отже, полімери на основі ДМАЕМА у концентрації 0,0025 % володіють низькою цитотоксичністю щодо цибулі *A. сера*. Слід зазначити, що полімери, які містять ПЕГ у структурі (БГП24, БГП25 і БГП26), у більшій мірі інгібували ріст кореня цибулі та проростання на-

Таблиця 4. Показник мітотичного індексу у меристематичних клітинах кореня цибулі *A. сера* за дії полімерів на основі ДМАЕМА

Речовина	Концентрація, %	MI, % ± SD	M/(A+T)	A/M
Контроль		12,7 ± 1,3	0,4	2,0
NaN <sub>3</sub>	0,0025	8,5 ± 1,0 *	0,3	2,3
БГ2	0,0025	10,6 ± 0,6	0,4	1,8
	0,025	9,9 ± 0,5 *	0,4	1,9
БГА21	0,0025	10,6 ± 0,5	0,4	1,9
	0,025	9,8 ± 0,4 *	0,4	1,8
БГА22	0,0025	10,6 ± 0,3	0,4	1,8
	0,025	10,0 ± 0,8 *	0,4	1,8
БГА22(2ф)	0,0025	10,1 ± 0,4 *	0,4	1,8
	0,025	9,9 ± 1,1 *	0,4	1,9
БГП24	0,0025	10,8 ± 0,5	0,3	2,1
	0,025	10,1 ± 0,2 *	0,3	2,0
БГП25	0,0025	10,8 ± 0,2	0,4	1,8
	0,025	10,0 ± 0,6 *	0,4	1,9
БГП26	0,0025	10,3 ± 0,3	0,3	2,1
	0,025	10,0 ± 0,5 *	0,3	2,1
БАДМ1	0,0025	11,3 ± 0,9	0,4	1,9
	0,025	10,2 ± 0,9	0,4	1,8
БАДМ2	0,0025	11,5 ± 1,0	0,4	1,9
	0,025	10,1 ± 0,8	0,4	1,8
ЛАДМ1	0,0025	11,5 ± 0,9	0,4	2,0
	0,025	10,3 ± 0,9	0,4	2,1
ЛАДМ2	0,0025	11,8 ± 1,1	0,4	2,0
	0,025	10,3 ± 0,8	0,4	2,1
ПЕГ	0,0025	8,3 ± 0,8 *	0,3	2,1
	0,025	8,0 ± 0,5 **	0,3	2,2

Примітка. MI – мітотичний індекс, M – метафаза, A – анафаза, T – телофаза; \* – P < 0,05; \*\* – P < 0,01.

сіння. Отримані результати співвідносяться з результатами, описаними в інших дослідженнях, щодо більш вираженої токсичності ПЕГ-вмісних носіїв [39–41].

Вплив полі-ДМАЕМА носіїв на каталазу, супероксиддисмутазу активності, вміст малнового діальдегіду. Показано, що у відповідь на дію стресових чинників активуються вільнорадикальні процеси (утворення активних форм Оксигену, відбувається вплив на активність ензимів антиоксидантної системи захисту, активуються процеси перекисного окиснення ліпідів, що є важливими захисними реакціями організму [42, 43]. У рослин є система захисту від окиснювальних процесів, зокрема ензими антиоксидантної системи захисту – супероксиддисмутазу, каталазу, аскорбат пероксидазу, глутатіонпероксидазу/S-трансферазу/редуктазу, поліфенолоксидазу та інші, а також неензиматичні антиоксидантні чинники, такі як каротиноїди, відновлений глутатіон, аскорбінова кислота, альфа-токоферол, пролін та різні фенольні сполуки, наприклад, флавоноїди, антоціани, дубильні речовини, лігнін, фенольна кислота та інші [33]. Каталаза розщеплює пероксид водню до води та кисню [44], а СОД каталізує відновлення супероксид радикалу до перекису водню та кисню [33]. Продукція активних форм Оксигену (АФО) також призводить до пошкодження основних компонентів клітини, таких як мембранні ліпіди (перекисне окислення ліпідів (ПОЛ)), білки, вуглеводи і нуклеїнові кислоти. Зміна вмісту основних молекулярних продуктів ПОЛ, наприклад, малнового діальдегіду, дозволяє оцінити інтенсивність даного процесу [33].

У зв'язку з цим ми досліджували вплив полі-ДМАЕМА носіїв у цибулі *A. сера* на активність КАТ і СОД, основні складові антиоксидантної системи захисту організму, а також на вміст МДА, що є інтегративним показником активності окиснювальних процесів.

Виявлено підвищення КАТ і СОД активності у корені цибулі *A. сера* за дії досліджуваних полі-ДМАЕМА носіїв і ПЕГ-6000 (рис. 2, а). Полімери БГ2, БГА21, БГА22, БГА22(2ф), БГП24, БГП25, ЛАДМ1, ЛАДМ2, БАДМ1 та БАДМ2 у концентрації 0,0025 % істотно не впливали на КАТ активність порівняно з рівнем такої активності у контролі. КАТ актив-



ність зростала до 0,35 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\text{хв}^{-1}$   $\text{мг}^{-1}$  білка за дії БГ2 у концентрації 0,0025 %; до 0,36 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\text{хв}^{-1}$   $\text{мг}^{-1}$  білка – за дії БГА21; до 0,37 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\text{хв}^{-1}$   $\text{мг}^{-1}$  білка – при дії БГА22 та БГА22(2ф); до 0,38 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\text{хв}^{-1}$   $\text{мг}^{-1}$  білка – за дії БГП25; до 0,39 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\text{хв}^{-1}$   $\text{мг}^{-1}$  білка – за дії БГП25 і БГП26 порівняно з рівнем КАТ активності у контролі (0,31 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\text{хв}^{-1}$   $\text{мг}^{-1}$  білок). Усі полімери на основі ДМАЕМА у концентрації, яка у 10 разів перевищує оптимальну концентрацію для трансформації рослин, впливали на КАТ активність, яка мінімально зростала на 26 % за дії БГА21 та ЛАДМ2, а максимально (на 55 %) за дії БГП24 та БГП26. Слід зазначити, що максимальну зміну КАТ активності можна було спостерігати за дії ПЕГ-6000 в обох досліджуваних концентраціях (рис. 2, а).

Полімери на основі ДМАЕМА у концентраціях 0,0025 % та 0,025 % не впливали на СОД активність (рис. 2, б). СОД активність значно зростала у клітинах кореня цибулі за дії ПЕГ в обох досліджуваних концентраціях.

Можна припустити, що зростання КАТ і СОД активності є реакцією організму на дію стресових чинників і пов'язана з накопиченням пероксиду водню та/або стимулюванням їх синтезу. АФО здатні пригнічувати реплікацію ДНК, синтез білків, а також взаємодіють з білками і ліпідами [33].

Полімери БАДМ1, БАДМ2 і ЛАДМ1 в концентрації 0,0025 % істотно не впливали на вміст МДА у корені цибулі. ПЕГ-вмісний носій БГП26 викликав підвищення вмісту МДА на 18,7 %, порівняно з контролем. Вміст МДА зростав на 59,4 % за дії ПЕГ у концентрації 0,0025 і на 112,7 % – за дії ПЕГ у концентрації 0,025 %, порівняно з контролем (рис. 2, в).

За результатами проведених досліджень можна зробити висновок, що полі-ДМАЕМА носії істотно не впливають на активність ензимів антиоксидантного захисту (КАТ і СОД) і вміст МДА.

Оцінка генотоксичного потенціалу полі-ДМАЕМА носіїв. Мутації і хромосомні аберації є ключовими маркерами мутагенної дії різних чинників [36]. Ми використали ана-телофазний тест з *A. сера* для виявлення потенційних ризиків від дії полімерних носіїв на осно-

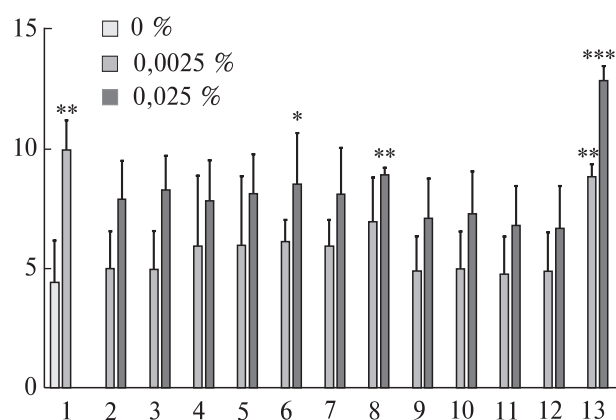
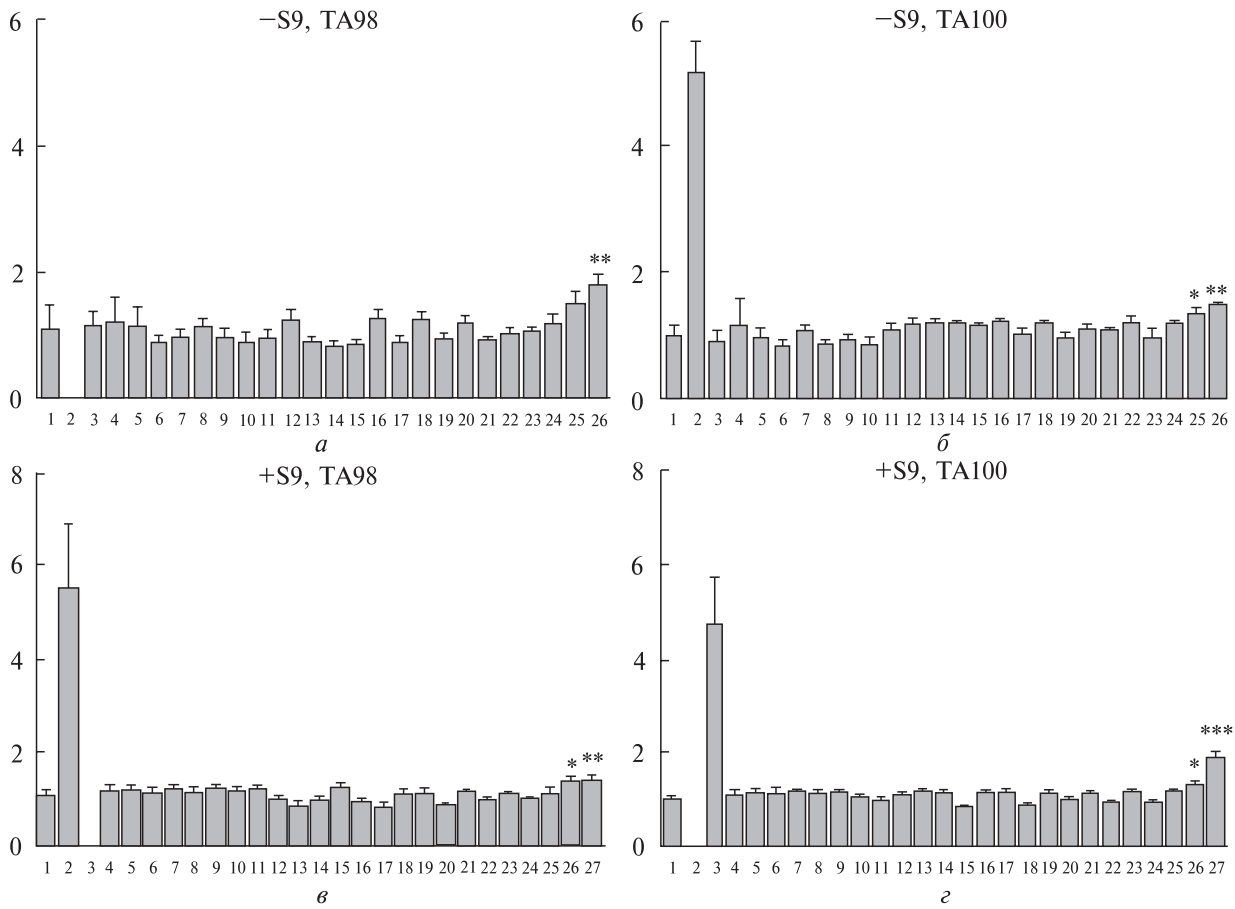


Рис. 3. Рівень хромосомних аберацій у меристематичних клітинах кореня цибулі *A. сера* за дії полі-ДМАЕМА носіїв. \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,0$ ; по вертикалі – рівень хромосомних аберацій, %; по горизонталі: 1 –  $\text{NaN}_3$ , 2 – БГ2, 3 – БГА21, 4 – БГА22, 5 – БГА22(2ф), 6 – БГП24, 7 – БГП25, 8 – БГП26, 9 – БАДМ1, 10 – БАДМ2, 11 – ЛАДМ1, 12 – ЛАДМ2, 13 – ПЕГ

ві ДМАЕМА. Встановлено, що БГА22(2ф) в концентрації 0,0025 % знижує мітотичний індекс (МІ) до 10,1 %, БГП26 – до 10,3 %, БГ2, БГА21 і БГА22 – до 10,6 %, БГП24 і БГП25 – до 10,8 %, БАДМ1 – до 11,3 %, БАДМ2, ЛАДМ1 – до 11,5 %, ЛАДМ2 – до 11,8 %, порівняно з 12,7 % у негативному контролі (необроблені корені цибулі) (табл. 4). Усі досліджені полімерні носії у 10-кратній концентрації (0,025 %) знижували МІ до 10,3–9,8 %, порівняно з негативним контролем (табл. 4). Таке зниження МІ може бути спричинене пригніченням проліферації клітин, синтезом ДНК та/або зупинкою клітинного циклу [30, 35].

Зниження співвідношення  $M/(A+T)$  свідчить про накопичення клітин в анафазі та телофазі, що може бути наслідком сповільненого поділу хромосом [30]. Коефіцієнт  $M/(A+T)$  рівновеликий 0,4, у контрольних зразках (табл. 4). Одержані результати свідчать про незначні зміни тривалості клітинного циклу за дії досліджуваних полімерів та відсутність вираженого інгібувального ефекту на мітотичний цикл, порівняно зі значним зниженням МІ за впливу ПЕГ та азиду натрію у концентрації 0,0025 % (табл. 4). БГП24 і БГП26 знижували коефіцієнт  $M/(A+T)$  до 0,3 і не порушували тривалості мітотичного циклу. Відомо, що співвідношення



**Рис. 4.** Результати визначення мутагенної активності полі-ДМАЕМА носіїв на штаммах TA98 і TA100 *S. typhimurium* без (а, б) і з метаболічною активацією мікосомальною фракцією S9 (в, г). Бензидин, нітрозогуанідин і натрію азид, відомі речовини-мутагени, використані як позитивні контрольні речовини. \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$ . По горизонталі а–б: 1 – контроль, 2 –  $\text{NaN}_3$ , 3 – БГ2, 0,0025 %; 4 – БГ2, 0,025 %; 5 – БГА21, 0,0025 %; 6 – БГА21, 0,025 %; 7 – БГА22, 0,0025 %; 8 – БГА22, 0,025 %; 9 – БГА22(2ф), 0,0025 %; 10 – БГА22(2ф), 0,025 %; 11 – БГП24, 0,0025 %; 12 – БГП24, 0,025 %; 13 – БГП25, 0,0025 %; 14 – БГП25, 0,025 %; 15 – БГП26, 0,0025 %; 16 – БГП26, 0,025 %; 17 – БАДМ1, 0,0025 %; 18 – БАДМ1, 0,025 %; 19 – БАДМ2, 0,0025 %; 20 – БАДМ2, 0,025 %; 21 – ЛАДМ1, 0,0025 %; 22 – ЛАДМ1, 0,025 %; 23 – ЛАДМ2, 0,0025 %; 24 – ЛАДМ2, 0,025 %; 25 – ПЕГ, 0,0025 %; 26 – ПЕГ, 0,025 %; по горизонталі в–г: 1 – контроль, 2 – бензидин, 3 – нітрозогуанідин, 4 – БГ2, 0,0025 %, 5 – БГ2, 0,025 %; 6 – БГА21, 0,0025 %; 7 – БГА21, 0,025 %; 8 – БГА22, 0,0025 %; 9 – БГА22, 0,025 %; 10 – БГА22(2ф), 0,0025 %; 11 – БГА22(2ф), 0,025 %; 12 – БГП24, 0,0025 %; 13 – БГП24, 0,025 %; 14 – БГП25, 0,0025 %; 15 – БГП25, 0,025 %; 16 – БГП26, 0,0025 %; 17 – БГП26, 0,025 %; 18 – БАДМ1, 0,0025 %; 19 – БАДМ1, 0,025 %; 20 – БАДМ2, 0,0025 %; 21 – БАДМ2, 0,025 %; 22 – ЛАДМ1, 0,0025 %; 23 – ЛАДМ1, 0,025 %; 24 – ЛАДМ2, 0,0025 %; 25 – ЛАДМ2, 0,025 %; 26 – ПЕГ, 0,0025 %; 27 – ПЕГ, 0,025 %

А/М менше рівня контролю передбачає частковий мітотичний блок [45]. Полімери БГП24 і БГП26, ЛАДМ1 і ЛАДМ2 підвищували коефіцієнт А/М до 2,1, тоді як інші досліджувані полімери знижували коефіцієнт А/М до 1,8–1,9, порівняно з контролем (А/М = 2,0; табл. 4).

Досліджено здатність полімерних носіїв на основі ДМАЕМА індукувати хромосомні аберації у меристематичних клітинах кореня цибулі *A. seara*. Виявлено 4,4 % хромосомних аберацій у контрольній групі (необроблені корені) (рис. 3). Появу хромосомних аберацій у контрольній

групі можна пояснити спонтанними мутаціями у клітинах. За дії полі-ДМАЕМА носіїв у концентрації 0,0025 % нами не відмічено суттєвих змін рівня хромосомних аберацій. Лише полімери БГП24 і БГП26 в концентрації 0,025 % достовірно підвищували рівень хромосомних аберацій до 8,5 і 8,9 %, відповідно. Можна припустити, що присутність ПЕГ у структурі полімерів БГП24, БГП25 і БГП26 є причиною підвищеної токсичності цих носіїв. Комерційний полімер ПЕГ-6000 в концентрації 0,0025 % підвищував рівень хромосомних аберацій до 8,8 %, в концентрації 0,025 % – до 9,9 % (рис. 3). Натрію азид підвищував рівень хромосомних аберацій до 9,7 % в меристематичних клітинах кореня цибулі (рис. 3).

Отже, досліджувані полі-ДМАЕМА носії в концентрації 0,0025 % не стимулюють збільшення рівня хромосомних аберацій у меристематичних клітинах кореня цибулі *A. sepa*.

Для виявлення мутагенного потенціалу нових полі-ДМАЕМА носіїв у концентраціях 0,0025 і 0,025 % використано тест Еймса на штамів *S. typhimurium* TA100 і TA98. Відповідно до рекомендацій OECD [32], при аналізі результатів тесту Еймса речовина оцінюється як мутаген, якщо середня кількість колоній індукованих Ніс-ревертантів перевищує спонтанний мутагенний фон більше, ніж в 2 рази. Якщо даний показник знаходиться в межах 1,7–1,9, сполука може бути класифікована як потенційно-мутагенна. Якщо мутагенний індекс сполуки знаходиться в межах від 1,0 до 1,6, речовина не володіє мутагенним потенціалом.

За дії бензидину, нітрозогуанідину та натрій азиду, відомих речовин-мутагенів спостерігали статистично достовірне збільшення кількості ревертантів *S. typhimurium*, що свідчить про чутливість даних тест-систем до впливу цих речовин. За дії вищезгаданих речовин мутагенний індекс досягав 4,72–5,44 (рис. 4, а–г). Мутагенний індекс становив 0,82–1,15 у штаму TA98 (рис. 4, а) і 0,81–1,21 – у штаму TA100 без додавання S9 за дії полімерів у концентрації 0,0025 і 0,025 % (рис. 4, б). Мутагенний індекс досягав значення 0,81–1,18 у штаму TA98 (рис. 4, в) і 0,82–1,17 – у штаму TA100 за додавання S9 (рис. 4, г). За дії ПЕГ у концентрації 0,0025 % мутагенний показник становив 1,27–1,47, а за дії ПЕГ в концентрації 0,025 % за додавання

мікросомальної активуючої суміші S9 спостерігали збільшення мутагенного індексу до 1,89 на штамі TA100 (рис. 4, г), а за відсутності S9 – до 1,76 (рис. 4, а). Одержані результати свідчать, що ПЕГ у концентрації 0,025 % є потенційно мутагенним чинником.

Досліджувані полі-ДМАЕМА носії не виявляли мутагенної активності у штамів TA98 і TA100 *S. typhimurium* ні у випадку додавання S9, ні за її відсутності (рис. 4).

**Висновки.** У роботі досліджено токсичний і мутагенний потенціал нових полі-ДМАЕМА носіїв генетичного матеріалу. ПЕГ-вмісні полі-ДМАЕМА носії в концентраціях 0,0025 % і 0,025 % проявляли більш виражений токсичний ефект щодо цибулі *A. sepa*. Полі-ДМАЕМА носії у вищій концентрації (0,025 %) неістотно підвищували каталазну активність (на 26–55 %), але не впливали на супероксиддисмутазну активність і вміст малонового діальдегіду в корені проростків цибулі *A. sepa*. Результати ана-телофазного тесту *A. sepa* не виявили здатності досліджуваних полі-ДМАЕМА носіїв в обох концентраціях (0,0025 % та 0,025 %) індукувати хромосомні аберації у меристемних клітинах цибулі. ПЕГ-вмісні полі-ДМАЕМА носії (БГП24 та БГП26) у 10-кратній концентрації (0,025 %) достовірно підвищували рівень хромосомних аберацій у клітинах *A. sepa*. Результати тесту Еймса (-S9 та +S9) продемонстрували відсутність мутагенного потенціалу полімерів на основі ДМАЕМА. Таким чином, нові полімерні носії на основі ДМАЕМА володіють низькою фітотоксичністю і відсутністю мутагенного потенціалу, порівняно із ПЕГ-вмісними носіями БГП24, БГП25, БГП26.

*Автори щиро дякують кандидату біологічних наук, доценту Боднар Л.С. (кафедра генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка) за консультації і технічну підтримку у проведенні тесту Еймса.*

**Дотримання етичних стандартів.** Біоетична експертиза експериментів із лабораторними тваринами проведена на біологічному факультеті Львівського національного університету імені Івана Франка, протокол від 15 травня 2018 р. № 11052018.

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Роботу виконано за фінансової підтримки гранту цільової комплексної між-дисциплінарної програми наукових досліджень Національної Академії наук України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» за 2015–2019 рр. (грант № 0115U004198).

EVALUATION OF PHYTOTOXICITY AND MUTAGENICITY OF NOVEL DMAEMA-CONTAINING GENE CARRIERS

N. Finiuk, N. Romanyuk, N. Mitina, O. Lobachevska, A. Zaichenko, O. Terek, R. Stoika

Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences of Ukraine, Drahomanov st., 14/16, Lviv, 79005, Ukraine

Ivan Franko National University of Lviv, Hrushevskyy st., 4, Lviv, 79005, Ukraine

Lviv Polytechnic National University, Bandera st., 12, Lviv, 79013, Ukraine

Institute of Ecology of the Carpathians of National Academy of Sciences of Ukraine, Kozelnyska st., 4, Lviv, 79026, Ukraine

E-mail: stoika.rostyslav@gmail.com

A use of novel carriers for gene delivery is rapidly growing, thus, investigation of potential phytotoxic and mutagenic action of gene delivery carriers is important for excluding their negative side effects. We found that poly-DMAEMA carriers used in 0,0025 % dose exhibited weak cytotoxic effect towards *Allium cepa* plant. In higher dose (0,025 %), they slightly (by 26–55 %) increased the level of catalase activity, but they did not affect the level of superoxide dismutase activity and malonic dialdehyde content in roots of *A. cepa*. The results of ana-telophase test in *A. cepa* did not demonstrate a genotoxic activity of the polymeric carriers used in 0.0025 % concentration and its higher dose (0,025 %). Slight genotoxic activity was detected only for BGP24 and BGP26, PEG-containing poly-DMAEMA carriers used in 0,025 %. The DMAEMA-based polymers did not possess mutagenic potential estimated in Ames test (–S9 and +S9). Thus, low phytotoxicity and absence of mutagenic action of novel polymeric carriers suggest their potential as promising nanocarriers for gene delivery into plant cells.

ОЦЕНКА ФИТОТОКСИЧЕСКОГО И МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА НОВЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ДМАЕМА

Н. Фінюк, Н. Романюк, Н. Мітіна, О. Лобачевська, А. Заиченко, О. Терек, Р. Стойка

Использование новых носителей для доставки генов у клетки быстро увеличиваются, поэтому исследование фитотоксического и мутагенного потенциала носителей генов является важным для исключения их отрицательных побочных эффектов. Установлено, что поли-ДМАЕМА носители в концентрации 0,0025 % владеют низкой токсичностью для лука *Allium cepa*. В более высокой дозе (0,025 %) они незначительно повышали активность каталазы (на 26–55 %), но не влияли на активность супероксид-дисмутазы и содержание малонового диальдегида в корнях проростков *A. cepa*. Результаты *A. cepa* ана-телофазного теста не показали генотоксического потенциала исследуемых поли-ДМАЕМА носителей в обеих концентрациях (0,0025 и 0,025 %). ПЭГ-содержащие поли-ДМАЕМА носители (БПП24 и БПП26) в 10× концентрации (0,025 %) достоверно повышали уровень хромосомных aberrаций в клетках *A. cepa*. Результаты теста Эймса (–S9 и +S9) показали отсутствие мутагенного потенциала полимеров на основе ДМАЕМА. Таким образом, низкая фитотоксичность и отсутствие мутагенного действия новых полимерных носителей на основе ДМАЕМА свидетельствуют об их перспективности для доставки генов в клетки растений.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cunningham, F.J., Goh, N.S., Demirer, G.S., Matos, J.L., and Landry, M.P., Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering, *Trends Biotechnol.*, 2018, vol. 36, no. 9, pp. 882–97. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.03.009>.
2. Demirer, G.S., Zhang, H., Matos, J.L., Goh, N.S., Cunningham, F.J., Sung, Y., Chang, R., Aditham, A.J., Chio, L., Cho, M. J., Staskawicz, B., and Landry, M.P., High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants, *Nat. Nanotechnol.*, 2019, vol. 14, no. 5, pp. 456–64. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0382-5>.
3. Tomlinson, and Rolland, A.P., Controllable gene therapy: pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems, *J. Control. Release*, 1996, vol. 39, no. 2–3, pp. 357–72. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00166-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00166-2).
4. Lv, H, Zhang, S., Wang, B., Cui, S., and Yan, J., Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *J. Control. Release*, 2006, vol. 114, no. 1, pp. 100–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014>.
5. Cerda-Cristerna, B.I., Flores, H., Pozos-Guillén, A., Pérez, E., Sevrin, C., and Grandfils, C., Hemocompatibility assessment of poly(2-dimethylamino ethylmethacrylate) (PDMAEMA)-based polymers, *J. Control. Release*, 2011, vol. 153, no. 3, pp. 269–77. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.016>.

6. Plamper, F.A., Synatschke, C.V., Majewski, A.P., Schmalz, A., Schmalz, H., and Müller, A.H.E., Star-shaped poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] and its derivatives: toward new properties and applications, *Polimery*, 2014, vol. 59, no. 1, pp. 66–73. <https://doi.org/10.14314/polimery.2014.066>.
7. Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D., and Li, Z., Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery, *J. Control. Release*, 2004, vol. 100, no. 2, pp. 15–180. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.019>.
8. Agarwal, S., Zhang, Y., Maji, S., and Greiner, A., PDMAEMA based gene delivery materials, *Materials Today*, 2012, vol. 15, no. 9, pp. 388–93. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70165-7](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70165-7).
9. Arnold, A.E., Czupiel, P., and Shoichet, M., Engineered polymeric nanoparticles to guide the cellular internalization and trafficking of small interfering ribonucleic acids, *J. Control. Release*, 2017, vol. 259, pp. 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.019>.
10. Cheng, Q., Du, L.L., Meng, L.W., Han, S.C., Wei, T., Wang, X.X., Wu, Y.D., Song, X.Y., Zhou, J.H., Zheng, S.Q., Huang, Y.Y., Liang, X.J., Cao, H.Q., Dong, A.J., and Liang, Z.C., The promising nanocarrier for doxorubicin and siRNA co-delivery by PDMAEMA-based amphiphilic nanomicelles, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, vol. 8, no. 7, pp. 4347–56. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b11789>.
11. Ficen, S.Z., Guler, Z., Mitina, N., Finiuk, N., Stoika, R., Zaichenko, A., and Ceylan S.E., Biophysical study of novel oligoelectrolyte based non-viral gene delivery systems to mammalian cells, *J. Gene Med.*, 2013, vol. 15, no. 5, pp. 193–204. <https://doi.org/10.1002/jgm.2710>.
12. Filyak, Ye., Finiuk, N., Mitina, N., Bilyk, O., Titorenko, V., Hrydzuk, O., Zaichenko, A., and Stoika R., A novel method for genetic transformation of yeast cells using oligoelectrolyte polymeric nanoscale carriers, *BioTechniques*, 2013, vol. 54, no. 1, pp. 35–43. <https://doi.org/10.2144/000113980>.
13. Finiuk, N., Chaplya, A., Mitina, N., Boiko, N., Lobachevska, O., Miahkota, O., Yemets, A., Blume Ya., and Stoika R., Genetic transformation of moss *Ceratodon purpureus* by means of polycationic carriers of DNA, *Cytol. Genet.*, 2014, vol. 48, no. 6, pp. 345–51. <https://doi.org/10.3103/S0095452714060048>.
14. Finiuk, N., Buziashvili, A., Burlaka, O., Zaichenko, A., Mitina, N., Miagkota, O., Lobachevska, O., Stoika, R., Blume, Ya., and Yemets, A., Investigation of novel oligoelectrolyte polymer carriers for their capacity of DNA delivery into plant cells, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2017, vol. 131, pp. 27–39. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1259-7>.
15. von Gersdorff, K., Sanders, N.N., Vandenbroucke, R., De Smedt, S.C., Wagner, E., and Ogris, M., The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethyleneimine-polyplex type, *Mol. Ther.*, 2006, vol. 14, no. 5, pp. 745–53. <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2006.07.006>.
16. You, Y.Z., Manickam, D.S., Zhou, Q.H., and Oupický, D., Reducible poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate): synthesis, cytotoxicity, and gene delivery activity, *J. Control. Release*, 2007, vol. 122, no. 3, pp. 217–25. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.04.020>.
17. Marslin, G., Sheeba, C.J., and Franklin, G., Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst, *Front. Plant Sci.*, 2017, vol. 8, pp. 832. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00832>.
18. Rao, S., Shekhawat, G.S., Phytotoxicity and oxidative stress perspective of two selected nanoparticles in *Brassica juncea*, *3 Biotech*, 2016, vol. 6, no. 2, pp. 244. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0550-3>.
19. Schallon, A., Jerome, V., Walther, A., Synatschke, C.V., Muller, A.H.E., and Freitag, R., Performance of three PDMAEMA-based polycation architectures as gene delivery agents in comparison to linear and branched PEI, *React. Funct. Polym.*, 2010, vol. 70, no. 1, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2009.09.006>.
20. Voronov, S.A., Kiselyov, E.M., Minko, S.S., Budishevska, O.G., and Roiter, Y.V., Structure and reactivity of peroxide monomers, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 1996, vol. 34, no. 12, pp. 25–2511. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19960915\)34:12<2507::AID-POLA24>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19960915)34:12<2507::AID-POLA24>3.0.CO;2-B).
21. Paiuk, O., Mitina, N., Slouf, M., Pavlova, E., Finiuk, N., Kinash, N., Karkhut, A., Manko, N., Gromovoy, T., Hevus, O., Shermolovich, Y., Stoika, R., and Zaichenko, A., Fluorine-containing block/branched polyamphiphiles forming bioinspired complexes with biopolymers, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2019, vol. 174, pp. 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.047>.
22. Zaichenko, A., Mitina, N., Shevchuk, O., Rayevska, K., Lobaz, V., Skorokhoda, T., and Stoika, R., Development of novel linear, block and branched oligoelectrolytes and functionally targeting nanoparticles, *Pure Appl. Chem.*, 2008, vol. 80, no. 11, pp. 2309–26. <https://doi.org/10.1351/pac200880112309>.
23. Kirmse, W., *Organic elemental analysis: Ultramicro, Micro, and Trace Methods*, N.-York: Academic Press, 1983.
24. Critchfield, F.E., *Organic functional group analysis – International Series of Monographs on Analytical Chemistry*, Pergamon Press, 1963.
25. Fiskesjo, G., *Allium test, Methods in Molecular Biology*, 1995, vol. 43, pp. 19–127.
26. Cove, D., Perroud, P.F., Charron, A., McDaniel, S.,

- Khandelwal, A., and Quatrano, R., The moss *Physcomitrella patens*. A novel model system for plant development and genomic studies in *Emerging model organisms, a laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo115>.
27. Goth, L., A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clin. Chim.*, 1991, vol. 196, no. 2–3, pp. 143–51. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-M](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M).
  28. Kumar, G., and Knowles, N.R., Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers, *Plant Physiol.*, 1993, vol. 102, no. 1, pp. 115–24. <https://doi.org/10.1104/pp.102.1.115>.
  29. Rank, J., and Nielsen, M.H., A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, vol. 118, no. 1, pp. 49–53. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1993.t01-3-00049.x>.
  30. Kiełkowska, A., *Allium cepa* root meristem cells under osmotic (sorbitol) and salt (NaCl) stress *in vitro*, *Acta Bot. Croat.*, 1993, vol. 76, no. 2, pp. 146–53. <https://doi.org/10.1515/botcro-2017-0009>.
  31. Mortelmans, K., and Zeiger, E., The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.*, 2000, vol. 455, no. 1–2, pp. 29–60. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00064-6).
  32. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test. TG 471. Adopted July 1997. Available at [chrome-extension://oemmnndcbldboiebf-nladdacbfmadadm/https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948418.pdf](https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948418.pdf).
  33. Yang, J., Cao, W., and Rui, Y., Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms, *J. Plant Interact.*, 2017, vol. 12, no. 1, pp. 158–69. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1310944>.
  34. Rajeshwari, A., Roy, B., Chandrasekaran, N., and Mukherjee, A., Cytogenetic evaluation of gold nanorods using *Allium cepa* test, *Plant Physiol. Biochem.*, 2016, vol. 109, pp. 209–19. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.003>.
  35. Shetty, A., Venkatesh, T., Suresh, P.S., and Tsutsumi, R., Exploration of acute genotoxic effects and antigenotoxic potential of gambogic acid using *Allium cepa* assay. *Plant Physiol. Biochem.*, 2017, vol. 118, pp. 643–52. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.005>.
  36. Ahmed, B., Dwivedi, S., Abdin, M.Z., Azam, A., Al-Shaeri, M., Khan, M.S., Saquib, Q., Al-Khedhairy, A.A., and Musarrat, J., Mitochondrial and chromosomal damage induced by oxidative stress in Zn<sup>2+</sup> ions, ZnO-bulk and ZnO-NPs treated *Allium cepa* roots, *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, pp. 40685. <https://doi.org/10.1038/srep40685>.
  37. Lah, B., Zinko, B., Tisler, T., and Marinsek-Logara, R., Genotoxicity detection in drinking water by Ames test, Zimmermann test and Comet assay, *Acta Chim. Slov.*, 2005, vol. 52, pp. 3–348.
  38. McCarren, P., Springer, C., and Whitehead, L., An investigation into pharmaceutically relevant mutagenicity data and the influence on Ames predictive potential, *J. Cheminform.*, 2011, vol. 3, pp. 51. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-51>.
  39. Lin, S., Du, F., Wang, Y., Li, S., Liang, D., Yu, L., and Li, Z., An acid-labile block copolymer of PDMAEMA and PEG as potential carrier for intelligent gene delivery systems, *Biomacromolecules*, 2008, vol. 9, no. 1, pp. 109–15. <https://doi.org/10.1021/bm7008747>.
  40. Sharma, R., Lee, J.-S., Bettencourt, R.C., Xiao, Ch., Konieczny, S.F., and Won, Y.-Y., Effects of the incorporation of a hydrophobic middle block into a PEG-polycation diblock copolymer on the physicochemical and cell interaction properties of the polymer-DNA complexes, *Biomacromolecules*, 2008, vol. 9, no. 1, pp. 3294–7. <https://doi.org/10.1021/bm800876v>.
  41. Piroton, S., Muller, C., Pantoustier, N., Botteman, F., Collinet, S., Grandfils, C., Dandrifosse, G., Degée, P., Dubois, P., and Raes, M., Enhancement of transfection efficiency through rapid and noncovalent post-PEGylation of poly(dimethylaminoethylmethacrylate)/DNA complexes, *Pharmaceut. Res.*, 2004, vol. 21, no. 8, pp. 1471–9. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000036923.25772.97>.
  42. Hong, J., Peralta-Videa, J.R., Rico, C., Sahi, S., Viveros, M.N., Bartonjo, J., Zhao, L., and Gardea-Torresdey, J.L., Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO<sub>2</sub> nanoparticles on cucumber (*Cucumis sativus*) plants, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, vol. 48, no. 8, pp. 4376–85. <https://doi.org/10.1021/es404931g>.
  43. Song, U., Lee, E.J., Ecophysiological responses of plants after sewage sludge compost applications, *J. Plant Biol.*, 2010, vol. 53, pp. 259–67. <https://doi.org/10.1007/s12374-010-9112->.
  44. Garg, N., and Manchanda, G., ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosyst.*, 2009, vol. 143, pp. 81–96. <https://doi.org/10.1080/11263500802633626>.
  45. Kenneth, W.A., *Advanced techniques in chromosome research*, CRC Press, 1991.

Надійшла в редакцію 16.10.19  
Після доопрацювання 16.01.20  
Прийнята до друку 18.09.20