



DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.2.2021.9-21>
УДК: 546.66-022.513.2:611.018.46.085

Функціональна активність клітин кісткового мозку тварин після обробки їх наноконкомплексами

Гольцев А. М., ORCID: 0000-0002-5289-5876, e-mail: cryopato@gmail.com
Дубрава Т. Г., ORCID: 0000-0002-1056-5107, e-mail: tgubrava@gmail.com
Гаєвська Ю. О., ORCID: 0000-0002-2375-357X, e-mail: yugaevska@gmail.com
Бабенко Н. М., ORCID: 0000-0001-7002-0267, e-mail: natbabenko73@gmail.com
Бондарович М. О., ORCID: 0000-0001-7977-0283, e-mail: nikolay.bondarovich@gmail.com
Луценко О. Д., ORCID: 0000-0003-3982-9687, e-mail: lenalutsenko809@gmail.com

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, м. Харків, Україна

Functional activity of animal bone marrow cells after their treatment with nanocomplexes

Goltsev A. M., ORCID: 0000-0002-5289-5876, e-mail: cryopato@gmail.com
Dubrava T. G., ORCID: 0000-0002-1056-5107, e-mail: tgubrava@gmail.com
Gaevska Yu. O., ORCID: 0000-0002-2375-357X, e-mail: yugaevska@gmail.com
Babenko N. M., ORCID: 0000-0001-7002-0267, e-mail: natbabenko73@gmail.com
Bondarovich M. O., ORCID: 0000-0001-7977-0283, e-mail: nikolay.bondarovich@gmail.com
Lutsenko O. D., ORCID: 0000-0003-3982-9687, e-mail: lenalutsenko809@gmail.com

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

Ключові слова:

наноконкомплекс, ортованадати, кістковий мозок, гемопоетичні клітини-попередники.

Для цитування:

Гольцев А. М., Дубрава Т. Г., Гаєвська Ю. О., Бабенко Н. М., Бондарович М. О., Луценко О. Д. Функціональна активність клітин кісткового мозку тварин після обробки їх наноконкомплексами. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2021. Т. XXIX. № 2. С. 9–21. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.2.2021.9-21>

Для кореспонденції:

Гольцев Анатолій Миколайович
Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, відділ кріопатофізіології та імунології;
вул. Переяславська, буд. 23,
м. Харків, Україна, 61016;
e-mail: cryopato@gmail.com

© Гольцев А. М., Дубрава Т. Г., Гаєвська Ю. О., Бабенко Н. М., Бондарович М. О., Луценко О. Д., 2021

РЕЗЮМЕ

Актуальність. Протипухлинна активність наноконкомплексів (НК), що містять наночастинки ортованадатів рідкісноземельних металів (GdYEuVO₄) та холестерин була доведена раніше. Їх застосування у співвідношенні – клітини : НК – 9:1, може вважатися умовно-терапевтичною дозою. Тому актуальним є дослідження потенційних ризиків впливу НК щодо функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників.

Мета роботи – визначення токсичного впливу наноконкомплексів на функціональну активність гемопоетичних клітин кісткового мозку (КМ).

Матеріали та методи. Дослідження були виконані на клітинах КМ мишей лінії СВА/Н. Наноконкомплекси були синтезовані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України. Інкубацію клітин КМ з НК проводили у співвідношеннях – 9КМ:1НК; 1КМ:1НК; 1КМ:9НК, після цього визначали кількість апоптотичних/некротичних клітин у КМ за допомогою FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD, США) на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD», США). Функціональну оцінку гемопоетичних клітин-попередників КМ проводили *in vivo* шляхом визначення вмісту колонієутворюючих одиниць селезінки (КУОс) і кількості мієлокаріоцитів у летально опромінених реципієнтів на 8-му добу після введення їм клітин КМ, попередньо інкубованих з НК. Облік виживаності опромінених мишей-реципієнтів після введення їм КМ здійснювали протягом 12 діб.

Результати та їх обговорення. Встановлено дозозалежний ефект інгібіції функціонального потенціалу гемопоетичних клітин-попередників КМ під впливом НК. Обробка *in vitro* клітин КМ умовно-терапевтичною дозою НК (9КМ:1НК) перед введенням опроміненим тваринам хоча і викликала перебудову мембран клітин та сприяла апоптотичним проявам, але не призводила до значущих змін їх колонієутворюючого потенціалу і не зменшувала кількість клітин КМ у стегні в опромінених тварин у порівнянні з введенням клітин КМ без обробки НК. Підвищення концентрації НК в 5 і 10 разів значно знижувало колонієутворюючий потенціал клітин КМ, викликало гіпоплазію КМ і суттєве зниження виживаності тварин-реципієнтів, що свідчить про можливий токсичний вплив цієї сполуки при введенні у високих концентраціях.

Висновки. Токсична дія НК виявляється тільки при застосуванні певних їх концентрацій, які значно перевищують умовно-терапевтичну дозу, визначену раніше при лікуванні експериментальних онкозахворювань.

Key words:

nanocomplex, orthovanadate, bone marrow, hematopoietic progenitor cells.

For citation:

Goltsev AM, Dubrava TG, Gaevska YuO, Babenko NM, Bondarovich MO, Lutsenko OD. Functional activity of animal bone marrow cells after their treatment with nanocomplexes. *Ukrainian journal of radiology and oncology*. 2021;29(2):9–21. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.2.2021.9-21>

For correspondence:

Goltsev Anatoliy Mykolayovych
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Cryopathophysiology and Immunology Department;
23, Pereyaslavska Str., Kharkiv, Ukraine, 61016;
e-mail: cryopato@gmail.com

© Goltsev A. M., Dubrava T. G., Gaevska Yu. O., Babenko N. M., Bondarovich M. O., Lutsenko O. D., 2021

ABSTRACT

Background. Previously, the antitumor activity of nanocomplexes (NCs) containing nanoparticles of rare earth metal orthovanadates GdYEuVO₄ and cholesterol has been approved when applied in 9:1 ratio (the cells-to-NCs), which can be considered as a conditionally therapeutic dose. Therefore, studying the potential risks of NCs exposure in terms of functional activity of hematopoietic progenitor cells is relevant.

Purpose – determining a toxic effect of NCs on functional activity of hematopoietic cells of bone marrow (BM).

Materials and Methods. The study was performed in BM cells of CBA/H mice. Nanocomplexes were synthesized at Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine. BM cells with NCs were incubated in the ratios as follows: 9BM:1NCs; 1BM:1NCs; 1BM:9NCs, followed by assessing the number of apoptotic/necrotic cells in BM using FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD, USA) by means of “FACS Calibur” flow cytometer (“BD”, USA). Hematopoietic progenitor cells of BM were functionally evaluated in vivo by determining the content of colony-forming units of the spleen (CFUs) and the number of myelokaryocytes in lethally irradiated recipients on day 8 after administering BM cells, pre-incubated with NCs. Survival of irradiated recipient mice after BM administration was recorded 12 days long.

Results and discussion. The dose-dependent effect of functional potential inhibition for BM hematopoietic progenitor cells under NCs influence has been established. Although, in vitro processing the BM cells with a conditionally therapeutic dose of NCs (9BM:1NCs) before administration to irradiated animal caused remodeling of cell membranes and contributed to apoptotic manifestations, but it did not lead to strong changes in their colony-forming potential and did not reduce the number of BM cells in animals if compared with the introduced BM cells without NCs treatment. Increasing the NCs concentration five- and tenfold significantly reduced the colony-forming potential of BM cells, caused BM hypoplasia and a crucial reduction in the survival of recipient animals, indicating possible toxic effects of this compound when administered at high concentrations.

Conclusions. The toxic effect of NCs is detected only when certain concentrations, significantly exceeding the conditionally therapeutic dose previously determined when treating the experimental oncology diseases, are used.

Рукопис надійшов
Manuscript was received
18.02.2021

Отримано після рецензування
Received after review
04.03.2021

Прийнято до друку
Accepted for printing
09.06.2021

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України «Сумісне застосування нанокомпозитів та ультранизких температур для інактивації туморогенних клітин та гальмування пухлинного росту», 1 етап (2020 р.) «Вивчення можливого токсичного впливу гібридних нанокомплексів на організм здорових тварин та на функціональну активність гемопоетичних клітин кісткового мозку» (номер державної реєстрації: 0120U102198, шифр теми: 2.2.6, фундаментальна, термін виконання: 2020–2024 рр., керівник – директор

Relationship with academic programs, plans and themes

The paper is a fragment of the planned research project at Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine (IPC&C) of the National Academy of Sciences of Ukraine which is “Combined use of nanocomposites and ultralow temperatures for inactivation of tumorigenic cells and inhibition of tumor growth”, Stage 1 (2020) “Study of possible toxic effects of hybrid nanocomplexes on organism of healthy animals and functional activity of bone marrow hematopoietic cells” (State Registration Number: 0120U102198, topic code: 2.2.6, fundamental, term: 2020–2024, headed by Director of IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academician

Інституту проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, академік НАН України, д-р мед. наук, професор Гольцев А.М.).

ВСТУП

Таргетна терапія онкозахворювань із застосуванням різноманітних наноматеріалів є одним із сучасних засобів комплексної терапії злоякісних новоутворень. Системне застосування лікарських протипухлинних засобів може супроводжуватись виникненням різних за проявом і ступенем тяжкості побічних реакцій відносно інших клітин і тканин. Тому однією з вимог до таких терапевтичних засобів є оптимальне співвідношення між їхньою протипухлинною ефективністю та відсутністю токсичного впливу на нормальні клітини та тканини.

В експериментальних умовах *in vivo* на моделі аденокарциноми Ерліха (АКЕ) раніше нами була обґрунтована можливість використання наноконкомплексів (НК), що містять наночастинки (НЧ) ортованадатів рідкісноземельних металів ($GdYEuVO_4$) та холестерин, для ідентифікації і пригнічення росту ракових клітин [1, 2]. Час інкубації 3 години був раніше визначений як оптимальний для проникнення НК у пухлинні клітини, що було підтверджено за допомогою конфокальної мікроскопії [3]. Було встановлено, що успішна реалізація протипухлинної здатності НК передбачає порушення функції мітохондрій із подальшою індукцією апоптотичних і некротичних змін трансформованих клітин [3]. Це забезпечувало 70% інгібіцію росту АКЕ в умовах *in vivo* [2, 3], що дозволяє розглядати співвідношення – клітини : НК (9:1) як умовно-терапевтичну дозу. Однак при цьому не виключена можливість негативного впливу НК на функцію нормальних клітин організму.

Відомо, що одним із механізмів реалізації протипухлинного ефекту НК може бути формування активних форм кисню із подальшим порушенням системи репарації ДНК [4]. Зокрема відомо, що комплекси металів здатні діяти як штучні нуклеази і розщеплювати ДНК активно проліферуючих клітин, що перешкоджає їх реплікації [5]. З огляду на це актуальним є визначення ступеня ушкодження найбільш активно проліферуючих клітин здорового організму, а саме клітин кісткового мозку (КМ), до пулу яких відносяться гемопоетичні клітини-попередники, які є ключовими клітинами імунопоезу, і здійснюють контроль та підтримку протипухлинної активності організму. Тому збереження функціонального стану клітин-попередників КМ онкохворих після застосування НК є однією із умов успішної реалізації їх протипухлинної дії.

Експериментальні дослідження щодо впливу сполук ванадію на функціональну активність мієлокаріоцитів досить нечисленні і суперечливі. Так, González-Villalva A. та співавт. встановили збільшення рівня тромбоцитів у крові, мегакаріоцитів у селезінці та КМ після вдихання ванадію [6]. Доведено, що ортованадат натрію є потужним радіопротектором, який запобігає ураженню системи кровотворення у мишей після їх

of the National Academy of Sciences of Ukraine, MD, Professor, A.M. Goltsev).

INTRODUCTION

Targeted therapy of cancer using various nanomaterials is one of the modern means of combined therapy of malignant neoplasms. Systemic administration of anti-cancer drugs may be accompanied by different manifestations and severity of adverse responses to other cells and tissues. Therefore, one of the requirements for such therapeutic agents is the optimal ratio between their antitumor efficiency and absence of toxic effects on normal cells and tissues.

In experimental *in vivo* models of Ehrlich carcinoma (EC), we have previously substantiated the possibility of using nanocomplexes (NCs) containing nanoparticles (NPs) of rare earth metal orthovanadates ($GdYEuVO_4$) and cholesterol to identify and inhibit the cancer cell growth. The incubation time of 3 hours was previously determined as optimal for the penetration of NCs into tumor cells, evidenced by confocal microscopy [3]. It was found that the successful implementation of the antitumor ability of NCs involved mitochondrial dysfunction with subsequent induction of apoptotic and necrotic changes in transformed cells [3]. This provided 70% inhibition of EC growth *in vivo* [2, 3], which enabled assuming the 9:1 ratio (the cells-to-NCs) as a conditionally therapeutic dose. However, the possibility of a negative effect of NCs on the function of normal cells is not excluded.

It is known that one of the mechanisms of implementation of the NCs antitumor effect may be the formation of reactive oxygen species with subsequent disruption of the DNA repair [4]. In particular, metal complexes are known to be able to act as artificial nucleases and break down the DNA of actively proliferating cells, preventing their replication [5]. In view of this, it is important to determine the degree of damage to the most actively proliferating cells of a healthy body, namely bone marrow (BM) cells, the pool of which comprises the hematopoietic progenitor cells, which are key immunopoiesis cells, controlling and maintaining an antitumor activity. Therefore, the preservation of the functional state of BM progenitor cells in cancer patients after the use of NCs is one of the conditions for successful implementation of their antitumor effect.

Experimental studies on the effect of vanadium compounds on the functional activity of myelokaryocytes are quite few and contradictory. Thus, González-Villalva A. et al. found a rise in the level of platelets in blood, megakaryocytes in the spleen and BM after inhalation of vanadium [6]. Sodium orthovanadate has been shown to be a potent radioprotector, preventing the damage to the hematopoietic system in mice after irradiation [7]. In contrast, Altamirano-Lozano M. et al. [8] report that vanadium pentoxide can cause DNA damage in various organs and tissues, in particular in BM cells.

опромінення [7]. Навпаки, Altamirano-Lozano М. та співавт. [8] повідомляють, що пентаоксид ванадію здатен викликати пошкодження ДНК у різних органах і тканинах, зокрема у клітинах КМ.

Мета роботи – визначення токсичного впливу наноконкомплексів на функціональну активність гемопоетичних клітин кісткового мозку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження були проведені на мишах лінії СВА/Н масою 20–22 г, віком 8 місяців, що утримувались у стандартних умовах віварію ІПКіК НАН України. Усі маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до регламенту, затвердженому Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України, який був розроблений відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (3447-IV від 21.02.2006 р.) і узгоджується з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Отримання суспензії кісткового мозку

Кістковий мозок вимивали із стегнових кісток середовищем 199 із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки («Biowest», Франція) і 3% цитрату натрію («WeifangEnsign», Китай) (робоче середовище). Суспензію клітин КМ отримували шляхом пропускання через голки різного діаметра (0,9–0,4 мм) та капроновий фільтр. Кількість клітин у суспензії підраховували в камері Горяєва.

Отримання наноконкомплексів

Наноконкомплекси були синтезовані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України (Харків) [9]. Наноконкомплекси є водною дисперсією холестерину (0,55 г/л) («Acrosorganics», Belgium) з використанням в якості речовини-стабілізатора НЧ ортованадатів рідкісноземельних металів ($GdYEuVO_4$) у концентрації 1,30 г/л [9]. Негативно заряджені НЧ стабілізують НК за рахунок локалізації по периферії частинок холестерину внаслідок Ван-дер-Ваальсових та гідрофобних взаємодій. Розміри синтезованих НК не перевищують 100 нм.

Інкубацію клітин КМ з НК проводили в силіконізованих пробірках у концентрації КМ 2×10^7 кл/мл у різних співвідношеннях з НК (9КМ:1НК; 1КМ:1НК; 1КМ:9НК) при кімнатній температурі протягом трьох годин. Після інкубації клітини були одноразово відмиті за допомогою центрифугування із фізіологічним розчином (АТ «Галичфарм», Україна) протягом 10 хвилин при 300g.

Кількість апоптотичних і некротичних клітин у КМ після їх інкубації з НК визначали за допомогою набору FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD, США, Cat. 556547) на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («Becton Dickinson») відповідно до протоколу фірми-виробника. Визначали відсоток живих клітин (AnnexinV⁻/PI⁻), клітин у стані раннього апоптозу (AnnexinV⁺/PI⁻), пізнього апоптозу (AnnexinV⁺/PI⁺) і некрозу (AnnexinV⁻/PI⁺).

Опромінення мишей здійснювали на установці «РУМ-17» («Мосрентген», Росія) в дозі 8 Гр у ДУ «Інс-

Purpose – determining a toxic effect of NCs on functional activity of hematopoietic cells of bone marrow.

MATERIALS AND METHODS OF RESEARCH

The study involved the CBA/H mice weighing 20–22 g, aged 8 months, kept under standard vivarium conditions at the IPC&C of NAS of Ukraine. All manipulations with animals were performed in accordance with the regulations approved by the Committee in Bioethics of the IPC&C of NAS of Ukraine, developed following the Law of Ukraine “On Protection of Animals Against Cruelty” (3447-IV of 21.02.2006), consistent with the provisions of the “European Convention on the Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1986).

Obtaining a suspension of bone marrow

The bone marrow was washed from a thigh with medium 199 adding 10% fetal bovine serum (Biowest, France) and 3% sodium citrate (WeifangEnsign, China) (handling medium). A suspension of BM cells was obtained by passing through needles of various diameters (0.9–0.4 mm) and a nylon filter. The number of cells in the suspension was counted in Goryaev's chamber.

Obtaining nanocomplexes

Nanocomplexes (NCs) were synthesized at Institute for Scintillation Materials of the NAS of Ukraine (Kharkiv) [9]. Nanocomplexes represent an aqueous dispersion of cholesterol (0.55 g/l) (“Acrosorganics”, Belgium) using as a stabilizer of NPs of orthovanadate rare earth metals $GdYEuVO_4$ at a concentration of 1.30 g/l [9]. Negatively charged NPs stabilize NCs owing to the localization of cholesterol particles on the periphery due to Van der Waals forces and hydrophobic interactions. The dimensions of the synthesized NCs do not exceed 100 nm.

BM cells were incubated with NCs in siliconized tubes at a concentration of BM 2×10^7 cells/ml in various ratios with NCs (9BM:1NCs; 1BM:1NCs; 1BM:9NCs) at room temperature for 3 hours. After incubation, the cells were washed with saline (JSC “Halychpharm”, Ukraine) once by centrifugation for 10 minutes, 300 g.

The number of apoptotic and necrotic cells in BM after incubation with NCs was determined using Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit I (BD, USA, Cat. 556547) with “FACS Calibur” flow cytometer (“Becton Dickinson”) according to the manufacturer protocol. The percentage of living cells (Annexin V⁻/PI⁻), cells in early apoptosis (Annexin V⁺/PI⁻), late apoptosis (Annexin V⁺/PI⁺) and necrosis (Annexin V⁻/PI⁺) was determined.

Mice were irradiated using “RUM-17” device (“Mosrentgen”, Russia) at a dose of 8 Gy at SO “Grigoriev

титут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва НАМН України». Умови опромінення: потужність дози – 38,6 Р/хв, напруга на трубці – 220 кВ, сила струму – 10 мА, фільтри – 1 мм Cu + 1 мм Al, фокусно-дорзальна відстань – 50 см. Тварин опромінювали в коробці з оргскла з індивідуальними комірками. Через 1 год після опромінення мишам (група 1 – 5) у хвостову вену вводили клітини КМ в дозі 1×10^5 кл / мишу в 0,2 мл фізіологічного розчину.

Дослідження було проведено двома серіями експериментів із використанням 6 експериментальних груп по 6 опромінених тварин у кожній.

Експериментальні групи:

Група 1 – введення суспензії свіжоізольованих клітин КМ (Контроль 1)

Група 2 – введення суспензії клітин КМ після інкубації протягом трьох годин у робочому середовищі (Контроль 2)

Група 3 – введення 900 мкл суспензії клітин КМ + 100 мкл НК (9КМ:1НК)

Група 4 – введення 500 мкл суспензії клітин КМ + 500 мкл НК (1КМ:1НК)

Група 5 – введення 100 мкл суспензії клітин КМ + 900 мкл НК (1КМ:9НК)

Група 6 – опромінені тварини без введення будь-чого (Контроль опромінення).

Визначення кількості клітин КМ в опромінених мишей проводили на 8-му добу (Група 1, n=5; Група 2, n=5; Група 3, n=5; Група 4, n=4; Група 5, n=3). У мишей вилучали стегнові кістки, вимивали з них КМ в 1 мл робочого середовища і підраховували кількість клітин у камері Горяєва та перераховували їх вміст у стегні.

Оцінка функціонального статусу гемопоетичних клітин-попередників КМ після їх попередньої обробки *in vitro* різними концентраціями НК була проведена *in vivo* за методом J.E. Till і E.A. McCulloch [10] шляхом визначення вмісту колонієутворюючих одиниць селезінки (КУОс) у летально опромінених тварин на 8-му добу після введення клітин КМ (група 1–5). У групі 6 (n=4) визначення кількості клітин КМ та КУОс здійснювали на 5-ту добу після опромінення.

Крім цього, протягом 12 діб після введення КМ здійснювали облік кількості тварин, що вижили.

Статистична обробка даних проводилася з використанням електронних таблиць Microsoft Excel 2010 і програми Statistica 10.0 («StatSoft», США). Порівняння декількох незалежних вибірок проводилося методом Краскала–Уолліса. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$. Попарне порівняння груп здійснювали з використанням непараметричного тесту Манна–Уїтні, з виправленням Бонферроні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З метою з'ясування можливого токсичного впливу НК на структурно-функціональну повноцінність клітин КМ були визначені показники життєздатності мієлокаріоцитів та тип їхньої загибелі за умов одночасного забарвлювання анексином-V (An) і пропідій йодидом (PI). Це є важливим показником при атестації

Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”. Irradiation conditions were as follows: 38.6 R/min dose rate, 220 kV tube voltage, 10 mA current, 1 mm Cu+ 1 mm Al filters, 50 cm focal length. The animals were irradiated in an acrylic box with individual cells. One hour after irradiation, the mice (groups 1–5) were injected into the tail vein with BM cells at a dose of 1×10^5 cells/mouse in 0.2 ml saline.

The study was performed in two series of experiments with 6 experimental groups of 6 irradiated animals in each.

Experimental groups were as follows:

Group 1 – introduction of a suspension of freshly isolated BM cells (Control 1)

Group 2 – introduction of a suspension of BM cells after incubation for 3 hours in a handling medium (Control 2)

Group 3 – introduction of 900 μ l of a suspension of BM cells + 100 μ l NCs (9BM: 1NCs)

Group 4 – introduction of 500 μ l of a suspension of BM cells + 500 μ l of NCs (1BM: 1NCs)

Group 5 – introduction of 100 μ l of a suspension of BM cells + 900 μ l of NCs (1BM: 9NCs)

Group 6 – irradiated animals without anything (Irradiation control).

The number of BM cells in irradiated mice was examined on day 8 (Group 1, n = 5; Group 2, n = 5; Group 3, n = 5; Group 4, n = 4; Group 5, n = 3). In mice, the thigh was removed, BM was washed from them in 1 ml of handling medium and the number of cells in Goryaev's chamber was counted and their content in a thigh was counted.

The functional status of hematopoietic progenitor cells of BM after their pre-treatment *in vitro* with various concentrations of NCs was evaluated *in vivo* with J.E. Till and E.A. McCulloch method [10] by determining the content of colony-forming units of the spleen (CFUs) in lethally irradiated animals on day 8 after administration of BM cells (groups 1–5). In Group 6 (n = 4), the number of BM and CFU cells was determined on day 5 after irradiation.

In addition, for 12 days after the BM introduction the number of survived animals was counted.

Data were statistically processed using Microsoft Excel 2010 spreadsheets and Statistics 10.0 (“StatSoft”, USA). Several independent samples were compared by the Kruskal–Wallis test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The groups were pairwise compared using the nonparametric Mann–Whitney test, with Bonferroni correction.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to determine the possible toxic effect of NCs on structural and functional integrity of BM cells, the indices of myelokaryocyte viability and type of their death during simultaneous staining with Annexin-V (An) and propidium iodide (PI) were determined. This is an important index in attesting the functional activity of BM cells after treatment

функціональної активності клітин КМ після обробки їх НК, оскільки відомо, що різні форми загибелі клітин, а саме, некроз або апоптоз, індукують різні типи імунної відповіді організму, що може обумовлювати різну ефективність протипухлинного захисту [11].

Перш за все, встановлено, що у свіжоізолюваних клітинах КМ (група 1) кількість живих клітин (An^{-}/PI^{-}) становила $93,42 \pm 0,96\%$, у стадії раннього апоптозу (An^{+}/PI^{-}) – $3,48 \pm 0,67\%$, пізнього апоптозу (An^{+}/PI^{+}) – $3,08 \pm 0,53\%$ та некрозу (An^{-}/PI^{+}) – $0,02 \pm 0,01\%$ (рис. 1, рис. 2). У клітинах КМ, які були проінкубовані у робочому середовищі при кімнатній температурі протягом трьох годин (група 2) не встановлено статистично значущих відмінностей щодо кількості живих клітин ($87,00 \pm 1,73\%$) від групи 1 ($93,42 \pm 0,96\%$), але відбувалося майже двократне (у порівнянні з групою 1) збільшення клітин у стадії раннього та пізнього апоптозу ($6,70 \pm 1,42\%$ та $6,30 \pm 0,84\%$ відповідно). Інкубація клітин КМ з НК у різних співвідношеннях (група 3, 4 та 5) призводила до поступового дозозалежного зниження частки живих клітин (An^{-}/PI^{-}), яка склала $53,39 \pm 2,21\%$; $10,23 \pm 1,71\%$ та $9,11 \pm 1,03\%$ відповідно. При цьому відзначено, що переважним типом загибелі клітин КМ під впливом НК є апоптоз. Інкубація клітин КМ з НК у співвідношенні 9КМ:1НК викликала збільшення кількості клітин у ранньому апоптозі (An^{+}/PI^{-}) з $3,48 \pm 0,67\%$ (група 1) до $25,85 \pm 1,72\%$ ($p < 0,05$), що свідчить про перебудову композиційного складу мембрани під дією такої концентрації НК і початок реалізації механізму їх загибелі шляхом апоптозу. Крім того, в цій групі було відзначено і статистично значуще збільшення кількості клітин у пізньому апоптозі (An^{+}/PI^{+}) в порівнянні з групою 1 і групою 2 (рис. 1 – 2).

of their NCs, because it is known that different forms of cell death, namely necrosis or apoptosis induce different types of immune response, that may stipulate different efficiency of antitumor protection [11].

It was first of all found that in the cells of freshly isolated BM (Group 1) the number of living cells (An^{-}/PI^{-}) was $93.42 \pm 0.96\%$, at the stage of early apoptosis (An^{+}/PI^{-}) it made $3.48 \pm 0.67\%$, $3.08 \pm 0.53\%$ for late apoptosis (An^{+}/PI^{+}) and $0.02 \pm 0.01\%$ for necrosis (An^{-}/PI^{+}) (Figs. 1 and 2). In the BM cells, which were incubated in the handling medium at room temperature for 3 hours (group 2), there were no significant differences in the number of living cells ($87.00 \pm 1.73\%$) from Group 1 ($93.42 \pm 0.96\%$), but there was almost a twofold (compared to Group 1) increase in cells at the stage of early and late apoptosis ($6.70 \pm 1.42\%$ and $6.30 \pm 0.84\%$, respectively). Incubation of BM cells with NCs in different ratios (groups 3, 4 and 5) led to a gradual dose-dependent decrease in the proportion of living cells (An^{-}/PI^{-}), which amounted to $53.39 \pm 2.21\%$; $10.23 \pm 1.71\%$ and $9.11 \pm 1.03\%$, respectively. It was noted that the predominant type of death of BM cells under the influence of NCs was apoptosis. Incubation of BM cells with NCs in the ratio of 9BM:1NCs caused a rise in the number of cells in early apoptosis (An^{+}/PI^{-}) from $3.48 \pm 0.67\%$ (Group 1) to $25.85 \pm 1.72\%$ ($p < 0.05$), which indicated the restructuring of the membrane composition under the action of such a concentration of NCs and the beginning of the mechanism of their death by apoptosis. In addition, in this group there was a significant increase in the number of cells in late apoptosis (An^{+}/PI^{+}) in comparison with Group 1 and Group 2 (Figs. 1 and 2).

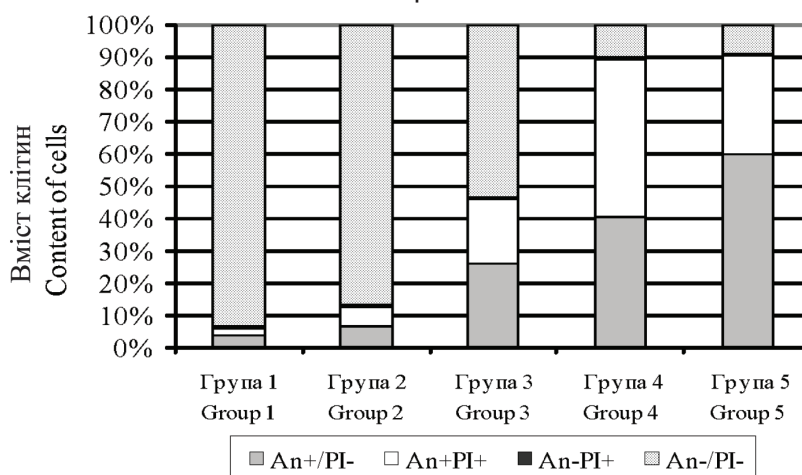


Рис. 1. Співвідношення апоптотичних/некротичних клітин КМ, виявлених шляхом забарвлення анексином-V/PI
Fig. 1. Ratio of apoptotic/necrotic BM cells detected by staining with Annexin-V/PI

Примітки: An^{-}/PI^{-} – живі; An^{+}/PI^{-} – ранньоапоптотичні; An^{+}/PI^{+} – пізньоапоптотичні та An^{-}/PI^{+} – некротичні клітини. Група 1 – свіжоізолювані клітини КМ; Група 2 – клітини КМ після інкубації в робочому середовищі протягом трьох годин без обробки НК; Група 3 – клітини КМ після інкубації з НК протягом трьох годин у співвідношенні 9КМ:1НК; Група 4 – клітини КМ після інкубації з НК протягом трьох годин у співвідношенні 1КМ:1НК; Група 5 – клітини КМ після інкубації з НК протягом трьох годин у співвідношенні 1КМ:9НК

Notes: An^{-}/PI^{-} – living cells; An^{+}/PI^{-} – early apoptotic; An^{+}/PI^{+} – late apoptotic and An^{-}/PI^{+} – necrotic cells. Notes: Group 1 – freshly isolated BM cells; Group 2 – BM cells after incubation in handling medium for 3 hours without NCs treatment; Group 3 – BM cells after incubation with NCs for 3 hours in a ratio of 9BM:1NCs; Group 4 – BM cells after incubation with NCs for 3 hours in a ratio of 1BM:1NCs; Group 5 – BM cells after incubation with NCs for 3 hours in a ratio of 1BM:9NCs

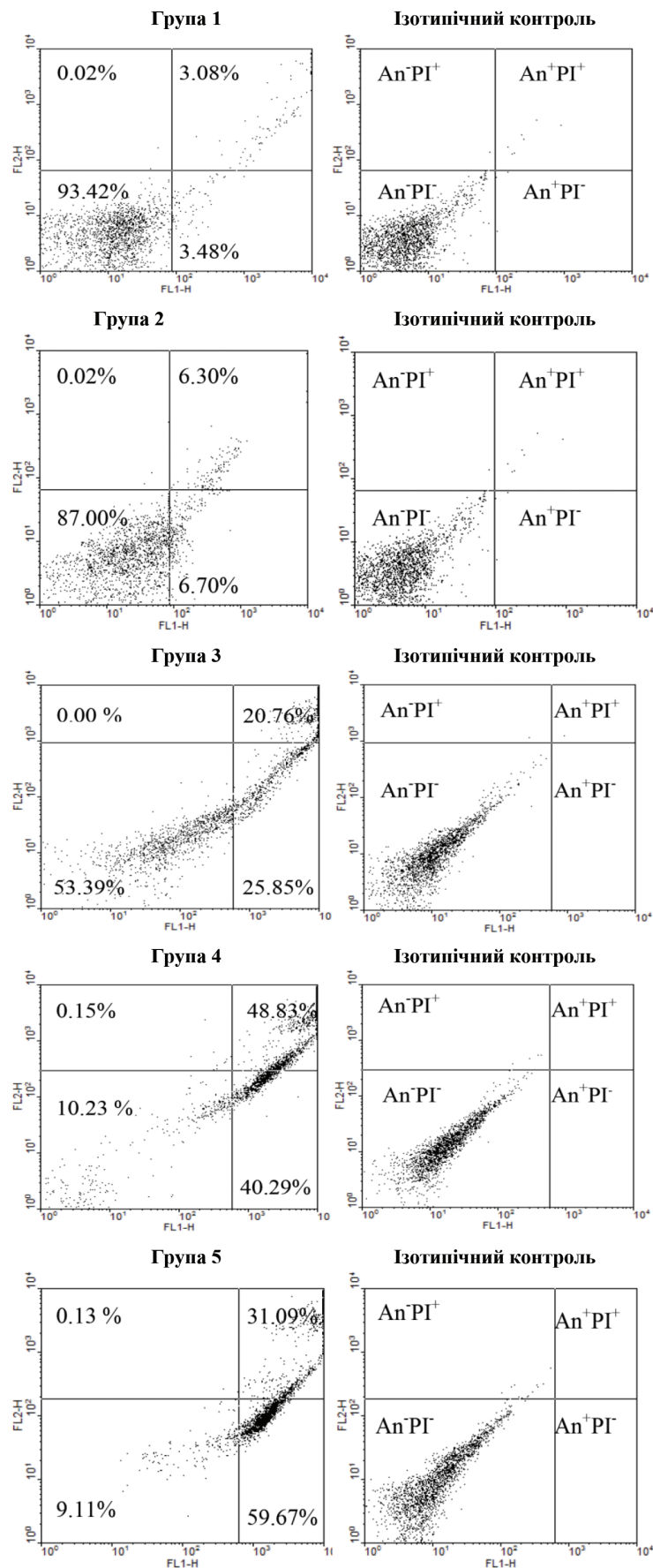


Рис. 2. Репрезентативні дані цитофлуориметричного аналізу кількості апоптотичних/некротичних клітин КМ
Fig. 2. Representative data of cytofluorimetric analysis of the number of apoptotic/necrotic BM cells

Примітки: An⁻/PI⁻ – живі; An⁺/PI⁻ – ранньоапоптотичні; An⁺/PI⁺ – пізньоапоптотичні та An⁻/PI⁺ – некротичні клітини
Notes: An⁻/PI⁻ – living cells; An⁺/PI⁻ – early apoptotic; An⁺/PI⁺ – late apoptotic and An⁻/PI⁺ – necrotic cells

Більш високі концентрації НК (група 4 та група 5) дозозалежно збільшували загальну кількість апоптотичних клітин. Так, використання найбільшої концентрації НК (у співвідношенні 1КМ:9НК) в 5 групі викликало максимальну загибель клітин шляхом апоптозу: в стадії раннього апоптозу (An^+/PI^-) – $59,67 \pm 0,56\%$, пізнього апоптозу (An^+/PI^+) – $31,09 \pm 0,39\%$, що у двадцять та у десять разів відповідно перевищувало аналогічний показник у необроблених клітин (група 1). Кількість клітин у стадії некрозу (An^-/PI^+) в усіх дослідних групах не перевищувала $0,15 \pm 0,01\%$.

Таким чином, встановлено, що НК вже на етапі інкубації *in vitro* здатні негативно впливати на клітини КМ, дозозалежно збільшуючи кількість мієлокаріоцитів у стані апоптозу. Раніше було встановлено, що НК викликають загибель пухлинних клітин аденокарциноми Ерліха переважно шляхом некрозу [3]. Подібна особливість впливу сполук ванадію на нормальні остеобласти лінії MC3T3E1 і клітини остеосаркоми лінії UMR106 була відзначена Molinuevo M.S. та співавт. [12]. Автори встановили, що ступінь токсичного впливу сполук ванадію був сильнішим щодо остеобластичних пухлинних клітин лінії UMR106, ніж щодо нетрансформованих MC3T3E1. Більш того, автори зазначали, що сполуки ванадію у комплексі з глюкозою були здатні індукувати некротичну загибель лише клітин пухлини і не виявляли такого механізму дії щодо нетрансформованих клітин.

Встановлені нами особливості дії різних концентрацій НК щодо типу загибелі мієлокаріоцитів *in vitro* обумовлюють необхідність визначення можливих змін функціонального стану гемопоетичної системи організму. Відомо, що при радіаційному ураженні організму тварин спостерігалася аплазія КМ і відновлення кровотворення в опромінених мишей-реципієнтів можливо шляхом введення КМ. Встановлено, що під впливом опромінення у тварин групи 6 на 5-ту добу було виявлено 40-разове зменшення кількості клітин у КМ ($2,3 [3,0; 3,0] \times 10^5$ /стегно, дані не наведені), а на 6-ту добу спостерігалася загибель усіх тварин. Введення свіжоізолюваних клітин КМ (група 1) не призводило до повного відновлення медулярного кровотворення, про що свідчить зниження цього показника приблизно у 7,7 рази в порівнянні з кількістю клітин на стегно здорової неопроміненої миші лінії СВА/Н віком 8 місяців, яка у середньому становить приблизно 1×10^7 клітин (дані не наводяться).

Обробка мієлокаріоцитів перед введенням летально опроміненим реципієнтам дозозалежно зменшувала їх здатність до відновлення костномозкового кровотворення, судячи з кількості клітин КМ на стегно у тварин груп 3–5 (табл. 1). При цьому треба зауважити, що обробка мієлокаріоцитів НК в умовно-терапевтичній дозі (співвідношення 9КМ:1НК) практично не зменшувала їх функціонального потенціалу в порівнянні з контрольними групами 1 і 2. Найнижчі показники кількості клітин КМ на стегно були відзначені в групі 5 (передобробка у співвідношенні 1КМ:9НК).

Порушення у системі кровотворення внаслідок впливу НК можуть обумовлювати зміну здатності гемопоетичних клітин-попередників належним чином підтри-

Higher concentrations of NCs (Group 4 and Group 5) dose-dependently increased the total number of apoptotic cells. Thus, the use of the highest concentration of NCs (in the ratio 1BM:9NCs) in Group 5 caused the maximum cell death by apoptosis, i.e. at the stage of early apoptosis (An^+/PI^-) it made $59.67 \pm 0.56\%$, in late apoptosis (An^+/PI^+) this made $31.09 \pm 0.39\%$, which was twenty and ten times higher, respectively, than in untreated cells (Group 1). The number of cells at the necrosis stage (An^-/PI^+) in all experimental groups did not exceed $0.15 \pm 0.01\%$.

Thus, it was found that NCs already at the stage of incubation *in vitro* were able to adversely affect the BM cells, increasing in a dose-dependent manner the number of myelokaryocytes in the state of apoptosis. It has previously been found that NCs cause the death of Ehrlich carcinoma tumor cells mainly by necrosis [3]. A similar feature of the effect of vanadium compounds on normal osteoblast cell line, MC3T3E1 and osteosarcoma cell line, UMR106 was noted by Molinuevo M.S. et al. [12]. They found that the degree of toxicity of vanadium compounds was stronger against osteoblastic tumor cells of the UMR106 line than untransformed MC3T3E1. Moreover, the authors revealed that vanadium compounds in combination with glucose were able to induce necrotic death of only tumor cells and did not show such a mechanism of action against untransformed cells.

The peculiarities of the action of different concentrations of NCs in relation to the type of myelokaryocyte death *in vitro* determine the need to reveal possible changes in the functional state of hematopoietic system of the organism. It is known that in case of radiation damage to the body of animals there is BM aplasia along with restoration of hematopoiesis in irradiated recipient mice being possible if BM is introduced. It was found that under the influence of irradiation in the animals of Group 6 on day 5 there was a 40-fold decrease in the number of cells in the BM ($2.3 [3.0; 3.0] \times 10^5$ / thigh, no data provided), and on day 6 we observed a death of all animals. The introduction of freshly isolated BM cells (Group 1) did not lead to complete recovery of medullar hematopoiesis, as evidenced by a decrease of approximately 7.7 times compared to the number of cells per a thigh of a healthy non-irradiated CBA / H mouse aged 8 months averaging approximately 1×10^7 cells (no data provided).

Treatment of myelokaryocytes before administration to lethally irradiated recipients in dose-dependent manner reduced their ability to restore bone marrow hematopoiesis, judging by the number of BM cells per a thigh in the animals of groups 3–5 (Table 1). It should be noted that the treatment of myelokaryocytes with NCs in the conditionally therapeutic dose (ratio 9BM:1NCs) did not decrease their functional potential in comparison with the control groups 1 and 2. The lowest rates of BM cells per a thigh were observed in Group 5 (pre-treatment in 1BM: 9NCs ratio).

Disturbances in the hematopoietic system resulting from NCs may alter the ability of hematopoietic progenitor cells to properly maintain hematopoiesis, which can be estimated by the number of colony-forming units in spleen (CFUs) of lethally irradiated recipients *in vivo*.

мувати гемопоєз, що може бути оцінено за кількістю колонієутворюючих одиниць у селезінці (КУОс) летально опромінених реципієнтів *in vivo*. Дійсно, встановлено, що обробка клітин КМ різними концентраціями НК (група 3–5) перед введенням опроміненим тваринам викликала дозозалежне зниження кількості КУОс у селезінці в порівнянні з контрольними групами 1 і 2 (табл. 1).

Indeed, it was found that the treatment of BM cells with different concentrations of NCs (groups 3–5) before administration to irradiated animals caused a dose-dependent decrease in the number of CFUs in the spleen compared with control groups 1 and 2 (Table 1).

Таблиця 1. Кількість клітин КМ на стегно та КУОс в опромінених мишей на восьму добу після введення клітин КМ, попередньо інкубованих з НК у різних співвідношеннях
Table 1. The number of BM cells per a thigh and CFUs in irradiated mice on day 8 after administration of BM cells pre-incubated with NCs in different ratios

Група/Group	Кількість клітин КМ/стегно, $\times 10^5$ Number of BM cells / thigh, 10^5	Кількість КУОс, абс. од. Number of CFUs, abs. units
1	13,0 [13,0; 14,0]	15,0 [14,5; 15,5]
2	12,0 [11,5; 12,5]	14,0 [14,0; 14,1]
3	11,0 [9,8; 11,5]	13,5 [13,0; 14,0]
4	7,0 [6,0; 7,0]	11,0 [10,0; 12,5]
5	4,0 [3,6; 4,3]*	6,0 [5,5; 6,5]*

Примітки: група 1 (контроль 1) – введення опроміненим реципієнтам свіжоізолюваних клітин КМ (n=5); група 2 (контроль 2) – введення опроміненим реципієнтам КМ після інкубації в робочому середовищі протягом трьох годин без обробки НК (n=5); група 3 – співвідношення 9КМ:1НК (n=5); група 4 – співвідношення 1КМ:1НК (n=4); група 5 – співвідношення 1КМ:9НК (n=3); * – різниця статистично значуща у порівнянні з групою 1 (p < 0.01)

Notes: Group 1 (Control 1) – maintenance of irradiated recipients of freshly isolated BM cells (n=5); Group 2 (Control 2) – introduction to irradiated recipients of BM after incubation in handling medium for 3 hours non-treated with NCs (n=5); Group 3 – ratio of 9BM:1NCs (n=5); Group 4 – ratio of 1BM:1NCs (n=4); Group 5 – ratio of 1BM:9NCs (n=3); * – difference is significant in comparison with Group 1 (p < 0.01)

Суттєво, що обробка КМ НК у співвідношенні 9КМ:1НК (група 3) викликала лише 10% зниження КУОс у порівнянні з аналогічними показниками тварин груп 1 і 2 (табл. 1). Введення летально опроміненим мишам клітин КМ, попередньо оброблених в співвідношеннях 1КМ:1НК (група 4) і 1КМ:9НК (група 5) призвело до статистично значущого зменшення кількості КУОс як у порівнянні з контрольними показниками груп 1 і 2, так і з групою 3. При цьому встановлено, що інкубація клітин КМ із найбільшою концентрацією НК (група 5) спричинила максимальну інгібіцію функціонального потенціалу КУОс серед усіх дослідних груп. Таким чином, застосування НК лише в найменшій із досліджених концентрацій – в умовно-терапевтичній дозі (співвідношення 9КМ:1НК) статистично значуще не змінювало кількість КУОс у КМ.

Функціональний потенціал клітин-попередників, які здатні відновлювати кровотворення у КМ летально опромінених реципієнтів після трансплантації КМ, визначає виживаність опромінених тварин. Тотальна загибель тварин, яким не вводили КМ (група 6) спостерігалася на 6-ту добу (рис. 3) на тлі аплазії КМ. Виживаність тварин групи 3 із введенням КМ, обробленого найменшою дозою НК (9КМ:1НК), на 12 добу суттєво не відрізнялась від цього показника контрольної групи 2. Водночас обробка КМ НК у співвідношеннях 1КМ:1НК

It is crucial that the treatment of BM with NCs in the ratio of 9 BM:1NCs (Group 3) caused only a 10% decrease in CFU compared to similar indices of animals of Groups 1 and 2 (Table 1). The introduction of lethally irradiated mice BM cells, pre-treated in the ratio of 1BM: NCs (Group 4) and 1BM:9NCs (group 5) led to a significant decrease in the number of CFUs in comparison with control indices of Groups 1 and 2 as well as Group 3. The incubation of BM cells with the highest concentration of NCs (Group 5) was found to cause maximum inhibition of the functional potential of CFUs among all experimental groups. Thus, the use of NCs only in the lowest of the studied concentrations, i.e. in conditionally therapeutic dose (ratio 9BM: 1NCs) did not significantly change the amount of CFUs in BM.

The functional potential of progenitor cells that are able to restore hematopoiesis in BM of lethally irradiated recipients after BM transplantation determines the survival of irradiated animals. Total death of animals not administered with BM (Group 6) was observed on day 6 (Fig. 3) on the background of the BM aplasia. Survival of animals of Group 3 with the introduction of BM treated with the lowest dose of NCs (9BM:1NCs) for 12 days did not differ significantly from this index of Control group 2. At the same time, treatment of BM with NCs in the ratios 1BM:1NCs (Group 4) and 1BM:9NCs (Group 5) before

(група 4) та 1КМ:9НК (група 5) перед введенням опроміненим тваринам викликала суттєве зниження їх виживаності в порівнянні як з контрольними групами 1 і 2, так із групою 3 з обробкою найменшою дозою НК.

administration to irradiated animals caused a significant reduction in their survival compared to both Control groups 1 and 2 as well as Group 3 with the lowest dose of NCs treatment.

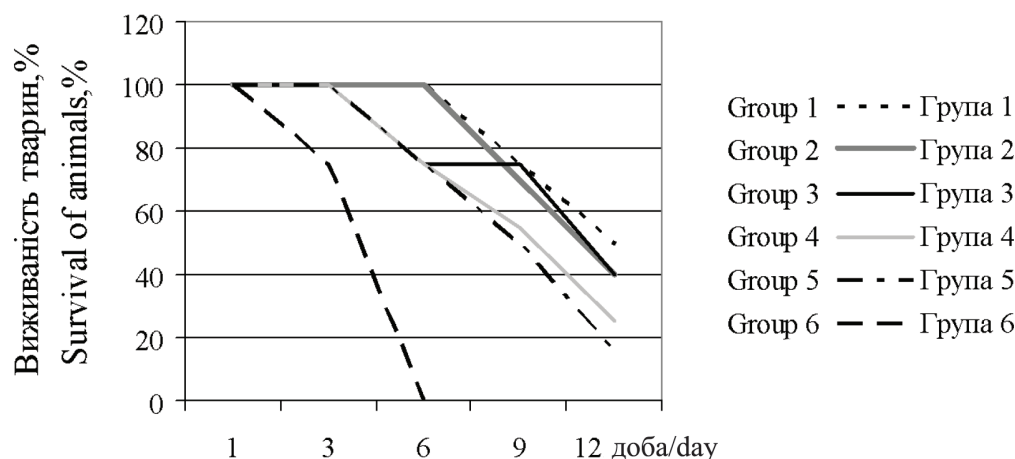


Рис. 3. Виживаність тварин після введення КМ з попередньою обробкою різними концентраціями НК
Fig. 3. Survival of animals after introduction of BM pre-treated with different concentrations of NCs

Отримані результати свідчать про те, що НК не є індиферентними сполуками щодо колонієутворюючого потенціалу (КУОс) клітин КМ, зокрема гемопоетичних клітин-попередників. Однак токсична дія НК виявляється тільки при застосуванні їх у певних концентраціях, які значно перевищують умовно-терапевтичну дозу (9КМ:1НК), ефективність застосування якої раніше була доведена при лікуванні експериментальної онкопатології [3]. Встановлено, що обробка клітин КМ найменшою дозою НК (9КМ:1НК) перед введенням опроміненим тваринам викликала збільшення кількості клітин у стані раннього апоптозу (An^+/PI^-), що свідчить про перебудову мембран клітин, зокрема появу на поверхні клітини фосфатидилсерину, який зазвичай локалізований на внутрішньому боці плазматичної мембрани. Але це свідчить лише про можливість розвитку апоптозу, оскільки на ранніх стадіях апоптозу цілісність клітинної мембрани зберігається і втрата асиметрії мембранних фосфоліпідів є оборотною. Оскільки в цій групі не було відзначено статистично значущих змін вмісту і кількості клітин КМ на стегно в опромінених тварин у порівнянні з контрольною групою 2 (введення клітин КМ без обробки НК), можна вважати, що мієлокаріоцити не втратили своєї функціональної повноцінності під впливом НК. Натомість підвищення концентрації НК в 5 і 10 разів призвело до значного збільшення клітин у стані пізнього апоптозу (An^+PI^+), що свідчить вже про порушення цілісності клітинної мембрани, проникнення пропідій йодиду (PI) крізь неї та інтеркаляцію з дефрагментованою ДНК. Такі незворотні зміни мієлокаріоцитів під впливом НК призвели в цих групах до зменшення колонієутворюючого потенціалу клітин-попередників КМ, що обумовило суттєве зниження виживаності тварин-реципієнтів.

The findings indicate that NCs are not indifferent compounds with respect colony-forming potential (CFUs) of BM cells, in particular hematopoietic progenitor cells. However, the toxic effect of NCs is detected only when certain concentrations are used, significantly exceeding the conditionally therapeutic dose (9BM:1NCs), the effectiveness of which has previously been proven when treating experimental oncopathology [3]. It was found that treatment of BM cells with the lowest dose of NCs (9BM:1NCs) before administration to irradiated animals caused an increase in the number of cells in the early apoptosis (An^+/PI^-), indicating the rearrangement of cell membranes, in particular an appearance of phosphatidylserine on the cell surface which is usually localized on the inner side of plasma membrane. However, this testifies only to possibility of the apoptosis development, since at early stages of apoptosis the integrity of cell membrane is kept and the loss of membrane phospholipids' asymmetry is reversible. Because in this group there were no significant changes in the content and number of BM cells per a thigh in irradiated animals compared with Control group 2 (introduction of BM cells without NCs treatment), we can assume that myelokaryocytes have not lost their functional value under the influence of NCs. Instead, an increase in the concentration of NCs by 5 and 10 times has led to a significant rise in the cells in late apoptosis (An^+PI^+), which indicates a disorder of cell membrane integrity, penetration of propidium iodide (PI) through it and intercalation with defragmented DNA. Such irreversible changes in myelokaryocytes under the influence of NCs led to a decrease in the colony-forming potential of BM progenitor cells in animals of these groups, which led to a significant reduction in the survival of recipient animals.

ВИСНОВКИ

1. Ризик застосування наноконкомплексів, що містять наночастинки рідкісноземельних металів ($GdYEuVO_4$)

CONCLUSIONS

1. The risk of using the nanocomplexes containing rare earth metal orthovanadates nanoparticles ($GdYEuVO_4$)

та холестерин, у дозах, що значно перевищують умовно-терапевтичну, може бути пов'язаний із їх проапоптотичним впливом на клітини кісткового мозку.

2. Встановлено дозозалежний ефект інгібіції колонієутворюючого потенціалу гемопоетичних клітин-попередників (КУОс) під впливом наноконкомплексів.

3. Обробка клітин *in vitro* наноконкомплексами в умовно-терапевтичній дозі (співвідношення 9КМ:1НК), хоча і сприяла збільшенню кількості апоптотичних клітин у загальному пулі мієлокаріоцитів, однак це не призвело до зниження їх колонієутворюючого потенціалу при введенні летально опроміненим тваринам.

4. Підвищення концентрації НК у 5 і 10 разів в порівнянні з умовно-терапевтичною дозою статистично значуще знижувало кількість КУОс, що свідчить про можливий токсичний вплив цієї сполуки щодо функціональної активності клітин-попередників гемопоєзу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Goltsev A. N., Malyukin Y. V., Dubrava T. G., Babenko N. N., Gaevskaya Y. A., Chelombytko O. V. et al. Nanocomposites specifically penetrate and inhibit tumor cells. *Nanoverbundstrukturen zur besonderen Durchdringung und Hemmung von Tumorzellen*. 2016. Vol. 47(2/3). P. 156–165. DOI: <https://doi.org/10.1002/mawe.201600457>
2. Goltsev A. N., Babenko N. N., Gaevskaya Y. A., Bondarovich N. A., Dubrava T. G., Ostankov M. V., et al. Nanotechniques inactivate cancer stem cells. *Nanoscale Research Letters*. 2017. Vol. 12(1). 415 p. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2175-9>
3. Goltsev A., Malyukin Yu., Babenko N., Gaevska Yu., Bondarovich M., Kovalenko I. et al. Mechanisms of Antitumor Effect of Nanomaterials Based on Rare Earth Orthovanadates. In: Fesenko O., Yatsenko L. (eds) *Nanooptics and Photonics, Nanochemistry and Nanobiotechnology, and Their Applications*. Springer Proceedings in Physics. 2020. Vol. 247. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-52268-1_1
4. Kowalski S., Wyrzykowski D., Inkielewicz-Stepniak I. Molecular and cellular mechanisms of cytotoxic activity of vanadium compounds against cancer cells. *Molecules*. 2020. Vol. 7. 1757 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25071757>
5. Saha U., Mukherjee K. K. DNA binding and nuclease activity of an oxovanadium valinato-Schiff base complex. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014. Vol. 66. P. 166–171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.033>
6. González-Villalva A., Piñón-Zarate G., Piñón-Zarate G., Rodríguez-Lara V., Montaña L. F., Saldivar-Osorio L. Ultrastructural megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in spleen and bone marrow. *Journal of Electron Microscopy*. 2009. Vol. 58(6). P. 375–380. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfp031>
7. Wang B., Tanaka K., Morita A., Ninomiya Y., Maruyama K., Fujita K. et al. Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *Journal of Radiation Research*. 2013. Vol. 54(4). P. 620–629. DOI: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrs140>

and cholesterol at doses significantly exceeding the conditionally therapeutic may be associated with their proapoptotic effects on bone marrow cells.

2. The dose-dependent effect of inhibition of colony-forming potential of hematopoietic progenitor cells (CFUs) under the influence of nanocomplexes has been established.

3. Treatment of cells *in vitro* with nanocomplexes at a conditionally therapeutic dose (ratio 9NM:1NCs), although contributed to a rise in the number of apoptotic cells in total pool of myelokaryocytes, but this did not reduce their colony-forming potential when administered to irradiated animals.

4. Increasing the concentration of NCs five- and tenfold compared with the conditionally therapeutic dose significantly reduced the number of CFUs, indicating a possible toxic effect of this compound on functional activity of hematopoietic progenitor cells.

REFERENCES

1. Goltsev AN, Malyukin YV, Dubrava TG, Babenko NN, Gaevskaya YA, Chelombytko OV et al. Nanocomposites specifically penetrate and inhibit tumor cells. *Nanoverbundstrukturen zur besonderen Durchdringung und Hemmung von Tumorzellen*. 2016;47(2/3):156–65. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1002/mawe.201600457>
2. Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YA, Bondarovich NA, Dubrava TG, Ostankov MV et al. Nanotechniques inactivate cancer stem cells. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1):415. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2175-9>
3. Goltsev A, Malyukin Yu, Babenko N, Gaevska Yu, Bondarovich M, Kovalenko I et al. Mechanisms of Antitumor Effect of Nanomaterials Based on Rare Earth Orthovanadates. In: Fesenko O., Yatsenko L. (eds) *Nanooptics and Photonics, Nanochemistry and Nanobiotechnology, and Their Applications*. Springer Proceedings in Physics. 2020;247. (In English). DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-52268-1_1
4. Kowalski S, Wyrzykowski D, Inkielewicz-Stepniak I. Molecular and cellular mechanisms of cytotoxic activity of vanadium compounds against cancer cells. *Molecules*. 2020;25(7):1757. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25071757>
5. Saha U, Mukherjee KK. DNA binding and nuclease activity of an oxovanadium valinato-Schiff base complex. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;66:166–71. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.033>
6. González-Villalva A, Piñón-Zarate G, Piñón-Zarate G, Rodríguez-Lara V, Montaña LF, Saldivar-Osorio L. Ultrastructural megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in spleen and bone marrow. *Journal of Electron Microscopy*. 2009;58(6):375–80. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfp031>
7. Wang B, Tanaka K, Morita A, Ninomiya Y, Maruyama K, Fujita K et al. Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *Journal of Radiation Research*. 2013;54(4):620–9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrs140>

8. Altamirano-Lozano M., Valverde M., Alvarez-Barrera L. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*. 1999. Vol. 19(4). P. 243–255. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6866\(1999\)19:4<243::aid-tcm1>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6866(1999)19:4<243::aid-tcm1>3.0.co;2-j)
9. Ключков В. К. Спосіб отримання водної дисперсії холестерину: пат. № 10801 України: заявл. 10.03.2015.
10. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Journal of Radiation Research*. 1961. Vol. 14(12). P. 213–222. DOI: <https://doi.org/10.2307/3570892>
11. Гольцев А. М., Бондарович М. О., Бабенко Н. М., Гаєвська Ю. О., Дубрава Т. Г., Останков М. В. Використання наноматеріалів у кріобіології та кріомедицині. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2020. № 30(4). P. 313–330. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.04.313>
12. Molinuevo M. S., Barrio D. A., Cortizo A. M., Etcheverry S. B. Antitumoral properties of two new vanadyl (IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother and Pharmacology*. 2004. Vol. 53(2). P. 163–172. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0708-7>
8. Altamirano-Lozano M., Valverde M., Alvarez-Barrera L. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*. 1999;19(4):243–55. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6866\(1999\)19:4<243::aid-tcm1>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6866(1999)19:4<243::aid-tcm1>3.0.co;2-j)
9. Klochkov VK. Method for Producing Water Dispersion of Cholesterol inventor. [dissertation]. Patent 10801. Ukraine. 2015 Mar 10. (In Ukrainian).
10. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Journal of Radiation Research*. 1961;14(12):213–22. (In English). DOI: <https://doi.org/10.2307/3570892>
11. Goltsev AM, Bondarovich MO, Babenko NM, Gaevska YO, Dubrava TG, Ostankov MV. Use of Nanomaterials in Cryobiology and Cryomedicine. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020;30(4):313–30. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.04.313>
12. Molinuevo MS, Barrio DA, Cortizo AM, Etcheverry SB. Antitumoral properties of two new vanadyl (IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother and Pharmacology*. 2004;53(2):163–72. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0708-7>

Перспективи подальших досліджень

Доведена відсутність негативного впливу НК в умовно-терапевтичній дозі щодо функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку експериментальних тварин. Раніше було показано, що застосування такої самої дози НК призводило до пригнічення росту пухлини [3]. Це відкриває перспективи для створення протипухлинних лікарських засобів на основі НК, які індіферентні по відношенню до гемопоетичних клітин-попередників.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Інформація про фінансування

Робота фінансується видатками Державного бюджету України.

Подяка

Автори статті висловлюють найщирішу вдячність провідному інженеру повірковій лабораторії клінічної дозиметрії ДУ «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України» О. Курову за допомогу у проведенні експериментів з опромінення тварин та старшому науковому співробітнику відділу наноструктурних матеріалів Інституту сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України кандидату хімічних наук В. Ключкову за здійснення синтезу наноконструкцій на основі наночастинок ортованадатів рідкісноземельних металів та холестерину.

Prospects for further research

No negative effect of NCs in conditionally therapeutic dose on functional activity of bone marrow hematopoietic progenitor cells of experimental animals has been proven. The use of the same dose of NCs has previously been shown to inhibit the tumor growth [3]. This opens up the prospects for developing the anticancer drugs based on NCs, which are indifferent to hematopoietic progenitor cells.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

Funding information

Funded by the State Budget of Ukraine.

Acknowledgments

The authors of the paper express their sincere gratitude to the leading engineer of the Calibration Laboratory of Clinical Dosimetry of SO “Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of NAMS of Ukraine” Oleksander Kurov for his assistance in performing the experiments on animal irradiation as well as to senior researcher at the Department of Nanostructured Materials of the Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine Ph.D. Volodymyr Klochkov for synthesizing the nanocomplexes.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Гольцев Анатолій Миколайович – доктор медичних наук, професор, академік Національної академії наук України, директор Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України; вул. Переяславська, буд. 23, м. Харків, Україна, 61016;
e-mail: cryopato@gmail.com,
моб.: +38 (050) 909-28-33.

Внесок автора: розробка концепції дослідження.

Дубрава Тетяна Георгіївна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу кріопатофізіології та імунології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України; вул. Переяславська, буд. 23, м. Харків, Україна, 61016;
e-mail: tgubrava@gmail.com,
моб.: +38 (050) 593-49-31.

Внесок автора: розробка дизайну дослідження.

Гаєвська Юлія Олександрівна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу кріопатофізіології та імунології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України; вул. Переяславська, буд. 23, м. Харків, Україна, 61016;

e-mail: yugaevska@gmail.com,
моб.: +38 (097) 286-80-93.

Внесок автора: підбір груп експериментальних тварин за темою роботи, написання тексту статті.

Бабенко Наталя Миколаївна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу кріопатофізіології та імунології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України; вул. Переяславська, буд. 23, м. Харків, Україна, 61016;

e-mail: natbabenko73@gmail.com,
моб.: +38 (096) 530-80-65.

Внесок автора: підбір джерел літератури, написання тексту статті.

Бондарович Микола Олександрович – кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу кріопатофізіології та імунології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України; вул. Переяславська, буд. 23, м. Харків, Україна, 61016;

e-mail: nikolay.bondarovich@gmail.com;
моб.: +38 (098) 281-41-12.

Внесок автора: статистичне опрацювання отриманих даних.

Луценко Олена Дмитрівна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу кріопатофізіології та імунології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України; вул. Переяславська, буд. 23, м. Харків, Україна, 61016;

e-mail: lenalutsenko809@gmail.com,
моб.: +38 (095) 608-23-19

Внесок автора: участь у проведенні експериментальних досліджень.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Goltsev Anatoliy Mykolayovych – MD, Professor, Academician of the National Academy of Sciences of Ukraine, Director of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; 23, Pereyaslavskaya Str., Kharkiv, Ukraine, 61016;

e-mail: cryopato@gmail.com,
ph: +38 (050) 909-28-33.

Author's contribution: study concept development.

Dubrava Tetyana Georgiina – Ph.D., Senior Researcher, Leading Researcher of Department of Cryopathophysiology and Immunology of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; 23, Pereyaslavskaya Str., Kharkiv, Ukraine, 61016;

e-mail: tgubrava@gmail.com,
ph: +38 (050) 593-49-31.

Author's contribution: study design development.

Gaevska Yuliia Oleksandrivna – Ph.D., Senior Researcher of the Department of Cryopathophysiology and Immunology of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; 23, Pereyaslavskaya Str., Kharkiv, Ukraine, 61016;

e-mail: yugaevska@gmail.com,
ph: +38 (097) 286-80-93.

Author's contribution: selecting experimental animals in the scope of the study issue, writing the paper.

Babenko Natalia Mykolaivna – Ph.D., Senior Researcher of the Department of Cryopathophysiology and Immunology of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; 23, Pereyaslavskaya Str., Kharkiv, Ukraine, 61016;

e-mail: natbabenko73@gmail.com,
ph: +38 (096) 530-80-65.

Author's contribution: literature sourcing, writing the article.

Bondarovich Mykola Oleksandrovych – Ph.D., Senior Researcher of the Department of Cryopathophysiology and Immunology of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; 23, Pereyaslavskaya Str., Kharkiv, Ukraine, 61016;

e-mail: nikolay.bondarovich@gmail.com,
ph: +38 (098) 281-41-12.

Author's contribution: statistical processing of the obtained data.

Lutsenko Olena Dmytrivna – Ph.D., Senior Researcher, Senior Researcher of the Department of Cryopathophysiology and Immunology of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; 23, Pereyaslavskaya Str., Kharkiv, Ukraine, 61016;

e-mail: lenalutsenko809@gmail.com,
ph: +38 (095) 608-23-19.

Author's contribution: participation in performing the experiments.