

INVESTIGATION OF THE CONDITION OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANES OF RATS USING A FLUORESCENT PROBE UNDER CONDITIONS OF EXPOSURE TO YTTRIUM GADOLINIUM ORTHOVANADATE NANOPARTICLES AND POLYETHYLENE GLYCOL-400

¹Kharkiv National Medical University (Kharkiv, Ukraine)

²National Technical University “Kharkiv Polytechnic Institute” (Kharkiv, Ukraine)

ai.bezrodna@knu.edu.ua

Nanomaterials based on rare earth metals have become widely used in medicine for radiotherapy for patients with cancer. However, irradiation of nanoparticles (NP) generates many short-range electrons, which can cause their modification. Polyethylene glycol-400 (PEG-400) is a cell-impermeable substance that can adsorb on the membrane surface, causing changes in its structure and charge value, being incorporated into its hydrophobic regions and interacting with the fatty acid tails of phospholipids or hydrophobic regions of integral proteins. The fluorescent probe O1O (2-(2-hydroxy-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole) was used to study the state of rat erythrocyte membranes under the influence of NP (with and without irradiation) and PEG-400, whose fluorescence parameters depend on the polarity and proton donor capacity of its microenvironment. Since an increase in the hydration of the lipid bilayer of cell membranes leads to an increase in the proton donor capacity and polarity of the membrane environment, the O1O probe can be used to detect changes in the hydration of lipid membranes. An experimental study of the fluorescence spectrum of the O1O probe in a suspension of rat erythrocytes exposed to polyethylene glycol-400 indicates the formation of an additional shell of its molecules on the surface of the membranes. The study of the fluorescence spectrum of the O1O probe in the suspension of erythrocytes from rats exposed to NP of yttrium gadolinium orthovanadate activated with europium at doses of 100 µg/kg and 200 µg/kg, both under conditions of their preliminary UV irradiation and without it, did not reveal any changes in the erythrocyte membranes.

Key words: yttrium gadolinium orthovanadate, nanoparticles, fluorescence of probe O1O, polyethylene glycol-400, rat erythrocyte membranes.

Connection of the publication with planned research works.

The work is a fragment of the research work “Investigation of the effectiveness, mechanisms of action and safety of the use of rare earth element orthovanadates nanoparticles for optimisation of radiotherapy in oncological pathology”, state registration number 0121U110920.

Introduction.

Due to their low toxicity and unique optical properties, nanomaterials based on rare earth metals are increasingly being used in fields such as biology, pharmacology, and medicine [1-5]. In the medical field, nanoparticles (NPs) are of particular interest both for creating systems for targeted delivery of biologically active substances to target organs and as a noninvasive tool in biological and chemical research [6-8].

The most common is the use of colloidal solutions containing lanthanide ions, in particular, stable gadolinium compounds, which are characterised by high solubility, biological compatibility and low toxicity, used as magnetic resonance contrast agents in radiotherapy for patients with cancer [9-12]. However, irradiation of NPs with a photon beam generates many short-range electrons, and Auger cascades, causing a modification of NPs. These chemical transformations can result in increased generation of reactive oxygen species (ROS), which subsequently leads to more significant cytotoxicity and genotoxicity to tumours [13-15]. It has been demonstrated that NPs can have not only antioxidant but also prooxidant effects, so their effect can be considered, on the one hand, as favourable and, on the other hand, as unfavourable, depending on the nature of NPs, their shape, size, dose, and environment [16-20].

There is a danger of developing pathological conditions caused by nanomaterials, so finding out the causes of the toxic effects of NP is one of the experimental areas of modern medicine. At present, more than 2000 types of NPs are known, but none of them has been thoroughly studied. The number of reports on the toxic effects of NP is increasing [21-25]. Upon ingestion, NPs can be transported through blood vessels and accumulate in various organs, including the liver, heart, kidneys, spleen, bone marrow, and other organs and tissues, where they can cause pathological changes [6-8], which indicates the relevance of this study. There are few studies on the use of nanomaterials in radiotherapy in which various effects are possible as a result of the synergy of factors.

In our study, we determined the effect of polyethylene glycol-400 (PEG-400) on various cell systems and, first of all, on plasma membranes, particularly on its surface and hydrophobic properties [12-16]. According to the research of L. A. Babiychuk [7-10], PEG-400 is a non-penetrating substance that can adsorb on the membrane surface, causing changes in its structure and charge. With its lipophilic groups, PEG-400 can be incorporated into hydrophobic areas of the plasma membrane, interacting with the fatty acid tails of phospholipids or hydrophobic regions of integral proteins. Due to the polar groups in its structure, PEG-400 can interact with hydrophilic regions of molecules, in particular with the polar heads of phospholipids [21-23]. We chose PEG-400 as a model object of influence on the erythrocyte membrane *in vivo*.

The fluorescent probe **O1O** (2-(2-hydroxy-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole) was used to study the state of rat erythrocyte membranes under the conditions of exposure to NP (with and without irradiation) and PEG-400,

whose fluorescence parameters depend on the polarity and proton donor capacity of its microenvironment [15-18].

The aim of the study.

To evaluate the state of erythrocyte cell membranes in rats using the fluorescent probe O10 under the influence of yttrium gadolinium orthovanadate nanoparticles activated with europium at doses of 100 µg/kg and 200 µg/kg, both under conditions of their preliminary UV irradiation and without it and polyethylene glycol-400 at a dose of 2.89 g/kg (1/10 LD₅₀).

Object and research methods.

Samples of chemically pure substances with regulated physicochemical characteristics were used in the study: synthesized polyethylene glycol-400 (PEG-400) (Barva-Pharm, Ivano-Frankivsk) and yttrium gadolinium orthovanadate nanoparticles activated with europium GdYVO₄:Eu³⁺. Gadolinium gadolinium orthovanadate nanoparticles with europium impurity GdVO₄:Eu³⁺ were provided for the study by the Institute of Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine (Department of Nanostructural Materials named after Y. V. Malyukin, Kharkiv, Ukraine).

Polyethylene glycol-400 (PEG-400) is a colourless viscous liquid with a characteristic odour and a bitter, slightly burning taste, highly hygroscopic. Density: 1.1-1.2 g/cm³; flash T 182-287 C. Melting point 4-8°C. Soluble in many organic solvents: benzene, carbon tetrachloride, chloroform, dimethylformamide, acetonitrile.

The experimental part of the study was carried out following the general ethical principles adopted by the First National Congress of Ukraine on Bioethics (Kyiv, 2001), the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals (Strasbourg, 1986) and the Council Directive 86/609/EEC (1986), Law of Ukraine No. 3447-IV of 21.02.2006 «On the Protection of Animals from Cruelty». The experiment was carried out on sexually mature (6-8 months old) white male WAG rats weighing 200-250 g obtained from the research and experimental clinic of Kharkiv National Medical University. The study was conducted during an experiment lasting 14 days under exposure to GdYVO₄:Eu³⁺ and PEG-400.

The experimental animals were kept in standard vivarium conditions with a 12-hour day/night regime.

According to the standards, animals received sufficient water and granular feed ad libitum [15-21].

Water and aqueous solutions of NPs were administered orally to rats using a pipette with a tip, and an aqueous solution of PEG-400 was administered intragastrically using a metal probe daily in the morning on an empty stomach.

The experiment was conducted on 36 sexually mature male rats of the WAG population, randomly divided into six groups (6 animals in each group). The first group was the control group (rats received drinking water); groups 2 and 3 were animals injected with aqueous solutions of gadolinium yttrium orthovanadate for 14 days, respectively, at a dose of 100 µg/kg body weight (group 2, Gd-100) and 200 µg/kg (group 3, Gd-200); groups 4 and 5 – animals receiving a similar dose of aqueous solutions of nanoparticles for 14 days, i.e. 100 µg/kg (group 4, Gd(UV)-100) and 200 µg/kg (group 5, Gd(UV)-200), which were pre-irradiated with UV light in quartz cuvettes, UV radiation source «Quartz-125» (λ=200÷400 nm) for 20 min at a distance of l=20 cm. The sixth group of animals received an aqueous solution of PEG-400 at a dose of 2.89 g/kg body weight.

At the end of the experiment on day 14, the animals were anaesthetised by cervical dislocation [15-22]. All manipulations were performed from 8:30 to 10:00 under standard conditions. During the experimental part of the study, the general condition of the animals, as well as water and feed intake, was monitored every day except for weekends. Blood was collected in sterile tubes containing K2 EDTA Vacutainer (BD Vacutainer). Red blood cells were separated from plasma by centrifugation for 15 min at 3000 g on a UNIVERSAL 320 R centrifuge. The leukocyte film and supernatant were removed by aspiration. The erythrocyte suspension was washed three times by centrifugation at 1500 g for 3 min in a 10-fold volume of phosphate-salt buffer (0.15 mol/L NaCl, 0.01 mol/L phosphate buffer, pH 7.4) [13-19].

The fluorescent probe O10 (2-(2'-hydroxy-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole) was used to study the state of rat erythrocyte membranes under the influence of NP and PEG-400. Its fluorescence is sensitive to changes in the polarity and proton-donating capacity of its microenvironment [8-14].

When the O10 probe is in the excited electronic state, an intramolecular proton phototransfer reaction (IPPT) occurs [3-5]: the hydroxyl group in the ortho position of the lateral benzene ring acts as a proton donor, and the nitrogen atom of the oxazole ring acts as a proton acceptor (fig. 1). This reaction results in the formation of the phototautomeric form (T*). The photoproduct has fluorescence in a much longer wavelength region of the spectrum compared to the original (or so-called «normal») form (N*) [12-17].

The presence of dual-band fluorescence allows for ratiometric measurements, i.e., the ratio of fluorescence intensities of the phototautomeric form and the original form (I_{T*}/I_{N*}) is used as a parameter for assessing changes in the physical and chemical properties of the O10 probe microenvironment: for example, with increasing polarity and/or proton donor capacity of the medium, the ratio I_{T*}/I_{N*} decreases [5-7].

The use of ratiometric fluorescent probes eliminates the measurement error caused by deviations in the concentration of the fluorescent probe (e.g., uneven con-

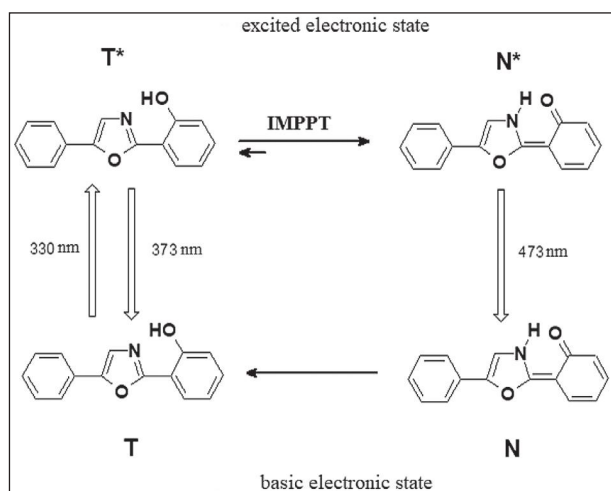


Figure 1 – Scheme of the intramolecular proton phototransfer reaction (IPPT) in 2-(2'-OH-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole (O10 probe). The up arrow indicates electronic excitation, and the down arrow indicates light emission (fluorescence).

tent of the fluorescent probe in different membranes), as well as measurement errors due to deviations in the configuration and adjustment of fluorescence measurement equipment (e.g., due to changes in photodetector sensitivity, deviations (fluctuations) in the intensity of the excitation light source, etc.) [8-14].

Since an increase in the hydration of the lipid bilayer leads to an increase in the proton donor capacity and polarity of the membrane medium [6], the **O10** probe can be used to detect changes in lipid membrane hydration [10-12]. Given that changes in membrane hydration, in turn, are associated with changes in membrane lipid order [5-8], the **O10** probe can indicate the latter.

In phospholipid membranes, the **O10** probe is located (fig. 2) in the region of glycerol residues of phospholipids (closer to the centre of the lipid bilayer), in the area of carbonyl groups of phospholipids, and the region of fatty acid chains of phospholipids near the region of carbonyl groups of phospholipids [15-21].

The state of the lipid bilayer of the cell membranes of rat erythrocytes toxicated with PEG-400 was determined using the fluorescent probe **O10** in physiological solutions [17]. The fluorescent probe was dissolved in acetonitrile to an initial concentration of $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L; 10 μ L of the corresponding probe solution was added to 2 ml of erythrocyte suspension. The final concentration of the probe in the suspension of the studied membranes was $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Thus, the molar ratio of lipid/probe was 1000:1. The fluorescence spectra were measured using a Hitachi 850 spectrofluorometer (Japan) one hour after the probes were added to the cell suspension. The fluorescence spectra of the probes were measured in the region of 340-600 nm at a slit width of 5 and 5 nm, respectively, and an excitation wavelength of 330 nm.

In the case of fluorescence measurements of the **O10** probe in suspensions of rat erythrocytes toxicised with yttrium gadolinium orthovanadate, the cells were stained with the fluorescent probe by adding an aliquot of the initial probe solution in acetonitrile to the cell suspensions: the final probe concentration was $\sim 5 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Before measuring fluorescence, the cell suspensions were incubated with the probe at room temperature for 1 hour. A PerkinElmer FL8500 spectrofluorometer was used to measure the emission of the probe in the range of 340-550 nm. Other parameters of fluorescence acquisition: spectrum scan increment was 0.1 nm, emission scan rate was 240 nm/min, excitation wavelength was 330 nm, excitation and emission band gaps were 5 nm.

Research results and their discussion.

Figure 3 shows the results of measurements of the fluorescence of the **O10** probe bound to erythrocytes of rats toxicated with the xenobiotic (XB) PEG-400 in comparison with the fluorescence of the probe in solution with erythrocytes of the control group of rats.

According to fig. 3, in the case of animals administered with PEG-400, the ratio of intensities of the long-wave (emission of the phototautomeric form of the probe [4-7]) and short-wave (emission of the normal form of the probe [9-16]) fluorescence bands of the probe practically did not change compared to the corresponding value for the control group of rats: the ratio of fluorescence intensities of I_{477}/I_{370} was 110 and 108, respectively.

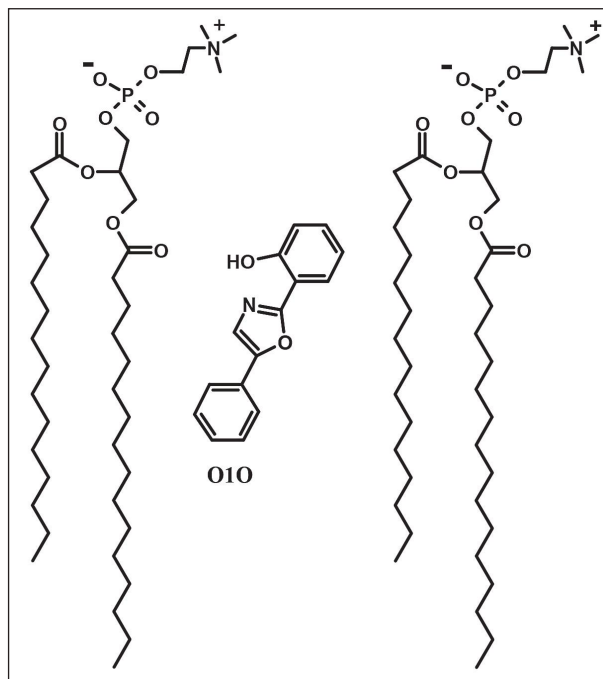


Figure 2 – Localisation and orientation of the fluorescent probe **O10** in phospholipid membranes. Two molecules of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine from the outer lipid bilayer of the membrane are shown to indicate the localisation of the probe.

Thus, as a result of PEG-400 exposure, no changes were observed in the area of localisation of the **O10** probe, i.e. in the region of glycerol residues of phospholipids (closer to the centre of the lipid bilayer), in the region of carbonyl groups of phospholipids and the region of fatty acid chains of phospholipids near the area of carbonyl groups of phospholipids.

However, in the case of erythrocytes from rats toxicated with PEG-400, a marked decrease in the fluorescence intensity of the probe used was observed, indicating a reduction in the number of probe molecules that bound to erythrocyte membranes during one hour of incubation. The decrease in the rate of probe binding to the membranes can be explained by the formation of an additional protective membrane around each lipid membrane [15-20], consisting of PEG-400 molecules that were adsorbed on the surface of the erythrocyte membrane.

The dynamics of the fluorescence intensity of the probe were recorded, as well as the absence of changes in the area of glycerol residues of phospholipids, in the

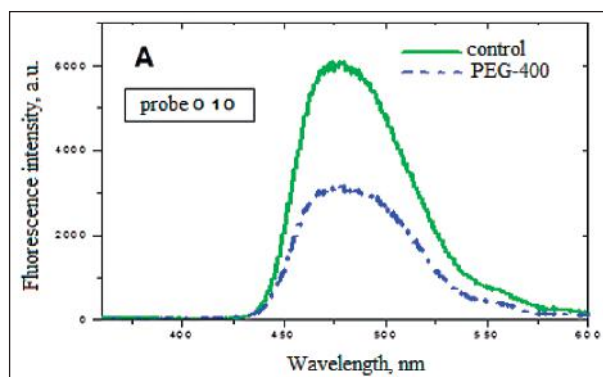


Figure 3 – Fluorescence spectrum of the **O10** probe in solution with rat erythrocytes under the influence of PEG-400 compared to the spectrum of **O10** in the solution of erythrocytes of the control group of rats.

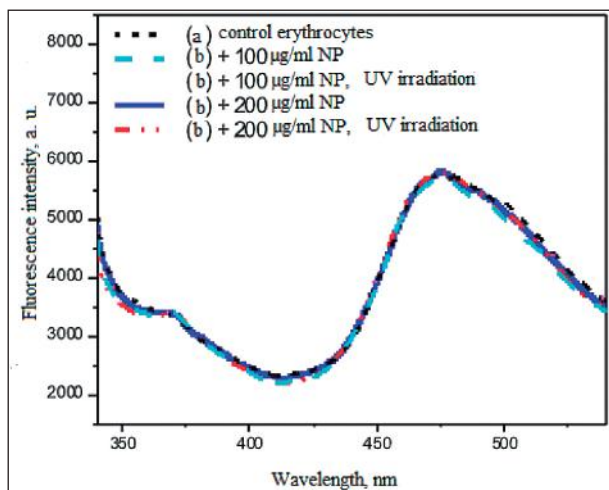


Figure 4 – Representative fluorescence spectra of the O10 probe in rat erythrocyte suspensions: (a) control sample, (b) under the influence of NP of yttrium gadolinium orthovanadate activated with europium GdYVO₄:Eu³⁺ and under irradiation.

Table – Ratio of fluorescence intensities of normal and phototautomeric forms (I_{T*}/I_{N*})^a of the O10 probe in rat erythrocyte membranes after exposure to NP of yttrium gadolinium orthovanadate activated with europium (GdYVO₄:Eu³⁺) under UV irradiation and without it

No.	Groups of rats after exposure to NP of gadolinium yttrium orthovanadate activated with europium (GdYVO ₄ :Eu ³⁺) under UV irradiation and without it	Ratio of fluorescence intensities of normal and phototautomeric forms (I _{T*} /I _{N*}) ^a (I ₄₇₀ ¹ /I ₃₇₀ ¹)
1	Control group	1.71
2	GdYVO ₄ :Eu ³⁺ in a dose of 100 µg/kg	1.67
3	GdYVO ₄ :Eu ³⁺ in a dose of 100 µg/kg and UV irradiation	1.74
4	GdYVO ₄ :Eu ³⁺ in a dose of 100 µg/kg	1.72
5	GdYVO ₄ :Eu ³⁺ in a dose of 100 µg/kg and UV irradiation	1.72

Notes: ^a – the relative error in determining I_{T*}/I_{N*} is less than 6%.

area of carbonyl groups of phospholipids and the area of fatty acid chains of phospholipids of erythrocytes of the experimental group of animals, treated with PEG-400 at a dose of 1/10 LD_{50'} is evidence of the formation of an additional membrane of polyethylene glycol-400 molecules on the surface of erythrocyte membranes in vivo, which is adsorbed on the membrane surface.

In the next series of experimental studies, the state of rat erythrocyte membranes under the influence of NP yttrium gadolinium orthovanadate activated with europium (GdYVO₄:Eu³⁺) was studied: the results of measurements of the fluorescence spectra of the fluorescent probe O10 bound to erythrocytes are shown in figure 4 and table.

In comparison with the corresponding spectrum of the O10 probe in the case of the control sample, no sig-

nificant changes in the O10 spectrum were recorded in the rat erythrocyte suspension after exposure to yttrium gadolinium orthovanadate activated with europium (GdYVO₄:Eu³⁺) under UV irradiation, both under UV conditions and without it.

The absence of changes in the I_{T*}/I_{N*} ratio of the O10 probe in rat erythrocytes exposed to yttrium gadolinium orthovanadate activated with europium (GdYVO₄:Eu³⁺) under UV irradiation and without it, compared to the corresponding ratio for control cells, indicates that there are no changes in membrane hydration in the probe area under the action of nanoparticles: in the area of glycerol residues of phospholipids (closer to the centre of the lipid bilayer), in the area of carbonyl groups of phospholipids and the area of fatty acid chains of phospholipids near the area of carbonyl groups of phospholipids. The absence, as mentioned above, of changes in hydration, in turn, indicates the absence of changes in the order of membrane lipids [23-25].

Thus, in comparison with the control sample of erythrocyte suspension, no changes in rat erythrocyte membranes were recorded under the influence of NP gadolinium yttrium orthovanadate activated with europium (GdYVO₄:Eu³⁺) even at the maximum concentrations of NP (200 µg/kg) and UV irradiation.

Conclusions.

1. The experimental study of the fluorescence spectrum of the O10 probe in the suspension of erythrocytes of rats exposed to 14 days of intragastric administration of PEG-400 at a dose of 2.89 g/kg of the animal body (1/10 of the LD₅₀) indicates the formation of an additional membrane of polyethylene glycol-400 molecules on the surface of erythrocyte membranes.

2. The study of the fluorescence spectrum of the O10 probe in the suspension of erythrocytes of rats exposed to 14 days of exposure to NP of gadolinium gadolinium orthovanadate activated with europium at doses of 100 µg/kg and 200 µg/kg of the animal body, both under UV irradiation and without it, did not reveal any changes in the erythrocyte membranes of rats, even at the maximum concentrations of NP (200 µg/kg) and UV irradiation.

Prospects for further research.

The obtained results of using gadolinium yttrium orthovanadate nanoparticles, activated by ultraviolet irradiation or not, provide new grounds for further testing and implementation of the approach in clinical practice to improve the effectiveness of radiation therapy in patients with cancer without negative consequences.

ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА ЗА УМОВ ВПЛИВУ НАНОЧАСТИНОК ОРТОВАНАДАТУ ГАДОЛІНІЮ ІТРІЮ ТА ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЮ-400¹Харківський національний медичний університет (м. Харків, Україна)²Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут» (м. Харків, Україна)
ai.bezrodna@knu.edu.ua

Наноматеріали на основі рідкоземельних металів почали широко використовуватися в медицині при проведенні променевої терапії пацієнтам з онкологічними захворюваннями. Однак опромінення наночастинок (НЧ) генерує велику кількість електронів ближньої дії, що може викликати їх модифікацію. Поліетиленгліколь-400 (ПЕГ-400) є непроникаючою у клітину речовиною, яка має властивість адсорбуватися на поверхні мембрани, викликаючи зміни її структури та величину заряду, вбудовуючись в її гідрофобні ділянки та взаємодіючи з жирнокислотними хвостами фосфоліпідів або гідрофобними областями інтегральних білків. Для дослідження стану мембран еритроцитів щурів за умов впливу НЧ (на тлі опромінювання та без нього) та ПЕГ-400 було застосовано флуоресцентний зонд О10 (2-(2-гідрокси-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол), параметри флуоресценції якого залежать від полярності та протонодонорної здатності його мікрооточення. Оскільки збільшення гідратації ліпідного бішару клітинних мембран призводить до збільшення протонодонорної здатності та полярності мембранного середовища, зонд О10 можна використовувати для виявлення змін гідратації ліпідних мембран. Експериментальне вивчення спектру флуоресценції зонда О10 у суспензії еритроцитів крові щурів, що зазнавали дії поліетиленгліколю-400, свідчить про формування на поверхні мембран додаткової оболонки з його молекул. Дослідження спектру флуоресценції зонда О10 у суспензії еритроцитів крові щурів, що зазнавали дії НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм у дозах 100 мкг/кг і 200 мкг/кг, як в умовах їх попереднього УФ опромінення, так і без нього, змін у мембранах еритроцитів щурів не виявило.

Ключові слова: ортованадат гадоліній ітрію, наночастинок, флуоресценція зонда О10, поліетиленгліколь-400, мембрани еритроцитів щурів.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом НДР «Дослідження ефективності, механізмів дії та безпеки використання наночастинок ортованадатів рідкоземельних елементів для оптимізації променевої терапії за умов онкопатології», номер державної реєстрації 0121U110920.

Вступ.

Завдяки малій токсичності та унікальним оптичним властивостям наноматеріали на основі рідкоземельних металів все частіше знаходять застосування в таких областях науки як біологія, фармакологія та медицина [1-5]. У сфері медицини особливий інтерес викликають наночастинок (НЧ), як для створення систем адресної доставки біологічно-активних речовин до органів-мішеней, так і в якості неінвазивного інструменту в біологічних та хімічних дослідженнях [6-8].

Найбільш поширеним є застосування колоїдних розчинів, які містять іони лантанодів, зокрема, стабільні сполуки гадолінію, які характеризуються високою розчинністю, біологічною сумісністю і низькою токсичністю, що використовують в якості магнітно-резонансних контрастних препаратів при проведенні променевої терапії пацієнтам з онкологічними захворюваннями [9-12]. Але опромінення НЧ пучком фотонів генерує велику кількість електронів ближньої дії та оже-каскади, викликаючи модифікацію НЧ. Результатом цих хімічних перетворень може бути підвищена генерація активних форм кисню (АФК), що згодом призведе до більшої цитотоксичності та генотоксичності по відношенню до пухлин [13-15]. Продемонстровано, що НЧ можуть чинити не тільки анти-

оксидантну, але й прооксидантну дію, тому їх вплив можна розглядати з одного боку, як сприятливий, а з іншого, як негативний, що залежать від природи НЧ, їх форми, розміру, дози та оточення [16-20].

Існує небезпека розвитку патологічних станів, викликаних застосуванням наноматеріалів, тому з'ясування причин токсичної дії НЧ становлять один з експериментальних напрямків сучасної медицини. На теперішній час відомо понад 2000 видів НЧ, але жодна з них достеменно не досліджена. Кількість повідомлень про токсичну дію НЧ все зростає [21-25]. При потрапленні в організм людини, НЧ можуть транспортуватися по кровоносних судинах та накопичуватися в різних органах, зокрема в печінці, серці, нирках, селезінці, кістковому мозку та інших органах та тканинах, де вони можуть викликати патологічні зміни [6-8], що вказує на актуальність проведення цього дослідження. Істотно мало досліджень щодо застосування наноматеріалів при проведенні променевої терапії, при якій можливі різні ефекти як наслідок синергізму впливу чинників.

У нашому дослідженні було визначено вплив поліетиленгліколю-400 (ПЕГ-400) на різні системи клітин і першочергово, на плазматичні мембрани, зокрема на її поверхневі та гідрофобні властивості [12-16]. За дослідженнями Л. А. Бабійчук [7-10] ПЕГ-400 є непроникаючою у клітину речовиною, яка має властивість адсорбуватися на поверхні мембрани, викликаючи зміни її структури та величину заряду. Маючи ліпофільні групи, ПЕГ-400 може вбудовуватися в гідрофобні ділянки плазматичної мембрани, взаємодіючи з жирнокислотними хвостами фосфоліпідів або гідрофобними областями інтегральних білків. Завдяки

наявним полярним групам в структурі, ПЕГ-400 може взаємодіяти з гідрофільними ділянками молекул, зокрема з полярними головками фосфоліпідів [21-23]. Нами було обрано ПЕГ-400, як модельний об'єкт впливу на мембрану еритроцитів *in vivo*.

Для дослідження стану мембран еритроцитів щурів за умов впливу НЧ (на тлі опромінювання та без нього) та ПЕГ-400 було застосовано флуоресцентний зонд **O1O** (2-(2'-гідрокси-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол), параметри флуоресценції якого залежать від полярності та протонодонорної здатності його мікрооточення [15-18].

Мета дослідження.

Оцінити стан клітинних мембран еритроцитів крові щурів за допомогою флуоресцентного зонда **O1O** за умов впливу наночастинок ортованадату гадоліній ітрію, активованого европієм у дозах 100 мкг/кг і 200 мкг/кг, як в умовах їх попереднього УФ опромінення так і без нього та поліетиленгліколю-400 у дозі 2,89 г/кг (1/10 ДЛ₅₀).

Об'єкт і методи дослідження.

У роботі використано зразки хімічно чистих речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: синтезований поліетиленгліколь-400 (ПЕГ-400) («Барва-фарм», м. Івано-Франківськ) та наночастинки ортованадату гадоліній ітрію, активованого европієм GdYVO₄:Eu³⁺. Наночастинки ортованадату гадоліній з домішкою европію GdVO₄:Eu³⁺ надав для дослідження Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України (відділ наноструктурних матеріалів імені Ю. В. Малюкіна, м. Харків, Україна).

Поліетиленгліколь-400 (ПЕГ-400) – безбарвна в'язка рідина з характерним запахом і гіркуватим, ледь пекучим присмаком, дуже гігроскопічна. Густина: 1,1-1,2 г/см³; Т спалаху 182-287 С. Точка плавлення 4-8°C. Розчинний у багатьох органічних розчинниках: бензолі, чотирихлористому вуглеці, хлороформі, диметилформаміді, ацетонітрилі.

Експериментальна частина дослідження виконувалась відповідно до загальних етичних принципів, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Стразбург, 1986) та Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження». Експеримент проводився на статевозрілих (6-8 місяців) білих щурах-самцях популяції WAG масою 200-250 г, отриманих з науково-експериментальної клініки Харківського національного медичного університету. Дослідження проведено в процесі експерименту тривалістю 14 діб за умов впливу GdYVO₄:Eu³⁺ та ПЕГ-400.

Експериментальні тварини перебували в стандартних умовах віварію з 12-годинним режимом день/ніч. Тварини отримували воду в достатній кількості та гранульований корм *ad libitum* згідно норм [15-21].

Воду та водні розчини НЧ вводили щурам перорально – за допомогою піпетки-дозатора з наконечником, водний розчин ПЕГ-400 – за допомогою металевого зонду внутрішньошлунково щоденно вранці натщесерце.

Експеримент проводили на 36 статевозрілих щурах-самцях популяції WAG, яких випадковим чином розподіляли на 6 груп (по 6 тварин у кожній).

Перша група – контрольна (щури отримували питну воду), 2 та 3 група – тварини, яким на протязі 14 діб вводили водні розчини ортованадату гадоліній ітрію, відповідно в дозі 100 мкг/кг маси тіла тварини (2 група, Gd-100) і 200 мкг/кг (3 група, Gd-200); 4 і 5 група – тварини, які отримували протягом 14 діб аналогічну дозу водних розчинів наночастинок, тобто 100 мкг/кг (4 група, Gd(UV)-100) і 200 мкг/кг (5 група, Gd(UV)-200), що були попередньо опроміненні УФ-світлом у кварцових кюветах, джерело УФ-випромінювання «Кварц-125» (λ=200÷400 нм) протягом 20 хв. на відстані l=20 см. Шоста група тварин отримувала водний розчин ПЕГ-400 у дозі 2,89 г/кг маси тіла.

По закінченню експерименту на 14 добу тварин знеживляли методом цервікальної дислокації [15-22]. Всі маніпуляції проводили з 8:30 до 10:00 в стандартних умовах. Протягом проведення експериментальної частини дослідження кожного дня, крім вихідних, контролювали загальний стан тварин, вживання води та корму. Кров відбирали в стерильні пробірки, що містили K2 EDTA Vacutainer (BD Vacutainer). Еритроцити відділяли від плазми центрифугуванням протягом 15 хв. при 3000 г на центрифугі UNIVERSAL 320 R. Лейкоцитарну плівку та супернатант видаляли методом аспірації. Суспензію еритроцитів тричі промивали шляхом центрифугування при 1500 г 3 хв в 10-кратному об'ємі фосфатно-сольового буферу (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, pH 7,4) [13-19].

У проведених дослідженнях стану мембран еритроцитів щурів при впливі НЧ та ПЕГ-400 було застосовано флуоресцентний зонд **O1O** (2-(2'-гідрокси-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол, флуоресценція якого є чутливою до змін полярності та протонодонорної здатності його мікрооточення [8-14].

Коли зонд **O1O** знаходиться у збудженому електронному стані, відбувається реакція внутрішньомолекулярного фотопереносу протона (ВМФПП) [3-5]: гідроксильна група в орто-положенні латерального бензольного кільця діє як протонодонор, а атом азоту оксазольного кільця діє як акцептор протона (**рис. 1**). У результаті цієї реакції утворюється фототаутомерна форма (Т*). Фотопродукт має флуоресценцію у значно більш довгохвильовій області спектру порівняно з вихідною (або так званою «нормальною») формою (N*) [12-17].

Наявність двосмугової флуоресценції дозволяє проводити раціометричні вимірювання, тобто використовувати співвідношення інтенсивностей флуоресценції фототаутомерної форми та вихідної форми (I_{T^*}/I_{N^*}) як параметр для оцінки змін фізико-хімічних властивостей мікрооточення зонда **O1O**: наприклад, із зростанням полярності та/або протонодонорної здатності середовища співвідношення I_{T^*}/I_{N^*} зменшується [5-7].

Застосування раціометричних флуоресцентних зондів усуває похибку вимірювання, викликану відхиленням концентрації флуоресцентного зонда (наприклад, нерівномірний вміст флуоресцентного зонда в різних мембранах), а також похибки вимірювання через відхилення в конфігурації та налаштуванні обладнання для вимірювання флуоресценції (наприклад, за умов зміни чутливості фотодетектора, девіації (коливаний) інтенсивності джерела збуджувального світла тощо) [8-14].

Оскільки збільшення гідратації ліпідного бішару призводить до збільшення протонодонорної здатності та полярності мембранного середовища [6], зонд **O10** можна використовувати для виявлення змін гідратації ліпідних мембран [10-12]. Враховуючи, що зміни гідратації мембран, у свою чергу, пов'язані зі змінами впорядкованості ліпідів мембран [5-8], зонд **O10** може вказувати на останні.

У фосfolіпідних мембранах зонд **O10** розташований (рис. 2) в ділянці гліцеринових залишків фосfolіпідів (ближче до центру ліпідного бішару), в ділянці карбонільних груп фосfolіпідів і в ділянці жирнокислотних ланцюгів фосfolіпідів поблизу ділянки карбонільних груп фосfolіпідів [15-21].

Визначення стану ліпідного бішару клітинних мембран еритроцитів щурів, токсифікованих ПЕГ-400, проводилося за допомогою флуоресцентного зонда **O10** у фізіологічних розчинах [17]. Флуоресцентний зонд розчиняли в ацетонітрилі до початкової концентрації $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 10 мкл відповідного розчину зонда додавали до 2 мл суспензії еритроцитів. Кінцева концентрація зонда в суспензії досліджуваних мембран – $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, таким чином, молярне відношення ліпід / зонд становило 1000:1. Вимірювання спектрів флуоресценції проведено на спектрофлуориметр «Hitachi 850» (Японія) через годину після додавання зондів до суспензії клітин. Спектри флуоресценції зондів вимірювали в області 340-600 нм при ширині щілин монохроматорів збудження і флуоресценції 5 і 5 нм відповідно, і довжині хвилі збудження 330 нм.

У випадку вимірювань флуоресценції зонда **O10** у суспензіях еритроцитів щурів, токсифікованих НЧ ортованадату гадолінію ітрію, клітини фарбували флуоресцентним зондом шляхом додавання аліквоти вихідного розчину зонда в ацетонітрилі до суспензій клітин: кінцева концентрація зонда становила $\sim 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Перед вимірюванням флуоресценції клітинні суспензії інкубували із зондом при кімнатній температурі протягом 1 години. Для вимірювання випромінювання зонда в діапазоні 340-550 нм використовували спектрофлуориметр «PerkinElmer FL8500». Інші параметри отримання флуоресценції: приріст сканування спектру становив 0,1 нм, швидкість сканування випромінювання 240 нм/хв, довжина хвилі збудження 330 нм, щілини збудження та випромінювання 5 нм.

Результати досліджень та їх обговорення.

На **рисунку 3** представлено результати вимірювань флуоресценції зонда **O10**, зв'язаного з еритроцитами щурів, токсифікованих ксенобіотиком (КБ) ПЕГ-400, порівняльно до флуоресценції зонда у розчині з еритроцитами контрольної групи щурів.

Згідно **рис. 3**, у випадку тварин, які отримували ПЕГ-400, співвідношення інтенсивностей довгохвильової (випускання фототаутомерної форми зонду [4-7]) і короткохвильового (випускання нормальної форми зонду [9-16]) смуг флуоресценції зонда практично не змінювалося в порівнянні з відповідним значенням для контрольної групи щурів: співвідношення інтенсивностей флуоресценції I_{477} / I_{370} становило 110 і 108, відповідно.

Таким чином, в результаті впливу ПЕГ-400 не спостерігається змін в області локалізації зонду **O10**, тобто в ділянці гліцеринових залишків фосfolіпідів

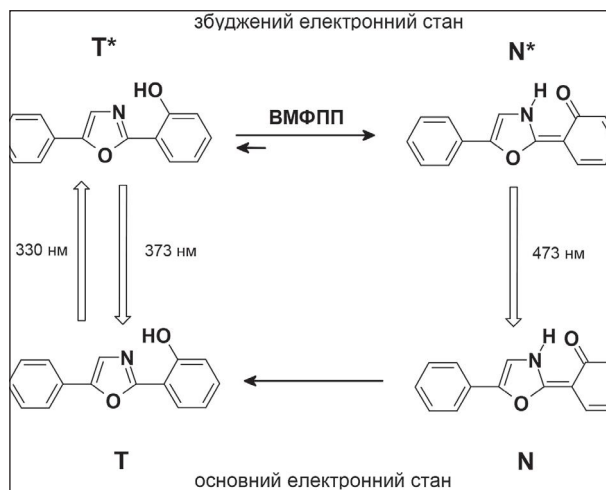


Рисунок 1 – Схема реакції внутрішньо молекулярного фотопереносу протона (ВМФПП) у 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазолі (зонд **O10**). Стрілка вгору показує електронне збудження, а стрілка вниз – випромінювання світла (флуоресценцію).

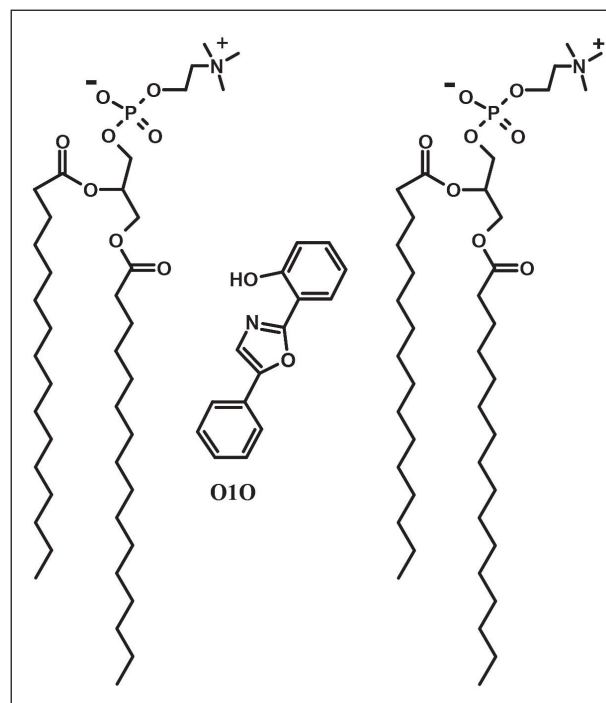


Рисунок 2 – Локалізація та орієнтація флуоресцентного зонда **O10** у фосfolіпідних мембранах. Для позначення локалізації зонда показано дві молекули 1,2-дипальмітоїл-фосфатидилхоліну із зовнішнього ліпідного шару мембрани.

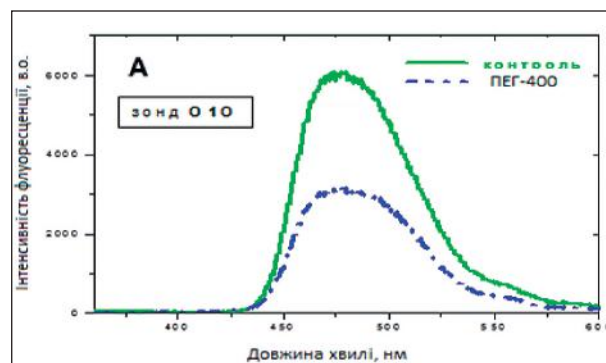


Рисунок 3 – Спектр флуоресценції зонда **O10** у розчині з еритроцитами щурів при впливі ПЕГ-400 порівняльно до спектра **O10** у розчині еритроцитів контрольної групи щурів.

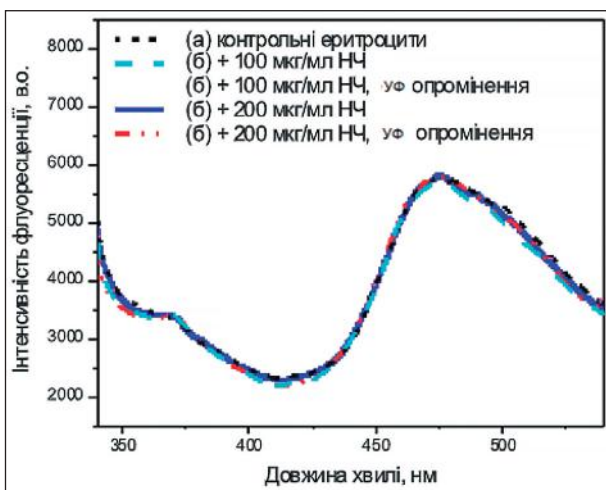


Рисунок 4 – Репрезентативні спектри флуоресценції зонда O10 в суспензіях еритроцитів щурів: (а) контрольний зразок, (б) в умовах впливу НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм GdYVO₄:Eu³⁺ та в умовах опромінення.

Таблиця – Співвідношення інтенсивностей флуоресценції нормальної та фототаутомерної форм (I_T*/I_N*)а зонда O10 в мембранах еритроцитів щурів після впливу НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм (GdYVO₄:Eu³⁺) в умовах УФ опромінення та без нього

№ п/п	Групи щурів після впливу НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм (GdYVO ₄ :Eu ³⁺) в умовах УФ опромінення та без нього	Співвідношення інтенсивностей флуоресценції нормальної та фототаутомерної форм (I _T */I _N *) ^a (I ₄₇₀ /I ₃₇₀)
1	Контрольна група	1.71
2	GdYVO ₄ :Eu ³⁺ в дозі 100 мкг/кг	1.67
3	GdYVO ₄ :Eu ³⁺ в дозі 100 мкг/кг та УФ опромінені	1.74
4	GdYVO ₄ :Eu ³⁺ в дозі 200 мкг/кг	1.72
5	GdYVO ₄ :Eu ³⁺ в дозі 200 мкг/кг УФ опромінені	1.72

Примітки: ^a – відносна похибка визначення I_T*/I_N складає менш 6%.

(ближче до центру ліпідного бішару), в ділянці карбонільних груп фосфоліпідів і в ділянці жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів поблизу ділянки карбонільних груп фосфоліпідів.

Разом з тим, у випадку розглядання еритроцитів щурів, токсифікованих ПЕГ-400, спостерігається помітне зниження інтенсивності флуоресценції використаного зонда, що свідчить про зменшення кількості молекул зонда, що зв'язалися з мембранами еритроцитів за одну годину інкубації. Зменшення швидкості зв'язування зонда з мембранами може бути пояснено формуванням навколо кожної ліпідної мембрани додаткової захисної оболонки [15-20], що складається з молекул ПЕГ-400, які адсорбувалися на поверхні мембрани еритроцитів.

Зареєстрована динаміка інтенсивності флуоресценції зонда, а також відсутність змін в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів еритроцитів дослідної групи тварин, які отримували ПЕГ-400 в дозі 1/10 ДЛ50, є свідченням формування на поверхні мембрани еритроцитів in vivo крові щурів додаткової оболонки з молекул поліетиленгліколю-400, яка адсорбується на поверхні мембрани.

У наступній серії експериментальних досліджень проведено вивчення стану мембран еритроцитів щурів в умовах впливу НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм (GdYVO₄:Eu³⁺): результати вимірювань флуоресценції спектрів флуоресцентного зонда O10, зв'язаного з еритроцитами, представлено на **рисунку 4** та в **таблиці**.

У порівнянні з відповідним спектром зонда O10 у випадку контрольного зразка, не зареєстровано значних змін спектра O10 у суспензії еритроцитів щурів після впливу НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм (GdYVO₄:Eu³⁺), як в умовах УФ опромінення так і без нього.

Відсутність зміни співвідношення I_T*/I_N* зонда O10 у еритроцитах щурів, що були під дією НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм (GdYVO₄:Eu³⁺), в умовах УФ опромінення та без нього, порівняно до відповідного співвідношення для контрольних клітин, вказує на те, що під дією наночастинок не відбувається змін гідратації мембрани в зоні розташування зонда: в ділянці гліцеринових залишків фосфоліпідів (ближче до центру ліпідного бішару), в ділянці карбонільних груп фосфоліпідів і в ділянці жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів поблизу ділянки карбонільних груп фосфоліпідів. Згадана відсутність змін гідратації, у свою чергу, є свідченням про відсутність змін впорядкованості мембранних ліпідів [23-25].

Таким чином, порівняно до контрольного зразка суспензії еритроцитів, в умовах впливу НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм (GdYVO₄:Eu³⁺), не зареєстровано змін у мембранах еритроцитів щурів навіть при максимальних концентраціях НЧ (200 мкг/кг) та УФ опроміненні.

Висновки.

1. Експериментальне вивчення спектру флуоресценції зонда O10 у суспензії еритроцитів щурів, що зазнавали 14 денного внутрішньошлункового введення ПЕГ-400 в дозі 2,89 г/кг тіла тварини (1/10 ДЛ₅₀) свідчить про формування на поверхні мембрани еритроцитів крові щурів додаткової оболонки з молекул поліетиленгліколю-400.

2. Дослідження спектру флуоресценції зонда O10 у суспензії еритроцитів щурів, що зазнавали 14 денної дії НЧ ортованадату гадоліній ітрію, активованого європієм у дозах 100 мкг/кг та 200 мкг/кг тіла тварини, як умовах УФ опромінення так і без нього, змін у мембранах еритроцитів щурів, навіть при максимальних концентраціях НЧ (200 мкг/кг) та УФ опроміненні не виявило.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати використання наночастинок ортованадату гадоліній-ітрію, які були активованими ультрафіолетовим опроміненням або не активовані, дають нові підстави для проведення подальших випробувань та імплементацію підходу в клінічну практику для підвищення ефективності променевої терапії у хворих на онкопатологію без негативних наслідків.

References / Література

- Palacios-Alonso P, Sanz-de-Diego E, Peláez RP, Cortajarena AL, Teran FJ, Delgado-Buscalioni R. Predicting the size and morphology of nanoparticle clusters driven by biomolecular recognition. *Soft Matter*. 2023;19:8929-8944. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D3SM00536D>.
- Sim S, Wong NK. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). *Biomedical Reports*. 2021;14:1-9. DOI: <https://doi.org/10.3892/br.2021.1418>.
- Nadeem J, Dirk L. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nano biotechnology*. 2022;20:1-29. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>.
- Nowak N, Czekanowska D, Reeks JM, Wiglusz RJ. Structural, Spectroscopic, and Biological Characterization of Novel Rubidium(I) and Europium(III) Co-Doped Nano-Hydroxyapatite Materials and Their Potential Use in Regenerative Medicine. *Nanomaterials*. 2022;12:4475. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano12244475>.
- Hooda A, Singh D, Dalal A, Malik S, Redhu S, Jakhar K, et al. Preparation and spectral features of Dy(III) β -Diketonates with m,m'-Disubstituted N-donor aromatic auxiliary moieties for displays. *Inorganic Chemistry Communications*. 2023;155:111018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111018>.
- Featherston ER, Cotruvo JA. The biochemistry of lanthanide acquisition, trafficking, and utilization. *BBA – Molecular Cell Research*. 2021;1868:118864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118864>.
- Abbasi R, Shineh G, Mobaraki M, Doughty S, Tayebi L. Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review. *J Nanopart Res*. 2023;25:43. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05690-w>.
- Cheignon C, Kassir AA, Soro LK, Loic J. Charbonnière. Dye-sensitized lanthanide containing nanoparticles for luminescence based applications. *Nanoscale*. 2022;14:13915-13949. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1NR06464A>.
- Gu N, editor. *Nanomedicine. Micro/NanoTechnologies*. Singapore: Springer; 2023. Chapter, Nano-bio Interactions in the Lung; p. 469-499. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-16-8984-0_14.
- Sikorska K, Sawicki K, Czajka M, Kapka-Skrzypczak L, Kruszewski M, Brzóška K. Adverse Effects of Non-Metallic Nanoparticles in the Central Nervous System. *Materials (Basel)*. 2023;16:1-39. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma16237264>.
- Prokopyuk V, Onishchenko A, Yefimova S, Chumachenko T. Cytotoxicity Tests on Cultured Rat Skin Fibroblasts Revealed no Toxicity for Low Concentrations of GdYVO₄:Eu³⁺ Nanoparticles. *Proceedings of 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP)*; 2021 Sept 5-11; Odessa. Odessa: IEEE; 2021. p. 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1109/NAP51885.2021.9568547>.
- Yefimova S, Onishchenko A, Klochkov V, Myasoedov V, Kot Y, Tryfonyuk L, et al. Rare-earth orthovanadate nanoparticles trigger Ca²⁺-dependent eryptosis. *Nanotechnology*. 2023;34:20. DOI: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acbb7f>.
- Tkachenko A, Onishchenko A, Myasoedov V, Yefimova S, Havranek O. Assessing regulated cell death modalities as an efficient tool for in vitro nanotoxicity screening: a review. *Nanotoxicology*. 2023;17(3):218-248. DOI: <https://doi.org/10.1080/17435390.2023.2203239>.
- Onishchenko A, Myasoedov V, Yefimova S, Nakonechna O, Prokopyuk V, Butov D, et al. UV Light-Activated GdYVO₄:Eu³⁺ Nanoparticles Induce Reactive Oxygen Species Generation in Leukocytes Without Affecting Erythrocytes In Vitro. *Biological Trace Element Research*. 2021;200:2777-2792. DOI: [10.1007/s12011-021-02867-z](https://doi.org/10.1007/s12011-021-02867-z).
- Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV, Masalov AA, Vyagin OG. Colloidal synthesis and properties of lanthanide orthophosphate nanophosphors. *Functional Materials*. 2009;4:466-469.
- Zhulikova MV, Myroshnychenko MS, Nakonechna OA, Zhulikov OO, Pustova NO, Bibichenko VO, et al. Reactive oxygen species generation by blood leukocytes of rats with polycystic ovary syndrome under the conditions of intermittent cold exposure. *Wiadomości Lekarskie Medical Advances*. 2023;76:1670-1676. DOI: https://doi.org/10.36740/WLek2023_07123.
- Maksimchuk PO, Hubenko KO, Seminko VV, Karbivskii VL, Tkachenko AS, Onishchenko AI, et al. High antioxidant activity of gadolinium-¹¹⁵yttrium orthovanadate nanoparticles in cell-free and biological milieu. *Nanotechnology*. 2021;33(5). DOI: [10.1088/1361-6528/ac31e5](https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac31e5).
- Scibior A, Kurus J. Vanadium and Oxidative Stress Markers – In Vivo Model: A Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2019;26:5456-5500. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867326666190108112255>.
- Nikitchenko YuV, Klochkov VK, Kavok NS, Karpenko NA. Gadolinium orthovanadate nanoparticles increase survival of old rats. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 2020;2:29-36. DOI: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.02.029>.
- Koshevoy VI, Naumenko SV, Klochkov VK, Yefimova SL. The use of gadolinium orthovanadate nanoparticles for the correction of reproductive ability in boars under oxidative stress. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*. 2021;12:74. DOI: <https://doi.org/10.31548/ujvs2021.02.008>.
- Han B, Han X, Ren M, You Y, Zhan J, Huang W. Antimicrobial Effects of Novel H₂O₂-Ag⁺ Complex on Membrane Damage to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Food Protection*. 2022;85:104-111. DOI: <https://doi.org/10.4315/JFP-21-087>.
- Maksimchuk P, Yefimova S, Hubenko KO, Omelajeva VV. Dark reactive oxygen species generation in ReVO₄:Eu³⁺ (Re=Gd,Y) nanoparticles in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. C*. 2020;124:3843-3850. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10143>.
- Baek H, Kang S, Heo J, Choi S, Kim R, Kim K, et al. Insights into structural defect formation in individual InP/ZnSe/ZnS quantum dots under UV oxidation. *Nat Commun*. 2024;15:1671. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45944-2>.
- Jubeer EM, Manthrammel MA, Subha PA, Subha PA, Shkir M, Biju KP, et al. Defect engineering for enhanced optical and photocatalytic properties of ZnS nanoparticles synthesized by hydrothermal method. *Sci Rep*. 2023;13:16820. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43735-1>.
- Maksimchuk PO, Hubenko KO, Grygorova G, Klochkov VK. Impact of Eu³⁺ ions on pro-oxidant activity of ReVO₄:Eu³⁺ nanocrystals. *J Phys Chem C*. 2021;125:1564-1569. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c10028>.

ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА ЗА УМОВ ВПЛИВУ НАНОЧАСТИНОК ОРТОВАНАДАТУ ГАДОЛІНІЮ ІТРИУ ТА ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЮ-400

Наконецна О. А., Посохов Є. О., Безродна А. І., Ярмиш Н. В., Бачинський Р. О.

Резюме. У сфері медицини особливий інтерес викликають наночастинки (НЧ), як для створення систем адресної доставки біологічно-активних речовин до органів-мішеней, так і в якості неінвазивного інструменту в біологічних та хімічних дослідженнях, особливо в якості магнітно-резонансних контрастних препаратів при проведенні променевої терапії пацієнтам з онкологічними захворюваннями. Але опромінення НЧ пучком фотонів генерує велику кількість електронів ближньої дії та оже-каскади, викликаючи модифікацію НЧ, що може підвищувати генерація активних форм кисню (АФК), що згодом призведе до більшої цитотоксичності та генотоксичності по відношенню до пухлин. Показано, що під дією опромінення НЧ можуть чинити не тільки антиоксидантну, але й прооксидантну дію, що залежать від природи НЧ, їх форми, розміру, дози та оточення.

Робота виконана для дослідження стану мембран еритроцитів щурів за умов впливу поліетиленгліколю-400 (у дозі 1/10 ДЛ₅₀), речовиною, яка, адсорбуючись на поверхні мембрани, може викликати зміни її структури та величину заряду, та НЧ, а саме ортованадату гадолінію ітрію, активованого європієм у дозах 100 мкг/кг та 200 мкг/кг, на тлі опромінювання та без нього було використано флуоресцентний зонд **O10** (2-(2'-гідрокси-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол), параметри флуоресценції якого залежать від полярності та протондонорної здатності його мікрооточення.

Проведені експериментальні дослідження спектру флуоресценції зонду O1O в суспензії крові еритроцитів щурів під впливом поліетиленгліколю-400 свідчать про утворення додаткової оболонки з його молекул на поверхні мембрани. Дослідження спектру флуоресценції зонда O1O в суспензії еритроцитів крові щурів, які піддалися дії ортованадату ітрію гадолінію, активованого європієм, як в умовах УФ-опромінення, так і без нього, не виявило змін мембран еритроцитів щурів, навіть при максимальних концентраціях НЧ (200 мкг/кг).

Ключові слова: ортованадат ітрію гадолінію, наночастинки, флуоресценція зонда O1O, поліетиленгліколь-400, мембрани еритроцитів щурів.

INVESTIGATION OF THE CONDITION OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANES OF RATS USING A FLUORESCENT PROBE UNDER CONDITIONS OF EXPOSURE TO YTTRIUM GADOLINIUM ORTHOVANADATE NANOPARTICLES AND POLYETHYLENE GLYCOL-400

Nakonechna O. A., Posokhov Y. O., Bezrodnaya A. I., Yarmysh N. V., Bachynskiy R. O.

Abstract. In the field of medicine, nanoparticles (NPs) are of particular interest, both for the creation of targeted delivery systems of biologically active substances to target organs, and as a non-invasive tool in biological and chemical research, especially as magnetic resonance contrast agents during radiation therapy patients with oncological diseases. But irradiation of NPs with a photon beam generates a large number of short-range electrons and Auger cascades, causing the modification of NPs, which can increase the generation of reactive oxygen species (ROS), which will subsequently lead to greater cytotoxicity and genotoxicity in relation to tumors. It is shown that under the influence of irradiation, NPs can have not only an antioxidant, but also a pro-oxidant effect, which depends on the nature of the NPs, their shape, size, dose, and environment.

Work conducted for the study the state of rat erythrocyte membranes under the conditions of exposure to polyethylene glycol-400 (in a dose of 1/10 DL50), a substance that, adsorbed on the surface of the membrane, can cause changes in its structure and the amount of charge, and NPs, namely yttrium gadolinium orthovanadate, activated with europium in doses of 100 µg/kg and 200 µg/kg, with and without irradiation, the fluorescent probe O1O (2-(2'-hydroxy-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole) was used, the fluorescence parameters of which depend from the polarity and proton-donating ability of its microenvironment.

Experimental studies of the fluorescence spectrum of the O1O probe in the blood suspension of rat erythrocytes under the influence of polyethylene glycol-400 indicate the formation of an additional shell of its molecules on the surface of the membrane. The study of the fluorescence spectrum of the O1O probe in the erythrocyte suspension of the blood of rats exposed to europium-activated yttrium gadolinium orthovanadate, both under UV irradiation and without it, did not reveal changes in the membranes of rat erythrocytes, even at the maximum concentration of NPs (200 µg/kg).

Key words: yttrium gadolinium orthovanadate, nanoparticles, fluorescence of probe O1O, polyethylene glycol-400, rat erythrocyte membranes.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Nakonechna O. A.: <https://orcid.org/0000-0002-2614-1587>^{AEF}

Posokhov Y. O.: <https://orcid.org/0000-0001-8395-9089>^C

Bezrodnaya A. I.: <https://orcid.org/0000-0002-7543-7165>^{BD}

Yarmysh N. V.: <https://orcid.org/0009-0006-9518-6208>^{BD}

Bachynskiy R. O.: <https://orcid.org/0000-0001-7141-0435>^D

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Bezrodnaya Anastasiia Ihorivna / Безродна Анастасія Ігорівна

Kharkiv National Medical University / Харківський національний медичний університет

Ukraine, 61022, Kharkiv, 4 Nauki Ave. / Адреса: Україна, 61022, м. Харків, пр. Науки 4

Tel.: +380932046754 / Тел.: +380932046754

E-mail: ai.bezrodna@knmu.edu.ua

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 15.03.2024 / Стаття надійшла 15.03.2024 року
Accepted 20.08.2024 / Стаття прийнята до друку 20.08.2024 року