

ВИЗНАЧЕННЯ УШКОДЖЕНЬ ДНК НАНОЧАСТИНКАМИ МЕТАЛІВ, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

С. М. Дибкова¹

М. Є. Романько²

Т. Г. Грузіна¹

Л. С. Рєзніченко¹

З. Р. Ульберг¹

В. О. Ушкалов³

А. М. Головка³

¹Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ

²Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» УААН, Харків

³Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів, Київ

E-mail: tgruzina@mail.ru

Методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин визначено ступінь ушкодження ДНК наночастинками металів (золота, срібла та заліза) на тестовій культурі СНО-К1. Показано, що ступінь цих ушкоджень наночастинками металів, перспективних для біотехнології, залежить від їхньої природи та розміру. Встановлено, що наночастинки золота розміром 30 і 45 нм, срібла — 30 нм і заліза — 77 нм не спричинюють появу ушкоджень ДНК. ДНК-ушкоджувальну дію на еукаріотичні тестові клітини зумовлювали наночастинки золота розміром 10 і 20 нм та заліза — 14, 18 і 23 нм.

Ключові слова: наночастинки металів, ушкодження ДНК, клітини культури СНО-К1, метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин.

Нанобіотехнологія — сучасний напрям досліджень, який посідає особливе місце в науково-практичній діяльності людини. В останні роки цей напрям переживає особливо бурхливий розвиток. Значною мірою досягнення нанобіотехнології позначилися на розвитку медицини та ветеринарії, де наноматеріали набули широкого застосування в лікуванні та діагностиці захворювань різної етіології [1, 2], а також як засоби цільового доставлення лікарських засобів [3]. Найперспективнішими в цьому аспекті є наночастинки металів [1, 2, 4]. Наночастинки металів мають особливі фізико-хімічні властивості та біологічний вплив, порівняно з речовинами у звичайному фізико-хімічному стані, а тому їх слід віднести до нових видів матеріалів, характеристика потенційного ризику яких для здоров'я людини та стану навколишнього середовища в усіх випадках є обов'язковою.

Особливу роль у характеристиці біобезпеки наночастинок металів, відповідно до міжнародних норм, відіграє відсутність ушкодження ДНК такими наноматеріалами

[5, 6]. Найбільш перспективним методом виявлення ушкоджень ДНК є метод ДНК-комет (лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин), який широко використовують у науково-дослідницькій практиці, проте дані щодо застосування його для тестування біобезпеки наноматеріалів у літературі практично відсутні. Цей метод характеризується високою чутливістю, експресністю, високим рівнем відтворюваності результатів.

З огляду на вищезазначене метою даної роботи було визначення ушкоджень ДНК наночастинками металів (золота, срібла та заліза) різного розміру і концентрації, перспективних для застосування у біотехнології, методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин.

Матеріали та методи

У роботі використано тестову культуру клітин китайського хом'ячка СНО-К1 із колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроор-

ганізмів (Київ, Україна). Клітини культури СНО-К1 нарощували на середовищі F10 (Sigma, США), що містило 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Gibco, США), до титру $5 \cdot 10^5$ кл./мл. Кількість живих клітин, визначених за допомогою фарбування 0,3%-м розчином трипанового синього, становила не менш ніж 90%.

Наночастинки золота синтезували, відновлюючи аурат калію ацетоном або етанолом методом Девіса [7]. Вихідною речовиною була золотохлористоводнева кислота $H[AuCl_4] \cdot 4H_2O$, з якої під час взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію. Наночастинки срібла та заліза отримували конденсаційним методом шляхом відновлення солей відповідних металів [7]. Розмір одержаних наночастинок обчислювали із застосуванням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС). Вимірювання проводили на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 (Malvern Instruments Ltd, Великобританія).

У роботі використовували такі наночастинки металів (нанопрепарати):

- золота (розміром 10, 20, 30 та 45 нм у концентраціях:
 - 10 нм — 11,06 мкг/мл; $11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл;
 - 20 нм — 11,0 мкг/мл; $11,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл;
 - 30 нм — 14,0 мкг/мл; $14,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл;
 - 45 нм — 38,6 мкг/мл; $38,6 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл);
- срібла (розміром 30 нм у концентраціях 86,0 мкг/мл та $86,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл);
- заліза (розміром 14 нм у концентрації 21,0 мкг/мл; $21,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл);
 - 18 нм — 29,0 мкг/мл; $29,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл;
 - 23 нм — 16,0 мкг/мл; $16,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл;
 - 77 нм — 18,0 мкг/мл; $18,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл).

Позитивним контролем слугували клітини культури СНО-К1, оброблені N-нітрозометилсечовиною в концентрації 1 мМ протягом 48 год. Як негативний контроль — ті ж самі клітини в розчині ДМСО.

Оброблення евкаріотичних клітин культури СНО-К1 досліджуваними наночастинками металів здійснювали упродовж 30 хв при кімнатній температурі. Час оброблення експериментально обґрунтований, виходячи із даних конфокальної та електронно-трансмисійної мікроскопії. Візуалізацію процесу акумуляції наночастинок золота евкаріотичними клітинами СНО-К1 виконували за допомогою лазерного конфокального мікроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина, лазер 543 нм, відбиття 530–540 нм, об'єктив 63-повітряний). Електронно-мікроскопічний аналіз розподілу наночастинок золота та срібла у тест-клітинах проводили

електронним мікроскопом JEOL JEM-1230 Electron Microscope (Tokyo Boeki Ltd, Японія). Визначення генотоксичності нанопрепаратів золота здійснювали у реакційних сумішах, які містили 67 мкл суспензії клітин та 33 мкл нанопрепарату при 37° С. Час інкубації наночастинок з клітинами СНО-К1 — 30 хв.

В експериментах з метаболічною активацією використовували мікросомальну фракцію S9 печінки щурів, вміст якої в інкубаційній суміші становив 5%. Час інкубації — 3 год при температурі 37° С.

Ушкодження ДНК наночастинками металів визначали за такою схемою: отримання гель-слайду, формування мікропрепарату, лізис, лужна денатурація, проведення електрофорезу, нейтралізація/фіксація, фарбування препарату, мікроскопічний аналіз [6, 8].

Мікроскопію мікропрепаратів здійснювали із застосуванням флуоресцентного мікроскопа (ЛЮМАМ Р8, Росія). На кожен мікропрепарат аналізували не менш ніж 100 «ДНК-комет». Комп'ютерну обробку отриманих цифрових зображень виконували за допомогою програми COMET-CASP. При цьому визначали такі параметри «комет»: «довжина хвоста», «% ДНК у хвості», «момент хвоста» тощо.

Статистичну обробку результатів проводили по кожній експериментальній точці, порівнюючи показники ушкодження ДНК у дослідній та контрольних групах. Критерієм позитивного результату слугував статистично достовірний відтворюваний ефект.

У роботі використано Tris-HCl, агарозу (Serva, Німеччина), акридиноий жовтогарячий, N-нітрозометилсечовину, трипановий синій (Sigma, США) та реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «ч. д. а.»

Експерименти виконано в шести повторах та у двох паралелях.

Результати та обговорення

Результати експериментів з контактної взаємодії клітин лінії СНО-К1 з наночастинками металів свідчать про їхню здатність акумулювати наночастинки як на поверхні, так і всередині клітини. Дані конфокальної мікроскопії підтверджують активну взаємодію наночастинок золота розміром 20 нм з клітинами культури СНО-К1 (рис. 1).

Таку картину спостерігали і для клітин, оброблених наночастинками золота розміром 10, 30 та 45 нм.

Дані електронно-мікроскопічного аналізу свідчать про різний характер внутрішньо-

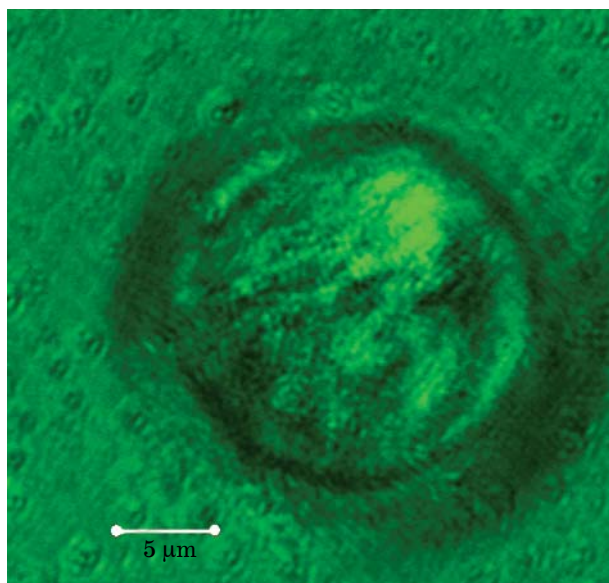


Рис. 1. Конфокальна мікроскопія клітин культури СНО-К1 з акумульованими наночастинками золота розміром 20 нм

клітинної локалізації наночастинок золота різного розміру. Так, наночастинок золота розміром 20 нм переважно локалізуються поблизу вакуолей (рис. 2, А), кількість яких істотно більша порівняно з не обробленими клітинами, тимчасом як наночастинок розміром 30 нм переважно локалізуються поблизу лізосом (рис. 2, Б).

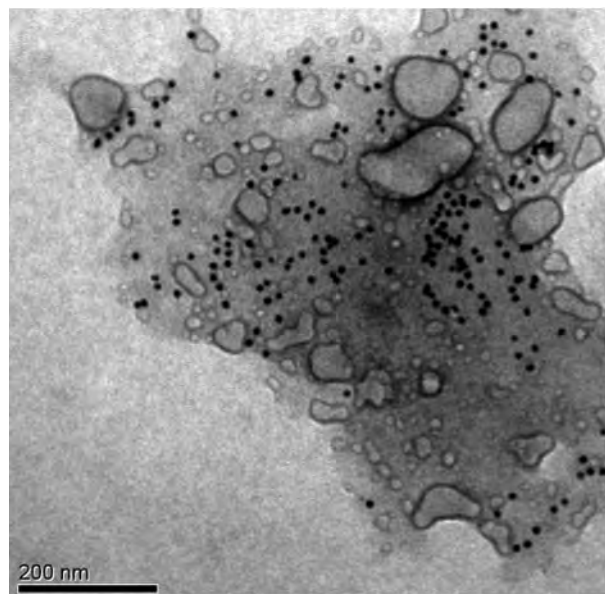
Виходячи з цих даних можна припустити, що характер біотрансформації акумульованих наночастинок золота різного розміру під впливом метаболітів цитоплазматичного матриксу буде різним. А саме, розмір наночастинок 20 нм не змінюється. З іншого боку, найвірогідніше, що наночастинок розміром 30 нм зазнають біотрансформуючого впливу лізосомального апарату.

Що стосується наночастинок срібла вивченого розміру (30 нм), слід відзначити рівномірний розподіл їх у цитоплазмі клітини без надмірної її вакуолізації (рис. 3).

Виконані дослідження генотоксичних властивостей нанопрепаратів металів свідчать про таке. Кількість ушкоджень ДНК для нанопрепарату золота розміром 10 нм (рис. 4, а, б) становить близько 15% ушкодженої ДНК за показником «% ДНК у хвості», що значно перевищує аналогічну величину негативного контролю (1%), і наближається до величини позитивного контролю (19%).

Така сама картина спостерігається і для нанопрепаратів золота розміром 20 нм (рис. 4, в, г). Ефект генотоксичності зберігався для всіх вивчених концентрацій наночастинок металу цього розміру.

А



Б

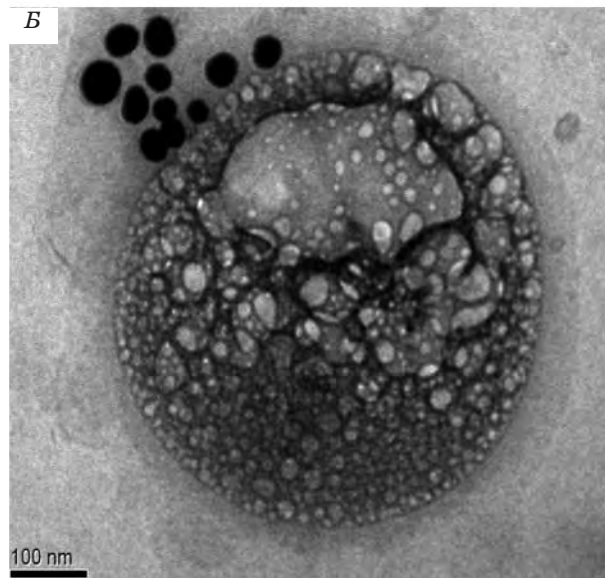


Рис. 2. Електронно-мікроскопічні зображення внутрішньоклітинної локалізації наночастинок золота розміром: А — 20 нм; Б — 30 нм

Ці дані свідчать про те, що наночастинок золота розміром 10 та 20 нм у вивчених концентраціях справляють генотоксичну дію на еукаріотичні тестові клітини лінії СНО-К1. Нанопрепарати золота розміром 30 та 45 нм не виявляли генотоксичності до тестових еукаріотичних клітин (величина «% ДНК у хвості» становила 1,5% та 1,3% відповідно, що майже збігається з аналогічною величиною негативного контролю — рис. 4, д, е, з, к).

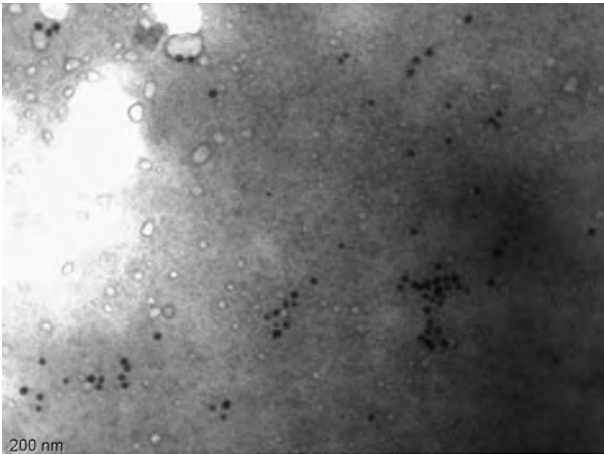


Рис. 3. Електронно-мікроскопічне зображення внутрішньоклітинної локалізації наночастинок срібла розміром 30 нм

Як відомо з літератури [6], метаболіти, що утворюються в живому організмі як продукти біотрансформації потенційних генотоксикантів, можуть самі виявляти генотоксичні властивості. Тому доцільно тестувати їх у системі метаболічної активації.

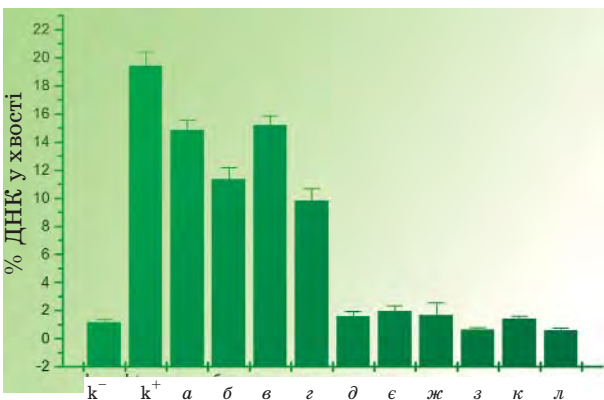


Рис. 4. Величина ДНК-ушкоджувальної активності наночастинок золота:

- k⁻ — негативний контроль (клітини, не оброблені наночастинокми);
- k⁺ — позитивний контроль (клітини, оброблені N-нітрозометилсечовиною);
- клітини, оброблені наночастинокми золота:
- a — 10 нм (11,06 мкг/мл);
- б — 10 нм (11,06·10⁻⁵ мкг/мл);
- в — 20 нм (11,0 мкг/мл);
- г — 20 нм (11,0·10⁻⁵ мкг/мл);
- д — 30 нм (14,0 мкг/мл);
- е — 30 нм (14,0·10⁻⁵ мкг/мл);
- ж — 30 нм (14,0 мкг/мл) у системі S9;
- з — 45 нм (38,6 мкг/мл);
- к — 45 нм (38,6·10⁻⁵ мкг/мл);
- л — 45 нм (38,6 мкг/мл) у системі S9

У результаті проведених досліджень встановлено, що показники ушкодження ДНК за дії наночастинок золота розміром 30

та 45 нм (1,6% та 0,6% відповідно) на клітині культури СНО-К1 у присутності фракції S9 були майже на рівні негативного контролю (1%) (рис. 4, ж, л). Отже, отримані результати свідчать про те, що наночастинокми золота розміром 30 і 45 нм у разі використання метаболічної активації не є генотоксичними.

Результати досліджень генотоксичних властивостей наночастинок срібла розміром 30 нм на клітині культури СНО-К1 подано на рис. 5.

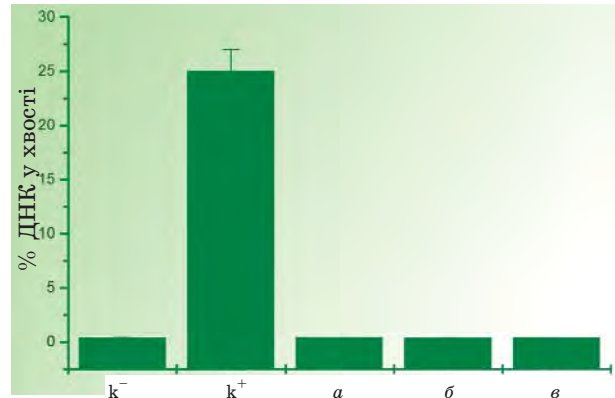


Рис. 5. Величина ДНК-ушкоджувальної активності наночастинок срібла розміром 30 нм:

- k⁻ — негативний контроль (клітини, не оброблені наночастинокми);
- k⁺ — позитивний контроль (клітини, оброблені N-нітрозометилсечовиною);
- клітини, оброблені наночастинокми срібла розміром 30 нм у концентраціях:
- a — 86,0 мкг/мл;
- б — 86,0·10⁻⁵ мкг/мл;
- в — 86,0 мкг/мл із фракцією S9

Так, показано, що кількість ушкоджень ДНК наночастинокми срібла зазначеного розміру за показником «% ДНК у хвості» становила 0,4% і була на рівні негативного контролю (рівень позитивного контролю — 25% за аналогічним показником). Тестування нанопрепаратів срібла розміром 30 нм із системою метаболічної активації — фракцією S9 — свідчать про відсутність генотоксичного впливу наночастинок срібла цього розміру (рис. 5).

Для сучасної біотехнології комплексних лікарських засобів та біологічно-активних добавок особливий інтерес становлять наночастинокми заліза як важливий мікроелемент для запобігання розвитку анемічних станів. У роботі досліджено генотоксичні властивості наночастинок заліза розміром 14, 18, 23 та 77 нм.

Отримані показники ДНК-ушкоджувальної активності вивчених нанопрепаратів заліза дозволяють зробити висновок про наявність генотоксичних властивостей наночастинок розміром 14, 18 та 23 нм (показник «% ДНК у хвості» становить 16%, 15% і 13% відповідно, позитивний контроль — 25%, негативний — 0,4%). Наночастинки заліза розміром 77 нм не виявляли генотоксичної дії.

Отже, метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин, використаний у роботі, є придатним для визначення генотоксичних властивостей наночастинок металів стосовно тестових еукаріотичних клітин.

Вияв генотоксичної дії наночастинок металів, перспективних до використання в біотехнології, залежить від їхньої природи та розміру.

Наночастинки золота розміром 10 та 20 нм мали генотоксичні властивості, тимчасом як наночастинки розміром 30 та 45 нм не вияв-

ляли генотоксичної дії на клітини культури СНО-К1.

Вивчені наночастинки срібла розміром 30 нм не справляли генотоксичного впливу на клітини тестової культури.

Наночастинки заліза розміром 14, 18 та 23 нм відзначались генотоксичними властивостями, а наночастинки розміром 77 нм не виявляли генотоксичності.

Колектив авторів висловлює подяку канд. хім. наук, ст. наук. співр. Горчеву Василю Федоровичу за допомогу у проведенні лазерно-кореляційної спектрометрії та конфокальної мікроскопії і пров. інженеру Паніній Зої Олександрівні — за допомогу у виконанні електронної мікроскопії зразків.

Роботу виконано за фінансової підтримки Проекту №01080005964 КПФД НАН України «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології».

ЛІТЕРАТУРА

1. Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M. Nanotechnological applications in medicine // *Cur. Opin. Biotechnol.* — 2007. — V. 18, N1. — P. 26 — 30.
2. Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A. et al. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance // *Brit. J. Pharmacol.* — 2007. — V. 150. — P. 552–558.
3. Wang M. D., Shin D. M., Simons J. W. et al. Nanotechnology for targeted cancer therapy // *Exp. Rev. Anticancer Ther.* — 2007. — V. 7, N. 6. — P. 833–837.
4. Чехун В. Ф. Нанотехнології в онкології: від терапії до молекулярної візуалізації та керованої терапії // *Онкологія.* — 2008. — Т. 10, № 4. — С. 414–419.
5. Чекман І. С., Сердюк А. М., Кундієв Ю. І. та ін. Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд) // *Довкілля та здоров'я.* — 2009. — Т. 48, № 1. — С. 3–7.
6. *Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Метод. рекомендации.* — М., 2006. — 27 с.
7. *Методические разработки к практикуму по коллоидной химии/ Под.ред. А. В. Перцова.* — М.: Изд-во МГУ, 1976. — 128 с.
8. *Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols.* / Ed. Vladimir V. Didenko. — Humana Press, 2002. — V. 203. — 279 p.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК
НАНОЧАСТИЦАМИ МЕТАЛЛОВ,
ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ**

*С. Н. Дыбкова¹
М. Е. Романько²
Т. Г. Грузина¹
Л. С. Резниченко¹
З. Р. Ульберг¹
В. А. Ушкалов³
А. Н. Головкин³*

¹Институт биокolloидной химии
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев
²Национальный научный центр «Институт
экспериментальной и клеточной
ветеринарной медицины» УААН, Харьков
³Государственный научно-контрольный
институт биотехнологии и штаммов
микроорганизмов, Киев

E-mail: tguzina@mail.ru

Методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток определена степень повреждения ДНК наночастицами металлов (золота, серебра и железа) для клеток тестовой культуры CHO-K1. Показано, что повреждение ДНК перспективными для биотехнологии наночастицами металлов зависит от их природы и размера. Наночастицы золота размером 30 и 45 нм, серебра — 30 нм и железа — 77 нм не вызывали повреждений ДНК. ДНК-повреждающее действие на эукариотические тестовые клетки оказывали наночастицы золота размером 10 и 20 нм, а также железа — 14, 18 и 23 нм.

Ключевые слова: наночастицы металлов, повреждение ДНК, клетки культуры CHO-K1, метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток.

**DETERMINATION OF DNA DAMAGE
BY METAL NANOPARTICLES
PERSPECTIVE
FOR BIOTECHNOLOGY**

*S. M. Dybkova¹
M. E. Romanko²
T. G. Gruzina¹
L. S. Rieznichenko¹
Z. R. Ulberg¹
V. O. Ushkalov³
A. M. Golovko³*

¹D. F. Ovcharenko's Institute of Biocolloid
Chemistry of NAS of Ukraine, Kyiv
²National Scientific Center «Institute
of experimental and cellular veterinary
medicine» of AAS of Ukraine, Kharkiv
³State Scientific and Control Institute
of Biotechnology and Microorganisms Strains,
Kyiv

E-mail: tguzina@mail.ru

Determination DNA damage by metal nanoparticles (Au, Ag, Fe) on the test-culture CHO-K1 has been performed by the method of alkaline gel-electrophoresis single eukaryotic cells («comet-assay»). Size- and nature- dependent DNA damage degree of metals nanoparticles perspective in biotechnology has been demonstrated. It has been shown that gold nanoparticles with size 30 and 45 nm, silver nanoparticles with size 30 nm and iron nanoparticles with size 77 nm have not DNA damage influence. Gold nanoparticles with size 10 and 20 nm, iron nanoparticles with size 14, 18, 23 nm possess DNA damage properties.

Key words: metals nanoparticles, DNA damage, culture CHO-KI cells, method of alkaline gel-electrophoresis of isolated cells.