



УДК 577.352.3:616-006.04:57.02:661.859

© 2010

С. М. Дибкова, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, С. І. Шпильова,
З. Р. Ульберг, академік НАН України В. Ф. Чехун

Аналіз генотоксичності наночастинок золота методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин

Методом лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод "ДНК-комет") досліджено генотоксичність наночастинок золота різного розміру та в різній концентрації на еукаріотичних пухлинних клітинах (культура U937) та лейкоцитах крові людини. Встановлено, що в умовах in vitro наночастинок розміром 10 та 20 нм є генотоксичними щодо вивчених еукаріотичних клітин, а наночастинок розміром 30 та 45 нм не виявляють генотоксичних властивостей до цих клітин навіть в тестах з метаболічною активацією. Визначено біобезпечні розміри наночастинок золота для їх використання як носіїв протипухлинних препаратів у нанобіотехнологіях цільової терапії.

Нанотехнологія — нова галузь науки та виробництва, яка переживає бурхливий розвиток у всьому світі і в Україні зокрема. Особливої уваги заслуговують нанобіотехнології і, зокрема, їх розробки в діагностиці та лікуванні онкозахворювань.

Одним із перспективних напрямків на цьому шляху є застосування наночастинок металів як носіїв протипухлинних препаратів [1–4]. У зв'язку з цим актуальним є дослідження біобезпеки таких наночастинок. Серед усього арсеналу відомих методів визначення біобезпеки наноматеріалів методи генетичного моніторингу, а саме оцінка їх генотоксичності, займають особливе місце, оскільки дозволяють безпосередньо проаналізувати вплив на генетичний апарат клітини. Найперспективнішим та найінформативнішим на сьогодні в оцінці генотоксичності наночастинок є метод "ДНК-комет" — лужний гель-електрофорез ізольованих клітин [5], що є одним з найбільш високочутливих методів сучасної генотоксикології і дає можливість визначати первинні ДНК-пошкодження, патогенетична роль яких достовірно встановлена.

Метою проведеного нами дослідження було вивчення генотоксичних властивостей наночастинок золота різного розміру в експериментах in vitro з використанням методу лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин.

Як експериментальні моделі використовували клітини культури U937 (human histiocytic lymphoma cell line) з колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України та лейкоцити, виділені з крові людини. Клітини лінії

U937 нарощували на середовищі RPMI-1640 ("Sigma", США), що містило 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби ("Gibco", США) до титру $5 \cdot 10^5$ кл./мл. Лейкоцити з крові людини отримували шляхом дворазової обробки крові розчином такого складу: 155 мМ NH_4Cl , 5 мМ KHCO_3 , 0,005 мМ Na_2EDTA , рН 7,4, з подальшим центрифугуванням при 1000 g протягом 10 хв. Виділені лейкоцити ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері до концентрації $5 \cdot 10^5$ кл./мл.

Кількість живих клітин, визначених за допомогою забарвлення 0,3% розчином трипанового синього, становила не менш ніж 90%.

Наночастинки золота синтезували шляхом відновлення аурату калію ацетоном або етанолом методом Девіса [6]. Вихідною речовиною була золотохлористоводнева кислота $\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, з якої при взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію. Розмір отриманих частинок обчислювали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії. Вимірювання проводили на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 ("Malvern Instruments Ltd", Великобританія).

У дослідженні були використані наночастинки (нанопрепарати) золота із середнім розміром 10, 20, 30 та 45 нм у таких 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.

Позитивними контролями були клітини культури U937 та лейкоцити крові людини, оброблені етидид бромідом у концентрації 1 мМ протягом 3 год. Як негативний контроль використані ті ж клітини в розчині ДМСО.

Обробку еукаріотичних клітин культури U937 наночастинками золота здійснювали протягом 5 хв при кімнатній температурі. Час обробки експериментально обґрунтований, виходячи з кінетичних кривих акумулювання наночастинок золота клітинами U937. Лейкоцити крові людини обробляли наночастинками золота протягом 30–45 хв.

Визначення генотоксичності нанопрепаратів золота здійснювали в реакційних сумішах, які містили 67 мкл суспензії клітин та 33 мкл нанопрепарату при 37 °С.

В експериментах з метаболічною активацією використовували мікросомальну фракцію S9 печінки щурів. Реакційна суміш містила 2–5% фракції S9. Час інкубації становив 3 год при 37 °С.

Генотоксичні властивості наночастинок золота методом "ДНК-комет" в лужних умовах електрофорезу визначали за загальноприйнятою схемою [7, 8].

Отримані мікропрепарати забарвлювали розчином акридинового жовтогогарячого в концентрації 20 мкг/мл. Мікроскопічний аналіз мікропрепаратів здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа ("ЛЮМАМ Р8", Росія). На кожен мікропрепарат аналізували не менш ніж 100 "ДНК-комет".

На рис. 1 наведені типові зображення "ДНК-комет", отримані при генотоксичному впливі наночастинок золота. Цифрові зображення аналізували за допомогою комп'ютерної програми "СОМЕТ-СASP". Визначали такі параметри "комет": "довжина хвоста", "% ДНК у хвості", "момент хвоста" і т. п.

Статистичну обробку результатів проводили по кожній експериментальній точці шляхом порівняння показників ушкодження ДНК у дослідній та контрольних групах. Критерієм позитивного результату вважали статистично достовірний, відтворюваний ефект.

Експерименти виконані в шести повторах та у двох паралелях.

На рис. 2 наведені результати визначення генотоксичних властивостей наночастинок золота розміром 10, 20, 30 та 45 нм. Показано, що у вивчених концентраціях наночастинки

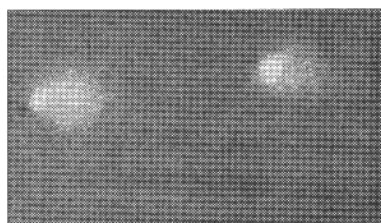


Рис. 1. “ДНК-комети”, які характеризують пошкодження ДНК клітин U937 наночастинками золота 10 і 20 нм

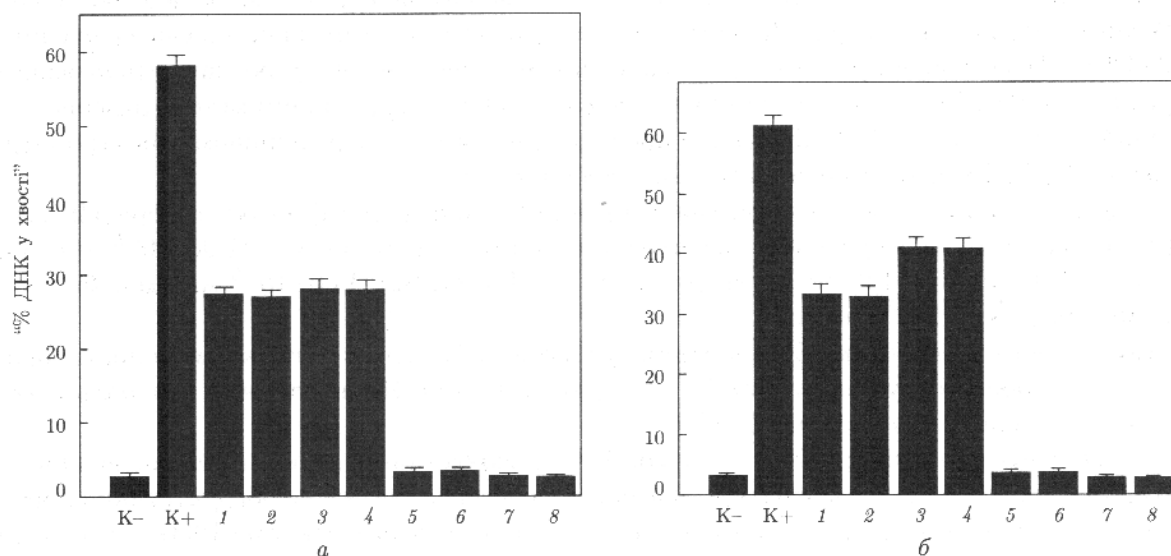


Рис. 2. Величина ДНК-руйнівної активності наночастинок золота різного розміру та концентрації на клітинах культури U937 (а) і лейкоцитах крові людини (б).

K- — негативний контроль (клітини, не оброблені наночастинами); K+ — позитивний контроль (клітини, оброблені етидій бромідом). Клітини, оброблені наночастинами: 1 — 10 нм (11,06 мкг/мл); 2 — 10 нм ($11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); 3 — 20 нм (11,0 мкг/мл); 4 — 20 нм ($11,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); 5 — 30 нм (14,0 мкг/мл); 6 — 30 нм ($14,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); 7 — 45 нм (38,6 мкг/мл); 8 — 45 нм ($38,6 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл)

розміром 10 та 20 нм виявляли генотоксичну дію щодо клітин лінії U937 (див. рис. 2, а). Так, величина ДНК-руйнівної активності для наночастинок золота розміром 10 нм становила близько 27% ушкодженої ДНК за показником “% ДНК у хвості”, що значно перевищує аналогічну величину негативного контролю та збігається з величиною позитивного контролю. Подібна картина спостерігається і для нанопрепаратів золота розміром 20 нм. Нанопрепарати золота розміром 30 та 45 нм не виявляли генотоксичності щодо пухлинних клітин (величина “% ДНК у хвості” становила 3,4 та 2,9% відповідно, що майже збігається з аналогічною величиною негативного контролю).

Згідно з результатами визначення ДНК-пошкоджень лейкоцитів людини (див. рис. 2, б), показник “% ДНК у хвості” при дії наночастинок золота розміром 10 та 20 нм становить 33,4 і 41,2% відповідно, а аналогічний показник негативного контролю — 3,3%, що свідчить про значний рівень генотоксичності досліджених нанопрепаратів. На відміну від наночастинок розміром 10 і 20 нм, нанопрепарати золота розміром 30 та 45 нм мали показник “% ДНК у хвості” на рівні негативного контролю, що засвідчує відсутність їх генотоксичного впливу на лейкоцити людини.

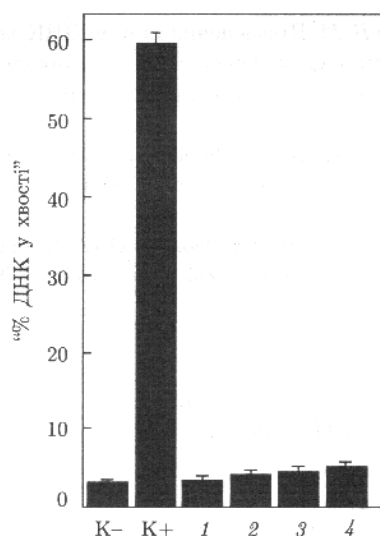


Рис. 3. Величина ДНК-руйнівної активності наночастинок золота різного розміру та концентрації на клітинах культури U937 та лейкоцитах людини з використанням метаболічної активації фракцією S9.

K- — негативний контроль (клітини, не оброблені наночастинками); K+ — позитивний контроль (клітини, оброблені етидій бромідом); 1 — клітини U937, оброблені наночастинками розміром 30 нм (14,0 мкг/мл); 2 — лейкоцити людини, оброблені наночастинками розміром 30 нм (14,0 мкг/мл); 3 — клітини U937, оброблені наночастинками розміром 45 нм (38,6 мкг/мл); 4 — лейкоцити людини, оброблені наночастинками розміром 45 нм (38,6 мкг/мл)

Оскільки генотоксичність можуть спричиняти метаболіти, які утворюються в живому організмі при біотрансформації таких нанопрепаратів, доцільним було їх тестування з системою метаболічної активації S9. Встановлено, що показник пошкодження ДНК у результаті дії наночастинок розміром 30 та 45 нм з системою метаболічної активації S9 для клітин культури U937 становить 3,4 і 4,5% відповідно, а для лейкоцитів — 4,2 та 5,1%, що практично відповідає рівню негативного контролю (рис. 3). Ці дані свідчать про те, що наночастинки золота розміром 30 і 45 нм і з метаболічною активацією не мають генотоксичних властивостей.

Таким чином, результати тестування наночастинок золота різних розмірів дозволили виявити розмірний діапазон (30 та 45 нм), в якому генотоксична дія відсутня. На підставі отриманих даних можна зробити висновок про можливість застосування методу “ДНК-комет” для визначення біобезпеки наночастинок металів, що є важливим та необхідним при використанні таких наночастинок як носіїв протипухлинних препаратів у нанобіотехнологіях цільової терапії.

Робота виконана за фінансової підтримки КПФД НАН України “Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології”, проект № 01080005964.

1. Wang M. D., Shin D. M., Simons J. W., Nie S. Nanotechnology for targeted cancer therapy // *Expert Rev. Anticancer Ther.* – 2007. – 7, No 6. – P. 833–837.
2. Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A. et al. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance // *Brit. J. Pharmacol.* – 2007. – 150. – P. 552–558.
3. Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M. Nanotechnological applications in medicine // *Curr. Opinion Biotechnol.* – 2007. – 18, No 1. – P. 26–30.
4. Чегун В. Ф. Нанотехнології в онкології: від терапії до молекулярної візуалізації та керованої терапії // *Онкологія.* – 2008. – 10, № 4. – С. 414–419.

5. Сорочинская У. Б., Михайленко В. М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. – 2008. – 10, № 3. – С. 303–309.
6. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / Под. ред. А. В. Перцова. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 128 с.
7. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. – Москва, 2006. – 27 с.
8. *Methods in Molecular Biology // In Situ Detection of DNA Damage. Methods and Protocols* / Ed. by V. V. Didenko. – Totowa, NJ: Humana Press, 2002. – Vol. 203. – 279 p.

Інститут біологічної хімії

Надійшло до редакції 04.06.2009

ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ

Інститут експериментальної патології, онкології

і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

**S. M. Dybkova, L. S. Rieznichenko, T. G. Gruzina, S. I. Shpileva,
Z. R. Ulberg, Academician of the NAS of Ukraine V. F. Chekhun**

Genotoxicity of gold nanoparticles for eukaryotic cells by the comet-assay method

Genotoxicity of gold nanoparticles (10–45 nm) for tumor cells (human histiocytic lymphoma cell line U937) and blood leucocytes is investigated by comet-assay method. It is shown that 10-nm and 20-nm gold nanoparticles but not 30-nm and 45-nm ones possess genotoxic properties for eukaryotic cells. These data are confirmed by the metabolic activation test. The obtained results allow us to define the biosafe sizes of gold nanoparticles for their subsequent use as carriers of antineoplastic preparations in target therapy.