

© С.М. Дибкова

УДК 577.151:579.864.1

С.М. Дибкова

ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА І СРІБЛА, ПЕРСПЕКТИВНИХ У БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ

Інститут біологічної хімії ім.Ф.Д.Овчаренка НАН України (м. Київ)

Робота виконана в рамках проекту «Молекулярні механізми взаємодії, транспорту та трансформації наночастинок в біологічних системах як основа створення засобів цільової терапії» програми «Нано-структурні системи, наноматеріали, нанотехнології» (розділ «Біонаносистеми») (№ Державної реєстрації 0108U005964).

Вступ. Наночастинки металів є перспективними наноматеріалами у біотехнології та медицині [7, 9]. Наноматеріали і, зокрема, наночастинки металів, мають фізико-хімічних властивості, які радикально відрізняються від властивостей таких речовин в іонній формі чи макроскопічних дисперсіях [1]. Відомо, що наночастинкам металів притаманна висока біологічна активність. Так, наночастинки золота володіють високою каталітичною активністю, яка проявляється лише в нанорозмірному діапазоні. Біологічна активність наночастинок срібла обумовлена їх участю у синтезі деяких ферментів, вітамінів та гормонів [4]. Перспективність використання наночастинок золота та срібла у біотехнології та медицині є безсумнівною. На цьому фоні важливою є оцінка їх біобезпеки, яка включає токсикологічні дослідження, а також генотоксичну та мутагенну дію.

Високоінформативним є дослідження мутагенної дії наноматеріалів на рослинних меристемах, які є надзвичайно чутливими до небезпечної дії хімічних речовин та фізичних факторів. Біотест «Allium test» розроблений А. Леваном в 1938 році і вперше запропонований Шведською Королівською Академією наук як стандартний тест-об'єкт для тестування мутагенності [10]. Даний метод не потребує знання каріотипу та ідентифікації типів пошкоджень хромосом, він є надзвичайно простим, дешевим, високоінформативним та досить чутливим для визначення «мутаген»- «не мутаген». «Allium test» рекомендований експертами ВООЗ як стандарт при цитогенетичному моніторингу навколишнього середовища [10, 11] та є достойною альтернативою тестам *in vivo* [8].

Анафазний метод підрахунку хромосомних аберацій в клітинах апікальної меристеми цибулі *Allium* *sepa* дозволяє реєструвати мутації типу делецій та транслокацій, наслідком яких є утворення мостів та фрагментів у ана- та телофазі.

Мета дослідження полягала в оцінці мутагенної активності наночастинок золота і срібла, перспективних в біотехнології та медицині.

Об'єкт і методи досліджень. Наночастинки золота синтезували шляхом відновлення аурату калію ацетоном або етанолом методом Девіса [3]. Вихідною речовиною виступала золотохлористоводнева

кислота $H[AuCl_4] \cdot 4H_2O$, з якої при взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію. Наночастинки срібла отримували конденсаційним методом шляхом відновлення солей срібла [3]. Розмір отриманих наночастинок обчислювали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС). Вимірювання проводили на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 ("Malvern Instruments Ltd", Великобританія).

В роботі були використані наступні наночастинки металів (нанопрепарати): золота - розміром 10, 20 та 30 нм у концентраціях: 10 нм – 11,0 мкг/мл, 20 нм - 11,6 мкг/мл, 30 нм – 14,0 мкг/мл; срібла розміром 30 нм у концентрації 86,0 мкг/мл за металом.

Насінини цибулі *Allium* *sepa* урожаю 2009 року зберігали в кімнатних умовах один рік за сезонних коливань вологості і температури. Їх пророщували в чашках Петрі на вологому фільтровальному папері при температурі 24 °С в термостаті до розміру корінця 1 см в довжину.

Кожна експериментальна та контрольна група складалась з 5 рослин. Дослідження проводили в 4 серіях незалежних експериментів та в блокторностях.

В експериментальні чашки додавали одноразово по 0,4 мл водних розчинів відповідних наночастинок у вихідних концентраціях, а в контрольні чашки - аналогічний об'єм дистильованої води. В період всього терміну проростання корінців здійснювали зволоження фільтрувального паперу 0,4 мл дистильованої води як в контрольних, так і в експериментальних зразках.

Фіксацію корінців здійснювали в фіксаторі Кларка («оцтовий алкоголь») протягом 2 годин, після чого триразово відмивали 80% етиловим спиртом до зникнення запаху оцту [5].

Фарбування корінців здійснювали ацетокарміном протягом 40 хвилин за триразового підігріву до кипіння. Після закінчення фарбування корінці промивали 45%-ою оцтовою кислотою, розміщували на предметному склі в краплі 45%-ої оцтової кислоти, накривали покривним склом і рівномірним тиском розчавлювали корінець до моношару [5]. Препарати аналізували під світловим мікроскопом при збільшенні 12,5 x 1,5 x 40 та аналізували клітини з профарбованим ядром та непошкодженими клітинними стінками. Підраховували кількість нормальних та абераційних ана-телофаз, розраховуючи процент абераційних клітин. Мітотичний індекс визначали за формулою:

$$\frac{I+M+A+T}{I+P+M+A+T} \times 100 \%$$

де I – кількість клітин в інтерфазі, P – кількість клітин в профазі, M – кількість клітин в метафазі, A – кількість клітин в анафазі, T – кількість клітин в телофазі.

В кожному препараті аналізували 1000 клітин. Статистичну обробку проводили загальноприйнятими методами [2].

Результати досліджень та їх обговорення.

Показано, що обробка насінин Allium sera наночастинками золота прискорювала їх проростання. Так, насінини, які були оброблені наночастинками золота розміром 10 та 20 нм проростали на кінець четвертої-початок п'ятої доби культивування, насінини, оброблені наночастинками золота розміром 30 нм проростали на шосту-сьому добу. Насінини контрольних груп проростали через сім діб культивування.

Наночастинки срібла розміром 30 нм значно прискорювали проростання насінин Allium sera. Так, насінини, оброблені такими наночастинками проростали на четверту добу культивування, при проростанні контрольних насінин на восьму добу.

Визначення мітотичної активності в клітинах апікальної меристеми корінців використаної рослинної тест-системи показало, що наночастинки золота і срібла всіх вивчених розмірів інтенсифікували мітотичні процеси в рослинній клітині. Як свідчать дані **таблиці 1**, обробка насінини наночастинками золота розміром 10 нм призводила до підвищення мітотичного індексу в клітинах апікальної меристеми Allium sera, з 64 % для контрольних зразків до 83%. Стимуляція мітотичної активності спостерігалася і у випадку використання наночастинок золота розміром 20 та 30 нм (мітотичні індекси 82 % та 75 % відповідно). Максимальна стимуляція мітотичних процесів спостерігалася при обробці насінин наночастинками срібла розміром 30 нм (мітотичний індекс - 95 %).

Таблиця 1

Мітотична активність наночастинок металів в клітинах апікальної меристеми Allium sera

Проба	Мітотичний індекс, %
Контроль (насінини без обробки наночастинками)	64±2 %
Насінини + наночастинки золота 10 нм	83±4 %
Насінини + наночастинки золота 20 нм	82±3 %
Насінини + наночастинки золота 30 нм	75±3 %
Насінини + наночастинки срібла 30 нм	95±1 %

Стимуляція мітотичної активності у корінцях, де насіння було оброблене наночастинками золота та срібла, узгоджується з їх високою біологічною активністю, яка була продемонстрована для прокаріотичних та еукаріотичних клітин [6,7].

Показано, що рівень хромосомних аберацій в клітинах апікальної меристеми Allium sera при дії наночастинок золота розміром 10, 20 та 30 нм рівень складав 0,1 % і не відрізнявся від рівня в контрольних зразках (**табл. 2**).

Таблиця 2

Рівень абераційних клітин при дії наночастинок металів на клітини апікальної меристеми Allium sera

Наноматеріал/ контроль	% абераційних клітин
Контроль (насінини без обробки наночастинками)	0,1±0,01%
Насінини + наночастинки золота 10 нм	0,1±0,06%
Насінини + наночастинки золота 20 нм	0,1±0,02%
Насінини + наночастинки золота 30 нм	0,1±0,01%
Насінини + наночастинки срібла 30 нм	0,3±0,04%

Це дає підстави стверджувати про відсутність мутагенної дії наночастинок золота цих розмірів в тестових клітинах Allium sera.

Збільшення відсотку абераційних клітин (до 0,3%) під дією наночастинок срібла розміром 30 нм може бути обумовлене інтенсифікацією мітотичного процесу (95%) в оброблених клітинах цими наночастинками і не може свідчити про їх мутагенну активність.

Таким чином, результати, представлені в даній роботі, свідчать про те, що вивчені наночастинки золота розміром 10, 20, 30 нм та срібла 30 нм не виявляють мутагенної дії навіть на фоні підвищеної проліферативної активності.

Висновки. Біологічний тест з використанням апікальних меристем Allium sera є адекватним для оцінки мутагенної дії наночастинок металів. Наночастинки золота розміром 10, 20 та 30 нм та срібла 30 нм не викликають хромосомних аберацій в апікальних меристемах Allium sera, а отже не спричиняють мутагенної дії.

Перспективи подальших досліджень. Проведені дослідження щодо мутагенності наночастинок золота та срібла з використанням Allium-теста є одним з важливих етапів оцінки біобезпечності наноматеріалів, перспективних до застосування в біотехнології, медицині, фармакології та ветеринарії.

Список літератури

1. Коллоидно-химические основы нанонауки / под ред. А.П. Шпака, З.Р. Ульберг. – К.: Академперіодика, 2005. – 466 с.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов / Г.Ф. Лакин – М.: Высш. шк., 1990. – 352с.
3. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / под ред. А.В. Перцова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132с.
4. Нанофармакологія / І.С.Чекман. – Київ: ПВП "За друга", 2011. – 422с.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева - М.: Агропромиздат, 1988. - 272 стр.
6. Ульберг З. Р. Біобезпечні наночастинки металів в наномедицині та нанобіотехнології/ З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. – 2010. - В. 4. – С.72-77.
7. Ульберг З.Р. Нанотехнології в медицині: роль колоїдно-хімічних процесів / З.Р. Ульберг, Т.Г. Грузіна, О.В. Карпов // Вісник НАНУ. – 2008. – № 8. – С. 28–41.
8. Abu, Ngozi E., Mba, K. C. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on Allium cepa root tip meristems/ Abu, E. Ngozi, K.C. Mba// Toxicology and Environmental Health Sciences. — Academic Journals, 2011. — Vol.3, No 2 — С. 44-51.
9. Caruthers S.D. Nanotechnological applications in medicine / S.D. Caruthers, S.A Wickline, G.M. Lanza // Current Opinion Biotechnology. – 2007. – Vol 18, No 1. – P.26-30.
10. Cotelle S., Masfaraud J.F., Fıřard J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium/Vicia- micronucleus and the Tradescantia- micronucleus assays/ S. Cotelle, J.F. Masfaraud, J.F. Fıřard // Mutat. Res.. — Elsevier B.V., 1999. — Vol 426, No2. — С. 167-71.11.
11. Fiskesjo G. The Allium Test as a standard in environmental monitoring /G.Fiskesjo // Hereditas. — 1985. — Т. 102. — С. 99-112.

УДК 577.151:579.864.1

ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА І СРІБЛА, ПЕРСПЕКТИВНИХ У БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ

Дибкова С.М.

Резюме. В роботі досліджена мутагенна дія наночастинок золота та срібла з використанням анафазного методу підрахунку хромосомних аберацій в клітинах апікальної меристеми цибулі Allium cepa. Біологічний тест з використанням апікальних меристем Allium cepa є адекватним для оцінки мутагенної дії наночастинок металів. Наночастинки золота розміром 10, 20 та 30 нм та срібла 30 нм не викликають збільшення частоти виникнення хромосомних аберацій у порівнянні з контрольними зразками в апікальних меристемах Allium cepa, а отже не спричиняють мутагенної дії.

Ключові слова: наночастинки золота та срібла, мутагенність, апікальні меристеми Allium cepa, анафазний метод підрахунку хромосомних аберацій, мітотичний індекс.

УДК 577.151:579.864.1

ОЦЕНКА МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА, ПЕРСПЕКТИВНЫХ В БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Дыбкова С.Н.

Резюме. В работе исследовано мутагенное действие наночастиц золота и серебра с использованием анафазного метода подсчета хромосомных aberrаций в клетках апикальной меристемы лука Allium cepa. Биологический тест с использованием апикальных меристем Allium cepa является адекватным для оценки мутагенного действия наночастиц металлов. Наночастицы золота размером 10, 20 и 30 нм и серебра 30 нм не вызывают увеличения частоты возникновения хромосомных aberrаций по сравнению с контрольными образцами в апикальных меристемах Allium cepa, а следовательно не оказывают мутагенного действия.

Ключевые слова: наночастицы золота и серебра, мутагенность, апикальные меристемы Allium cepa, анафазный метод подсчета хромосомных aberrаций, митотический индекс.

UDC 577.151:579.864.1

Assessment Mutagenic Effect Of Gold And Silver Nanoparticles, Perspective For Biotechnology And Medicine

Dybko S. M.

Summary. Mutagenic effects of gold and silver nanoparticles has been investigated by the method of chromosomal aberrations counting in anaphase apical meristem of Allium cepa. Allium-test is adequate for assessing of metal nanoparticles' mutagenic action. Gold(10, 20 and 30 nm) and silver (30 nm) nanoparticles' do not cause increased the frequencies of chromosomal aberrations in the apical meristem of Allium cepa compared with control samples, and therefore do not cause mutagenic' action.

Key words: gold and silver nanoparticles, mutagenicity, apical meristem of Allium cepa, method of chromosomal aberrations counting in anaphase, mitotic index.

Стаття надійшла 21.07.2011 р.