

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОЙ И МИТОЗМОДИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Б. С. КИБРИК¹, С. В. ТИХОМИРОВА¹, И. А. БИТКИН¹, Д. С. ПЕСНЯ²

EXPERIMENTAL STUDY OF MUTAGENOUS AND MITOSIS MODIFYING ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES

B. S. KIRBIK¹, S. V. TIKHOMIROVA¹, I. A. BITKIN¹, D. S. PESNYA²

¹Лаборатория токсикологии НИИ «Ярсинтез», Ярославская государственная медицинская академия, г. Ярославль

²Ярославский Государственный университета им. П. Г. Демидова, г. Ярославль

¹Toxicology Laboratory of Yarsintez Research Institute, Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, RF

²P.G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, RF

Проведено исследование мутагенного и митозмодифицирующего действия наночастиц серебра на аутбредных мышах. Форма наночастиц округлая; размеры 5-50 нм, размер сформированной органической оболочки 2-5 нм; количество в 1 мкм³ 120-270. В качестве метода исследования выбран метафазный анализ клеток костного мозга мышей. На препаратах учитывались частота хромосомных aberrаций и митотический индекс. При однократном внутрибрюшинном введении препарата в дозе 250 мкг/кг наночастицы серебра проявляли митозстимулирующую активность. Мутагенного эффекта наночастиц серебра при ежедневном введении в течение 4 сут в дозе 25 мкг/кг и однократного введения в дозе 250 мкг/кг не зарегистрировано, но существует статистически незначимая тенденция увеличения числа aberrантных метафаз. Следовательно, наночастицы серебра в исследованных дозах не проявляли мутагенной активности и могут считаться безопасными для клеток млекопитающих.

Ключевые слова: наночастицы серебра, митотический индекс, хромосомные aberrации, метафазный анализ, метафаза, мыши.

Mutagenous and mitosis modifying impact of silver nanoparticles has been studied on outbred mice. Nanoparticles were of round shape with dimensions of 5-50 nm, size of generated organic shell of 2-5 nm, the quantity in 1 mcm³ makes 120-270. Metaphasic analysis of mice bone marrow cells was used as a testing technique. The frequency of chromosome aberrations and mitotic index of preparations were accounted. During single intraperitoneal administration of the agent in the dose of 250 mcg/kg the silver nanoparticles demonstrated mitosis stimulating activity. No mutagenous effect of silver nanoparticles by daily administration for 4 days of 25 mcg/kg and single administration in the dose of 250 mcg/kg has been registered, but there is statistically insignificant tendency of aberrant metaphases increase. Consequently silver nanoparticles in the investigated doses demonstrated no mutagenous activity and can be considered safe for mammalian cells.

Key words: silver nanoparticles, mitotic index, chromosome aberrations, metaphase analysis, metaphase, mice.

Наночастицы серебра (НС), благодаря их анти-микробным свойствам, являются одним из наиболее часто используемых в медицине наноматериалов. Рассматривается возможность использования НС как эффективного и безопасного противотуберкулезного средства, продемонстрирована высокая бактерицидная активность НС в отношении клинических изолятов возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью [9, 12].

Мутагенная активность НС исследована недостаточно, а результаты противоречивы по причине большого разнообразия типов НС и стабилизирующих оболочек [13]. Имеются данные о том, что высокая концентрация НС (50 000 мг/л) повреждает ДНК [13]. В исследовании на культуре клеток глиобластомы человека была зарегистрирована мутагенная активность НС методом ДНК-комет и в микроядерном тесте [5]. В аналогичном исследовании, в Allium test, также была обнаружена генотоксическая активность НС [11]. Наиболее вероятным считается, что НС вызывают повреждение ДНК посредством индукции окислительного стресса [5, 8, 11], поэтому разрабатывают различные спосо-

бы повышения биосовместимости НС. Показано, что генотоксичность НС по отношению к клеткам млекопитающих может быть значительно снижена или нивелирована, если в ходе их синтеза использовать различные типы органических стабилизаторов, из которых будет сформирована оболочка (сывороточные белки, поливинилпирролидин и т. д.) [6, 10, 12]. При этом сохраняются бактерицидные свойства наночастиц, т. е. токсичность по отношению к прокариотам [12, 14].

Цель исследования – выявление и количественная оценка потенциальной мутагенной и митозмодифицирующей активности НС в органической оболочке с помощью метафазного анализа в клетках костного мозга млекопитающих в условиях *in vivo*.

Материалы и методы

Материалом исследования служили коллоидные растворы НС [2]. НС получали электрохимическим методом в присутствии органического стабилизатора (RU200812762 7/15). С помощью автоэмиссионного сканирующего электронного микроскопа

SUPRA 40 определены параметры наночастиц: форма округлая; размеры 5-50 нм; количество в 1 мкм³ 120-270; размер оболочки, сформированной из стабилизатора, – 2-5 нм. Дополнительное исследование методом сканирующей зондовой микроскопии на приборе FemtoScan Online позволило установить наличие наночастиц с размерными диапазонами: 10-20, 25-30, 30-40 и 40-45 нм.

Эксперимент проведен на аутбредных мышах-самцах в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г.). Возраст к началу введения препарата – 8-10 нед. Для исследования генетической активности НС использовали метафазный анализ клеток костного мозга, метод из списка стандартных тестов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения, для определения мутагенности и канцерогенности химических веществ [4]. Согласно международным руководствам OECD (ОЭСР), при исследовании генотоксической активности НС и других наноматериалов рекомендуется тест на хромосомные aberrации (в том числе метафазный анализ) [7].

Постановку опыта проводили по стандартной методике [4]. Исследуемый препарат НС вводили животным внутрибрюшинно в дозе 250 мкг/кг однократно и в дозе 25 мкг/кг ежедневно в течение 4 сут. Контрольной группе вводили внутрибрюшинно воду для инъекций. Спустя 24 ч после последнего введения тестируемого образца животные подвергались эвтаназии в CO₂-камере. Всем животным за 1,5 ч до умерщвления вводили внутрибрюшинно колхицин в дозе 5 мг/кг. Объем вводимого раствора не превышал 1 мл.

Учет хромосомных aberrаций в стволовых клетках костного мозга мышей (метафазный анализ) проводили общепринятыми методами [1, 4]. После забоя отделяли бедренные кости и вымывали из них костный мозг, используя 0,56% раствор хлористого калия. По окончании гипотонической обработки в течение 30 мин клетки центрифугировали, диспергировали и фиксировали трехкратно смесью этилового спирта и уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Через сутки клеточную суспензию наносили на стекла (два стекла от каждого животного), окрашивали красителем Романовского – Гимзы, шифровали и анализировали на микроскопе Olympus BX51, оснащенном камерой, с использованием программы ВидеоТесТ-Карио 3.1.

Анализировали до 100 метафазных пластинок от каждого животного, без наложений хромосом с модальным числом 40 хромосом. Регистрировали различные типы хромосомных aberrаций. На стадии метафазы исследовали нестабильные хромосомные aberrации (изменения структуры хромосом) и геномные мутации. Все хромосомные aberrации связаны с разрывами хромосом. Учитывали делеции – потери участка хромосомы, число одиночных и парных фрагментов, разрывы по центромере, кольцевые хромосомы, дицентрические хромосомы. Транслокации – обмен участками между двумя хромосомами, объединение двух акроцентрических хромосом – робертсоновская транслокация. Среди геномных мутаций определяли анеуплоидные клетки – не кратное гаплоидному набору изменение числа хромосом и полиплоидные – кратное гаплоидному изменение числа хромосом. [3, 4]. Варианты учтенных хромосомных aberrаций представлены на рис. 1.

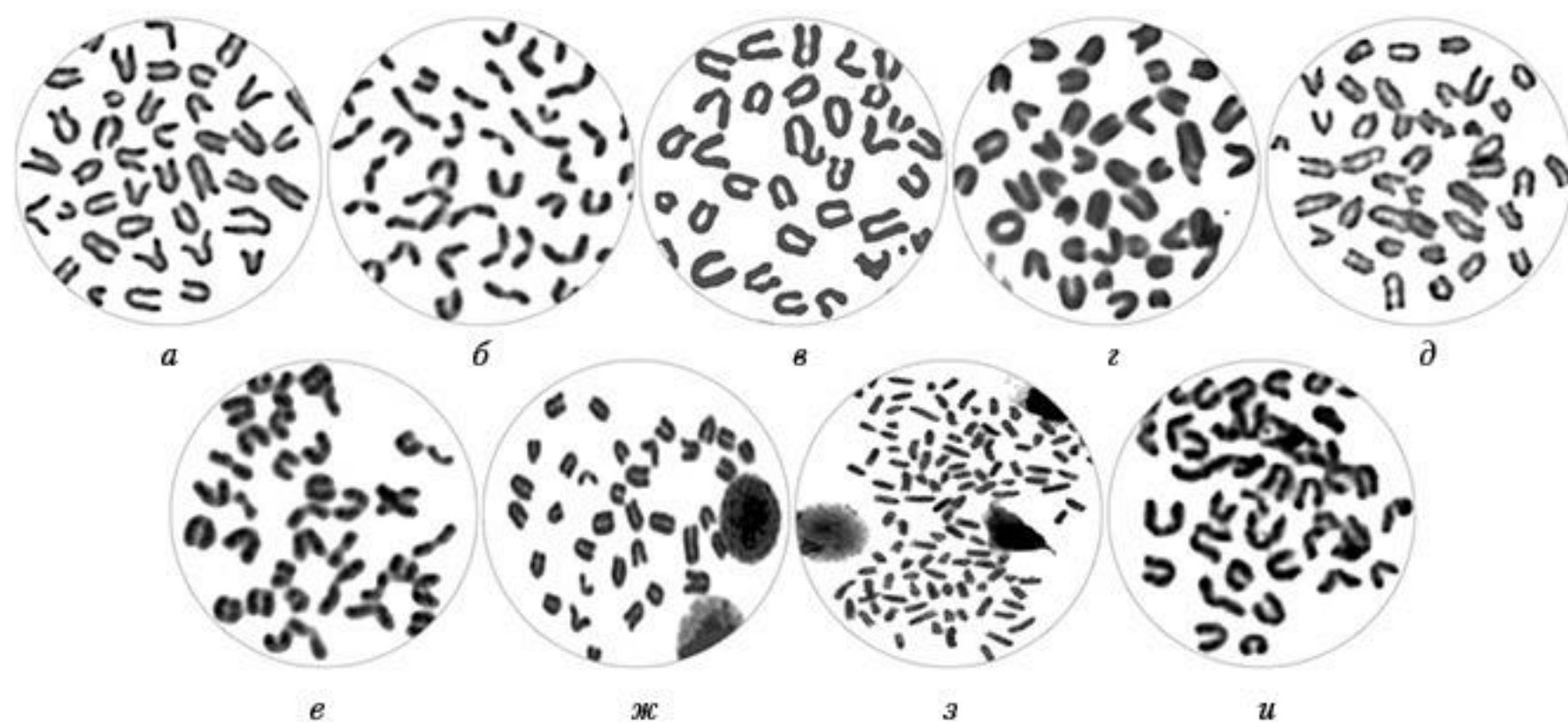


Рис. 1. Микропрепараты метафазных пластинок костного мозга мыши: (кр. Романовский – Гимза; ув. $\times 1000$); Нормальный кариотип – а, хромосомные aberrации (разрыв по центромере – б, одиночный фрагмент – в, внутриплечевой обмен – г, aberrация хроматидного типа – д, робертсоновская транслокация – е, делеция – ж, полиплоидная клетка – з, анеуплоидия и структурные aberrации – и)

Митозмодифицирующую активность наночастиц оценивали на тех же препаратах, что и метафазный анализ, по изменению митотического индекса (МИ) [3]. Данный показатель позволил оценить пролиферативную активность ткани по отношению числа делящихся клеток к общему числу интерфазных клеток при увеличении $\times 400$, рис. 2.

Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента в программе «Био-

статистика». Различия определялись при $p \leq 0,05$ уровне достоверности.

Результаты исследования

Полученные данные представлены в таблице. Анализ метафаз, проведенный при фиксации материала при однократном внутрибрюшинном введении НС в дозе 250 мкг/кг и ежедневном введении в течение 4 сут в дозе 25 мкг/кг, выявил тенденцию к увеличению числа метафаз с aberrациями по сравнению с контрольной группой, но статистически недостоверную. Отсутствие мутагенного эффекта, по-видимому, связано с использованием наночастиц с модифицированной поверхностью, заключенной в органическую оболочку, что повышает их биосовместимость и уменьшает генотоксичность по отношению к клеткам млекопитающих [6, 10, 12].

Как видно из таблицы, наночастицы в подостром опыте в дозе 25 мг/кг в сутки (4 сут) не привели к достоверному изменению митотического индекса по сравнению с контрольным уровнем. Следовательно, при данной дозе НС не оказывают митозмодифицирующего действия на клетки костного мозга.

В остром опыте при дозе НС 250 мг/кг зарегистрировано достоверное повышение митотического индекса по сравнению с контрольным уровнем. Таким образом, при данной дозе НС проявили митозстимулирующую активность.

Выводы

1. Наночастицы в дозе 250 и 25 мкг/кг не приводят в сроки до 4 сут к достоверному повышению частоты генетических нарушений, т. е. мутагенный эффект при данной концентрации НС не зарегистрирован.

2. Наночастицы при дозе 250 мкг/кг достоверно увеличивают значение митотического индекса до $10,92 \pm 1,1\%$ (при $7,37 \pm 0,79\%$ в контрольном опыте), т. е. обладают митозстимулирующей активностью.

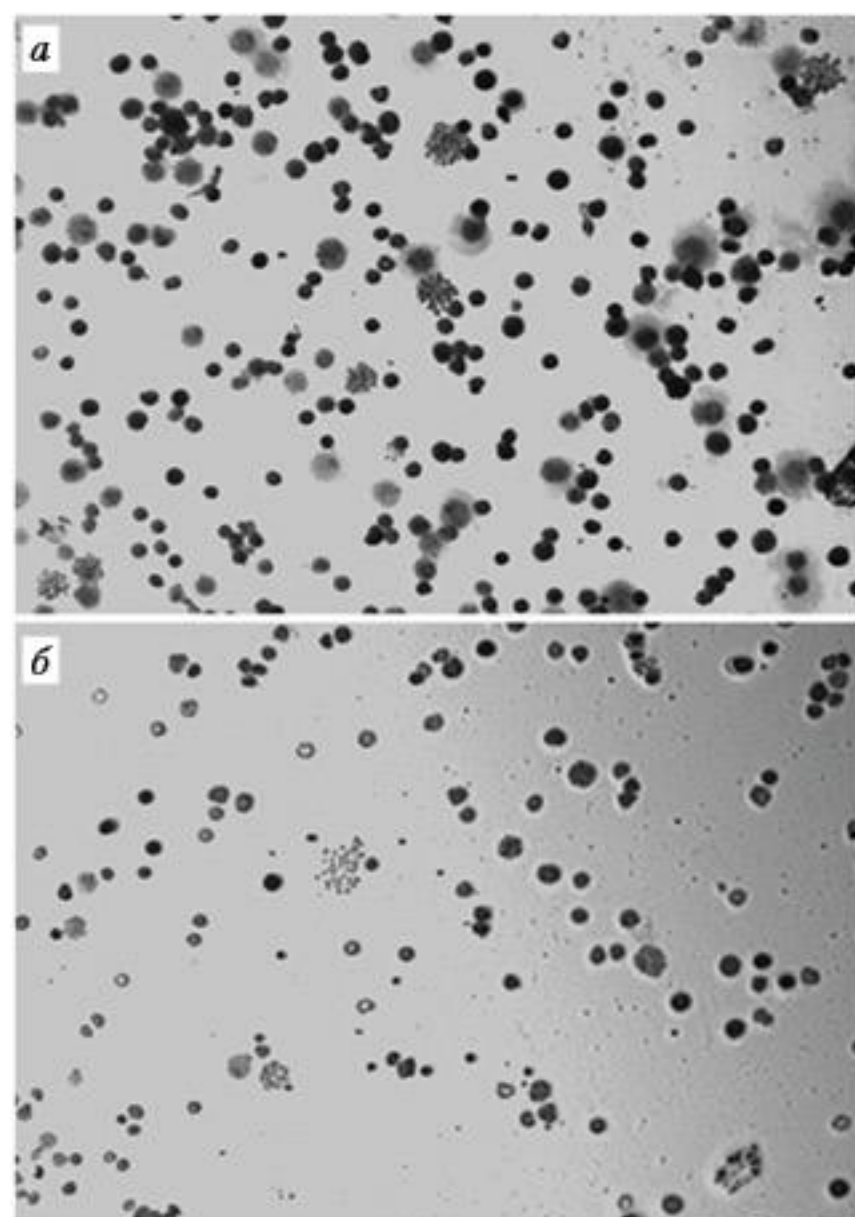


Рис. 2. Митотическая активность клеток костного мозга (кр. Романовский – Гимза; ув. $\times 400$); а – под воздействием наночастиц серебра, б – в контроле

Таблица

Влияние наночастиц серебра на частоту aberrантных метафаз в клетках костного мозга мышей и митотический индекс

Путь введения и кратность введения	Группа животных ♂	Доза вещества мкг/ кг	Просмотрено метафаз	Частота метафаз с aberrациями, % среднее $\pm$ SD	Митотический индекс, % среднее $\pm$ SD
Внутрибрюшинно однократно (экспозиция 24 ч)	Опыт, 5 особей	250 мкг/кг	489	$3,52 \pm 1,72$	$10,92 \pm 1,1^*$
	Контроль, 5 особей	Вода для инъекций	445	$1,66 \pm 0,82$	$7,37 \pm 0,79$
Внутрибрюшинно ежедневно в течение 4 сут (экспозиция 96 ч)	Опыт, 4 особи	25 мкг/кг	374	$3,05 \pm 1,88$	$11,30 \pm 0,94$
	Контроль, 4 особи	Вода для инъекций	271	$1,21 \pm 0,83$	$10,20 \pm 0,94$

Примечание: * – статистически значимое ($p \leq 0,05$) отличие от контрольной группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н. П., Демин Ю. С., Лучник Н. В. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках // Генетика. – 1972. – № 5. – С. 133-141.
2. Кибрик Б. С. и др. Патент на изобретение № 2403050 «Комбинированный лекарственный препарат противотуберкулезного действия с использованием наночастиц серебра». – Зарегистрирован 10 ноября 2010 г.
3. Прокорова И. М., Фомичева А. Н., Ковалева М. И. и др. Пространственная и временная динамика мутагенной активности воды оз. Неро // Биология внутренних вод. – 2008. – № 2. – С. 17-23.
4. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. – Женева. – ВОЗ, 1989. – С. 189.
5. Asha Rani P. V., Low Kah Mun G., Hande M. P. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells // ACS Nano. – 2009. – Vol. 3, № 2. – P. 279-290.
6. de Lima R., Seabra A.B., Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles // J. Applied Toxicology. – 2012. – Vol. 32. – P. 867-879.
7. Doak S. H., Manshian B., Jenkins G. J. S. et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines // Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2012. – Vol. 745, № 1-2. – P. 104-111.
8. Kim S., Ryu D.-Y. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues // J. Applied Toxicology. – 2013. – Vol. 33. – P. 78-89.
9. Kreysberg G. N., Gracheva I. E., Kibrik B. S. et al. Antituberculous effect of silver nanoparticles // J. Phys.: Conf. Ser. 2011, p. 291 012030 doi:10.1088/1742-6596/291/1/012030
10. Nymark P., Catalán J., Suhonen S. et al. Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells // Toxicology. – 2012. – Available online 8 November 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.014>
11. Panda K. K., Achary V. M., Krishnaveni R. et al. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants // Toxicology in Vitro. – 2011. – Vol. 25, № 5. – P. 1097-1105.
12. Seth D., Samrat Roy Choudhury, Saheli Pradhan et al. Nature-inspired novel drug design paradigm using nanosilver: efficacy on multi-drug-resistant clinical isolates of tuberculosis // Cur. Microbiol. – 2011. – Vol. 62, Issue 3. – P. 715-726.
13. Singh N., Manshian B., Jenkins G. J. S. et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30. – P. 3891-3914.
14. Travan A., Marsich E., Donati I. et al. Silver-polysaccharide nanocomposite antimicrobial coatings for methacrylic thermosets // Acta Biomaterialia. – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 337-346.
2. Kibrik B.S. et al. *Kombinirovanny lekarsvenny preparat protivotuberkuleznogo delstviya s ispolzovaniem nanochastits serebra*. [Combined anti-tuberculosis drug with silver nanoparticles]. Patent RF, no. 2403050. Registered on November 10, 2010.
3. Prokhorova I.M., Fomicheva A.N., Kovaleva M.I. et al. Spatial and temporal changes of water mutagenous activity in the lake Nero. *Biologiya Vnutrennikh Vod*, 2008, no. 2, pp. 17-23. (In Russ.)
4. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. (Russ. ed.), Geneva, WHO, 1989, 189 p.
5. Asha Rani P.V., Low Kah Mun G., Hande M.P. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009, vol. 3, no. 2, pp. 279-290.
6. de Lima R., Seabra A.B., Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Applied Toxicology*, 2012, vol. 32, pp. 867-879.
7. Doak S.H., Manshian B., Jenkins G.J.S. et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012, vol. 745, no. 1-2, pp. 104-111.
8. Kim S., Ryu D.-Y. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *J. Applied Toxicology*, 2013, vol. 33, pp. 78-89.
9. Kreysberg G.N., Gracheva I.E., Kibrik B.S. et al. Antituberculous effect of silver nanoparticles. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2011, p. 291 012030 doi:10.1088/1742-6596/291/1/012030
10. Nymark P., Catalán J., Suhonen S. et al. Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, 2012, Available online 8 November 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.014>
11. Panda K.K., Achary V.M., Krishnaveni R. et al. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro*, 2011, vol. 25, no. 5, pp. 1097-1105.
12. Seth D., Samrat Roy Choudhury, Saheli Pradhan et al. Nature-inspired novel drug design paradigm using nanosilver: efficacy on multi-drug-resistant clinical isolates of tuberculosis. *Cur. Microbiol.*, 2011, vol. 62, no. 3, pp. 715-726.
13. Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S. et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 2009, vol. 30, pp. 3891-3914.
14. Travan A., Marsich E., Donati I. et al. Silver-polysaccharide nanocomposite antimicrobial coatings for methacrylic thermosets. *Acta Biomaterialia*, 2011, vol. 7, no. 1, pp. 337-346.

REFERENCES

1. Boshkov N.P., Demin Yu.S., Luchnik N.V. Classification and methods of chromosome aberrations in somatic cells. *Genetika*, 1972, no. 5, pp. 133-141. (In Russ.)

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Кибрик Борис Семенович

Ярославская государственная медицинская академия,
доктор медицинских наук, профессор.

E-mail: kibrik@mail.ru

Поступила 13.10.2014