

ОЦІНКА *IN VIVO* ДНК-УШКОДЖУВАЛЬНОЇ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА РІЗНОГО РОЗМІРУ

С. М. Дибкова
Л. С. Резніченко
Т. Г. Грузіна
З. Р. Ульберг

Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ

E-mail: tgruzina@mail.ru

Показано, що наночастинки золота середнього розміру 20 і 30 нм (на відміну від наночастинок розміром 10 і 45 нм) у модельних системах крові не взаємодіють із сироватковим альбуміном та стійкі до коагуляції. Методом лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (ДНК-комет) встановлено, що за умов одноразового внутрішньовенного введення наночастинок золота розміром 20, 30 та 45 нм не виявляли ДНК-ушкоджувальної дії в клітинах печінки, нирок, кишечника та кісткового мозку щурів. Наночастинки золота 20 нм, на відміну від наночастинок 30 та 45 нм, виявляли ДНК-ушкоджувальну дію в клітинах селезінки. Отримані дані свідчать, що наночастинки золота розміром 30 нм є найбільш біосумісними та біобезпечними.

Ключові слова: наночастинки золота, модельні системи крові, сироватковий альбумін, коагуляція, ДНК-ушкоджувальна дія, метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин, біосумісність, безпека.

Наноматеріали — сучасні перспективні речовини з розміром елементів структури 1–100 нм. На особливу увагу заслуговують наночастинки металів, зокрема золота. Вони набули широкого застосування у медицині та ветеринарії як засоби цільового доставлення лікарських препаратів до органів-мішеней, у фототермічній терапії, діагностичній візуалізації та як компоненти імунобіологічних препаратів [1, 2]. Це зумовлює тісний контакт людини з такими наноматеріалами. Тому оцінка їх потенційного ризику для здоров'я людини та навколишнього середовища є вкрай актуальною.

Добре відомо, що важкі метали можуть мати негативні наслідки впливу на живі організми, передусім на їхній генетичний апарат, спричинюючи первинні ушкодження ДНК [3]. Метали у стані наночастинок мають особливі фізико-хімічні та біологічні властивості, що зумовлено, насамперед, їхніми розмірами.

Застосування препаратів наночастинок золота в діагностичних чи терапевтичних цілях має бути обґрунтованим науковими доказами їх біосумісності та біобезпеки. Це досягається дослідженнями *in vitro* та *in vivo*, які включають вивчення впливу наночастинок на клітини тестових культур, поведінку в модельних системах (протеїни та замітники крові), а також введення в кров'яне русло лабораторних тварин з по-

дальшим оцінюванням дії їх на клітини органів і тканин.

Раніше нами встановлено [4], що в експериментах *in vitro* з використанням тестової культури клітин лінії СНО-К1 синтезовані наночастинки золота розміром 10 і 20 нм виявляли ДНК-ушкоджувальну дію, а у наночастинок 30 та 45 нм подібна дія була відсутня.

Метою цієї роботи було вивчення ДНК-ушкоджувальної дії наночастинок золота різного розміру в експериментах *in vivo*.

Матеріали і методи

Наночастинки золота синтезували, відновлюючи аурат калію ацетоном або етанолом методом Девіса [5]. Вихідною речовиною слугувала золотохлористоводнева кислота $\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, з якої під час взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію. Розмір отриманих наночастинок обчислювали, послуговуючись методом лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) (Zetasizer-3, Malvern Instruments Ltd, Великобританія). У роботі використовували наночастинки золота, середні розміри яких становили 10, 20, 30 та 45 нм у концентрації 38,6 мкг металу/мл.

Для вивчення взаємодії наночастинок золота з модельними протеїнами були проведені експерименти з використанням комерційних протеїнів: сироваткового альбуміну людини

(«Reanal», Угорщина) з ізоелектричною точкою (ІЕТ) — 4,5, соєвого інгібітору трипсину («Reanal», Угорщина) з ІЕТ — 4,9; трипсину («Srofa», Чехія) з ІЕТ — 10,8, α -хімотрипсину («Loba chemie», Австрія) з ІЕТ — 7,9, РНКазу («Loba chemie», Австрія) з ІЕТ — 10,2, папаїну («Loba chemie», Австрія) з ІЕТ — 9,0 та лізоциму («Loba chemie», Австрія) з ІЕТ — 11,0.

Ефективність взаємодії наночастинок золота з протеїнами встановлювали за зміною оптичної густини фільтратів, отриманих під час фільтрування дисперсії наночастинок з розчином протеїну через мембранні фільтри з діаметром пор 0,17 мкм («Владипор», Росія). Величину оптичної густини реєстрували в зеленій області спектру (520–550 нм) за допомогою фотоелектроколориметра ФЕК-М. Результати представляли в одиницях D/D_0 , які відображали відношення оптичних густин фільтратів, модифікованих протеїном, та немодифікованих наночастинок. Оскільки середній розмір наночастинок становив 30 нм, що на порядок нижче середнього діаметра пор використаних фільтрів, вихідний розчин наночастинок вільно проходив через фільтри. Останні не були також бар'єром і для протеїнів. У випадку взаємодії наночастинок з протеїном утворювались агрегати, які осідали на фільтрі. Проби об'ємом 2 мл на дистильованій воді містили 1 частину (38,6 мкг металу/мл) препарату наночастинок золота та 3 частини препарату протеїну певної концентрації. 1 мл інкубаційного середовища наносили на фільтр (фільтрація під вакуумом), промивали 1 мл дистильованої води і фільтрат використовували для колориметрії.

Стійкість до коагуляції наночастинок золота під час контакту з біологічним оточенням визначали за методикою [6]. Як модельні системи крові було обрано комерційні препарати: фізіологічний розчин для ін'єкцій та плазмозамінники «Реополіглюкін» і «Стабізол». Робочі розчини модельних систем містили відповідно 20%, 40%, 60% та 100% комерційних препаратів. Контакт робочих розчинів модельних систем і препаратів наночастинок золота різного розміру проводили у співвідношенні 1:1.

Ступінь коагуляції наночастинок золота в модельних системах після 30 хв інкубації визначали за змінами положення, інтенсивності та форми піка абсорбції в області 500–560 нм. Контролем слугував 50% -й препарат наночастинок золота на дистильованій воді.

В експериментах *in vivo* було використано білих нелінійних самців та самок лабораторних щурів із середньою масою тіла 180–230 г, отриманих із віварію Інституту ек-

периментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Експериментальні тварини перебували на стандартному режимі утримання і були поділені на 4 групи: контрольна група — 3 тварини, яким не вводили наночастинок золота, та 3 піддослідних групи (по 4 тварини кожна), яким одноразово внутрішньовенно (у хвостову вену) вводили 1 мл препарату наночастинок золота розмірами 20, 30 та 45 нм відповідно.

Дослідження проводили згідно з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях». Забій тварин контрольної та піддослідних груп здійснювали через 24 год після введення препарату наночастинок шляхом декапітації з використанням анестетика тіопенталу (з розрахунку 70 мг/кг маси тіла тварини). Після цього видаляли печінку, нирки, селезінку, кістковий мозок та кишечник, які є органами/тканинами-мішенями можливої ДНК-ушкоджувальної дії наночастинок золота. Виділення клітин із тканин та органів щурів виконували за загальноприйнятими методиками [7].

Визначення ДНК-ушкоджувальної дії наночастинок металів здійснювали за такою схемою: отримання гелю-слайду, формування мікропрепарату (імобілізація отриманих клітинних суспензій в агарозі), лізис, лужна денатурація, проведення електрофорезу, нейтралізація/фіксація, фарбування препарату, мікроскопічний аналіз за допомогою флуоресцентного мікроскопа (ЛЮМАМ Р8, Росія). На кожний мікропрепарат аналізували по 100 «ДНК-комет» [7, 8].

Комп'ютерну обробку отриманих цифрових зображень здійснювали за допомогою програми COMET-CASP. При цьому визначали такі параметри «комет»: «довжина хвоста», «% ДНК у хвості», «момент хвоста».

Статистичну обробку результатів проводили по кожній експериментальній точці, порівнюючи показники ушкодження ДНК у дослідній та контрольних групах.

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень було виконано модельні експерименти з використанням препаратів індивідуальних комерційних протеїнів, у тому числі й протеїнів сироватки крові. Показано, що молекули протеїнів, залежно від їхніх фізико-хімічних властивостей, можуть певним чином взаємодіяти з наночастинками золота, модифікувати їхню поверхню і, як наслідок, сприяти агрегації або стабілізації наночастинок (рис. 1).

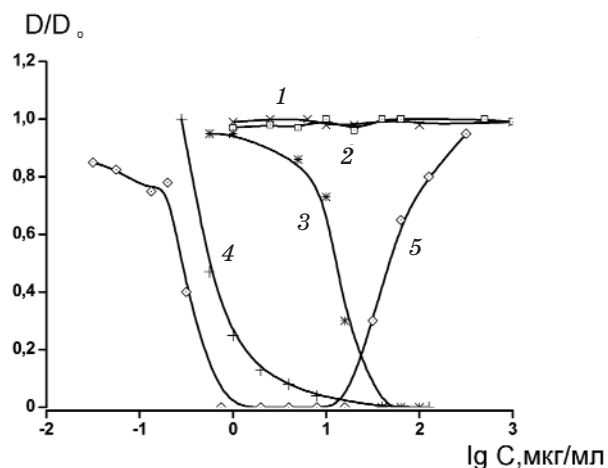


Рис. 1. Залежність агрегативної стійкості наночастинок золота (30 нм) від концентрації протеїнів:

- 1 — сироватковий альбумін людини;
- 2 — соевий інгібітор трипсину;
- 3 — α -хімотрипсин;
- 4 — трипсин;
- 5 — лізоцим.

Криві залежності D/D_0 від концентрації РНК-ази та папаїну подібні до кривої 3;

D/D_0 — відношення оптичної густини фільтратів інтактних та модифікованих протеїном наночастинок золота в зеленій частині спектра;

C — концентрація протеїну в пробі в мкг/мл

Досліджені протеїни належать до різних груп за величиною їх ізоелектричної точки. Як видно з рисунка, сироватковий альбумін людини (крива 1) та соевий інгібітор трипсину (крива 2) під час контакту з препаратом наночастинок золота не спричинювали їх коагуляції. Індиферентність цих протеїнів до наночастинок золота можна пояснити тим, що їх ІЕТ становлять 4,5–4,9 і за умов експерименту (рН 7,4–7,8) їхні молекули, як і наночастинки золота, несуть негативний заряд. Агрегацію наночастинок спричиняли позитивно заряджені протеїни: трипсин, α -хімотрипсин, РНКаза, папаїн та лізоцим з ІЕТ 7,9–11,0 (криві 3–5). Такі результати свідчать про те, що в разі введення наночастинок золота в кров'яне русло лабораторних тварин їх агрегації сироватковими альбумінами не відбудеться.

Наступна серія модельних експериментів була спрямована на вивчення стабільності наночастинок золота у фізіологічному розчині та препаратах комерційних плазмозамінників.

Як показано на рис. 2, наночастинки золота характеризувалися високим рівнем стійкості до коагуляції у вивчених модельних системах крові.

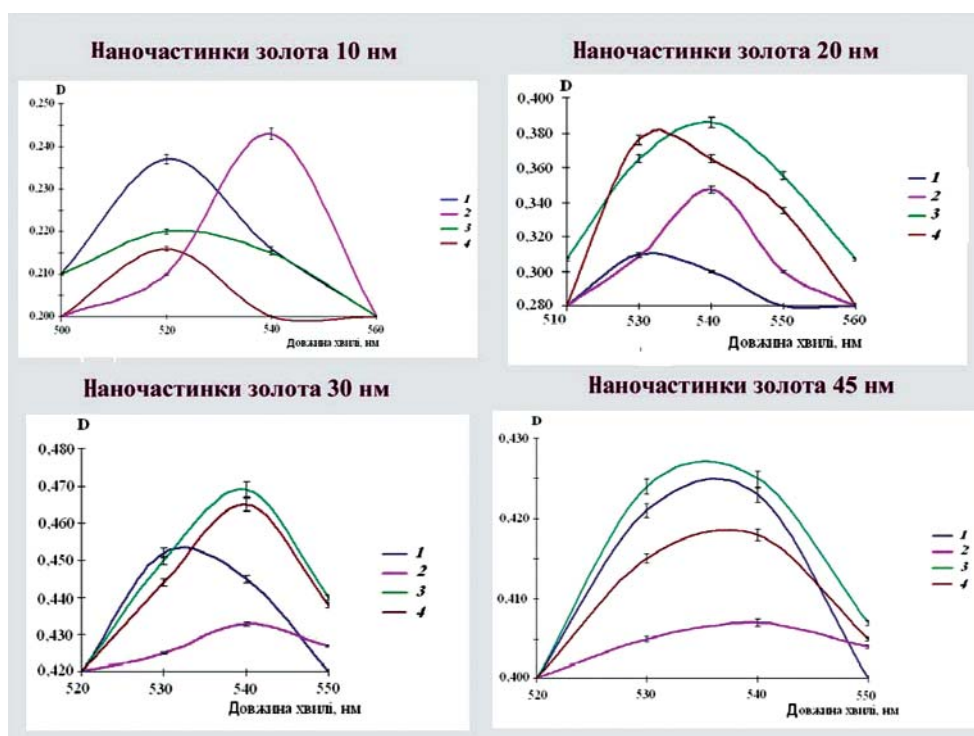


Рис. 2. Стійкість наночастинок золота в модельних системах крові:

- 1 — контроль: препарат наночастинок золота відповідного розміру та вода у співвідношенні 1:1;
- 2 — наночастинок золота : фізіологічний розчин = 1:1;
- 3 — наночастинок золота : плазмозамінник «Стабізол» = 1:1;
- 4 — наночастинок золота : плазмозамінник «Реополіглюкін» = 1:1

Така агрегативна стійкість наночастинок золота у вивчених модельних системах може бути зумовлена адсорбцією високомолекулярних сполук — компонентів модельних систем крові — на поверхні наночастинок. Це приводить до утворення захисної оболонки на їхній поверхні та перешкоджає коагуляції. Встановлено, що наночастинок 20 і 30 нм виявилися найбільш стійкими до коагуляції порівняно з наночастинками 10 нм та 45 нм. Стабільність наночастинок у використаних модельних системах визначається стеричним фактором при взаємодії з протеїновими макромолекулами. Тому ймовірно розмір наночастинок золота розміром 10 та 45 нм є критичним для стабільності біодисперсної системи.

Отже, отримані дані щодо взаємодії наночастинок золота з модельними протеїнами (у тому числі протеїнами крові) та стійкість наночастинок до коагуляції в модельних системах крові дали змогу експериментально обґрунтувати можливість введення наночастинок золота певного розміру в кров'яне русло лабораторних тварин та дослідити їх вплив на

генетичний апарат клітин органів-мішеней.

Методом ДНК-комет у лужних умовах показано, що наночастинок золота 20, 30 та 45 нм не виявляли ДНК-ушкоджувальної дії на клітини печінки, нирок, кишечника, кісткового мозку. Так, показники ДНК-ушкоджувальної активності («% ДНК у хвості») були на рівні аналогічного показника негативного контролю (таблиця). При цьому електрофоретичні зображення типу «ДНК-комет» були відсутні.

У літературі є дані про накопичення золота в селезінці після введення його лабораторним тваринам [9]. Тому вважали за доцільне дослідити ДНК-ушкоджувальну дію наночастинок золота різного розміру в клітинах цього органа. Показано, що наночастинок золота розміром 20 нм спричиняли ушкодження ДНК на рівні 21% за показником «% ДНК у хвості» (за рівня негативного контролю 0,3%). Електрофоретичну картину, що характеризує первинні ушкодження ДНК клітин селезінки, наведено на рис. 3.



Рис. 3. Електрофоретична картина ушкодженої ДНК («ДНК-комета») клітин селезінки наночастинками розміром 20 нм

ДНК-ушкоджувальна дія наночастинок золота

Орган-мішень	«% ДНК у хвості» негативного контролю	«% ДНК у хвості» під час дії наночастинок золота		
		20 нм	30 нм	45 нм
Печінка	0,3	0,4	0,4	0,3
Нирки	0,3	0,5	0,3	0,3
Кістковий мозок	1,1	1,9	1,0	1,1
Кишечник	0,7	0,9	0,8	0,8
Селезінка	0,3	21,2	0,3	0,3

Тимчасом як наночастинки золота розмірами 30 та 45 нм не впливали на ДНК клітин селезінки, показники «% ДНК у хвості» були на рівні негативного контролю. ДНК-ушкоджувальна дія наночастинок золота розміром 20 нм імовірно зумовлена здатністю їх проникати через ядерні пори і спричиняти первинні ушкодження ДНК у вигляді однострижкових розривів.

Таким чином, проведені дослідження *in vivo* засвідчили, що наночастинки золота розміром 30 нм є найбільш біосумісними та біобезпечними і можуть бути рекомендовані для використання в нанобіотехнологіях та наномедицині.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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.
2. Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M. Nanotechnological applications in medicine // Cur. Opin. Biotechnol. — 2007. — V. 18, N 1. — P. 26–30.
3. Черненко В. Ю., Лукаш Л. Л., Мацевич Л. Л. і др. Применение метода микроэлектрофореза ДНК для оценки генотоксических эффектов мутагенов в культуре гемопоэтических клеток человека // Цитология и генетика. — 2004. — № 1. — С. 31–35.
4. Дибкова С. М., Романько М. Є., Грузіна Т. Г. та ін. Визначення ушкоджень ДНК наночастинками металів, перспективних для біотехнології // Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 3. — С. 80–86.
5. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / Под. ред. А. В. Перцова. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — 128 с.
6. Практическое руководство к лабораторным работам по коллоидной химии / Под. ред. В. В. Горбачук, В. А. Загуменнова, В. А. Сироткина, Д. А. Суслова, Е. В. Никитина. — Казань: Казанский гос. ун-т, 2001. — 83 с.
7. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Метод. рекомендации. — М., 2006. — 27 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.
9. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы: Синтез, свойства, биомедицинское применение. — М.: Наука, 2008. — 319 с.

Колектив авторів висловлює подяку канд. фіз.-мат. наук, ст. наук. співр. Горчеву Василю Федоровичу за допомогу у проведенні лазерно-кореляційної спектроскопії.

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

**ОЦЕНКА *IN VIVO*
ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА
РАЗНОГО РАЗМЕРА**

*С. Н. Дыбкова
Л. С. Резниченко
Т. Г. Грузина
З. Р. Ульберг*

Институт биocolлоидной химии
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев

E-mail: tguzina@mail.ru

Показано, что наночастицы золота среднего размера 20 и 30 нм (в отличие от наночастиц размером 10 и 45 нм) в модельных системах крови не взаимодействуют с сывороточным альбумином и устойчивы к коагуляции. Методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет) установлено, что при условии однократного внутривенного введения наночастицы золота размером 20, 30 и 45 нм не проявляли ДНК-повреждающего действия в клетках печени, почек, кишечника и костного мозга крыс. Наночастицы золота 20 нм, в отличие от наночастиц 30 и 45 нм, оказывали подобное действие в клетках селезенки. Полученные данные свидетельствуют о том, что наночастицы золота размером 30 нм наиболее биосовместимы и биобезопасны.

Ключевые слова: наночастицы золота, модельные системы крови, сывороточный альбумин, коагуляция, ДНК-повреждающее действие, метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток, биосовместимость, биобезопасность.

**ASSESSMENT OF THE *IN VIVO*
DNA-DAMAGING ACTION
OF THE GOLD NANOPARTICLES
OF DIFFERENT SIZES**

*S. M. Dybkova
L. S. Rieznichenko
T. G. Gruzina
Z. R. Ulberg*

F. D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal
Chemistry of National Academie of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: tguzina@mail.ru

It is shown that gold nanoparticles which average size is 20 and 30 nm (in contrast to 10 and 45 nm nanoparticles) do not interact with blood serum albumin and are resistant to coagulation in model systems. By the method of alkaline gel-electrophoresis of single eukaryotic cells («comet-assay») it was shown that under single intravenous injection the gold nanoparticles of 20, 30 and 45 nm in size didn't show DNA-damaging action in the cells of liver, kidneys, intestines and bone marrow of rats. 20 nm gold nanoparticles in contrast to 30 and 45 nm nanoparticles showed DNA-damaging action in spleen. These data suggest that 30 nm gold nanoparticles are the most biocompatible and biosafety.

Key words: gold nanoparticles, blood models system, serum albumin, coagulation, DNA-damage action, method of alkaline gel electrophoresis of single cells, biocompatibility, biosafety.