

## НАНОТЕХНОЛОГІЇ

© Дибкова С. М.

УДК 577. 151:579. 864. 1

**Дибкова С. М.**

## МЕТОД ДНК-КОМЕТ В ОЦІНЦІ БЕЗПЕЧНОСТІ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ТА МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

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

Робота виконана в рамках проекту «Розроблення та створення високоефективного протианемійного препарату нового покоління на основі наночастинок заліза для профілактики і лікування залізодефіцитної анемії та анемії хронічних захворювань» цільової комплексної науково-технічної програми «Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнологій», державний реєстраційний номер 0112U003421.

**Вступ.** Дослідження генетичних ушкоджень внаслідок дії тих чи інших речовин є ключовою ланкою визначення ризику нових фармацевтичних агентів на основі наноматеріалів біотехнологічного та медичного призначення, оскільки первинні ДНК-ушкодження можуть ініціювати злоякісне переродження клітин [7]. Основна перевага методу ДНК-комет полягає у можливості визначення пошкоджень на рівні ізольованих еукаріотичних клітин різного походження, а також у оцінці інтегральної цілісності геному. Метод є надзвичайно чутливим, експресним та високопрогностичним.

**Мета дослідження** полягала у вивченні можливості використання методу лужного гелелектрофорезу ізольованих клітин (методу ДНК-комет в лужних умовах) для оцінки безпечності наночастинок металів біотехнологічного та медичного призначення.

**Об'єкт і методи досліджень.** Об'єктами досліджень слугували наночастинок металів:

1. Наночастинок золота сферичної форми розмірами 10, 20, 30, 40, 45 та 57 нм (концентрація 38,6 мкг/мл по металу).

2. Наночастинок срібла сферичної форми розмірами 30 та 50 нм (концентрація 86,4 мкг/мл по металу).

3. Наночастинок заліза (FeO) сферичної форми розмірами 40 та 100 нм (концентрація 10 мг/мл за металом) та оксиду заліза – розмірами 14, 18, 23 та 77 нм (концентрація 21,0 мкг/мл за металом).

4. Наночастинок вісмуту сферичної форми розміром 40 нм та кубічної форми розміром 20 нм (концентрація 2,4 мг/мл за металом).

5. Наночастинок міді сферичної форми розміром 20 нм (концентрація 8 мг/мл за металом), 40 та 70 нм (концентрація 2,7 мг/мл за металом).

6. Наночастинок гексаціаноферрату кобальту сферичної форми розміром 5 нм (концентрація 2,5 мг/мл по металу).

7. Наночастинок марганцю сферичної форми розміром 50 нм (концентрація 2,8 мг/мл по металу).

8. Наночастинок цинку сферичної форми розміром 20 нм (концентрація 2,4 мг/мл по металу).

Наночастинок металів (нанопрепарати) отримували конденсаційним методом шляхом відновлення солей відповідних металів [3]

Оцінку генотоксичності нанопрепаратів *in vitro* методом «ДНК-комет» здійснювали із залученням наступних ліній культур клітин: гістіоцитарної лімфоми людини (лінія U937 із колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України); китайського хом'ячка (лінія CHO-K1 колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів (Київ, Україна); гепатокарциноми (лінія HEP-2); перещеплюваної культури фібробластів мишей (лінія L929); перещеплюваної культури тестикул поросят (лінія ПТП) з колекції Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного та сперматозоїдів бика.

Оцінку генотоксичності нанопрепаратів *in vivo* методом «ДНК-комет» проводили із залученням дрібних лабораторних гризунів – статевозрілих мишей та щурів. Кожна контрольна і піддослідна група складалася з 5 тварин. Введення тестованих нанопрепаратів здійснювали трьома шляхами: внутрішньовенно (для забезпечення системного впливу) та перорально і інтраперитонеально (для випадків перспектив застосування нанопрепаратів саме таким шляхом). Дослідження проводили відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» [2]. Виділення клітин із тканин та органів лабораторних тварин здійснювали за загальноприйнятими методиками [5].

Аналіз генотоксичності нанопрепаратів методом лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин включав наступні етапи [6,8]:

1. Обробка нанопрепаратом клітин *in vitro* або *in vivo* введення лабораторним тваринам нанопрепарату. Тестову культуру клітин обробляли: нанопрепаратом протягом 3-24 годин, хімічною сполукою позитивного контролю (24 години) та розчинником негативного контролю (24 години). Як негативний контроль в експериментах *in vivo* використовували тварин, яким вводили розчинник в об'ємі, еквівалентному об'єму нанопрепарату.

2. Отримання ізольованих еукаріотичних клітин.

3. Імобілізація ізольованих еукаріотичних клітин в агарозі (отримання мікропрепарату).

4. Лізис еукаріотичних клітин, іммобілізованих в агарозі.

5. Лужна денатурація ДНК при pH > 13.

6. Розділення денатурованої ДНК гель-електрофорезом.

7. Нейтралізація/ фіксація мікропрепарату.

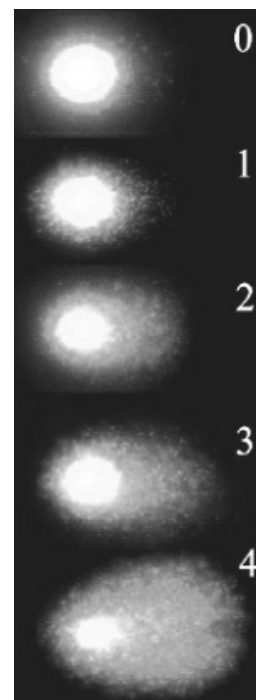
8. Візуалізація ДНК шляхом фарбування мікропрепарату флуоресцентними барвниками з послідуною мікроскопією. Мікропрепарати аналізували на флуоресцентному мікроскопі при збільшенні 200-400X. На кожен мікропрепарат аналізували не менше 100 «ДНК-комет».

При візуальному аналізі «ДНК-комети» розподіляли на п'ять умовних типів з відповідним для кожного типу числом від 0 до 4 (рис.).

Ступінь пошкодження ДНК виражали як індекс «ДНК-комет» ( $I_{\text{ДНК}}$ ), обчислений за формулою:

$$I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma, \text{ де}$$

$n_0-n_4$  – число «ДНК-комет» кожного типу,  $\Sigma$  – сума «ДНК-комет».



**Рис. Таблиця «ДНК-комет» із різним рівнем пошкодження ДНК.**

**Таблиця 1**

### Оцінка *in vitro* генотоксичності наночастинок металів біотехнологічного та медичного призначення

Тип наночастинок металу	Тестова культура клітин	Висновок про генотоксичність
Сферичні наночастинки срібла 20 нм	U937, CHO-K1	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки срібла 30 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП, сперматозоїди бика	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки срібла 50 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки золота 10 нм	U937, CHO-K1	Генотоксичні
Сферичні наночастинки золота 20 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП, сперматозоїди бика	Генотоксичні
Сферичні наночастинки золота 30 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП, сперматозоїди бика	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки золота 40 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП, сперматозоїди бика	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки золота 57 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП, сперматозоїди бика	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки заліза (Fe <sup>0</sup> ) 40 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП, сперматозоїди бика	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки заліза (Fe <sup>0</sup> ) 100 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки заліза (оксид) 14 нм	U937, CHO-K1	Генотоксичні
Сферичні наночастинки заліза (оксид) 18 нм	U937, CHO-K1	Генотоксичні
Сферичні наночастинки заліза (оксид) 23 нм	U937, CHO-K1	Генотоксичні
Сферичні наночастинки заліза (оксид) 77 нм	U937, CHO-K1	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки вісмуту 40 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929,	Не генотоксичні
Кубічні наночастинки вісмуту 20 нм	U937, CHO-K1	Генотоксичні
Сферичні наночастинки міді 20 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП, сперматозоїди бика	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки міді 40 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, ПТП	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки міді 70 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, ПТП,	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки гексаціаноферрату кобальту 5 нм	U937, CHO-K1	Генотоксичні
Сферичні наночастинки марганцю 50 нм	U937, CHO-K1	Не генотоксичні
Сферичні наночастинки цинку 20 нм	U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП	Генотоксичні

**Таблиця 2**  
**Оцінка *in vivo* генотоксичності наночастинок металів біотехнологічного та медичного призначення**

Тип наночастинок металу	Спосіб введення наночастинок металу	Висновок про генотоксичність
Сферичні наночастинок срібла 30 нм	Інтраперитонеальне, миші лінії BALB/c, 28,35 мг/кг	Не генотоксичні
Сферичні наночастинок золота 7нм	Інтраперитонеальне, щури лінії Vistar, 193 мкг/кг	Генотоксичні в клітинах селезінки, головного мозку, легень, нирок, печінки, серця
Сферичні наночастинок золота 17 нм	Інтраперитонеальне, щури лінії Vistar, 193 мкг/кг	Генотоксичні в клітинах селезінки, головного мозку, легень, нирок, печінки, серця
Сферичні наночастинок золота 20нм	Внутрішньовенне, щури лінії Vistar, 193 мкг/кг	Генотоксичні в клітинах селезінки
Сферичні наночастинок золота 30нм	Внутрішньовенне, щури лінії Vistar, 193 мкг/кг	Не генотоксичні
Сферичні наночастинок золота 45нм	Внутрішньовенне, щури лінії Vistar, 193 мкг/кг	Не генотоксичні
Сферичні наночастинок золота 57нм	Інтраперитонеальне, щури лінії Vistar, 193 мкг/кг	Не генотоксичні
Сферичні наночастинок заліза (Fe <sup>0</sup> ) 40 нм	Пероральне, миші лінії BALB/c, 5г/кг	Не генотоксичні

Статистичну оцінку результатів проводили, порівнюючи показники пошкодження ДНК в піддослідній та контрольній групах. Дані двох повторностей поєднували і визначали середній показник групи. Критеріями негативного результату (відсутності генотоксичної дії) були статистично достовірні низькі (близькі до негативного контролю) показники генотоксичності. Критеріями позитивного результату були статистично достовірні високі (на 2-3 порядки вищі ніж у негативного контролю) показники пошкодження ДНК.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Генотоксичність – це показник, який відображає рівень потенційної небезпеки певної речовини по відношенню до генетичного матеріалу клітини. Можливі наступні первинні ДНК-пошкодження: ДНК-аддукти, алкільована ДНК, а також одно- та двонитчасті розриви. Найчастіше трапляються однострижкові розриви ДНК. Тому, фіксуючи наявність таких розривів, можна робити висновки про генотоксичні властивості речовини.

Суть методу “ДНК-комет” полягає у реєстрації відмінностей в електрофоретичній рухливості у постійному електричному полі. нативної ДНК і фрагментів ДНК лізованих клітин. У випадку використання методу лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин для оцінки безпечності наночастинок металів лужна обробка препаратів лізованих клітин викликає розплетення дуплекса ДНК та дозволяє окремим ниткам незалежно мігрувати в електричному полі. При цьому ДНК мігрує до аноду та формує

електрофоретичний слід, що нагадує «хвіст комети», параметри якого залежать від рівня пошкодження піддослідної ДНК.

Нами вперше показана можливість застосування методу ДНК-комет в лужних умовах для оцінки безпеки наночастинок металів біотехнологічного та медичного призначення [1].

У таблиці 1 наведений перелік наночастинок металів різної природи та різних розмірів, безпечність яких протестована *in vitro* за допомогою методу ДНК-комет в лужних умовах.

З наведених результатів тестувань *in vitro* генотоксичними виявилися наступні наночастинок: золота – розмірами 10, 20 нм; оксиду заліза – 14, 18, 23 нм; вісмуту кубічної форми розміром 20 нм; гексаціаноферрату кобальту – 5 нм; цинку – 20 нм. Такі наночастинок є потенційно небезпечними для генетичного апарату еукаріотичної клітини, а тому не можуть бути рекомендованими до застосування в біотехнології та медицині.

В таблиці 2 наведений перелік наночастинок металів, безпечність яких оцінена *in vivo* за допомогою методу ДНК-комет в лужних умовах.

З наведених в таблиці 2 результатів генотоксичності виявилися наночастинок золота розмірами 7, 17, 20 нм.

Аналізуючи результати тестувань генотоксичності наночастинок металів *in vitro* та *in vivo* можна зробити висновок про високий рівень їх кореляції: не генотоксичними виявилися наночастинок золота розміру 30, 45, 57 нм, наночастинок срібла 30 нм і наночастинок заліза (Fe<sup>0</sup>) 40 нм. Такі наночастинок можуть бути рекомендовані до біотехнологічного та медичного застосування.

Здійснене тестування безпечності наночастинок металів за показником генотоксичності в експериментах *in vitro* та *in vivo* дало змогу рекомендувати метод ДНК-комет в лужних умовах для оцінки безпеки наночастинок металів. Цей метод включений в систему методів Методичних рекомендацій «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів» Державного експертного центру МОЗ України [8].

**Висновки.** Метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет в лужних умовах) *in vitro* та *in vivo* є високопрогностичним та адекватним для оцінки безпечності наночастинок металів біотехнологічного та медичного призначення.

**Перспективи подальших досліджень.** Виконані дослідження щодо генотоксичності наночастинок металів відкривають перспективи подальшого удосконалення системи оцінки безпечності нового класу речовин – наноматеріалів для потреб біотехнології та медицини.

## Література

1. Дибкова С. М. Визначення ушкоджень ДНК наночастинами металів, перспективних для біотехнології / С. М. Дибкова, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна [та ін.] // Біотехнологія . – 2009. – Т. 2, № 3. – С. 80-85.
2. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – № 8, Т. 1. – С. 142–145.
3. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / Под ред. А. В. Перцова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132 с.
4. Методичні рекомендації «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів». – Київ, 2013. – 108 с.
5. Методичні рекомендації «Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних клітин». – Київ, 2010. – 24 с.
6. Патент України на корисну модель МПК (2009.01) G01N33/00 G01N33/48. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів / С. М. Дибкова, О. В. Годовський, М. Є. Романько [та ін.] // Заявл. 10. 09. 2009; Опубл. 25.03.2010; Бюл. № 6. – 10 с.
7. Чекман І. С. Наногенотоксикологія: вплив наночастинок на клітину / І. С. Чекман, М. О. Говоруха, А. М. Дорошенко // Український медичний часопис. – 2011. – № 1 (81). – с. 30-35.
8. Didenko V. Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols / V. Didenko. – Humana Press, 2002. – 279 p.

УДК 577. 151:579. 864. 1

### МЕТОД ДНК-КОМЕТ В ОЦІНЦІ БЕЗПЕЧНОСТІ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ТА МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Дибкова С. М.

**Резюме.** Дослідження генетичних ушкоджень внаслідок дії тих чи інших речовин є ключовою ланкою визначення ризику нових субстанцій на основі наноматеріалів біотехнологічного та медичного призначення. Метою дослідження було вивчення можливості використання методу лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (методу ДНК-комет в лужних умовах) для оцінки безпечності наночастинок металів біотехнологічного та медичного призначення. Здійснене тестування безпечності наночастинок металів за показником генотоксичності в експериментах *in vitro* та *in vivo* дало змогу рекомендувати метод ДНК-комет в лужних умовах для оцінки безпеки наночастинок металів. Цей метод включений в систему методів Методичних рекомендацій «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів» Державного експертного центру МОЗ України.

**Ключові слова:** генотоксичність, наночастинки металів, метод ДНК-комет в лужних умовах.

УДК 577. 151:579. 864. 1

### МЕТОД ДНК-КОМЕТ В ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО И МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Дыбкова С. Н.

**Резюме.** Исследование генетических повреждений в результате действия тех или иных веществ является ключевым звеном определения риска новых субстанций на основе наноматериалов биотехнологического и медицинского назначения. Целью исследования было изучение возможности использования метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет в щелочных условиях) для оценки безопасности наночастиц металлов биотехнологического и медицинского назначения. Тестирование генотоксичности наночастиц металлов *in vitro* и *in vivo* позволило рекомендовать метод ДНК-комет в щелочных условиях для оценки безопасности наночастиц металлов. Этот метод включен в систему методов Методических рекомендаций «Оценка безопасности лекарственных нанопрепаратов» Государственного экспертного центра МЗ Украины.

**Ключевые слова:** генотоксичность, наночастицы металлов, метод ДНК-комет в щелочных условиях.

UDC 577. 151:579. 864. 1

### Comet Assay in Assessing the Safety of Metal Nanoparticles for Biotechnology and Medicine

Dybko S. M.

**Abstract.** Genotoxicity is property of chemical, physical and biological factors exert adverse effects on the genetic structure of a living organism. The study of genetic damage as a result of certain substances is a key element determining the risk of new pharmaceutical agents based nanomaterials biotech and medical devices, as the primary DNA damage can trigger malignant degeneration of cells. In recent years, the new techniques that allow you to record DNA damage are developed. However, these methods do not have sufficient sensitivity and specificity, which is so necessary to monitor a wide range of primary DNA damage. The main advantage of the Comet assay is the ability to determine the level of damage in isolated eukaryotic cells of different origins, as well as an integrated assessment of the integrity of the genome. The method is extremely sensitive and fast. The aim of the study was to study the possibility of using the method of alkaline gel electrophoresis of isolated cells (Comet assay under alkaline conditions) to assess the safety of metal nanoparticles for biotechnology and medicine. The Comet assay is to register the differences in electrophoretic mobility in a constant electric field native DNA and fragments of DNA of lysed cells. It results in relaxation of DNA macromolecules and formation of fragments. When

using the method of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess safety of nanoparticles of metals alkaline treatment drugs lysed cells is destruction of duplex of DNA and allows individual threads regardless migrate in an electric field. In this case, the DNA migrates to the anode and forms electrophoretic trace that resembles "comet tail", whose properties depend on the experimental DNA damage. We first demonstrated the possibility of applying the Comet assay under alkaline conditions to assess the safety of metal nanoparticles for biotechnology and medicine. Evaluation of metal nanoparticles genotoxicity *in vitro* by Comet assay under alkaline conditions was carried out with the involvement of cells culture lines: U937, CHO-K1, HEP-2, L929, PTP and sperm of bull. Evaluation of metal nanoparticles genotoxicity *in vivo* by Comet assay under alkaline conditions was performed involving of laboratory animals – mice and rats. Identified genotoxic properties of gold nanoparticles with size 7, 10, 17 and 20 nm, iron oxide nanoparticles with size 14, 18 and 23 nm, cobalt nanoparticles with size 5 nm, nanoparticles of zinc with size 20 nm and bismuth cubic nanoparticles with size 20 nm. Were not genotoxic gold nanoparticles with size 30, 40 and 57 nm, silver nanoparticles with size 30 and 50 nm, iron nanoparticles with size 40, 77 and 100 nm, nanoparticles with size copper 20, 40 and 70 nm. Analyzing the results of genotoxicity testing metal nanoparticles *in vitro* and *in vivo* can be concluded about the high level it's correlation: not genotoxic gold nanoparticles with size of 30-57 nm, silver nanoparticles with size 30 nm and iron nanoparticles (Fe<sub>0</sub>) with size 40 nm. These nanoparticles can be recommended for biotechnological and medical applications. Realized testing the safety of metal nanoparticles of in terms of genotoxicity *in vitro* and *in vivo* made it possible to recommend Comet assay under alkaline conditions to assess the safety of metal nanoparticles. This method is included in the system of methods Methodical recommendations "Safety assessment of medical nanopreparations" of the State Expert Center of the Ministry of Health of Ukraine. Comet assay under alkaline conditions *in vitro* and *in vivo* is adequate for evaluation of safety of metal nanoparticles for biotechnology and medicine.

**Keywords:** genotoxicity, metal nanoparticles, Comet assay under alkaline conditions.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 17. 06. 2014 р.