

УДК 577.539.199

Генотоксические эффекты наночастиц серебра при воздействии на млекопитающих *in vivo*

Л.К. Рамайя¹, К.Г. Орджоникидзе¹, Е.М. Егорова², *А.В. Рубанович¹¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3² НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8² Научно-производственная компания «Наномет», Москва, Долгоруковская ул., 33/2

*E-mail: rubanovich@vigg.ru

РЕФЕРАТ Приводятся данные по токсическим и генотоксическим эффектам водного раствора наночастиц серебра (НЧС) при инъекции лабораторным мышам линии BALB/c *in vivo*. Действие НЧС сравнивалось с эффектами водных растворов нитрата серебра и анионного ПАВ (АОТ), используемого в качестве стабилизатора наночастиц. Показано, что токсическое действие изученных растворов падает в ряду: НЧС > АОТ >> AgNO₃. Регрессионный анализ зависимости гибели мышей от концентрации показал, что полумлетальные дозы (ЛД_{50/30}) растворов НЧС и АОТ равны $(2.7 \pm 0.7) \cdot 10^{-3}$ г-ион/л и 29.9 ± 4.8 мМ, или (0.30 ± 0.07) гAg/л и 13.3 ± 2.1 гAg/л соответственно. Для регистрации генетических эффектов при концентрациях $\frac{1}{2}$ ЛД₅₀ были использованы два теста: частота появления аномальных головок спермиев (АГС) и степень повреждения ДНК лимфоцитов и других клеток селезенки, выявляемая методом ДНК-комет. Оба теста не обнаружили дополнительные генетические эффекты НЧС по сравнению с АОТ.

Ключевые слова: наночастицы серебра, мыши, летальное действие, половые клетки, первичные повреждения ДНК.

Список сокращений: НЧС – наночастицы серебра, АОТ – аэрозоль-ОТ, ЛД – летальное действие, АГС – аномальные головки спермиев, ПАВ – поверхностно-активное вещество.

ВВЕДЕНИЕ

Применение продуктов нанотехнологий в настоящее время расширяется во всех областях жизнедеятельности человека. В связи с этим возникла необходимость изучения биологических эффектов различных наночастиц и нанокompозитных материалов, прежде всего действия их на организм человека и животных. Главная задача здесь состоит в определении степени токсичности наночастиц для человека и, соответственно, потенциального риска использования наночастиц и препаратов на их основе. Наибольший интерес представляют исследования биологического действия металлических наночастиц, т.к. они наиболее часто служат объектом прикладных разработок в различных областях промышленности и медицины. За последнее десятилетие накоплены данные как о положительном (лечебный эффект), так и об отрицательном (стимуляция возникновения различных заболеваний) воздействии наночастиц металлов на живые организмы [1, 2]. Одним из наиболее популярных объектов исследований являются наночастицы серебра, поскольку они активно используются в последнее время в производстве различных товаров широкого потребления – пищевых добавок, одежды, бытовой техники, игрушек и др. Работы проводятся главным образом на бактериях с целью определения антимикробной активности наночастиц [3–5] или на клеточных культурах *in vitro*

(напр., [6]), а также имеются сведения о действии наночастиц на фибробласты человека [7]. Данные о действии наночастиц серебра и других металлов на высшие организмы весьма немногочисленны. До настоящего времени практически отсутствуют сведения о биологическом и генетическом эффектах наночастиц серебра при поступлении их в организм млекопитающих.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В настоящей работе изучались токсические и генотоксические эффекты наночастиц серебра (НЧС) при воздействии на мышей *in vivo*.

Наночастицы серебра были получены методом биохимического синтеза в обратных мицеллах [8, 9] путем восстановления ионов металла биологически активным веществом из группы флавоноидов. Синтез проводился в тройной системе: водный раствор соли серебра/АОТ/изооктан, где АОТ – анионное поверхностно-активное вещество (ПАВ), используемое в качестве стабилизатора наночастиц. Метод позволяет получать наночастицы серебра и других металлов, стабильные на воздухе в мицеллярном растворе в течение длительного времени; более подробные сведения о методе и свойствах наночастиц серебра даны в ряде опубликованных ранее работ (напр., [10–12]). Из полученного таким способом мицеллярного раствора

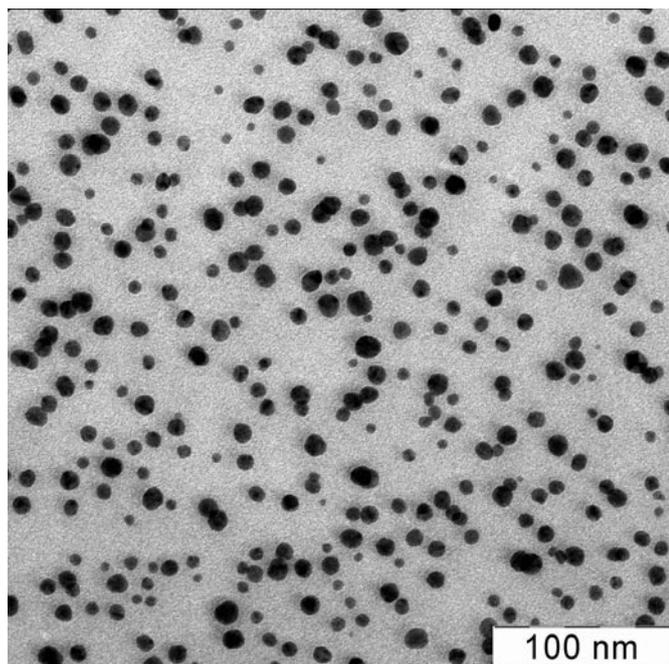


Рис. 1. Электронная микрофотография наночастиц серебра

наночастиц готовят их водный раствор по разработанной ранее стандартной методике [13]. В водном растворе наночастицы существуют в оболочке – бислое из молекул АОТ, внешняя поверхность которого несет отрицательный заряд вследствие диссоциации ионогенных групп этого ПАВ. Кроме наночастиц, в растворе присутствует также избыток АОТ; концентрация АОТ в водном растворе определяется по стандартной методике (ГОСТ Р-51211-98). В исследованиях биологического действия водных растворов наночастиц это позволяет ставить контрольные эксперименты по определению действия этого ПАВ в соответствующей концентрации. Как установлено в проводившихся ранее исследованиях, водные растворы наночастиц серебра обладают выраженной антибактериальной и противовирусной активностью [14], а также сильным токсическим действием на плазмодий слизевого гриба *Physarum polycephalum* [10]. В экспериментах на плазмодии было показано, что токсическое действие наночастиц существенно превышает такое для водных растворов АОТ и ионов серебра в эквивалентной концентрации.

Электронная микрофотография наночастиц, использованных в настоящей работе, приведена на рис. 1. Частицы сферические, средний размер для выборки из 600 частиц составляет 9 ± 6 нм.

Начальная концентрация НЧС в водном растворе (далее – препарат НЧС) составляла 0.54 г/л. Действие препарата НЧС сравнивалось с действием АОТ и ионов Ag^+ в эквивалентных концентрациях. Для этого использовали водные растворы АОТ (начальная концентрация 6.7 г/л) и азотнокислого серебра (начальная концентрация 0.85 г/л).

Опыты проводили на лабораторных мышах (самцах и самках) линии BALB/c в возрасте 3–4 мес. с массой тела 30–35 г. Для установления процента выживаемости мышей и дозы препарата, вызывающей 50 % гибели, животные были разделены на четыре группы по 16 голов в каждой. Мышам 1-й группы вводили однократно внутрибрюшинно раствор НЧС в дистиллированной воде по 0.2 мл. Концентрации НЧС в растворе варьировали путем разбавления исходного препарата в 0; 1.5; 2; 3; 5; 7; 10 и 100 раз. Соответственно концентрации НЧС в растворе составляли: 0.54; 0.36; 0.27; 0.18; 0.11; 0.077; 0.054 и 0.0054 г/л.

Во 2-й группе мышам вводили водный раствор АОТ в концентрациях, соответствующих тем, которые были инъецированы животным 1-й группы. Для ряда концентраций НЧС, указанных выше, эквивалентные концентрации АОТ составляли: 6.7; 4.5; 3.4; 2.2; 1.34; 0.96; 0.67 и 0.067 г/л.

Мышам 3-й группы вводили водный раствор $AgNO_3$ в концентрациях 5, 0.5 и 0.05 мМ, соответствующих разведениям препарата НЧС в 0; 10 и 100 раз.

4-я группа составляла биологический контроль, им вводили по 0.2 мл дистиллированной воды.

Определение летального действия вводимых растворов производилось по стандартной методике. Все инъецированные мыши в течение 30 сут содержались в виварии, и ежедневно велся учет павших животных. Наблюдение за физическим состоянием животных показало, что в первые часы после инъекции у мышей первой группы при двух наибольших дозах (0.54 и 0.36 г/л) НЧС наступало снижение двигательной активности, возникали судороги и в дальнейшем паралич задних конечностей. Смерть наступала через 12–24 ч после введения препарата. Можно предположить, что причиной смерти является воздействие нанопрепарата на нервную ткань; вскрытие погибших животных не показало видимых нарушений в тканях или кровоизлияний во внутренних органах. У остальных мышей этой группы, при меньшей концентрации препарата, признаки общего угнетения и внешнего проявления токсикоза в первые часы после инъекции были менее выражены, и состояние этих мышей практически не отличалось от контроля. Гибель мышей в этой группе наступала и при более низких концентрациях, однако длительность жизни павших животных была несколько больше (9–10 дней), чем при высоких дозах (1–3 дня).

В группе 2 смерть мышей отмечалась только в трех случаях, при достаточно высоких концентрациях АОТ (6.7; 4.5; 3.4 г/л). Более низкие концентрации АОТ не вызывали гибели животных. В группах 3 и 4 гибели мышей в течение 30 сут не наблюдалось.

Зависимости гибели мышей от концентрации растворов представлены на рис. 2.

Из данных рис. 2 следует, что выживаемость животных монотонно падала с увеличением концентрации введенного раствора НЧС за исключением наименьшей концентрации (0.0054 г/л – разведение в 100 раз). Регрессионный анализ данных по выживаемости мышей позволил оценить полумлетальные дозы ($LD_{50/30}$) для исследованных препаратов. $LD_{50/30}$ для препарата НЧС оказалась равной 0.30 ± 0.07 г/л при концентрации АОТ, равной 3.7 г/л (разведение в 1.8 раза). Экстраполяция данных показывает, что $LD_{50/30}$ для АОТ без наночастиц равна 13.3 ± 2.1 г/л.

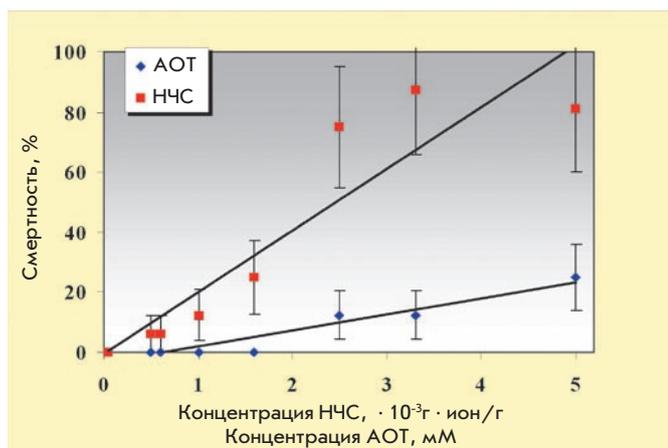


Рис. 2. Смертность мышей при инъекции препарата НЧС и раствора АОТ в зависимости от концентрации

Таким образом, можно считать, что токсический эффект наночастиц серебра в 3.6 раз превышает эффект АОТ. Отсутствие летального эффекта в группе мышей, которым вводили нитрат серебра, показывает также, что из трех исследованных здесь агентов ионы Ag^+ обладают наименее выраженным токсическим действием. Иначе говоря, токсическое действие падает в ряду: НЧС > АОТ >> $AgNO_3$.

Для изучения действия препарата НЧС на половые клетки млекопитающих был выбран показатель частоты появления аномальных головок спермиев (АГС) через 21 день после введения препарата. Этот метод позволяет определить повреждающий эффект препарата в половых клетках на ранней премеитической стадии гаметогенеза, т.е. в пахитене первого мейотического деления. Считается, что появление АГС обуславливается либо крупными хромосомными aberrациями, такими как транслокации, либо точечными мутациями и мелкими делециями, либо они являются следствием соматических повреждений. Ранее было показано, что воздействие на самцов мышей некоторых физических (ионизирующая радиация, СВЧ) и химических факторов (циклофосфамид, хлористый кадмий, хлористый цинк и др.) вызывало повышение частоты АГС, сопровождающееся снижением массы семенников, увеличением доимплантационных потерь в эмбриогенезе и снижением уровня эффективных скрещиваний при действии на премеитические клетки самцов мышей. Эти факты указывают не только на мутагенный, но также на цитолитический и/или цитотоксический эффект воздействия [16]. Метод определения частоты АГС достаточно прост, не требует большого количества животных и может использоваться для первоначального определения мутагенного эффекта препарата [17].

На рис. 3а представлены данные по частоте АГС при введении самцам мышей растворов АОТ и НЧС в концентрации 2.2 г/л и 0.18 г/л соответственно (разведение исходных препаратов в 3 раза). Приведенные на рис. 3а результаты говорят о более высоком (примерно в 1.5 раза)

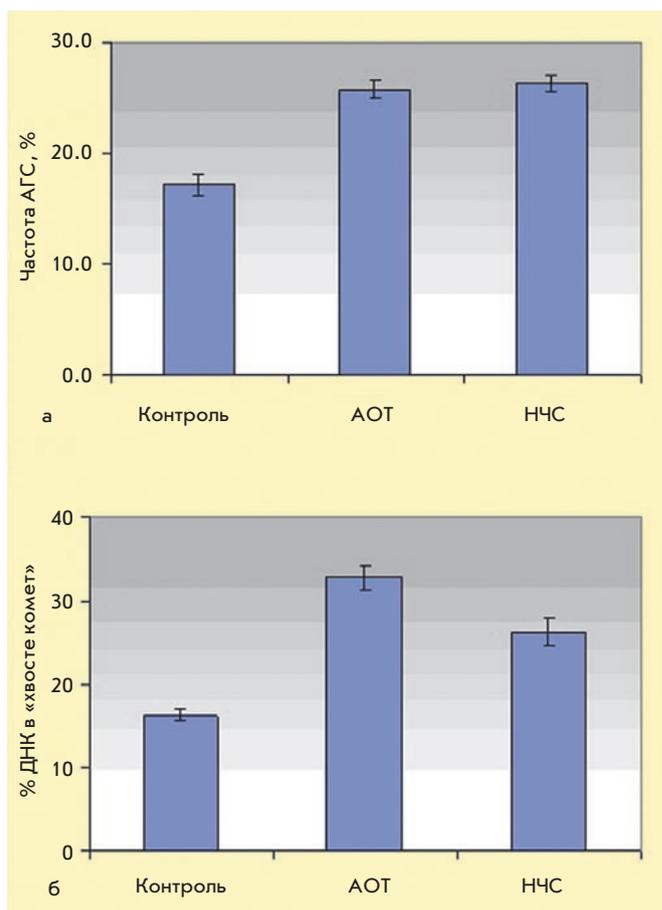


Рис. 3. Частота АГС (а) и доля ДНК вышедшей из клетки в «хвост кометы» (б) при введении самцам мышей растворов АОТ и НЧС в концентрации 2.2 г/л и 0.18 г/л соответственно (разведение исходных препаратов в 3 раза)

повреждающем эффекте НЧС и АОТ по сравнению с контролем. При этом различия между эффектами АОТ и НЧС практически отсутствуют.

Параллельно на тех же животных был проведен анализ первичных ДНК-повреждений методом нейтрального гель-электрофореза единичных клеток (ДНК-комет). ДНК-повреждения (в виде одиночных и двойных разрывов) являются индикаторами таких процессов, как окислительный стресс и клеточная гибель. Метод ДНК-комет позволяет в определенной степени регистрировать факт возможного индуцированного мутагенеза по относительному количеству поврежденной ДНК.

Анализ проводился по стандартной методике [18]. В качестве органа-мишени была выбрана селезенка как орган, несущий специфические функции в системе кровообращения. Накопленные в белой и красной пульпе лимфоциты, моноциты и макрофаги могут быть повреждены наночастицами. Метод основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле ДНК и возможных фрагментов ДНК лизированных клеток, заключенных в агарозный гель.

С помощью этого метода определялась степень повреждения ДНК после введения препарата НЧС и раствора АОТ в концентрации 0.17 и 2.2 г/л соответственно. Не обнаружено снижения процента ДНК в «хвосте комет» вплоть до 48 ч после инъекции. На рис. 3б представлены усредненные данные по 14 мышам и 7 временным точкам (3, 5, 7, 9, 12, 24 и 48 ч). Рисунок демонстрирует, что АОТ оказывает повреждающее действие на ДНК, превышающее соответствующие эффекты для НЧС. Доля ДНК, вышедшей в «хвосте кометы», составила $32.8 \pm 1.5 \%$ для АОТ против $26.3 \pm 1.7 \%$ для НЧС. Оба показателя достоверно превышали контрольный уровень ($16.2 \pm 0.7 \%$).

ВЫВОДЫ

В данной работе впервые показано, что наночастицы серебра, полученные методом биохимического синтеза, оказывают летальное воздействие на организм млекопитающих при инъекции *in vivo*. Летальный эффект наночастиц примерно в 4 раза превышает таковой для АОТ (см. рис. 2), в то время как при введении эквивалентных количеств ионов серебра выживаемость животных была 100 %-ной.

Анализ результатов показывает, что наночастицы серебра, полученные методом биохимического синтеза, при инъекции мышам *in vivo* оказывают летальное воздействие. Летальный эффект наночастиц заметно превышает таковой для АОТ, в то время как ионы серебра вообще не вызывают гибели животных. Отсюда следует, что водная дисперсия наночастиц серебра оказывает на организм мле-

копитающих существенно более выраженное токсическое действие, чем поверхностно-активное вещество, входящее в состав препарата НЧС. Такой же вывод был сделан по результатам тестирования биологических эффектов препарата НЧС на плазмодии *Physoarum polycephalum* [10] и (для сравнения НЧС и ионов серебра) на клетках *E.coli* [9]. В исследованиях генотоксического действия наночастиц серебра по тестам АГС и ДНК-комет не удалось обнаружить дополнительных генетических эффектов НЧС по сравнению с АОТ. Следует отметить, что применение растворов НЧС, видимо, должно быть индивидуально нормировано с учетом чувствительности биологического объекта.

Настоящая публикация содержит результаты предварительного анализа генотоксических эффектов наночастиц серебра при воздействии на млекопитающих *in vivo*. В дальнейших исследованиях предполагается выяснить генетический эффект наночастиц металлов у млекопитающих и растений. ●

Работа поддержана договором о выполнении НИР № 8418-16/09 с ООО «Наномет». Авторы благодарят чл.-корр. РАН, проф. Н.К. Янковского (ИОГЕН РАН) за обсуждение результатов и В.С. Лысенкову, старшего лаборанта лаборатории экологической генетики ИОГЕН РАН за техническую помощь в выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. // *Journal of Nanobiotechnology*. 2004. 2:3doi:10.1186/1477-3155-2-3.
- Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. // *Environmental health perspectives*. 2005. V. 113. № 7. P. 823.
- Лопанов А.Н. Серебро. СПб.: Arat, 2005. 399 с.
- Neal A.L. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? // *Ecotoxicology*. 2008. V. 17. P. 362.
- Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. // *J. Colloid Interface Sci*. 2004. V. 275. P. 177.
- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J. et al. In Vitro Cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. // *Toxicological sciences*. 2005.V. 88. Iss. 2. P. 412.
- Hui Yang, Chao Liu, Danfeng Yang, Yuashan Zhang and Zhuge Xi. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. // *J. Appl. Toxicol*. 2009. V. 29. P. 69–78.
- Егорова Е.М., Ревина А.А., Кондратьева В.С. Способ получения наноструктурных металлических частиц. Патент РФ №2147487.
- Egorova E.M., Revina A.A. // *Colloids and Surfaces A*. 2000. V. 168. P. 87.
- Егорова Е.М., Ревина А.А. // *Коллоидный журн*. 2002. Т. 64. С. 334.
- Егорова Е.М., Ревина А.А., Ростовщикова Т.Н., Киселева О.И. // *Вестник МГУ. Сер.2. Химия*. 2001. Т. 42. С. 332.
- Егорова Е.М., Ревина А.А. // *Журнал физической химии*. 2003. Т. 77. С. 1683.
- Егорова Е.М., Ревина А.А., Румянцев Б.В. и др. // *Журнал прикладной химии*. 2002. Т. 75. С. 1620.
- Егорова Е.М. Наночастицы металлов в растворах: биохимический синтез, свойства и применение. // *Нанотехника*. 2004. № 1. С. 15.
- Матвеева Н.Б., Егорова Е.М., Бейлина С.И., Леднев В.В. Хемотаксис как способ тестирования биологических эффектов наноразмерных частиц серебра. // *Биофизика*. 2006. Т. 51. № 3. С. 859.
- М.Д. Померанцева, Л.К. Рамайя, Г.А. Вилкина. Сравнительная эффективность использования разных тестов для определения мутагенности некоторых факторов у млекопитающих. Сообщение II. Частота аномальных головок спермиев у мышей, подвергшихся воздействию различных факторов. // *Генетика*. 1980. Т. XVI, № 8. С. 1397–1403.
- W.R. Bruce, R. Furrer, A.J. Wyrobec. Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular X-irradiation. // *Mutat.Res*. 1974. V. 23. № 3. P. 381.
- P.L. Olive and J.P.Banath. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵Ird. // *Int.J.Radiat.Biol*. 1993. V. 64. № 4. P. 349–358.