

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 576.591

НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА: МУТАГЕН, АНТИМУТАГЕН, КОМУТАГЕН?

© 2017 г. С. Т. Захидов*, Н. М. Муджири*, **, В. М. Рудой***,
О. В. Дементьева***, А. А. Макаров****, И. А. Зеленина*, Т. Л. Маршак**, @

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т,
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

**Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
119334 Москва, ул. Вавилова, 26

***Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
119071 Москва, Ленинский просп., 31

****Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”,
101000 Москва, ул. Мясницкая, 20

@E-mail: 4361.idb@bk.ru

Поступила в редакцию 12.04.2016 г.

С помощью метода учета мейотических микроядер изучено действие ультрамалых наночастиц золота (НЧЗ), в том числе в сочетании с алкилирующим мутагеном дипином на генетические структуры мужских половых клеток у мышей. Впервые показано, что НЧЗ в зависимости от выбранных условий эксперимента способны проявлять мутагенную, антимутагенную и комутагенную активности.

DOI: 10.7868/S0002332917030122

Нанотехнологии обладают большими ресурсами для ускоренного становления и развития новых направлений в естествознании, промышленном производстве, сельском хозяйстве, медицине. При этом, однако, нельзя упускать из виду, что материалы, создаваемые на базе нанотехнологического синтеза, могут обуславливать генетические и биологические риски, создавать новые потенциальные угрозы наследственному и репродуктивному здоровью человека. Поскольку такая вероятность весьма высока, в последние годы большое внимание уделяется исследованиям, направленным на изучение вредных токсических действий наноматериалов.

Одним из привилегированных объектов исследования в настоящее время являются наночастицы золота (НЧЗ), обладающие уникальными физико-химическими свойствами, реакционной активностью, способностью легко преодолевать сложную систему тканевых и клеточных барьеров, внутриклеточных преград и фильтров, вступать во взаимодействие с различными молекулярными системами в клетке. По мнению ряда исследователей, НЧЗ с успехом могут быть использованы как транспортеры для адресной доставки лекарств, биологически и генетически активных веществ к местам назначения, а также как эффективное лечебное средство при онкологических заболеваниях (Cai *et al.*, 2008; Alkilany, Mur-

phy, 2010; Dreaden *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Yah, 2013). Однако прежде чем НЧЗ найдут широкое применение в клинической онкологии и других областях медицины, необходимо располагать убедительной доказательной базой отсутствия у них собственной способности к канцерогенезу, механизм которого во многих случаях тесно связан с мутационными изменениями в генах и хромосомах.

В литературе имеются пока еще немногочисленные данные, свидетельствующие о мутагенности и генотоксичности этих уникальных наночастиц (Tsoli *et al.*, 2005; Vecchio *et al.*, 2012; Balansky *et al.*, 2013; Di Bucchianico *et al.*, 2014; Евдокимов, 2015а, б). В то же время показано (Singh *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2012), что НЧЗ не способны индуцировать сколько-нибудь значительные изменения в структуре генома. Отметим, что большинство этих исследований выполнено на клетках соматических тканей.

Цель работы — изучение однократного и многократного (четырёхкратного) воздействия ультрамалых НЧЗ, в том числе и в сочетании с алкилирующим мутагеном дипином, на хромосомный материал мужских половых клеток мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез коллоидного раствора (гидрозоля) золота, использованного нами, был выполнен методом Даффа (Duff *et al.*, 1993), основанным на восстановлении AuCl_4^- хлоридом тетрагидроксиметилфосфония в водном растворе щелочи (NaOH). По данным динамического рассеяния света и просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения средний размер частиц Au равнялся ~ 2.5 нм, их концентрация составляла $\sim 1 \times 10^{15}$ мл $^{-1}$.

Опыты проводили на половозрелых самцах мышей-гибридов CBA \times C57BL/6 в возрасте 2–3 мес. Животные, разделенные на контрольные и подопытные группы, содержались в стандартных условиях вивария (температура воздуха 18–22°C, световой день 12 ч), получали пищу и воду *ad libitum*. Отрицательным контролем служили мыши ($n = 5$), которым в течение 4 сут вводили по 0.2 мл физиологического раствора, а положительным контролем ($n = 4$) — животные, подвергшиеся однократному воздействию модельного мутагена дипина в генетически активной дозе 30 мг/кг. Мышам из подопытных групп однократно или многократно (ежедневно в течение 4 сут) внутрибрюшинно инъецировали по 0.2 мл НЧЗ (возраст ~ 7 мес.). Через 1 ч после последних инъекций НЧЗ части животных вводили дипин в генетически активной дозе 30 мг/кг. Для каждой подопытной группы $n = 4$.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. “Об утверждении правил лабораторной практики” и этических норм, изложенных в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинской декларации (2000).

Мышей из контрольных и подопытных групп забивали путем дислокации шейных позвонков на 14-е сут после завершения последних инъекций. Извлекали семенники, из которых выделяли конгломераты семенных канальцев, помещали их в 7%-ный раствор поливинилпирролидона (ПВП), максимально разделяли их, затем переносили на предметное стекло в каплю ПВП, покрывали полиэтиленовой пленкой и готовили давленные препараты. После охлаждения в парах жидкого азота, удаляли полиэтиленовые пленки с поверхности, полученные препараты высушивали на воздухе и фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина (рН 7.2) в течение 10–15 мин. Фиксированные препараты отмывали в проточной, а затем в дистиллированной воде, высушивали на воздухе и окрашивали методом Фельгена.

Регистрация потенциальных хромосомных мутаций велась в популяции округлых сперматид, т.е. клеток, которые исходя из данных о кинетике сперматогенеза у мышей (Meistrich, 1986) в мо-

мент воздействий находились преимущественно на стадиях прелептотены—лептотены профазы I мейоза, являющихся генетически одними из наиболее чувствительных стадий развития мужских половых клеток. Для количественной оценки частоты встречаемости генетически аномальных округлых сперматид был выбран метод учета мейотических микроядер. От каждого животного подсчитывали от 2000 до 5000 округлых сперматид. Частоту встречаемости aberrантных ранних постмейотических клеток выражали в промилле.

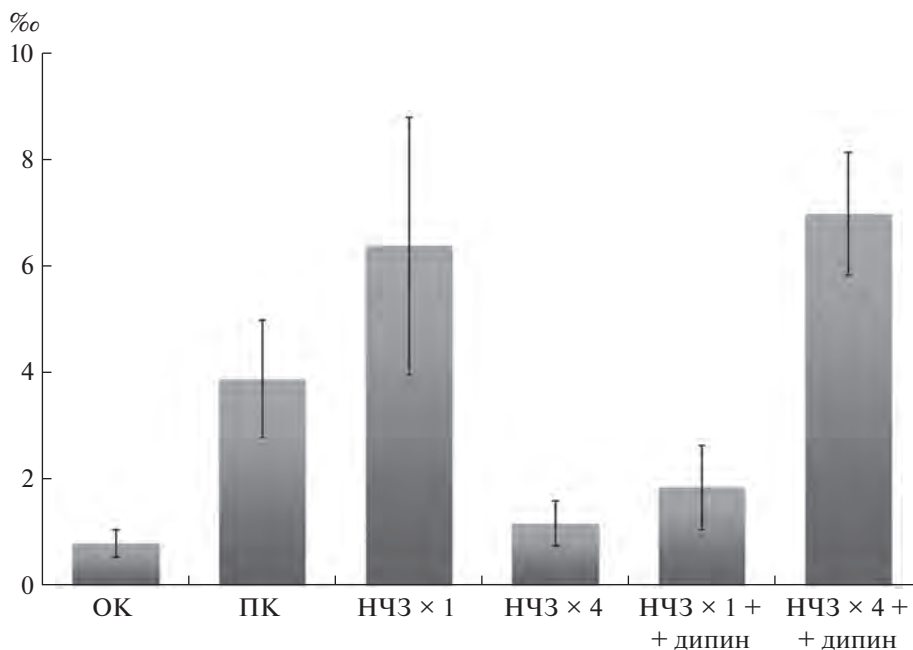
При статистической обработке и сравнительном анализе данных использовался пакет SPSS. Для определения значимых различий средних показателей и дисперсий в различных группах мышей применялся критерий Стьюдента для двух независимых выборок в предположении равных и неравных вариаций в группах. Для определения значимых различий вариации в группах использовался критерий Ливиня для равенства дисперсий (Тюрин, Макаров, 1998).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты цитогенетического анализа популяции округлых сперматид у мышей контрольных и подопытных групп суммированы на рисунке (рисунок). В положительном контроле (дипин) средняя частота встречаемости округлых сперматид с микроядрами заметно возрастала по сравнению с отрицательным контролем (физиологический раствор); различия были статистически значимы при $p = 0.032$ (рисунок). В варианте опыта с однократным воздействием НЧЗ частота выхода мутантных округлых сперматид достоверно увеличивалась по сравнению с отрицательным контролем при $p = 0.0515$. Напротив, по сравнению с положительным контролем значимые различия средних не были установлены при $p = 0.382$; обнаружению возможных значимых различий средних в данном случае препятствовала высокая дисперсия в каждой из изученных групп животных. Нередко сильные колебания мутационных проявлений могут быть обусловлены как неравномерностью распределения испытуемого вещества в цитоплазме клетки, так и известной несинхронностью физиологических процессов у мышей в составе выборки, что сказывается на статистических оценках (Рапопорт, 1989).

После четырехкратного воздействия НЧЗ частота образования округлых сперматид с микроядрами достоверно не отличалась от таковой в отрицательном контроле при $p = 0.447$, т.е. в данном варианте опыта НЧЗ не влияли на спонтанную частоту мейотических микроядерных aberrаций.

В семенниках у мышей, которым однократно вводили НЧЗ, а через 1 ч инъецировали дипин, частота встречаемости округлых сперматид с



Частоты встречаемости округлых сперматид с микроядрами в семенниках контрольных и подопытных мышей. ОК — отрицательный контроль; ПК — положительный контроль; НЧЗ × 1, НЧЗ × 4 — соответственно однократное и четырехкратное воздействия наночастиц золота. Вертикальные линии — стандартные отклонения.

микроядрами оказалась существенно меньше, чем в положительном контроле и в варианте опыта только с однократным воздействием НЧЗ (рисунк). При этом по сравнению с положительным контролем различия оказались статистически недостоверны при $p = 0.186$.

Наоборот, после четырехкратного воздействия НЧЗ в сочетании с дипином в гонадах подопытных самцов мышей наблюдалось почти семикратное увеличение числа генетически аномальных ранних постмейотических клеток. По сравнению с частотами, обнаруженными в отрицательном контроле и в варианте опыта только с четырехкратным воздействием НЧЗ, различия оказались статистически высокодостоверными (соответственно при $p = 0.001$ и 0.003).

Итак, проведенные нами пилотные опыты по испытанию НЧЗ на генетическую активность дали весьма неожиданные и, на первый взгляд, парадоксальные результаты. Действительно, однократное воздействие НЧЗ на сперматогенные клетки мышей значительно увеличивало частоту выхода мейотических микроядерных аберраций в популяции округлых сперматид, в то время как мутагенная эффективность четырехкратного воздействия НЧЗ фактически оказалась “нулевой”. Несовпадение генетической активности НЧЗ при однократном и четырехкратном воздействиях, по видимому, связано с тем, что в сложной высокостероидной клеточной среде суммарное кумулятивное действие НЧЗ могло кардинально изме-

нить ферментативный баланс в клетке, например сильно активизировать работу ферментов репарации и/или детоксикации. Это автоматически должно было повлечь за собой обесценивание мутагенного потенциала золотых наночастиц. Важно отметить, что ранее (Захидов и др., 2012) многократное воздействие НЧЗ на сперматогенез мышей приводило к достоверному (правда, обратному) увеличению числа хромосомных аномалий в популяции округлых сперматид. По нашему мнению, расхождение результатов опытов, скорее всего, обусловлено двумя обстоятельствами: использованием “разновозрастных” НЧЗ и/или проведением опытов на фоне аномально жаркого московского лета 2010 г., которое могло решительно повлиять на экологическую стабильность генетического материала половых клеток. То, что температурный фактор окружающей среды имеет значение, показано во многих генетических и биологических исследованиях (Астауров, 1979; Струнников, 1987; Рапопорт, 1991).

Из наших опытов также следует, что после однократного воздействия НЧЗ в сочетании с алкилирующим мутагеном дипином, суммарный мутагенный эффект этих двух далеко неродственных химических агентов сильно снижался по сравнению с мутагенной активностью каждого из них по отдельности. К сожалению, пока нет данных, позволяющих получить правильный ответ на вопрос о причине такого комбинированного эффекта действия НЧЗ и дипина. Однако можно