

УДК 613.31:628.162-078

ЦИТОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА, ИНДУЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА РАЗНЫХ РАЗМЕРОВ НА КУЛЬТУРЕ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

*Статья в виде доклада была заслушана на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути ее снижения".

Ф.И. Ингель,
Е.К. Кривцова,
Н.А. Юрцева,
О.Н. Савостикова,
А.В. Алексеева

ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им А.Н. Сысина» Минздрава РФ, 119121, Москва, Российская Федерация

Высокая бактерицидная активность наночастиц серебра (НЧС) предполагает возможность их использования при подготовке питьевой воды. В данной работе на лимфоцитах периферической крови человека, культивированных в микроядерном тесте с цитохалазином В, изучены эффекты нестабильности генома в диапазоне концентраций 0,005-5,0 мг/л наночастиц серебра (НЧС) размером $14,3 \pm 0,2$ нм (Ag14) и $100,0 \pm 11,0$ нм (Ag100), стабилизированных арабийской камедью, и - для сравнения - в том же диапазоне концентраций Ag_2SO_4 (ионов серебра). Все вещества суспендированы или растворены в питьевой воде.

Результаты показали, что НЧС обладают генотоксическим и цитотоксическим действием, что делает их непригодными для улучшения качества питьевой воды. Эффекты нестабильности генома, определенные по частоте делящихся клеток с микроядрами и нуклеоплазменными мостами, также как торможение митотической активности и снижение пролиферативной активности и увеличение продолжительности клеточного цикла уменьшались в ряду $Ag_2SO_4 \gg Ag100 \gg Ag14$. Однако повышение частоты асимметричных 3-ядерных клеток, обусловленное индукцией анеуплоидии, оказалось наиболее характерным для частиц Ag14.

Ключевые слова: наночастицы серебра, микроядерный тест с цитохалазином В, клетки крови человека, нестабильность генома, анеуплоидия

Введение. Наночастицы серебра (НЧС) становятся все более востребованными в электронных приборах и биодатчиках, при производстве красителей и тканей для пошива одежды, в пищевой промышленности, при производстве косметики, широкого спектра медицинских изделий [1]. Высокая бактерицидная активность НЧС предполагает широкую перспективу их использования при подготовке питьевой воды [2, 3]. Однако на линиях клеток кожи, печени, легких, мозга, сосудов и половых клеток животных, а также *in vivo* в соответствующих тканях лабораторных грызунов и не-

которых морских организмов были выявлены цитотоксические эффекты, индуцированные НЧС [4, 12]. Поэтому для использования НЧС в водоподготовке должны быть проведены дополнительные исследования.

Считается, что основой цито- и генотоксического действия наночастиц, в том числе, НЧС является эндцитоз, когда НЧС могут терять в виде ионов серебра до 90 % своей массы [1, 12, 13, 14, 15]. На следующих стадиях развития эффектов НЧС выделяют образование свободных радикалов, которые считают основным индуктором дисфункции

Ингель Фаина Исааковна (Ingel Faina Isaakovna), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетического мониторинга ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им А.Н. Сысина» Минздрава РФ, 119121, Москва, fainaingel@mail.ru

Кривцова Елена Константиновна (Krivtsova Elena Konstantinovna), научный сотрудник лаборатории генетического мониторинга ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им А.Н. Сысина» Минздрава РФ, 119121, Москва, e_k_krivtsova@mail.ru;

Юрцева Надежда Александровна (Urtseva Nadejda Aleksandrovna), ведущий инженер лаборатории генетического мониторинга ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им А.Н. Сысина» Минздрава РФ, 119121, Москва, urtseva@mail.ru

Савостикова Ольга Николаевна (Savosticova Olga Nikolaevna), ведущий научный сотрудник лаборатории гигиены питьевого водоснабжения и санитарной охраны водоемов, кандидат медицинских наук ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им А.Н. Сысина» Минздрава РФ, 119121, Москва, savon05@yandex.ru

Алексеева Анна Венедиктовна (Aleksееva Anna Venediktovna), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории гигиены питьевого водоснабжения и санитарной охраны водоемов ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им А.Н. Сысина» Минздрава РФ, 119121, Москва, al.anna@list.ru

митохондрий и истощения системы синтеза АТФ [12]. При этом особо отмечается, что НЧС – в отличие от других НЧ близкого размера (например, нанозолота) – не обнаруживаются внутри клеточного ядра, что, тем не менее, в эксперименте сочетается с более высокой генотоксической активностью НЧС по сравнению с НЧ золота близких размеров [7].

Среди процессов, происходящих в присутствии НЧС в клеточном ядре, основную роль отводят образованию двунитевых разрывов ДНК и хромосомных перестроек, что сопровождается задержкой клеточного цикла на стадии S/G2 и индукцией апоптоза [1, 7, 8, 12, 16, 17]. Следует отметить, что большинство указанных эффектов обнаружено на перевиваемых клеточных линиях опухолей животных и человека, о которых известно, что их чувствительность к воздействию всегда значительно выше, чем у первичных культур [18, 19, 20]. В то же время, все еще очень мало публикаций об эффектах НЧС *in vivo* и экспериментах на первичных культурах нормальных клеток человека – системе, удобной для скрининга эффектов нестабильности генома [7, 8, 16, 20].

Принимая во внимание принципиальную возможность использования НЧС для улучшения качества питьевой воды и, следовательно, необходимость надежной оценки безопасности НЧС, в том числе – генетической.

Целью настоящей работы является анализ эффектов нестабильности генома, индуцированных НЧС разного размера на первичной культуре крови человека *ex vivo*. Поскольку идеальным инструментом для изучения всего комплекса возможных цитогенетических изменений стабильности генома *in vitro* и *ex vivo* является цитомный анализ в микроядерном тесте на клетках, культивируемых в условиях цитокинетического блока, именно этот подход использован в данной работе [21, 22, 23, 24, 25].

Материалы и методы исследования. Цитомный анализ в микроядерном тесте с цитокинетическим блоком разработан и рекомендован для тестирования на наличие генотоксической активности отдельных химических соединений и их смесей, включая лекарственные препараты [17, 26, 27]. Специальные исследования были предприняты для оценки возможности его применения для НЧ различных материалов [20, 28]. Использование расширенного протокола цитомного анализа, позволяющего определять комплекс основных эффектов нестабильности генома (генетические повреждения, симметрию распределения генетического материала между дочерними ядрами, ускорение либо замедление клеточного цикла, пролиферативную активность и апоптоз) сделало этот тест одним из универсальных инструментов для выявления эффектов нестабильности генома и изучения механизмов их образования [22, 28, 29].

В работе использовали коммерческие препараты сферических частиц серебра типа КНД-С-К размерами $14,3 \pm 0,2$ нм (Ag14) и $100,0 \pm 11,0$ нм (Ag100), стабилизированных аравийской камедью (1:7 по массе). Частицы синтезированы по технологии Multi Mode SPM и предоставлены для экспериментов ООО НПП «Сентоза Факторинг НП» (Россия) [30].

Эффекты НЧС сравнивали с действием сульфата серебра (Ag_2SO_4 , ТУ 6-09-370374), который в использованных концентрациях растворим (растворимость в воде 0,79 г/100 г H_2O при 20°C) и диссоциирован на ионы.

НЧС разного размера и сульфат серебра вносили в стерилизованную кипячением и охлажденную до комнатной температуры дистиллированную воду (ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия») так, что маточные суспензии содержали 50 мг/л серебра. Их разводили той же водой до концентраций 0,005–5,0 мг/л и использовали в экспериментах. В качестве дополнительного контроля использовали аравийскую камедь в концентрации 5 мг/л, что заведомо превышало ее суммарное содержание в оболочке НЧС при их максимальной концентрации. В экспериментах использовали только свежеприготовленные суспензии и растворы.

Для постановки культур использовали цельную венозную кровь молодого здорового некурящего донора-мужчины. Среду для культивирования клеток готовили, используя собственный подход, разработанный ранее [29]. Цитохалазин В до конечной концентрации 6 мкг/мл вносили в культуру на 44 часу от начала постановки; клетки культивировали 72 часа (37 °C) [23, 24]. Клетки фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты, цитогенетические препараты окрашивали по Гимзе-Романовскому, шифровали и анализировали под микроскопом (10 100, масляная иммерсия) [21, 28, 29]. Для анализа выбирали только те поля зрения, на которых все клетки лежали отдельно, каждая из интерфазных клеток имела четкую цитоплазму и в ней можно было точно определить количество ядер, обнаружить МЯ, НПМ и другие ядерные аномалии. Поля зрения, не соответствовавшие этим критериям, пропускали. Эксперимент повторяли дважды.

Статистический анализ для оценки значимости различий с контролями проводили с использованием критерия χ^2 . Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Наличие дозовых зависимостей определяли с использованием регрессионного анализа. Статистический анализ проводили с использованием стандартного пакета программ Statistica 10.0 Statsoft.

Результаты и обсуждение. Под нестабильностью генома принято понимать совокупность механизмов и изменений, трансформирующих стабильный геном нормальной клетки в нестабильный, харак-

терный для клеток опухоли [31]. Классический вариант цитомного анализа в микроядерном тесте предусматривает оценку эффектов нестабильности генома по частоте генетических повреждений (МЯ и/или НПМ) только в 2-ядерных клетках, а также разные варианты гибели клеток [20, 23, 24]. Поэтому, прежде всего, мы провели анализ именно 2-ядерных клеток (рис. 1А).

Как видно, в двуядерных клетках значимые генотоксические эффекты наблюдали только при действии высоких концентраций Ag100 и сульфата серебра. При учете повреждений во всех делящихся клетках, генотоксические эффекты также наблюдали только при действии максимальной концентрации Ag100 и 0,05 мг/л сульфата серебра (рис. 1Б).

Поскольку (ср. данные на рис. 1А и 1Б) суммарные частоты делящихся клеток с МЯ и НПМ в наших экспериментах были существенно выше, чем частоты двуядерных клеток с повреждениями для всех видов воздействия (картина, которую неоднократно наблюдали ранее в культурах крови, экспонированных различными веществами, а также при обследовании разных групп населения), мы обоснованно ожидали обнаружить накопление генетических повреждений в клетках, прошедших за время культивирования более одного клеточного цикла (делящихся ускоренно, рис.1В) [22, 32]. Однако среди таких клеток, особенно при малых уровнях экспозиции, мы обнаружили снижение частоты клеток с повреждениями, индуцированных НЧС вне зависимости от размера.

Анализ частот клеток с МЯ и НПМ показал, что сульфат серебра (в нашем случае ионы серебра) во всем диапазоне изученных концентраций не изменяли частоты делящихся клеток с НПМ, в то время как в присутствии Ag14 наблюдалось резкое снижение частоты таких клеток относительно контроля (рис. 2).

В культурах, экспонированных к сульфату серебра, при низких уровнях воздействия доминировали клетки с НПМ, частота которых с увеличением концентрации существенно снижалась. Похожая динамика, но с пиком на концентрации, соответствующей ПДК серебра в воде, наблюдалась для Ag100. В то же время, для Ag14 значимое превышение частоты клеток с НПМ над клетками с МЯ наблюдалось только на высоких концентрациях. Среди клеток второго митоза (преимущественно 4-ядерных) в присутствии сульфата серебра частоты клеток с НПМ превышали частоты клеток с МЯ уже при экспозиции ниже ПДК, а затем этот эффект снижался в динамике, близкой к обнаруженной в 2-ядерных клетках. В присутствии Ag100 наоборот – в пределах ПДК для серебра частоты клеток с МЯ были выше, чем клеток с НПМ, и частота последних доминировала только при более высоких концентрациях. В присутствии Ag14 во всем диапазоне концентраций, за исключением

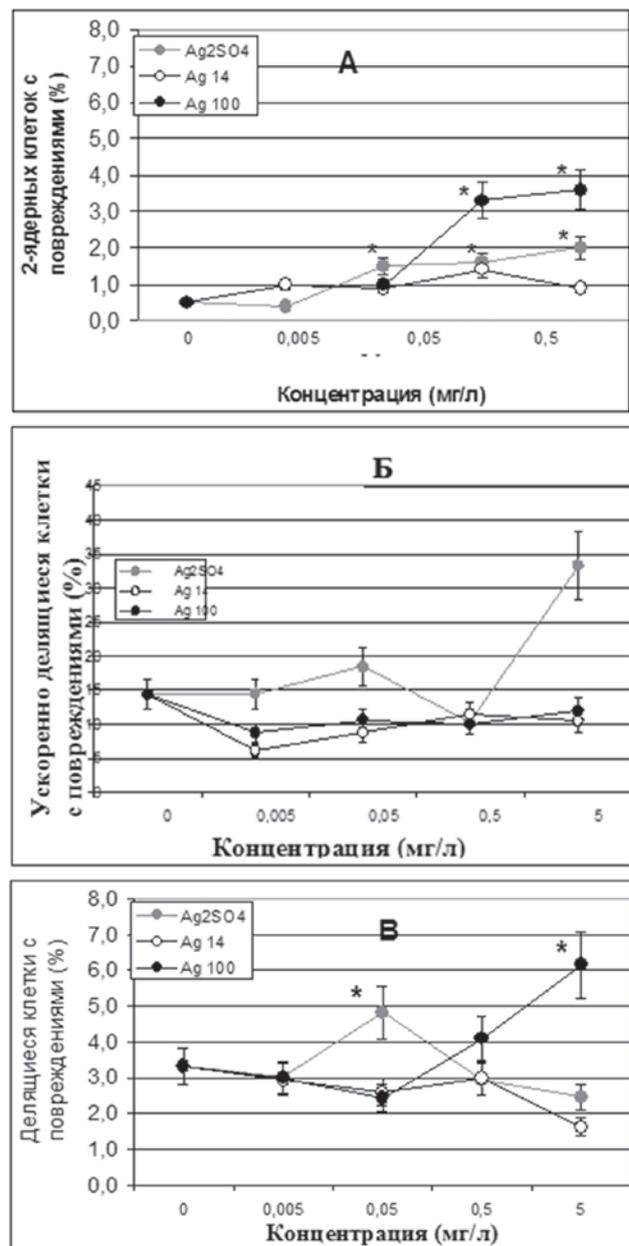


Рис. 1. Частоты разных типов клеток с генетическими повреждениями (микроядрами и нуклеоплазменными мостами): двуядерные клетки (А), ускоренно делящиеся клетки (В), все делящиеся клетки

максимальной, частоты клеток с МЯ были значительно выше частот клеток с НПМ. Учет всех делящихся клеток показал близкую динамику клеток с МЯ и НПМ для сульфата серебра и Ag100, которая качественно отличалась от эффектов Ag14. То есть, по видам индуцированных генетических повреждений, их частотам и динамике действие Ag100 было близко к сульфату (ионам) серебра, но качественно и по тем же параметрам отличалось от эффектов частиц Ag14.

Дозозависимое повышение частоты апоптоза (рис.3) во всем диапазоне изученных концентраций наблюдалось только в двух случаях – под действием сульфата (ионов) серебра и частиц Ag14, причем

эффекты сульфата серебра были существенно более выражены, особенно на высоких концентрациях. Неожиданно, частицы Ag100 дозозависимо повышали частоту апоптоза только в диапазоне концентраций, не превышающих 0,05 мг/л ПДК серебра в питьевой воде. Это означает, что в присутствии более высоких концентраций Ag100 возможно минимум два варианта развития эффектов: увеличение клеточной гибели по механизму некроза (токсическое действие), который трудно учитывать в микроядерном тесте, либо активизацию процессов репарации. В последнем случае должна возникать задержка митоза и связанное с ней снижение частоты ускоренно делящихся клеток в спектре клеточных популяций. В другом случае снижение частоты апоптоза может быть обусловлено изменением характера либо сигнала апоптоза, что должно привести к накоплению повреждений в делящихся клетках и также к снижению пролиферативной активности (ср. рис.2).

Результаты цитомного анализа показали, что в присутствии частиц Ag14 даже в максимальной концентрации – и только для этой формы серебра – ни при одной концентрации не наблюдали снижения объема пролиферативного пула (рис.4 левый). При этом частота ускоренно делящихся клеток снижалась только в присутствии максимальной концентрации Ag14. В совокупности это подтверждает реализацию сценария 1.

Для сульфата серебра снижение пролиферативного пула и частота ускоренно делящихся клеток были согласованы с частотой апоптоза, что еще раз доказывает гибель клеток в присутствии высоких концентраций. Влияние высоких концентраций частиц Ag100 на пролиферативную активность проявлялось в динамике, практически аналогичную действию сульфата серебра, что достаточно точно подтверждает развитие событий по сценарию 2 – накопление повреждений в делящихся клетках путем модификации каскада апоптоза и снижения пролиферативной активности.

То есть, частицы разного размера оказывают влияние на пролиферативную активность клеток крови человека по разным механизмам.

Анализ спектра клеточных популяций, образовавшихся в культурах показал, что с увеличением концентрации Ag100 и сульфата серебра в культуре действительно наблюдалось увеличение частоты одноядерных (неделяющихся за время культивирования) и двуядерных (прошедших 1 цикл деления) клеток и снижение частоты клеток, прошедших более одного митотического цикла (рис. 5). Это подтверждает предположение о дозозависимом увеличении продолжительности клеточного цикла в присутствии сульфата серебра и НЧ Ag100. В культурах, экспонированных к Ag14,

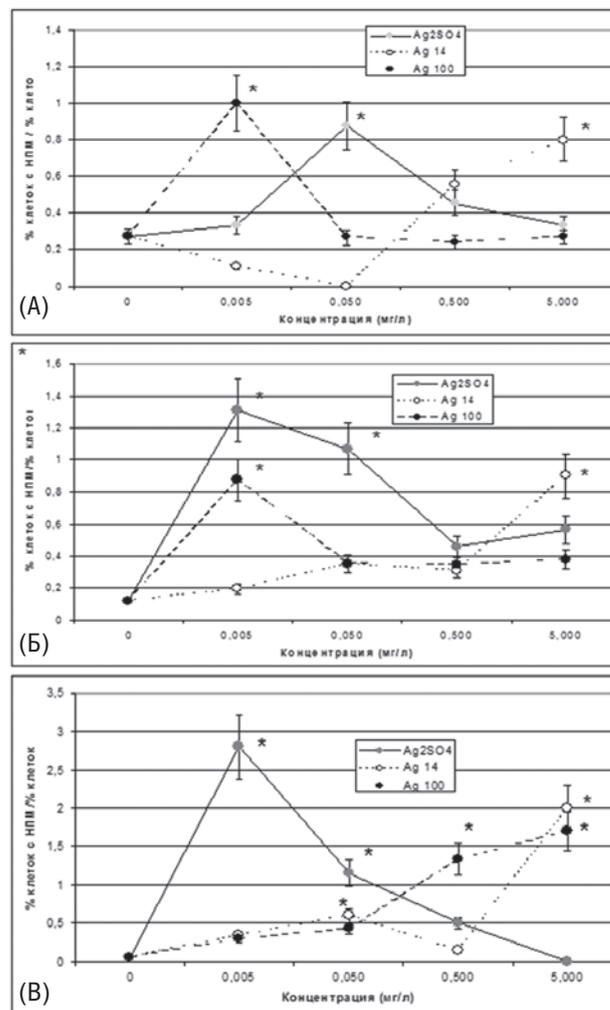


Рис. 2. Соотношение частот основных типов генетических повреждений (микроядер и нуклеоплазмальных мостов) в клетках, прошедших за время культивирования разное количество цикла деления: двуядерные клетки (А), ускоренно делящиеся клетки (Б), все делящихся клетках (В)

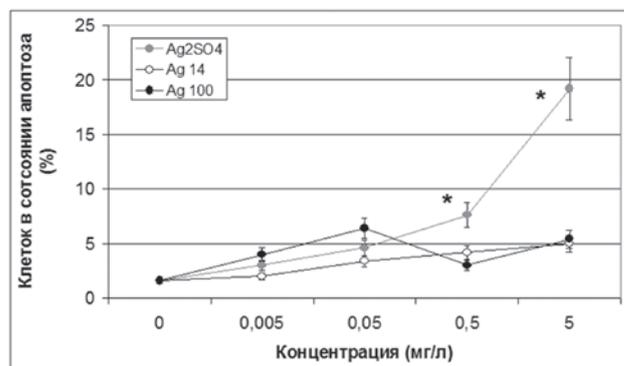


Рис. 3. Частоты апоптоза, индуцированные НЧ разных размеров и сульфатом (ионами) серебра

частота одноядерных клеток с экспозицией не менялась, однако частота ускоренно делящихся клеток, прошедших за время культивирования более 2 циклов деления, существенно не менялась, что говорит о слабом влиянии на продолжительность клеточного цикла.

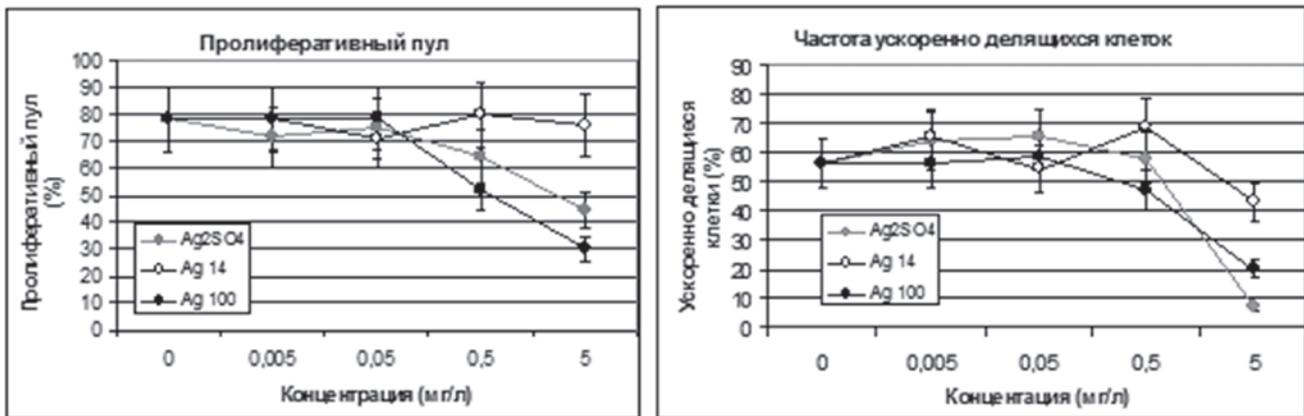


Рис. 4. Динамика пролиферативной активности и частоты ускоренно делящихся клеток в культурах лимфоцитов крови человека, экспонированных к сульфату серебра и наночастицам серебра разных размеров.

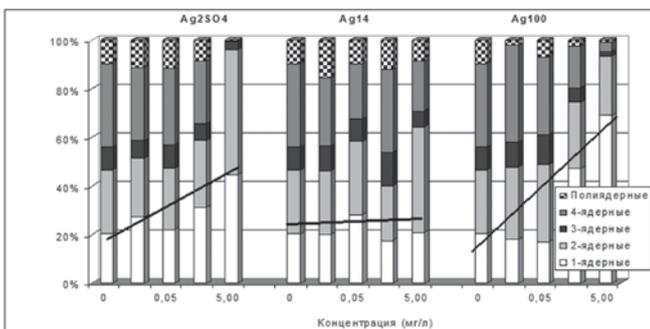


Рис. 5. Спектр клеточных популяций в культурах крови человека, экспонированных к различным концентрациям сульфата (ионов) серебра и наночастицам Ag14 и Ag100.

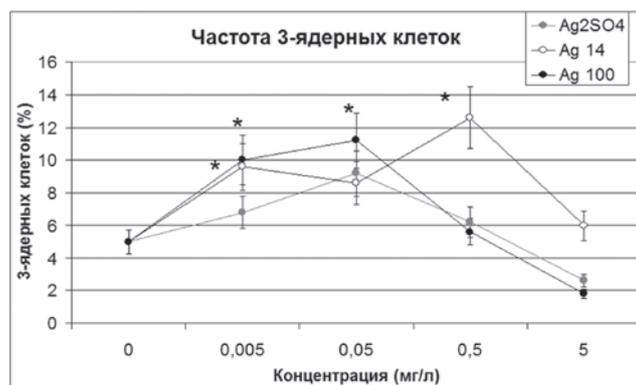


Рис. 6. Динамика образования асимметричных 3-ядерных клеток при экспозиции культур крови человека сульфатом серебра и наночастицами серебра разных размеров.

Анеуплоидия, связанная с нарушениями в механизме распределения хромосом между дочерними клетками, может возникать как в результате мутаций, так и других повреждений ДНК. Анеуплоидия является одним из доказанных механизмов канцерогенеза и стимулятором прогрессии генетических повреждений в ряду клеточных поколений, что делает показатель частоты анеуплоидии одним из ключевых при оценке эффектов нестабильности генома [33]. Расширенный протокол микроядерного теста позволяет надежно оценить уровень анеуплоидии во втором митотическом цикле - когда во время инкубации с цитохалазином В двуядерные клетки делятся еще раз и в норме образуют симметричные 4-ядерные клетки. Параллельно во 2 митозе могут образовываться асимметричные 3-ядерные клетки, которые являются удобным и точным маркером анеуплоидии [21, 22, 28].

На рисунке 6 видно, что значимое повышение частоты 3-ядерных клеток наблюдалось только при экспозиции клеток к двум минимальным концентрациям Ag100, а также во всем диапазоне экспозиции к Ag14, за исключением максимальной концентрации. Снижение частоты 3-ядерных клеток при экспозиции к более высоким концентрациям сульфата серебра и НЧС, вероятнее всего, обусловлено комплексом причин, связанных с индукцией повреждений ДНК, замедлением пролиферации и развитием токсических эффектов или гибелью клеток. Интересно, что и по этому показателю Ag14 отличался и от сульфата серебра, и от наночастиц Ag100, поскольку именно в присутствии Ag14 обнаружена максимальная частота 3-ядерных клеток, причем этот эффект наблюдали даже при очень высокой концентрации, когда в присутствии ионов серебра и частиц Ag100 уже проявлялись токсические эффекты. То есть, в присутствии Ag14 анеуплоидия наблюдалась при максимальной выживаемости клеток. Это означает, что анеуплоидные клетки не погибали, а выживали. Принимая во внимание тот факт, что самые высокие уровни анеуплоидии обнаружены в опухолевых клетках, феномен анеуплоидного действия Ag14, на наш взгляд, во многом определяет высокий канцерогенный потенциал этих частиц.

Следует отметить, что в современных исследованиях анеуплоидия определяется, преимущественно, с использованием fish-окраски, специфичной для определенных хромосом, поэтому для оценки неспецифических анеуплоидий требуется сложный и дорогой полногеномный анализ. Может быть, поэтому анеуплоидия, индуцированная НЧС, была выявлена еще только в одном извест-

ном нам исследованию - на клетках *Oryzias latipes* при их инкубации с 0.05 - 0,3 мкг/см² частиц размером 30 нм [34].

Заключение. Обобщая приведенные данные, необходимо, прежде всего, отметить, что все изученные НЧС обладали генотоксическими и цитотоксическими свойствами, что делает их мало пригодными для улучшения качества питьевой воды, хотя частицы Ag14 обладали наименьшей токсичностью из всех изученных соединений.

Кроме того, результаты исследования показали, что все изученные соединения индуцировали эффекты нестабильности генома на культуре лимфоцитов крови человека, причем количественно эти эффекты ослабевали в ряду Ag2SO4>>Ag100>>Ag14. Однако типы генетических повреждений и степень симметрии распределения генетического материала в митозе под действием НЧС разного размера, принципиально различались. Наиболее серьезные эффекты, и, что очень важно, связанные с выживаемостью поврежденных клеток и анеуплоидией, вызывали частицы Ag14. Поэтому частицы Ag14 представ-

ляются более опасными, чем Ag100 и ионы серебра. Таким образом, в данной работе впервые показано, что частицы наносеребра разных размеров индуцируют эффекты нестабильности генома по принципиально разным механизмам, а также различаются по уровню и динамике индукции анеуплоидии и влиянию на выживаемость клеток.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность кандидату медицинских наук, старшему научному сотруднику лаборатории генетического мониторинга ФГБУ «НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Минздрава РФ В.В. Юрченко за внимательный анализ работы и ценные замечания.

Работа выполнена в ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» МЗ РФ в соответствии с Государственным заданием № 056-00138-16 ПР (Часть 2. Раздел 1. Выполнение фундаментальных научных исследований: «Изучение генотоксического, мутагенного и потенциального канцерогенного действия наноматериалов для минимизации их влияния на здоровье человека»). Государственный регистрационный номер 115072870026.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahamed M, Alsalmi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. // Clin Chim Acta. 2010; v.411: 23-24:1841-1848
- De Jong W.H., Borm P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: application and hazards // Int J of Nanomedicine, 2008, v.3: 2:133-149
- Мосин О.В., Игнатов И. Методы получения мелкодисперсных наночастиц коллоидного серебра Интернет-журнал «НАУКОВЕДЕНИЕ» Выпуск 3, май – июнь 2014 <http://naukovedenie.ru/85TVN314>
- Xu L, Li X, Takemura T, Hanagata N, Wu G M S V, Chou LL Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. // J Nanobiotechnology. 2012, v.10, № 1:16-18;
- De Lima R, Seabra AB, Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J Appl Toxicol. 2012, Jun 13. doi: 10.1002/jat.2780;
- Lansdown A.B.G. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices. Review Article // Advances in Pharmacological Sciences, Volume 2010, Article ID 910686, doi:10.1155/2010/910686
- Б.А.Кацнельсон, Л.И.Привалова, М.П.Сутункова, В.Б.Гурвич, И.А.Минигалиева, Н.В.Логнинова, Е.П.Киреева, В.Я.Шур, Е.В.Шишкина, Я.Б.Бейжин, С.В.Пичугова, О.Г.Макеев, И.Е.Валамина. Основные результаты токсикологических экспериментов «in vivo» с некоторыми металлическими и металло-оксидными наночастицами Токсикологический вестник, 2015; 3: 26-40.
- Katsnelson B.A, Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Lognina N.V., Minigaliev I.A., Kireyeva E.P., Shur V.Y., Shishkina E.V., Beikin Y.B., Makeyev O.H., Valamina I.E. Some inferences from in vivo experiments with metal and metal oxide nanoparticles: the pulmonary phagocytosis response, subchronic systemic toxicity and genotoxicity, regulatory proposals, searching for bioprotectors (a self-overview). Int J Nanomedicine. 2015 Apr 16; 10:3013-29. doi: 10.2147/IJN.S80843. eCollection 2015.
- Tomankova K., Horakova J., Harvanova M., Malina L., Soukupova J., Hradilova S., Kejliva Kristina, Malohlava Libor Licman Jakub, Dvorakova Marketa, Jirova Dagmar, Kolarova H. Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro, Food and Chemical Toxicology (2015), doi: 10.1016/j.fct.2015.03.027
- Thiago Verano-Braga, Rona Miethling-Graff, Katarzyna Wojdyła, Adelina Rogowska-Wrzinska, Jonathan R. Brewer, Helmut Erdmann, and Frank Kjeldsen. Insights into the Cellular Response Triggered by Silver Nanoparticles Using Quantitative Proteomics. ACS NANO. February 2014, www.acsnano.org. DOI: 10.1021/nl4050744
- Hay RT (2005). "SUMO: a history of modification". Mol. Cell 18 (1): 1-12. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.012
- AshaRani P. V., Kah Mun Grace Lo †, Hande M. P., Valiyaveetil S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells // ACS Nano, 2009, 3 (2), pp 279-290
- Xiu ZM, Zhang QB, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJ. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. Nano Lett. 2012; 12 (8):4271-5. doi: 10.1021/nl301934w.
- Kittler, S. C. G.; Gebauer, J. S.; Diendorf, J.; Treuel, L.; Ruiz, L.; Gonzalez-Calbet, J. M.; Vallet-Regí, M.; Zellner, R.; Köller, M. Epple, M. The Influence of Proteins on the Dispersability and Cell-Biological Activity of Silver Nanoparticles. J. Mater Chem. 2009, 20:512-518
- Chong-xin Huang, Bo Lv, and Yue Wang. Protein Phosphatase 2A Mediates Oxidative Stress Induced Apoptosis in Osteoblasts Mediators Inflamm. 2015; 804260. 10.1155/2015/804260
- Lim Hui Kheng, Asharani P. V., Prakash Hande M. Enhanced genotoxicity of silver nanoparticles in DNA repair deficient mammalian cells Frontiers in Genetics, 2012, v. 3, p.104. doi: 10.3389/fgene.2012.00104
- Vecchio G, Fenech M, Pompa PP, Voelcker NH. Lab-on-a-chip-based high-throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials. Small. 2014; 10 (13):2721-34. doi: 10.1002/smll.201303359.
- Сливак И.М. Действие алкилирующих агентов и ионизирующей радиации на клетки человека с наследственными нарушениями репарации ДНК. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Санкт-Петербург, 1998; 26.
- McLuckie KI, Crookston RJ, Gaskell M, Farmer PB, Routledge MN, Martin EA, Brown K. Mutation spectra induced by alpha-acetoxymoxifen-DNA adducts in human DNA repair proficient and deficient (xeroderma pigmentosum complementation group A) cells // Biochemistry. 2005 v.44., №22, P.8198-8205;19.
- Kroes R, Galli C, Munro I, Schilter B, Tran L, Walker R, Würzten G. Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing. Food Chem Toxicol. 2000, v.38, № 2-3:255-312
- Gonzalez L., Sanderson B.J. S. and Kirsch-Volders M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials [Journal] / Mutagenesis.- 2011. - 1 : Vol. 26:185-191.
- Ингель Ф.И., Гуськов А.С., Юрченко В.В., Кривцова Е.К., Юрцева Н.А. Показатели пролиферативной активности и их связь с генетическими повреждениями лимфоцитов крови при культивировании в условиях цитокинетического блока // Вестник РАМН, 2006; 4: 41-46.
- Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток. Экологическая генетика 2006г.Т.IV, №3: 7-19
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death // MutRes. -2006-. Vol.537, №7:127-132.
- Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures // Mut Res, 2003. Vol. 534, P.65-75.
- Gonzalez L., Sanderson B.J. S. and Kirsch-Volders M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials [Journal] / Mutagenesis. - 2011. - 1 : Vol. 26:185-191.
- Statement on genotoxicity assessment of nanomaterials* and experimental considerations by committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (com) http://www.iacom.org.uk/statements/documents/nanomaterialsfinal2012_000.pdf
- OECD guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating Test Guideline 487. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/50108793.pdf>
- Мошков Н.Е., Ингель Ф.И., Кривцов Г.Г. Морфотерия клеточных ядер для скрининга эффектов нестабильности генома в микроядерном тесте на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока // Нанотехнологии и охрана здоровья, 2012, Том IV, № 1 (10):24-32
- Ingel F., Zetsepina O., Stekhin A., Yakovleva G., Savostikova O., Alekseeva A., Iksanova T. Electrochemically activated water induced effects of genomic instability in various living objects in vitro and in vivo. Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine 2013, Vol. 1, Iss.7, 1:143 [http://dx.doi.org/10.4172/2329-6879.1000143](http://esciencecentral.org/journals/electrochemically-activated-tap-water-induced-effects-of-genomic-instability-in-various-living-objects-in-vitro-and-in-vivo-2329-6879.1000143.php?aid=23292)
- Кошелев К.К., Кошелева О.К., Паутов В.Л., Горовенко В.И., Сивистунов М.Г. Препараты коллоидных металлов КНД-М для медицины. Нанотехнология и охрана здоровья, 2010; 2: 36-38.
- Smith LE, Nagar S, Kim GJ, Morgan WF. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. Health Phys. 2003, Jul; 85(1):23-29.
- Titenko-Holland N., Jacob R. A., Shang N., Balaraman A., Smith M. T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. Mutat. Res., 1998. v. 417, N 2 - 3:101 - 114.
- Тимошевский В.А., Назаренко С.А. Биологическая индикация мутагенных воздействий и генетической нестабильности у человека путем учета числовых хромосомных нарушений. Вестник ВОГИС, 2006; 10 (3): 530-540.
- Wise JP Sr, Goodale BC, Wise SS, Craig GA, Pongnan AF, Walter RB, Thompson WD, Ng AK, Aboueiisa AM, Mitani H, Spalding MJ, Mason MD. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquat Toxicol. 2010, v.97, № 1:34-41

REFERENCES:

- Ahamed M., Alsali M.S., Siddiqui M.K. Silver nanoparticle applications and human health. // Clin Chim Acta. 2010, v.411, № 23-24:1841-1848
- De Jong W.H., Borm P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: application and hazards // Int J of Nanomedicine, 2008, v.3, № 2:133-149
- Mosin O. V., Ignatov A. Methods of receiving fine nanoparticles of colloidal silver the Internet magazine "NAUKOVEDENIYE" Release 3, May - June 2014 <http://naukovedenie.ru> 85TVN314
- Xu L., Li X., Takemura T., Hanagata N., Wu G M S V, Chou LL. Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. // J Nanobiotechnology, 2012, v.10, № 1:16-18;
- de Lima R, Seabra AB, Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J Appl Toxicol. 2012, Jun 13. doi: 10.1002/jat.2780;
- Lansdown A.B.G. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices. Review Article // Advances in Pharmacological Sciences, Volume 2010, Article ID 910686, doi:10.1155/2010/910686
- Katsnelson B. A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V. B., Minigaliyeva I.A., Loginova N. V., Kireev E.P., Schur W. Ja., Shishkina E.V., Beykin Ya.B., Pichugova S.V., Makeev O. G., Valamina I.E. The main results of toxicological experiments "in vivo" with some metal - oxidic nanoparticles. Toxicological vestnik, 2015 No. 3, S.26-40.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Loginova N.V., Minigaliyeva I.A., Kireyeva E.P., Shur V.Y., Shishkina E.V., Beikin Y.B., Makeyev O.H., Valamina I.E. Some inferences from in vivo experiments with metal and metal oxide nanoparticles: the pulmonary phagocytosis response, subchronic systemic toxicity and genotoxicity, regulatory proposals, searching for bioprotectors (a self-overview). Int J Nanomedicine. 2015 Apr 16; 10:3013-29. doi: 10.2147/IJN.S80843. eCollection 2015.
- Tomankova K., Horakova J., Harvanova M., Malina L., Soukupova J., Hradilova S., Kejllova Kristina, Malohlava Libor Licman Jakub, Dvorakova Marketa, Jirova Dagmar, Kolarova H. Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro, Food and Chemical Toxicology (2015), doi: 10.1016/j.fct.2015.03.027
- Thiago Verano-Braga, Rona Miethling-Graff, Katarzyna Wojdyla, Adelina Rogowska-Wzesinska, Jonathan R. Brewer, Helmut Erdmann, and Frank Kjeldsen. Insights into the Cellular Response Triggered by Silver Nanoparticles Using Quantitative Proteomics. ACS NANO, February 2014, www.acsnano.org. DOI: 10.1021/nn4050744
- Hay RT (2005). "SUMO: a history of modification". Mol. Cell 18 (1): 1-12. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.012
- AshaRani P. V., Kah Mun Grace Low ‡, Hande M. P., Valiyaveetil S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells // ACS Nano, 2009, 3 (2), pp 279-290
- Xiu ZM, Zhang QB, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJ. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. Nano Lett. 2012; 12 (8):4271-5. doi: 10.1021/nl301934w.
- Kittler, S. C. G.; Gebauer, J. S.; Diendorf, J.; Treuel, L.; Ruiz, L.; Gonzalez-Calbet, J. M.; Vallet-Regi, M.; Zellner, R.; Köller, M. Epple, M. The Influence of Proteins on the Dispersability and Cell-Biological Activity of Silver Nanoparticles. J. Mater Chem. 2009, 20:512-518
- Chong-xin Huang, Bo Lv, and Yue Wang. Protein Phosphatase 2A Mediates Oxidative Stress Induced Apoptosis in Osteoblasts Mediators Inflamm. 2015; 2015: 804260. 10.1155/2015/804260
- Lim Hui Kheng, Asharani P. V., Prakash Hande M. Enhanced genotoxicity of silver nanoparticles in DNA repair deficient mammalian cells Frontiers in Genetics, 2012, v. 3, p.104. doi: 10.3389/fgene.2012.00104
- Vecchio G, Fenech M, Pompa PP, Voelcker NH. Lab-on-a-chip-based high-throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials. Small. 2014; 10 (13):2721-34. doi: 10.1002/smll.201303359.
- Spivak I.M. Action of the alkylating agents and ionizing radiation on human cells with hereditary violations of DNA repair. Abstract of the thesis for degree of Candidate of Biology, St. Petersburg, 1998, S.26.
- McLuckie KI, Crookston RJ, Gaskell M, Farmer PB, Routledge MN, Martin EA, Brown K. Mutation spectra induced by alpha-acetyltamoxifen-DNA adducts in human DNA repair proficient and deficient (xeroderma pigmentosum complementation group A) cells // Biochemistry. 2005 v.44, № 22, P.8198-8205; 19.
- Kroes R, Galli C, Munro I, Schilter B, Tran L, Walker R, Würzten G. Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing. Food Chem Toxicol. 2000, v.38, № 2-3:255-312
- Gonzalez L., Sanderson B.J. S. and Kirsch-Volders M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials [Journal] / Mutagenesis - 2011. - 1. Vol. 26:185-191.
- Ingel F.I., Guskov A.S., Yurchenko V. V., Krivtsov E.K., Yurtseva N. A. Indicators of proliferative activity and their correlations with genetic damages of lymphocytes of human blood cultivated in cytokinetic block // the Bulletin of the Russian Academy of Medical Science, 2006, No. 4:41-46.
- Ingel F.I. Prospects of use of micronuclear test on human blood lymphocytes cultivated using cytokinetic block. Part 1. Proliferation of cages. Ecological genetics 2006, v. IV, No. 3: 7-19
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death // MutRes. - 2006.-Vol.537, №7:127-132.
- Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures // Mut Res, 2003. Vol. 534, P.65-75.
- Gonzalez L., Sanderson B.J. S. and Kirsch-Volders M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials [Journal] / Mutagenesis. - 2011. - 1. Vol. 26:185-191.
- Statement on genotoxicity assessment of nanomaterials* and experimental considerations by committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (com) http://www.iaom.org.uk/statements/documents/nanomaterialsfinal2012_000.pdf
- OECD guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating Test Guideline 487. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/50108793.pdf>
- Moshkov N. E., Ingel F. I., Krivtsov G. G. A morphometry of cellular nuclei for screening of the effects of genomic instability in micronuclear test on human blood lymphocytes cultivated in cytokinetic block // Nanotechnology and health protection, 2012, v. IV, No. 1 (10):24-32
- Ingel F., Zatepina O., Stekhin A., Yakovleva G., Savostikova O., Alekseeva A., Iksanova T. Electrochemically activated water induced effects of genomic instability in various living objects in vitro and in vivo. Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine 2013, Vol. 1, Iss. 7, 1:143 [http://dx.doi.org/10.4172/2329-6879.1000143](http://esciencecentral.org/journals/electrochemically-activated-tap-water-induced-effects-of-genomic-instability-in-various-living-objects-in-vitro-and-in-vivo-2329-6879.1000143.php?aid=23292)
- Koshelev K.K., Kosheleva O.K., Pautov V.P., Gorovenko V. I., Svistunov M. G. Preparations of the KND-M colloidal metals for medicine. Nanotechnology and health protection, 2010, No. 2, S.36-38
- Smith LE, Nagar S, Kim GJ, Morgan WF. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. Health Phys. 2003, Jul; 85 (1):23-29.
- Titenko-Holland N., Jacob R. A., Shang N., Balaraman A., Smith M. T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. Mutat. Res., 1998. v. 417, N 2 - 3:101 - 114.
- Timoshevskiy VA., Nazarenko S. A. Biologic indication of mutagenic influences and human genetic instability by the accounting of numerical chromosomal violations. Vestnic VOGIS, 2006, T.10, No. 3, S.530-540.
- Wise JP Sr, Goodale BC, Wise SS, Craig GA, Pongan AF, Walter RB, Thompson WD, Ng AK, Aboueiassa AM, Mitani H, Spalding MJ, Mason MD. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquat Toxicol. 2010, v.97, № 1:34-41. Healthcare of Russia, 119121, Moscow, Russian Federation

F.I. Ingel, E.K. Krivtsova, N.A. Yurtseva, O.N. Savostikiva, A.V. Alekseeva.

CYTOME ANALYSIS OF EFFECTS OF GENOMIC INSTABILITY INDUCED BY DIFFERENTLY SIZED SILVER NANOPARTICLES IN HUMAN WHOLE BLOOD CULTURE

A.N. Sysin Research Institute of Human Ecology and Environmental Health, of Ministry of Health of Russia, 119121, Moscow, Russian Federation

A high bactericidal activity of silver nanoparticles (NHS) suggests the possibility of their use in the preparation of drinking water. On the example of human peripheral blood lymphocytes cultured in micronucleus test with cytochalasin B, effects of genome instability were investigated in a concentration range of 0.005-5.0 mg / l of silver nanoparticles (NHS) with a size of 14.3 ± 0.2 nm (Ag14) and 100.0 ± 11.0 nm (AG100), stabilized with gum acacia and for comparison, those of Ag_2SO_4 (silver ions), in the same range of concentrations. All substances were suspended or dissolved in drinking water. The results showed that the NP_5 had genotoxic and cytotoxic effects that made them unsuitable to improve the quality of drinking water. Effects of genome instability determined by the frequency of dividing cells with micronuclei and nucleoplasmic bridges, as well as inhibition of mitotic activity, decrease of proliferative activity and increasing duration of the cell cycle came down in series of $\text{Ag}_2\text{SO}_4 \gg \text{Ag}100 \gg \text{Ag}14$. However, frequency rise of asymmetric 3-nucleated cells due to aneuploidy induction was the most characteristic of Ag14 particles.

Key words: silver nanoparticles, micronucleus test with cytochalasin B, human blood cells, genome instability, aneuploidy.

Материал поступил в редакцию 18.11.2016 г.