

НАНОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОРИЗИКИ

З. С. Клестова, А. М. Головка

Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів

Отримання нових знань започатковує нові наукові напрямки, одним із таких є нанотехнологія. Виготовлені нові матеріали, до складу яких входять наночастинки як металів, так і інших хімічних речовин. Ці матеріали знайшли широке впровадження в різних галузях, у тому числі і у біо-медичних використаннях. Але, окрім нових властивостей та нових можливостей від запровадження цих матеріалів, ми отримали нові виклики у сфері здоров'я, стикнулись із виникненням нових біоризиків. Так, нанотоксикологія виявила нові дані стосовно токсичної дії деяких наносполук, досліджені молекулярні механізми їх токсигенного впливу на живі клітини та їх геном. Опинившись у навколишньому середовищі, воді, лікарських засобах, деякі наносполуки стають новим антропогенним фактором-навантаженням, що змушує нас прогнозувати та контролювати нові біоризики.

Сучасна епоха ставить перед людством все нові виклики, враховуючи, що події і відкриття здійснюються прискореними темпами, що докорінно змінює якість життя. Виникнення нових напрямків у науці в свою чергу призводять до впровадження нових знань і матеріалів у практику. Одним із таких напрямків, що бурхливо розвивається є нанотехнологія.

Як відомо, термін «нано» запровадив К. Ерік Дрекслер у 1977 році. Але, ідея про те, що можливо зробити пристрої та працювати з об'єктами, які мають нанорозміри була вперше виголошена у виступі лауреата Нобелівської премії Річарда Фейнмана у 1959 році.

Нанотехнологіями (наномолекулярними технологіями) прийнято називати міждисциплінарну область фундаментальної і прикладної науки, в якій вивчаються закономірності фізичних і хімічних систем, що мають розміри декількох нанометрів, а точніше, в діапазоні 1–100 нанометрів.

Сприймаючи нанонауку як науку і технологію колоїдних систем, можна виділити їх принципову відмінність у тому, що поверхня таких частинок або величезних молекул в мільйони разів перевищує обсяг самих частинок. Поведінка таких систем сильно відрізняється від поведінки істинних розчинів і від об'єктів мікросвіту завдяки високорозвиненій поверхні. Як правило, такі ефекти починають відігравати значну роль тоді, коли розмір частинок лежить саме у діапазоні 1–100 нанометрів. Істинні наноструктури, окрім розмірів, володіють зовсім іншими, унікальними властивостями, що відрізняє їх від просто фізичних об'єктів.

Сучасна тенденція до мініатюризації показала, що речовина може мати зовсім нові властивості, якщо взяти дуже маленькі частинки цієї речовини, «наночастинки». Так, наприклад, виявилось, що наночастки деяких матеріалів мають дуже хороші каталітичні і адсорбційні властивості. Інші матеріали показують дивовижні оптичні властивості, наприклад, надтонкі плівки органічних матеріалів застосовують для виробництва сонячних батарей. Такі батареї, хоч і мають порівняно низьку квантову ефективність, зате більш дешеві і можуть бути механічно гнучкими. Вдається домогтися взаємодії штучних наночасток з природними об'єктами нанорозмірів — білками, нуклеїновими кислотами і іншими. Ретельно очищені наночастинки можуть самовистроюватися в певні структури. Така структура містить строго впорядковані наночастинки і також часто проявляє незвичайні властивості. Наночастинки, впорядковуючись певним чином, створюють так звані

нанокластери. Нанотехнології призводять до побудови структур із наперед заданими новими властивостями та дозволяють, при потребі, інтегрувати ці наноконпоненти (<100 нм) в повноцінно функціонуючі системи більшого масштабу. У Єврокомісії створена спеціальна група, що має розробити за 2 роки класифікацію нанопродукції. Наразі, в розробці Технічного комітету ISO/TC 229 «нанотехнології» знаходяться 42 стандарти за 24 робочими програмами. Цим ТК під нанотехнологіями мається на увазі: «знання та управління процесами в масштабі до 100 нм в одному, або більше вимірах, коли дія розмірного ефекту призводить до можливості нових застосувань; використання властивостей об'єктів і матеріалів у нанометровому масштабі, які відрізняються від властивостей вільних атомів або молекул, а також від об'ємних властивостей речовини, що складається з цих атомів або молекул, для створення досконаліших матеріалів, приладів, систем, що реалізують ці властивості».

Практичний аспект нанотехнологій включає в себе виробництво пристроїв і їх компонентів, необхідних для створення, обробки і маніпуляції атомами, молекулами і наночастинками. У ширшому сенсі цей термін охоплює також методи діагностики, характерології і досліджень таких об'єктів. Нанотехнології якісно відрізняються від традиційних дисциплін, оскільки на таких масштабах звичні, макроскопічні технології поводження з матерією часто непридатні, а мікроскопічні явища, слабкі на звичних масштабах, стають набагато значнішими. Зважаючи на значне застосування нанотехнологій в енергетиці, інформаційних технологіях, електроніці, риладобудуванні, отриманні нових композиційних матеріалів для будівництва, автомобіле-і авіабудуванні (наприклад . у виробництві скла, батарей, нанобетону, чорнил, одягу, пального, світлових діодів, пластикової тари, в т.ч. для харчових продуктів, фотопоглинаючих плівок, біоетану, нанокomp'ютерів, мікросхем, ліків та інш) не стояли осторонь такі галузі, як медицина, екологія, сільське господарство, харчова промисловість. Створені і такі нові наноматеріали, як фулерени, вуглецеві трубки, графени, нанокристали та інш. Крім того, нанотехнології нині використовуються для фільтрації води і інших рідин. Нанотехнології здатні здійснити революцію в сільському господарстві. Молекулярні роботи можуть виробляти їжу, замінивши сільськогосподарські рослини і тварин.

У даний час вже є дослідні зразки наноконтейнерів — для прицільної доставки ліків до уражених органів і нововипромінювачів для знищення злоякісних пухлин; для створення матеріалів, необхідних при лікуванні опіків і ран; у стоматології; у косметології.

Експерти Європейської комісії склали наступний перелік найважливіших на їхню думку розділів нанобіотехнологій на майбутні 15–20 років:

- прицільне постачання ліків;-молекулярна візуалізація;
- косметика;
- створення нових лікарських засобів;
- методи діагностики;
- хірургія, в тому числі трансплантація тканин та органів;
- тканинна інженерія;
- харчові технології;
- геноміка і протеоміка;
- молекулярні біосенсиори;
- інші розділи.

Ці напрямки будуть здійснюватись завдяки:

- створенню матеріалів з ексклюзивними, наперед заданими властивостями шляхом оперування окремими молекулами;
- конструюванню нанокomp'ютерів, які використовують замість звичайних мікросхем набори логічних елементів з окремих молекул;

— збиранню нанороботів — систем, що саморозмножуються і призначені для проведення зборки на молекулярному рівні.

Таким чином, маючи безліч нових об'єктів, де використані наноматеріали, постає питання контролю їх впливу на організм людини і тварин, вивчення токсичної дії на живі клітини і молекулярні механізми клітинного метаболізму.

Маючи на увазі природній аспект, при якому клітина все життя стикалась та працювала із природними нанооб'єктами, збираючи з різних атомів молекули складних сполук, вона розміщала їх в різних органелах-у ядрі, мембрані і т.інш. Але, наносвіт наповнений перепонами та проблемами, в наносвіті всі деталі є дуже міцними. Поведінка наночасток в клітині є невизначеною в багатьох випадках, і тому, ставлення суспільства і науковців до нанотехнологій неоднозначне, таким чином, підвищується усвідомлення необхідності досліджень з нанотоксикології, яка може дати розуміння і відповідь щодо механізмів шкідливих ефектів, які можуть проявлятися.

Ми маємо виявити нові можливі ризики від застосування наноматеріалів на клітину і організм людини і тварин в цілому. Нова нанопродукція, в т.ч.. біоматеріали, вакцини, імунобіологічні засоби тощо, до складу яких включені наночасточки як металів, так і інших хімічних речовин, потребують розробки нової методології їх контролю та тестування в процесі розробки і досліджень, у тому числі і методології з виявлення ефектів цитотоксичності та генотоксичності наноматеріалів.

Метою нашої роботи є привернення уваги щодо необхідності державної політики і підтримки у контролі біологічних ефектів обігу наноматеріалів, у першу чергу в медицині, ветеринарії та харчовій промисловості.

Нанотоксикологія, чи дослідження потенційних хворобливих ефектів наноматеріалів на організм людини зростає особливо останніми роками через збільшення кількості споживчої продукції, що їх вміщує. Наприклад, на момент серпня 2009 року на ринку споживчої продукції нараховувалось 1015 найменувань, до складу яких увійшли наноматеріали. У порівнянні із березнем 2006 року їх кількість зросла на 379 %. Тому дуже важливо оцінити потенційні біоризики, що можуть бути викликані наноматеріалами, оскільки вважається, що нанотехнологія може принести значну користь у таку галузь, як охорона здоров'я та ветеринарія. Це постійно є питанням, що повторюється у обговореннях вчених та наукових комітетів, таких, як Науковий комітет з емерджентних та знов виявлених ризиків для здоров'я (SCE-NIHR, European Commission) [19].

Нами проведений аналіз наукових даних стосовно впливу деяких наноматеріалів, наночасток на метаболізм живих клітин. Розглянемо дію деяких найбільш вживаних наночасток, як їх позитивну дію, так і негативну.

Відомо, що золото використовують як наноматеріал на сьогоднішній час у багатьох випадках, у тому числі і для медико-біологічного застосування. Були проведені дослідження з нанокластерами золота ультра-тонких (< 2nm) розмірів, оскільки, враховуючи хімію їх поверхні. була неясна їх дія.

Використали панель із наноматеріалів золота різних атомів (Au15, Au18, Au25). Ці нанокластери були захищені меркаптопропіоновою кислотою та глутатіоном [1]. Дослідили цитотоксичну, генотоксичну дію та генерацію внутрішньоклітинних форм кисню. Виявили, що при обробці клітин нанокристаллами золота, в захисному середовищі меркаптопропіленової кислоти, викликалась поява у великій кількості мітохондріальних супероксидних аніонів (O_2^-) і підвищувався рівень у цитоплазмі активних форм кисню, чого не спостерігали при застосуванні нанокластерів золота у глутатіоні. Цікавим виявився той факт, що незважаючи на стимулювання підвищення рівня активних форм кисню, у клітині не проявились шкідливі ефекти, такі як клітинна смерть, або пошкодження ДНК. Тільки відмітили, що підвищення окислювально-відновлювального статусу та прискорення клітинного метаболізму і проліферативної здатності. Таким чином, сформували базис

специфічного дизайну на основі створення ультра-малих комплексів наноструктур золота для застосування у біологічних системах [1].

За допомогою бактеріофагів і наночасточок золота розроблена нова технологія вилучення та відновлення іонів золота, що відкриває новий і екологічний варіант сорбування золота. Припускають, що ця технологія може бути використана для відновлення після контамінації довкілля важкими металами. Полягає вона у біосорбції наночасток металів бактеріофагами та їх біоредукції. Це опосередковано іонною і ковалентною взаємодіями, між іонами золота та скороченими групами молекул протеїнової оболонки фагів, оскільки бактеріофаги показали ефективну сорбцію іонів золота з максимальною здатністю їх адсорбувати у кількості 571 мг золота на 1 г сухої маси фагів. Продуктом цього опосередкованого фагами процесу є золоті нанокристали, розміром 30-100-630 нм [2].

Застосування властивостей срібла використовується людством давно. Його протимікробну здатність застосовували у боротьбі з інфекційними захворюваннями. В епоху нанотехнологій ефективність срібла знаходить широкий спектр застосування при бактеріальних інфекціях, використовуючи його у вигляді наночасток [3,4,5]. Але, було виявлено, що в разі коли розмір наночасточок срібла зменшується до 2 нм, або менше, при захисті їх глутатионом, багаті на наночасточки кластери срібла Ag^+ мали більш високу протибактеріальну активність до грам-негативних та грам-позитивних бактерій, ніж референтні зразки нанокластерів срібла, де срібло представлене у формі, що не має заряду. Це відкриття було зроблено із застосуванням бактерій *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* [3].

Але багатьма дослідниками дискутується питання можливості викликати наноматеріалами срібла токсичну дію. Для відповіді на це питання дослідники із Сінгапуру використали нанокластери срібла одного розміру із захистом ліганд, але різних за вибудовуванням поверхонь ядра. Були синтезовані багаті сріблом Ag^+ наноматеріали, їх редуковані копії, багаті на нанокластери Ag^0 -R, для досліджень двох груп наноматеріалів срібла, що можливо виникають при поділі в процесі деградації Ag^+ -наноматеріалів [4]. Було показано, що нанокластери срібла Ag^0 -R викликали більшу клітинну токсичність у порівнянні з нанокластерами Ag^+ -R. Виявили механізми такої токсичності. Вона виникала із-за модуляції активних форм кисню у клітинах, як результат більш швидкого вивільнення зразків срібла з нанокластерів Ag^0 -R і подальшому їх окисненні в Ag^+ у лізосомах.

Слабкий зв'язок Ag^0 -R сильно потенціює зміни у зразках наносрібла при кислотному і ензиматичному процесам в лізосомах. Ці дослідження вказали шлях до переконструювання нанокластерів срібла, результатом якого можливо досягти безпечні за дією на клітини снаноматеріали срібла [4].

Модифікували також нанокластери срібла, синтезували їх водну форму, у водній фазі, що є необхідним для біо-медичних досліджень. У водній фазі показали прекрасну стабільність нанокластери срібла $Ag_{16}(SG)_9$ та $Ag_9(SG)_6$ [5]. Ці наноструктури виявили прекрасні унікальні протимікробні властивості щодо мультирезистентної бактерії, яку використали в якості моделі, (*Pseudomonas aeruginosa*) і які були основані на їх здатності викликати утворення внутрішньоклітинних активних форм кисню. Ця бактерія у пацієнтів з ВІЛ викликає пневмонію, інфекції сечового тракту, респіраторної системи, підсилює імуносупресію. Досліджена бактерія була стійка до дії таких антибіотиків, як ампіцилін, пеніцилін і цефалоспорін. Було доказано, (дослідженнями методом дифузії в агар), що $< 8 \mu\text{g}/\text{мл}$ досліджених наночасточок ефективно інгібували ріст *Pseudomonas aeruginosa*. При збільшенні дози нанокластерів на базі атомів срібла у суспензії до $500 \mu\text{g}/\text{мл}$ і спостереженням за збудником протягом 14 годин виявили, що був повністю зупинений його ріст. При порівнянні виявили, що інгібуючий ефект був таким, як при застосуванні хлорамфеніколу протягом 24 годин [24]. Автори підтвердили дозозалежний ефект від застосування наночасток срібла, що було раніше показано іншими дослідниками. Але, за

рахунок того, що було застосовано наночасточки срібла меншого розміру, а саме <1,5 нм, ніж у інших дослідників (~ 100 нм), мінімальна інгібуюча концентрація була меншою (45 μm), ніж у інших дослідників (110 μm). Таким чином, від застосування того чи іншого кластеру наночастинок срібла (в залежності від їх певного розміру) залежить і протимікробний ефект, що теж слід враховувати при створенні нових лікарських засобів [5].

Інші дослідники при дослідженні цитотоксичної та генотоксичної дії трьох видів наночастинок диоксиду титанію (TiO_2), оксиду газодоліній тербій-легованого ($\text{Tb-Gd}_2\text{O}_3$) та полі (лактік-Со-гліколієвої кислоти) - (PLGA) теж виявили дозозалежні ефекти від застосування цих речовин в різних концентраціях. Так, для нано TiO_2 застосували концентрації 10,25,50,100,250,500, 1000 $\mu\text{g/ml}$; для $\text{Tb-Gd}_2\text{O}_3$ та для (PLGA): 300,450,600,750,1000 $\mu\text{g/ml}$. Дослідження провели у клітинній лінії фібробластів людини (VJ), яка має найменший мутований геном в порівнянні з раковою клітинною лінією. Автори доказали дозозалежний ефект щодо цитотоксичності наночастинок TiO_2 та $\text{Tb-Gd}_2\text{O}_3$ в клітинах VJ. Обидва ці види наночастинок проявляли і генотоксичну дію, призводячи до пошкоджень ДНК. Так, цитотоксичну та генотоксичну дію TiO_2 виявляв, починаючи з концентрацій від 250 $\mu\text{g/ml}$ (10-100 $\mu\text{g/ml}$ були нешкідливі), причому в концентрації 500 $\mu\text{g/ml}$ життєздатність клітин знижувалась на 25 % [6].

Але є повідомлення Falck et al. [7] про те, що наночасточки ататазного TiO_2 розміром < 25 нм і при обробці протягом 48–72 годин у менших концентраціях (10-36 $\mu\text{g/ml}$) викликалось пошкодження ДНК. Ці ушкодження ДНК виникали внаслідок підвищення внутрішньоклітинного рівня перекисного окислення, що виникало внаслідок пошкоджень в певних, так званих «контрольних точках» на різних стадіях клітинного циклу G1, S, G2/M. Виникало блокування клітинного циклу, ушкоджувались білки системи репарації ДНК.

Також у дозозалежній манері підвищували ступінь ушкоджень ДНК і наночасточки $\text{Tb-Gd}_2\text{O}_3$. Виявили, що низькі концентрації (<300 $\mu\text{g/ml}$) суттєво не пошкоджували ДНК в живих клітинах, але високі концентрації (1000 $\mu\text{g/ml}$) у 65 % клітин ушкоджували геном, т.ч. проявляли генотоксичну дію, в той час як цитотоксична дія починалась при застосуванні концентрацій 750 $\mu\text{g/ml}$ [6].

Але досліджені наночасточки PLGA не проявляли негативного (цито-і генотоксичних ефектів) впливу на клітину, тому їх можливо використовувати у біо-медичних дослідженнях.

Отримані Magdiel Ingrid Setyawati et al. (2012) дані дозволили дійти висновку, що механізми дії наночастинок різні і призводять до різних цито-і генотоксичних ефектів [6].

Провели також експерименти з наночастинами TiO_2 в культурі клітин мікроваскулярного епітелію людини з концентраціями 10,100 та 500 $\mu\text{g/ml}$ при обробці протягом однієї години [8] для встановлення маркерів апоптозу клітин щодо антикаспази-3, антикаспази 8, антикаспази 9, антиPARP та анти α -тубуліну. При цьому виявили, що при взаємодії наночастинок TiO_2 з епітеліальними клітинами із-за їх фізичної взаємодії виникає «нешільність» клітин у моношарі, що обумовлена «злипимим» протеїном VE-кадгеріном. Було доведено, що застосування наночастинок TiO_2 призводить до нещільності кровоносних судин у мишей, меланомо-легеневих метастазів у дослідних мишей та підвищує кількість метастазів у легенях. Дослідники вперше розкрили нерцепторно-опосередкований механізм дії, при якому наноматеріали запускають внутрішньоклітинний сигнальний каскад через специфічну взаємодію з VE-кадгеріном, що призводить до індукованої наноматеріалом клітинної нещільності ендотелію [8].

Але слід зауважити, що діоксид титанію (TiO_2) та гідрооксиапатит широко використовують у харчовій промисловості, засобах особистої гігієни, багатьох господарських предметах. Все це відбулось внаслідок недостатніх досліджень щодо впливу на клітину і її метаболізму. Були проведені дослідження на моделі *in vitro* клітин ротової порожнини людини TR 146.

Доведено, що наночасточки TiO_2 і гідроксиapatиту зв'язувались з мембранами клітин і проникали в клітину в дозозалежній манері [9]. Обоє видів наночасточок призводили до підвищення рівня активних форм кисню і експресії запальної відповіді з підвищенням концентрацій. Хоча в клітинах провокувався незначний ступінь апоптозу, оброблені наночасточками TiO_2 зразки проявляли підвищення рівня апоптозу на 28%, який виявлявся раніше після обробки [9]. Було також показано, що виникала так звана нано TiO_2 -залежна клітинна загибель, яка була за механізмом дії відмінною від класичного відомого шляху патогенезу апоптозу p53-Bax.

Відсоток клітин з раннім апоптозом підвищувались залежно від дози наночасток TiO_2 через 24 години і, запускаючи механізм апоптозу клітини, нано TiO_2 викликали зовсім новий, специфічний механізм апоптозу [9]. Подальші дослідження цих же авторів показали у моношарі клітинної лінії людини TR146, що при її обробці наночасточками TiO_2 , SiO_2 та гідроксиapatиту підвищувались скоротні властивості клітин із порушенням здатності до її зцілення. Хоча при цьому не виявили будь-яких ознак цитотоксичності. Але був показаний інший механізм опосередкованої наночасточками дії, при якому відбувалось масивне пошкодження внутрішньоклітинної асоціації мікротрубочок. Тим самим, спрацювала позитивна зворотна відповідь, при якій виникала більша адгезія клітин до субстрату, що обмежувало клітинну рухливість [10].

Розглянемо подальші дослідження із наночасточками оксиду сіліцію (SiO_2 NPs), що найбільш розповсюджені в інженерних матеріалах та у широкому асортименті споживчих продуктів. На тих же клітинних лініях слизової оболонки ротової порожнини людини TR146 показали взаємодію з клітинною мембраною та перехід через неї усередину клітини наночасток SiO_2 NPs. Дослідили через 12 годин їх дії та у різних концентраціях. Було показано, що концентрації більші за 500×10^{-6} М викликали в клітинах оксидативний стрес, який супроводжувався збудженням регуляції генів запалення IL6 та TNFA. Подальший аналіз патогенезу p53 та серії апоптозів і біомаркерів клітинного циклу показали внутрішньоклітинне накопичення SiO_2 NPs, які викликали максимальну нанотоксичність [11].

Таким чином, була отримана важлива інформація щодо розуміння процесів внутрішньоклітинного впливу і виникнення шкідливих для клітини ефектів під дією SiO_2 NPs, наночасточки якого зазвичай використовують через дешевизну. Доказані негативні ефекти від взаємодії SiO_2 NPs (які знаходяться сьогодні в широкому спектрі споживчих продуктів і епітеліальних клітин ротової порожнини людини. Таким чином, вживання харчових продуктів із вмістом даних наночасток для людини може становити небезпеку [11].

Окремо слід розглянути питання щодо потрапляння наночасточок у навколишнє середовище, в тому числі у воду з стічними водами домашнього та індустріального походження. Для здійснення часткового рециркулювання води (що вміщує серед інших забруднювачів і наночасточки) виникає потреба в фільтрувальних установках для фільтрації ультра-малих концентрацій речовин з ультра-малими розмірами, що поки що ставить людство в глухий кут із-за можливих, досі невідомих загроз здоров'ю людини [12]. Було досліджено наночастинки цинку, срібла, диоксиду титаніуму в широких діапазонах концентрацій, зразки яких знаходились як у питній воді, клітинних системах, тканинах ротової порожнини і шлунково-кишкового тракту. Концентрації наноречовин були від 100 пікограм на літр до 100 μ г/л водного розчину. Виявили зменшення токсичності від наночастинок окису цинку до наночасточок срібла і до диоксиду титаніуму. Виявили, що наночастинки цинку у концентрації 10 мг/л підвищують рівень внутрішньоклітинного стресу. Поріг концентрацій, що провокували цитотоксичний ефект був на 2-5 порядків величин вищим, ніж дозволений рівень для концентрацій відповідних металів і оксидів металів (не у формі наночасток) у питній воді [12].

Як відомо, медицина використовує наночасточки для доставки лікарських форм до їх мішеней, особливо при лікуванні раку. Було при цьому відмічено, що наночастинки не

інертні по відношенню до клітини. Вони активно взаємодіють з ними, викликаючи різну клітинну відповідь. Ліки, до структури яких входять наночасточки більш активні, ніж їх звичайні аналоги, тому їх і застосовували при виготовленні фармацевтичних засобів для терапії раку. При цьому необхідно вивчити їх фармакокінетику та дослідити питання їх повного виведення з організму. По-перше, важливо зрозуміти, як наночасточки впливають на ключові внутрішньоклітинні каскади, такі, наприклад, як шлях активізації протеїну p53.

Як відомо, протеїн p53 є регулятором клітинних функцій. У більш, ніж 50% всіх випадків раку людини виявляли, що p53 або втрачений, або видозмінений. Це повністю зрозуміло, так як відомою головною функцією p53 є супресія пухлини, де він контролює багато клітинних процесів, які впливають на виживання клітини, або її смерть.

При зниженні функцій p53, у передракових клітинах порушується більшість функцій клітинного захисту проти нерегульованого клітинного росту і прогресування пухлин. Таким чином, p53 грає значну роль в регуляції клітинної смерті. Оксиди металів і різні типи наночастинок металів можуть впливати на p53 клітинну регуляцію шляхом медіації внутрішньоклітинного перекисного окиснення. З циркулюванням p53 також пов'язані генотоксичні ефекти при супресії пухлинного розвитку, впливаючи на систему репарації ушкоджень ДНК, або на шляху клітини до апоптозу [13].

Деякі комерційні види наночастинок провокують клітинну смерть в дозозалежній манері, впливаючи на p53 і підвищуючи перекисне окиснення [14–17].

Але те, що шкідливо для нормальних клітин, можливо використати для пухлинних клітин. Відомо, що застосовані наночастинок ZnO, TiO₂, Ag, Fe₃O₄ були здатні селективно вбивати ракові клітини без добавки інших лікарських засобів, що було пов'язано із рівнем протеїну p53 в клітині [13].

Таким чином, цитотоксичні для нормальних клітин наночасточки можуть бути використані в терапії пухлин. Однак, ці дослідження, здійснені на моделі *in vitro*, потребують валідації і підтвердження на тваринах і у клінічній практиці онкохворих.

Більш детально взаємодію із пухлинними клітинами при канцерогенезі наночастинок ZnO було досліджено Kee Woei Ng et al (2011) та виявлено зв'язок з протеїном p53. Автори показали шлях активації p53 в клітинах фібробластів шкіри людини (BJ) при обробці наночасточками ZnO. Було доведено, що ці наночасточки проявляли клітинну токсичність і канцерогенез, що залежало не тільки від специфічних властивостей наночастинок, а також (що більш важливо) від ендогенних властивостей клітин-мішеней [18]. Не дивлячись на те, що наночасточки ZnO застосовують як транспортний засіб для доставки ліків, але відомо з наукових джерел і про їх цитотоксичний та генотоксичний ефекти. Використовуючи клітини бронхів людини (BEAS-2B) фібробласти шкіри (BJ), макрофаги мишей (RAW 264.7), дослідити вплив на них наночастинок ZnO із середніми розмірами $22,5 \pm 4,9$ нм. Виявили цитотоксичний ефект при їх концентрації 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ та вище. Ці наночастинок викликали подвійні ушкодження ланцюгів ДНК. Генотоксичний ефект був результатом активації протеїну p53. Було показано, що наночастинок ZnO ініціювали процес канцерогенезу, або підсилювали любі канцерогенні ситуації, будучи в змозі запустити процес апоптозу [18, 20-33].

Розробляються нові концепції для майбутньої детекції бактерій та методів лікування бактеріальних інфекцій [34]. Наприклад, на моделі бактерій *E.coli* та *St. aureus* випробували нову конструкцію- ДНК-нанопірамідAu/актиноміцинд. Ця конструкція являє собою актиноміцинд, який вбудований у ДНК-нанопірамід, що використали у якості каркасу. Під дією ДНК-ази ця структура деградує, вивільняючи актиноміцинд, що підвищувало його антибактеріальний ефект [34].

Нашими дослідженнями було доведено противірусну дію наносполуки вуглецю-фулерену C₆₀ на корона-вірус трансмісивного гастроентериту свиней в культурах клітин *in*

vitro [35]. Але, незважаючи на позитивний ефект, необхідні подальші дослідження щодо генотоксичного впливу та вивчення клітинного метаболізму.

Враховуючи важливість питання щодо впливу нових наноструктур на біологічні об'єкти, в тому числі при їх використанні в імунобіологічних ветеринарних засобах, що можуть найближчим часом потрапити на ринок ветеринарних препаратів України, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів ініціює розробку нових методів досліджень та контролю ветеринарних препаратів, які можуть вмещувати наноматеріали, що мають бути нешкідливими для здоров'я тварин. Розроблені Методичні рекомендації з «Оцінки біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних клітин» [36]. Крім того, досліджується вплив цілого ряду нових нанопродуктів на бактеріальні клітини та клітини тварин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що наночасточки деяких хімічних речовин, широко вживані у різних споживчих продуктах, проявляють цитотоксичний та генотоксичний ефект, що залежить як від їх походження, розміру наночастинок, що входять до нанокластерів, так і від їх концентрацій (دوزи), терміну взаємодії наночастинок і живої клітини, від того чи знаходяться наночастинок у «захисних конструкціях», створених з інших проективних сполук та від об'єктів-мішеней, на які вони впливають.

2. Необхідно створити нову методологію та систему контролю як за обігом наночастинок у навколишньому середовищі, так і при контролюванні їх безпечності для здоров'я, при включенні їх у складі лікарських засобів, у тому числі і у ветеринарних імунобіологічних препаратах.

NANOTECHNOLOGY AND BIO-RISKS

Z. S. Klestova, A. N. Golovko

State Scientific-Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms

S U M M A R Y

Getting new know ledge launches new research areas, one of these is nanotechnology. Made new materials composed of nanoparticles as metals and other chemicals. These materials have found widespread adoption in different areas, including in bio-medical. But apart from new features and new capabilities of the introduction of these materials, we have new challenges in the field of health, faced with the emergence of new bio-risks. Nano-toxicology revealed new data on the toxic effect of some nano-chemicals investigated the molecular mechanisms of toxigenic effects on living cells and their genome. Once in the environment, water, medicines, some are new nanoparticles as a new anthropogenic factor that compels us to predict and control the new bio-risks.

НАНОТЕХНОЛОГИИ И БИОРИСКИ

З. С. Клестова, А. Н. Головка

Государственный научно-исследовательский институт биотехнологии
и штаммов микроорганизмов

АННОТАЦИЯ

Новые знания порождают новые научные направления, одним из таких является нанотехнология. Изготовлены новые материалы, в состав которых входят наночастицы как металлов, так и других химических веществ. Эти материалы нашли широкое применение в различных отраслях, в том числе и в биомедицинских использованиях. Но, кроме новых свойств и новых возможностей от внедрения этих материалов, мы получили новые вызовы в сфере здравоохранения, столкнулись с возникновением новых биорисков. Так, нанотоксикология получила новые доказательства токсического действия некоторых наносоединений, исследованы их молекулярные механизмы воздействия на живые клетки и их геном. Оказавшись в окружающей среде, воде, лекарственных средствах, некоторые наночастицы становятся новым антропогенным фактором-нагрузки, что заставляет нас прогнозировать и контролировать новые биориски.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Chor Yong Tay, Yong Yu, Magdiel Ingrid Setyavati*. Presentation matters: Identity of gold nanoclusters capping agent governs intracellular uptake and cell metabolism // *NANO Res.* — 2014. — DOI:10.1007/s12274-014-0441-Z.
2. *Magdiel Ingrid Setyavati, Jianping Xie, David T. Leong*. Phage Based Green Chemistry for Gold Ion Reduction and Gold Retrieval // *Appl. Materials and Interfaces.* — 2013. — P. A-H.
3. *Xun Yuan, Magdiel Ingrid Setyavati, David T. Leong*. Ultra-small Ag⁺-rich nanoclusters as highly efficient nanoreservoirs for bacterial killing // *NANO Res.-Tsinghua University Press.* — 2013. — DOI:10.1007/s 12274-013-0395-6.
4. *Magdiel Ingrid Setyavati, Xun Yuan, Jianping Xie*. The influence of liposomal stability of silver nanomaterials on their toxicity to human cells // *Biomaterials.* — 2014. — 35. — P. 6707–6715.
5. *Xun Yuan, Magdiel Ingrid Setyavati, Audrey ShuTan*. Highly luminescent silver nanoclusters with tunable emissions: cyclic reduction-decomposition synthesis and antimicrobial properties // *NPG Asia Materials.* — 2013. — 5. — 8 p.
6. *Magdiel Ingrid Setyavati, Pheng Kian Stella Khoo, Bao Hui Eng*. Cytotoxic and genotoxic characterization of titanium dioxide, gadolinium oxide and poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in human fibroblasts // *J. Biomed. Materials Res.* — 2012. — v.00A.-is.-o. — P.1-8.
7. *Falck G.C., Lindberg H.K., Suhonen S.* Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂ // *Hum.Exp. Toxicol.* — 2009. — 28. — P. 339.
8. *Magdiel Ingrid Setyavati, C. Y. Tay, S. L. Chia*. TiO₂ nanoparticles cause endothelial cell leakiness by disrupting the hemophilic interaction of VE-cadherin // *Nature communications.* — 2012. — Feb.2013. — 12 p.
9. *Chor Yong Tay, Wanru Fang, Magdiel Ingrid Setyavati*. Nano-hydroxyapatite and nano-titanium Dioxide Exhibit Different Subcellular Distribution and Apoptotic Profile in Human Oral Epithelium // *App. Materials and interfaces.* — 2014. — dx.doi.org/10.1021/am501266a. — 9 p.
10. *Chor Yong Tay, Ping Qiang Cai, Magdiel Ingrid Setyavati*. Nanoparticles strengthen intracellular tension and retard cellular migration // *NANO Letters.* — 2013. — 12. — DOI:10.1021/nl4032549.
11. *Chor Yong Tay, Wanru Fang, Magdiel Ingrid Setyavati*. Reciprocal Response of Human Oral Epithelial cells to Internalized Silicia Nanoparticles // *Part. Syst.Charact.* — 2013. — DOI:10.1002/ppsc.20130011. — 10 p.
12. *Marsela Giovani, Magdiel Ingrid Setyavati, Chor Yong Tay*. Toxicity Profiling of Water Contextual Zinc Oxide, Silver and Titanium Dioxide Nanoparticles in Human Oral and

Gastrointestinal cell systems // *Environmental Toxicology*. — 2014. — DOI:10.1002/tox/ 22.015. —11 p.

13. *Magdiel Ingrid Setyavati, Chor Yong Tay, David Tai Leong*. Exploiting cancer's antioxidative weakness through h53 with nanotoxicology // *Nanomedicine*. — 2014. — 9(4). — P. 369–371.

14. *Magdiel Ingrid Setyavati, Khoo Stella P.K. Eng B. H.* Cytotoxic and genotoxic characterization of titanium dioxide, gadolinium oxide, and poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in human fibroblasts // *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 101 A (30). — 2013. — P. 633–640.

15. *Ng K. W. Khoo Stella P.K, Heng B.C.* The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles // *Biomaterials*. — 2011. — 32. —P. 8218–8225.

16. *Ahamed M., Akhtar M. J., Raja M.* ZnO nanorod-induced apoptosis in human alycolar adenocarcinoma cells via p53, surviving and bax/bcl-2 pathways: role of oxidative stress // *Nanomedicine*. — 2011. — 7(6). — P. 904–913.

17. *Magdiel Ingrid Setyavati, Tay C.Y., Leong D.T.* Effect of zinc oxide nanomaterials-induced oxidative stress on the p53 pathway // *Biomaterials*. — 2013. — 34(38). — P. 10133–10142.

18. *Kee Woei Ng, Stella P. K. Khoo, Boon Chin Heng.* The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles // *Biomaterials*. — 2011. — 32. — P. 8218–8225.

19. Scientific committee g and newly identified health risks. Online. Available from URL: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/index_en.htm.

20. *Nel A., Xia T., Madler I.* Toxic potential of materials at the bnano level // *Science*. — 2006. — 311. — P. 622–627.

21. *Singh N., Manshian B., Jenkins GJS.* Nano-Geno-toxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials // *Biomaterials*. — 2009. — 30. — P. 3891–914.

22. *Obedorster G., Obedorster E., Obedorster J.* Nano emerging discipline evolution from studies of ultrafine particles // *Environ. Health Perspect.* — 2005. — 113. — P. 823–39.

23. *Zhang H. J., Chen B. A., Jian H.* A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment // *Biomaterials*. — 2011. — 32(7). — P. 1906–14.

24. *Khan Y., Durrani S. K., Mehmood M.* Low temperature synthesis of fluorescent ZnO nanoparticles // *Appl. Surf. Sci.* — 2010. — 257. — P. 1756–61.

25. *Liu Y. L., Ai K. L., Yuan Q. H.* Fluorescence-enhanced gadolinium-doped zinc oxide quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging // *Biomaterials*. — 2011. — 32(4). — P. 1185–92.

26. *Zhang P., Liu W. G.* ZnO QDPMAA-cj-PDMAEMA nonviral vector for plasmid DNA delivery and biomaging // *Biomaterials*. — 2010. — 31(11). — P. 3087–94.

27. *Rasmussen J.W., Martinez E., Louka P.* Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications // *Expert Opin Drug Deliv.* — 2010. — 7. — P. 1063–77.

28. *Heng B.C., Zhao X., Xiong S.* Cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles is influenced by cell density and culture format // *Arch. Toxicol.* — 2010. — 85. — P. 695–704.

29. *Heng B.C., Zhao X., Xiong S.* Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress // *Food Chem Toxicol.* — 2010. — 48. — P. 1762–6.

30. *Xia T., Kovochich M., Liang M.* Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties // *ACS Nano*. — 2008. — 2. — P. 2121–34.

31. *Yuan J. H., Chen Y., Zha H. X.* Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nanoparticles // *Coloids Surf B Biointerfaces*. — 2010. — 76. — P. 145–50.
32. *Sharma V., Shukla R. K., Saxena N.* DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells // *Toxicol. Lett.* — 2009. — 185. — P. 211–8.
33. *Yin H., Casey P. S., McCall M. J.* Effects of surface chemistry on cytotoxicity, genotoxicity and the generation of reactive oxygen species induced by ZnO nanoparticles // *Langmuir*. — 2010. — 26. — P. 15399–408.
34. *Magdiel Ingrid Setyavati, Kutty R. V., Tay C. Y.* Novel theranostic DNA nano-scaffolds for the simultaneous detection and killing of *E. coli* and *St. aureus* // *Appl. Materials interfaces*. — 2014. — 06.-DOI:10.1021/am502591.
35. *Zinaida Klestova, Yuriy Prylutskiy, Marina Marchenko.* Cytotoxic and antiviral properties of fullerene C60 in the culture of animal cells // *Int. Conf. “Nanotechnology and Nanomaterials”*. (NANO-2014) — 2014. — Lviv. — 11 p.
36. *Дибкова С. М., Грузіна Т. Г., Ульберг З. Р.* Методичні рекомендації «Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних клітин». — 2009. — 24 с.