

УДК 577.151:579.864.1

**С. М. ДИБКОВА**, кандидат біологічних наук  
**Н. Г. ПІНЧУК**<sup>1</sup>, кандидат ветеринарних наук  
**Т. Г. ГРУЗИНА**<sup>2</sup>, кандидат біологічних наук  
**Л. С. РЄЗНІЧЕНКО**<sup>2</sup>, кандидат біологічних наук  
**З. Р. УЛЬБЕРГ**<sup>2</sup>, доктор хімічних наук, професор  
**В. О. УШКАЛОВ**<sup>1</sup>, доктор ветеринарних наук, член-кореспондент НААН України, професор

**А. М. ГОЛОВКО**<sup>1</sup>, доктор ветеринарних наук, академік НААН України

<sup>1</sup> Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів, м. Київ

<sup>2</sup> Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, м. Київ

## ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ТЕСТУ ЕЙМСА ДЛЯ ОЦІНКИ МУТАГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ

*Використання тесту Еймса при оцінці мутагенності наночастинок металів має певні обмеження. Результати тесту Еймса при оцінці мутагенності наночастинок металів з вираженими антимікробними властивостями не є достовірними. Для наночастинок металів, які характеризуються антимікробною дією, необхідно застосовувати методи оцінки мутагенності з використанням таких тест-чутливих елементів, які виключають наявність нативних бактеріальних клітин.*

Сучасний рівень уваги до продуктів нанотехнологій практично у всіх сферах народного господарства вимагає формування банку біобезпечних та біосумісних наноматеріалів, насамперед для потреб ветеринарної та гуманної медицини [1, 2]. Проте роботи в цьому напрямку стримуються відсутністю законодавчо визначеної методичної бази оцінки біобезпечності наноматеріалів [3]. Одним із основних етапів на шляху вирішення цієї проблеми є в першу чергу створення комплексної системи оцінки біологічної безпеки наноматеріалів різної природи.

До одних з найважливіших показників, які характеризують біобезпечність наноматеріалів, відноситься мутагенність. При оцінці якості нових фармакологічних засобів мутагенність рекомендовано визначати за допомогою «*Allium*» - тесту (виявлення хромосомних аберацій) [4], мікроядерного тесту, репараційного тесту на *Escherichia coli* [5], а також тесту Еймса з використанням гістидинових ауксотрофів *Salmonella*

*typhimurium*, які мають мутації у системі структурних генів біосинтезу гістидину по типу зсуву рамки зчитування, чи по типу заміни пар основ [6].

Застосування тесту Еймса базується на властивості тест-штамів *Salmonella typhimurium* під дією мутагенів відновлювати вихідні біологічні властивості, тобто повертатися від ауксотрофності по гістидину до прототрофного стану [6].

**Метою даної роботи** була оцінка інформативності тесту Еймса для визначення мутагенності наночастинок металів - золота, срібла, міді, цинку, заліза, вісмуту та марганцю.

### **Матеріали і методи.**

Використані в роботі наночастинки металів – золота (Au), срібла (Ag), вісмуту (Bi), міді (Cu), цинку (Zn), заліза (Fe), марганцю (Mn), отримували конденсаційним методом шляхом відновлення солей відповідних металів згідно [7]. Розмір отриманих наночастинок обчислювали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС). Вимірювання проводили на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 (“Malvern Instruments Ltd”, Великобританія).

В роботі були використані наступні нанопрепарати металів різних розмірів та концентрацій: Au (5 нм - 3,9 мкг/мл по металу; 15 нм - 3,86 мкг/мл по металу; 30 нм - 3,9 мкг/мл по металу); Ag (15 нм – 4,3 мкг/мл по металу; 50 нм – 4,3 мкг/мл по металу); Bi (20 нм - 3,8 мкг/мл по металу), Zn (10 нм - 3,4 мкг/мл по металу); Fe (100 нм – 3,8 мкг/мл по металу); Mn (50 нм - 3,0 мкг/мл по металу); Cu (70 нм - 3,5 мкг/мл).

Тестовими штамми слугували *Salmonella typhimurium TA 98* (ауксотроф по гістидину, що має мутації в структурному гені біосинтезу гістидину по типу зсуву рамки зчитування) та *Salmonella typhimurium TA 100* (ауксотроф по гістидину, що має мутації в структурному гені біосинтезу гістидину по типу заміни пар основ). Тест-штами отримані із колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів у ліофілізованому стані. Штами відновлювали на середовищі M56 (середовище 1) наступного складу г/л:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 8,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,7;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,025;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – 0,005; 2% глюкози; рН 7,2 з 0,05 мМ L-гістидину HCl та 0,05 мМ біотину [6].

Для постановки тесту Еймса використовували наступні середовища:

середовище 2 (напіврідке голодне середовище) - 0,5% агару, 0,65% NaCl, 0,05 мМ L-гістидину HCl, 0,05 мМ біотину та середовище 3 (нижнє селективне середовище) - агаризоване середовище M56 (1,6% агару) без L-гістидину.

Активуючою сумішшю в тесті Еймса слугував постмітохондріальний супернатант печінки щурів (фракція S9), 1 мл якого містив НАДФ (4 мкМ),  $\text{MgCl}_2$  (8 мкМ), KCl (33 мкМ), глюкозо-6-фосфат (5 мкМ), Na-фосфатний буфер (100 мкМ). Перед проведенням тесту Еймса активуючу суміш

обов'язково перевіряли на стерильність шляхом посіву на м'ясо-пептонний агар (МПА).

Постановку тесту Еймса проводили за наступною схемою.

1. Приготування сумішей, до складу яких входять: 0,1 мл суспензії тестових бактерій *Salmonella typhimurium TA100* / *Salmonella typhimurium TA98*, що відповідає  $2 \cdot 10^8$  КУО з 0,5 мл активуючої суміші та 0,1 мл тестованої речовини/мутагена позитивного контролю. Вибір концентрацій наночастинок металів здійснювали виходячи з оптимальних співвідношень бактеріальних клітин з наночастинками для прояву біологічної дії.

2. Внесення отриманих сумішей у середовище 2 при 43-45°C.

3. Нашарування тестової суміші на середовище 3.

4. Інкубація протягом 48 годин при  $37 \pm 0,3$ °C.

5. Підрахунок кількості колоній-ревертантів тестових сальмонел від ауксотрофного стану по гістидину до прототрофного.

6. Статистична обробка результатів тестування загальноприйнятими методами [8].

Позитивним контролем слугували мікроорганізми *Salmonella typhimurium TA 98* і *Salmonella typhimurium TA 100*, оброблені нітрозометилсечовиною у концентрації 1мМ.

Негативним контролем слугували не оброблені клітини тестових бактерій мікроорганізми.

Наночастинок металів вважали не мутагенними в тесті Еймса, якщо вони в кількості 1 мг не викликали двократного збільшення кількості зворотніх мутацій порівняно з кількістю спонтанних зворотніх мутацій у негативному контролі.

#### Результати та обговорення

В результаті проведення тестування мутагенності наночастинок металів – Au, Ag, Bi, Cu, Fe, Zn, Mn - були виявлені наступні ефекти.

Обробка клітин *Salmonella typhimurium TA 98* і *Salmonella typhimurium TA 100* наночастинками золота різного розміру спричиняла появу порівняно невеликої кількості гістидинових ревертантів (табл.1).

Таблиця 1.

**Кількість гістидинових ревертантів ( $\text{His}^+$ ) *S. typhimurium TA 98*, *S. typhimurium TA 100* при тестуванні мутагенності наночастинок металів тестом Еймса**

Метал	Розмір наночастинок металу, нм	Концентрація, мкг/мл по металу	Кількість $\text{His}^+$ -ревертантів на чашку Петрі (n=6)	
			<i>Salmonella typhimurium TA 98</i>	<i>Salmonella typhimurium TA 100</i>
Негативний контроль			38±2	45±1
Позитивний контроль			195±24	204±36

Au	5	3,90	47±3	52±1
	15	3,86	15±5	25±1
	30	3,90	8±1	15±2
Ag	20	4,30	11±1	3±2
	50	4,30	17±3	37±3
Bi	20	3,80	8±1	17±1
Fe	110	3,80	2±1	7±1
Zn	10	3,40	3±1	5±1
Mn	50	3,00	8±1	14±1
Cu	70	3,50	2±2	14±1

Показано, що частота реверсії до прототрофного стану у бактерій штаму *Salmonella typhimurium TA 98* при обробці їх наночастиками золота розміром 5 нм незначна і складає 47±3 His<sup>+</sup>-ревертантів на чашку Петрі при кількості 38±2 His<sup>+</sup>-ревертантів у негативному контролі. Аналогічну картину спостерігали і у випадку обробки наночастиками золота розміром 5 нм бактерій тестового штаму *Salmonella typhimurium TA 100*.

Обробка тестових бактерій наночастиками золота розміром 15 та 30 нм також не призводила до збільшення частоти зворотніх мутацій у порівнянні з спонтанним фоном (негативний контроль). Таким чином, отримані дані дозволяють зробити припущення про відсутність мутагенних властивостей у наночастинок золота усіх вивчених розмірів. Проте слід зазначити, що наночастилки золота у розмірному діапазоні 10 - 20 нм, як показано нами раніше [9] проявляли ДНК-ушкоджуючу (генотоксичну) дію. Такі результати без сумніву потребують подальшого уточнення. Приймаючи до уваги, що наночастилки металів в тій чи іншій мірі володіють антибактеріальною дією, можна припустити, що такого біологічного впливу зазнають і His<sup>+</sup>-ревертанти тестових сальмонел при проведенні тесту Еймса.

Тестування мутагенності наночастинок срібла різного розміру тестом Еймса показало, що кількість отриманих гістидинових ревертантів при обробці тестових *S.typhimurium TA 98, TA100* була значно меншою від кількості His<sup>+</sup> в негативних контрольних зразках. Так, у випадку обробки наночастиками срібла розміром 20 нм кількість His<sup>+</sup>-ревертантів *S.typhimurium TA 98* становила 11±1 ревертантів на чашку Петрі, а обробка наночастиками розміром 50 нм спричиняла появу 17±3 His<sup>+</sup> бактерій на чашку Петрі. Ці показники нижчі від показників спонтанного фону. Обробка іншої тестової культури *Salmonella typhimurium TA 100* продемонструвала аналогічну тенденцію. Тому можна судити про відсутність властивостей у вивчених наночастинок срібла. Привертає увагу той факт, що кількість зворотніх мутацій у оброблених наночастиками срібла сальмонел значно менша від спонтанного фону мутацій. Це підтверджує наявність вираженої антимікробну дію наночастинок срібла [10] і викликає сумніви щодо достовірності результатів тесту Еймса в даному випадку.

Оцінка мутагенних властивостей наночастинок вісмуту викликає надзвичайний інтерес, враховуючи їх сучасну перспективність застосування у гуманній та ветеринарній медицині. Беручи до уваги високу токсичність іонів вісмуту, можна очікувати прояву його високої токсичності і в стані наночастинок.

Отримані результати показали, що поява His<sup>+</sup>-ревертантів при обробці наночастинами вісмуту тестових бактерій *Salmonella typhimurium TA 98* і *Salmonella typhimurium TA 100* складала 8±1 His<sup>+</sup>-ревертантів на чашку Петрі у випадку штаму **TA 98** та 17±1 His<sup>+</sup>-ревертантів для штаму **TA 100**.

Ці результати ще раз підтверджують наші припущення про відсутність достовірності результатів тесту Еймса в оцінці мутагенних властивостей тих наночастинок металів, антибактеріальна дія яких доведена.

Оцінка мутагенних властивостей наночастинок заліза, цинку, марганцю та міді продемонструвала практично відсутність мутагенних властивостей таких наночастинок. Як видно з таблиці 1, були отримані поодинокі His<sup>+</sup>-ревертанти.

Таким чином, виконаний комплекс досліджень по оцінці мутагенних властивостей наночастинок металів, перспективних у біотехнології, гуманній та ветеринарній медицині, засвідчив існування певних обмежень для використання тесту Еймса. Так, для наночастинок металів, які характеризуються антимікробною дією, слід застосовувати методи оцінки мутагенності з такими тест-чутливими елементами, які виключають наявність нативних бактеріальних клітин.

### **Висновки**

1. Використання тесту Еймса при оцінці мутагенності наночастинок металів має певні обмеження.
2. Результати тесту Еймса при оцінці мутагенності наночастинок металів з вираженими антимікробними властивостями не є достовірними.
3. Для наночастинок металів, які характеризуються антимікробною дією, необхідно застосовувати методи оцінки мутагенності з використанням таких тест-чутливих елементів, які виключають наявність нативних бактеріальних клітин.

### **Список літератури**

1. *Кобаяси Н.* Введение в нанотехнологию. — Пер. с японск. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. — 134 с.
2. *Головко А.М., Ушкалов В.О., Резніченко Л.С. та інші.* Оцінювання та контролювання біологічної безпеки наноматеріалів у ветеринарній // Вісник аграрної науки. – 2011р. - № 5. – С.24-28.
3. *Трахтенберг М.І., Дмитруха Н.М., Анихтіна О.Л.* Питання безпеки виробництва та застосування наноматеріалів. Матеріали міжнародного

семінару «Етика нанотехнологій та нанобезпека». – 13 жовтня 2011р. Київ, Україна. – с.57.

4. *Abu, Ngozi E., Mba, K. C.* Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems // *Toxicology and Environmental Health Sciences*. — Academic journals, 2011. — Vol.3, No 2 — С. 44-51

5. *Методические* указания по оценке мутагенных свойств фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.// под ред. Хабриева Р.У. - 2005. - 829 с.

6. *Методы* общей бактериологии /под. ред.Ф.Герхарда. – Москва: "Мир". - 1984. - Т.2. – 472 с.

7. *Методические* разработки к практикуму по коллоидной химии / под ред. А.В. Перцова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132с.

8. *Лакин Г.Ф.* Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов– М.: Высш. шк., 1990. – 352с.

9. *Дибкова С.М. , Романько М.Є., Грузіна Т.Г. та інші* Визначення ушкоджень ДНК наночастинками металів, перспективних для біотехнології // *Біотехнологія* . – 2009. -Т.2, №3. – с.80-85.

10. *Чекман І.С.* Нанофармакологія – Київ: ПВП “Задруга”, 2011. - 422с.