

Читайте
онлайн
Read
online

Тютрина В.А., Соседова Л.М., Новиков М.А.

Анализ генотоксичности нанокompозита железа арабиногалактана методом ДНК-комет

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, Ангарск, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Для успешного внедрения в практику железосодержащих наночастиц необходимо понимать их влияние на здоровье человека. Одним из важнейших этапов определения безопасности железосодержащих наночастиц в составе нанокompозитов является исследование их генотоксических свойств как после экспозиции, так и в отдалённом периоде.

Материалы и методы. Самцам белых крыс перорально вводили в течение 10 дней водный раствор нанокompозита Fe арабиногалактана в дозах 500 и 5000 мкг/кг. Образцы крови брали из хвостовой вены. Оценку генотоксического эффекта нанокompозита Fe арабиногалактана на лейкоциты проводили по процентному содержанию ДНК в хвосте ДНК-комет в три срока методом ДНК-комет в щелочной версии: на следующие сутки после окончания экспозиции, через два и четыре месяца для выявления сохранения или отсутствия эффекта.

Результаты. В представленном исследовании на всех этапах эксперимента не выявлено статистически значимого увеличения повреждений ДНК при применении исследуемого нанокompозита в дозе 500 мкг/кг. При этом было обнаружено, что нанокompозит Fe арабиногалактан оказывает негативное воздействие на структуру ДНК в дозе 5000 мкг/кг через сутки после экспозиции.

Ограничения исследования. Эксперимент ограничен исследованием генотоксического эффекта нанокompозита Fe арабиногалактана в дозах 500 и 5000 мкг/кг на самцах белых крыс на следующие сутки после десятидневной экспозиции и в отдалённом периоде через два и четыре месяца.

Заключение. Установлено, что статистически значимые повреждения ДНК клеток крови вызывает применение только нанокompозита Fe арабиногалактана сразу после экспозиции и в наиболее высокой концентрации 5000 мкг/кг, со временем же возникшие повреждения ДНК нивелируются системами репарации. Следовательно, потенциальный генотоксический эффект при применении исследуемого нанокompозита для клеток крови весьма невысок.

Ключевые слова: нанокompозит железа; арабиногалактан; генотоксичность; ДНК-повреждения; метод ДНК-комет

Соблюдение этических стандартов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ ВСИМЭИ (протокол № 1 от 18.12.2017 г.), проведено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей.

Для цитирования: Тютрина В.А., Соседова Л.М., Новиков М.А. Анализ генотоксичности нанокompозита железа арабиногалактана методом ДНК-комет. *Гигиена и санитария*. 2024; 103(10): 1251–1256. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-10-1251-1256> <https://elibrary.ru/ngqwic>

Для корреспонденции: Тютрина Вера Александровна, e-mail: tyutrina.v.a@yandex.ru

Участие авторов: Тютрина В.А. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, статистическая обработка данных, написание текста, редактирование; Соседова Л.М. — концепция и дизайн исследования, редактирование; Новиков М.А. — концепция и дизайн исследования. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Работа выполнена по плану НИР в рамках государственного задания.

Поступила: 10.08.2024 / Поступила после доработки: 30.09.2024 / Принята к печати: 02.10.2024 / Опубликовано: 19.11.2024

Vera A. Tyutrina, Larisa. M. Sosedova, Mikhail A. Novikov

Analysis of the genotoxicity of iron nanocomposite arabinogalactan using the DNA comet method

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, 665827, Angarsk, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Successful implementation of iron-containing nanoparticles into practice requires obtaining knowledge about their effect on human health. One of the most important stages in developing an understanding of the safety of iron-containing nanoparticles in nanocomposites is the study of their genotoxic properties both after exposure and over the long-term period.

The aim of the study is to assess DNA damage in nucleated blood cells in white rats during subacute administration of the Fe nanocomposite arabinogalactan in two different doses one day after exposure, and in 2 and 4 months.

Materials and methods. Male white rats were orally administered an aqueous solution of Fe arabinogalactan nanocomposite at doses of 500 µg/kg and 5000 µg/kg for 10 days. Blood samples were taken from the tail vein. The genotoxic effect of Fe arabinogalactan nanocomposite on leukocytes was assessed by the percentage of DNA in the «DNA comet tail» at 3 times using the alkaline version of the DNA comet assay: on the next day after the end of exposure, and in 2 and 4 months to determine whether the effect was preserved or absent.

Results. In the present study, no statistically significant increase in DNA damage was detected at any stage of the experiment when using the studied nanocomposite at a dose of 500 µg/kg. At the same time, Fe arabinogalactan nanocomposite was found to have a negative effect on the DNA structure at a dose of 5000 µg/kg one day after exposure.

Limitations. The experiment is limited to studying the genotoxic effect of the Fe arabinogalactan nanocomposite at doses of 500 and 5000 µg/kg on male white rats the next day after ten-day exposure and in the late period after 2 and 4 months.

Conclusions. Statistically significant damage to the DNA of blood cells has been established to be caused by the use of only nFe-AG immediately after exposure and at the highest concentration of 5000 µg/kg; over time, the resulting DNA damage is leveled out by repair systems. Consequently, the potential genotoxic effect when using the studied nanocomposite for blood cells is very weak.

Keywords: iron nanocomposite; arabinogalactan; genotoxicity; DNA damages; DNA comet assay

Compliance with ethical standards. The study was approved by the local ethics committee of the East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research (Protocol No. 1 of 12/18/2017), conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments or for Other Scientific Purposes (ETS N 123), Directive 2010/63/EC of the European Parliament and the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

For citation: Tyutrina V.A., Sosedova L.M., Novikov M.A. Analysis of the genotoxicity of iron nanocomposite arabinogalactan using the DNA comet method. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal*. 2024; 103(10): 1251–1256. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-10-1251-1256> <https://elibrary.ru/ngqwic> (In Russ.)

For correspondence: Vera A. Tyutrina, e-mail: tyutrina.v.a@yandex.ru

Contribution: Tyutrina V.A. — concept and design of research, data collection and processing, statistical data processing, text writing, editing; Sosedova L.M. — concept and design of research, editing; Novikov M.A. — concept and design of research. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was carried out according to the research plan within the framework of the state task.

Received: August 10, 2024 / Revised: September 30, 2024 / Accepted: October 2, 2024 / Published: November 19, 2024

Введение

Наночастицы (НЧ) имеют широкие перспективы применения в различных сферах, в том числе медицине и биологии. Всё большую популярность приобретают нанокompозиты с магниточувствительными компонентами. Железосодержащие нанокompозиты благодаря их уникальным свойствам могут применяться в биомедицине в качестве терапевтических и диагностических инструментов. НЧ оксидов Fe интересны прежде всего своим суперпарамагнетизмом, означающим, что частицы не проявляют магнитных свойств без внешнего магнитного поля, а движением таких НЧ можно управлять посредством воздействия внешнего магнитного поля и локализовать их в необходимой области или органе. Суперпарамагнитные НЧ Fe маггемит ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) и магнетит (Fe_3O_4) являются перспективными агентами для магнитной гипертермии, они способны выступать в качестве магнитных векторов и носителей в системах направленной доставки лекарств [1–3]. Поскольку свободное железо склонно к окислению и участвует в образовании опасных свободных радикалов, НЧ Fe без покрытий не могут непосредственно использоваться для доставки лекарственных препаратов. Для устранения этого недостатка НЧ Fe покрывают оболочкой либо встраивают в матричный комплекс для получения защищённой от окисления структуры, устойчивой на воздухе. Так, например, синтезированы стабильные структуры типа «сердцевина — оболочка» из НЧ Fe, покрытых золотом. Покрытия из благородных металлов на поверхности магнитных НЧ не только сохраняют их свойства, но также улучшают биосовместимость [4]. В последние годы одним из приоритетных направлений поиска новых методов лечения стало использование препаратов, изготовленных из растительного сырья, развиваются методы синтеза, в которых НЧ стабилизируются природными полимерами, то есть создаются нанобиокompозиты. Уникальность нанобиокompозитов состоит в проявлении синергизма свойств как материалов центрального ядра, так и природной стабилизирующей матрицы. В Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН синтезированы многофункциональные нанобиокompозиты с использованием оксидов Fe (Fe_2O_3 , Fe_3O_4) и стабилизирующей полимерной матрицы арабиногалактана, получаемой из листьев сибирской. В процессе формирования НЧ арабиногалактан предотвращает агрегацию образующихся в водном растворе НЧ оксидов переходных металлов за счёт их специфического взаимодействия с макромолекулами полисахаридной матрицы [5]. Железо — важнейший для организма металл, участвующий во многих метаболических процессах, однако отравление этим элементом приводит к тяжёлым последствиям. Поскольку Fe является переходным металлом с высокой окислительно-восстановительной активностью, безопасность железосодержащих наноматериалов требует всестороннего изучения. В настоящее время остаётся в значительной степени неизвестным, каким образом НЧ Fe в составе нанокompозитов трансформируются на субклеточном уровне, вызывая различные биологические эффекты. Тем не менее генерация активных форм кислорода (АФК) — ус-

явшаяся парадигма, объясняющая токсические эффекты НЧ [6]. Повышенная продукция АФК приводит к повреждению клеток, в том числе и на уровне ДНК. Повреждение ДНК может служить биоиндикатором, показывающим уровень токсичности воздействующего агента. Следовательно, анализ генотоксического действия нанокompозитов может косвенно указывать на активацию оксидативного стресса в клетках и запуск апоптоза. Методы исследования нарушения целостности ДНК многочисленны. Нами была выбрана щелочная модификация метода ДНК-комет, поскольку данный вариант позволяет оценивать на уровне одной клетки выход не только двунитевых разрывов, составляющих менее 5% общего выхода повреждений ДНК, но и однострунные разрывы и щелочно-лабильные сайты [7]. Исследование генотоксических свойств новых нанокompозитов — важный этап понимания их безопасности. Многие исследования посвящены изучению этой проблемы, и большинство известных нанокompозитов имеют оценку генотоксичности, при этом выводы о генотоксичности НЧ Fe противоречивы даже при изучении одинаковых доз [8, 9]. Кроме того, в литературе отсутствуют сведения о проведении анализа генотоксичности нанокompозитов Fe на полимерных матрицах. Поскольку НЧ Fe способны накапливаться в организме, очевидна необходимость оценки эффективности репарации не только после завершения экспозиции, но и в отдалённом периоде.

Цель исследования — провести анализ повреждений ДНК в лейкоцитах белых крыс при подостром введении нанокompозита Fe арабиногалактана (nFe-АГ) в двух разных дозах через сутки после экспозиции, а также два и четыре месяца.

Материалы и методы

Анализ генотоксического эффекта nFe-АГ проведён на беспородных белых крысах-самцах массой 200–220 г, полученных в виварии ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований». Образцы нанокompозита были синтезированы в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН и представляли собой комплекс элементарного Fe (3,74%) в матрице арабиногалактана со средним диаметром частиц 5 нм. Исследование проводили с соблюдением правил гуманного отношения к животным в соответствии с требованиями «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ВОЗ, Женева, 1985) и «Правилами лабораторной практики» (приказ Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199Н). На проведение исследований получено разрешение Локального этического комитета (протокол № 1 от 18.12.2017 г.). Самцам белых крыс экспериментальной группы ($n = 48$) в течение 10 дней перорально вводили водный раствор nFe-АГ в дозах 500 и 5000 мкг/кг, а животным контрольной группы ($n = 24$) — дистиллированную воду. Образцы крови брали из хвостовой вены. Анализ повреждений ДНК в лейкоцитах проводили в три срока методом ДНК-комет в щелочной версии в соответствии с рекомендациями [10, 11]: на следующие сутки после окончания экспозиции, через два и четыре месяца для

Повреждение ДНК лейкоцитов крови белых крыс при применении разных доз nFe-АГ на трёх этапах исследования, выраженное в содержании ДНК в хвосте комет, %

Damage to DNA in blood leukocytes of white rats when using different doses of nFe-AG at three stages of the study, expressed in the DNA content in the “tail of comets”, %

Этап исследования Study stage	Группа Group	Медиана Median	Процентиль / Percentile		Стандартное отклонение Standard deviation
			Q ₂₅	Q ₇₅	
1	Контроль / Control	4.39	4.22	5.75	1.50
	Опыт 500 / Experiment 500	4.60	2.21	6.93	2.31
	Опыт 5000 / Experiment 5000	7.05*	5.70	8.60	1.65
2	Контроль / Control	4.24	3.33	4.55	1.04
	Опыт 500 / Experiment 500	3.71	2.97	4.58	1.18
	Опыт 5000 / Experiment 5000	5.01	4.37	5.63	0.89
3	Контроль / Control	4.74	4.33	5.86	0.80
	Опыт 500 / Experiment 500	5.07	4.89	5.59	1.20
	Опыт 5000 / Experiment 5000	5.79	5.24	6.06	0.53

Примечание. * – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$).
Note: * – statistically significant differences ($p \leq 0.05$).

выявления сохранения или отсутствия эффекта. Подробно методика анализа описана ранее в нашей статье [12]. В качестве показателя повреждения ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (% ДНК в хвосте комет), поскольку чем больше эта величина, тем более повреждённой является клетка. Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 6.1 (StatSoft, Inc.). Вид распределения признаков оценивали с помощью *W*-критерия Шапиро – Уилка. Так как было установлено ненормальное распределение признаков, для сравнения количественных показателей использовали непараметрический метод *U*-критерия Манна – Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты

В результате эксперимента установлено, что подострое введение nFe-АГ в дозе 500 мкг/кг (группа «Опыт 500») не оказывает статистически значимого негативного влияния на фрагментацию ДНК клеток крови на всех трёх этапах по сравнению с контролем (этапы 1-й, 2-й, 3-й, $p = 0,95; 0,64; 0,43$ соответственно). Однако применение nFe-АГ в дозе 5000 мкг/кг (группа «Опыт 5000») по сравнению с контрольной группой вызвало повреждение клеток крови через сутки после окончания экспозиции, чего не наблюдалось на по-

следующих этапах оценки воздействия (этапы 1-й, 2-й, 3-й, $p = 0,01; 0,19; 0,10$ соответственно). Результаты исследования по группам в виде медианы и интерквартильного диапозона *Me* ($Q_{25}–Q_{75}$) представлены в таблице.

Представляет интерес оценка доли клеток с разной степенью повреждения по экспериментальным группам (рис. 1). На первом этапе исследования доля клеток практически без повреждений (до 5% повреждений) в группе «Контроль» составила 63,5% от общего числа, что сопоставимо с данным показателем для группы «Опыт 500» (67,17%). При этом в группе «Опыт 5000» клеток, не имеющих повреждений, обнаружено 50,5%. Показательно различие доли клеток с достаточно высоким уровнем повреждений (более 15%): 1,38; 5,10 и 10,88% (группы «Контроль», «Опыт 500» и «Опыт 5000» соответственно).

Таким образом, при сравнении полученных результатов на втором этапе эксперимента выявлено увеличение доли клеток без повреждений во всех исследуемых группах (рис. 2).

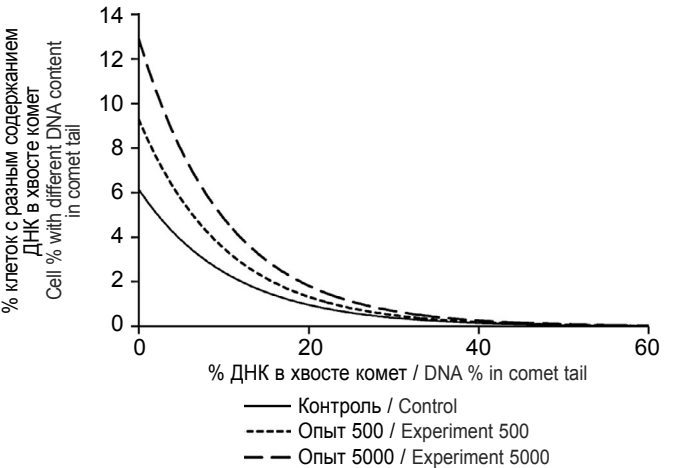


Рис. 1. Экспоненциальная зависимость частоты встречаемости клеток крови с разным уровнем повреждения ДНК через сутки после экспозиции, %.

Fig. 1. Exponential dependence of the frequency of occurrence of blood cells with different levels of DNA damage one day after exposure, %.

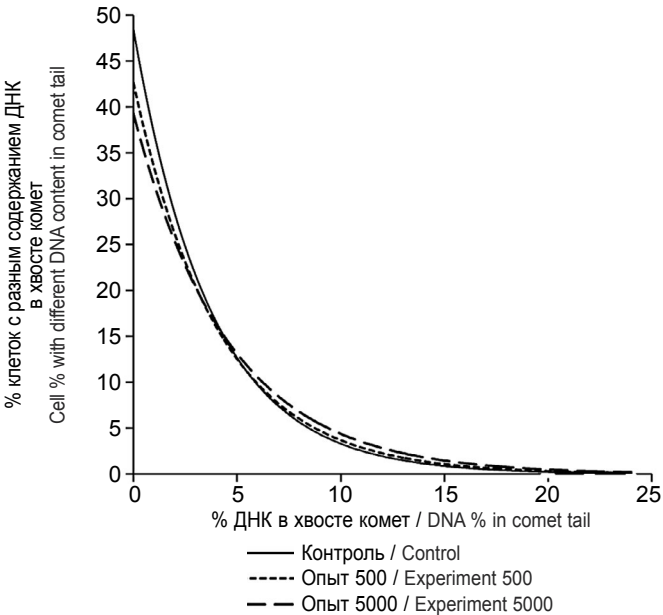


Рис. 2. Экспоненциальная зависимость частоты встречаемости клеток крови с разным уровнем повреждения ДНК через два месяца после экспозиции, %.

Fig. 2. Exponential dependence of the frequency of occurrence of blood cells with different levels of DNA damage 2 months after exposure, %.

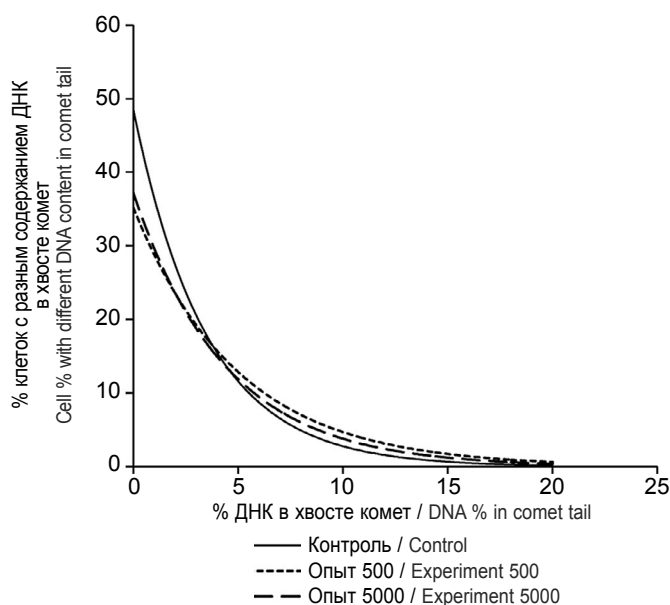


Рис. 3. Экспоненциальная зависимость частоты встречаемости клеток крови с разным уровнем повреждения ДНК через четыре месяца после экспозиции, %.

Fig. 3. Exponential dependence of the frequency of occurrence of blood cells with different levels of DNA damage 4 months after exposure, %.

Доля клеток с повреждением ДНК более 15% уменьшилась и составила 0,75; 1,38 и 3% для групп «Контроль», «Опыт 500» и «Опыт 5000» соответственно, что в 1,84; 3,7 и 3,63 раза меньше, чем на предыдущем этапе.

На третьем этапе во всех экспериментальных группах наблюдалось уменьшение числа клеток без повреждений с увеличением доли клеток со средним уровнем повреждений ДНК (от 5 до 15%) (рис. 3). Доля клеток с повреждениями ДНК более 15% по-прежнему оставалась мала – в группе «Контроль» таких клеток обнаружено не было, в группе «Опыт 500» осталась на том же уровне (1,38%), в группе «Опыт 5000» снизилась до 0,25%.

В нашем эксперименте ни на одном из этапов не было выявлено статистически значимого увеличения повреждений ДНК при введении крысам исследуемого наноконцентра в дозе 500 мкг/кг. При этом было обнаружено, что nFe-АГ оказывает негативное воздействие на структуру ДНК в дозе 5000 мкг/кг через сутки после экспозиции.

Обсуждение

Известно, что Fe поступает в организм не только с пищей, но и другими путями. НЧ Fe в окружающей среде претерпевают различные химические превращения. Это приводит к образованию таких оксидов, как FeO, α -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃ и Fe₃O₄ [13]. Работники многих отраслей подвергаются воздействию мелких (микронных) частиц Fe или оксидов Fe. Особенно подвержены риску как острого, так и хронического отравления люди, работающие на производстве, связанном с промышленными процессами механической и (или) термической обработки металлов, таких как добыча железной руды, обработка стали, сварка и производство пирита, в процессе которых образуются железосодержащие НЧ [14]. Длительное вдыхание НЧ Fe чрезвычайно опасно, что подтверждают многочисленные исследования. В. Wang и соавт. показали, что НЧ Fe₃O₄ субмикронного уровня способны транспортироваться в мозг по пути обонятельного нерва и вызывать повреждение мозга, связанное с окислительным стрессом [15]. А. Peters и соавт. подчеркнули значение окислительного стресса, вызываемого НЧ, в головном мозге, а также оценили возможную связь между длительным воз-

действием НЧ и нейродегенеративными патологиями [16]. Обонятельная луковица, полосатое тело и гиппокамп, по-видимому, являются основными местами отложения НЧ Fe₃O₄ после интраназальной инстилляций [17].

Механизмы генетических повреждений могут быть первичными (прямыми или косвенными) либо вторичными. Первичная генотоксичность, индуцированная НЧ, в первую очередь является результатом прямого взаимодействия НЧ с молекулой ДНК или белками, ассоциированными с ДНК. Это может привести к образованию повреждений ДНК и потенциальному мутагенезу из-за возникновения ошибок репарации или мутаций сдвига рамки считывания (из-за размера НЧ они могут действовать как интеркалирующий агент с парами оснований ДНК) [18]. Косвенная генотоксичность возникает за счёт образующихся в клетке АФК и свободных радикалов в ответ на их взаимодействие с частицами, катализируя реакции Фентона и Хабера – Вейсса, которые являются широкоизвестным механизмом клеточного повреждения [19–21].

При вдыхании НЧ Fe происходит активация фагоцитирующих иммунных клеток как иммунная защита от вторгающихся из окружающей среды частиц и микроорганизмов. Это способствует выведению инородных материалов из лёгочной ткани, через которую в основном проникают в организм НЧ. Если выведение вдыхаемых частиц оказывается безуспешным, возможно формирование хронического воспаления, обусловленного модуляцией внутриклеточных концентраций кальция, активацией факторов транскрипции и индуцирования продукции цитокинов, что в свою очередь способно спровоцировать развитие респираторного взрыва. Этот процесс приводит к образованию порочного круга производства свободных радикалов и активации иммунных клеток. Данный механизм был подтверждён в эксперименте М.Т. Zhu и соавт., которые установили, что при ингаляционном воздействии НЧ Fe₂O₃ размером 22 и 280 нм в дозах 0,8 и 20 мг/кг соответственно у крыс-самцов Sprague Dawley развивалась воспалительная реакция в лёгких с индукцией в клетках АФК и возникали нарушения в системе гемостаза [22]. АФК, вырабатываемые посредством активации никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидазы, были идентифицированы как важный фактор активации нейтрофилов в лёгочной ткани [23]. Воспаление и окислительный стресс ответственны за повреждение биомолекул, в том числе липидов, белков и ДНК, и тем самым способствуют повреждению клеток и тканей, которое может привести к генотоксическим и цитотоксическим эффектам.

Поскольку механизмы возникновения генотоксичности, связанной с НЧ, могут быть как первичными, так и вторичными, а общий профиль токсичности НЧ Fe недостаточно изучен, трудно установить безопасные пределы воздействия на работников, подвергающихся профессиональному риску. Важно разработать гигиенические подходы, обеспечивающие безопасное применение НЧ. Например, использование воздушных фильтров в промышленности позволило удерживать мелкую фракцию твёрдых частиц, однако их использование менее эффективно в отношении ультрамелкой фракции [24]. Отсутствие простых и стандартизированных методов скрининга токсичности НЧ и идентификации их в окружающей среде ограничивает возможность получения полной и достоверной информации о механизмах действия наноматериалов.

В научных публикациях встречаются сведения о влиянии на токсичность наноконцентра различных факторов, таких как тип поверхностного покрытия или продуктов его распада, степень окисления Fe в НЧ, размер НЧ и др. Так, например, Berry C.C. с соавт. проводили исследование цитотоксичности непокрытых НЧ Fe₃O₄ со средним диаметром частиц 8–15 нм (жизнеспособность клеток 79%) и НЧ, покрытых декстрановой либо альбуминовой оболочкой, при воздействии в дозе 50 мкг/мл на фибробласты человека hTERT-BJ1. Причина наблюдаемой цитотоксичности декстран-Fe₃O₄ (жизнеспособность клеток 83%) была объяс-

нена разрушением декстрановой оболочки, в результате чего клеточные компоненты подвергались воздействию цепочек или агрегатов декстран- Fe_3O_4 [25]. Некоторое нарушение мембран клеток после воздействия альбумин- Fe_3O_4 , связанное скорее всего с взаимодействием между альбумином и мембранными жирными кислотами и фосфолипидами, не вызывало гибели клеток [26].

Исследуемый в нашей работе нанокompозит является нанобиокompозитом на основе природной стабилизирующей матрицы — полисахарида арабиногалактана. Безопасность арабиногалактана ранее была установлена E.V. Groman и соавт. При однократном внутривенном введении мышам (5000 мг/кг) и при исследованиях хронической токсичности на крысах (500 мг/кг/день, 90 дней) арабиногалактан из лиственницы западной не вызывал побочных эффектов [27]. Следовательно, можно утверждать, что арабиногалактан является безопасным для применения соединением, однако токсичность его сочетания с НЧ исследована не в полной мере.

Важная составляющая оценки нанокompозита — сравнение генотоксичности элементарных НЧ и НЧ, стабилизированных матрицей, с помощью метода ДНК-комет. В одних исследованиях было установлено, что непокрытые оболочки НЧ менее токсичны, чем встроенные в матрицу [8, 9]. В других исследованиях непокрытые НЧ оксидов Fe оказывали на клетки токсическое воздействие, и было доказано, что покрытие поверхности НЧ оболочкой способно значительно снизить токсичность [8, 28, 29]. В то же время оценка генотоксичности НЧ Fe_3O_4 показала, что применение (3-аминопропил)триметоксисилана (APTMS), APTMS-тетраэтилортосиликата, цитрата и олеата в качестве матрицы приводит к зависящему от концентрации увеличению содержания ДНК в хвосте комет по сравнению с контрольными клетками, то есть свидетельствует о повреждениях ДНК [8, 9]. Нашим исследованием подтверждено отсутствие негативного воздействия на целостность структуры ДНК клеток крови полисахарида арабиногалактана как стабилизирующей матрицы для НЧ Fe_3O_4 .

Наряду с типом используемой матрицы на токсические свойства нанокompозита большое влияние оказывает размер НЧ. Показано, что НЧ Fe диаметром менее 10 нм быстро распределяются по всем органам и тканям при внутривенном введении, в то время как большинство НЧ большего размера (более 100 нм) обнаруживаются в печени и селезенке [30]. В эксперименте Wu L. с соавт. установлено, что сверхмалые НЧ Fe_3O_4 (2,3 и 4,2 нм) были высокотоксичными и вызывали стопроцентную гибель мышей после внутривенного введения в дозе 100 мг/кг в течение 5 ч. Напротив, токсичность НЧ Fe_3O_4 размером 9,3 нм была приближена к контрольным значениям. В экспериментах *in vitro* было показано, что все сверхмалые НЧ Fe_3O_4 (< 5 нм) индуцировали генерацию АФК, в то время как более крупные НЧ не усиливали выработку АФК [31]. Исследуемый в нашей работе нанокompозит имеет в своём составе НЧ со средним диаметром 5 нм. Однако, несмотря на потенциальную токсичность, обусловленную размером применяемых НЧ, развитие генотоксического эффекта было обнаружено только при использовании дозы 5000 мкг/кг через сутки после экспози-

ции. Отсутствие фрагментации ДНК может быть объяснено защитным свойством арабиногалактана. Очевидно, высокая разветвлённость структуры его макромолекул создаёт барьер между клетками и НЧ, как и в случаях применения других матриц, описанных выше.

Таким образом, можно сделать вывод о влиянии на показатель генотоксичности нанокompозитов Fe множества факторов. Как правило, модификация поверхности НЧ помогает уменьшить неблагоприятное воздействие НЧ, однако необходимо внимательно исследовать влияние на цитотоксичность клеток, в том числе и самой матрицы. Важен и размер НЧ, поскольку известно, что чем меньше частицы (до 10 нм), тем выше их опасность. Отсутствие выраженной фрагментации ДНК может быть показателем как низкого числа повреждений, так и высокой индивидуальной эффективности репарации. В нашей работе было установлено, что исследуемый нанокompозит обладает достаточно широким диапазоном безопасной концентрации, а наносимый клеткам ущерб в случае применения nFe-АГ в дозе 5000 мкг/кг подвергается репарации, то есть механизмы репарации не затрагиваются. Кроме того, уменьшение доли клеток с повреждениями на втором и третьем этапах эксперимента по сравнению с первым может быть связано с процессом элиминации клеток с повреждённой ДНК за счёт апоптоза и (или) некроза, поскольку длительность жизни лейкоцитарных клеток в зависимости от их видовой принадлежности составляет от нескольких часов до нескольких лет. Большой интерес вызывает вопрос о влиянии nFe-АГ на интенсивность генерации АФК, который предстоит решить в будущем. Лишь всесторонняя информация позволит сделать серьёзные выводы о соотношении пользы и возможных негативных последствий применения нового соединения. Ранее нами был изучен биологический ответ организма на подострое введение нанокompозита nFe-АГ в дозе 500 мкг/кг. Обнаружены снижение числа нормальных нейронов на единицу площади и развитие белковой дистрофии гепатоцитов, увеличение числа нейронов с экспрессией стресс-белка БТШ 70, нарушение нормальной реологии крови в ткани печени и почек, развитие периваскулярных отёков сосудов головного мозга [32]. Следовательно, отсутствие генотоксического эффекта в клетках крови не исключает возможности возникновения других патологических процессов. Требуется дальнейшее исследование и подбор таких доз, при которых негативные побочные эффекты данного нанокompозита будут минимальными.

Заключение

В нашем эксперименте установлено, что наибольший вред ДНК клеток крови наносит применение nFe-АГ сразу после экспозиции и в наиболее высокой концентрации (5000 мкг/кг). Следовательно, потенциальный генотоксический эффект применения исследуемого нанокompозита для клеток крови незначителен. Полная оценка генотоксического действия nFe-АГ требует дополнительных исследований, в том числе установления отдалённых последствий воздействия на различные органы.

Литература (п.п. 1–3, 6–9, 13–31 см. References)

4. Туранская С.П., Четыркин А.Д., Дубровин И.В., Туров В.В., Горбик П.П. Синтез свойства и применение в экспериментальной медицине и биологии магниточувствительных нанокompозитов, содержащих благородные металлы. *Поверхность*. 2011; (3): 343–66.
5. Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Полимерстабилизированные многофункциональные нанобиокompозиты. В кн.: *Сборник тезисов докладов II Всероссийской конференции по наноматериалам «НАНО 2007»*. Новосибирск; 2007: 346. <https://elibrary.ru/wikqvh>
6. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Сиднева Е.С., Никитина В.А., Оганесянц Л.А. и др. Применение метода щелочного гелевого электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. М.; 2006. <https://elibrary.ru/sevvqt>
7. Дурнев А.Д., Меркулов В.А., Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Середенин С.Б. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гелевого электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1*. М.: Гриф и К; 2012: 115–28. <https://elibrary.ru/wxwgrv>
8. Тютрина В.А., Соседова Л.М., Вокина В.А. Фрагментация ДНК как биоиндикатор воздействия дыма торфяных пожаров. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(7): 653–7. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-7-653-657> <https://elibrary.ru/znogca>
9. Титов Е.А., Соседова Л.М., Новиков М.А. Анализ токсичности нанокompозита оксида железа, инкапсулированного в полимерную матрицу арабиногалактана. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(3): 285–9. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-3-285-289> <https://elibrary.ru/wiwjmo>

References

- Shabatina T.I., Vernaya O.I., Shabatin V.P., Melnikov M.Ya. Magnetic nanoparticles for biomedical purposes: modern trends and prospects. *Magnetochemistry*. 2020; 6(3): 30. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry6030030>
- Perecin C.J., Tirich B.M., Nagamine L.C.C.M., Porto G., Rocha F.V., Cerize N.N.P., et al. Aqueous synthesis of magnetite nanoparticles for magnetic hyperthermia: Formation mechanism approach, high water-dispersity and stability. *Colloid Surface A*. 2021; 127169. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127169>
- Surowiec Z., Miaskowski A., Budzyński M. Investigation of magnetite Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Nukleonika*. 2017; 62(2): 183–6. <https://doi.org/10.1515/nuka-2017-0028>
- Turanskaya S.P., Chetyrkin A.D., Dubrov I.V., Turon V.V., Gorbik P.P. Synthesis, Properties and Applications of Magnetosensitive nanocomposites containing noble metals in experimental medicine and biology. *Poverkhnost'*. 2011; (3): 343–66. (in Russian)
- Aleksandrova G.P., Grishchenko L.A., Sukhov B.G., Trofimov B.A. Polymerstabilized multifunctional nanobiocomposites. In: *Collection of Abstracts of the II All-Russian Conference on Nanomaterials «NANO-2007» [Sbornik tezisev dokladov II Vserossiiskoi konferentsii po nanomaterialam «NANO 2007»]*. Novosibirsk: 2007: 346. <https://elibrary.ru/wikqvh> (in Russian)
- Nel A., Xia T., Mädlar L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006; 311(5761): 622–7. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>
- Olive P.L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999; 75(4): 395–405. <https://doi.org/10.1080/095530099140311>
- Durnev A.D., Zhanataev A.K., Anisina E.A., Sidneva E.S., Nikitina V.A., Oganesyants L.A., et al. The use of the method of alkaline gel-electrophoresis of isolated cells to assess the genotoxic properties of natural and synthetic compounds: Methodological recommendations. Moscow; 2006. <https://elibrary.ru/sevvqt> (in Russian)
- Durnev A.D., Merkulov V.A., Zhanataev A.K., Nikitina V.A., Voronina E.S., Seredenin S.B. Methodological recommendations for the assessment of DNA damage by alkaline gel electrophoresis of individual cells in pharmacological studies. In: *Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Medicines. Part 1 [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' I]*. Moscow: Grif I K; 2012: 115–28. <https://elibrary.ru/wxwgvv> (in Russian)
- Tyutrina V.A., Sosedova L.M., Vokina V.A. DNA fragmentation as a bioindicator of peat fires' smoke exposure. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(7): 653–7. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-7-653-657> <https://elibrary.ru/znogca> (in Russian)
- Paunovic J., Vucevic D., Radosavljevic T., Mandić-Rajčević S., Pantic I. Iron-based nanoparticles and their potential toxicity: Focus on oxidative stress and apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 2020; 316: 108935. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108935>
- Kornberg T.G., Stueckle T.A., Antonini J.A., Rojanasakul Y., Castranova V., Yang Y., et al. Potential toxicity and underlying mechanisms associated with pulmonary exposure to iron oxide nanoparticles: conflicting literature and unclear risk. *Nanomaterials (Basel)*. 2017; 7(10): 307. <https://doi.org/10.3390/nano7100307>
- Wang B., Feng W., Zhu M., Wang Y., Wang M., Gu Y., et al. Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice. *J. Nanopart. Res.* 2009; 11(1): 41–53. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9452-6>
- Peters A., Veronesi B., Calderón-Garcidueñas L., Gehr P., Chen L.C., Geiser M., et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre. Toxicol.* 2006; 3: 13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-3-13>
- Miller R.M., Kiser G.L., Kaysser-Kranich T.M., Lockner R.J., Palaniappan C., Federoff H.J. Robust dysregulation of gene expression in substantia nigra and striatum in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2006; 21(2): 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.07.010>
- Evans S.J., Clift M.J., Singh N., de Oliveira Mallia J., Burgum M., Wills J.W., et al. Critical review of the current and future challenges associated with advanced *in vitro* systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis*. 2017; 32(1): 233–41. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew054>
- Donaldson K., Poland C.A., Schins R.P. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology*. 2010; 4: 414–20. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.482751>
- Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2014; 8(3): 233–78. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464>
- Kehrer J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000; 149(1): 43–50. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00231-6)
- Zhu M.T., Feng W.Y., Wang B., Wang T.C., Gu Y.Q., Wang M., et al. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*. 2008; 247(2–3): 102–11. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.02.011>
- Marriott H.M., Jackson L.E., Wilkinson T.S., Simpson A.J., Mitchell T.J., Buttle D.J., et al. Reactive oxygen species regulate neutrophil recruitment and survival in pneumococcal pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 177(8): 887–95. <https://doi.org/10.1164/rccm.200707-990OC>
- Stone V., Miller M.R., Clift M.J.D., Elder A., Mills N.L., Möller P., et al. Nanomaterials versus ambient ultrafine particles: an opportunity to exchange toxicology knowledge. *Environ. Health Perspect.* 2017; 125(10): 106002. <https://doi.org/10.1289/EHP424>
- Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchison G., Curtis A.S. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*. 2004; 25(23): 5405–13. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.046>
- Berry C.C., Wells S., Charles S., Curtis A.S. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 2003; 24(25): 4551–7. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00237-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00237-0)
- Groman E.V., Enriquez P.M., Jung C., Josephson L. Arabinogalactan for hepatic drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 1994; 5(6): 547–56. <https://doi.org/10.1021/bc00030a010>
- Hong S.C., Lee J.H., Kim H.Y., Park J.Y., Cho J., et al. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *Int. J. Nanomedicine*. 2011; 6: 3219–31. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26355>
- Magdolenova Z., Drlickova M., Henjum K., Rundén-Pran E., Tulinska J., Bilanovic D., et al. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2015; 9(Suppl. 1): 44–56. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.847505>
- Auffan M., Decome L., Rose J., Orsiere T., De Meo M., Briois V., et al. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxicological study. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40(14): 4367–73. <https://doi.org/10.1021/es060691k>
- Lima R.D., Oliveira J.L., Murakami P.S.K., Molina M.A.M., Itri R., Haddad P. Iron oxide nanoparticles show no toxicity in the comet assay in lymphocytes: A promising vehicle as a nitric oxide releasing nanocarrier in biomedical applications. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2013; 429: 012021. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/429/1/012021>
- Feng Q., Liu Y., Huang J., Chen K., Huang J., Xiao K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 2082. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19628-z>
- Wu L., Wen W., Wang X., Huang D., Cao J., Qi X., et al. Ultrasmall iron oxide nanoparticles cause significant toxicity by specifically inducing acute oxidative stress to multiple organs. *Part Fibre. Toxicol.* 2022; 19(1): 24. <https://doi.org/10.1186/s12989-022-00465-y>
- Titov E.A., Sosedova L.M., Novikov M.A. Analysis of toxicity of iron oxide nanocomposite encapsulated in a polymer matrix of arabinogalactan. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(3): 285–9. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-3-285-289> <https://elibrary.ru/wiwjmo> (in Russian)

Сведения об авторах

Тютрина Вера Александровна, канд. фарм. наук, науч. сотр. лаб. биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ ВСИМЭИ, 665827, Ангарск, Россия. E-mail: tyutrina.v.a@yandex.ru

Соседова Лариса Михайловна, доктор мед. наук, профессор, зав. лаб. биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ ВСИМЭИ, 665827, Ангарск, Россия. E-mail: sosedlar@mail.ru

Новиков Михаил Александрович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ ВСИМЭИ, 665827, Ангарск, Россия. E-mail: novik-imt@mail.ru

Information about authors

Vera A. Tyutrina, PhD (Pharm.), researcher of the Laboratory of biomodelling and translational medicine of the East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, 665827, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-9406-5424> E-mail: tyutrina.v.a@yandex.ru

Larisa M. Sosedova, DSc (Med.), Prof., head of the Laboratory of biomodelling and translational medicine of the East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, 665827, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-1052-4601> E-mail: sosedlar@mail.ru

Mikhail A. Novikov, PhD (Biol.), senior researcher of the Laboratory of biomodelling and translational medicine of the East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, 665827, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-6100-6292> E-mail: novik-imt@mail.ru