

ПРОЦЕНКО О.В.^{1✉}, ЯСІНСЬКИЙ Я.¹, ГОРЮНОВА І.І.², ПЛОХОВСЬКА С.Г.²,
 БОРОВА М.М.², ПОСТОВОЙТОВА А.С.², ПІРКО Н.М.^{2✉✉}, ПІРКО Я.В.², ЄМЕЦЬ А.І.²,
 ДЕМИДОВ С.В.¹, КОЗЕРЕЦЬКА І.А.¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»,
 Україна, 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: protsenko.olexandra@gmail.com

² Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: marie0589@gmail.com, nmpirko@gmail.com

✉ protsenko.olexandra@gmail.com, (066) 600-99-90

✉✉ nmpirko@gmail.com, (063) 339-56-71

ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ТА ГЕНОТОКСИЧНОСТІ НАНОЧАСТИНОК Ag₂S, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОЛОГІЧНИХ МАТРИЦЬ, НА ТЕСТ-СИСТЕМІ *DROSOPHILA MELANOGASTER* MG. (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)

Мета. Оцінити токсичність та генотоксичність квантових точок Ag₂S, синтезованих за допомогою міцелію гриба *Pleurotus ostreatus*, на *Drosophila melanogaster*. **Методи.** Токсичність наночастинок визначали, оцінюючи виживаність імаго та личинок. Генотоксичність вивчали у тесті на репарацію. Вплив наночастинок на розвиток репродуктивної системи *D. melanogaster* визначали, оцінюючи кількість оваріол. **Результати.** Показана наявність токсичної дії іонного срібла і відсутність таких ефектів у біосинтезованих наночастинок Ag₂S. Виявлено негативний вплив як біосинтезованих наночастинок Ag₂S, так і біоматриці та іонного срібла на розвиток репродуктивної системи *D. melanogaster*. Не зафіксовано генотоксичної дії всіх досліджуваних зразків. **Висновки.** Біосинтезовані квантові точки Ag₂S не мають токсичних та генотоксичних ефектів на *D. melanogaster* в концентрації 1,5 мг/мл. Однак дія Ag₂S (сіль), біологічної матриці *Pleurotus* та біосинтезованих наночастинок Ag₂S призводить до зменшення кількості оваріол.

Ключові слова: наночастинок Ag₂S, *D. melanogaster*, токсичність, генотоксичність.

Наночастинок сьогодні широко використовуються у багатьох сферах діяльності людини. Здатність наночастинок проникати в тканини, клітини і ядро дає можливість застосування їх і у медицині [1]. Наночастинок срібла – один із найбільш вивчених об'єктів нанотехнологій, що пов'язано з їх використанням у багатьох різних продуктах через їх надзвичайно малий розмір та потенційний антибактеріальний

ефект [2, 3]. Сьогодні наночастинок срібла використовуються як у медичних, так і в біологічних дослідженнях [4]. Однак таке широке застосування ставить питання щодо можливості прямого або опосередкованого впливу наночастинок на живі організми в тих аспектах, які раніше не досліджувалися, або не потрапляли у поле зору фахівців через застосування наночастинок срібла в конкретних методиках. Тому пошук більш біобезпечних форм цих речовин є вкрай актуальним.

Дрозофіла як модельний організм ефективно використовується для оцінки токсичних, мутагенних, канцерогенних та протекторних властивостей широкого спектра хімічних сполук і фізичних факторів, під час дослідження потенційних лікарських засобів і вивчення молекулярних механізмів їх дії. Відомо, що система детоксикації хімічних сполук у дрозофіли влаштована за тим же принципом, що і у людини, і у інших ссавців, а в її основі лежить активність системи цитохрому P-450 [5]. Система цитохрому P-450 у дрозофіли індукційна, сам фермент характеризується наявністю кількох ізоферментних форм у цього виду [6], що свідчить про потенційну можливість активації широкого спектра промутагенів у них [7].

Метою роботи було оцінити токсичність та генотоксичність квантових точок сульфідів срібла (Ag₂S), синтезованих за допомогою біологічних матриць, а саме міцелію гриба *Pleurotus ostreatus*, на тваринній тест-системі з використанням *Drosophila melanogaster*.

© ПРОЦЕНКО О.В., ЯСІНСЬКИЙ Я., ГОРЮНОВА І.І., ПЛОХОВСЬКА С.Г., БОРОВА М.М., ПОСТОВОЙТОВА А.С., ПІРКО Н.М., ПІРКО Я.В., ЄМЕЦЬ А.І., ДЕМИДОВ С.В., КОЗЕРЕЦЬКА І.А.

Матеріали і методи

Характеристика ліній, які використовували для оцінки токсичності наночастинок Ag₂S.

Лінія 1: *mei-9^a mei-41^{D5} / FM7c; mwh*. Гени *mei-9^a* та *mei-41^{D5}* розташовані в X хромосомі, мутації в них призводять до дефектів в ексцезійній та постреплікативній репарації відповідно. Ген *mwh* знаходиться в третій хромосомі, мутації в ньому спричиняють формування множинних волосків у клітинах міжжилкового простору крила. (Лінія отримана з Kyoto stock center).

Лінія 2: *Oregon R(R)*. Лінія дикого типу.

Поживне середовище та умови експерименту. До 4 мл стандартного поживного середовища [8] додавали 0,5, 1 та 2 мл маточного розчину біосинтезованих наночастинок Ag₂S, концентрація якого складала 3 мг/мл. Окремо оцінювали вплив на модельний об'єкт сульфиду срібла та біологічної матриці, на основі якої відбувався біологічний синтез наночастинок, додаючи їх в аналогічних концентраціях до середовища.

У якості негативного контролю використовували стандартне поживне середовище, а позитивного – стандартне середовище з додаванням циклофосфаміду у концентрації 0,2 мг/мл.

Методи. Для дослідження токсичності наночастинок визначали їх вплив на виживаність імаго, тривалість розвитку та виживаність личинок (кількість отриманих особин імаго в F1) мух лінії *Oregon R(R)*, які виростили на середовищі з додаванням та без додавання наночастинок Ag₂S, отриманих за допомогою біологічного синтезу та іонного срібла у відповідних концентраціях.

Вживаність оцінювали за кількістю мух лінії *Oregon R(R)*, які не загинули на 10-й день після посадки на середовище з додаванням досліджуваних зразків.

Можливий генотоксичний ефект вивчали у тесті на репарацію ДНК (DNA reparation test) [9]. Для цього схрещували віргінних самок лінії 1 з самцями лінії 2, в кожну пробірку саджали по 3 самки та 2 самці. Схрещування проводили безпосередньо в пробірках із дослідним середовищем. Отже, весь життєвий цикл отриманих у досліді нащадків проходив на середовищі, що містило зразки (біологічна матриця, наночастинки, іонний Ag⁺) в певних концентраціях. Надалі проводили аналіз F1, розділяючи мух на такі

класи: 1) самки, які мали червоні очі округлої форми або полосковидні (зменшена кількість фасеток ока в результаті мутації *Bar*) (f(female)); 2) самці, які характеризувалися порушенням системи репарації ДНК, а також жовтими округлими очима (m(male)1); 3) самці з непорушеною системою репарації, з білими полосковидними очима (m2) [9].

Вживання кожного класу мух оцінювали як співвідношення кількості мух в дослідній культурі до кількості мух, отриманих у контрольній групі. Генотоксичність зразка оцінюється як наявна, коли співвідношення виживання особин зазначених класів (m1 / f і m1 / m2) становить менше 0,1 і 1 відповідно.

Вплив наночастинок на репродуктивну систему *D. melanogaster* визначали, оцінюючи кількість оваріол у самок лінії *Oregon R(R)*, які розвивалися на досліджуваному середовищі. Для цього на середовище висаджували одну самку та одного самця дикого типу. Особини першого покоління відсаджували в окремі пробірки. Розвиток оваріол оцінювали за кількістю оваріїв у кожній оваріолі у самок п'ятидобового віку. Всі досліди проводили в трьох повторностях.

Результати та обговорення

Для дослідження токсичності наночастинок визначали їх вплив на виживаність, тривалість розвитку та плодючість (кількість отриманих особин імаго в F1) мух лінії *Oregon R(R)*, які розвивалися на середовищі з додаванням та без додавання наночастинок Ag₂S, отриманих шляхом біологічного синтезу, чи сульфиду срібла у відповідних концентраціях.

Під час оцінки токсичності зразків не було зафіксовано затримки в розвитку мух, також не було відмічено загибелі особин на 10-й день після посадки на середовище з додаванням наночастинок. Що стосується оцінки виживаності личинок, то у мух, які розвивалися на середовищі з додаванням сульфиду срібла Ag₂S у концентрації 1,5 мг/мл, вона була зниженою (рис. 1). Також слід зазначити, що матриця, на основі якої здійснювали біосинтез наночастинок а, не мала відповідного впливу на *D. melanogaster*. Відомо, що наночастинки срібла мають виражений токсичний ефект. Так, в роботі [10] на щурах було показано, що введення їм наночастинок срібла призводить до значних уражень різних органів. Також у роботі на *D. melanogaster* [11] показано зниження життєздатності

личинок, які виростили на середовищі з додаванням наночастинок срібла. Однак використання сульфиду срібла характеризується меншими негативними впливами на організм [12].

Є роботи що показують не лише токсичний вплив срібновмісних наночастинок на живі організми, а і його негативні наслідки саме для репродуктивної системи. Так, у роботі [13], проведеної на *D. melanogaster*, показано, що вони призводять до утворення активних форм кисню, які і є причиною передчасної диференціації статевих клітин, а відповідно і їх загибелі. Дослідження впливу наночастинок Ag_2S у куль-

турі перероджених клітин засвідчили їх слабкий ефект на проліферацію клітин, запуск апоптозу та некрозу [14].

У нашій роботі ми, аналізуючи вплив наночастинок Ag_2S на розвиток репродуктивної системи *D. melanogaster*, показали зниження кількості оваріол у самок, яких вирощували на середовищах як із додаванням іонного срібла чи наночастинок Ag_2S , отриманих біологічним синтезом, так і на середовищі, до якого додавали лише біологічну матрицю в концентрації 1,5 мг/мл (рис. 2).

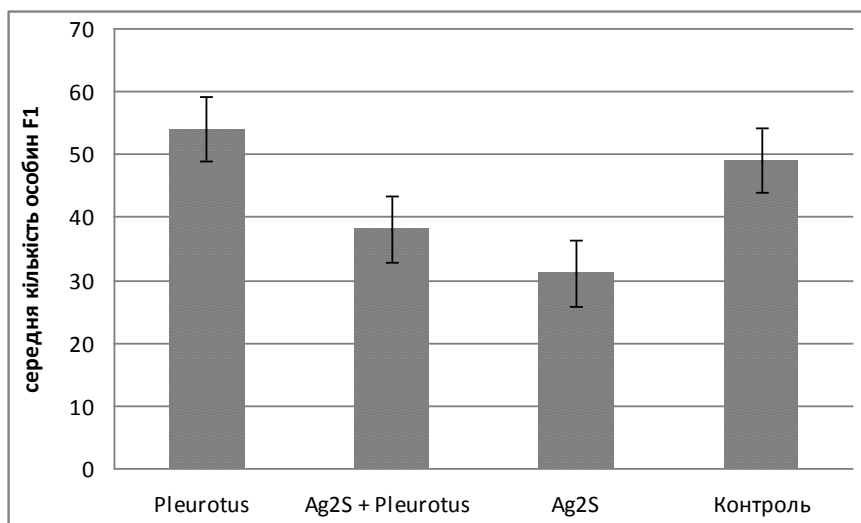


Рис. 1 Середня кількість личинок, які виростили на середовищах без (контроль) та з додаванням біологічної матриці (*Pleurotus*), наночастинок Ag_2S , синтезованих за використання матриці ($Ag_2S + Pleurotus$) та іонного срібла (Ag_2S):* – достовірні відмінності у порівнянні з контролем за $p < 0,05$.

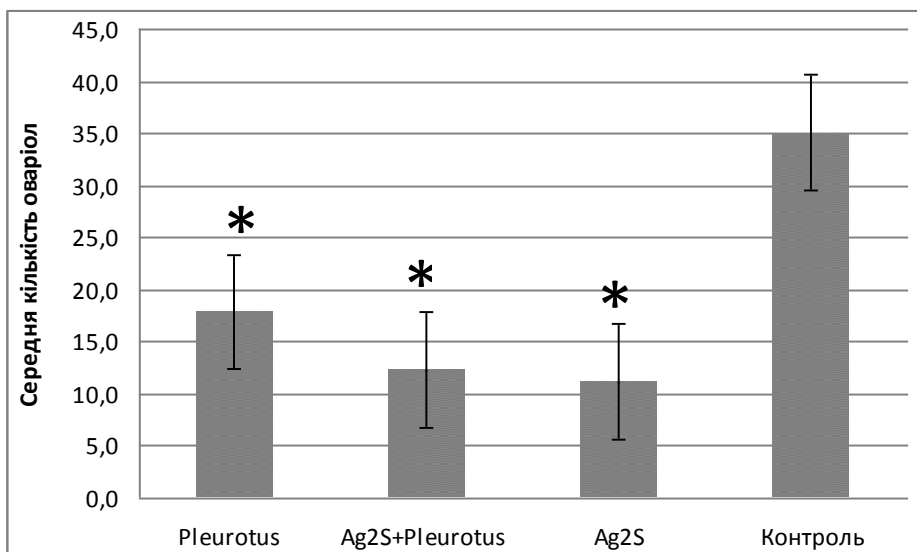


Рис. 2. Середня кількість оваріол у особин, які виростили на середовищах без (контроль) та з додаванням біологічної матриці (*Pleurotus*), наночастинок Ag_2S , синтезованих за використання матриці ($Ag_2S + Pleurotus$) та сульфиду срібла (Ag_2S):* – достовірні відмінності у порівнянні з контролем за $p < 0,05$.

Таблиця. Співвідношення фенотипових класів мух в експерименті на мутагенність

Варіанти досліду	Середня кількість особин			Співвідношення класів	
	Самки (f)	Самці (m1)	Самці (m2)	m1 / f	m1 / m2
<i>Pleurotus</i>	21,7	7,6	3,4	0,35	2,24
Ag ₂ S + <i>Pleurotus</i>	22,0	8,2	3,8	0,37	2,16
Ag ₂ S	21,9	7,9	3,6	0,36	2,19
Контроль	21,9	7,9	3,6	0,36	2,19
Циклофосфамід	21,8	7,9	3,6	0,16	0,46

Примітка. Результати вважаються позитивними у випадку, коли $m1/f \leq 0,1$, а $m1/m2 \leq 1$.

Такий результат свідчить про негативний вплив усіх досліджуваних зразків на репродуктивну систему *D. melanogaster*. Негативний вплив матриці на кількість оваріол можна пояснити не характерним для *D. melanogaster* харчовим субстратом. Таким чином, біологічний синтез наночастинок Ag₂S не знижує їх негативного впливу на розвиток репродуктивної системи дрозофіл, що узгоджується з експериментами *in vitro* [14].

Дані стосовно генотоксичності наночастинок срібла, наявні в літературі, не однозначні, оскільки існують як роботи, в яких показано, що вони здатні викликати порушення генетичного матеріалу [10], так і публікації, які свідчать про відсутність мутагенної та рекомбіногенної дії наночастинок срібла [15]. В експериментах із застосуванням культури клітин пухлин продемонстровано слабку генотоксичну дію Ag₂S [14].

У наших експериментах на мутагенність не було отримано результатів, які могли б свідчити про мутагенність речовин, що вивчалися (табл.). Отримані нами результати можуть пояснюватися запуском у дрозофіли індуцубель-

ної системи репарації, що могла б пояснити відсутність мутагенної дії Ag₂S на рівні організму.

Висновки

1. Сульфід срібла Ag₂S у концентрації 1,5 мг/мл призводить до зниження виживання личинок у порівнянні з контролем та біологічною матрицею *Pleurotus*.

2. Як сульфід срібла, так і біологічна матриця *Pleurotus* та біосинтезовані наночастинок Ag₂S у концентрації 1,5 мг/мл, додані до поживного середовища, на якому розвивалися дрозофіли, призводять до зменшення кількості оваріол в оваріях імаго.

3. Результат тесту на мутагенність свідчить про відсутність мутагенної дії біосинтезованих наночастинок Ag₂S на *Drosophila melanogaster*.

Робота виконана за фінансової підтримки проекту Національної академії наук України для Відділення цільової підготовки Київського національного університету ім. Т. Шевченка «Зелений» синтез та оцінка біобезпечності квантум-дот наночастинок сульфиду срібла» (проект № 24 б (2017–2018).

Література

1. Абаева Л.Ф., Шумский В.И., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Любченко П.Н. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра *Альманах клинической медицины*. 2010. № 22. С. 10–16.
2. Lem K.W., Choudhury A., Lakhani A.A., Kuyate P., Haw J.R., Lee D.S., Iqbal Z., Brumlik C.J. Use of nanosilver in consumer products. *Rec Pat Nanotec*. 2012. Vol. 6. P. 60–72.
3. Faria A.F., Martinez D.S.T., Meira S.M.M., Moraes A.C.M., Brandelli A., Souza Filho A.G., Alves O.L. Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets. *Colloid Surf B*. 2014. Vol. 113. P. 115–124.
4. Durbn N., Silveira C.P., Durbn M., Martinez D.S.T. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *J Nanobiotechnol*. 2015. 13. P. 55. doi: 10.1186/s12951-015-0114-4.
5. Wilkinson C.F., Brattsten L.B. Microsomal drug metabolizing enzymes in Insects. *Drug Metab. Rev.* 1972. Vol. 1. P. 153.
6. Zijlstra J.A., Vogel E.W., Breimer D.D. Pharmacological and toxicological aspects of mutagenicity research in *Drosophila melanogaster*. *Reviews in Biochemical Toxicology*. Vol. 8. Eds E. Hodgston J.R. Bend R.M. Philpot. Amsterdam: Elsevier, 1987.
7. Захаренко Л.П., Захаров И.К. Оценка мутагенности химических соединений, физических факторов и неидентифицированных компонентов загрязнения окружающей среды методом соматических мозаиков на клетках крыла *Drosophila melanogaster*. *Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2016. Т. 20, № 1. С. 72–77.
8. Ashburner M., Golic K., Hawley R. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. 2nd ed. York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. 1370 p.
9. Fujikawa K. Genotoxic potency in *Drosophila melanogaster* of selected aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons as assayed in the DNA repair test *Mutation Research*. 1993. No. 290. P. 175–182.

10. Wen H., Dan M., Yang Y., Lyu J., Shao A., Cheng X, et al. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, No. 9. P. 1–16. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185554>.
11. Raj A., Shah P., Agrawal N. Dose dependent effect of silver nanoparticles (AgNPs) on fertility and survival of *Drosophila*: An in-vivo study *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, No. 5. P. 1–14. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178051>.
12. Miclaýus T., Beer C., Chevallier J., Scavenius C., Bochenkov V.E., Enghild J.J., Sutherland D.S. Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation *in vitro*. *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7, No. 11770. P. 1–10 doi: 10.1038/ncomms11770.
13. Ong C., Lee Q.Y., Cai Y., Liu X., Ding J., Yung L.L., Bay B., Baega G. Silver nanoparticles disrupt germline stem cell maintenance in the *Drosophila* testis. *Sci. Rep.* 2016. P. 1–10.
14. Zhang Y., Hong G., Zhang Y., Chen G., Li F., Dai H., Wang Q. Ag₂S quantum dot: a bright and biocompatible fluorescent nanoprobe in the second near-infrared window. *ACS Nano*. 2012. Vol. 6, No. 5. P. 3695–3702. doi: 10.1021/nn301218z.
15. Haza A.I.B., Drosopoulou E., Mavragani-Tsipidou P., Morales P. *In vivo* genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila*. *Food Chem Toxicol.* 2015 Vol. 85. P. 114–119. doi: 10.1016/j.fct.2015.06.024.

References

1. Абаева Л.Ф., Шумский В.И., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Любченко П.Н. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра *Альманах клинической медицины*. 2010. № 22. С. 10–16.
2. Lem K.W., Choudhury A., Lakhani A.A., Kuyate P., Haw J.R., Lee D.S., Iqbal Z., Brumlik C.J. Use of nanosilver in consumer products. *Rec Pat Nanotec.* 2012. Vol. 6. P. 60–72.
3. Faria A.F., Martinez D.S.T., Meira S.M.M., Moraes A.C.M., Brandelli A., Souza Filho A.G., Alves O.L. Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets. *Colloid Surf B.* 2014. Vol. 113. P. 115–124.
4. Durón N., Silveira C.P., Durón M., Martínez D.S.T. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *J Nanobiotechnol.* 2015. 13. P. 55. doi: 10.1186/s12951-015-0114-4.
5. Wilkinson C.F., Brattsten L.B. Microsomal drug metabolizing enzymes in Insects. *Drug Metab. Rev.* 1972. Vol. 1. P. 153.
6. Zijlstra J.A., Vogel E.W., Breimer D.D. Pharmacological and toxicological aspects of mutagenicity research in *Drosophila melanogaster*. *Reviews in Biochemical Toxicology*. Vol. 8. Eds E. Hodgston J.R. Bend R.M. Philpot. Amsterdam: Elsevier, 1987.
7. Zakharenko L.P., Zakharov I.K. Determination of mutagenicity of chemical compounds, physical factors and environmental pollutants by the *Drosophila melanogaster* wing somatic mutation and recombination test. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016. Vol. 20, № 1. P. 72–77. doi: 10.18699/VJ16.113.
8. Ashburner M., Golic K., Hawley R. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. 2nd ed. York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. 1370 p.
9. Fujikawa K. Genotoxic potency in *Drosophila melanogaster* of selected aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons as assayed in the DNA repair test *Mutation Research*. 1993. No. 290. P. 175–182.
10. Wen H., Dan M., Yang Y., Lyu J., Shao A., Cheng X, et al. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, No. 9. P. 1–16. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185554>.
11. Raj A., Shah P., Agrawal N. Dose dependent effect of silver nanoparticles (AgNPs) on fertility and survival of *Drosophila*: An in-vivo study *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, No. 5. P. 1–14. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178051>.
12. Miclaýus T., Beer C., Chevallier J., Scavenius C., Bochenkov V.E., Enghild J.J., Sutherland D.S. Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation *in vitro*. *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7, No. 11770. P. 1–10. doi: 10.1038/ncomms11770.
13. Ong C., Lee Q.Y., Cai Y., Liu X., Ding J., Yung L.L., Bay B., Baega G. Silver nanoparticles disrupt germline stem cell maintenance in the *Drosophila* testis. *Sci. Rep.* 2016. P. 1–10.
14. Zhang Y., Hong G., Zhang Y., Chen G., Li F., Dai H., Wang Q. Ag₂S quantum dot: a bright and biocompatible fluorescent nanoprobe in the second near-infrared window. *ACS Nano*. 2012. Vol. 6, No. 5. P. 3695–3702. doi: 10.1021/nn301218z.
15. Haza A.I.B., Drosopoulou E., Mavragani-Tsipidou P., Morales P. *In vivo* genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila*. *Food Chem Toxicol.* 2015 Vol. 85. P. 114–119. doi: 10.1016/j.fct.2015.06.024.

PROTSENKO O.V.¹, YASINSKIY Ya.¹, HORIUNOVA I.I.², PLOHOVSKA S.H.², BOROVAYA M.N.², POSTOVOITOVA A.S.², PIRKO N.M.², PIRKO Ya.V.², YEMETS A.I.², DEMIDOV S.V.¹, KOZERETSKA I.A.¹

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of Biology and Medicine, Ukraine, 01033, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: protsenko.olexandra@gmail.com

² Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Akademiya of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: nmpirko@gmail.com

EVALUATION OF TOXICITY AND GENOTOXICITY OF NANO NANOPARTICLES Ag₂S, SYNTHESISED BY BIOLOGICAL MATRIX, ON *DROSOPHILA MELANOGASTER* MG. (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)

Aim. To evaluate the toxicity and genotoxicity of Ag₂S quantum dots that had been synthesized by the mycelium of the fungus *Pleurotus ostreatus* on *Drosophila melanogaster*. **Methods.** The toxicity of nanoparticles was determined by

assessing the survival rate of imagos and larvae. Genotoxicity was studied in the reparation test. The influence of nanoparticles on the development of the *D. melanogaster* reproductive system was determined by evaluating the number of ovarioles. **Results.** The toxic effects of ionic silver and the absence of such effects in biosynthetic Ag₂S nanoparticles had been shown. The negative influence of biosynthesized Ag₂S nanoparticles and biomaterials and ionic silver on the development of *D. melanogaster* reproductive system had been revealed. There was no genotoxic effect for all investigated specimens. **Conclusions.** Ag₂S biosynthesized quantum dots do not have a toxic and genotoxic effects on *D. melanogaster* at the concentration of 1.5 mg/ml. However, the action of Ag₂S (salt), the biological matrix *Pleurotus* and biosynthetic Ag₂S nanoparticles leads to a decrease in the number of ovarioles.

Keywords: Ag₂S nanoparticles, *D. melanogaster*, toxicity, genotoxicity.