Генотоксичность катионных липопептидных наночастиц

Анисина Е.А.¹, Жанатаев А.К.¹, Лисицын А.А.¹, Шиловский И.Р.², Колоскова О.О.², Хаитов М.Р.², Дурнев А.Д.¹

- 1 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8.
- 2 ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России 115478, г. Москва, Каширское шоссе, дом 24.

Наночастицы при однократном и многократном введении увеличивают уровень повреждений ДНК в легких, печени и почках мышей, а также в клетках костного мозга *in vitro*. В условиях однократного и многократного введения наночастицы не индуцируют хромосомные аберрации в клетках костного мозга мышей.

Ключевые слова: катионные липопептидные наночастицы, ДНК-кометы, генотоксичность, хромосомные аберрации

Для цитирования: Анисина Е.А., Жанатаев А.К., Лисицын А.А., Шиловский И.Р., Колоскова О.О., Хаитов М.Р., Дурнев А.Д. Генотоксичность катионных липопептидных наночастиц. *Медицинская генетика* 2020; 19(9): 65-66.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.65-66

Автор для корреспонденции: Анисина E.A.; e-mail: anisinalena@yandex.ru

Финансирование. Государственное задание.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020.

Genotoxicity of cationic lipopeptide nanoparticles

Anisina E.A.1, Zhanataev A.K.1, Lisitsyn A.A.1, Shilovskiy I.P.2, Koloskova O.O.2, Khaitov M.R.2, Durnev A.D.2

- Zakusov Research Institute of Pharmacology Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315, Russia
- 2 NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia Kashirskoye Hwy 24, Moscow, 115478, Russia.

A single and repeated doses of nanoparticles caused DNA damage in the liver, lung and kidney of mice as well as in the *in vitro* comet assay on bone marrow cells. No statistically significant increase in the percentage of cells with chromosomal aberrations was observed in mice treated with nanoparticles after a single or repeated injection.

Key words: cationic lipopeptide nanoparticles, genotoxicity, comet assay, chromosome aberrations

For citation: Anisina E.A., Zhanataev A.K., Lisitsyn A.A., Shilovskiy I.P., Koloskova O.O., Khaitov M.R., Durnev A.D. Genotoxicity of cationic lipopeptide nanoparticles. *Medical genetics*. 2020; 19(9): 65-66. (In Rus).

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.65-66

Corresponding author: Anisina E.A.; e-mail: anisinalena@yandex.ru

Funding. State assignment.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020

Вобласти фармакологии наблюдается интенсификация разработки и внедрения в практику лекарственных средств на основе нанотехнологий. Вместе с тем, применение наноносителей в клинике часто происходит на фоне отсутствия адекватной, научно-обоснованной оценки их безопасности [1,2]. Липидные наночастицы широко используются в последнее десятилетие в качестве носителей для доставки терапевтических олигонуклеотидов (ДНК, siPHK, мРНК и др.) [3]. Токсичность катионных липопептидных наночастиц хорошо изучена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, в то время

как сведения о их генотоксическом потенциале отсутствуют. Отличительные особенности проявления генотоксических эффектов наночастиц определяют необходимость оптимизации существующей методологии оценки генотоксичности, в частности применения высокочувствительных тестов оценки повреждений ДНК [1,4].

Цель исследования — оценка ДНК-повреждающей активности методом ДНК-комет *in vitro* и *in vivo* и цитогенетической активности *in vivo* используемых в качестве наноносителей лекарственных средств катионных липопептидных наночастиц.

Материалы и методы

Для оценки индукции повреждений ДНК липопептидные наночастицы в дозах 8, 20 и 40 мг/кг вводили мышам подкожно, в область холки, однократно с получением препаратов через 3 и 24 часа и 3, 7 и 14 суток после введения. В дозах 2 и 8 мг/кг наночастицы вводили ежедневно в течение 7 дней с 24-часовым интервалом с получением препаратов через 24 часа после последнего введения. Суспензии клеток печени, легкого, почки и селезенки вносили в 1% раствор легкоплавкой агарозы и наносили на предварительно покрытые 1% универсальной агарозой предметные стекла, покрывали покровным стеклом и помещали на лед. Метод ДНКкомет проводили в щелочной версии. Препараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I. Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе, совмещенном с цифровой камерой высокого разрешения. Полученные с микропрепаратов изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (%ДНК в хвосте). С каждого микропрепарата снимали и анализировали не менее 100 ДНК-комет.

В экспериментах *in vitro* наночастицы вносили в суспензии клеток костного мозга мышей в конечных концентрациях 2,5, 5, 10, 20, 40 и 100 мкг/мл и инкубировали в течение 1 и 3 часов. Получение и анализ препаратов ДНК-комет проводили как описано выше.

Для оценки цитогенетической активности наночастицы в дозах 2, 8, 20 и 40 мг/кг вводили животным подкожно, в область холки, однократно и многократно, в течение 7 дней с интервалом в 24 часа. Цитогенетические препараты костного мозга бедренных костей готовили стандартным суховоздушным методом. Окраску производили азур-эозином. Цитогенетический анализ проводили при масло-иммерсионном увеличении х1000. Учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), одиночными и парными фрагментами хромосом, обменами различного типа и клетки с множественными повреждениями. От каждого животного анализировалось по 100 метафаз.

Результаты

Через 3 часа после однократного введения мышам не зарегистрировано статистически значимого влияния наночастиц на уровень ДНК-повреждений в клетках печени, почек, легкого и селезенки. Через 24 часа после введения увеличение поврежденности ДНК выявлено в легких (доза 40 мг/кг), печени (20 и 40 мг/кг) и дозозависимо в почках во всех использованных дозах. На 3 сутки после однократного введения наночастиц повышенный уровень повреждений ДНК зарегистрирован в почках мышей для доз 20 и 40 мг/кг и легкого для дозы 40 мг/кг. На 7 и 14 сутки геноток-

сический эффект наночастиц (20 и 40 мг/кг) выявлялся в почках. В условиях многократного 7-дневного введения наночастицы в дозах 2, 8 и 20 мг/кг увеличивали поврежденность ДНК в почках, в дозах 8 и 20 мг/кг — в печени и в дозе 20 мг/кг — в легких.

Наночастицы в концентрациях 2, 5 и 10 мкг/мл в условиях 1-часовой экспозиции статистически значимо, более чем в два раза, увеличивали уровень повреждений ДНК в клетках костного мозга *in vitro*. В концентрациях 20 и 40 мкг/мл превышение контрольного уровня поврежденности ДНК составило 4,8 и 5-крат, соответственно. В максимальной концентрации 100 мкг/мл наблюдалось также увеличение оцениваемого показателя, однако различия не достигли статистической значимости. После 3-часовой экспозиции клеток костного мозга наночастицами не выявлено статистически значимых различий между контрольной и экспериментальными группами.

Использованные в дозах 2, 8, 20 и 40 мг/кг наночастицы как при однократном, так и при многократном введении не проявили цитогенетической активности.

Таким образом, катионные липопептидные наночастицы проявляют генотоксическую активность в условиях *in vitro* и *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют в пользу предложенной ранее стратегии, предусматривающей оценку генотоксичности нанопроизводных в тестах на млекопитающих *in vivo* в нескольких тканях при различных сроках и режимах экспозиции, а также обосновывают целесообразность использования с этой целью высокочувствительного метода ДНК-комет, в том числе с проведением экспериментов в условиях *in vitro*.

Литература

- 1. Дурнев А.Д. Оценка генотоксичности наночастиц при использовании в медицине. *Гигиена и санитария 2014;(2):82–88*.
- Elespuru R., Pfuhler S., Aardema M.J. et al. Genotoxicity Assessment of Nanomaterials: Recommendations on Best Practices, Assays, and Methods. Toxicol Sci. 2018, 164(2):391–416.
- Shah, M.R., Imran M., Ullah S., 2017. Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis. 1st ed. William Andrew Publishing. New York
- Karlsson, H.L., Di Bucchianico, S., Collins, A.R., Dusinska M. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? Environ. Mol. Mutagen. 2015; 56, 82–96.

References

- Durnev A.D. Ocenka genotoksichnosti nanochastic pri ispol'zovanii v medicine [Assessment of the genotoxicity of nanoparticles used in medicine]. Gigiena i sanitariya [Hygiene and sanitation] 2014;(2):82–88. (In Russ.)
- Elespuru R., Pfuhler S., Aardema M.J. et al. Genotoxicity Assessment of Nanomaterials: Recommendations on Best Practices, Assays, and Methods. Toxicol Sci. 2018, 164(2):391–416.
- Shah, M.R., Imran M., Ullah S., 2017. Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis. 1st ed. William Andrew Publishing. New York.
- Karlsson, H.L., Di Bucchianico, S., Collins, A.R., Dusinska M. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? Environ. Mol. Mutagen. 2015; 56, 82–96.