

ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ Ni⁰ И NiO В РАСТЕНИЯХ ВИДА TRITICUM VULGARE

Изучено влияние сферических наночастиц никеля Ni⁰ размером 70±0,3 нм и оксида никеля NiO 94±0,3 нм в трех разведениях – 0,025, 0,05 и 0,1 М на корневую часть 4-х дневных проростков пшеницы *Triticum vulgare*. После 48 часовой инкубации растений с наночастицами регистрировалось дозозависимое увеличение фрагментации ДНК. Электрофоретическое разделение ДНК показало изменение подвижности с позиции уменьшения суммы содержания фрагментов формы I (более 1000 н.п.) и переход основной массы ДНК во фрагменты из легкоподвижных нуклеотидов (форма II – менее 1000 н.п.). Так, при воздействии НЧ Ni⁰ и NiO в концентрациях 0,025–0,1 М происходило увеличение фрагментов формы II на 53–59% и на 55–59,8% с одновременным снижением формы I на 16,6–20,9% и 15,6–22%, относительно контроля соответственно. Рассчитанный по результатам электрофореграммы коэффициент повреждения ДНК в случае с 0,025, 0,05 и 0,1 М наночастиц никеля составлял 1,052±0,009, 1,126±0,043 и 1,2±0,03, а с наночастицами оксида никеля – 0,982±0,02, 1,053±0,013 и 1,192±0,21 (на фоне контроля 0,398±0,05), соответственно. Линейный профиль электрофореграмм ДНК свидетельствовал, что наночастицы в малых концентрациях (0,025 и 0,05 М) вызывают системную деградацию ДНК до дискретных фрагментов из легкоподвижных нуклеотидов с переходом основной массы ДНК в область менее 1000 н.п., а концентрация 0,1 М вызывает появление апоптотной «лесенки», представленной группой расщепленных пиков, расположенных по убыванию площади, в которых количество ДНК кратно 180 н.п.

Ключевые слова: *Triticum vulgare* – наночастицы никеля – активные формы кислорода – окислительный стресс – деградация ДНК.

Современный интерес к применению нанотехнологий определил необходимость моделирования экологического прессинга данного вида металлов на организм. Это связано с тем, что растворение наноматериалов приводит к загрязнению окружающей среды: при попадании в воздух и воду диспергированные наночастицы (НЧ) могут образовывать устойчивые во времени аэрозоли и агрегаты, которые с помощью различных механизмов могут попадать в почву и другие компоненты экологической системы. Малый размер обуславливает способность НЧ проникать через биологические барьеры и ускользать из под контроля регуляторной системы живых организмов [1]. Исследования действия ионов металлов на клетки начали проводиться уже давно, а вот токсичностью наночастиц металлов на растения – как удобных тест-объектов – стали заниматься лишь в последние 10 лет. В большинстве научных работ в основном рассматривается влияние наиболее распространенных промышленно производимых наноматериалов на основе металлов и их оксидов на показатели всхожести и параметры роста растений [2], [3], и практически отсутствуют отдельные исследования, посвященные проблеме цитотоксических эффектов наночастиц металлов переменной валентности. Именно

НЧ металлов переходных валентностей способны непосредственно взаимодействовать с окислительно-восстановительными органеллами и стимулировать выработку АФК в клетках, что показано во многих работах [4]. Представленный научный задел подтверждает целесообразность глубокого изучения экологической безопасности и выяснения формирования цитогенетических эффектов именно подобного рода НЧ металлов.

Методология проведенных исследований заключалась в использовании обработанных 0,025, 0,05 и 0,1 М наночастицами Ni⁰ (размер 70±0,3 нм, Z-потенциал 25±0,5 мВ) и NiO (размер 94±0,3 нм, Z-потенциал 29±0,5 мВ) семян *Triticum vulgare*, пророщенных в климатической камере без освещения и температуре 22±1 °С в течение 2 суток. После 48 часовой инкубации корневую часть растений длиной 1–1,5 см использовали для анализа межнуклеосомной деградации ДНК [5]. Для исследования предварительно выделяли фракцию тотальной ДНК согласно протоколу набора реагентов «ДНК-Экстран-3» («Синтол», Россия), концентрацию полученных растворов определяли спектрофотометрически по соотношению поглощения 260/280 нм. Опытным путем нами определено, что больший выход

ДНК и щадящий режим измельчения сырья, без дополнительного повреждения молекул до фрагментов менее 500 н.п., перекрывающих визуализацию фрагментации под влиянием наночастиц, достигается не растиранием в ступке с жидким азотом, а встряхиванием в течение 60 сек при частоте 25 Гц на гомогенизаторе «TissueLyser LT». Разделение и анализ ДНК фрагментов проводили методом горизонтального электрофореза в 1%-ной универсальной агарозе типа I в присутствии 0,5 мкг/мл бромистого этидия. В качестве стандарта молекулярной массы фрагментов ДНК использовали 1 мкл 10 Kb ДНК маркера, состоящий из смеси 13 фрагментов плазмид длиной от 250 до 10000 н.п. В качестве электролита использовали трис-боратный буфер (pH 7,2). Электрофорез проводили при напряженности 5 В/см геля и силе тока 200 мА, задаваемыми источником питания SE-1 («Helicon», Россия), в течение 1 часа. ДНК регистрировали по люминесценции в ультрафиолетовом свете с помощью трансиллюминатора и системы видеодokumentации гелей Gel Imager-2. Полученные цифровые изображения обрабатывали с помощью программы «ImageJ». Коэффициент ДНК-повреждающего эффекта НЧ рассчитывали по соотношению совокупности фрагментов менее 1000 пар оснований (форма II) к фрагментам более 1000 пар оснований (форма I). Лабораторные опыты проводили в 3-х кратной биологической повторности.

Электрофоретическое разделение ДНК, выделенной из корней проростков пшеницы пос-

ле обработки 0,025–0,1 М никельсодержащими наночастицами, показало изменение подвижности с позиции уменьшения суммы содержания наименее мигрирующих в агарозном геле и наиболее близко расположенных к старту фрагментов конформации I (более 1000 н.п.), составляющих наибольшее количество в составе контрольных образцов, и переход основной массы ДНК во фрагменты из легкоподвижных нуклеотидов (форма II – менее 1000 н.п.).

В количественном соотношении эффект наночастиц с позиции изменения топологии и повреждения ДНК имел дозозависимый характер, и усиливался с увеличением содержания металлов в среде. Так, при воздействии НЧ Ni⁰ и NiO в концентрациях 0,025–0,1 М происходило увеличение фрагментов менее 1000 н.п. (форма II) на 53–59% (P<0,01) и на 55–59,8% (P=0,05) с одновременным снижением формы I на 16,6–20,9% и 15,6–22%, относительно контроля соответственно (P<0,05). Отметим, что с внесением небольших концентраций наночастиц (0,025 и 0,05 М) не было видно значительных изменений, за исключением слабого свечения фрагментов массой более 1000 н.п. и, по структуре приближающегося к варианту с водой (рис. 1А).

Рассчитанный по результатам электрофореграммы коэффициент повреждения ДНК в случае с 0,025, 0,05 и 0,1 М наночастиц никеля составлял 1,052±0,009, 1,126±0,043 и 1,2±0,03, а с наночастицами оксида никеля –0,982±0,02, 1,053±0,013 и 1,192±0,21 (на фоне контроля 0,398±0,05), соответственно (P<0,05).

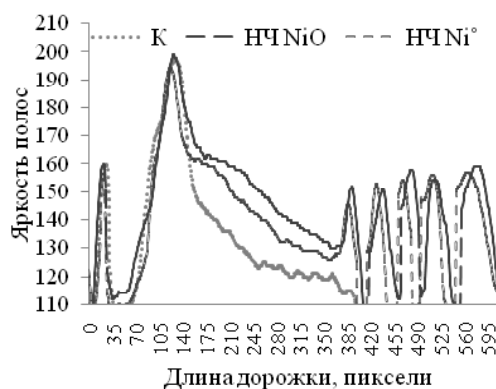
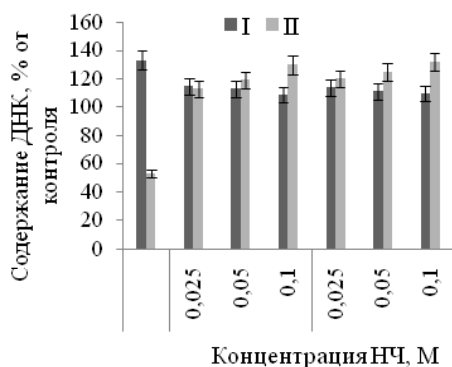


Рисунок 1. А. Содержание ДНК, выделенной из апикальной части корней *Triticum vulgare*, инкубированных с НЧ Ni⁰ и NiO в концентрациях 0,1, 0,05 и 0,025 М: К – контроль, дистиллированная вода; значения показывают общую площадь свечения конформации ДНК > 1000 н.п. (форма I) и < 1000 н.п. (форма II) в % от контроля. Б. Линейные профили интенсивности полос электрофореграммы ДНК *T. vulgare* после 48-часовой инкубации с НЧ Ni⁰ и NiO. Достоверность значений P<0,05

Линейный профиль электрофореграмм ДНК растений, обработанных концентрациями 0,025 и 0,05 М наночастиц, представлял собой плавно спускающуюся кривую, похожую на контрольный вариант, но со слабой деградацией в виде нескольких небольших пиков (данные не представлены). Однако с увеличением концентрации вносимых НЧ до 0,1 М ДНК-повреждающий эффект становится настолько заметным, что возрастает общая интенсивность электрофореграммы, а линейный профиль представляет собой суперпозицию расщепленного на интенсивные разрешенные пики светимости вследствие смены изоэлектрической точки и перехода в терминальную фазу с неспецифической и глубокой деградацией нуклеазами в более легкоподвижные и легкие нуклеотиды размером менее 300 тыс. н.п. Подобная картина является признаком типичного апоптоза, а именно появление характерной «лесенки», представленной группой пиков, расположенных по убыванию площади, в которых количество ДНК кратно 180 н.п. (рис. 1Б). Интрануклеосомное расщепление при апоптозе происходит ступенчато под действием индуцированных различными факторами (например, каспазами), эндонуклеаз, которые

атакуют хроматин в областях относительно протяженных розеточных петель (доменов) с высвобождением 50–300 kb фрагментов [5].

Настоящее исследование показало, что наночастицы как никеля, так и его оксида способствуют развитию генетических повреждений пшеницы. Так, никельсодержащие наночастицы в малых концентрациях вызывают системную деградацию ДНК до дискретных фрагментов менее 1000 н.п. Напротив, наноформы никеля в концентрации 0,1 М, вероятно, запускают механизмы апоптоза [5]. Сравнивая эффекты никеля и оксида никеля между собой стоит отметить, что НЧ никеля, имеющие электронейтральный заряд, вполне возможно, могут легко диффундировать через ядерные поры и вызывать повреждение генетического материала прямым взаимодействием с ДНК [7], блокировать функций аквапоринов и тем самым вызывать гибель клеток. Напротив, генотоксический эффект НЧ оксида никеля, вероятно, реализуется за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных ионов никеля Ni^{2+} , высвобожденных из их матрикса частицы, и фосфатными группами полианиона ДНК, а также выделяемыми $HO\cdot$ радикалами в цикле Хабера-Вейсса [3].

5.09.2015

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ соглашение №14-36-00023 от 15.09.2014 г. и Государственного задания №342 от 01.02.2014 г.

Список литературы:

1. Du W., Sun Y., Ji R., Zhu J., Wu J., Guo H. TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil // *J. Environ. Monit.* – 2011. – №13. – P. 822-828.
2. Lebedev S.V., Korotkova A.M., Osipova E.A. Influence of Fe⁰ nanoparticles, magnetite Fe₃O₄ nanoparticles, and iron (II) sulfate (FeSO₄) solutions on the content of photosynthetic pigments in *Triticum vulgare* // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 2014. – V. 61. – №4. – P. 564-569.
3. Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Mohammad F. Nanotechnology and plant sciences: nanoparticles and their impact on plants. New York: Springer, 2015. 305 p.
4. Rico C.M., Morales MI, McCreary R et al. Cerium oxide nanoparticles modify the antioxidative stress enzyme activities and macromolecule composition in rice seedlings // *Environ Sci Technol.* – 2013. – №47. – P. 14110-14118.
5. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // *Успехи биологической химии.* – 2001. – Т. 41. С. 3-38.
6. Kinsella J.M., Ivanisov A. Fabrication of powdered metallic and magnetic heterostructured DNA-nanoparticle hybrids // *Colloids surf. Biointerfaces.* – 2008. – V. 63(2). – P. 296-300.

Сведения об авторах:

Короткова Анастасия Михайловна, аспирант, научный сотрудник Института Биоэлементологии Оренбургского государственного университета, e-mail: anastasiaporv@mail.ru

Лебедев Святослав Валерьевич, заведующий лабораторией Института Биоэлементологии Оренбургского государственного университета, доктор биологических наук, e-mail: lsv74@list.ru

Русакова Елена Анатольевна, младший научный сотрудник Института Биоэлементологии Оренбургского государственного университета, e-mail: elenka_rs@mail.ru