

Методы гигиенических исследований

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ахальцева Л.В.¹, Журков В.С.¹, Сычева Л.П.², Савостикова О.Н.¹, Алексеева А.В.¹

ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ В ТЕСТЕ ЭЙМСА (SALMONELLA / МИКРОСОМЫ)

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, г. Москва;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, 123098, г. Москва

Введение. Одним из важных этапов оценки безопасности наночастиц (НЧ) является анализ мутагенной активности, включающий оценку генных, хромосомных, геномных мутаций.

Материал и методы. НЧ покрытого симетиконом диоксида титана ($33,16 \pm 16,7$ нм, анатаз, 5–50000 мкг/мл), покрытого силикатом магнетита (10 нм, 0,92–575 мкг/мл), НЧ серебра, стабилизированные камедью аравийской ($14 \pm 0,2$ нм, 5–50000 мкг/мл), нановолокно гидроксида алюминия (50–70 нм, 24–3000 мкг/мл) и многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ «Таунит» с наружным диаметром 15–40 нм, внутренним диаметром 3–8 нм, длиной 2 и более мкм, 5–50000 мкг/мл). Параллельно в экспериментах оценивали мутагенную активность эквивалентных микрочастиц. Исследования проводили в тесте Эймса (*Salmonella*/микросомы), регистрирующем генные мутации разного механизма действия, в варианте с преинкубацией. Использован набор индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*: TA 100 (мутации типа замены пар оснований), TA 98 и TA 97 (мутации типа сдвига рамки считывания генетического кода). Добавление во время эксперимента микросомальной активирующей смеси позволяет определять воздействие не только самих веществ, но и их метаболитов.

Результаты. Во всех экспериментах кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в опыте над таковыми в контроле была менее 2, что свидетельствует об отсутствии мутагенного эффекта.

Заключение. Исследованные наноматериалы, как и их микро-аналоги, в изученном диапазоне доз не индуцировали генные мутации в тесте Эймса на трёх штаммах *Salmonella typhimurium* в присутствии или без добавления микросомальной активирующей смеси.

Ключевые слова: тест Эймса (*Salmonella* / микросомы); мутагенность; наночастицы; наночастицы серебра; наночастицы диоксида титана; наночастицы магнетита; многослойные углеродные нанотрубки; нановолокно гидроксида алюминия.

Для цитирования: Ахальцева Л.В., Журков В.С., Сычева Л.П., Савостикова О.Н., Алексеева А.В. Изучение мутагенной активности нано- и микрочастиц в тесте Эймса (*Salmonella*/микросомы). *Гигиена и санитария*. 2019; 98 (4): 455-460. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-4-455-460>

Для корреспонденции: Ахальцева Людмила Вячеславовна, кандидат биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. генетической токсикологии и группой цитогистологии ФГБУ «ЦСП» Минздрава России, 119991, Москва. E-mail: ahallv@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.04.2018
Принята к печати 06.02.2019
Опубликована 05.2019

Akhaltseva L.V.¹, Zhurkov V.S.¹, Sycheva L.P.², Savostikova O.N.¹, Alekseeva A.V.¹

STUDY OF MUTAGENIC ACTIVITY NANO- AND MICROPARTICLES IN THE AMES TEST (SALMONELLA / MICROSOME)

¹ Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation;

² State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, 123098, Russian Federation

Introduction. One of the important steps in assessing the nanoparticles (NP) safety is the analysis of mutagenic activity, including the evaluation of gene, chromosomal, and genomic mutations.

Material and methods. The purpose of this investigation is to study the ability of different NP aqueous suspensions and the same compounds in microforms to induce gene mutations in *Salmonella*/microsome test (Ames test).

Anatase titanium dioxide NP coated with simethicone (33.16 ± 16.7 nm, 5-50000 µg/ml), magnetite NP coated with silicate (10 nm, 0.92-575 µg/ml), silver NP coated with arabian gum (14 ± 0.2 nm, 5-50000 µg/ml), aluminum hydroxide nanofibres (50-70 nm, 24-3000 µg/ml) and multi-walled carbon nanotubes (Taunit MWCNTs, outer diameter 15-40 nm, inner diameter 3-8 nm, length 2 and more microns, 5-50000 µg/ml). In parallel, the mutagenic activity of equivalent microparticles was evaluated in experiments. Ames test (*Salmonella*/microsomes) registers gene mutations induced by a different mechanism of action, in the variant with preincubation. A set of *Salmonella typhimurium* indicator strains: TA 100 (base pair substitution mutations), TA 98 and TA 97 (mutations of the frameshift type of the genetic code) were used. Using addition of the S9 microsomal activating mixture during the experiment makes it is possible to determine the effect not only of the substances themselves, but also of their metabolites.

Conclusion. *The investigated nanomaterials as well as their micro analogs in the studied dose range did not induce gene mutations in the Ames test both in presence and absence microsomal activating mixture.*

Key words: *Ames test (Salmonella/microsome); mutagenicity; nanoparticles; NP silver; NP titanium dioxide; magnetite nanoparticles; multi-walled carbon nanotubes; aluminum hydroxide nanofibers.*

For citation: Akhaltseva L.V., Zhurkov V.S., Sycheva L.P., Savostikova O.N., Alekseeva A.V. Study of mutagenic activity nano- and microparticles in the Ames test (salmonella/microsome). *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(4): 455-460. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-4-455-460>

For correspondence: Lyudmila V. Akhaltseva, MD, Ph.D., senior researcher of the Laboratory of genetic toxicology with a group of cytohistology of the Centre for Strategic Planning, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: ahallv@mail.ru

Information about the author:

Zhurkov V.S., <http://orcid.org/0000-0002-4101-9635>; Sycheva L.P., <https://orcid.org/0000-0002-7370-0169>;

Savostikova O. N., <http://orcid.org/0000-0002-7032-1366>; Alekseeva A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0422-8382>

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received: 03 April 2018

Accepted: 06 February 2019

Published: May 2019

Введение

Стратегия обеспечения безопасности наноматериалов для здоровья человека включает комплексную оценку их мутагенных свойств [1, 2]. В экспериментальных работах в основном используют цитогенетические методы и метод ДНК-повреждений (метод ДНК-комет). В то же время обязательным этапом оценки мутагенности химических соединений является определение генных мутаций с использованием метода оценки обратных мутаций на бактериях, в частности, теста Эймса. Таких работ в отношении исследования наноматериалов существенно меньше.

Цель работы – оценить мутагенную активность ряда веществ, используемых в виде нано- и микрочастиц, в тесте Эймса (*Salmonella* / микросомы).

Материал и методы

Объектами исследования были водные суспензии частиц в нано- и микроформе:

1. Наночастицы диоксида титана, покрытые симетиком (НЧ TiO_2 , природный анатаз, $33,16 \pm 16,7$ нм, Германия).

Микрочастицы диоксида титана (микро- TiO_2 , природный анатаз, $160,0 \pm 59,4$ нм, США).

Исследуемые концентрации – 5; 50; 500; 500 и 500000 мкг/мл или 0,5; 5; 50; 500 и 5000 мкг/чашку.

2. Нановолокно гидроксида алюминия (НВ ALOOH, марка IPC, ТУ 1791-002-36280340–2005, ООО «Передовые порошковые технологии», Россия, 50–70 нм. Материал содержит гидроксиды алюминия ALOOH – 55% масс., $AL(OH)_3$ – 33% масс., оксид алюминия AL_2O_3 – 5% масс., металлический алюминий AL – не более 5% масс., адсорбированная вода H_2O – до 2% масс., другие примеси – до 0,55 % масс. Удельная поверхность, измеренная методом БЭТ, – около 350 м²/г.

Микрочастицы химически чистого (х. ч.) гидроксида алюминия (микро-ALOOH, >1000 нм, ООО «АО Реахим», Россия).

Исследуемые концентрации – 24; 120; 600 и 3000 мкг/мл или 2,4; 12; 60 и 300 мкг на чашку Петри.

3. НЧ магнетита, покрытые силикатом (НЧ Fe_3O_4/SiO_2 , средний размер 10 нм, концентрация 575 мкг/мл), изготовлены по методике TEOS (Whitehead R. A. Et al. [Patent]: 4554088.-U.S., 1985). Синтез проведен канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. генной терапии вирусных инфекций ГУ НИИ Вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН Кривцовым Г.Г.

Исследуемые концентрации – 0,92; 4,6; 23; 115; 575 мкг/мл или 0,092; 0,46; 2,3; 11,5; 57,5 мкг/чашку.

4. Многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ) «Таунит» (ТУ 2166-001-02069289–2006, ООО «НаноТех-Центр», Россия, г. Тамбов,). Наружный диаметр 15–40 нм, внутренний диаметр 3–8 нм, длина 2 и более мк, удельная геометрическая поверхность 0,4–0,5 м²/г). Наружный диаметр МУНТ 15–40 нм, внутренний диаметр 3–8 нм, длина 2 и более мкм, удельная геометрическая поверхность 0,4–0,5 м²/г;

Порошкообразный активный уголь «Флотосорб» марки А (< 0,1 мм, ТУ 2162-325-05795731–2007, ОАО «Сорбент», Россия, г. Пермь).

Исследуемые концентрации – 5; 50; 500; 5000 и 50 000 мкг/мл или 0,5; 5; 50; 500 и 5000 мкг/чашку.

5. НЧ серебра, стабилизированные камедью аравийской 1:7 по массе (НЧ Ag, $14 \pm 0,2$ нм, ТУ 9197-009-77342998 11, ООО НПП «Сентоза Факторинг НП», Россия);

Камедь аравийская;

Микрочастицы серебра (микро-Ag, 100–120 нм);

Сульфат серебра (Ag_2SO_4 , ТУ 6-09-370374, х. ч., Россия).

Исследуемые концентрации – 5; 50; 500; 5000 и 50 000 мкг/мл или 0,5; 5; 50; 500 и 5000 мкг/чашку. В связи с сильным бактерицидным эффектом диапазон тестируемых концентраций сульфата серебра был расширен до 0,04 мкг/мл.

Тест Эймса. Мутагенную активность наночастиц определяли в тесте Эймса [3–5], регистрирующем способность испытуемого соединения индуцировать обратные генные мутации у индикаторных микроорганизмов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Использовали набор индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*, регистрирующий мутации типа сдвига рамки считывания генетического кода (ТА 98 и ТА 97) и замены пар оснований (ТА 100). В опыт включали варианты в присутствии системы метаболической активации (СМ+) и без таковой (СМ-), что позволяет выявлять мутагенное действие самих веществ (прямые мутагены) и их метаболитов. Непосредственно перед экспериментом готовили микросомальную активирующую смесь [6]. Ночную культуру центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали в буферном растворе до плотности $2 \cdot 10^9$ клеток на 1 мл.

Вещества испытывали в преинкубационном варианте теста. В центрифужные пробирки, содержащие 0,1 мл культуры бактерий в 0,5 мл 0,02М фосфатного буфера или микросомальной активирующей смеси (в варианте СМ+), вносили 0,1 мл соответствующей концентрации

Таблица 1

Результаты оценки мутагенной активности диоксида титана в тесте Эймса

Концентрация, мкг/мл	Отношение среднего числа колоний ревертантов в опыте к таковому в контроле					
	штамм TA 100		штамм TA 98		штамм TA 97	
	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+
<i>НЧ TiO₂</i>						
5	0,83	–	0,79	–	1,01	–
50	0,76	–	0,84	–	1,12	–
500	0,86	–	0,96	–	1,08	–
5000	0,72	–	0,72	–	1,13	–
50 000	0,69	–	0,88	–	0,94	–
<i>микро-TiO₂</i>						
5	0,83	–	0,72	–	1,06	–
50	0,85	–	0,93	–	1,06	–
500	0,86	–	0,63	–	1,18	–
5000	0,92	–	0,98	–	1,12	–
50 000	0,78	–	0,88	–	0,94	–
<i>Позитивные контроли:</i>						
NaN ₃	8,89*	–	–	–	–	–
ДИАМ	–	–	21,78*	–	–	–
9-АА	–	–	–	–	3,70*	–
<i>Растворители (среднее число колоний ревертантов на чашку)</i>						
H ₂ O	112,5	–	28,5	–	125,5	–
DMCO	–	–	27,0	–	135,0	–

Примечание. Здесь и в табл. 2–7: «–» – не исследовано; * – мутагенный эффект.

Таблица 2

Результаты оценки мутагенной активности гидроксида алюминия в тесте Эймса

Концентрация, мкг/мл	Отношение среднего числа колоний ревертантов в опыте к таковому в контроле					
	штамм TA 100		штамм TA 98		штамм TA 97	
	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+
<i>НЧ ALOOH</i>						
24	0,94	–	0,74	–	0,85	–
120	1,01	–	0,97	–	0,85	–
600	0,79	–	1,26	–	1,08	–
3000	0,89	–	0,84	–	1,02	–
<i>микро-ALOOH</i>						
24	0,92	–	0,94	–	1,33	–
120	0,78	–	1,03	–	0,79	–
600	0,89	–	1,19	–	1,27	–
3000	0,89	–	1,03	–	0,92	–
<i>Позитивные контроли</i>						
NaN ₃	7,84*	–	–	–	–	–
ДИАМ	–	–	38,5*	–	–	–
9-АА	–	–	–	–	3,52*	–
<i>Растворители (среднее число колоний ревертантов на чашку)</i>						
H ₂ O	127,5	–	15,5	–	175,5	–
DMCO	–	–	17,5	–	153,5	–

Таблица 3

Результаты оценки мутагенной активности НЧ магнетита в тесте Эймса

Концентрация, мкг/мл	Отношение среднего числа колоний ревертантов в опыте к таковому в контроле					
	штамм TA 100		штамм TA 98		штамм TA 97	
	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+
0,092	0,96	–	0,78	–	1,01	–
0,46	0,92	–	0,81	–	1,02	–
2,3	0,93	–	0,73	–	0,83	–
11,5	0,85	–	0,73	–	0,82	–
57,5	0,82	–	0,86	–	0,81	–
<i>Позитивные контроли</i>						
NaN ₃	8,47*	–	–	–	–	–
ДИАМ	–	–	42,18*	–	–	–
9-АА	–	–	–	–	6,25*	–
<i>Растворители (среднее число колоний ревертантов на чашку)</i>						
H ₂ O	118,0	–	18,5	–	159,0	–
DMCO	–	–	17,0	–	160,0	–

тестируемых частиц. Смесь инкубировали 2 ч при температуре 37 °С на перемешивающем устройстве ПЭ-6410 (50 об/мин), затем переносили в пробирки с 0,7% селективным полубогатённым агаром, перемешивали и равномерно распределяли на слой нижнего агара на чашках Петри. Учёт результатов проводили через 48 ч инкубации при 37 °С.

Эксперимент сопровождали контролем растворителя (0,1 мл дистиллированной воды) и положительным контролем со стандартными мутагенами: азид натрия (NaN₃) – 10 мкг на чашку для штамма TA 100; 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диокси-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазопирен (ДИАМ) – 10 мкг на чашку для штамма TA 98; 9-аминоакридин (9АА) – 50 мкг на чашку для штамма TA 97. Растворителем для ДИАМ и 9-АА был диметилсульфоксид (DMCO). Для контроля активности системы метаболической активации (СМ+) использовали этидиум бромид (*BrEt*) – 10 мкг на чашку на штамме TA 98. На каждую точку в опыте ставили по 2 чашки. Мутагенный эффект считали значимым при превышении среднего числа колоний ревертантов на чашку в опыте над таковым в контроле в 2 и более раз [7–9], бактерицидный эффект – при снижении этого показателя в 2 и более раз.

Результаты

Результаты экспериментов по изучению мутагенной активности НЧ и микрочастиц в тесте Эймса представлены в табл. 1–7 в виде кратности превышения среднего числа колоний ревертантов в опытных чашках Петри над таковым в контрольных (растворитель). Количество колоний ревертантов на чашку в контрольных вариантах и ответ штаммов на стандартные мутагены были в пределах урвной исторического контроля лаборатории [6, 10].

Наночастицы диоксида титана (33 нм) и микрочастицы (160 нм) в диапазоне концентраций 5–50000 мкг/мл в эксперименте на штаммах *S. typhimurium* TA 100, TA 97 и TA 98 в варианте без метаболической активации не показали мутагенной активности (см. табл. 1). Нановолокна (50–70 нм) и микрочастицы (>1000 нм) гидроксида алюминия (см. табл. 2), наночастицы магнетита (см. табл. 3) в

Таблица 4

Результаты оценки мутагенной активности МУНТ в тесте Эймса

Концентрация, мкг/мл	Отношение среднего числа колоний ревертантов в опыте к таковому в контроле					
	штамм ТА 100		штамм ТА 98		штамм ТА 97	
	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+
<i>«Таунит»</i>						
5	1,05	1,17	0,97	1,05	0,75	0,87
50	0,93	1,06	1,08	1,12	0,77	1,04
500	1,26	0,97	1,00	0,99	0,78	0,98
5000	1,18	0,98	0,85	0,82	0,95	0,94
50 000	1,19	1,51	0,88	0,82	0,93	0,89
<i>«Флотосорб»</i>						
5	0,92	1,09	0,88	1,08	0,83	0,94
50	0,91	1,02	1,31	0,97	0,81	0,91
500	0,84	1,36	1,05	1,08	0,78	1,01
5000	0,85	1,11	1,02	0,89	0,61	0,91
50 000	0,76	0,95	1,02	0,93	0,68	1,03
<i>Позитивные контроли</i>						
NaN ₃	7,58*	–	–	–	–	–
ДИАМ	–	–	25,30*	–	–	–
BrEt	–	–	–	7,77*	–	–
9-АА	–	–	–	–	5,75*	–
<i>Растворители (среднее число колоний ревертантов на чашку)</i>						
H ₂ O	132,0	119,5	29,5	37,0	115,0	123,5
DMCO	–	–	27,0	–	113,0	–

изученных дозах не проявили мутагенной активности на штаммах *S. typhimurium* в варианте без метаболической активации.

Активный уголь «Флотосорб» (< 0,1 мм) и МУНТ «Таунит» (15–40 нм) не проявили мутагенности в концентрациях 5–50000 мкг/мл на штаммах ТА 100, ТА 97 и ТА 98 в присутствии и без системы метаболической активации (см. табл. 4). С дозы 500 мкг/мл начиналась агрегация нанотрубок, возрастающая с увеличением концентрации, которая не мешала подсчёту колоний ревертантов.

Сульфат серебра (0,04–50000 мкг/мл), микрочастицы серебра (100–120 нм), НЧ серебра в камеди аравийской (14 нм), а также само покрытие (камедь аравийская) в концентрациях 5–50000 мкг/мл не показали мутагенной активности в тесте Эймса на штаммах ТА 100, ТА 97 и ТА 98 в присутствии и без добавления системы метаболической активации (см. табл. 5–7).

Серебро во всех формах проявило бактерицидность по отношению к штаммам *S. typhimurium*. В варианте без метаболической активации бактерицидный эффект проявился на более низких дозах. Бактерицидный эффект разных типов одного и того же вещества существенно отличался. Микрочастицы серебра проявили бактерицидность только в варианте без метаболической активации на штамме ТА 98 в дозе 50000 мкг/мл, на штаммах ТА 100 и ТА 97 в дозе 5 000 мкг/мл. НЧ серебра были бактерицидны в обоих вариантах эксперимента (СМ+ и СМ-). На штамме ТА 98 (СМ+, СМ-), ТА 100 (СМ+) и ТА 97 (СМ+) эффект проявился в концентрации 50000 мкг/мл, на ТА 100 (СМ-) и ТА 97 (СМ-) – 5000 мкг/мл. Сульфат серебра был высоко

Таблица 5

Результаты оценки мутагенной активности НЧ серебра в тесте Эймса

Концентрация, мкг/мл	Отношение среднего числа колоний ревертантов в опыте к таковому в контроле					
	штамм ТА 100		штамм ТА 98		штамм ТА 97	
	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+
<i>НЧ Ag</i>						
5	0,98	0,95	0,89	0,86	1,00	1,24
50	0,99	1,11	0,94	0,70	0,83	0,95
500	0,79	0,76	1,09	0,74	0,44**	1,04
5000	0,22**	0,90	0,77	0,88	0,35**	1,12
50 000	0,10**	0,50**	0,49**	0	0,38**	0,40**
<i>Камедь аравийская</i>						
5	0,84	0,86	0,94	0,78	0,78	0,75
50	1,00	0,87	0,80	0,60	0,85	0,82
500	0,98	0,95	0,89	0,76	0,79	0,70
5000	0,97	0,67	1,03	0,80	0,77	0,91
50 000	1,07	0,84	0,83	0,64	0,79	0,94
<i>Позитивные контроли:</i>						
NaN ₃	10,42*	–	–	–	–	–
ДИАМ	–	–	51,93*	–	–	–
BrEt	–	–	–	13,2*	–	–
9-АА	–	–	–	–	5,27*	–
<i>Растворители (среднее число колоний ревертантов на чашку)</i>						
H ₂ O	96,0	115,0	17,5	25,0	133,5	126,5
DMCO	–	–	14,0	–	137,5	–

Примечание. Здесь и в табл. 6, 7: ** – бактерицидный эффект; 0 – отсутствие роста бактериальной культуры.

бактерициден на всех трёх штаммах в присутствии системы метаболической активации, начиная с концентрации 50 мкг/мл, а без системы метаболической активации – с 0,2 мкг/мл. Таким образом, серебро во всех формах было бактерицидно по отношению к данным штаммам *S. typhimurium* и по степени бактерицидности распределялось в следующем порядке: сульфат серебра > нано серебро в камеди аравийской > порошок серебра.

Обсуждение

Результаты экспериментов по оценке мутагенной активности в нано- и микроформе частиц диоксида титана, гидроксида алюминия, магнетита, серебра, МУНТ и активного угля показали отсутствие у них способности вызывать генные мутации в тесте Эймса. Исследование этих же веществ в других тестах выявило, что в микроядерном тесте на культуре лимфоцитов периферической крови человека с цитохалазином В НЧ диоксида титана активнее микрочастиц индуцировали микроядра и нуклеоплазменные мосты [11], частицы серебра размером 100 нм активнее частиц 14 нм повышали частоту генетических повреждений [12]. В экспериментах *in vivo* [13, 14] установлено, что микрочастицы TiO₂ индуцировали повреждение ДНК и образование микроядер в клетках костного мозга, а НЧ TiO₂ индуцировали повреждение ДНК в клетках костного мозга и печени мышей. В полиорганном микроядерном исследовании на мышах при воздействии с питьевой во-

Таблица 6

Результаты оценки мутагенной активности микрочастиц серебра в тесте Эймса

Концентрация, кг/мл	Отношение среднего числа колоний ревертантов в опыте к таковому в контроле					
	штамм ТА 100		штамм ТА 98		штамм ТА 97	
	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+
<i>микро-Ag</i>						
5	0,99	0,97	1,07	1,01	0,87	1,16
50	1,08	0,88	1,26	0,87	1,00	1,21
500	0,91	0,89	0,98	0,96	0,92	1,08
5000	0,17**	0,97	1,30	0,97	0,32**	1,02
50 000	0	0,82	0	1,30	0	1,24
<i>Ag₂SO₄</i>						
5	0	0,89	0	0,67	0	1,22
50	0	0	0	0	0	0,17**
500	0	0	0	0	0	0
5000	0	0	0	0	0	0
50 000	0	0	0	0	0	0
<i>Позитивные контроли</i>						
NaN ₃	9,22*	–	–	–	–	–
ДИАМ	–	–	44,44*	–	–	–
BrEt	–	–	–	10,99*	–	–
9-АА	–	–	–	–	5,36*	–
<i>Растворители (среднее число колоний ревертантов на чашку)</i>						
H ₂ O	108,5	121,5	23,0	33,5	132,5	132,0
ДМСО	–	–	22,5	–	122,5	–

Таблица 7

Результаты оценки мутагенной активности микрочастиц серебра в тесте Эймса (продолжение)

Концентрация, мкг/мл	Отношение среднего числа колоний ревертантов в опыте к таковому в контроле					
	штамм ТА 100		штамм ТА 98		штамм ТА 97	
	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+	СМ-	СМ+
<i>Ag₂SO₄</i>						
0,04	1,00	–	0,89	–	1,03	–
0,2	0,28**	–	0,44**	–	0,43**	–
1	0	–	0	–	0,03**	–
5	0	–	0	–	0	–
<i>Позитивные контроли</i>						
NaN ₃	7,81*	–	–	–	–	–
ДИАМ	–	–	26,98*	–	–	–
9-АА	–	–	–	–	5,59*	–
<i>Растворители (среднее число колоний ревертантов на чашку)</i>						
H ₂ O	128,0	–	35,0	–	137,0	–
ДМСО	–	–	29,5	–	140,5	–

дой в течение двух недель выявлено мутагенное действие МУНТ в клетках преджелудка (частота клеток с протрузиями ядра), активного угля в лёгких (увеличение доли клеток с микроядрами и ядерными протрузиями) [15]. НЧ серебра при поступлении в организм мышей с питьевой водой в концентрациях 0,1 и 50 мг/л в течение 15 суток индуцировали небольшое статистически значимое повышение частоты сперматид с микроядрами [16].

В ряде исследований других авторов также не выявлена индукция генных мутаций в тесте Эймса при действии наноматериалов, при наличии других генотоксических эффектов [17-23]. Отрицательные результаты в экспериментах по оценке мутагенной активности НЧ в тесте Эймса связывают в основном с наличием плотной клеточной стенки и отсутствием эндоцитоза у прокариот, что препятствует проникновению НЧ в бактериальную клетку [19, 24, 25].

Заключение

В нашей работе изучена способность пяти наноматериалов и их микро-аналогов индуцировать генные мутации. Установлено, что все они в изученном диапазоне концентраций не индуцировали генные мутации в тесте Эймса (*Salmonella*/микросомы) на штаммах *S. typhimurium* ТА 98, ТА 100 и ТА 97 в присутствии или без добавления системы метаболической активации.

Литература

(п.п. 5, 8, 9, 14, 17–25 см. References)

1. Сычева Л.П., Журков В.С. Стратегия тестирования мутагенных свойств наноматериалов. *Нанотехника*. 2010; 4 (24): 70-4.
2. Дурнев А.Д. Оценка генотоксичности наночастиц при использовании в медицине. *Гигиена и санитария*. 2014; 2: 76-83.
3. Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека: Руководство Р 1.2.3156-13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2014.
4. МУ 1.2.2634-10. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010.
5. Ахальцева Л.В., Журков В.С., Сычева Л.П., Кривцова Е.К. Генетическая оценка контрольных вариантов штаммов *Salmonella Typhimurium*, используемых в тесте *Salmonella*/микросомы (тест Эймса). *Гигиена и санитария*. 2015; 7: 103-5.
6. Дуган А.М., Журков В.С., Абилов С.К. Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса. *Цитология и генетика*. 1990; 24 (6): 41-5.
7. Журков В.С., Ахальцева Л.В., Ревазова Ю.А. Контроль со стандартными мутагенами в тесте Эймса. Обобщение результатов экспериментов 2004-2014 гг. (Исторический положительный контроль). В кн.: *Материалы Пленума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды по проблеме: «Методологические проблемы изучения, оценки и регламентирования химического загрязнения окружающей среды и его влияние на здоровье населения»*. Москва 17-18 декабря 2015 г. М.; 2015: 141-3.
8. Ахальцева Л.В., Мошков Н.Е., Ингель Ф.И., Юрцева Н.А., Юрченко В.В. Влияние нано- и микрочастиц диоксида титана на показатели микроядерного теста на культуре лимфоцитов крови человека. *Гигиена и санитария*. 2011; 5: 61-3.
9. Ингель Ф.И., Кривцова Е.К., Юрцева Н.А., Савостикова О.Н., Алексеева А.В. Цитомный анализ эффектов нестабильности генома, индуцированных наночастицами серебра разных размеров на культуре цельной крови человека. *Токсикологический вестник*. 2017; 1: 35-41.
10. Юрченко В.В., Кривцова Е.К., Юрцева Н.А., Тульская Е.А., Мамонов Р.А., Жолдакова З.И. и др. Показатели микроядерного теста на эпителиальных тканях животных при воздействии диоксида титана. *Гигиена и санитария*. 2011; 5: 57-61.
11. Сычева Л.П., Михайлова Р.И., Беляева Н.Н., Журков В.С., Юрченко В.В., Савостикова О.Н., Алексеева А.В., Кривцова Е.К.,

- Коваленко М.А., Ахальцева Л.В., Шереметьева С.М., Юрцева Н.А., Муравьева Л.В. Изучение мутагенного и цитотоксического действия многослойных углеродных нанотрубок и активного угля в шести органах мышей *in vivo*. *Российские нанотехнологии*. 2015; 10 (3-4): 120-5.
16. Сычева Л.П., Муравьева Л.В., Журков В.С., Михайлова Р.И., Савостикова О.Н., Алексеева А.В., Шереметьева С.М. Изучение мутагенного и цитотоксического действия наносеребра и сульфата серебра в половых клетках мышей *in vivo*. *Российские нанотехнологии*. 2016; 11 (3-4): 95-100.
12. Ingel F.I., Krivtsova E.K., Urtseva N.A., Savostikova O.N., Alekseeva A.V. Cytome analysis of the effects of genomic instability induced by silver nanoparticles with different sizes on culture of whole human blood. *Toksikologicheskij vestnik*. 2017; 1: 35-41. (in Russian)
13. Yurchenko V.V., Krivtsova E.K., Yurtseva N.A., Tul'skaya E.A., Mamonov R.A., Zholdakova Z.I. et al. Values of the micronucleus test with animal epithelial cells exposed to titanium dioxide. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2011; 5: 57-61. (in Russian)
14. Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Yurchenko V.V., Daugel-Dauge N.O., Kovalenko M.A., Krivtsova E.K., Durnev A.D. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. *Mutation Research*. 2011; 726: 8-14.
15. Sycheva L.P., Mikhailova R.I., Belyaeva N.N., Zhurkov V.S., Yurchenko V.V., Savostikova O.N., Alekseeva A.V., Krivtsova E.K., Kovalenko M.A., Ahal'tseva L.V., SHERemet'eva S.M., YURceva N.A., Murav'eva L.V. Study of mutagenic and cytotoxic effects of multiwalled carbon nanotubes and activated carbon in six organs of mice *in vivo*. *Rossijskie nanotekhnologii*. 2015; 10 (3-4): 120-5. (in Russian)
16. Sycheva L.P., Murav'eva L.V., Zhurkov V.S., Mikhailova R.I., Savostikova O.N., Alekseeva A.V., Sheremet'eva S.M. Study of cytogenetic and cytotoxic effects of nanosilver and silver sulfate in germ cells of mice *in vivo*. *Rossijskie nanotekhnologii*. 2016; 11 (3-4): 256-62. (in Russian)
17. Kim H.R., Park Y.J., Shin D.Y., Oh S.M., Chung K. H. Appropriate In Vitro Methods for Genotoxicity Testing of Silver Nanoparticles. *Environmental Health and Toxicology*. 2013; 28 (8): 8. DOI: <http://dx.doi.org/10.5620/eht.2013.28.e2013003>
18. Balasubramanyam A., Sailaja N., Mahboob M., Rahman M.F., Husain S.M., Grover P. In vitro mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the Salmonella/microsome assay. *Toxicol In Vitro*. 2010; 24 (6): 1871-6.
19. Guo X., Li Y., Yan J., Ingle T., Jones M.Y., Mei N. et al. Size- and coating-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using *in vitro* standard assays. *Nanotoxicology*. 2016; 10 (9): 1373-84.
20. Butler K.S., Peeler D.J., Casey B.J., Dair B.J., Elespuru R.K. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis*. 2015; 30 (4): 577-91.
21. Akyil D., Eren Y., Konuk M., Tepekozcan A., Sađlam E. Determination of mutagenicity and genotoxicity of indium tin oxide nanoparticles using the Ames test and micronucleus assay. *Toxicol Ind Health*. 2016; 32 (9): 1720-8. doi: 10.1177/0748233715579804.
22. Zhang Q., Wang H., Ge C., Duncan J., He K., Adeosun S.O. et al. Alumina at 50 and 13 nm nanoparticle sizes have potential genotoxicity. *J Appl Toxicol*. 2017; 37 (9): 1053-64. DOI: 10.1002/jat.3456.
23. Li Y., Chen D.H., Yan J., Chen Y., Mittelstaedt R.A., Zhang Y. et al. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutat Res*. 2012; 745 (1-2): 4-10.
24. George J.M., Magogoty M., Vetten M.A., Buys A.V., Gulumian M. From the cover: an investigation of the genotoxicity and interference of gold nanoparticles in commonly used *in vitro* mutagenicity and genotoxicity assays. *Toxicol Sci*. 2017; 156 (1): 149-66.
25. Doak S.H., Manshian B., Jenkins G.J.S., Singh N. *In vitro* genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research*. 2012; 745: 104-11.

References

1. Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Strategy of genotoxicity studying of nanomaterials. *Nanotechnics*. 2010; 4 (24): 70-4. (in Russian)

2. Durnev A.D. Genotoxicity evaluation of nanoparticles. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2014; 2: 76-83. (in Russian)

3. Assessment of toxicity and hazards of chemicals and their mixtures for human health: Guide P 1.2.3156-13. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2014. (in Russian)

4. MU 1.2.2634-10. Microbiological and molecular-genetic evaluation of the effect of nanomaterials on representatives of microbioscenes. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2010. (in Russian)

5. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (1997) Guidelines for the testing of chemicals. Bacteria reverse mutation test Guideline TG 471. <http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf>

6. Akhaltseva L.V., Zhurkov V.S., Sycheva L.P., Krivtsova E.K. Genetic evaluation of control variants of strains Salmonella typhimurium, used in the test Salmonella/microsome (Ames test). *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2015; 7: 103-5. (in Russian)

7. Dugan A.M., Zhurkov V.S., Abilev S.K. Criteria for taking into account mutagenic effects in the Ames test. *Citologiya i genetika*. 1990; 24 (6): 41-5. (in Russian)

8. Mathur N., Bhatnagar P. Mutagenicity assessment of textile dyes from Sanganer (Rajasthan). *J Environ Biol*. 2007; 28 (1): 123-6.

9. Kisin E.R., Murray A.R., Keane M.J., Shi X.C., Schwegler-Berry D., Gorelik O. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2007; 70 (24): 2071-9.

10. Zhurkov V.S., Akhaltseva L.V., Revazova Yu.A. Control with standard mutagens in the Ames test. Generalization of the results of experiments 2004-2014. (Historical positive control). In: *Materials of the Plenum of the Scientific Council of the Russian Federation on Human Ecology and Environmental Hygiene on the Problem: "Methodological Problems of the Study, Evaluation and Regulation of Chemical Pollution of the Environment and Its Impact on Public Health"*. Moscow 17-18 December. 2015 г. М.; 2015: 141-3. (in Russian)

11. Akhaltseva L.V., Moshkov N.E., Ingel F.I., Yurtseva N.A., Yurchenko V.V. Effect of titanium dioxide nano- and microparticles on the values of the micronucleus test with human whole blood. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2011; 5: 61-3. (in Russian)