

ОТСУТСТВИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ У НАНОЧАСТИЦ СЕРЫ В МИКРОЯДЕРНОМ ТЕСТЕ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК L5178Y

© Р. А. Исламов,^{1,*} И. Бишимова,¹ А. Н. Сабитов,¹
А. И. Ильин,¹ М. М. Буркитбаев²

¹ Научный центр противоинфекционных препаратов, Алма-Ата, Казахстан, и

² Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алма-Ата, Казахстан;

* электронный адрес: renatislamov@gmail.com

Природа и физико-химические характеристики наноматериалов влияют на их биологическую активность. Микрочастицы и наночастицы серы обладают различной активностью в отношении клеток бактерий, грибов и животных. На культуре клеток мышинной лимфомы L5178Y изучены цитотоксичность и генотоксичность наночастиц серы (НЧС) размером около 70 нм. Концентрация НЧС, вызывающая гибель 50 % клеток, составляет 0.078—0.312 мг/мл. Микроядерный анализ показал отсутствие мутагенных свойств НЧС. Метаболическая активация НЧС микросомальной фракцией печени крыс не влияет на токсичность. Предполагается, что механизм цитотоксического действия связан с взаимодействием элементарной серы с сульфгидрильными группами молекул внутри клетки.

Ключевые слова: генотоксичность, микроядерный анализ, мутагенность, наночастицы серы, цитотоксичность.

Принятые сокращения: ММС — митомицин С, МЯ — микроядерный, НЧС — наночастицы серы, НК — нежизнеспособные клетки, ЦФ — циклофосфамид, S9 — микросомальная фракция печени крыс.

Элементарная сера хорошо известна прежде всего как эффективный фунгицидный препарат (Tweedy, 1981; Williams, Cooper, 2004). Кроме того, коллоидные частицы серы, меченные изотопом Тс⁹⁹, применяются в лимфосцинтиграфии опухолей (Alazraki et al., 2001). Размеры используемых частиц в радиодиагностике варьируют в достаточно широких пределах — от 0.01 до 0.6 мкм (Frier et al., 1981; Hung et al., 1995). Однако этот показатель влияет на эффективность лимфосцинтиграфии — частицы менее 20 нм легко проникают через интерстиций в капилляры, частицы больше 100 нм медленно мигрируют по лимфатическим сосудам (Intenzo et al., 2009; Michenfelder et al., 2014). Такой же характер имеет и зависимость спектра противомикробной активности частиц серы от их размеров. Стабилизированные полиэтиленгликолем наночастицы серы размером 10—100 нм подавляют рост грамотрицательных бактерий, хотя более крупные частицы индифферентны для прокариот (Williams, Cooper, 2004; Deshpande et al., 2008; Choudhury et al., 2011, 2012a, 2012b; Choudhury, Goswami, 2013). Таким образом, антибактериальная и фунгицидная активность серы зависит от размера частиц серы. Несмотря на неспособность прокариот к эндоцитозу, антибактериальная активность наночастиц обеспечивается их высокой химической активностью на поверхности бактериальной мембраны (Fuerst, Sagulenko, 2010; Shrestha et al., 2014). Чем меньше размер наночастиц, тем эффективнее они подавляют

рост бактерий (Lu et al., 2013). Напротив, эукариотические клетки хорошо поглощают наночастицы, поэтому приоритет в выборе тестовой системы для исследований действия наноматериалов *in vitro* остается за клетками млекопитающих (Doak et al., 2012; Azqueta, Dusinska, 2015). Для изучения генотоксичности *in vitro* успешно используются клеточные культуры L5178Y, ТК6, А549, СНО, СНО-К1 и др. (Zhang et al., 1995; Totsuka et al., 2009; Wahrheit, Donner, 2010; Kim et al., 2013). Причем спонтанный уровень образования микроядер у линии клеток L5178Y ниже, чем у ТК6, что имеет немаловажное значение при оценке наноматериалов с низкой генотоксической активностью (Lorge, 2010; Abdal Dayem et al., 2017).

Зависимость биологической активности наночастиц от природы, физико-химических свойств, размеров и форм наночастиц актуализирует проблемы изучения их безопасности (Pan et al., 2007; Zhang et al., 2011; Lin et al., 2014).

В связи с этим целью настоящего исследования являлась оценка цитотоксической и мутагенной активности наночастиц серы на клеточной линии L5178Y с низким уровнем спонтанного образования микроядер. В представляемом исследовании изучали цитотоксичность и мутагенный потенциал наночастиц серы размером около 70 нм, синтезированных новым механохимическим способом (Urakaev et al., 2016).

Материал и методика

Наночастицы серы (НЧС) были синтезированы новым механохимическим способом, охарактеризованы с помощью электронной микроскопии и метода динамического рассеяния света (Urakaeв et al., 2016).

НЧС осаждали и промывали этиловым спиртом. Растворы для исследования готовили суспендированием НЧС в 0.2 мл 10%-ного раствора поверхностно-активного вещества Pluronic® F-68 с последующим добавлением 4.8 мл питательной среды RPMI-1640. Суспендирование осуществляли воздействием ультразвука мощностью 100 Вт и частотой 30 кГц в течение 20 мин. Стабильность раствора НЧС сохранялась в течение 1 сут. Диапазон исследуемых концентраций НЧС составлял от 0.002 до 1.250 мг/мл.

Культуру клеток лимфобластоидной Т-клеточной лимфомы *Mus musculus* L5178Y выращивали в среде RPMI-1640 с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой, 2 % L-глутамин и 1 % антибиотика-антимикотика. Культуру клеток культивировали в CO₂-инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo, Япония) при 37 °C, 5 % CO₂ и 95 % влажности.

Оценку цитотоксичности НЧС проводили на культуре клеток L5178Y при метаболической активации микросомальной фракцией печени крыс S9 и без таковой с помощью теста восстановления тетразолиевого красителя (МТТ-тест) согласно опубликованному протоколу (Lorge, 2010). Измерение оптической плотности образцов с формазаном производили на микропланшетном ридере Sunrise RC.4 (Tecan, Австрия) при длине волны 540 нм.

МЯ-тест *in vitro* проводили по рекомендациям руководства ОЭСР 487. Для этого воздействию НЧС на L5178Y в экспоненциальной фазе роста при плотности $6 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл осуществляли в течение 4 ч с метаболической активацией фракцией S9 с финальной концентрацией 2 % и без метаболической активации. Смесь для метаболической активации содержала 54 мг глюкозо-6-фосфата, 0.6 мл стерильной дистиллированной воды, 7.5 мг НАДФ, 0.3 мл 150 мМ раствора KCl и 0.6 мл S9.

Положительными контролями при воздействии смеси S9 являлся циклофосамид (ЦФ) в концентрации 10 мкг/мл, без метаболической активации — митомицин С (ММС) в концентрации 0.1 мкг/мл. Выбор концентраций контрольных веществ проведен согласно рекомендациям для культуры клеток L5178Y (Kirchner, Zeller, 2010). После окончания воздействия клетки отмывали центрифугированием в питательной среде при 130 g в течение 50 мин, вновь добавляли питательную среду и инкубировали 20 ч при 37 °C и 5 % CO₂. По окончании восстановительного периода клетки ресуспендировали, потом из ячеек отбирали по 20 мкл клеточной суспензии для подсчета с трипановым синим. Клетки отмывали центрифугированием, отбирали супернатант, добавляли раствор для гипотонического шока и инкубировали в течение 10 мин при 37 °C и 5 % CO₂. После окончания инкубации отбирали супернатант, ресуспендировали клетки и добавляли фиксатор из смеси ледяной уксусной кислоты и этилового спирта. Фиксировали в течение 10 мин и высушивали при комнатной температуре. После высыхания образцов проводили их окрашивание 3%-ным раствором Гимзы в течение 8 мин. Затем под микроскопом DM2500 (Leica, Австрия) при увеличении в 400 раз подсчитывали микроядра в 1000 одноядерных клетках (Countryman, Heddle, 1976).

Эксперимент повторяли 3 раза. Полученные результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 с помощью непараметрического критерия. Полученные значения положительного контроля и экспериментальных групп сравнивали с отрицательным контролем.

Исследования проводили на испытательной базе, имеющей сертификат GLP Federal Bureau, Germany, от 31 марта 2014 г.

Использованные реактивы: поверхностно-активное вещество Pluronic® F-68, питательная среда RPMI-1640, эмбриональная телячья сыворотка, L-глутамин, антибиотик-антимикотик, глюкозо-6-фосфат, НАДФ, KCl, микросомальная фракция печени крыс S9, митомицин С, циклофосамид, трипановый синий и раствор Гимзы (Sigma, США); ледяная уксусная кислота (Лабхимпром, Россия); этиловый спирт (Талгар-спирт, Казахстан).

Результаты и обсуждение

Исследование цитотоксичности НЧС на культуре клеток L5178Y позволило установить токсические концентрации с 50%-ным уровнем гибели клеток при разных условиях метаболической активации фракцией S9 (табл. 1, 2), что необходимо для оценки генотоксичности в МЯ тесте (Lorge, 2010)

Проведенное исследование цитотоксичности НЧС при инкубации с клетками лимфомы в течение 4 ч позволило установить концентрации, при которых гибнет около 50 % клеток (Lorge, 2010). Этот диапазон концентраций составил 0.078—0.312 мг/мл. Следует отметить, что не во всех исследованиях токсичности *in vitro* неметаллические наноматериалы подвергаются метаболической активации фракцией S9 (Kwon et al., 2014). В других же, напротив, цитотоксичность и мутагенность оценивают при метаболической активации (Warheit, Donner, 2010; Choi et al., 2011). Попадая в организм, ксенобиотики проходят метаболическое превращение в печени. Для моделирования этого процесса *in vitro* используют микросомальную фракцию S9 из гепатоцитов, которая включает в себя ферменты, осуществляющие окислительную биотрансформацию ксенобиотиков, в том числе исследуемых НЧС (Jia, Liu, 2007). Однако, как видно из полученных результатов, метаболическая трансформация не влияла на цитотоксичность и генотоксичность НЧС.

Нетоксические концентрации НЧС, синтезированных новым способом, почти в 50 раз ниже (2 мкг/мл), чем у модифицированных полиэтиленгликолем наночастиц серы, нетоксическая концентрация которых для линии HepG2 составляет 94.08 мкг/мл (Choudhury et al., 2012b). Несмотря на очевидную токсичность НЧС в отношении клеток L5178Y, однозначного вывода об их опасности сделать нельзя, поскольку исследования *in vitro* имеют существенные ограничения и подвержены влиянию различных факторов, а полученные результаты имеют относительный характер (O'Brien, Naskins, 2007). Более того, наблюдаемые различия в цитотоксичности наноматериалов вполне ожидаемы ввиду различной чувствительности клеточных линий к действию даже хорошо изученного наносеребра (Sahu et al., 2014).

Изучение цитотоксичности позволило определить диапазон концентраций НЧС для проведения МЯ-анализа. Результаты подсчета микроядер при воздействии НЧС

Таблица 1

Цитотоксичность НЧС на культуре клеток L5178Y по результатам МТТ-теста без метаболической активации

Вещество	Концентрация, мг/мл	Число клеток	Доля нежизнеспособных клеток, %
Вода (отрицательный контроль)	0	189 981	—
ММС (положительный контроль)	0.0001	149 985	31
НЧС	0.002	179 982	8
	0.005	159 984	23
	0.01	129 987	46
	0.078	129 987	54
	0.312	129 987	54
	0.625	79 992	85
	1.250	79 992	85

Таблица 2

Цитотоксичность НЧС на культуре клеток L5178Y в МТТ-тесте с метаболической активацией фракцией S9

Вещество	Концентрация, мг/мл	Число клеток	Доля нежизнеспособных клеток, %
Вода и S9 (отрицательный контроль)	0	199 980	—
ЦФ (положительный контроль)	0.010	139 986	43
НЧС	0.002	159 984	29
	0.005	159 984	29
	0.010	139 987	35
	0.078	129 987	44
	0.312	119 988	57
	0.625	119 988	57
	1.250	69 993	93

Таблица 3

Индукция образования микроядер НЧС в культуре клеток лимфомы мышей L5178Y без метаболической активации

Вещество	Концентрация, мг/мл	Число микроядер
Вода (отрицательный контроль)	0	2.5 ± 0.7
ММС (положительный контроль)	0.0001	15.0 ± 1.4 ^a
НЧС	0.002	2.0 ± 1.4
	0.005	2.5 ± 0.7
	0.010	2.0 ± 1.4
	0.078	2.5 ± 0.7
	0.312	4.5 ± 0.7

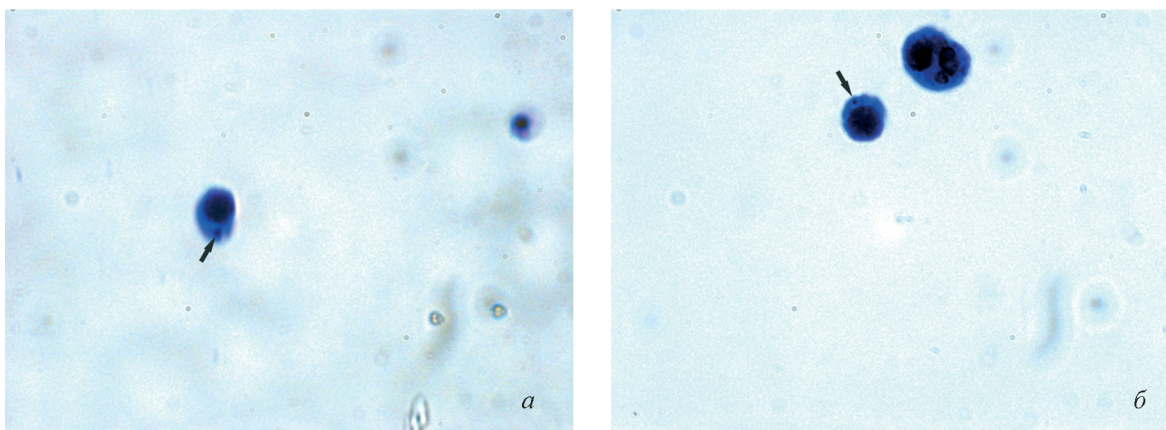
^a Статистически достоверные различия по сравнению с отрицательным контролем при $p < 0.05$.

Таблица 4

Индукция образования микроядер НЧС в культуре клеток лимфомы мышей L5178Y при метаболической активации фракцией S9

Вещество	Концентрация, мг/мл	Число микроядер
Вода и S9 (отрицательный контроль)	0	2.0 ± 0.5
ЦФ (положительный контроль)	10	11.5 ± 0.7 ^a
НЧС	0.002	2.0 ± 0.1
	0.005	2.5 ± 0.7
	0.010	2.5 ± 2.5
	0.039	3.0 ± 1.4
	0.312	3.0 ± 1.4

^a Статистически достоверные различия по сравнению с отрицательным контролем при $p < 0.05$.



Микроядра (стрелки) в клетках L5178Y (положительный контроль), культивировавшихся с MMC (а) и ЦФ (б).

на клетки L5178Y в течение 4 ч представлены в табл. 3, 4. Микроядра, обнаруживаемые в клетках из групп положительного контроля, представлены на рисунке.

Частота спонтанного образования микроядер в клетках из групп отрицательного контроля не превышает 0—0.5 %, что соответствует литературным данным (Logge, 2010). Несмотря на достаточно высокую токсичность НЧС, изменение числа обнаруживаемых микроядер в клетках L5178Y при воздействии НЧС статистически недостоверно и не превышает уровня их спонтанного образования. Также не выявлено существенных изменений числа микроядер, наблюдаемых в клетках при действии фракции S9 на НЧС. Для неметаллических наноматериалов отсутствие генотоксических свойств более характерно, чем для металлических (Ng et al., 2010; Kwon et al., 2014; Шубенков и др., 2014), поскольку металлические наночастицы в большей степени повышают эффективность генерации реактивных форм кислорода в ходе реакций Габера—Вейса и Фентона (Abdal Dayem et al., 2017). Неметаллические наноматериалы, такие как углеродные нанотрубки, могут взаимодействовать с белками, например с актином, и тем самым нарушать пролиферацию клеток, увеличивая число дефектов деления (Holt et al., 2010; Shvedova et al., 2012). Поэтому при изучении токсичности наноматериалов необходимо учитывать, что существенное влияние на их активность могут оказывать природа и физико-химические свойства объектов исследования.

Некоторые исследователи предполагают, что наночастицы серы, попадая внутрь эукариотической клетки, связываются с сульфгидрильными группами белков, нарушая тем самым ее метаболизм (Schneider et al., 2011; DeLeon et al., 2016), также в результате подобных взаимодействий может происходить образование молекул сероводорода (Williams, Cooper, 2004). Наночастицы серы лучше растворяются в воде, чем микрочастицы, и при нейтральных значениях pH способны образовывать сульфиды, которые ускоряют процесс образования полисульфидов (Hedderich et al., 1998). В свою очередь полисульфиды взаимодействуют с сульфгидрильными группами белковых и небелковых молекул, изменяя тем самым их свойства. По всей видимости, этим и объясняются цитотоксичность исследованных НЧС и в то же время отсутствие генотоксичности в микроядерном тесте *in vitro*.

Таким образом, токсическое действие НЧС на клетки мышины лимфомы L5178Y не связано с хромосомными

нарушениями, что подтверждается результатами МЯ-теста. По всей видимости, мишенью повреждающего действия НЧС на клетки действительно могут быть сульфгидрильные группы белков, что и обсуждается в различных исследованиях.

Авторы выражают благодарность проф. А. Нерсеяну (Медицинский университет Вены, Австрия) за ценные рекомендации и помощь в подготовке рукописи.

Работа выполнялась в рамках программно-целевого финансирования Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2015—2017 гг. по приоритетному направлению «Рациональное использование природных ресурсов, переработка сырья и продукции»: «Разработка новых методов получения наночастиц серы для создания технологий производства препаратов различного функционального назначения».

Список литературы

- Шубенков А. Н., Коровин С. Б., Андреева Е. Р., Буравкова Л. Б., Пустовой В. И. 2014. Модификация поверхности наночастиц кремния серебром или золотом снижает их биосовместимость *in vitro*. Цитология. 56 (7): 511—515. (Shubnikov A. N., Korovin S. B., Andreeva E. R., Buravkova L. B., Pustovoy V. I. 2014. Modification of silicon nanoparticles with silver or gold attenuates its biocompatibility *in vitro*. Tsitologiya. 56 (7): 511—515.)
- Abdal Dayem A., Hossain M. K., Lee S. B., Kim K., Saha S. K., Yang G.-M., Choi H. Y., Cho S.-G. 2017. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 120.
- Alazraki N. P., Styblo T., Grant S. F., Cohen C., Larsen T., Aarsvold J. N. 2001. Sentinel node staging of early breast cancer using lymphoscintigraphy and the intraoperative gamma detecting probe. *Radiol. Clin. North. Amer.* 39: 947—956.
- Azqueta A., Dusinska M. 2015. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Front. Genet.* 6: 239.
- Choi H.-S., Kim Y.-J., Song M., Song M.-K., Ryu J.-C. 2011. Genotoxicity of nano-silica in mammalian cell lines. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 3: 7—13.
- Choudhury S. R., Ghosh M., Goswami A. 2012a. Inhibitory effects of sulfur nanoparticles on membrane lipids of *Aspergillus niger*: a novel route of fungistasis. *Curr. Microbiol.* 65: 91—97.
- Choudhury S. R., Ghosh M., Mandal A., Chakravorty D., Pal M., Pradhan S., Goswami A. 2011. Surface-modified sulfur na-

- nanoparticles: an effective antifungal agent against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90 : 733—743.
- Choudhury S. R., Goswami A. 2013. Supramolecular reactive sulphur nanoparticles: a novel and efficient antimicrobial agent. J. Appl. Microbiol. 114 : 1—10.
- Choudhury S. R., Roy S., Goswami A., Basu S. 2012b. Polyethylene glycol-stabilized sulphur nanoparticles: an effective antimicrobial agent against multidrug-resistant bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 67 : 1134—1137.
- Countryman P. I., Heddle J. A. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. Mutat. Res. 41 : 321—332.
- DeLeon E. R., Gao Y., Huang E., Arif M., Arora N., Divietro A., Patel S., Olson K. R. 2016. A case of mistaken identity: are reactive oxygen species actually reactive sulfide species? Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 310 : 549—560.
- Deshpande A. S., Khomane R. B., Vaidya B. K., Joshi R. M., Harle A. S., Kulkarni B. D. 2008. Sulfur nanoparticles synthesis and characterization from H₂S gas, using novel biodegradable iron chelates in w/o microemulsion. Nanoscale Res. Lett. 3 : 221—229.
- Doak S. H., Manshian B., Jenkins G. J. S., Singh N. 2012. *In vitro* genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. Mutat. Res. 745 : 104—111.
- Frier M., Griffiths P., Ramsey A. 1981. The physical and chemical characteristics of sulphur colloids. Eur. J. Nucl. Med. 6 : 255—260.
- Fuerst J. A., Sagulenko E. 2010. Protein uptake by bacteria: an endocytosis-like process in the planctomycete *Gemmata obscuriglobus*. Comm. Integr. Biol. 3 : 572—575.
- Hedderich R., Klimmek O., Kröger A., Dirmeier R., Keller M., Stetter K. O. 1998. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. FEMS Microbiol. Rev. 22 : 353—381.
- Holt B. D., Short P. A., Rape A. D., Wang Y. L., Islam M. F., Dahl K. N. 2010. Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and *ex vivo*. ACS Nano. 4 : 4872—4878.
- Hung J. C., Wiseman G. A., Wahner H. W., Mullan B. P., Taggart T. R., Dunn W. L. 1995. Filtered Tc-99m sulfur colloid evaluated for lymphoscintigraphy. J. Nucl. Med. 36 : 1895—1901.
- Intenzo C. M., Truluck C. A., Kushen M. C., Kim S. M., Berger A., Kairys J. C. 2009. Lymphoscintigraphy in cutaneous melanoma: an updated total body atlas of sentinel node mapping. Radiographics. 29 : 1125—1135.
- Jia L., Liu X. 2007. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *in vitro* experiments. Curr. Drug Metabolism. 8 : 822—829.
- Kim H. R., Park Y. J., Shin D. Y., Oh S. M., Chung K. H. 2013. Appropriate *in vitro* methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. Environ. Health Toxicol. 28 : e2013003.
- Kirchner S., Zeller A. 2010. Comparison of different cytotoxicity measures for the *in vitro* micronucleus test (MN_{vit}) in L5178Y tk(+/-) cells: summary of 4 compounds (Mitomycin C, Cyclophosphamide, Colchicine and Diethylstilboestrol) with clastogenic and aneugenic mode of action. Mutat. Res. 702 : 193—198.
- Kwon J. Y., Kim H. L., Lee J. Y., Ju Y. H., Kim J. S., Kang S. H., Kim Y.-R., Lee J.-K., Jeong J., Kim M.-K., Maeng E. H., Seo Y. R. 2014. Undetectable levels of genotoxicity of SiO₂ nanoparticles in *in vitro* and *in vivo* tests. Int. J. Nanomed. 9 : 173—181.
- Lin P.-C., Lin S., Wang P. C., Sridhar R. 2014. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. Biotechnol. Advances. 32 : 711—726.
- Lorge E. 2010. Comparison of different cytotoxicity measurements for the *in vitro* micronucleus assay using L5178Y and TK6 cells in support of OECD draft Test Guideline 487. Mutat. Res. 702 : 199—207.
- Lu Z., Rong K., Li J., Yang H., Chen R. 2013. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. J. Mater. Sci. Mater. Med. 24 : 1465—1471.
- Michenfelder M. M., Bartlett L. J., Mahoney D. W., Herold T. J., Hung J. C. 2014. Particle-size and radiochemical purity evaluations of filtered 99mTc-sulfur colloid prepared with different heating times. J. Nucl. Med. Technol. 42 : 283—288.
- Ng C.-T., Li J. J., Bay B.-H., Yung L.-Y. L. 2010. Current studies into the genotoxic effects of nanomaterials. J. Nucl. Acid. 2010 : 947 859.
- O'Brien P., Haskins J. R. 2007. *In vitro* cytotoxicity assessment. Meth. Mol. Biol. 356 : 415—425.
- Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U. 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. Small. 3 : 1941—1949.
- Sahu S. C., Zheng J., Graham L., Chen L., Ihrie J., Yourick J. J., Sprando R. L. 2014. Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells in culture. J. Appl. Toxicol. 34 : 1155—1166.
- Schneider T., Baldauf A., Ba L. A., Jamier V., Khairan K., Sarakbi M. B., Reum N., Schneider M., Röseler A., Becker K., Burkholz T., Winyard P. G., Kelkel M., Diederich M., Jacob C. 2011. Selective antimicrobial activity associated with sulfur nanoparticles. J. Biomed. Nanotechnol. 7 : 395—405.
- Shrestha A., Hamblin M. R., Kishen A. 2014. Photoactivated rose bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-collagen. Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine. 10 : 491—501.
- Shvedova A. A., Pietrojusti A., Fadeel B., Kagan V. E. 2012. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. Toxicol. Appl. Pharmacol. 261 : 121—133.
- Totsuka Y., Higuchi T., Imai T., Nishikawa A., Nohmi T., Kato T., Masuda S., Kinai N., Hiyoshi K., Ogo S., Kawanishi M., Yagi T., Ichinose T., Fukumori N., Watanabe M., Sugimura T., Wakabayashi K. 2009. Genotoxicity of nano/microparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems. Part. Fibre. Toxicol. 6 : 23.
- Tweedy B. G. 1981. Inorganic sulfur as a fungicide. Residue Rev. 78 : 43—68.
- Urakaev F. Kh., Bulavchenko A. I., Uralbekov B. M., Massalimov I. A., Tatykayev B. B., Bolatov A. K., Dzharlykasimova D. N., Burkitbayev M. M. 2016. Mechanochemical synthesis of colloidal sulfur particles in the Na₂S₂O₃—H₂(C₄H₄O₄)—Na₂SO₃ system. Colloid J. 78 : 210—219.
- Warheit D. B., Donner E. M. 2010. Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines. Nanotoxicology. 4 : 409—413.
- Williams J. S., Cooper R. M. 2004. The oldest fungicide and newest phytoalexin — a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. Plant Pathol. 53 : 263—279.
- Zhang L. S., Honma M., Hayashi M., Suzuki T., Matsuoka A., Sofuni T. 1995. A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. Mutat. Res. 347 : 105—115.
- Zhang X.-D., Wu D., Shen X., Liu P.-X., Yang N., Zhao B., Zhang H., Sun Y.-M., Zhang L.-A., Fan F.-Y. 2011. Size-dependent *in vivo* toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. Int. J. Nanomed. 6 : 2071—2081.

LACK OF MUTAGENIC ACTIVITY OF SULFUR NANOPARTICLES
IN MICROCELLULAR TEST ON L5178Y CELL CULTURE

R. A. Islamov,^{1,} I. Bishimova,¹ A. N. Sabitov,¹
A. I. Ilin,¹ M. M. Burkitbaev²*

¹ Scientific Center for Anti-Infectious Drugs, Alma-Ata, Kazakhstan, and

² Al-Farabi Kazakh National University, Alma-Ata, Kazakhstan;

* e-mail: renatislamov@gmail.com

The nature and physicochemical characteristics of nanomaterials affect their biological activity. Sulfur microparticles and sulphur nanoparticles have different levels of activity against bacterial, fungal, and animal cells. The cytotoxicity and genotoxicity of sulfur nanoparticles (SNPs) of about 70 nm in size were examined on the L5178Y mouse lymphoma cell culture. The concentration of SNPs causing 50 % cell death is 0.078—0.312 mg/ml. The micronucleus assay revealed no mutagenic properties of SNPs. Metabolic activation of SNPs by the rat liver microsomal fraction does not affect the toxicity. It is assumed that the mechanism of cytotoxic action is associated with the interaction of elemental sulfur with sulfhydryl groups of molecules inside the cell.

Key words: cytotoxicity, genotoxicity, micronucleus assay, mutagenicity, sulphur nanoparticles.
