

УДК 614.876:621.039.58

Национальная академия медицинских наук Украины
Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии им. С. П.
Григорьева НАМН Украины»
(ГУ «ИМР НАМН Украины»)
Лаборатория радиационной цитогенетики 61024, г. Харьков, ул. Пушкинская, 82;
тел. (057) 700-49-69
e-mail: lrcg.imr@mail.ru

УТВЕРЖДАЮ

Директор ГУ ИМР НАМН Украины,
член-кор. НАМН Украины,
д-р мед. наук,

_____ М. Пилипенко

О Т Ч Е Т

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОГО ГЕНОТОКСИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ
ГИДРАТИРОВАННОГО ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ (ГФС₆₀) В ВИДЕ ЕГО ВОДНОГО
РАСТВОРА (ВРГФС₆₀)

Зав. лабораторией
радиационной цитогенетики,
д-р. биол. наук

_____ Н. Мазник
" 10 " 06 2010 г.

2010

© 2010 «Институт Физиологически Активных Соединений» ООО. Все права
защищены
(Адаптированный перевод с украинского)

УДК 614.876:621.039.58

Національна академія медичних наук України
Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С.П.Григор'єва НАМН
України»
(ДУ «ІМР НАМН України»)
Лабораторія радіаційної цитогенетики 61024, м. Харків, вул. Пушкінська, 82;
тел.(057) 700-49-69
e-mail: lrcg.imr@mail.ru

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор ДУ ІМР НАМН України,
член-кор. НАМН України, професор,
Д-р мед наук



М. Пилипенко М. Пилипенко

З В І Т

**ВИВЧЕННЯ МОЖЛИВОЇ ГЕНОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ГІДРАТОВАНОГО
ФУЛЕРЕНА C₆₀ (ГФС₆₀) У ВИГЛЯДІ ЙОГО ВОДНОГО РОЗЧИНУ (ВРГФС₆₀)**

Зав. лабораторією
радіаційної цитогенетики,
д-р. біол. наук

Н. Мазник Н. Мазник
"10" 06 2010 р.

2010

Изучение медико-биологических эффектов действия фуллеренов на нормальные и патологические клетки человека является неотъемлемой составляющей дальнейшего развития нанотехнологий в медицине. С появлением современных нанотехнологий становится очень актуальной проблема относительно безопасности наноматериалов, которые планируются для использования в областях медицины, фармакологии, биологии и других сферах человеческой деятельности [1, 2, 3].

Наиболее типичные и исследуемые объекты, которые традиционно относят к наноматериалам - это фуллерены. Фуллерены - третья после алмаза и графита аллотропная форма чистого углерода с общей формулой C_N , где N количество атомов углерода и может принимать значение 60, 70, 74, 76, 78, 80, 82 и 84. Они являются стабильными многоатомными углеродными молекулами сферической (икосаэдрической) формы, образованной пяти- и шестиугольными гранями. Размер таких молекул колеблется от 0,9 до 2 нм. Наиболее распространенным и доступным есть простейший фуллерен C_{60} (или бакминстерфуллерен), который был открыт в 1985 г. [4].

Проблемой биологического тестирования фуллеренов было то, что их кристаллические формы не могут самопроизвольно растворяться в воде для того, чтобы образовать их молекулярные растворы. В 1994 году Андриевским Г. В. и соавторами был разработан метод, который разрешал получать высокостабильные водные растворы гидратированных фуллеренов (ВРГФ, FWS). Эти растворы содержат большей частью изолированные гидратированные молекулы фуллерена (ГФ, H_nFn), а в высококонцентрированных ВРГФ они способны формировать небольшие ассоциаты с размерами 3 - 36 нм, которые легко диссоциируют при разбавлении ВРГФ [5, 6]. Это позволило проводить биологическое тестирование фуллеренов, в том числе и на генотоксичное действие.

Один из общепринятых в мировой практике тестов на генотоксичность - анализ структурных aberrаций хромосом и геномных нарушений в культуре лимфоцитов периферической крови человека [7, 8]. Хромосомный анализ очень чувствительный и, по мнению многих исследователей, является самым

информативным методом детекции и изучения генотоксического влияния факторов физической и химической природы на организм человека. На протяжении многих лет мы определяли влияние ионизирующей радиации на генетический аппарат человека как в экспериментах *in vitro*, так и при исследовании контингентов, которые подвергались влиянию радиационного фактора в условиях аварийного, профессионального или терапевтического облучения. С помощью цитогенетического анализа было выявлено не только радиационно-обусловленные эффекты, но и влияние факторов нерадиационной (химической) природы, в частности в группах пострадавших вследствие Чернобыльской аварии [9].

Целью данного исследования было изучение возможного генотоксического действия гидратированного фуллерена C_{60} ($ГФС_{60}$) в виде его водного раствора ($ВРГФС_{60}$) с помощью теста структурных aberrаций хромосом и геномных нарушений в культуре лимфоцитов периферической крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генотоксичность стандартного образца $ВРГФС_{60}$ ($C_{60}FWS$) определяли в условиях *in vitro*, с использованием эукариотической тест системы - культуры лимфоцитов периферической крови человека. Показателями исследования выступали структурные aberrации хромосом и геномные нарушения.

Использовали лимфоциты крови трех клинически здоровых доноров: одного - женского пола (донор I, возрастом 23 года), и двух - мужского пола (донор II, возрастом 50 лет и донор III, возрастом 54 года). Доноры не испытывали влияние ионизирующих излучений или повреждающих факторов нерадиационной природы в условиях профессиональной деятельности и не проходили рентгенодиагностических процедур на протяжении 1 года к моменту исследования.

Культивирование лимфоцитов периферической крови доноров выполняли по стандартной методике [7]. Цельную гепаринизированную кровь

(0,5 мл) [10] переносили в стерильные флаконы с культуральной смесью, состоящую из 4 мл среды Игла и RPMI 1640 (в соотношении 1:1), содержащую бромдезоксипуридин с концентрацией 0,5 мкг/мл, а также 1 мл сыворотки большого рогатого скота, содержащей фитогемаглютинин (GiBco) с общей концентрацией 2 %. По каждому донору делалось не менее 9 культур клеток. Рабочий образец водного раствора ГФС₆₀ ("рабочий ВРГФС₆₀") получали путем разведения в десять раз стерильного концентрированного ВРГФС₆₀ ($[C_{60}] = 200 \mu\text{M/L} = 144 \text{ мг/л}$) стерильной бидистиллированной водой двойной очистки. Согласно требованиям к тестированию веществ на биологическое действие (в том числе на генотоксичность), рабочий ВРГФС₆₀ вносили в культуры лимфоцитов через 24 часа после начала культивирования [10, 11]. В каждом экспериментальном варианте ставились параллельные культуры. Часть их оставляли интактными (точка 1 – контрольные культуры), к другой части культур стерильно внесли 0,25 мл растворителя (точка 2 – контроль растворителя) и в экспериментальные культуры стерильно внесли 0,25 мл рабочего ВРГФС₆₀, создавая конечную концентрацию $C_{60} 1,0 \mu\text{M/L}$ (точка 3 – экспериментальные культуры с ВРГФС₆₀). В пределах каждого эксперимента с контрольными культурами осуществляли такие же манипуляции, как и с экспериментальными за исключением добавления ВРГФС₆₀. Содержимое флаконов равномерно перемешивали и оставляли в термостате на 50 - 52 ч при 37,5 °С. За 4 ч до окончания культивирования прибавили раствор колхицина с массовой концентрацией 0,1 мкг/мл. После обработки гипотоническим раствором КС1 клетки фиксировали в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Суспензию клеток наносили на предметное стекло, высушивали при комнатной температуре в темноте. Часть препаратов, в количестве достаточном для оценки/контроля репликативного индекса, окрашивали методом флуоресцентного-плюс-Гимза (FPG). Если количество клеток второго митоза не превышало 5-7 %, остаток препаратов окрашивали по Гимзу. Полученное количество слайдов обеспечило необхо-

димое для статистического анализа количество клеток.

Препараты анализировали под световыми микроскопами Биолам-1 и Micros MC 300 (Австрия) на увеличении $\times 1000$, с масляной иммерсией. Распознавание цитогенетических нарушений и контроль клеточного цикла проводили с использованием общепринятых критериев [7, 12]. При анализе регистрировали весь спектр aberrаций хромосом (А Хр), которые распознавались в aberrантных клетках (А Кл) при групповом кариотипировании. В качестве aberrаций хромосомного типа (А Хс) регистрировали дицентрические хромосомы (Диц), центрические кольца (ЦК), свободные ацентричные хромосомные фрагменты (Ац Фр), атипические моноцентрики – транслокации и делетированные хромосомы (Тн); хромосомные обмены регистрировали в зависимости от наличия/отсутствия сопутствующих фрагментов (фр). Среди aberrаций хроматидного типа (А Хт) определяли хроматидные обмены (Хт Обм), хроматидные фрагменты (Хт Фр), хроматидные пробелы (Хт Пб) и изохроматидные делеции (Ихт Дел). К геномным нарушениям (ГН) относили полиплоидные (Ппл) и гиперплоидные (Гип) клетки.

При статистическом анализе данных результаты объединяли в зависимости от варианта культивирования: интактные клетки, контроль растворителя и экспериментальный вариант культивирования (внесение ВРГФС₆₀), для каждого донора отдельно. На каждой точке определяли взвешенные средние уровни aberrантных клеток и структурных перестроек хромосом (Y) на 100 нормоплоидных клеток и частоту геномных нарушений в расчете на все 100 проанализированные клетки. Стандартные погрешности средних (SE) вычисляли из дисперсии индивидуальных значений показателя в группе. Достоверность разности по средним значениям цитогенетических показателей между группами оценивали за t-критерием Стьюдента для независимых выборок и с помощью критерия χ^2 [13]. Соответствие распределения структурных aberrаций хромосом по клеткам статистике Пуассона оценивали по отношению дисперсии к среднему (σ^2/Y) и по u-тесту Папворта [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего в данном исследовании методом классического цитогенетического анализа проанализировано 5008 метафаз. На каждую контрольную и экспериментальную точку было изготовлено по 6-8 препаратов. Все препараты были закодированы. Препараты из каждой точки исследования анализировали два микроскописта; каждую aberrацию, найденную первым микроскопистом верифицировалась вторым микроскопистом.

Спектр цитогенетических аномалий в клетках культур лимфоцитов всех доноров в контроле и эксперименте состоял из aberrаций хромосомного типа (28,7 % от всех выявленных aberrаций) и хроматидного типа, которые составляли 71,3 %. Часть aberrаций хроматидного типа преобладала в спектре aberrаций всех доноров, независимо от возраста и пола и составляла 67,5 %, 60,7 % и 80,9 %, соответственно, у доноров I, II и III. Хроматидные aberrации были представлены преимущественно фрагментами, но в клетках всех трех доноров встречали также хроматидные обмены. Кроме того, в клетках донора I и III были выявленные изохроматидные делеции. Aberrации хромосомного типа были представлены ацентричными фрагментами, несколькими дицентриками с сопутствующими фрагментами и одним атипичским моноцентриком, который вероятнее всего представлял транслокацию. Среди aberrаций обоих типов преобладали фрагментные aberrации, которые составляли 87,5 %, 85,7 % и 89,3 % от всех выявленных aberrаций у доноров I, II и III соответственно. Что касается геномных нарушений, гиперплоиды были спорадично представлены клетками с трисомией по разным группам (т.е., не клонового характера) у доноров I и II. Ни у кого из доноров не наблюдалось полиплоидных клеток. Распределение всех видов структурных повреждений хромосом по клеткам на всех точках наблюдения было рандомизированным и отвечал статистике Пуассона, что подтверждалось значениями u -теста ($u < 1.96$).

Частоты разных видов хромосомных aberrаций и геномных нарушений в эксперименте с культурами лимфоцитов донора I (женского пола, возраст 23 года) представлены в таблице 1.

Все виды структурных повреждений хромосомного типа, т.е. дицентрики с сопутствующими фрагментами, ацентрические фрагменты, находились на спонтанном уровне для всех точек наблюдения (интактный контроль, контроль растворителя и ВРГФС₆₀). Повреждения хромосомного типа такие, как кольцевые хромосомы и транслокации, в клетках донора I не встретились.

Частоты aberrаций хроматидного типа, т.е. хроматидных фрагментов, хроматидных обменов, изохроматидных делеций также не различались для всех точек наблюдения. Тенденция к снижению уровня хроматидных фрагментов для точки 2 (контроль растворителя) в сравнении с интактным контролем и ВРГФС₆₀ не была достоверной: $t=1,30$ ($p>0,05$) для различия между точками 1 и 2 и $t=1,30$ ($p>0,05$) - между точками 2 и 3.

Что касается уровня геномных нарушений, было выявлено одну гиперплоидную клетку для точки 2, однако различие между точками наблюдения статистически не достоверное.

Уровень отдельных видов хромосомных aberrаций и геномных нарушений в эксперименте с культурами лимфоцитов донора II (мужского пола, возраст 50 лет) представлено в таблице 2.

Частоты aberrаций хромосомного типа, а именно дицентриков с сопутствующими фрагментами, ацентрических фрагментов, не выходили за пределы спонтанных значений, но частота ацентрических фрагментов была достоверно меньшей для точки 3 (ВРГФС₆₀) в сравнении с точками 1 и 2 (интактный контроль и контроль растворителя) при $t=2,13$ ($p<0,05$) и $t=2,28$ ($p<0,05$), соответственно. Кольцевых хромосом и транслокаций в клетках донора II не найдено.

Таблица 1 - Уровень отдельных видов цитогенетических структурных хромосомных повреждений и геномных нарушений в эксперименте *in vitro* с клетками донора I

Вариант культивирования	Число клеток	Y±SE на 100 клеток								
		А Кл	Структурные повреждения хромосом						Геномные нарушения (ГН)	
			Диц Фр	Ац Фр	Тн	Хт Фр	Хт Обм	Ихт Дел	Гип	Ппл
Интактный контроль	401	2,49±0,79	0	0,75±0,43	0	1,25±0,56	0,50±0,35	0	0	0
Контроль растворителя	700	1,57±0,47	0,14±0,14	0,57±0,29	0	0,86±0,35	0	0	0,14±0,14	0
ВРГФС ₆₀	873	2,18±0,50	0,11±0,11	0,46±0,23	0	1,37±0,40	0,11±0,11	0,11±0,11	0	0

Примечание: Y - частота aberrаций, SE - стандартная погрешность частоты aberrаций (здесь и дальше)

Также, здесь и далее, данные таблиц скрыты для просмотра, поскольку материалы этого отчета готовятся для научной публикации в открытых печатных источниках (редакция ООО ИФАС).

Таблица 2 - Уровень отдельных видов цитогенетических структурных хромосомных повреждений и геномных нарушений в эксперименте *in vitro* с клетками донора II

Вариант культивирования	Число клеток	Y±SE на 100 клеток								
		А Кл	Структурные повреждения хромосом						Геномные нарушения (ГН)	
			Диц Фр	Ац Фр	Тн	Хт Фр	Хт Обм	Ихт Дел	Гип	Ппл
Интактный контроль	309	2,91±0,97	0	1,29±0,65	0	1,29±0,65	0,32±0,32	0	0,32±0,32	0
Контроль растворителя	404	3,71±0,96	0,25±0,25	1,49±0,61	0	1,73±0,66	0,25±0,25	0	0	0
ВРГФС ₆₀	349	1,15±0,57	0	0	0	0,86±0,50	0,29±0,29	0	0,29±0,29	0

Отличия в уровнях отдельных видов повреждений хроматидного типа, а именно хроматидных фрагментов и хроматидных обменов, между тремя точками наблюдения не выявлено. Изохроматидных делеций у донора II не найдено.

Суммарный уровень клеток с абберациями хромосом был достоверно ниже для точки 3 (ВРГФС₆₀) в сравнении с точкой 2 (контроль растворителя) при $t=2,21$; $p<0,05$. Мы считаем, что такое отличие обусловлено очень низким (нулевым) уровнем ацентрических фрагментов в клетках с ВРГФС₆₀. Отличия в уровне клеток с абберациями хромосом между точками 3 и 1 (интактный контроль) не выявлено ($t=1,61$; $p>0,05$).

Из геномных нарушений было найдено 2 гиперплоидные клетки: одна для точки 1 и одна для точки 3, однако отличие между этими точками наблюдения статистически не достоверное.

Уровни отдельных видов хромосомных аббераций и геномных нарушений в эксперименте с культурами лимфоцитов донора III (мужского пола, возрастом 54 года) представлены в таблице 3.

Как и в случае клеток донора I, отличия в уровнях отдельных видов повреждений хромосомного типа во всех точках наблюдения выявлено не было. Для точки 3 выявлен один атипичский моноцентрик (транслокацию). Кольцевых хромосом в клетках третьего донора не найдено.

Частоты аббераций хроматидного типа, т.е. хроматидных фрагментов, хроматидных обменов, изохроматидных делеций, тоже не различались для всех точек. Наблюдали тенденцию к снижению уровня хроматидных фрагментов для точки 3 (ВРГФС₆₀) в сравнении с интактным контролем (точка 1) и контролем растворителя (точка 2), однако достоверного отличия выявлено не было ($t=0,82$; $p>0,05$ для отличия между точками 3 и 1 и $t=1,08$; $p>0,05$ - между точками 3 и 2).

Геномных нарушений в клетках донора III не найдено.

Таблица 3 - Уровень отдельных видов цитогенетических структурных хромосомных повреждений и геномных нарушений в эксперименте *in vitro* с клетками донора III

Вариант культивирования	Число клеток	Y±SE на 100 клеток								
		А Кл	Структурные повреждения хромосом						Геномные нарушения (ГН)	
			Диц Фр	Ац Фр	Тн	Хт Фр	Хт Обм	Ихт Дел	Гип	Ппл
Интактный контроль	541	2,22±0,64	0	0,18±0,18	0	1,85±0,59	0,18±0,18	0	0	0
Контроль растворителя	649	2,62±0,64	0	0,46±0,27	0	2,00±0,56	0,15±0,15	0,15±0,15	0	0
ВРГФС ₆₀	782	2,17±0,53	0,13±0,13	0,38±0,22	0,13±0,13	1,28±0,40	0,13±0,13	0,13±0,13	0	0

При объединении данных цитогенетического анализа для доноров мужского пола было установлено, что средний уровень повреждений хромосомного типа для точек наблюдения 1, 2 и 3 составлял: для ацентрических фрагментов $0,59 \pm 0,26$; $0,85 \pm 0,29$ и $0,27 \pm 0,15$, для дицентриков 0; $0,09 \pm 0,09$ и $0,09 \pm 0,09$, для транслокаций 0; 0 и $0,09 \pm 0,09$, соответственно (здесь и далее по тексту приводятся расчеты значений на 100 клеток).

Средний уровень aberrаций хроматидного типа для точек наблюдения 1, 2 и 3 составлял: для хроматидных фрагментов $1,65 \pm 0,44$; $1,90 \pm 0,42$ и $1,15 \pm 0,32$, для хроматидных обменов $0,24 \pm 0,17$; $0,19 \pm 0,13$ и $0,18 \pm 0,13$ и для изохроматидных делеций 0; $0,09 \pm 0,09$ и $0,09 \pm 0,09$, соответственно.

Средний уровень гиперплоидных клеток соответствовал значениям $0,12 \pm 0,12$; 0 и $0,09 \pm 0,09$, соответственно.

Ни по одному из показателей не было найдено отличия между точками наблюдения.

Существует еще один вид структурных повреждений хроматидного типа. Это так называемые хроматидные пробелы (gap – по-английски). Некоторые исследователи считают, что в связи с природой хроматидных пробелов и субъективностью критериев их распознавания, что обуславливает повышенную вариабельность данного показателя, не следует включать учет хроматидных пробелов к протоколам и результатам цитогенетического анализа [7, 15]. Мы разделяем это мнение. Тем не менее, другие исследователи считают, что хроматидные пробелы надо анализировать при тестировании веществ на генотоксичность [16]. Мы в данном исследовании вели учет хроматидных пробелов, но анализировали эти данные отдельно, не включая в суммарную частоту структурных хромосомных aberrаций. Результаты представлены в таблице 4. Для всех доноров существовала относительно невысокая вариабельность данного показателя. Отличие между точками наблюдения статистически не достоверное.

Таблица 4 - Уровень хроматидных пробелов в эксперименте *in vitro* по всей выборке проанализированных клеток

Донор клеток	Интактный контроль		Контроль растворителя		Раствор фуллерена	
	Число клеток	$Y \pm SE$ на 100 клеток	Число клеток	$Y \pm SE$ на 100 клеток	Число клеток	$Y \pm SE$ на 100 клеток
Донор I	401	4,24 \pm 1,03	700	2,86 \pm 0,64	873	3,44 \pm 0,63
Донор II	309	3,56 \pm 1,08	404	3,71 \pm 0,96	349	2,01 \pm 0,76
Донор III	541	1,11 \pm 0,45	649	2,00 \pm 0,56	782	2,05 \pm 0,51
Сумма для доноров I, II и III	1251	2,72 \pm 0,47	1753	2,74 \pm 0,40	2004	2,64 \pm 0,36

Интегральные цитогенетические показатели, а именно суммарные уровни всех aberrаций хромосом, aberrаций хромосомного типа и aberrаций хроматидного типа у доноров I, II и III для всех точек наблюдения, а также объединенные данные приведены на рис. 1, рис. 2, рис. 3 и рис. 4, соответственно.

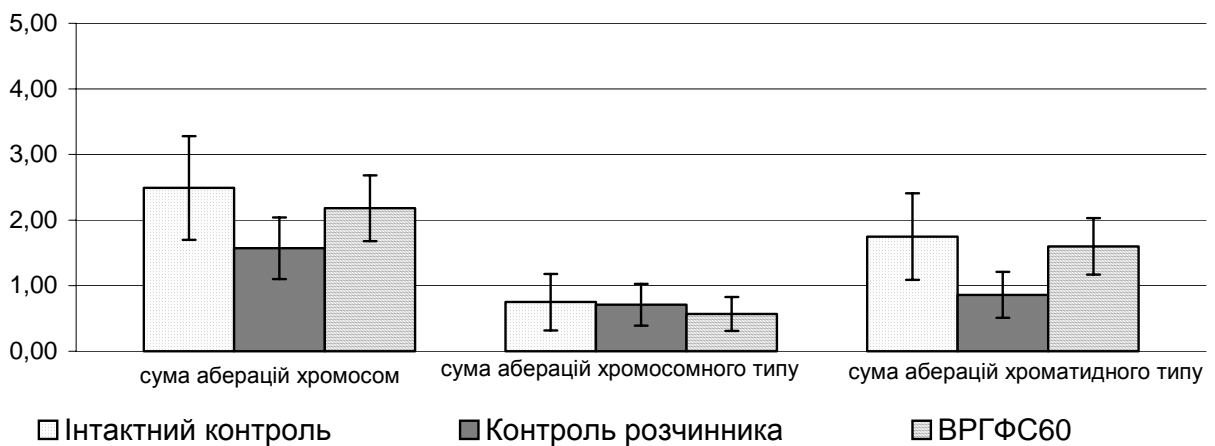


Рисунок 1 – Суммарные уровни структурных хромосомных повреждений разных типов в эксперименте *in vitro* с клетками донора I

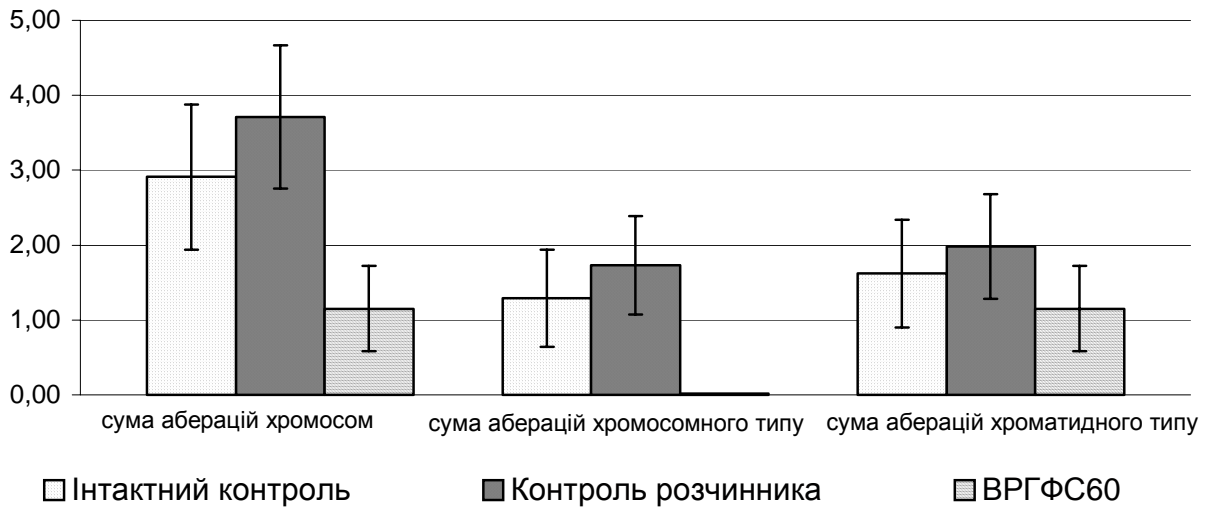


Рисунок 2 – Суммарные уровни структурных хромосомных повреждений разных типов в эксперименте *in vitro* с клетками донора II

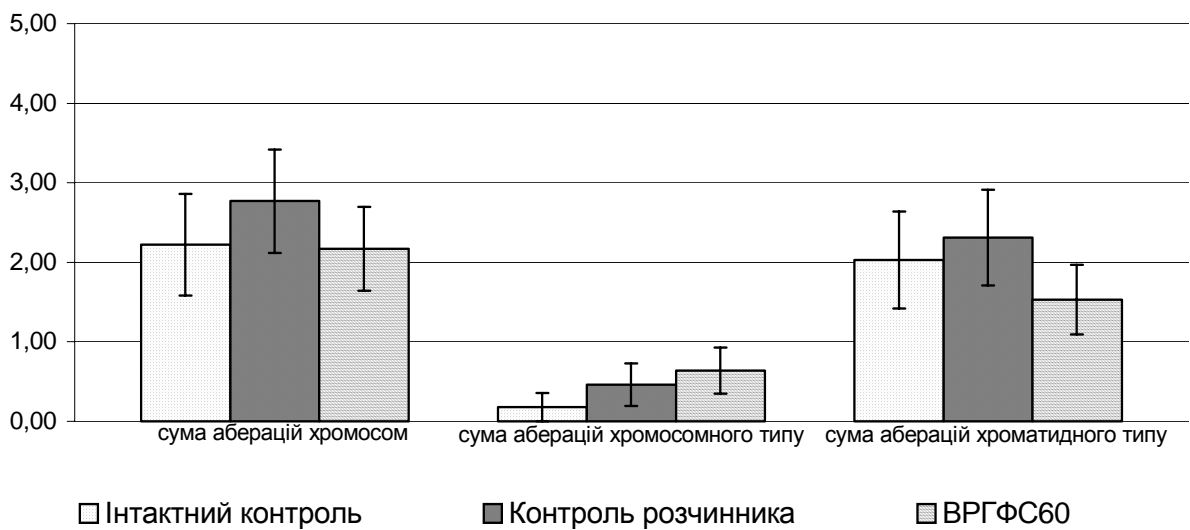


Рисунок 3 – Суммарные уровни структурных хромосомных повреждений разных типов в эксперименте *in vitro* с клетками донора III

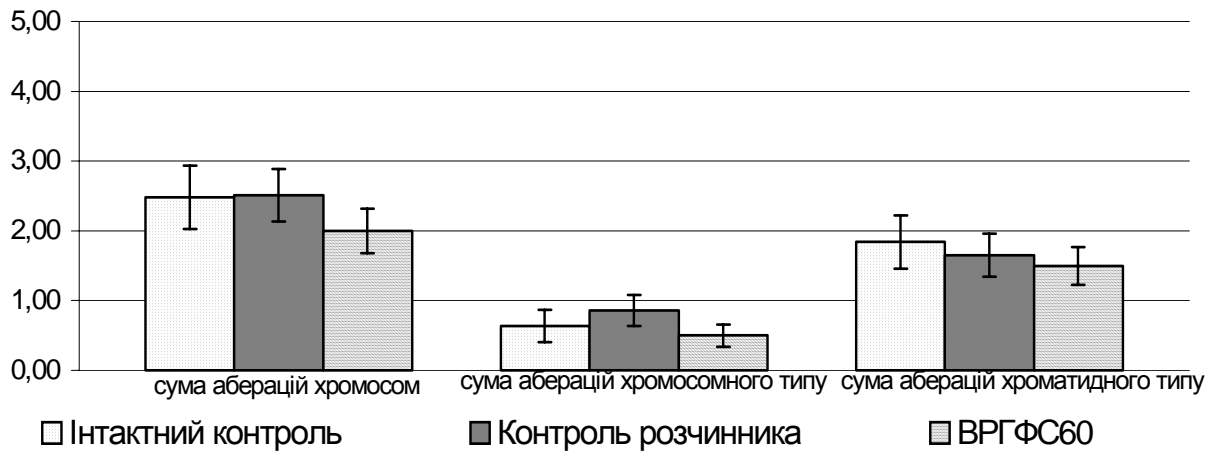


Рисунок 4 – Средние уровни структурных хромосомных повреждений разных типов в эксперименте *in vitro* при объединении выборок проанализированных клеток от трех доноров

По всем исследованным показателями у донора I (рис. 1) отличия между точками наблюдения выявлено не было. Наблюдали тенденцию к снижению частоты абераций хроматидного типа и за счет этого суммарной частоты абераций хромосом для точки контроля растворителя в сравнении с интактным контролем и ВРГФС₆₀, тем не менее, достоверного отличия выявлено не было ($\chi^2=1,05$; $p=0,31$ для отличия абераций хроматидного типа между точками 1 и 2 и $\chi^2=1,18$; $p=0,28$ - между точками 2 и 3).

Для донора II (рис. 2) для точки контроля растворителя наблюдали противоположную тенденцию, а именно увеличение суммарной частоты абераций хромосом в сравнении с интактным контролем и ВРГФС₆₀, при чем отличие между точками 2 и 3 было статистически значимым ($\chi^2=4,03$; $p=0,045$ для суммарной частоты абераций хромосом и $\chi^2=4,37$; $p=0,04$ для частоты абераций хромосомного типа). Между всеми показателями для точек 1 и 3 отличия не найдено.

Для уровней всех исследованных показателей донора III не было выявлено отличия между точками наблюдения (рис. 3).

Мы считаем, что индивидуальные колебания цитогенетических показателей для точек наблюдения целиком ожидаемы, а противоположная направленность изменений для точки контроля растворителя у доноров мужского и женского пола нуждается в дальнейшем изучении и свидетельствует о методологической необходимости оценки показателей в интактном контроле и в контроле растворителя при тестировании возможного генотоксического действия веществ. Вариабельность цитогенетических показателей между донорами была малозначащей и меньшей, чем мы ожидали. Одной из причин этого есть большое количество проанализированных в нашем исследовании клеток. Увеличение количества клеток, безусловно, положительно влияет на статистическую значимость полученных данных, но значительно удлиняет цитогенетическое исследование. Согласно рекомендациям относительно проведения тестов на генотоксичность, на каждую экспериментальную и контрольную точку надо анализировать не менее чем 200 клеток [17]. В нашем исследовании для каждой точке было проанализировано от 309 до 873 клеток, что обуславливает достоверность полученных выводов.

На рис. 4 представлены объединенные данные по всей выборке проанализированных клеток. Следует отметить, что полученные для каждого донора отдельные и суммарные данные основных цитогенетических показателей находились в полном соответствии контрольным значениям, которые были получены в нашей лаборатории и в других признанных лабораториях мира [7, 9, 18]. Частоты отдельных видов структурных повреждений и геномных нарушений, а также суммарные цитогенетические показатели в культурах лимфоцитов с раствором фуллерена равнялись или были в чем-то ниже, чем в интактных культурах, или в культурах с контролем растворителя. Полученные данные совпадают с недавними выводами других исследователей об отсутствии генотоксического действия фуллерена в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эксперименте *in vitro* с использованием методики анализа структурных aberrаций хромосом и геномных нарушений в культуре лимфоцитов периферической крови человека на репрезентативной выборке клеток не выявлено генотоксического действия водного раствора гидратированного фуллерена C₆₀.

ПЕРЕЧЕНЬ ССЫЛОК

1. Dobrovolskaia M.A. Immunological properties of engineered nanomaterials / S.E. McNeil // *Nature Nanotechnology* - 2007. - Vol. 2. - P. 468-478.
2. Dobrovolskaia M.A. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution / P. Aggarwal, J.B. Hall, S.E. McNeil // *Mol. Pharm.* - 2008. - Vol. 5. - P. 487- 495.
3. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека, МР 1.2.2522-09. // Методические рекомендации - М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора Российской Федерации, 2009. - 35 с.
4. Kroto H.W. C₆₀: Buckminsterfullerene / S. Heath, S.C. O'Brien, et al. // *Nature*. - 1985. - Vol. 318. - P. 162-162.
5. Andrievsky G.V. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes / M.V. Kosevich, O.M. Vovk, et al. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* - 1995. - Vol. 12. - P. 1281-1282.
6. Andrievsky G.V. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C₆₀ fullerene with help of FTIR reflectance and UV-Vis spectroscopy / V.K. Klochkov, A.B. Bordyuh, G.I. Dovbeshko // *Chem. Phys. Lett.* - 2002. - Vol. 364. - P. 8-17.
7. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A Manual. IAEA Techn. Report Series № 405. - Vienna: IAEA, 2001. – 127 p.
8. Environmental Health Criteria 47. Summary report on the evaluation of short-term tests for carcinogens (collaborative study on in vivo tests) - Geneva: World Health Organisation, 1985. – 77 p.
9. Мазник Н. А. Роль факторов нерадиационной природы в формировании цитогенетических эффектов у эвакуантов из 30 км зоны ЧАЭС // *Цитолог. и генетика* – 2004. – Т. XXXVIII, вып. 6. – С. 33-34.
10. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 473: Genetic Toxicology: In Vitro Mammalian Cytogenetic Test. - Paris: Organisation for Economic Co-

- operation and Development, 1997. – 10 p.
11. ISO 10993-3. Tests for genotoxicity, Carcinogenicity and Reproductive Toxicity. - Geneva: International Organization for Standardization, 2003. – 14 p.
 12. Хромосомы человека (Атлас) / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. - Г.: Медицина, 1982. - 264 с.
 13. Лакин Г. Ф. Биометрия. / Г. Ф. Лакин – М.: Высш. школа, 1973. - 344 с.
 14. Edwards A.A. Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution / A.A. Edwards, D.C. Lloyd, R.J. Purrott // Radiat. Environ. Biophys. – 1979. – Vol. 16. – P. 89-100.
 15. Environmental Health Criteria 51. Summary report on the evaluation of short-term tests for carcinogens (collaborative study on in vivo tests). - Geneva: World Health Organisation, 1985. – 208 p.
 16. Template for Genetic Toxicity Study: in vitro Mammalian Chromosomal Aberration: Test. Introduction to the Template for Genetic Toxicity Study: *in vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test [Electronic resource] / FDA US Food and Drug Administration. – 2005. – Mode of access: <http://www.fda.gov/default.htm>
 17. GenPharmTox: Invitromammalianchromosomeaberrationtest [Electronic resource] / GenPharmTox.– 2009.– Mode of access: <http://www.genpharmtox.de/downloads/AssaySheetCA.pdf>
 18. Maznik N.A., Vinnikov V.A., Lloyd D.C., Edwards A.A. Chromosomal dosimetry for some groups of evacuees from Prypiat and Ukrainian liquidators // Radiation Protection Dosimetry. - 1997. - Vol. 74, №1/2. - P. 5-11.
 19. Shinohara. In vivo and in vitro genotoxicity tests on fullerene₆₀ nanoparticles / N. Shinohara, K. Matsumoto, S. Endoh, J. Maru, J. Nakanishi // Toxicol. Letters-2009. - Vol. 191. - P. 289-296.