

**Литература.** 1. Алешкевич, В. Н. Диагностика трихофитии крупного рогатого скота в Республике Беларусь / В. Н. Алешкевич // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2011. – Т. 47, вып. 1. – С. 4–7. 2. Зайцева, В. В. Стимуляция биологической активности гриба рода *Trichophyton* при конструировании вакцины против трихофитии крупного рогатого скота : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 06.02.02 / В. В. Зайцева ; РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 2017. – 30 с. 3. Кухар, Е. В. Антигенные свойства компонентов клеточной стенки возбудителя трихофитии и их использование в разработке иммуноферментных тест-систем / Е. В. Кухар // Вестник науки Казахского аграрного университета им. С. Сейфуллина. – 2002. – Т. 3, № 5. – С. 75–81. 4. Кухар, Е. В. Культивирование гриба *Trichophyton faviforme* – возбудителя трихофитии крупного рогатого скота / Е. В. Кухар // Ветеринарная наука в период экономических реформ : сб. науч. ст. Международной научно-практической конференции, посвященной 120-летию академика К. И. Скрябина. – Астана, 1999. – С. 106–108. 5. Кухар, Е. В. Поверхностное культивирование дерматофитов в целях лабораторной диагностики / Е. В. Кухар, А. У. Байдуйсенова, А. К. Акимбаева // Вестник науки Казахского аграрного университета им. С. Сейфуллина. – 2006. – № 2 (41). – С. 149–156. 6. Лабусова, Н. И. Стимуляция поствакцинального иммунитета при трихофитии крупного рогатого скота : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / Н. И. Лабусова ; РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского». – Минск, 2004. – 21 с. 7. Лазовский, В. А. Живая сухая вакцина «Триховак-Стимул-1» против трихофитии крупного рогатого скота (получение, контроль и применение) : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / В. А. Лазовский ; РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 2007. – 22 с. 8. Маноян, М. Г. Терапия и профилактика дерматофитозов мелких домашних животных / М. Г. Маноян, К. П. Летягин, А. Н. Панин // Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов : тезисы докладов Всероссийской научной конф. – Москва, 2001. – С. 151–152. 9. Петрович, С. В. Микозы животных / С. В. Петрович. – Москва : Росагропромиздат, 1989. – 173 с. 10. Соловьев, Н. П. Подбор иммуногенных и продуктивных штаммов для вакцины Триховак 2 и ее применение в условиях Республики Саха (Якутия) : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / Н. П. Соловьева ; ВИЭВ. – Москва, 2004. – 27 с. 11. Тищенко, Е. В. Технологические параметры *Trichophyton faviforme* при культивировании в биореакторах / Е. В. Тищенко, М. Н. Мирзаев, Д. А. Деврешов // Ветеринарная медицина. – 2009. – № 1–2. – С. 20–21. 12. Тищенко, Е. В. Световая и сканирующая электронная микроскопия гриба *Trichophyton faviforme* при глубинном и поверхностном культивировании / Е. В. Тищенко // Ветеринарная медицина. – 2009. – № 4. – С. 21–22.

Поступила в редакцию 09.10.2024.

УДК 620.3:619

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОРАЗМЕРНЫХ И ИОННЫХ ФОРМ СЕРЕБРА

**Корочкин Р.Б., Красочко П.А., Понаськов М.А.**

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

Со времени появления нанотехнологий биологические объекты подвержены воздействию наноразмерных материалов, которые могут рассматриваться в качестве нового класса токсикантов. Из-за своей высокой антибактериальной активности и недоказанной устойчивости со стороны бактерий наночастицы серебра могут считаться одним из важных антибактериальных агентов, однако их токсичность в отношении более сложных организмов остается малоизученной. В настоящем опыте авторы постарались предложить методику определения экологической токсичности наночастиц металлов в сравнении с их ионными аналогами путем создания искусственной лабораторной модели, основанной на использовании водных организмов, таких как *Paramecium caudatum*. **Ключевые слова:** наночастицы серебра, ионы серебра, биоцидность, инфузория-туфелька, *Paramecium caudatum*.

## CYTOTOXIC PROPERTIES OF NANOSIZE AND IONIC FORMS OF SILVER

**Korachkin R.B., Krasochko P.A., Ponaskov M.A.**

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

Since the advent of nanotechnology, biological objects have been exposed to nanoscale materials, which can be considered as a new class of toxicants. Due to its high antibacterial activity and the unproven resistance of bacteria, silver nanoparticles can be considered one of the important antibacterial agents, however, their toxicity to more complex organisms remains poorly understood. In the present experiment, the authors tried to propose a method for determining the environmental toxicity of metal nanoparticles in comparison with these ionic counterparts by creating an artificial laboratory model based on the use of aquatic organisms such as *Paramecium caudatum*. **Keywords:** silver nanoparticles, silver ions, biocidal activity, ciliates, *Paramecium caudatum*.

**Введение.** Исследования в области наноматериалов получили значительную популярность в последние несколько лет. Нановещества привлекают все большее внимание благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, которые определяются их наноразмерностью и, в частности, в их большой площади поверхности. Наночастицы в настоящее время все чаще являются

целью научных исследований, а в повседневной жизни находят все большее применение, благодаря их использованию в коммерческих целях.

Наночастицы серебра представляют собой субстанцию, которая может использоваться в качестве потенциального антибактериального агента в медицинских целях и различных коммерческих продуктов благодаря своей биологической активности [7]. Так, наночастицы серебра обладают высокой бактерицидной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [4, 8], включая мультирезистентные штаммы. Кроме того, не было доказано приобретения какой-либо бактериальной устойчивости к наночастицам металлов, что представляет собой довольно важную проблему в случае традиционной антибиотикотерапии. Такие свойства дают возможность рассматривать и применять их в качестве потенциальных дезинфицирующих агентов в медицинской и ветеринарной практике в низких концентрациях, которые не являются токсичными в отношении высших организмов [2].

По причине вышесказанного с начала нового века препараты на основе наносеребра широко используются в качестве антибактериальных агентов во многих сферах деятельности человека, не ограничиваясь только медицинским и ветеринарным приложением. Например, в состав некоторых текстильных покрытий или различных косметических и дезинфицирующих средств включают наночастицы серебра для достижения их бактериостатичности. Однако их токсичность в отношении живых организмов и окружающей среды все еще остается нерешенным вопросом.

Как правило, безопасность материалов для живых организмов зависит от размера частиц. Так, вещества, которые безопасны в макроскопических количествах, могут стать опасными при уменьшении до микроскопических частиц. Поскольку поведение наночастиц в окружающей среде и в клетках недостаточно изучено, важно правильно выбрать экспериментальную модель, в которой можно оценить влияние наночастиц на окружающую среду и живые организмы. Возможные токсикологические риски использования этих материалов нашли отражение в создании новой научной области, называемой нанотоксикологией. Как известно, в любом опыте воссоздается система, в которой моделируется воздействие изучаемого ксенобиотика на живые объекты, однако в большинстве случаев экспериментатор должен стремиться к получению достоверных результатов, которые можно экстраполировать если не на всю биосферу, то хотя бы на ее определенную часть.

В наших предыдущих опытах [3] мы показали возможность использования удобной модели изучения токсического воздействия наночастиц на основе использования инфузории-туфельки *Paramecium caudatum*. Парамеций, реснитчатый эукариотический одноклеточный организм, является обитателем пресноводных водоемов, обладает рядом особенностей, которые делают его потенциально ценной моделью для анализа цитотоксичности различных агентов. Так, этот протист способен поглощать как растворимые молекулы, так и различные объемные разновидности частиц, включая частицы полиэтилена, железных опилок и песка путем фагоцитоза. Этот организм показывает очень стабильные клеточные функции, такие как фагоцитоз, деление и поведение при плавании.

Ранее мы установили высокую антагонистическую активность наночастиц серебра против различных типов бактерий [1], однако их токсичность в отношении простых или более сложных эукариотических организмов не изучена, без чего невозможно предсказывать сохранение баланса в окружающей среде в случае активного применения наноматериалов человеком.

В настоящем исследовании мы изучили использование организмов рода *Paramecium* в качестве биоанализа для оценки цитотоксичности наночастиц, а также разработали стандартный экспериментальный метод, который позволяет проводить анализы размером с микролитр. Этот одноклеточный эукариотический организм представляет собой один из значимых показателей загрязнения воды тяжелыми металлами [5].

**Материалы и методы исследований.** В опытах по определению токсичности использовали водные дисперсии (коллоидные растворы) наночастиц серебра и ионного серебра в различных концентрациях (от 3 до 200 мкг мл<sup>-1</sup>). Все исследуемые концентрации раствора серебра в ионной и наноразмерной формах были протестированы на одноклеточном эукариотическом организме *P. caudatum*. Токсичность веществ определяли по определению концентрации растворов серебра в ионной и наноразмерной формах, которые вызывали гибель 50 % парамеций (LC<sub>50</sub>), а также как время гибели 50 % парамеций (LT<sub>50</sub>). Значение LT<sub>50</sub> измеряли с момента добавления каждого разведения раствора наночастиц и ионов серебра в культуру *P. caudatum* до момента гибели 50 % организмов с помощью таймера.

В наших исследованиях определения токсичности предварительно в отдельную пробирку вносили по 1 мл культуры *P. caudatum* с концентрацией 200–300 организмов/мл (подсчитывали в камере Фукса-Розенталя после окрашивания 5 %-ным спиртовым раствором йода). После этого добавляли 1 мл раствора серебра в различных концентрациях и пробирку энергично встряхивали вручную. Такая смесь в объеме 0,2 мл немедленно переносилась на предметное стекло для микроскопирования. Популяцию из примерно 50 парамеций контролировали на площади 1×1 см предметного стекла с использованием оптического микроскопа при низком увеличении (40×) в течение одного часа (3600 секунд).

Для получения более точных результатов все эксперименты по оценке токсичности наночастиц серебра были повторены три раза, а результаты выражены в виде среднего значения трех наблюдений. Во всех случаях стандартное отклонение полученного значения  $LT_{50}$  не превышало 5 %. Токсичность водных дисперсий наночастиц серебра оценивали как по времени, так и концентрации, приводящей к 50 % гибели тестируемых организмов, причем окончательное значение  $LC_{50}$  оценивали по результату полной экспозиции (контакта) с дисперсией наночастиц серебра (1 ч). В ходе всего проведенного опыта была получена зависимость показателя  $LT_{50}$  от концентрации серебра (в форме наночастиц) в дисперсии.

В качестве сравнения с коллоидной формой серебра использовали ионный раствор  $AgNO_3$  (водорастворимая соль нитрат серебра) в различных концентрациях, для которого математически рассчитывали концентрацию ионов серебра.

**Результаты исследований.** В настоящее время фактически отсутствует единая методика оценки токсичности наночастиц металлов на одноклеточные эукариотические модели. В большинстве случаев прибегают к определению в статических тестах острой токсичности (по ее определению дважды во временном интервале в 10 минут и 2 часа) и хронической токсичности (в течение различного временного срока, составляющего более 24 часов экспозиции) токсиканта на протистный тест-объект.

В качестве экспериментальной модели мы выбрали определение значения  $LC_{50}$  за один час, так как во многих токсикологических исследованиях показатель  $LC_{50}$  за 24 часа на парамециях очень сильно подвержен сильным колебаниям вследствие резкого изменения устойчивости тестируемого одноклеточного организма к наночастицам, когда их концентрация падает до предела токсичности. По этой причине мы использовали данный временной параметр в оценке значения  $LC_{50(1 \text{ час})}$  для более точной количественной оценки токсического эффекта наночастиц серебра в отношении *P. caudatum*. Общий анализ токсического воздействия оценивался нами по определению зависимости значения  $LT_{50}$  от концентрации серебра в двух формах (ионной и наноразмерной).

Полученные нами результаты показали постепенное снижение токсичности в отношении испытуемых организмов (парамеций) при концентрациях наночастиц серебра ниже 200  $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$  (таблица 1), что отражалось в увеличении значения  $LT_{50}$  (таблица 2).

**Таблица 1 - Биоцидное действие растворов наноразмерного и ионного серебра на парамеции**

Время экспозиции, секунд	Концентрация, $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$															
	наночастицы								ионное серебро							
	3	10	20	30	40	50	100	200	3	10	20	30	40	50	100	200
60	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
120	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
180	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
300	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
600	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1000	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2000	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3000	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3600	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4000	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

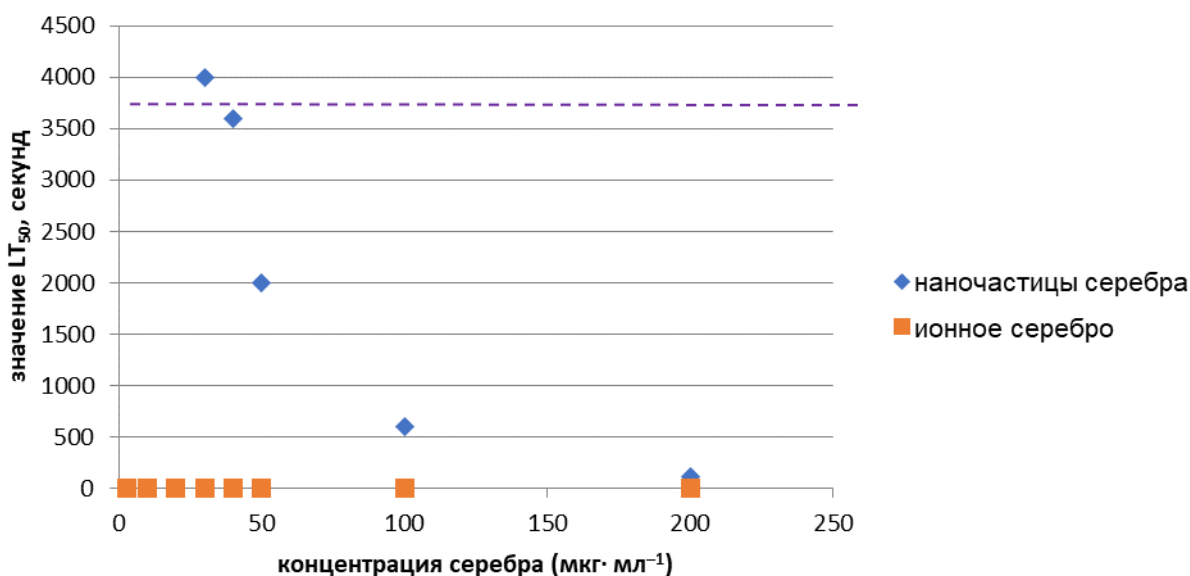
Примечания: «-» — отсутствие биоцидного действия; «+» — биоцидное действие (гибель парамеций).

**Таблица 2 - Зависимость показателя  $LT_{50}$  от времени экспозиции**

Показатель $LC_{50}$ , $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$	Время гибели парамеций, секунд	
	наночастицы	ионное серебро
3	>4000	<60
10	>4000	<60
20	>4000	<60
30	4000	<60
40	3600	<60
50	2000	<60
100	600	<60
200	120	<60

В концентрации более 20  $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$  парамеции выживали более 1 часа, следовательно, это значение нами принято в качестве нижней границы токсического действия наночастиц серебра на исследуемый организм. Также было установлено, что при временной экспозиции в 1 ч показатель концентрации  $LC_{50}$ , представляющий ключевой параметр для количественного определения токсичности наночастиц для окружающей среды, составляет 40  $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . На рисунке 1 показан график

распределения значений  $LT_{50}$  при разных экспозициях в зависимости от концентрации ионов и наночастиц серебра. На графике горизонтальная пунктирная линия указывает на временной порог в 1 час, соответствующий порогу минимального значения  $LC_{50}$  при экспозиции в 3600 секунд.



**Рисунок 1 - График распределения значений  $LT_{50}$  при разных экспозициях в зависимости от концентрации ионов и наночастиц серебра**

Сравнение значений  $LT_{50}$  растворов коллоидного и ионного серебра указывает на более высокую токсичность ионного раствора по сравнению с коллоидным. Так, раствор ионов серебра в концентрации более  $3 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$  демонстрировал практически мгновенную токсичность (<60 секунд).

Высокая биоцидная активность ионов серебра в растворе нитрата серебра не удивительна, так как он представляет собой наиболее токсичную форму этого металла. В наших опытах концентрация ионного серебра в значении всего лишь  $3 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$  привела к быстрой гибели организма *P. caudatum* (таблица 1). В дополнительном опыте нами установлено, что только при снижении концентрации ионов серебра ниже  $1 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$  наблюдается потеря биоцидных свойств в отношении парамеций. Таким образом, разница между токсической концентрацией ионов по сравнению с наночастицами серебра в отношении тестируемого одноклеточного эукариотического организма превышает более чем в 50 раз ( $<1 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$  и  $40 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , соответственно).

Полученные результаты токсической оценки наночастиц и ионного серебра также позволили нам сопоставить показатели токсичности в отношении одноклеточных эукариот (парамеций) со значениями минимальных ингибирующих концентраций наночастиц серебра в отношении микроорганизмов (бактерий). Так, в серии наших ранних опытов мы установили, что минимальная ингибирующая концентрация наночастиц серебра для таких микроорганизмов, как *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumonia* составляет значения от  $7,1 \text{ мкг}/\text{мл}$  до  $14,2 \text{ мкг}/\text{мл}$  [2]. Ингибирующая концентрация раствора ионов серебра в отношении указанных микроорганизмов составляет значение  $2\text{--}4 \text{ мкг}/\text{мл}$ . Таким образом, разница значений антибактериальных концентраций коллоидного и ионного растворов серебра не превышает более чем в 5 раз по сравнению с более чем 50-кратным превышением токсической концентрации ионной формы серебра по сравнению с коллоидной. На этом основании становится очевидным избирательное действие наночастиц при сравнении критериев антибактериальной и протистной цитотоксической активностей.

Показатели антибактериальной активности и антипротистной токсичности (экоотоксичности) обеих форм серебра (ионов и наночастиц) дают возможность провести промежуточное сравнение концентраций серебра, приводящих к ингибированию роста прокариотических микроорганизмов, с концентрациями, вызывающими токсическое действие на одноклеточных эукариот. Благодаря этому сопоставлению становится возможным заключить, какая из обеих форм серебра является более эффективной для практического применения в качестве антибактериального средства, принимая во внимание важность значений цитотоксичности и экоотоксичности.

Новое представление о селективном действии наночастиц серебра по сравнению с его ионной формой является одним из ключевых моментов при последующем выборе субстанции для будущего применения антибактериальных препаратов.

**Заключение.** Проведенные нами исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Токсичность наночастиц серебра выше в отношении прокариотических микроорганизмов (бактерий), чем в отношении тестируемого одноклеточного свободноживущего эукариотического организма (парамеции).
2. Селективный токсический эффект различных форм серебра (наноразмерной и ионной) наблюдается в гораздо большей степени в отношении одноклеточных эукариот (парамеции) по сравнению с антибактериальной активностью.
3. Наночастицы серебра представляют собой более важный антимикробный агент, чем серебро в его ионной форме, потому что они подавляют рост микроорганизмов при более низких концентрациях, которые не являются токсичными для клеток более сложных организмов, представляя таким образом меньший риск для окружающей среды.
4. Наночастицы серебра являются более экоинертным веществом по сравнению с его ионной формой с порогом ксенобиотического эффекта ниже более чем в 50 раз.

**Литература.** 1. Изучение антибактериальных свойств коллоидных растворов наночастиц серебра и меди / П. А. Красочко, Р. Б. Корочкин, А. В. Притыченко, М. А. Понаськов // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2019. – № 1. – С. 41–44. 2. Красочко, П. А. Определение минимальной ингибирующей и бактерицидной концентрации нано- и коллоидных частиц серебра / П. А. Красочко, Р. Б. Корочкин, М. А. Понаськов // Ветеринарный журнал Беларуси. – Витебск, 2019. – № 2 (11). – С. 46–50. 3. Красочко, П. А. Оценка биоцидного действия наночастиц металлов и биоэлементов в одноклеточной эукариотической тест-системе / П. А. Красочко, Р. Б. Корочкин, М. А. Понаськов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2022. – Т. 52, № 1. – С. 106–113. 4. Оценка бактериоингибирующего действия нано- и коллоидных частиц серебра и кремния диффузионным методом / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2019. – № 4. – С. 15–17. 5. Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Against *Candida* Spp. / A. Panáček [et al.] // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30, Issue 31. – P. 6333-6340. 6. Comparison of Different Biological Methods for the Assessment of Ecotoxicological Risks / C. Fenske [et al.] // International Journal of Hygiene and Environmental Health. – 2006. – Vol. 209, Issue 3. – P. 275-284. 7. Rai, M. Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials / M. Rai, A. Yadav, A. Gade // Biotechnology advances. – 2008. – Vol. 27, Issue 1. – P. 76–83. 8. The Effect of Silver and Zinc Nanoparticles on The Structural Characteristics of Bacterial Cells / P. A. Krasochko [et al.] // International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering. – 2019. – Vol. 9, Issue 1. – P. 3783–3789.

Поступила в редакцию 09.10.2024.

УДК 616.36-004:577.21

#### ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ КЛЮЧЕВЫМИ КЛЕТКАМИ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ФИБРОЗА И ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

\*Лебедева Е.И., \*\*Бабенко А.С., \*Грушин В.Н., \*\*\*Красочко П.А., \*Щастный А.Т.

\*УО «Витебский ордена Дружбы народов государственный медицинский университет»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

\*\*ГУ «Республиканский научно-практический центр «Кардиология», г. Минск, Республика Беларусь

\*\*\*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

Наиболее важные статистически значимые взаимосвязи между исследуемыми клетками, экспрессирующими маркеры FAP,  $\alpha$ -SMA, CD68, CD206, CX3CR1, CD45, CK19, CD31, CD34, Fn14, выявлены на стадии портального фиброза, начала узловой перестройки паренхимы и стадии полного цирроза. Показано, что в зависимости от стадии фиброза и цирроза печени популяции клеток формировали группы факторов в различном сочетании, что указывает на смену фенотипа клеток, вовлекаемых в данные патологические процессы. **Ключевые слова:** эксперимент, фиброз и цирроз печени, иммуногистохимия, факторный анализ.

#### FEATURES OF THE RELATIONSHIPS BETWEEN KEY CELLS AT DIFFERENT STAGES OF TOXIC FIBROSIS AND LIVER CIRRHOSIS

\*Lebedeva E.I., \*\*Babenka A.S., Grushin V.N., \*\*\*Krasochko P.A., \*Shchastnyy A.T.

\*Vitebsk Order of Friendship of Peoples State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

\*\*Republican Scientific and Practical Center "Cardiology", Minsk, Republic of Belarus

\*\*\*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

As a result of the study, the most significant relationships between the studied cells expressing markers FAP,  $\alpha$ -SMA, CD68, CD206, CX3CR1, CD45, CK19, CD31, CD34, Fn14 were revealed at the stage of portal fibrosis, the beginning of nodular reorganization of the parenchyma and the stage of complete cirrhosis. It was shown that depending on the stage of fibrosis and cirrhosis of the liver, cell populations formed groups of factors in various combinations, which indicates a change in the phenotype of cells involved in these pathological processes. **Keywords:** experiment, liver fibrosis and cirrhosis, immunohistochemistry, factor analysis.