

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК MDBK ПОД ДЕЙСТВИЕМ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА

*П.А. КРАСОЧКО**, *С.А. ЧИЖИК***, *Д.С. БОРИСОВЕЦ**, *М.С. СТРУК**,
*В.Л. РАДЬКО****

* РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь;
ГНУ «Институт тепло- и массообмена НАН Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь

** УО «Международный государственный экологический университет
имени А.Д. Сахарова», г. Минск, Республика Беларусь.

Summary. The influence of zinc oxide nanoparticles at MDBK cell line morphology was studied. The cytotoxic effect of zinc oxide nanoparticles at dilutions of 1:160 and 1:320, which manifested itself in the rounding of cells, expanding cell-cell contacts and origin of cell monolayer lesions was established. Analysis of the three-dimensional image of MDBK cells showed that nanoparticles affect the morphology of cell membrane surface, which becomes more pronounced with embossed ridges rounded.

Key words: cytotoxicity, cell morphology, MDBK cell culture, zinc oxide nanoparticles.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы происходит бурное развитие нанотехнологий, которое сопровождается широким внедрением полученных результатов в различные области деятельности человека. В настоящее время в медицине и ветеринарии все большее значение приобретают наночастицы благородных металлов, обладающие выраженными антисептическими, бактерицидными и противовирусными свойствами.

Однако новые научные достижения не только способствуют развитию экономики и повышению качества жизни человека, но ставят ряд задач, которые относятся прежде всего к проблеме воздействия наночастиц на животный и растительный мир, на качество сельскохозяйственной продукции и здоровье человека. Это связано с особенностью наночастиц и наноматериалов, которые при попадании в организм могут быть непредсказуемыми и опасными [1, 3]. Безопасность наноматериалов и нанотехнологий является важнейшим фактором, регламентирующим промышленное производство и внедрение в здравоохранение нанопродуктов. Для абсолютного большинства наноматериалов не известны механизмы поступления в организм, биосовместимости, биотрансформации, транслокации в органах и тканях, элиминации и, что особенно важно, их токсичности. В России, США, странах Евросоюза, Канаде, Японии, Китае и других странах ведутся обширные исследования по оценке безопасности и потенциальных рисков, связанных с производимыми наноматериалами [2, 4].

Для расширения нашего понимания влияния наночастиц на здоровье и окружающую среду, возникает необходимость проведения научных исследований по токсикологической оценке наночастиц оксида цинка на живых организмах, особенно на уровне клеточных систем.

Цель работы: оценить влияние препарата на основе наночастиц оксида цинка на морфологические характеристики перевиваемой линии клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ

В работе использован препарат на основе наночастиц оксида цинка «Иммунонаноцинк», произведенный в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Для изучения цитоморфологии клеточной линии MDBK на фоне влияния наночастиц оксида цинка, клетки выращивали на 24-луночных полистироловых планшетах на покровных стеклах в течение 48 часов. На сформировавшийся монослой клеток вносили препарат в трех последовательных разведениях от 1:160 до 1:640. Экспозиция клеток с препаратом составляла 24 часа, после чего покровные стекла извлекали из лунок при помощи пинцета и окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятым методам.

Световую микроскопию окрашенных препаратов проводили при помощи инвертированного светового микроскопа OLYMPUS OM-4 при увеличении объективов 10, 20, 40. Определяли следующие морфологические изменения культуры клеток под влиянием наночастиц: общий вид культуры, форму клеток и ядер, структуру цитоплазмы, наличие многоядерных клеток и др.

Для исследования морфологии клеток методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) культуру клеток MDBK инкубировали с раствором наночастиц оксида цинка при комнатной температуре 22°C в течение 15 минут. Затем клетки фиксировали 1,5% глутаровым альдегидом в течение 30 минут, после чего двукратно отмывали раствором фосфатного буфера (PBS), а затем дважды – дистиллированной водой и наносили на предметные стекла.

АСМ исследования проводились на микроскопе НТ-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) в контактном режиме сканирования с использованием зонда CSC38 («MicroMash»), радиусом закругления 41 нм и жесткостью консоли 0,03 Н/м.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение окрашенных цитологических препаратов показало, что в норме культура MDBK образует сплошной клеточный монослой с равномерным распределением клеток по поверхности стекла. Границы клеток четко различимы. Клетки плотно прилегают друг другу. Морфологически, клетки эпителиоподобного типа полигональной формы. Ядра крупные, овальной или округлой формы, расположены в центральной части цитоплазмы. Цитоплазма неоднородна, имеет рыхлый матрикс (рисунок 1).

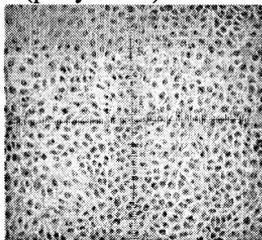


Рис. 1. Культура клеток MDBK (контроль) (x 20)

Препарат наночастиц оксида цинка в разведении 1:160 вызывал задержку развития клеточного монослоя, нарушал целостность сформировавшихся участков клеточного пласта вследствие возникновения очагов дегенерации различной интенсивности. Отмечалось расширение межклеточных контактов, в монослое образовались «окна» и разрывы значительных размеров. Клетки имели нехарактерную округлую форму. Наблюдались множественные случаи многоядерности. По частоте встречаемости двуядерных клеток при длительном культивировании данные по препарату превосходили контрольный показатель более чем в 2 раза (рисунок 2).

Препарат наночастиц оксида цинка в разведении 1:320 вызывал такие же цитоморфологические изменения, как в предыдущем разведении - 1:160, но в меньшей степени. Под воздействием наночастиц оксида цинка наблюдалось расширение межклеточных контактов, но при этом не отмечалось образование «окон» и разрывов.

В разведении 1:640 препарат наночастиц оксида цинка не влиял на морфологию клеток, внешний вид культуры соответствовал норме. Границы клеток четкоразличимы. Клетки плотно прилегают друг другу. Морфологически, клетки эпителиоподобного типа полигональной формы. Ядра крупные, овальной или округлой формы, расположены в центральной части цитоплазмы.

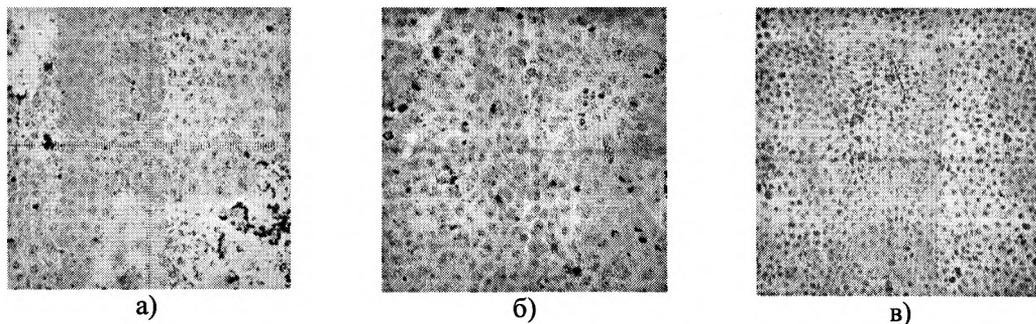


Рис. 2. Культура MDBK при экспозиции с препаратом на основе наночастиц оксида цинка в разведениях: а – 1:160 (x 20); б - 1:320 (x 20); в – 1:640 (x 10)

Таким образом, цитоморфологические исследования изменений в культуре клеток MDBK свидетельствуют о наличии цитотоксического эффекта препарата наночастиц оксида цинка при концентрациях 1:160 и 1:320. На рисунке 3 представлены изображения отдельной клетки MDBK и участка поверхности мембраны в режиме латеральных сил. Проведено исследование топографии поверхности клеток MDBK методом атомно-силовой микроскопии.

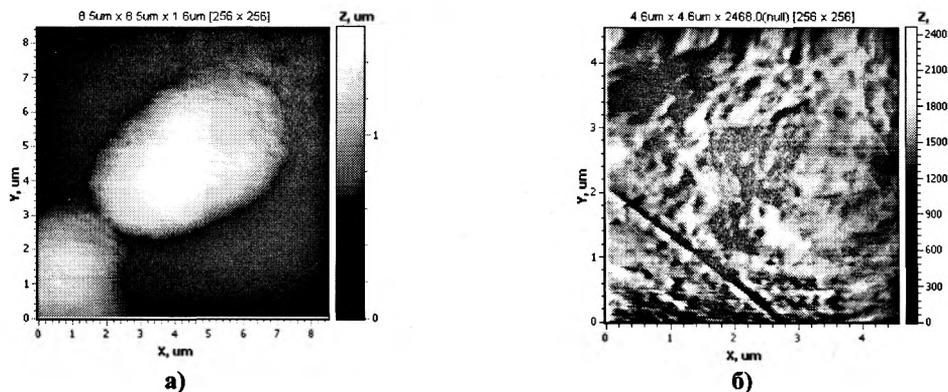


Рис. 3. АСМ-изображения поверхности клеток MDBK: а – топография поверхности, область сканирования 8,5x8,5 мкм²; б – изображение в режиме латеральных сил, область сканирования 4,6x4,6 мкм²

На рисунке 4 представлено 3-хмерное изображение и топография поверхности клетки линии MDBK, полученные с помощью атомно-силового микроскопа.

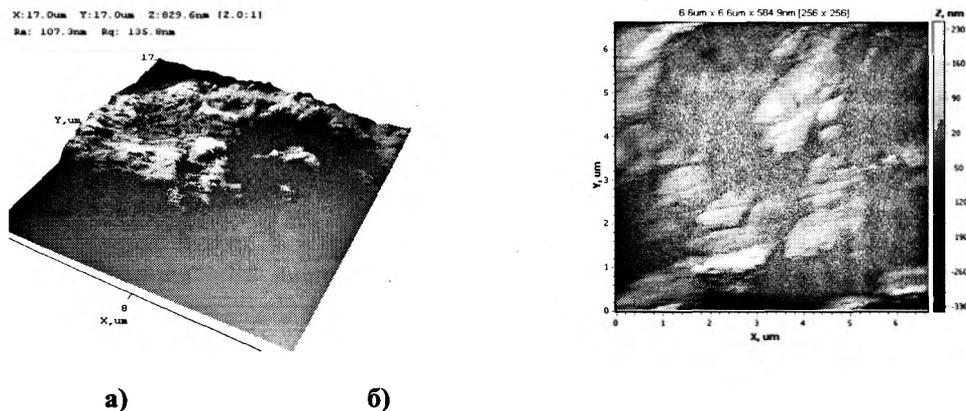


Рис. 4. АСМ изображение клеток линии MDBK (контрольные образцы): а - трехмерное АСМ изображение, размер поля сканирования 17x17 мкм; б - топография поверхности мембраны клетки, размер поля сканирования 7x7 мкм.

Исследование топографии показало, что поверхность клеток MDBK гладкая и ровная, без явно выраженных структурных элементов.

Результаты исследования топографии поверхности после инкубации с раствором наночастиц ZnO при температуре 37°C представлены на рисунке 5.

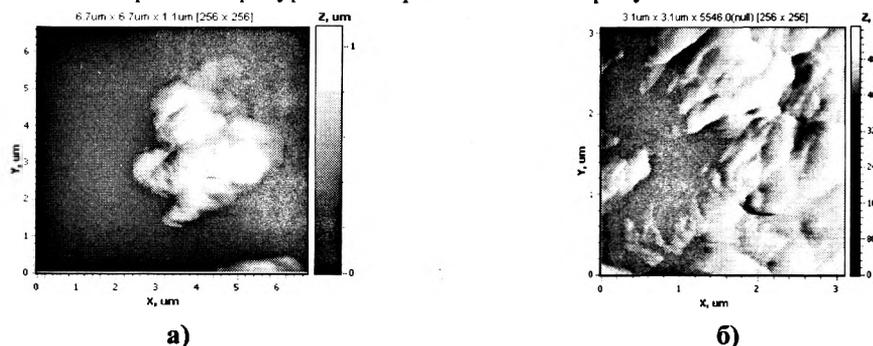


Рис. 5. АСМ-изображения поверхности клеток MDBK после их инкубации с наночастицами ZnO при температуре 37°C; а – топография поверхности, область сканирования 6,7х6,7 мкм²; б – изображение в режиме латеральных сил, область сканирования 3,1х3,1 мкм²

В результате взаимодействия клеток MDBK с наночастицами установлено, что форма клеток после инкубации с наночастицами ZnO сильно изменилась по сравнению с формой клеток контрольного образца. Наблюдается неоднородная поверхность клеток, с ярко выраженными структурными образованиями. Можно предположить, что в результате воздействия наночастиц ZnO происходит повреждение внутренней структуры клеток.

На рисунке 6 представлено 3-хмерное изображение клеток, инкубированных с наночастицами оксида цинка, полученные с помощью атомно-силового микроскопа.

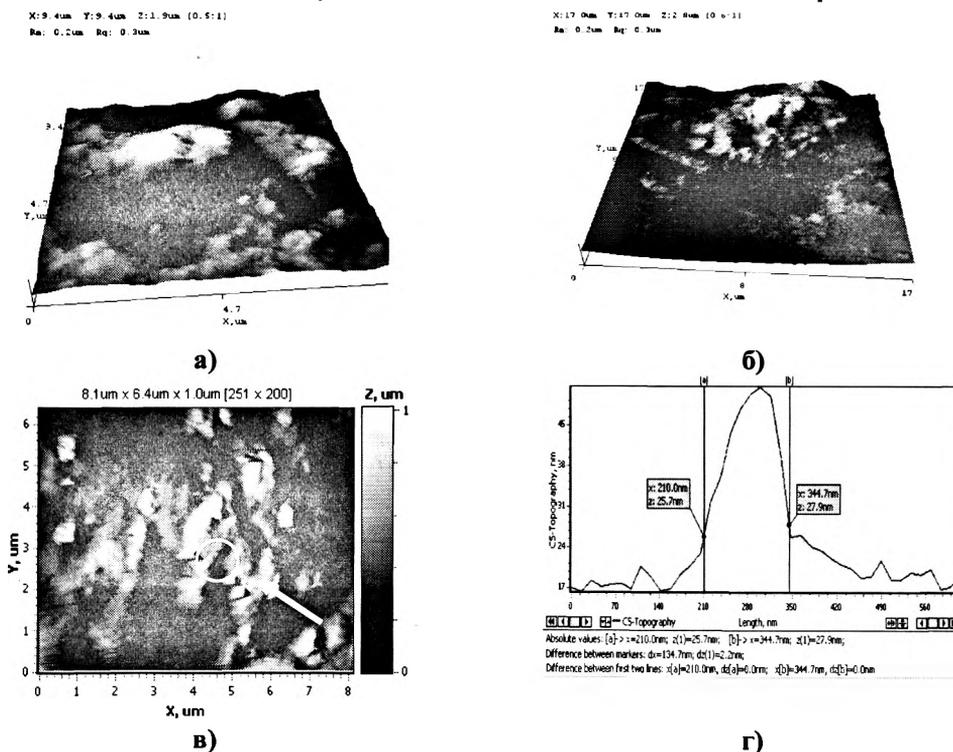


Рис. 6. АСМ изображения клеток инкубированных с наночастицами (ZnO):

а, б – трехмерное изображение клеток, в - топография поверхности мембраны клетки с наночастицами на поверхности, область сканирования 8,1х6,4 мкм; г – профиль сечения наночастицы

Размеры частиц оксида цинка определяли по профилю сечения поверхности изображения подложки с наночастицами, который проводится в обрабатывающей программе после сканирования исследуемого образца. На профилях маркерами отмечают края каждой частицы. Оценка размера частиц методом АСМ показала, что средний размер частиц на поверхности клеток составляет в среднем 200-230 нм.

ВЫВОДЫ

1. Использование специфических методов окраски позволило установить, что препарат на основе наночастиц оксида цинка оказывает цитотоксическое действие в разведениях 1:160 и 1:320, которое проявляется в округлении клеток, расширении и нарушении межклеточных контактов, нарушении развития клеточного монослоя и т.д.

2. При анализе трехмерных изображений клеток MDBK после 20 мин инкубации их с препаратом установлено, что наночастицы затрагивают морфологию поверхности мембраны клеток, которая становится более рельефной с ярко выраженными выступами округлой формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богословская, О.А. и др. Изучение безопасности введения наночастиц меди с различными физико-химическими характеристиками в организм животных. В: Вестник Оренбургского государственного ун-та. 2009, № 2, с. 124-127.
2. КАРКИЩЕНКО, Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов. В: Биомедицина. 2009, т. 1, № 1, с. 5-27.
3. WANG, B., FENG, W., WANG, M., WANG, T., GU, Y. et al. 2008. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. In: Journal Nanopart Research, nr. 10, pp. 263-276.
4. JUNG, W. C., KIM, S. and LEE, H. J. 2010. Acute Toxicity of Nano-Scale Zinc Oxide Powder in ICR Mice. In: Journal of Biomedical Research, nr. 11(4), pp. 219-224.

CZU 636.2(478)

SITUAȚIA ACTUALĂ ÎN RAMURA CREȘTERII BOVINELOR

V. FOCȘA, Alexandra CONSTANDOGLO, V. CURULIUC

Institutul Științifico-Practic Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară

Summary. In article are given results of the analysis of the current state of branch of lactic cattle breeding in the Republic of Moldova. Crisis of national economy in the republic, the high share of import of the foodstuffs and raw materials, difficulties with production sale and violation of many economic communications negatively affected development of lactic cattle breeding. From 1992 to 2001 milk production from one cow in the country decreased on the average by 29,3 - 48,8%. Since 2004 is observed the gradual increase in lactic production. In 2011 lactic production from each cow has constituted 3224 kg of milk that is 19,7% less, than in 1989. Production of milk was reduced 2,7 times and production of milk per capita - 2,3 times, with medical norm of 360 kg. Now the breeding base of lactic cattle breeding of the Republic of Moldova is presented by 8 farms.

Key words: cows, lactic cattle breeding, milk production, selection.

INTRODUCERE

În țările cu sectorul zootehnic bine dezvoltat producerea produselor animaliere depinde de doi factori principali: piața de desfacere (internă și export) și nivelul profitului obținut de la comercializarea materialului genetic și a producției marfă.