

**Красочко П. А.**, доктор ветеринарных и биологических наук, профессор  
**Борисовец Д. С.**, кандидат ветеринарных наук  
**Станкуть А. Э.**, аспирант  
**Радько В. Л.**, биолог\*

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского»  
г. Минск,*

*\*УО «Международный государственный экологический университет имени  
А.Д. Сахарова» г. Минск*

## **ВЛИЯНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК MDBK**

### **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время в медицине и ветеринарии все большее значение приобретают наночастицы благородных металлов, которые могут быть использованы для конструирования на их основе высокоэффективных препаратов, обладающих комплексным антибактериальным, противовирусным и иммуностимулирующим действием.

Наноматериалы и наночастицы, являющиеся продуктом современных нанотехнологий, обладают комплексом уникальных свойств, которые открывают широкие перспективы их промышленного применения. Тем не менее, многие наночастицы токсичны и представляют потенциальную опасность для организма. В связи с этим подчеркивается важность исследования механизмов биологического действия наночастиц и определения условий их безопасного применения [1, 2].

Данные, полученные в различных исследованиях о влиянии наночастиц на организмы достаточно противоречивы, поэтому забывать об актуальности данной проблемы не стоит. Во всем мире нет однозначного ответа по поводу опасности наночастиц, поскольку нет полного понимания их физико-химических свойств, воздействия на организм и отдаленных последствий такого воздействия [3, 4].

Для того, чтобы подтвердить научные исследования и расширить наше понимание влияния наночастиц на здоровье и окружающую среду, возникает необходимость изучения токсикологического воздействия наносеребра на живые организмы, особенно на уровне клеточных систем.

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

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Для изучения цитоморфологии клеточной линии MDBK на фоне влияния наночастиц серебра клетки выращивали на 24-луночных полистироловых планшетах на покровных стеклах в течение 48 часов. На сформировавшийся монослой клеток наносили препарат в трех последовательных разведениях от 1:10 до 1:40. 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 серебра 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 NT-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 ИССЛЕДОВАНИЙ

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 (рисунк 1).

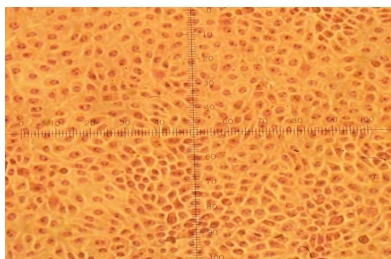
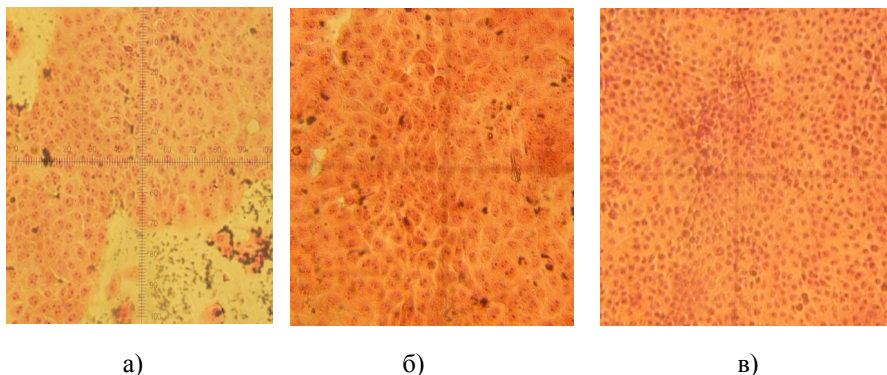


Рисунок 1 – Культура клеток MDBK (контроль) (x 20)

Препарат наночастиц серебра в разведении 1:10 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)



**Рисунок 2 – Культура MDBK при экспозиции с препаратом на основе наночастиц серебра в разведениях:  
а – 1:10 (x 20); б - 1:20 (x 20); в – 1:40 (x 10).**

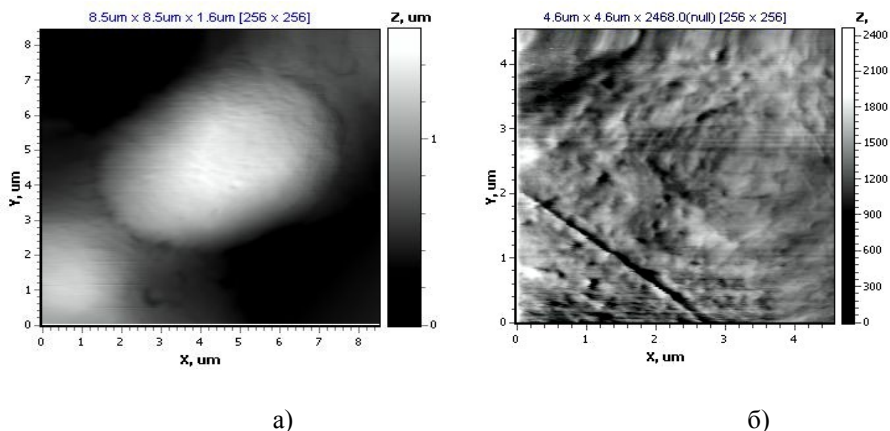
Препарат наночастиц серебра в разведении 1:20 вызывал такие же цитоморфологические изменения, как в предыдущем разведении – 1:10, но в меньшей степени. Под воздействием наночастиц серебра наблюдалось расширение межклеточных контактов, но при этом не отмечалось образование «окон» и разрывов.

В разведении 1:40 препарат наночастиц серебра 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.

Таким образом, цитоморфологические исследования изменений в культуре клеток MDBK свидетельствуют о наличии цитотоксического эффекта препарата наночастиц серебра при концентрациях 1:10 и 1:20.

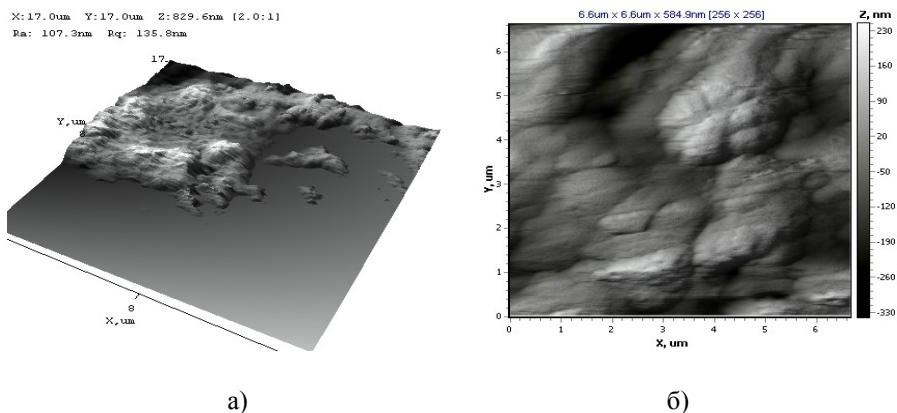
На рисунке 3 представлены изображения отдельной клетки MDBK и участка поверхности мембраны в режиме латеральных сил. Проведено

исследование топографии поверхности клеток MDBK методом.



**Рисунок 3 – АСМ-изображения поверхности клеток MDBK: а – топография поверхности, область сканирования 8,5x8,5 мкм<sup>2</sup>; б – изображение в режиме латеральных сил, область сканирования 4,6x4,6 мкм<sup>2</sup>**

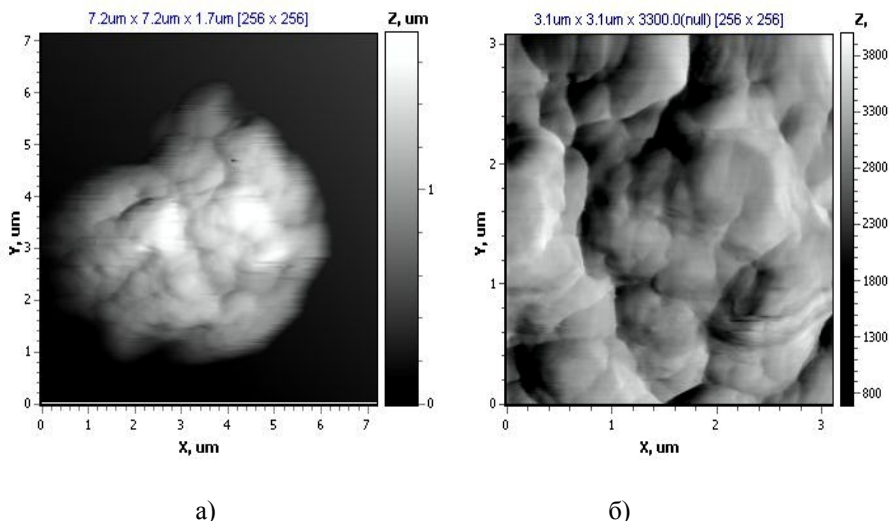
На рисунке 4 представлено 3-хмерное изображение и топография поверхности клетки линии MDBK, полученные с помощью атомно-силового микроскопа.



**Рисунок 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 Ag при температуре 37°C представлены на рисунке 5.



**Рисунок 5 – АСМ-изображения поверхности клеток MDBK после их инкубации с Ag; а – топография поверхности, область сканирования 7,2x7,2 мкм<sup>2</sup>; б – изображение в режиме латеральных сил, область сканирования 3,1x3,1 мкм<sup>2</sup>**

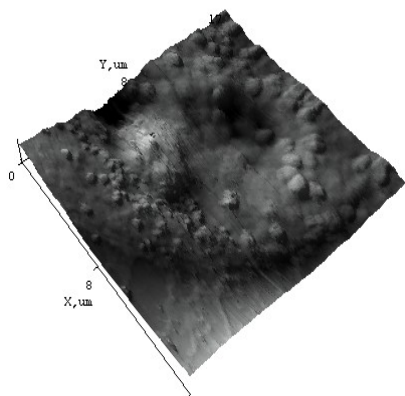
После взаимодействия клеток линии MDBK с наночастицами Ag наблюдались изменения формы поверхности клеток по сравнению с контрольным образцом. Поверхность клеток стала более рельефной с ярко выраженными выступами округлой формы.

На рисунке 6 представлено 3-хмерное изображение клеток, инкубированных с наночастицами серебра, получено с помощью атомно-силового микроскопа.

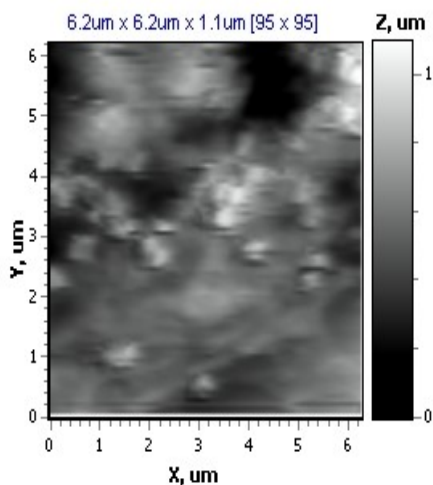
Размеры частиц серебра определяли по профилю сечения поверхности изображения подложки с наночастицами, который проводится в обрабатывающей программе после сканирования исследуемого образца. На профилях маркерами отмечают края каждой частицы.

Оценка размера частиц методом АСМ показала, что средний размер частиц на поверхности клеток составляет в среднем 220–250 нм.

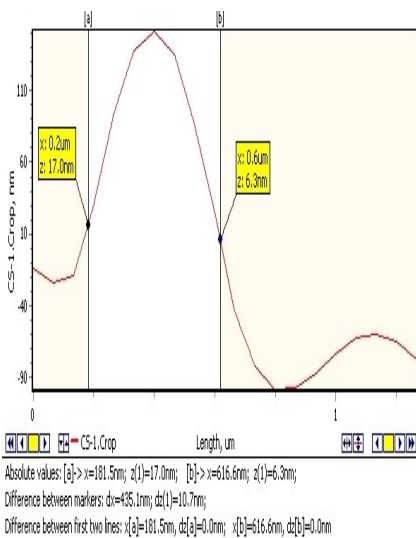
X: 17.0um Y: 17.0um Z: 2.6um [0.7:1]  
 Ra: 0.3um Rq: 0.3um



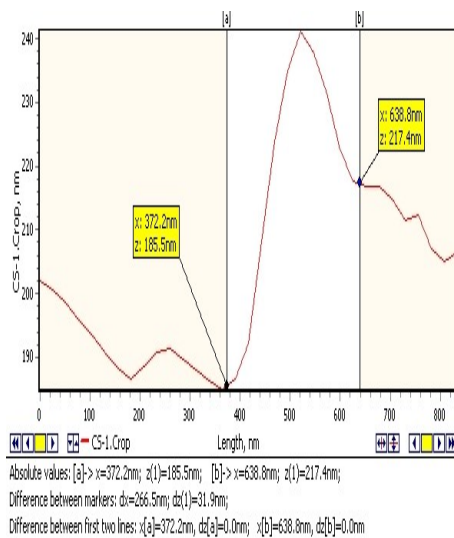
а)



б)



в)



г)

**Рисунок 6 – АСМ 3-мерное изображения клеток инкубированных с наночастицами (Ag): а – трехмерное изображение клетки, б - топография поверхности мембраны клетки с наночастицами на поверхности, область сканирования 6,2х6,2 мкм; в, г – профили сечения наночастиц**

## **ВЫВОДЫ**

1 Использование специфических методов окраски позволило установить, что препарат на основе наночастиц серебра оказывает цитотоксическое действие в разведениях 1:10 и 1:20, 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 Трифонова, Т. А. Экологическая безопасность наночастиц, наноматериалов и нанотехнологий : учеб. пособие / Т. А. Трифонова, Л. А. Ширкин; Владим. гос. ун-т. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2009. – 64 с.

2 Сергеев, Г. Б. Нанохимия: учеб. пособие / Г. Б. Сергеев. – М. : КДУ, 2006. – 336 с.

3 Lansdown, A.B. (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Current Problems in Dermatology*, 33, 17–34.

4 Gopinath, P.; Gogoi, S.K.; Chattopadhyay, A. & Gosh, S.S. (2008). Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 075104.