

4. Zhua, S., Oberdörster, E., Haascha, M.L. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, Daphnia and fathead minnow // Marine Environmental Research. – 2006. – Vol. 62. – PP. 5-9.
5. Adili, A., Crowe S., Gustin K.E. Differential cytotoxicity exhibited by silica nanowires and nanoparticles // *Nanotoxicology*. – 2008. – Vol. 2, Iss. 1 – PP. 1-8.
6. Chang, J.Sh., Hwang, D.-F., Kong, Z.-L. In Vitro Cytotoxicity of Silica Nanoparticles at High Concentrations Strongly Depends on the Metabolic Activity Type of the Cell Line // Environmental Science of Technologies. – 2007. – Vol. 41, Iss. 6. – PP. 2064–2068.
7. Geys, J., Nemmar, A., Verbeke, E. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge // Environmental Health Perspectives – 2008. –Vol. 116, No. 12. – PP. 1607-1613.

УДК 619:615.9:615.28

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЦИНКА И СЕРЕБРА В СИСТЕМЕ IN VITRO

**П.А. Красочко¹, Д.С. Борисовец¹, А.Э. Станкуть¹, М.С. Струк¹,
В.Л. Радько²**

¹ – РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышеселского»,

г. Минск, Республика Беларусь

² – УО «Международный государственный экологический университет
имени А.Д. Сахарова»,

г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 28.06.2013 г.)

Аннотация. Проведено изучение цитоморфологических характеристик культуры клеток MDBK под действием наноразмерных частиц серебра и оксида цинка. Установлена более высокая цитотоксичность наночастиц цинка в сравнении с нанопрепаратом на основе серебра, который оказывает цитотоксический эффект в разведении 1:5-1:320 в сравнении с наночастицами серебра, вызывающими дегенерацию монослоя клеток в разведениях 1:5 и 1:10. Препараты на основе наночастиц серебра и цинка оказывали цитотоксическое действие, которое проявлялось в округлении клеток, расширении межклеточных контактов и нарушении развития клеточного монослоя.

Summary. The study of cytomorphological characteristics of MDBK cell culture under the influence of nano-sized particles of silver and zinc oxidize is carried out. The higher cytotoxicity of zinc nanoparticles as compared to silver nanopreparation, which has a cytotoxic effect at dilutions of 1:5-1:320 versus silver nanoparticles causing degeneration of the cell monolayer at dilutions of 1:5 and 1:10 was established. Preparations based on silver and zinc nanoparticles had the cytotoxic effect, which manifested itself in the rounding of cells, expansion of intercellular contacts and infringing of development of a cell monolayer.

Введение. Нанотехнологии на сегодняшний день являются одним из приоритетных направлений развития науки и техники. Естественные и искусственные наночастицы, чьи размеры измеряются в нанометрах, находят широкое применение в фундаментальной и прикладной науке.

В последние годы разработано большое разнообразие наночастиц, различающихся по составу и размерам, а также различного функционального назначения [1, 2].

В биологии, медицине все большее значение приобретают наночастицы благородных металлов, которые могут быть использованы в качестве зондов, для целенаправленной доставки лекарственных препаратов, покрытия инструментов, шовных материалов и в других целях.

Тем не менее многие наночастицы токсичны и представляют потенциальную опасность для организма [3, 4]. Сейчас уже выпускаемые промышленностью некоторые наночастицы содержат тяжелые металлы и ядовитые соединения. В связи с этим подчеркивается важность исследования механизмов биологического действия наночастиц и определения условий их безопасного применения. Хотя степень опасности и ядовитости некоторых определяется их концентрацией и свойством накапливаться в организме, многие уже применяются в различных технологиях, в том числе и медицинских.

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.

Так как наночастицы получают все большее распространение, при их создании и расширении возможностей применения необходимо оценивать их цитотоксичность и установить предельно допустимые концентрации для каждого из нанообъектов.

Классическими модельными тест-системами для изучения цитотоксических и цитогенетических свойств препаратов на основе наночастиц биоэлементов остаются первичные и постоянные культуры клеток и человека.

Цель работы – изучить цитоморфологические характеристики перерываемой культуры клеток почки эмбриона крупного рогатого скота (MDBK) под действием наноразмерных частиц серебра и оксида цинка.

Материалы и методика исследований. Исследовали токсические свойства препаратов на основе наночастиц серебра «Наноарго-вир» и цинка «Иммунонаноцинк», произведенные в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

В основе метода получения коллоидов металлов были положены реакции восстановления ионов серебра и цинка, входящих в различные соли и стабилизация полученных металлических частиц различными добавками. Управление размерами частиц достигалось варьированием концентрации восстановителя, стабилизирующих добавок, а также добавок, влияющих на вязкость раствора.

Для определения цитотоксического действия препаратов на основе наночастиц биоэлементов на линию клеток MDBK готовили двукратные разведения препаратов от 1:5 до 1:1280. Каждое разведение вносили в лунки 24-луночных полистироловых планшетов в 3-х режимах воздействия – в клеточную суспензию, на растущую клетку и сформированный монослой. На каждое разведение препарата приходилось по 4 лунки. Время экспозиции составляло 24, 48 и 72 часа. Культивирование проводилось в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Результаты эксперимента оценивали по наличию дегенеративных изменений монослоя в лунках планшета.

В работе была исследована цитотоксичность препаратов на основе наночастиц биоэлементов на различных стадиях роста и размножения клеток (таблица 1).

Таблица 1 – Режимы воздействия наночастиц на перевиваемой линии клеток MDBK

Режим воздействия	Время экспозиции, ч.		
Внесение препарата непосредственно в клеточную суспензию	24	48	72
Внесение препарата на растущую клетку – 1-суточный монослой	24	48	72
Внесение препарата на сформированный 2-3-суточный монослой	24	48	72

Для изучения цитоморфологии клеточной линии MDBK на фоне влияния наночастиц биоэлементов клетки выращивали на 24-луночных полистироловых планшетах на покровных стеклах в течение 48 часов. На сформированный монослой клеток вносили препарат в трех последовательных разведениях, при которых не наблюдалось изменений клеток в монослое дегенеративного характера. 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.

Результаты исследований и их обсуждение. В работе использована перевиваемая культура клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK (Madin and Darby Bovine Kidney), представленная клетками эпителиоподобного типа полигональной формы с четко различимыми границами. Цитоплазма клеток прозрачная, не зернистая, ядра клеток округлой формы с 1-4 ядрышками, что соответствует их стандартным музейным характеристикам.

Контроль перевиваемой культуры клеток MDBK на стерильность показал, что за период наблюдения в течение 10 суток на питательных средах (МПА, МПБ, Сабуро, Китт-Тароцци) с посевами клеточной суспензии, роста бактерий и грибов не выявлено. Пробирки с питательными средами и посевами исследуемой суспензии клеток оставались без изменений (цвета, наличия осадка и т.д.), что свидетельствует об отсутствии контаминации клеточной культуры посторонней микрофлорой.

Для изучения влияния препарата на монослойформирующие способности и развитие постоянной культуры MDBK препараты наночастиц вносили в двукратных разведениях от 1:5 до 1:1280 в клеточную суспензию. Учет реакции проводили, оценивая наличие дегенерации монослоя (таблица 2).

Таблица 2 – Цитотоксическое действие наночастиц серебра и оксида цинка при внесении в суспензию клеток MDBK

Разведение препарата	Количество пробирок (лунок)	Время экспозиции, ч.					
		24		48		72	
		Ag	ZnO	Ag	ZnO	Ag	ZnO
1:5	4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1:10	4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1:20	4	4/1	4/4	4/2	4/4	4/2	4/4
1:40	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:80	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:160	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:320	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:640	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
1:1280	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
Контроль	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0

Примечание: 4/1 – в числителе – количество пробирок (лунок) с культурой клеток в опыте, в знаменателе – количество пробирок (лунок) с культурой клеток, в которых отмечена дегенерация клеток.

Было выявлено, что при концентрациях наночастиц серебра 1:5-1:10, оксида цинка – 1:5-1:320 дегенерация клеток наблюдалась во всех

лунках через 24, 48 и 72 часа, что свидетельствует об их цитотоксическом эффекте на клетки.

При концентрации наночастиц серебра 1:20 наблюдалась частичная дегенерация. Через 24 часа дегенерация наблюдалась в одной из четырех лунок, а через 48 и 72 часа – в двух лунках из четырех.

Разведения наночастиц серебра 1:40-1:1280, оксида цинка – 1:640 и 1:1280 дегенерацию клеток не вызывали.

Для определения цитотоксических эффектов наночастиц серебра и оксида цинка на растущую клетку – двукратные разведения препарата вносили на суточный 30-50%-й монослой клеток (таблица 3).

Таблица 3 – Цитотоксическое действие наночастиц серебра и оксида цинка при внесении на растущую клетку линии MDBK

Разведение препарата	Количество пробирок (лунок)	Время экспозиции, ч.					
		24		48		72	
		Ag	ZnO	Ag	ZnO	Ag	ZnO
1:5	4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1:10	4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1:20	4	4/0	4/4	4/1	4/4	4/1	4/4
1:40	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:80	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:160	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:320	4	4/0	4/2	4/0	4/3	4/0	4/4
1:640	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
1:1280	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
Контроль	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0

По данным таблицы 3 установлено, что концентрации наночастиц серебра 1:5-1:20 и оксида цинка – 1:5-1:320 оказывают цитотоксический эффект на растущую клетку. Но, в отличие от действия на суспензию клеток, при действии препаратов на сформированный суточный монослой наблюдается менее выраженный цитотоксический эффект.

Для определения цитотоксических эффектов наночастиц цинка на сформированный монослой клеток MDBK двукратные разведения препаратов на основе наночастиц биоэлементов вносили на 2-3-суточный 100%-й монослой клеток.

Результаты исследования цитотоксического действия наночастиц серебра и оксида цинка на 2-3-суточный монослой клеточных культур представлены в таблице 4.

По данным таблицы 4 дегенерация 100%-го монослоя при использовании наночастиц серебра в разведении 1:20 не проявлялась, при внесении наночастиц оксида цинка в разведении 1:320 была поражена только одна лунка из 4-х через 24, 48 и 72 часа. Полученные данные свидетельствуют о менее выраженном повреждающем действии иссле-

дуремых препаратов на сформировавшийся монослой в сравнении с растущей клеткой.

Таблица 4 – Цитотоксическое действие наночастиц серебра и оксида цинка при внесении на сформированный 2-3-суточный монослой MDBK

Разведение препарата	Количество пробирок (лунок)	Время экспозиции, ч.					
		24		48		72	
		Ag	ZnO	Ag	ZnO	Ag	ZnO
1:5	4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1:10	4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1:20	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:40	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:80	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:160	4	4/0	4/4	4/0	4/4	4/0	4/4
1:320	4	4/0	4/1	4/0	4/1	4/0	4/1
1:640	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
1:1280	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
Контроль	4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0

Следующим этапом работы явились цитологические исследования культуры MDBK, позволяющие выявить направление и глубину морфологических изменений под действием нанопрепаратов серебра и оксида цинка.

В процессе исследований проводилось изучение 2-суточной культуры клеток MDBK обработанной тремя последовательными разведениями препаратов, при которых не наблюдалось изменений клеток в монослое дегенеративного характера с экспозицией 24 часа и последующим окрашиванием гематоксилин-эозином.

Изучение окрашенных цитологических препаратов показало, что в норме культура MDBK образует сплошной клеточный монослой с равномерным распределением клеток по поверхности стекла (рисунок 1).



Рисунок 1 – Культура MDBK. Контроль (x 20)

Границы клеток четко различимы. Клетки плотно прилегают друг к другу. Морфологически клетки эпителиоподобного типа полигональной формы. Ядра крупные, овальной или округлой формы, расположены в центральной части цитоплазмы. Цитоплазма неоднородна, имеет рыхлый матрикс.

Препараты наночастиц серебра в разведении 1:10, оксида цинка – 1:160 вызвали задержку развития клеточного монослоя, нарушали 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 препаратам превосходили контрольный показатель более чем в 2 раза (рисунок 2, 3).

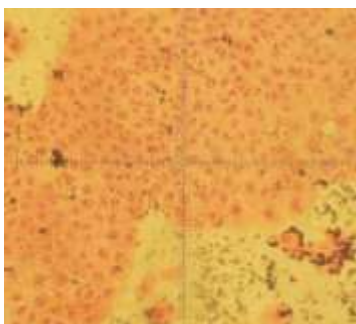


Рисунок 2 – Культура MDBK при экспозиции с препаратом наночастиц серебра в разведении 1:10 (x 20)

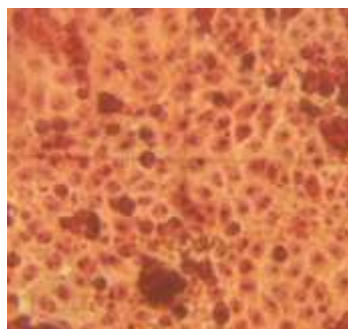


Рисунок 3 – Культура MDBK при экспозиции с препаратом наночастиц цинка в разведении 1:160 (x 40)

Препараты наночастиц серебра в разведении 1:20, оксида цинка – 1:320 вызывали такие же цитоморфологические изменения, как в предыдущих разведениях - 1:10 и 1:160 соответственно, но в меньшей степени. Под воздействием наночастиц серебра наблюдалось расширение межклеточных контактов, но при этом не отмечалось образование «окон» и разрывов (рисунок 4). Нанопрепарат оксида цинка вызывал задержку развития клеточного монослоя, нарушал целостность сформировавшихся участков клеточного пласта вследствие возникновения очагов дегенерации различной интенсивности. Отмечалось расширение межклеточных пространств. Клетки имели

нехарактерную округлую форму. Наблюдались множественные случаи многоядерности (рисунок 5).

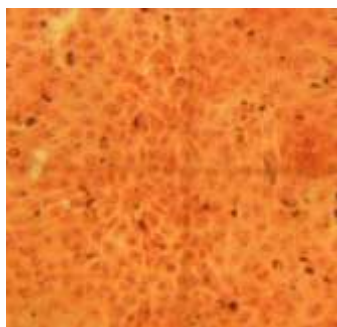


Рисунок 4 - Культура MDBK при экспозиции с препаратом наночастиц серебра в разведении 1:20 (x 20)

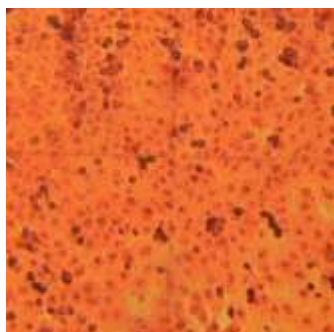


Рисунок 5 – Культура клеток MDBK при экспозиции с препаратом наночастиц цинка в разведении 1:320 (x 20)

По данным световой микроскопии препарат наночастиц серебра в разведении 1:40, оксида цинка – 1:640 не влиял на морфологию клеток, внешний вид культуры соответствовал норме (рисунок 6, 7). 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.

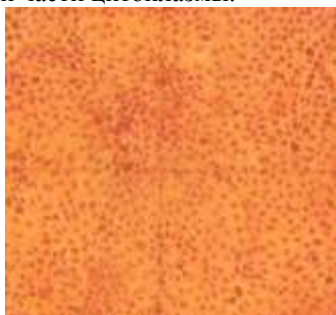


Рисунок 6 – Культура MDBK при экспозиции с препаратом наночастиц серебра в разведении 1:40 (x 10)

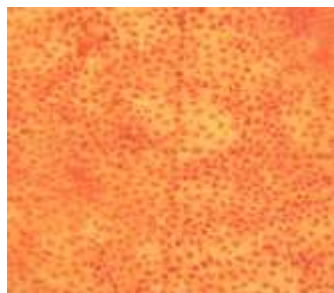


Рисунок 7 – Культура клеток MDBK при экспозиции с препаратом наночастиц цинка в разведении 1:640 (x 10)

Таким образом, цитоморфологические исследования изменений в культуре клеток MDBK свидетельствуют о наличии цитотоксического

эффекта препарата наночастиц серебра при концентрациях 1:10 и 1:20, оксида цинка – 1:160 и 1:320.

Заключение. 1. В результате сравнительного изучения цитотоксического действия наночастиц серебра и цинка на перевиваемые культуры клеток MDBK на различных стадиях размножения и роста клеточной линии установили, что цитотоксический эффект препаратов на основе наночастиц серебра и цинка зависит от возраста клетки и стадии роста, на которой находится клеточная популяция. Таким образом, молодые растущие клетки являются более чувствительными, чем зрелые клетки сформировавшегося монослоя.

2. Установлена более высокая цитотоксичность наночастиц цинка в сравнении с нанопрепаратом на основе серебра, который оказывает цитотоксический эффект в разведении 1:5-1:320 в сравнении с наночастицами серебра, вызывающими дегенерацию монослоя клеток в разведениях 1:5 и 1:10.

3. При изучении морфологии клеточных культур с использованием специфических методов окраски установлено, что препараты на основе наночастиц серебра и цинка оказывают цитотоксическое действие, которое проявляется в округлении клеток, расширении и нарушении межклеточных контактов, нарушении развития клеточного монослоя и т.д.

ЛИТЕРАТУРА

1. Губин, С. П. Магнитные наночастицы: методы получения, строение, свойства / С. П. Губин, Ю. А. Кошкарлов, Г. Б. Хомутов, Г. Ю. Юрков // *Успехи химии* – 2005 - №74(6). – С. 539–574.
2. Penn, S. G. Nanoparticles for bioanalysis. / S.G. Penn, L. He and M.J. Natan // *Current opinion in chemical biology*. - October 2003. – Vol. 7, № 5. – P. 609–615.
3. Bystrzejewska-Piotrowska, G. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management / G. Bystrzejewska-Piotrowska, J. Golimowski and P.L. Urban // *Waste Management*. - September 2009. – Vol. 29, №9. – P.2587–2595.
4. Nishimori, H. Silica nanoparticles as hepatotoxicants / H. Nishimori, M. Kondoh, K. Isoda, S.-I. Tsunoda, Y. Tsutsumi and K. Yagi // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. - August 2009. – Vol. 72, №3. – P. 496-501.