

УДК 345.466-74.867

## ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ПЕРЕВИВАЕМЫМИ КЛЕТКАМИ МДБК

\* Красочко П.А., \*\* Чижик С.А., \*\* Худолей А.Л., \*Станкуть А.Э., \*\*Дрозд Е.С.

\*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,

\*\*ГНУ «Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси,

г. Минск, Республика Беларусь

*Приведены результаты изучения взаимодействия наночастиц серебра с перевиваемой культурой клеток почки теленка МДБК с помощью атомно-силовой микроскопии. Установлено, что проникновение наночастиц серебра внутрь клеток не повреждает клеток, а увеличивает их упругость,*

*Results of studying of interaction of nanoparticles of an oxide of zinc with intertwined culture of cells of a kidney of a calf of MDBK by means of nuclear and power microscopy are given. It is established that nanoparticles of an oxide of zinc (ZnO) reduce elasticity of cages, on a surface of cages deepenings – a time that testifies to damage of cages are found out.*

**Введение.** В последнее десятилетие особое внимание уделяется изучению взаимодействия наночастиц с биологическими клетками и возможности использования наночастиц в медицине и в других приложениях. Наночастицы уже нашли свое применение в качестве маркировочных агентов, так как обеспечивают очень сильные и стабильные оптические сигналы и позволяют получить информацию о наличии определенного вещества, а также используются для транспортировки лекарственных веществ в организм [1,2].

В связи с широким их использованием в биологии и медицине и открытием все новых уникальных свойств у обычных материалов на субмикрометрическом уровне особое внимание стало уделяться проблеме взаимодействия наночастиц с биологическими системами. Поэтому необходима уверенность в том, что внедрение в практику нанотехнологий и их использование не создаст дополнительных проблем в будущем, как это уже случалось прежде. Таким образом, для дальнейшего развития и применения нанотехнологий требуется не только изучение физико-химических свойств самих наноматериалов, но и четкое понимание механизмов их поведения в биологических системах и взаимодействия наночастиц с клетками организма. Это связано с тем, что при введении в организм наночастиц возникает опасность проявления ими цитотоксических эффектов, которые зависят от многих факторов.

На сегодняшний день установлено, что химические и биологические свойства наночастиц существенно отличаются от свойств исходного материала, из которого они были получены. Так, при введении наночастиц металлов в организм требуется время для их растворения, связывания с биолигандами, достижения мишеней биологического действия. Поэтому важным свойством наночастиц металлов при введении в организм является их пролонгированное действие. Это, безусловно, относится и к материалам на основе серебра и меди [3,4].

Таким образом, рассматривая взаимодействие наночастиц металлов с живыми клетками, следует начать с той особенности, что наночастицы, попав в кровь, лимфу или любую другую биологическую жидкость, покрываются слоем белков, всё время находящихся в растворе и адсорбирующихся на поверхности частицы. Вследствие этого модифицируются как свойства самих частиц, так и белков. Основные белки, прикрепляющиеся к наночастицам — это альбумин, иммуноглобулины, факторы комплемента, фибриноген и аполипопротеины. Также установлено, что белки и другие органические вещества увеличивают растворимость наночастиц (например, ZnO, медь).

Следующий этап взаимодействия наночастиц металлов с клетками — это непосредственно контакт с их биологическими мембранами, который нередко заканчивается захватом первых внутрь клетки с помощью ряда механизмов. Существует минимальный радиус частицы, при котором она может быть захвачена внутрь клетки, и «оптимальный» радиус, при котором захват происходит с максимальной эффективностью. Для сферических и цилиндрических частиц такие оптимальные размеры равны 15 и 30 нм, соответственно. Пути и взаимодействия наночастиц после того, как они попадут внутрь клетки, изучены пока довольно слабо, хотя это и представляет огромный интерес в смысле направленной доставки лекарств в клетку. Не очень понятно и как клетка выбирает конкретный путь захвата: это может быть фагоцитоз, пиноцитоз или эндоцитоз, причём этот выбор зависит как от клетки, так и от параметров частицы.

Актуальным остается вопрос о характере взаимодействия и влияния наночастиц на биологические клетки. При применении наноматериалов возникает опасность возникновения токсических эффектов в живых системах. Томас Вебстер (Thomas J. Webster) [1] в своей книге приводит результаты исследований на цитотоксичность различных наночастиц, таких как квантовые точки или полупроводниковые нанокристаллы, наночастицы металлов (золота и серебра) и флуоресцентные наночастицы кремния. Изучено влияние различных механико-физических параметров на токсичность наночастиц, а именно изменение размера, влияние модификации поверхности наночастиц, постпокрытия наночастиц. Кроме того, степень токсичности наночастиц может зависеть от клеточной линии.

Одним из способов изучения влияния наночастиц на биологические клетки является метод количественной оценки механических характеристик, в частности, определение изменения модуля упругости клеток после инкубации их с наночастицами. В связи с этим была определена цель проводимого исследования.

Целью настоящих исследований было изучение взаимодействия наночастиц серебра с перевиваемой культурой клеток почки теленка МДБК с помощью атомно-силовой микроскопии.

**Материалы и методы.** Объектом исследований служили наночастицы серебра, полученные в ГНУ «Институт физики твердого тела и полупроводников» НПЦ НАН Беларуси по материаловедению. Оптимальный размер частиц был выбран в диапазоне 5-50 нм. Было достигнуто то, что суспензия наночастиц была устойчива по отношению к образованию конгломератов и седиментации (оседанию) путем добавления поверхностно активных веществ и водорастворимых полимеров. Также использовалась дисперсионная среда, совместимая с физиологическими жидкостями организма животного.

В основе метода получения коллоидного раствора наночастиц серебра были положены реакции осаждения серебра из нитрата, стабилизация полученных металлических частиц различными добавками. Управление размерами частиц достигалось варьированием концентрации восстановителя, стабилизирующих добавок, а также добавок, влияющих на вязкость раствора. Полученные растворы хранятся без заметной седиментации в течение 2 суток. Увеличить срок хранения до практически не ограниченного времени можно, охладив раствор до температуры ниже 3 градусов Цельсия [6].

Для получения образцов клеток, пригодных для АСМ-исследования, применяли химическую фиксацию. Для этого к культуре клеток добавляли раствор наночастиц серебра и инкубировали их в течение 20 минут. В данном эксперименте применялся раствор наночастиц, разведенный 1:5 (100 мг/мл) раствором Хэнкса. После клетки отмывали фосфатным буфером от раствора наночастиц и добавляли 1,5% раствор глутарового альдегида на 30 мин. Затем клетки отмывали дважды фосфатным буфером, дважды дистиллированной водой, высушивали на воздухе при комнатной температуре [5].

Изучение взаимодействия наночастиц цинка проводили в лаборатории нанопроцессов и технологий ГНУ «Институт тепло и массообмена им. А.В. Лыкова» НАН РБ при помощи атомно-силового микроскопа (АСМ) - НТ-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) в контактном режиме. Были

#### Результаты исследований.

Проведены исследования топографии поверхности клеток MDBK методом атомно-силовой микроскопии. На рисунке 1 представлены 3-мерное изображение и топография поверхности клетки линии MDBK, полученные с помощью атомно-силового микроскопа. Были получены следующие изображения топографии поверхности клеток MDBK до инкубации их с наночастицами (рис. 32).

X: 9.5um Y: 7.1um Z: 556.5nm [1.7:1]  
Ra: 64.7nm Rq: 81.1nm

X: 7.9um Y: 7.2um Z: 796.9nm [1.0:1]  
Ra: 48.7nm Rq: 67.5nm

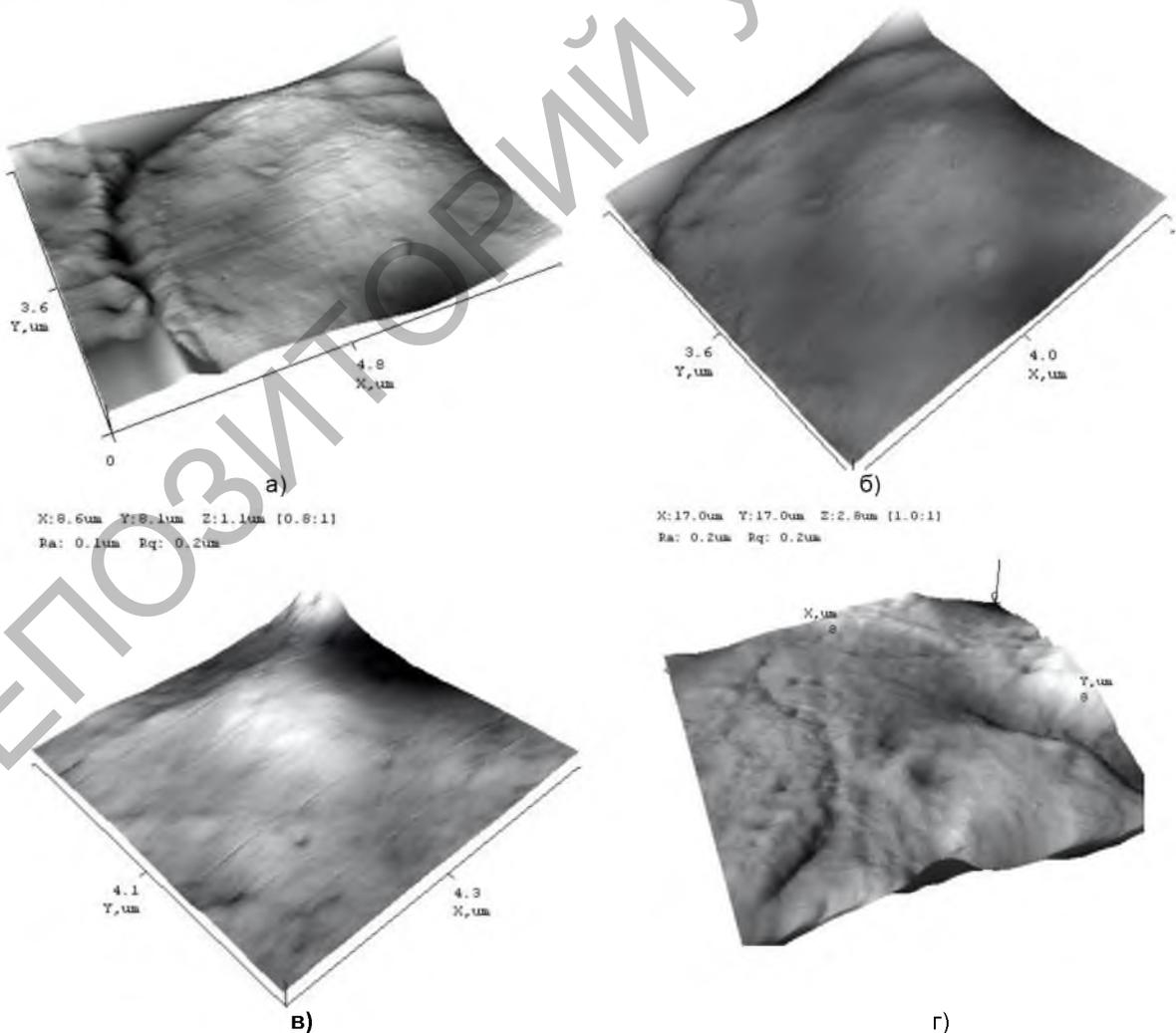


Рис. 32. Трехмерное АСМ-изображение поверхности культуры клеток MDBK до инкубации их с наночастицами серебра: а - область сканирования  $9,5 \times 7,1 \text{ мкм}^2$ ; б - область сканирования  $7,9 \times 7,2 \text{ мкм}^2$ ; в - область сканирования  $8,6 \times 8,1 \text{ мкм}^2$ ; г - область сканирования  $17 \times 17 \text{ мкм}^2$ .

Как видно из рисунка 32, поверхность клеток ровная, без явно выраженных выступов, впадин и пор. Ниже представлены изображения клеток после 20 минут инкубации с наночастицами нитрита серебра (рис. 32,33).

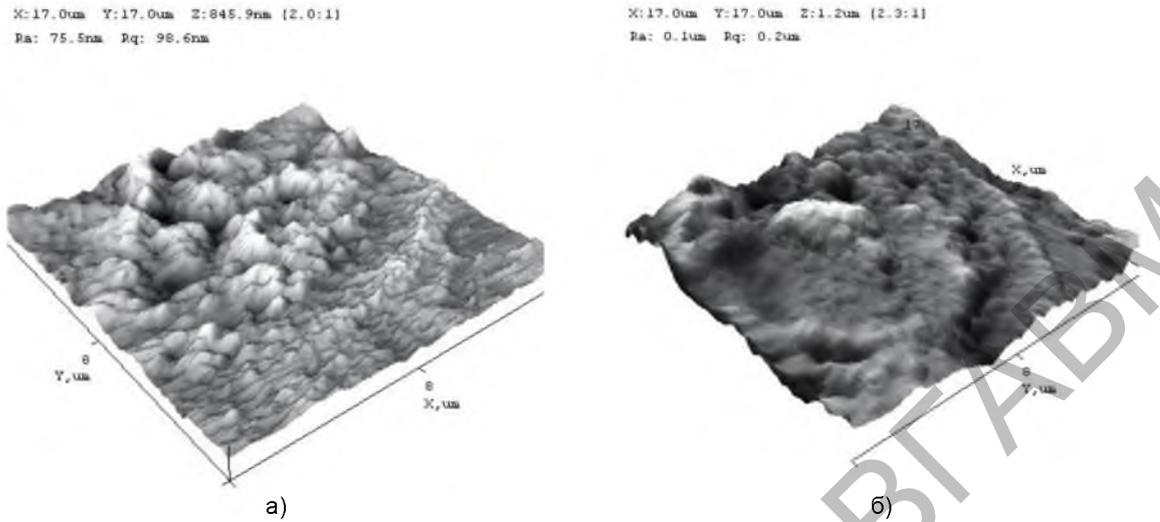


Рис. 33 Трехмерное АСМ-изображение поверхности клеток почки быка после 20 мин инкубации их с наночастицами серебра: а - область сканирования 17x17 мкм<sup>2</sup>; б - область сканирования 17x17 мкм<sup>2</sup>;

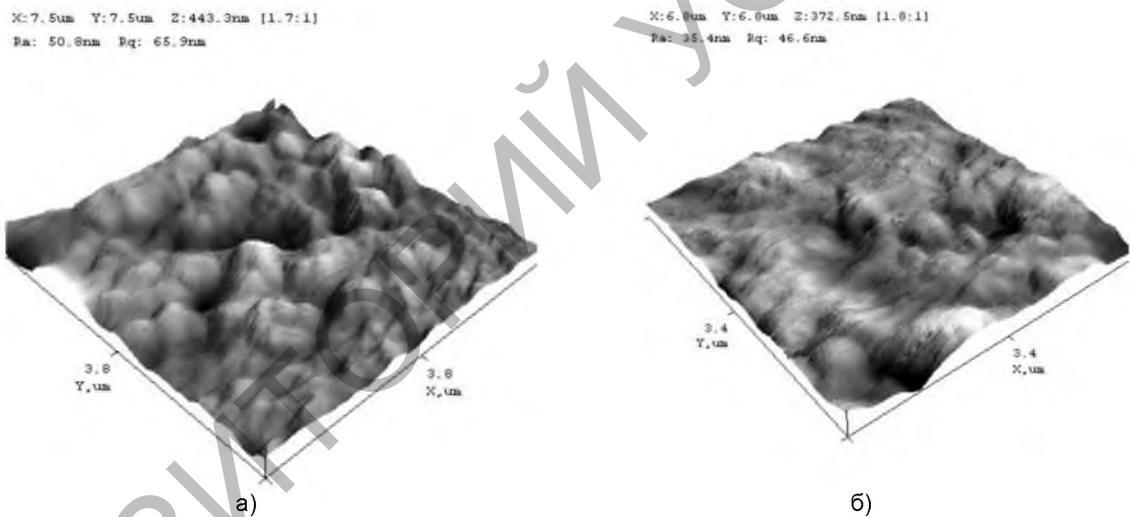


Рис. 34. Трехмерное АСМ-изображение поверхности клеток MDBK после 20 мин инкубации их с наночастицами серебра: а - область сканирования 7,5x7,5 мкм<sup>2</sup>; б - область сканирования 6,8x6,8 мкм<sup>2</sup>

На рисунках 32,33 можно заметить, что поверхность клеток сильно изменилась. В данном случае можно предположить, что наночастицы проникли в клетку и сильно деформировали ее поверхность.

На рисунке 2-3 наблюдаются образования на поверхности клетки, средним размером 349 нм. Можно сделать предположение, что это и есть наночастицы серебра, причем часть из них не проникла внутрь клетки, а осталась на ее поверхности. Ниже на рис. 4 представлен профиль наночастицы на поверхности клетки.

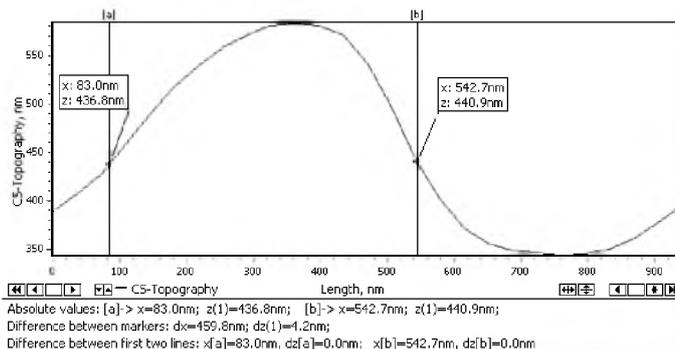


Рис. 35. Изображение профиля сечения наночастицы на поверхности клетки

Далее с помощью атомно-силового микроскопа были изучены упругие характеристики клеток, которые показали, что проникновение наночастиц серебра внутрь клеток увеличивает их упругость. Расчет модуля упругости показал, что модуль упругости клеток почки быка (контрольный образец) равен  $E = 6,92$  МПа, а через 20 мин инкубации их с наночастицами серебра модуль упругости составил  $E = 9,56$  МПа.

В таблице 41 приведены оценки модуля упругости клеток до и после воздействия наночастиц

Таблица 41

Значения модуля упругости клеток почки быка до и после инкубации с наночастицами серебра

Название	E, МПа	Сравнение значений модуля упругости по группам	
		Ag	контроль
Контроль	6.92±0.36		
Ag	9.56±0.68		<0.001

Значение модуля упругости клеток контрольного образца ниже, чем у клеток после воздействия растворов наночастиц серебра, при этом после воздействия оксида цинка модуль упругости клеток уменьшается.

Но не стоит забывать, что цитотоксичность может зависеть не только от физической природы, способа получения, размеров, структуры наноразмерных частиц, но и от биологической модели, на которой проводятся испытания.

Так или иначе, современная наука на данном этапе знает о процессах, протекающих в живых организмах при участии наночастиц, очень мало. И комплексный подход к этой проблеме подразумевает выработку общих принципов и универсальных характеристик, показывающих механизм взаимодействия наночастиц с биомолекулами.

**Литература.** 1. Thomas, J. Webster Safety of Nanoparticles / J. Thomas // Spring. – 2009. – 239 с. 2. Гусев, А.И. Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов / А.И. Гусев, А.А. Саранин, // [Электронный ресурс]. – 2009–2011г. – Режим доступа: <http://thesaurus.rusnano.com/wiki/article535>. – Дата доступа: 26.11.2011. 3. Кравченко, Н. С. Методы обработки результатов измерений и оценки погрешностей в учебном и лабораторном практикуме / Н.С. Кравченко, О.Г. Ревинская // Яндекс. Народ. [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: <http://ogrevinskaya.narod.ru/LabMethods.pdf>. – Дата доступа: 22.11.2011. 4. Российский электронный наножурнал // ООО «Парк-медиа» [Электронный ресурс] – 2007-2008. – Режим доступа: <http://www.nanorj.ru/> – Дата доступа: 22.11.2011. 5. Сергеев, Г.Б. Нанохимия: учеб. пособие / Г.Б. Сергеев // Университет книжный дом. – Москва, 2006. – 334с. 6. Сайт Биомолекула [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: <http://biomolecula.ru/techno/> – Дата доступа: 22.11.2011.

Статья передана в печать 03.09.2012 г.

УДК 633.367:632.4

#### АКТИВАЦИЯ ЛЕКТИНОВЫХ БЕЛКОВ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ФИТОПАТОГЕННЫМ ГРИБОМ *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

\*Кубарев В. С., \*\* Коваленок Ю.К.

\*РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию», г. Жодино, Республика Беларусь

\*\* Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

*Инфицирование растений узколистного люпина сортов Эдельвейс, Rancher, Marri, Wonga, Tanjil и Миртан фитопатогенным грибом Colletotrichum gloeosporioides вызывает значимое ( $P < 0,05-0,001$ ) возрастание геммагглютинирующей активности содержащихся в листьях лектинов по сравнению с неинфицированным контролем.*

*Infection of plant blue lupine varieties Edelweiss, Rancher, Marri, Wonga, Tanjil and Myrtana phytopathogenic fungus Colletotrichum gloeosporioides is significant ( $P < 0,05-0,001$ ) increase hemagglutinating activity in the leaves of lectins compared to uninfected control.*

**Введение.** В условиях Республики Беларусь при производстве зернобобовых культур все больше значение приобретает люпин. Данная сельскохозяйственная культура обладает высоким содержанием белка в семенах, высокой азотфиксацией, а также способна произрастать в условиях умеренно-континентального климата. Согласно принятой систематике род *Lupinus* включает около 200 видов, произрастающих в разных почвенно-климатических условиях. Однако сдерживающим фактором широкого внедрения этой культуры в сельскохозяйственное производство Республики Беларусь является восприимчивость сортов люпина к антракнозу, при эпифитотиях которого полностью гибнут его посевы [6].

К настоящему времени накоплен большой фактический материал об индукции в разных растительных объектах в ответ на инфицирование вирусами, бактериями и грибами синтеза многих PR-белков, в состав которых входят хитиназы, пероксидазы, туматинподобные белки, протеиназы, лектиновые белки [1]. Особый интерес представляет последняя группа белков - лектины. Лектины - это белки, не относящиеся к классу иммунных и ферментных, способные к обратимому связыванию с