

6. Копоть О.В., Свиридова А.П., Поплавская С.Л. Естественная резистентность телят-гипотрофиков при использовании биологически активных веществ. //Современные технологии сельскохозяйственного производства. – Гродно, 2011. – С.197-199.
7. Копоть О.В., Свиридова А.П., Поплавская С.Л., Фомкина И.Н. Применение биологически активных веществ для повышения иммунобиологической реактивности телят-гипотрофиков. //Современные технологии сельскохозяйственного производства. – Гродно, 2011. – С.199-201.
8. Михалюк, А.Н. Влияние пробиотиков на обмен веществ и естественную резистентность поросят // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2003. - №3. – С.19-21.
9. Михалюк А.Н., Каврус М.А. Экономическая эффективность использования пробиотического препарата «Билавет С» в хозяйствах Гродненского района. //Современные технологии сельскохозяйственного производства. – Гродно, 2011. – С.225-227.
10. Субботин, В.В. Основные элементы профилактики желудочно-кишечной патологии новорожденных животных // Ветеринария: стилистический научно-практический журнал. – М.,2004. - №1. – С.3-6.

УДК 619:57.082.26:615.28

## **ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК MDBK ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НАНОЧАСТИЦ БИОЭЛЕМЕНТОВ**

**П.А. Красочко<sup>1</sup>, Д.С. Борисовец<sup>1</sup>, А.Э. Станкуть<sup>1</sup>, М.С. Струк<sup>1</sup>,  
В.Л. Радько<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> – РУП «Институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышелесского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> – УО «Международный государственный экологический университет  
имени А.Д. Сахарова»,  
г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 28.06.2013 г.)

**Аннотация.** Изучены культуральные свойства перевиваемых линий клеток почки эмбриона крупного рогатого скота (MDBK) при взаимодействии с наночастицами цинка и серебра. Установлено, что нанопрепараты оказывают негативное влияние на пролиферацию клеток и их жизнеспособность. При увеличении концентрации препарата наночастиц цинка отмечалось достоверное снижение индекса пролиферации клеток на 19,79-26,94%, коэффициента жизнеспособности – на 7,72-13,29%; при повышении концентрации препарата наночастиц серебра данные показатели снижались в 1,09-4,76 раза и на 9,25-54,48% соответственно; выявлено увеличение уровня ЛДГ в культуральной питательной среде.

**Summary.** The cultural properties of MDBK cell line by interaction with zinc and silver nanoparticles were studied. The negative effect of nanopreparations on a cell proliferation and viability was established. The significant decrease of cell proliferation index by 19.79-26.94% and cell viability ratio by 7.72-13.29% with in-

*creasing of concentration of zinc nanoparticles was indicated; decrease of this indexes in 1.09-4.76 times and by 9.25-54.48% respectively with increasing of concentration of silver nanoparticles and the increase of LDH levels in the culture medium were established.*

**Введение.** В развитии современных нанотехнологий значительную роль играют исследования наночастиц металлов. Это обусловлено, прежде всего, широким спектром возможностей их практического применения, в которых используются специфические свойства как самих наночастиц, так и модифицированных ими материалов [1, 2].

Наноматериалы и наночастицы, являющиеся продуктом современных нанотехнологий, обладают комплексом уникальных свойств, которые открывают широкие перспективы их промышленного применения [3, 4]. Одновременно это создаёт риск возможных неблагоприятных воздействий наноматериалов на организм человека, сельскохозяйственных животных и растения, компоненты природных биоценозов [5, 6].

С одной стороны, преимущество использования наночастиц очевидно. С другой стороны, на настоящий момент проблема обнаружения наночастиц не изучена, и возможность влияния их на живой организм остается открытой. Данные, полученные в различных исследованиях о влиянии наночастиц на организмы, достаточно противоречивы, но забывать об актуальности данной проблемы не стоит [5, 7].

Вопросы токсического действия наночастиц на живой организм требуют проведения научных исследований, особенно на уровне клеточных систем, в процессе их роста и размножения.

Культурально-морфологические свойства клеточных культур представляют собой совокупность важнейших характеристик, которые позволяют судить о физиологическом состоянии клеточной линии под воздействием различных фармакологических препаратов. Основными культуральными показателями являются пролиферативная активность, определяющая в конечном итоге степень развития клеточного монослоя, число жизнеспособных клеток в пассаже, уровень активности лактатдегидрогеназы. В случае тестирования препаратов данные показатели, наряду с результатами цитоморфологических и других исследований, позволяют судить о степени цитотоксичности веществ.

**Цель работы** – изучить культуральные свойства перевиваемых линий клеток почки эмбриона крупного рогатого скота (MDBK) при взаимодействии с наночастицами цинка и серебра.

**Материалы и методика исследований.** Влияние препарата на культурально-морфологические свойства клеточных линий определяли с учетом показателей жизнеспособности клеток (КЖ) и индекса про-

лиферации культуры (ИП). Подсчет и морфологию клеток в культуре контролировали при помощи инвертированного светового микроскопа OLYMPUS OM-4 при увеличении объективов 10, 20, 40.

Концентрацию клеток в клеточной суспензии, а также количество жизнеспособных клеток определяли при помощи камеры Горяева с применением 0,5%-го раствора трипановой сини, рассчитывая на 1 мл среды. За жизнеспособные принимались неокрашенные клетки с хорошо выраженным ядром и неокрашенной цитоплазмой. Индекс пролиферации определяли через соотношение числа выросших клеток к числу засеянных.

Все расчеты производили по общепринятым методикам, оценивая культуральные показатели клеточных линий (Дьяконов Л.П., Ситьков В.И., 2000).

В работе была исследована динамика данных показателей при различных режимах воздействия препаратов на основе наночастиц серебра и цинка, кратко изложенных в таблице 1.

Таблица 1 – Режимы воздействия наночастиц цинка и серебра при исследовании культурально-морфологических показателей 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 сформировавшийся 2-3-суточный монослой	24	48	72

Концентрацию ЛДГ определяли в среде инкубации. Для изучения уровня указанного фермента препарат вносили в трех последовательных минимальных разведениях, при которых не наблюдалось изменений клеток в монослой дегенеративного характера. Препарат вносили в 3-х режимах воздействия, указанных в таблице 1. Наличие заметной активности фермента в среде инкубации свидетельствует об «утечке» его из клеток в результате существенного повреждения плазматической мембраны и является широко используемым показателем цитотоксического эффекта и клеточного некроза.

Активность ЛДГ в среде инкубации определяли с использованием автоматического биохимического анализатора DIALAB autolizer 20010D.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Влияние препарата на культурально-морфологические свойства клеточных линий определяли с учетом показателей жизнеспособности клеток (КЖ) и индекса пролиферации культуры (ИП) (таблица 2, 3).

Таблица 2 – Изменения культурально-морфологических показателей культуры клеток MDBK при внесении препарата на основе наночастиц серебра в суспензию клеток

Разведение препарата	Время экспозиции, ч.					
	24		48		72	
	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %
1:20	0,65± 0,08***	42,5± 0,95***	0,71± 0,08***	37,75± 3,9***	1,10± 0,28***	39,25± 1,25***
1:40	0,81± 0,21	74,0± 2,35***	1,4± 0,07***	68,25± 0,85***	2,85± 0,27**	62,0± 1,29***
1:80	1,15± 0,03*	84,25± 2,5*	2,06± 0,22**	77,0± 1,29***	3,72± 0,13**	75,5± 1,04***
Контроль	1,32± 0,05	93,0± 2,16	3,38± 0,08	95,25± 1,31	5,12± 0,33	95,75± 1,25

Примечание: \* -  $P \leq 0,05$ ; \*\* -  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0,001$ .

Из таблицы 2 видно, что наночастицы серебра оказывают существенное влияние на рост и размножение популяции клеток, способствуя их угнетению, т.к. в разведениях 1:20-1:80 показатели индекса пролиферации и коэффициент жизнеспособности были достоверно ниже контроля. При этом прослеживалось снижение индекса пролиферации в 1,15 – 4,76 раза относительно контроля, коэффициент жизнедеятельности снижался относительно контроля на 21,14 – 43,50%.

Применение препарата наночастиц серебра в концентрации 1:80 оказало наименьшее негативное воздействие на клеточный рост за все время экспозиции.

Таблица 3 – Изменения культурально-морфологических показателей культуры клеток MDBK при внесении препарата оксида цинка в суспензию клеток

Разведение препарата	Время экспозиции, ч.					
	24		48		72	
	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %
1:320	0,59± 0,12 ***	24,5± 1,04***	-	отсутствие роста	-	дегенерация монослоя
1:640	1,37±0,07*	85,5± 1,44***	2,18± 0,08**	77,25± 22,9***	2,34± 0,09***	73,25± 0,48***
1:1280	1,47±0,08	90,5± 2,02*	3,02±0,25	93,75± 1,84	3,85± 0,25**	85,0± 0,41***
Контроль	1,69±0,08	97±0,82	3,46±0,24	96,0±0,41	5,27±0,1	95,75±0,85

Примечание: \* -  $P \leq 0,05$ ; \*\* -  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0,001$ .

Из таблицы 3 видно, что наночастицы оксида цинка оказывают существенное влияние на рост и размножение популяции клеток, способствуя их угнетению, т.к. в разведениях 1:320-1:1280 показатели индекса пролиферации и коэффициент жизнеспособности были досто-

верно ниже контроля. При этом прослеживалось снижение ИП на 26,94% и КЖ на 11,2%.

Применение препарата наночастиц оксида цинка в концентрации 1:1280 оказало наименьшее негативное воздействие на клеточный рост за все время экспозиции.

Для изучения степени повреждения мембран клеток в суспензии использовали биохимический метод определения активности лактатдегидрогеназы (рисунок 1, 2).

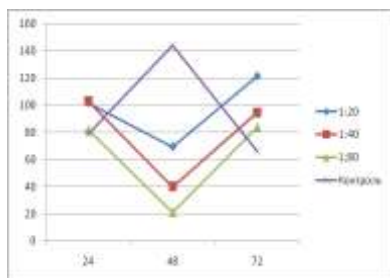


Рисунок 1 – Изменение уровня ЛДГ при внесении препарата на основе наночастиц серебра в суспензию клеток

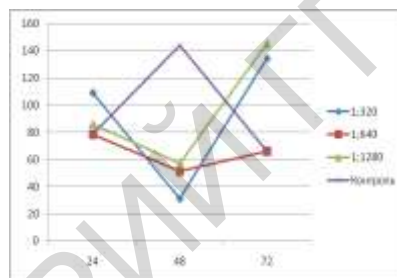


Рисунок 2 – Уровень ЛДГ при внесении препарата на основе наночастиц оксида цинка в суспензию клеток

Из рисунков 1, 2 видно, что при больших концентрациях наночастиц серебра и оксида цинка уровень активности ЛДГ выше, что свидетельствует о повреждающем воздействии высоких концентраций препаратов на мембраны клеток, находящихся в суспензии, в результате которого происходит выход фермента из клеток во внешнюю среду культивирования.

Для дальнейшего изучения культурально-морфологических показателей культуры клеток MDBK при внесении препаратов на растущую клетку были выбраны разведения, которые оказывают минимальное цитотоксическое действие (таблица 4, 5).

Данные таблицы 4 свидетельствуют о существенной корреляции между концентрацией препарата, показателями коэффициента жизнеспособности и индексом пролиферации. Индекс пролиферации снижался в 1,24-2,74 раза относительно контроля, а коэффициент жизнедеятельности снизился относительно контроля на 6,39-54,48%.

Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии исследуемого препарата на рост и размножение клеток, однако оно

является менее выраженным, чем при внесении разведений препарата на основе наночастиц серебра на суспензию клеток.

Таблица 4 – Изменения культурально-морфологических показателей культуры клеток MDBK при внесении препарата на основе наночастиц серебра на растущую клетку

Разведение препарата	Время экспозиции, ч.					
	24		48		72	
	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %
1:20	1,22±0,29*	77,75± 1,65***	1,73± 0,23***	47,0± 3,26***	2,54± 0,13****	44,5± 0,64***
1:40	1,68±0,11*	90,5± 0,96	3,32± 0,08***	87,25± 1,18***	4,24± 0,16***	88,75± 0,25***
1:80	1,7±0,12*	90±0,71	3,82± 0,11**	92,75± 1,31*	5,05± 0,25**	91,5± 0,96**
Контроль	2,12±0,1	92,25± 1,31	4,74± 0,13	97,25±0,75	6,51±0,08	97,75±0,75

Примечание: \* -  $P \leq 0,05$ ; \*\* -  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0,001$ .

Из таблицы 5 видно, что применение препарата на основе наночастиц оксида цинка оказывает отрицательное, но в то же время менее выраженное воздействие на рост и размножение клеток в популяции при внесении препарата на растущую клетку в сравнении с клеточной суспензией. В процессе опыта прослеживалось динамичное снижение ИП на 26,32% и КЖ на 13,29% с повышением концентрации нанопрепарата оксида цинка, а к 72 часам наблюдали дегенерацию монослоя (разведение – 1:320).

Таблица 5 – Изменения культурально-морфологических показателей культуры клеток MDBK при внесении препарата на основе наночастиц оксида цинка на растущую клетку

Разведение препарата	Время экспозиции, ч.					
	24		48		72	
	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %
1:320	0,79± 0,04	43,7± 0,75***	0,83± 0,15***	35,0± 1,08***	-	дегенерация монослоя
1:640	1,53± 0,04***	86,7± 0,85***	1,84± 0,21***	83,25± 1,55***	3,91± 0,13***	78,25± 0,85***
1:1280	1,85± 0,07**	88,7± 1,55*	2,74± 0,11***	93,25± 0,95**	4,62± 0,18***	84,75± 0,63***
Контроль	2,28± 0,04	95,0±1,08	4,04±0,05	97,75±0,63	6,27± 0,1	97,75±0,63

Примечание: \* -  $P \leq 0,05$ ; \*\* -  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0,001$ .

Динамика уровня фермента ЛДГ при нарушении целостности мембраны после внесения нанопрепаратов на растущую клетку представлена на рисунках 3, 4.

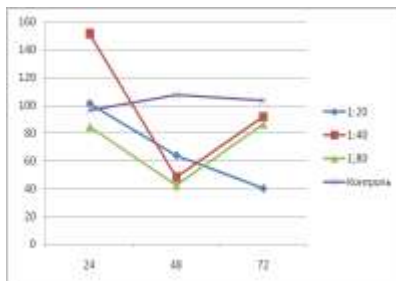


Рисунок 3 – Изменение уровня ЛДГ при внесении препарата на основе наночастиц серебра на растущую клетку

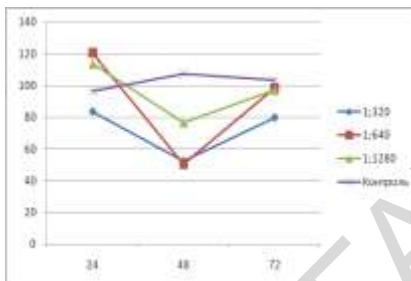


Рисунок 4 – Уровень ЛДГ при внесении препарата наночастиц оксида цинка на растущую клетку

Из рисунков 3, 4 видно, что наибольший уровень ЛДГ в культуральной питательной среде при воздействии нанопрепаратов на растущую клетку отмечается для наночастиц серебра – в разведении 1:20, оксида цинка – 1:320, что подтверждает данные о повреждающем их действии на клеточные мембраны.

Проведено изучение культурально-морфологических показателей культуры клеток MDBK при внесении препарата на основе наночастиц серебра и оксида цинка на сформированный монослой клеток (таблица 6, 7).

Таблица 6 – Изменения культурально-морфологических показателей культуры клеток MDBK при внесении препарата на основе наночастиц серебра на сформированный монослой

Разведение препарата	Время экспозиции, ч.					
	24		48		72	
	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %
1:20	1,63± 0,03***	80,0± 0,41***	2,81± 0,07***	65,22± 1,18***	3,72± 0,19***	67,25± 0,25***
1:40	1,86± 0,03***	92,5± 0,29***	3,49± 0,17**	85,5± 0,65***	5,24± 0,14***	88,25± 0,75***
1:80	2,03± 0,29	92,0± 0,41***	3,91± 0,13*	90,5± 1,94**	6,17± 0,08**	87,0± 0,41***
Контроль	2,56± 0,09	97,75±0,63	4,57± 0,13	98,0± 0,41	6,73± 0,07	97,25±0,85

Примечание: \* -  $P \leq 0,05$ ; \*\* -  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0,001$ .

Данные таблицы 6 свидетельствуют о существенной корреляции между концентрацией препарата, индексом пролиферации и коэффициентом жизнеспособности, уровень которых снижался в 1,09-1,8 раза и на 9,25-30,85% относительно контроля соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии исследуемого препарата на рост и размножение клеток, однако оно является менее выраженным, чем при внесении разведений препарата на основе наночастиц серебра на растущую клетку.

Таблица 7 – Изменения культурально-морфологических показателей культуры клеток MDBK при внесении препарата на основе наночастиц оксида цинка на сформировавшийся монослой

Разведе- ние пре- парата	Время экспозиции, ч.					
	24		48		72	
	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %	ИП	КЖ, %
1:320	0,99± 0,08***	84,2± 0,85***	1,55± 0,13***	76,0± 1,14***	2,28± 0,08***	72,0± 0,41***
1:640	1,56± 0,12*	93,2±0,25	2,82± 0,14***	90,0± 2,27*	4,97± 0,15***	88,0± 0,71***
1:1280	1,61± 0,15*	92,7±0,48	3,17± 0,05***	93,75± 1,55*	5,43± 0,09**	89,5± 0,87***
Контроль	2,14±0,12	95,0±1,08	4,75±0,06	98,25± 0,48	6,77±0,24	97,0±0,82

Примечание: \* -  $P \leq 0,05$ ; \*\* -  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0,001$ .

Из таблицы 7 видно, что при применении разведений препарата на основе наночастиц оксида цинка клетки сформировавшегося 100%-го монослоя более устойчивы к токсическому действию препарата и характеризуются менее выраженными дегенеративными изменениями в сравнении с растущей клеткой. Наблюдалось увеличение активности ЛДГ в питательной среде в процессе разрушения клеточной мембраны под действием наночастиц цинка. При этом прослеживалось снижение ИП на 19,79% и КЖ на 7,73%.

Результаты изучения степени повреждения сформировавшегося 2-3-суточного монослоя клеток MDBK под действием наночастиц биоэлементов представлены на рисунках 5, 6.

Таким образом, из рисунков 5 и 6 видно, что наиболее высокий уровень ЛДГ при воздействии на сформировавшийся монослой клеток отмечается при воздействии наночастиц серебра в разведении 1:20, оксида цинка – 1:320, которые существенно отличаются от показателя в контроле.

Важно отметить, что в сформировавшемся 2-3-суточном монослое уровень активности ЛДГ при концентрации наночастиц серебра 1:80, оксида цинка – 1:640-1:1280 близок к уровню активности ЛДГ в контроле, что свидетельствует о большей устойчивости клеток в постоянных культурах.



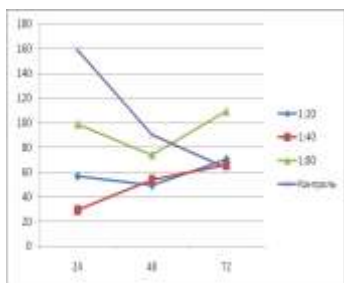


Рисунок 5 – Изменение уровня ЛДГ при внесении препарата на основе наночастиц серебра на сформировавшийся монослой клеток MDBK

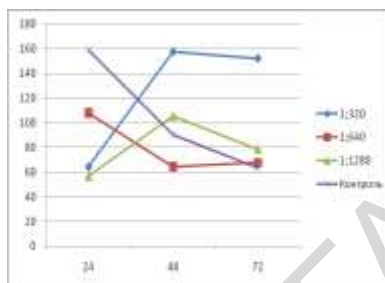


Рисунок 6 – Изменение уровня ЛДГ при внесении препарата на основе наночастиц оксида цинка на сформировавшийся монослой клеток MDBK

**Заключение.** Таким образом, исследования по изучению культурально-морфологических свойств культуры MDBK при экспозиции с препаратами наночастиц серебра и оксида цинка показали, что данные нанопрепараты оказывают негативное влияние на пролиферацию клеток и их жизнеспособность.

При увеличении концентрации препарата на основе наночастиц оксида цинка отмечается достоверное снижение индекса пролиферации на 19,79-26,94%, коэффициента жизнеспособности – на 7,72-13,29%; при повышении концентрации препарата на основе наночастиц серебра – ИП снижается в 1,09-4,76 раз, КЖ – на 9,25-54,48%. При воздействии нанопрепаратов в более высоких концентрациях уровень ЛДГ также был значительно выше, что свидетельствовало о повреждающем действии препаратов на перевиваемую линию клеток MDBK.

Кроме того, результаты проведенных исследований указывают на зависимость цитотоксического эффекта препаратов на основе наночастиц серебра и оксида цинка от возраста клетки и стадии роста, на которой находится клеточная популяция.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кобаяси, Н.И. Введение в нанотехнологию. – М.: Бинوم. Лаборатория знаний, – 2007. – 134 с.
2. Глушкова, А.В., Радиков, А.С., Рембовский, В.Р. Нанотехнологии и нанотоксикология – взгляд на проблему // «Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды». Материалы пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздравсоцразвития Российской Федерации под редакцией академика РАМН Ю.А. Рахманина, – Москва, 2007. – С. 20-27.
3. Генералов, М.Б. Криохимическая нанотехнология: Учеб. пособие для вузов. –М.: ИКЦ “Академкнига”, 2006. – 325 с.

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. Красочко<sup>1</sup>, Д.С. Борисовец<sup>1</sup>, А.Э. Станкуть<sup>1</sup>, М.С. Струк<sup>1</sup>,  
В.Л. Радько<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – РУП «Институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышелеского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> – 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.