ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 519.6+546.3+576.345

О. Л. Апихтіна, О. С. Саєга
ДУ «Інститут медицини праці НАМН України», м. Київ

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК МІДІ ТА ХЛОРИДУ МІДІ НА КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ЛЮДИНИ

У статті представлені результати дослідження цитотоксичної дії наночастинок міді та хлориду міді на культурах клітин людини А-549 та IMR-32. Встановлено, що цитотоксичний вплив сполук міді більш виражений на культуру клітин нейробластоми людини IMR-32. На культурі клітин А-549 встановлено істотна цитотоксична дія хлориду міді, що визначено в тесті з нейтральним червоним та обумовлено його вираженим негативним впливом на діяльність лізосомального апарату клітин.

Ключові слова: наночастинки міді, хлорид міді, культури клітин, цитотоксичність, IC50.

Робота є фрагментом НДР ««Наукове обґрунтування принципів, методів і показників експериментальної оцінки токсичності наночастинок і наноматеріалів (на прикладі важких металів)».

Нанотехнології та наноматеріали все ширше впроваджуються у промисловості, виробництві косметичних засобів, продуктів широкого вжитку. Наночастинки також широко застосовують у складі лікарських засобів. При цьому в організм людини надходять наночастинки різного хімічного складу з різними фізико-хімічними характеристиками. Розуміння механізмів їх впливу на організм людини дозволить раціонально та безпечно їх застосовувати, а також запобігти негативному впливу та розвитку інтоксикації.

Останнім часом проводяться розробки щодо можливостей застосування міді та її сполук у наноформі, у тому числі з лікувальною метою [6]. Мідь є ессенціальним елементів, що забезпечує належне функціонування організму людини. Проте, у разі надлишкового надходження міді в організм людини, а також при порушенні процесів її обміну можливий розвиток патологічного стану обумовлений її токсичним впливом [1]. Одна з найбільш відомих форм патологій обміну міді є гепатоцеребральна дистрофія або хвороба Вільсона-Коновалова. Це захворювання являє собою прогресуюче дегенеративне спадкове захворювання ЦНС, що поєднується з цирозом печінки [4].

У науковій літературі існує вкрай обмежена інформація щодо особливостей токсичної дії сполук міді у наноформі, а наявні результати досліджень досить різняться між собою. Це, у першу чергу, пов’язано із різноманітністю наночастинок міді, які можуть істотно різнитися між собою за фізико-хімічними властивостями. Зокрема, відзначалося, що наночастинки оксиду міді володіють високою цитотоксичністю у порівнянні із іншими наночастинками металів [3]. Вченими було виявлено, що наночастинки CuO, які викликають гостру токсичність для мишей, викликали значний набряк легенів та смерть тварин протягом 24 год [5, 7].

З усього вище згаданого, перспективи використання нанотехнологій у промисловості, побуті, а також для цільового надходження у складі лікарських препаратів зобов'язують дослідників прискіпливо вивчати питання, пов'язані з їх токсичністю.

Метою роботи було порівняльна оцінка цитотоксичної дії наночастинок міді та хлориду міді на культури клітин людини ліній А-549 та IMR-32.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проводились на постійних клітинних лініях людини: недрібноклітинного раку легені –А-549 та клітинах нейробластоми людини – лінія IMR-32. Клітини культивували в повному поживному середовищі RPMI-1640, що містило 2 мМоль/л L-глютаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину («SIGMA», США) у зволоженій атмосфері з 5 % CO2 при 37 °С. Заміну середовища проводили кожні 2-3 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину Версена при утворенні клітинами на субстраті суцільного моношару (4–5 доба росту). Усі клітинні лінії отримані з Клітинного Банку ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР імені Р. Є. Кавецького НАН України.

Для оцінки цитотоксичної дії сполук міді суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети у концентрації 1,5х105 клітин на лунку. Через 24 години інкубації за стандартних умов при температурі вносили досліджувані речовини хлориду (II) міді та наночастинок міді (розмір 20 нм, сферична форма) у деіонізованій воді в широкому діапазоні концентрацій від 0,0000064 моль/л до 0,5 моль/л. Клітини експонували сполуками міді за стандартних умов 24 години, після чого

проводили оцінку цитотоксичної дії у МТТ-тесті (оцінка активності мітохондріальних дегідрогеназ), тесті з сульфородаміном В (оцінка вмісту загального білку в клітинах) та тесті з барвником нейтральним червоним (оцінка лізосомальної активності та проникності мембран) [2].

Статистичний аналіз проведено за U-критерієм Манна-Уітні, з достовірною різницею між показниками на рівні $P < 0,05$. Величину IC50 (концентрація досліджуваної речовини, яка викликає зниження на 50% показника життєдіяльності клітин порівняно із інтактними клітинами) визначали методом пробіт-аналізу.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження показників цитотоксичної дії наночастинок міді та хлориду міді на культурі клітин А-549 показало, що при їх експозиції у концентраціях від 0,0000064 моль/л до 0,5 моль/л були однаково задіяні основні ланки патологічного процесу в клітинах: порушення функціонування мітохондрій, лізосомального апарату та синтезу білка (рис.1, рис. 2), виявлених у ММТ-тесті (МТТ), тесті з нейтральним червоним (НЧТ) та тесті із сульфородаміном В (СРТ). Проте найбільш істотні зміни були виявлені у тесті з нейтральним червоним за дії як наночастинок міді, так і хлориду міді, що обумовлено їх впливом на проникність мембран лізосом.

При експозиції клітин лінії А-549 хлоридом міді за концентрації від 0,0000064 моль/л до 0,5 моль/л, середнє значення відсоткової виживаності складало від 83 % до 25 %. За тих же концентрацій життєздатність клітин при додаванні наночастинок міді спостерігалася від 85% до 36 %.

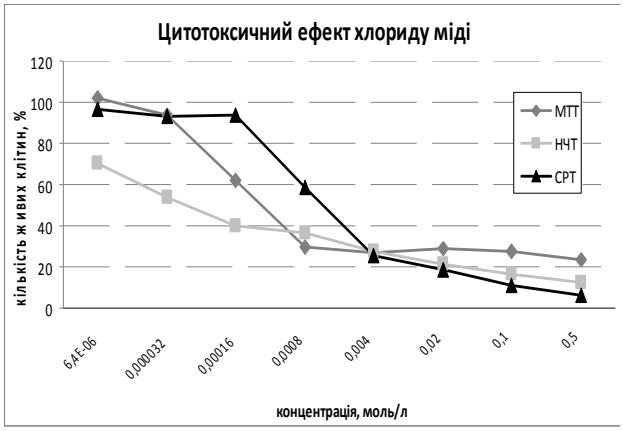

Рис. 1. Порівняння показників цитотоксичності хлориду міді, встановлених за допомогою трьох тестів для клітин лінії А-549.

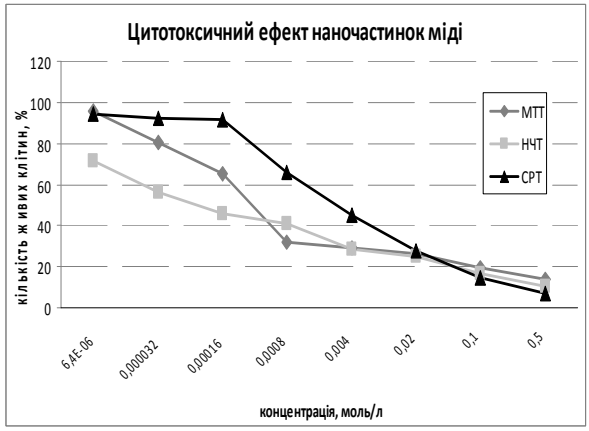

Рис. 2. Порівняння показників цитотоксичності наночастинок міді, встановлених за допомогою трьох тестів для клітин лінії А-549.

При вивченні цитотоксичного впливу сполук міді в культурі клітин IMR-32 спостерігалася більш виражена цитотоксична дія у порівнянні з впливом на культуру А-549, що відображався у інтенсивному зниженні життєдіяльності клітин (рис. 3, рис. 4). Показники виживаності клітин, визначені трьома тестами, змінювалися однонаправлено.

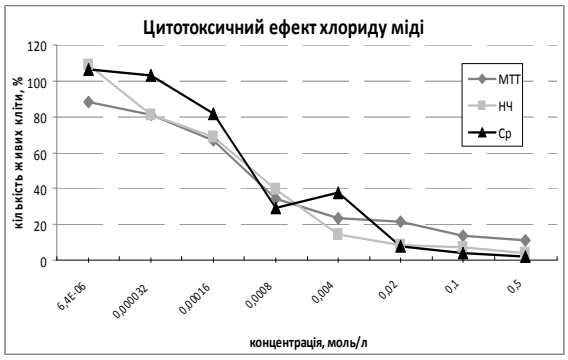

Рис. 3. Порівняння показників цитотоксичності хлориду міді, встановлених за допомогою трьох тестів для клітин лінії IMR-32.

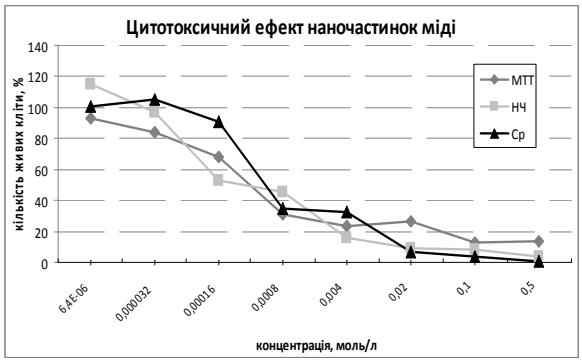

Рис. 4. Порівняння показників цитотоксичності наночастинок міді, встановлених для клітин культури IMR-32.

За даними регресійного аналізу при розрахунку величини IC50 встановлено, що клітини лінії IMR-32 були більш чутливими до дії наночастинок міді та хлориду міді порівняно із клітинами ліні А-549. Цитотоксичний вплив хлориду міді та наночастинок міді на клітини лінії IMR-32 проявлявся однаковою мірою на функціонування мітохондрій, лізосомальний апарат клітини та на біосинтез білка. Для лінії клітин А-549 встановлено, що найбільшу цитотоксичну

дію проявляв хлорид міді. Це визначено в тесті з нейтральним червоним та обумовлено його вираженим негативним впливом на діяльність лізосомального апарату клітин (табл.).

Таблиця

Показники IC50 для культури клітин лінії А-549 та лінії IMR-32 при експозиції хлоридом міді та наночастинками міді (моль/л)

Досліджувані речовини	МТТ	НЧТ	СРТ
для культури клітин лінії А-549			
Хлорид (II) міді	0,002	8,13	0,002
Наночастинки міді	0,001	0,0001	0,003
для культури клітин лінії IMR-32			
Хлорид (II) міді	0,00061	0,00054	0,00105
Наночастинки міді	0,00081	0,00063	0,00117

Висновки

1. Таким чином, у результаті проведеного експерименту було доведено, що сполуки хлориду міді та наночастинок міді здійснюють токсичний ефект на основні процеси життєдіяльності клітини, а саме синтез білку, роботу лізосомального апарату та мітохондріальних дегідрогеназ. Відмічається, що цитотоксичний вплив сполук міді більш виражений на культуру клітин нейробластоми людини IMR-32. Це може вказувати на певну органоспецифічну їх дію та можливість розвитку нейротоксичних ефектів у цілісному організмі.
2. У той же час, для лінії клітин А-549 встановлено, що найбільшу цитотоксичну дію проявляв хлорид міді, що визначено в тесті з нейтральним червоним та обумовлено його вираженим негативним впливом на діяльність лізосомального апарату клітин.

Перспективи подальших досліджень *з даної проблеми полягають у комплексній оцінці особливостей токсичної дії наночастинок міді на моделях in vitro та in vivo.*

Список літератури

1. Авцын А.П. Микроэлементозы человека. Этиология, классификация, органопатология / А. П. Авцын // – М.:Медицина, -1991. – 496 с.
2. Трахтенберг І. М. Методичні рекомендації «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів»: розроб // І. М. Трахтенберг, З. Р. Ульберг, І. С. Чекман // – Київ, - 2013. – С. 19 – 25.
3. Aruoja V. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO2 to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata / V. Aruoja, H.C. Dubourguie, K. Kasemets [et.al.] // Sci. Total Environ. – 2009. – Vol. 407. – P.1461–1468.
4. Ashish Badiye Copper Toxicity: A Comprehensive Study / Badiye Ashish, Kapoor Neeti, Khajuria Himanshu // Research Journal of Recent Sciences. – 2013. – Vol. 2. – P. 58-67.
5. Chen Z. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo / Z. Chen, H. Meng, G. Xing [et. al.] // Toxicol Lett. – 2006. – Vol. 163. – P. 109–120.
6. Cho W.S. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing / W.S. Cho, R. Duffin, C.A. Poland [et. al.] // Environ Health Perspect. – 2010. – Vol. 118. – P. 1699–1706.
7. Yokohira M. Lung toxicity of 16 fine particles on intratracheal instillation in a bioassay model using f344 male rats / M. Yokohira, T. Kuno, K. Yamakawa [et al.] // Toxicol Pathol. – 2008. – Vol. 36. – P. 620–631.

Реферати

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ХЛОРИДА МЕДИ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Апыхтина А. Л., Сапега А. С.

В статье представлены результаты исследования цитотоксического действия наночастиц меди и хлорида меди на культурах клеток человека А-549 и IMR-32. Установлено, что цитотоксическое влияние соединений меди более выраженно на культуру клеток нейробластомы человека IMR-32. На культуре клеток А-549 установлено существенное цитотоксинческое действие хлорида меди, что определено в тесте с нейтральным красным и обусловлено его выраженным негативным влиянием на деятельность лизосомального аппарата клеток.

Ключевые слова: наночастицы меди, хлорид меди, культуры клеток, цитотоксичность, IC50.

Стаття надійшла 17.02.2015 р.

COMPARATIVE EVALUATION OF CYTOTOXIC ACTION OF NANOPARTICLES OF COPPER CHLORIDE AND MEDIA RIGHTS TO CULTURE CELLS

Apyhtina O. L., Sapieha A.

The study presents cytotoxic effect of copper nanoparticles and copper chloride on cell cultures of human A-549 and IMR-32. We established the cytotoxic effect of copper is more pronounced in cell culture of human neuroblastoma IMR-32. It was found a significant cytotoxic effect of copper chloride, which is defined in the test with neutral red due to its negative effect on the activity of the lysosomal system cells in cell culture A-549.

Key words: copper nanoparticles, copper chloride, cell culture, cytotoxicity, IC50.

Рецензент Старченко І.І.