

УДК : 619:620.3

**П. А. КРАСОЧКО\***, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор

**С. А. ЧИЖИК\*\***, доктор технических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси.

**А. Л. ХУДОЛЕЙ\*\***, кандидат технических наук

**М. С. СТРУК\***,

**Е. С. ДРОЗД\*\***

*\*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии*

*им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь*

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

### **ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ЦИНКА С ПЕРЕВИВАЕМЫМИ КЛЕТКАМИ МДБК**

*Приведены результаты изучения взаимодействия наночастиц окиси цинка с перевиваемой культурой клеток почки теленка МДБК с помощью атомно-силовой микроскопии. Установлено, что наночастицы окиси цинка (ZnO) уменьшают упругость клеток, на поверхности клеток обнаруживаются углубления – поры, что свидетельствует о повреждении клеток.*

*Ключевые слова: наночастицы, цинк, культуре клеток, атомно-силовая микроскопия.*

В последнее время внедрение нанотехнологий развивается исключительно быстрыми темпами. 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 окиси цинка, серебра и меди.

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 апополипротеины. Так же 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.

В этой связи, целью настоящих исследований было изучение взаимодействия наночастиц окиси цинка с перевиваемой культурой клеток почки теленка МДБК с помощью атомно-силовой микроскопии.

### **Материалы и методы.**

Объектом исследований служили наночастицы окиси цинка, 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 и то, что суспензия наночастиц была устойчива по отношению к образованию конгломератов и седиментации (оседанию) путем добавления поверхностно активных веществ и водорастворимых полимеров. Так же использовалась дисперсионная среда, совместимая с физиологическими жидкостями организма животного.

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

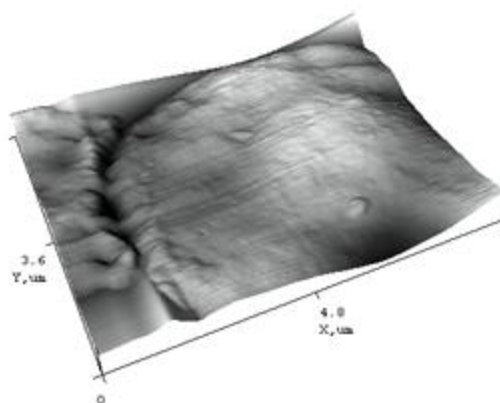
Для получения образцов клеток пригодных для АСМ-исследования применяли химическую фиксацию. Для этого к культуре клеток добавляли раствор наночастиц цинка и инкубировали их в течении 20 минут. В данном эксперименте применялся раствор наночастиц разведенный 1:5 (100 мг/мл) раствором Хэнкса. После клетки 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 высушивании на воздухе при комнатной температуре.

Изучение взаимодействия наночастиц цинка проводилось 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 использованы кремниевые зонды («MikroMasch» Co, Эстония) NSC11 с константой жесткости 3 Н/м.

### Результаты исследований.

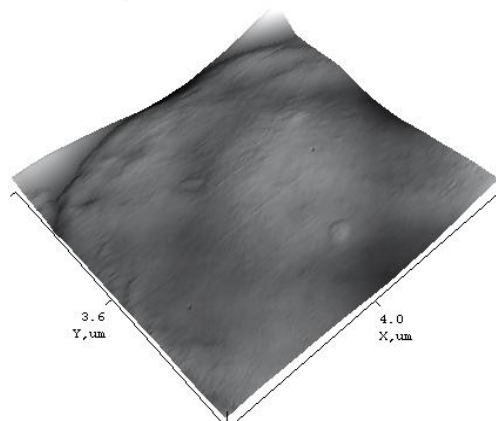
Проведены исследования топографии поверхности клеток MDBK методом атомно-силовой микроскопии. На рисунке 1 представлены 3-хмерное изображение и топография поверхности клетки линии MDBK, полученные с помощью атомно-силового микроскопа. Были получены следующие изображения топографии поверхности клеток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

X: 9.5um Y: 7.1um Z: 556.5nm [1.7:11]  
Ra: 64.7nm Rq: 81.1nm



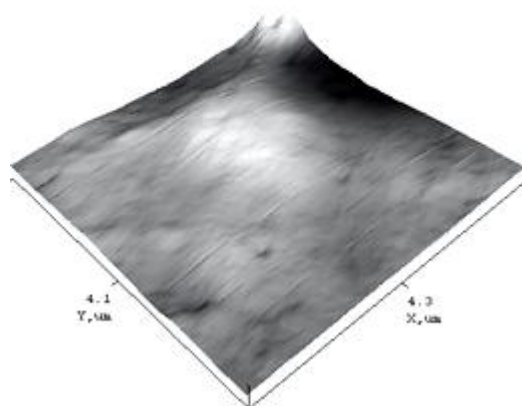
а)

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



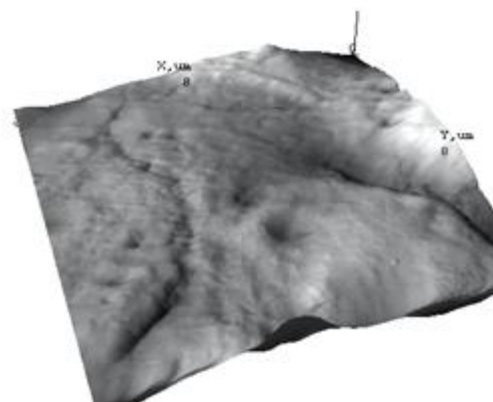
б)

X: 8.6um Y: 8.1um Z: 1.1um [0.8:1]  
Ra: 0.1um Rq: 0.2um



в)

X: 17.0um Y: 17.0um Z: 2.8um [1.0:1]  
Ra: 0.2um Rq: 0.2um

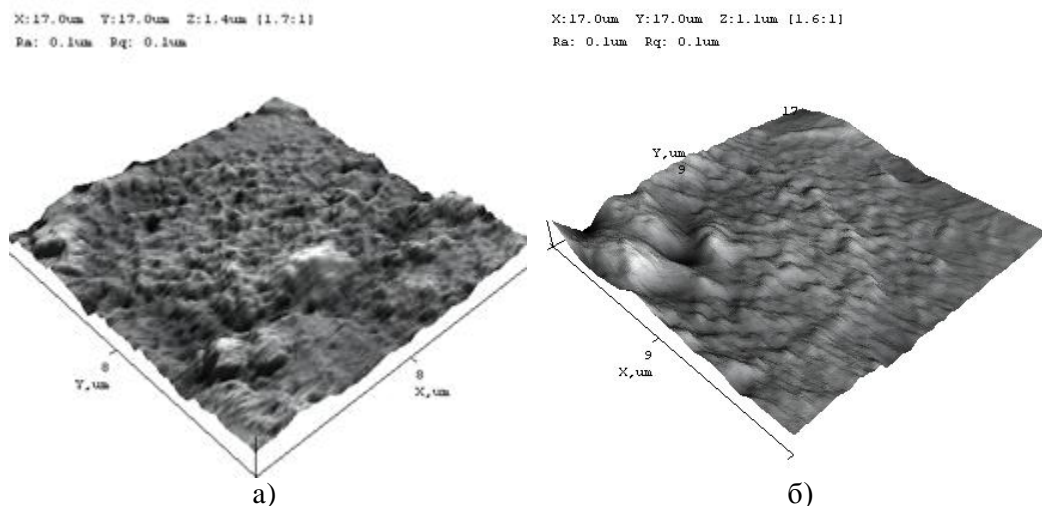


г)

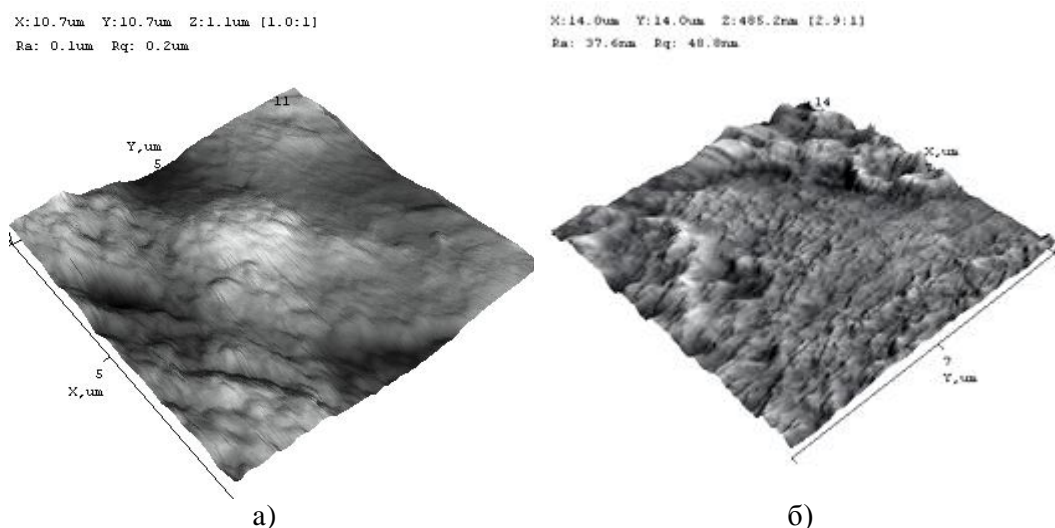
Рисунок 1. – Трехмерное АСМ-изображение поверхности клеток почки быка до инкубации их с наночастицами; а - область сканирования  $9,5 \times 7,1 \text{ мкм}^2$ ; б - область сканирования  $7,9 \times 7,2 \text{ мкм}^2$ ; в - область сканирования  $8,6 \times 8,1 \text{ мкм}^2$ ; г - область сканирования  $17 \times 17 \text{ мкм}^2$ .

Как видно из рисунка 1, поверхность клеток ровная, без явно выраженных выступов и впадин и пор.

После 20 минут инкубации с наночастицами окиси цинка были получены следующие результаты (Рис. 2 и 3).



**Рисунок 2. – Трехмерное АСМ-изображение поверхности клеток почки быка после 20 мин инкубации их с раствором наночастиц окиси цинка; а - область сканирования 17x17 мкм<sup>2</sup>; б - область сканирования 17x17 мкм<sup>2</sup>**



**Рисунок 3. – Трехмерное АСМ-изображение поверхности клеток почки быка после 20 мин инкубации их с раствором наночастиц окиси цинка; а - область сканирования 10,7x10,7 мкм<sup>2</sup>; б - область сканирования 14x14 мкм<sup>2</sup>**

Анализируя рисунки 2 и 3 можно заметить, что наночастицы окиси цинка ZnO оказывают влияние на клетки – на поверхности клеток обнаруживаются углубления - поры.

Так же с помощью атомно-силового микроскопа были изучены упругие характеристики клеток, которые показали, что проникновение наночастиц окиси цинка (ZnO), уменьшается их упругость на два порядка. Исходя из расчетов модуля упругости и анализа трехмерных изображений клеток после 20 мин их инкубации с наночастицами ZnO можно предположить, что, в данном случае, происходит сильное повреждение клеток. Но не стоит забывать, что цитотоксичность может зависеть не только от физической природы, способа получения, размеров, структуры наноразмерных частиц, но 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. Однако полноценно эксплуатировать преимущества, которые сулит применение нанотехнологий в биологии и медицине, можно только адекватно оценив связанные с наноматериалами опасности и приняв соответствующие меры по защите.

**ASSESSMENT OF INTERACTION OF NANOPARTICLES OF ZINC WITH INTERTWINED CAGES МДБК / Krasochko P. A., Chigik S. A., Hudoley A. L., Struk M. S., Drosd E. S.**

*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.*

*Key words: nanoparticles, zinc, culture of cages, nuclear and power microscopy.*

**Рецензент – доктор ветеринарных наук В. Л. Коваленко.**