

УДК: 547.6+546.23:544.77

DOI: 10.31073/vet_biotech38-14

ЦИГАНОВИЧ О.А.^{1,2}, канд. хім. наук, e-mail: elena_tsyganov@ukr.net,**ДИБКОВА С.М.**¹, канд. біол. наук, e-mail: sdybkova@gmail.com,**СІРИК О.О.**^{1,3}, канд. хім. наук, e-mail: olena.siryk38@gmail.com,**ГОЛОДЮК О.П.**¹, e-mail: golodyk91@ukr.net,**ПРОКОПЕНКО В.А.**^{1,2}, д-р техн. наук, e-mail: prokop_va@ukr.net,**ЖОВНІР О.М.**³, канд. вет. наук, e-mail: Zhovnir73@ukr.net¹Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України²Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»³Інститут ветеринарної медицини НААН

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ТА ГЕНОТОКСИЧНОСТІ НАНОЧАСТИНОК СЕЛЕНУ, СТАБІЛІЗОВАНИХ ПОЛІВІНІЛПРОЛІДОНОМ

У статті викладений аналіз результатів оцінки in vitro безпечності наночастинок селену отриманих відновленням селенітної кислоти аскорбіновою кислотою в присутності полівінілпролідону як стабілізатора. Одержані три препарати сферичних наночастинок селену розміром до 100 нм. Дослідження цитотоксичності здійснювали методом оцінки життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього, генотоксичності – методом ДНК-комет. Виконані дослідження щодо оцінки біобезпечності наночастинок селену, свідчать про відсутність цитотоксичного та генотоксичного впливу досліджуваних препаратів на тестові клітини перещеплювальної культури клітин нирки телят.

Ключові слова: нанорозмірні частинки селену (SeNP), цитотоксичність, генотоксичність.

Вступ. Не зважаючи на інтенсивний розвиток нанобіотехнологій, зустрічаються одиничні публікації щодо використання наночастинок селену (SeNP) для створення ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ). Завдяки своїм розмірам та нижчій токсичності, порівняно з органічними та неорганічними формами, наноселен знайшов широке застосування в медичних цілях. На відміну від наночастинок більшості металів селен сам володіє досить високою біологічною активністю, проведені дослідження якої показали, що антиоксидантні, протизапальні, антиканцерогенні, антимуtagenні, імуномодулюючі, гепатопротекторні та інші властивості наноселену можуть змінюватися залежно від способу одержання, стабілізації, розміру та форми [1, 2].

Колоїдний селен здатен посилювати імунну відповідь на вакцинацію навіть при застосуванні в якості кормової добавки. Дослідження показало посилення активності антиоксидантних ферментів, а також значне підвищення титрів антитіл після імунізації бройлерів ND-вакциною, які отримували SeNP в якості нанонутрицевтика, порівняно з особами, які не отримували селен [3]. В імунобіологічних засобах наночастинки можуть виступати в якості ад'юванта або каталізатора метаболічних процесів у клітинах виробничих штамів мікроорганізмів [4]. Дослідження імуногенних властивостей вакцини з наночастинками селену в якості носія антигенів штаму *Escherichia coli* Б-5 показали, що колоїдний селен стимулює вироблення антитіл [5]. Також було встановлено, що імунізовані селенвмісним препаратом тварини показують більш високий рівень виживання порівняно з контрольною групою. Імунізація морських свинок препаратом на основі SeNP, кон'югованих з антигеном вірусу трансмісивного гастроентериту свиней, приводить до активації дихальної активності лімфоцитів та перитонеальних макрофагів, що напряму пов'язано з активацією продукції антитіл, а також стимулює вироблення протизапальних цитокінів [6].

Таким чином, очевидна перспектива широкого використання нанорозмірних частинок селену у ветеринарній практиці, однак, через відсутність наукових досліджень у питаннях їх біобезпеки, постановка наукових досліджень цито- і генотоксичності таких наноматеріалів є актуальною та сучасною.

Мета роботи. Визначити біобезпечність перспективних наночастинок селену для використання у біотехнології виготовлення ВІЗ.

Матеріали і методи досліджень. Наночастинки селену синтезовані в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України у вигляді золів. Синтез SeNP проводили шляхом відновлення селенітної кислоти аскорбіною кислотою в присутності стабілізатора – полівінілпіролідону. Виготовляли три золі зі сферичними наночастинками селену з різною концентрацією за селеном: № 1 – 0,05 ммоль/л; препарат № 2 – 0,5 ммоль/л; № 3 – 0,25 ммоль/л. Візуалізацію синтезованих наночастинок селену виконували із залученням обладнання та фахівців Центру колективного користування електронними мікроскопами (ЦККЕМ) НАН України Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України методом трансмісійної електронної мікроскопії із використанням мікроскопу JEM-1230 («JEOL», Японія).

Тест-об'єктом при оцінці цитотоксичної та генотоксичної дії трьох препаратів наночастинок селену виступала культура клітин нирки теляти MDBK. Клітини MDBK вирощували на середовищі DMEM із 7% вмістом FBS (фетальної бичачої сироватки; Sigma) та з додаванням антибіотика Antibiotic-

Antimycotic («BIO West»). Клітини нарощували в атмосфері з 5% CO₂ при 37°C. В роботі використані: середовище DMEM («SIGMA»), трипсин («SIGMA»), ЕДТА («SIGMA»), ембріональна теляча сироватка (ETC) («SIGMA»), Antibiotic-Antimycotic (BIO West), розчин версену, 0,4% розчин барвника трипанового синього.

Оцінку цитотоксичності та генотоксичності наночастинок селену здійснювали згідно методичних рекомендацій «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджених Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України [7]. Оцінку цитотоксичності SeNP здійснювали *in vitro* методом оцінки життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього. Підрахунок живих (незабарвлених) і мертвих (забарвлених) клітин проводили під світловим мікроскопом в камері Горяєва. Розраховували частку живих клітин та визначали параметр цитотоксичності – загибель 50% клітин (IC₅₀).

Для оцінки генотоксичності наночастинок селену використовували метод ДНК-комет в лужних умовах *in vitro* [8, 9], суть якого полягає у реєстрації відмінностей в електрофоретичній рухливості ДНК і її фрагментів лізованих клітин у постійному електричному полі. ДНК мігрує до аноду, формуючи електрофоретичний слід, що нагадує «хвіст комети», параметри якого залежать від рівня пошкодження піддослідної ДНК. Як позитивний контроль використовували клітини культури MDBK, оброблені мутагеном позитивного контролю – N-нітрозометилсечовиною в концентрації 1 мМ протягом 18 годин. Як негативний контроль використовували інтактні клітини, нарощені при температурі 37°C протягом 24 годин. Аналіз «ДНК-комет» проводили візуально, розподіляючи на п'ять умовних типів з відповідним для кожного числом від 0 до 4. Ступінь пошкодження ДНК при цьому виражали як індекс «ДНК-комет» (І_{ДНК}), обчислений за формулою:

$$I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma, \text{ де}$$

n_0 - n_4 – число «ДНК-комет» кожного типу,

Σ – сума «ДНК-комет».

Статистичну оцінку результатів проводили, порівнюючи показники пошкодження ДНК в піддослідній та контрольній групах. Дані двох повторностей поєднували і визначали середній показник групи. Критеріями позитивного результату були статистично достовірні високі (близькі до позитивного контролю) показники пошкодження ДНК або статистично достовірний відтворений ефект.

Досліджували цитотоксичну та генотоксичну дію трьох препаратів наночастинок селену у наступних розведеннях: 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100.

Результати досліджень та їх обговорення. Морфологічні характеристики синтезованих SeNP визначали за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. На рис. 1 видно, що наночастинки мають сферичну форму. Встановлено, що в зразку № 1 частинки мають розмір 20–80 нм, № 2 – 70–90 нм, а № 3 – 80–90 нм.

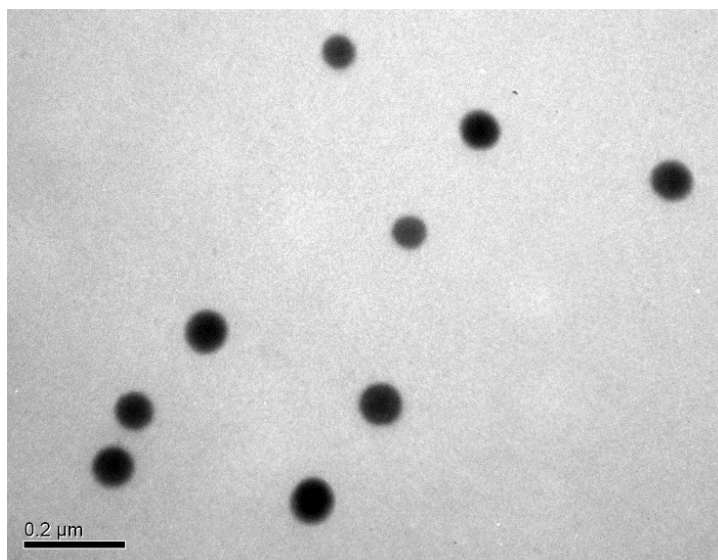


Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення наночастинок селену (препарат № 3).

Результати досліджень цитотоксичності трьох препаратів наночастинок селену на тестових клітинах MDBK методом оцінки життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього представлені в таблиці 1.

Як видно з таблиці 1, у середовищі культивування тестових клітин спостерігали значну кількість живих клітин, навіть при розведенні 1:5. При розведенні 1:50 виживаність клітин з препаратами №2 та №3 становила 99%. Загалом виявлені частки живих клітин свідчать про безпечність досліджених наночастинок селену.

Наступним етапом дослідження біобезпечності нанопрепаратів селену, перспективних для виробництва ветеринарних імунобіологічних засобів, була оцінка генотоксичності SeNP методом ДНК-комет. Результати досліджень генотоксичності трьох препаратів наночастинок селену у 50-му розведенні на тестових клітинах MDBK представлені у таблиці 2. З наведених результатів тестувань генотоксичності *in vitro* всі досліджені препарати наночастинок селену не генотоксичні.

Таблиця 1

Показники цитотоксичності (% живих клітин) зразків SeNP для культури клітин нирки телят MDBK

Препарат, розведення	% живих клітин
Контроль	97±1
Препарат №1	
1:5	96±1
1:10	94±2
1:20	93±2
1:50	94±1
1:100	95±2
Препарат №2	
1:5	92±1
1:10	98±1
1:20	98±2
1:50	99±1
1:100	99±1
Препарат №3	
1: 5	94±1
1:10	98±1
1:20	98±2
1:50	98±1
1:100	98±1

Примітка: результати вірогідні, $p < 0,05$.

Таблиця 2

Таблиця генотоксичності тестованих препаратів наночастинок селену

Препарат, розведення	Показник генотоксичності «ІДНК»	Висновок про генотоксичність
Контроль негативний	0,019±0,001	Не генотоксичний
Контроль позитивний	3,25±0,02	Генотоксичний
Препарат №1		
1:50	0,012±0,001	Не генотоксичний
Препарат №2		
1:50	0,015±0,001	Не генотоксичний
Препарат №3		
1:50	0,014±0,001	Не генотоксичний

Примітка: результати вірогідні, $p < 0,05$.

Заслужують уваги результати щодо нижчих показників «ІДНК» зразків, оброблених наночастинами селену та необроблених зразків. Це може свідчити про протективну роль наночастинок селену для еукаріот.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Виконані дослідження щодо оцінки біобезпечності трьох зразків наночастинок селену, шляхом встановлення цитотоксичності методом аналізу життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього та генотоксичності, методом ДНК-комет, свідчать про відсутність цитотоксичного та генотоксичного впливу досліджуваних препаратів на тестові клітини перещеплювальної культури клітин нирки телят MDBK. Отже синтезовані препарати селену в дослідженому діапазоні є безпечними та біосумісними для тварин і людини та можуть бути використані для розробки експериментальних зразків ВІЗ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hosnedlova B. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review / B. Hosnedlova, M. Kepinska, S. Skalickova [et al.] // International journal of nanomedicine. – 2018. – Vol. 13. – P. 2107–2128.
2. Khurana A. Therapeutic applications of selenium nanoparticles / A. Khurana, S. Tekula, M.A. Saifi [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2019. – Vol. 111. – P. 802–812.
3. Azab D.M. Antioxidant and immunomodulatory effects of nano-selenium on response of broilers to ND vaccine / D.M. Azab, H.S. El-Sayed, A.S. El-Habbaa // Assiut Veterinary Medical Journal. – 2019. – Vol. 65. – №. 161. – 174–185.
4. Горбатюк О.І. Вплив наночастинок металів на активізацію метаболічних процесів у клітинах *C. perfringens* тип А / О.І. Горбатюк, В.О. Андріяшук, Г.Ф. Риженко [та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2017. – №. 30. – С. 47–56.
5. Габалов К.П. Использование наночастиц селена в качестве наноносителя лекарственных веществ и антигенов на примере адьюванта при иммунизации животных против колибактериоза / К.П. Габалов, О.С. Видягина, М.В. Рюмина [и др.] // Ветеринарная патология. – 2016. – №3. – С. 31–38.
6. Меженный П.В. Изучение иммуногенных свойств наночастиц селена и золота, конъюгированных с антигеном вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней / П.В. Меженный, С.А. Староверов, А.А. Волков [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1. – 1965 с.
7. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів: методичні рекомендації / І.М. Трахтенберг, З.Р. Ульберг, І.С. Чекман та ін. – Київ, 2013. – 108 с.
8. Didenko V.V. Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols. // Edited by V.V. Didenko. – 2002. – Vol. 203. – 299 p.
9. Патент України на корисну модель МПК (2009.01) G01N33/00 G01N33/48. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів / С.М. Дибкова, О.В. Годовський, М.Є. Романько [та ін.] // Заявл.10.09.2009; Опубл. 25.03.2010; Бюл. № 6. – 10 с.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ГЕНОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНОМ / Циганович Е.А., Дыбкова С.Н., Сирык Е.А., Голодюк А.П., Прокопенко В.А., Жовнир А.М.

В статье изложен анализ результатов оценки in vitro безопасности наночастиц селена полученных восстановлением селенитной кислоты аскорбиновой кислотой в присутствии поливинилпирролидона в качестве стабилизатора. Получены три препарата сферических наночастиц селена размером до 100 нм. Исследование цитотоксичности осуществляли методом оценки жизнеспособности клеток с включением витального красителя трипанового синего, генотоксичности – методом ДНК-комет. Выполненные исследования по оценке биобезопасности наночастиц селена, свидетельствуют об отсутствии цитотоксического и генотоксического воздействия исследуемых препаратов на тестовые клетки перевиваемой культуры клеток почки телят.

Ключевые слова: наноразмерные частицы селена (SeNP), цитотоксичность, генотоксичность.

ESTIMATION OF CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF SELENIUM NANOPARTICLES STABILIZED WITH POLYVINYLPIRROLIDONE / Tsiganovich E.A., Dybkova S.N., Sirik E.A., Golodyuk A.P., Prokopenko V.A., Zhovnir A.M.

Introduction. *Selenium nanoparticles (SeNP) have high biological activity, which depends on the synthesis method, stabilization, particle size and shape. Colloidal selenium is able to enhance the immune response to vaccination when used as a feed additive. In vaccines composition SeNPs lead to increased production of antibodies and anti-inflammatory cytokines, respiratory activity of lymphocytes and peritoneal macrophages and survival of animals.*

The goal of the work *was to determine the biosafety of promising SeNPs for their using in the biotechnology of veterinary immunological means.*

Materials and methods. *SeNP synthesis performed by reducing selenic acid with ascorbic acid in the presence of polyvinylpyrrolidone. Three sols with SeNP with different selenium concentrations were made: № 1 – 0.05; № 2 – 0.5; № 3 – 0.25 mmol/l. The test object in evaluation toxic effects was the calf kidney cell culture (MDBK). SeNP cytotoxicity was assessed in vitro by cell viability with trypan blue dye. Genotoxicity estimation in vitro has been analyzed by the method of DNA comets in alkaline conditions.*

Results and discussions. *Morphological characteristics of SeNPs determined by electron microscopy. It was found that in the sample № 1 spherical particles have a size of 20-80 nm, № 2 – 70-90 nm and № 3 – 80-90 nm.*

The results of cytotoxicity studies on test cells showed that at a dilution of 1:50 the survival rate of cells in samples №2 and №3 were 99%. Obtained results of genotoxicity studies showed that SeNP samples in dilution 1:50 were not genotoxic and may have a protective effect.

Conclusions and prospects for further research. *Studies performed to evaluate biosafety of SeNPs indicate the absence of cytotoxic and genotoxic effects on test cells. Therefore, the synthesized SeNPs are safe and biocompatible and can be used for manufacturing of experimental veterinary immunological means.*

Keywords: *selenium nanoparticles (SeNP), cytotoxicity, genotoxicity.*

REFERENCES

1. Hosnedlova, B., Kepinska, M., Skalickova, S., et al. (2018). Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *International journal of nanomedicine*, 13, 2107-2128.
2. Khurana, A., Tekula, S., Saifi, M. A., et al. (2019). Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 802-812.
3. Azab, D.M., El-Sayed, H.S., El-Habbab, A.S. (2019). Antioxidant and immunomodulatory effects of nano-selenium on response of broilers to ND vaccine. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 65(161), 174-185.
4. Gorbatiuk, O.I., Andriyashchuk, V.A., Ryzhenko, G.F., et al. (2017). Vplyv nanochastynok metaliv na aktyvizatsiiu metabolichnykh protsesiv u klitynakh C. perfringens typ A. [The effect of metals nanoparticles on activation of metabolic processes in cells C. perfringens type A]. *Veterynarna biotekhnologiya – Veterinary biotechnology*, 30, 47-56 [in Ukrainian].
5. Gabalov, K.P., Vidyagina, O.S., Ryumina, M.V., et al. (2016). Ispol'zovanie nanochastic selen v kachestve nanonositelja lekarstvennykh veshchestv i antigenov na primere adjuvanta pri immunizacii zhivotnykh protiv kolibakterioza [Using of selen nanoparticles as adjuvant in immunization animal against colibacillosis]. *Veterinarnaja patologija – Veterinary pathology*, 57(3), 31-38 [in Russian].
6. Mezheny, P.V., Staroverov, S.A., Volkov, A.A., et al. (2015). Izucheniye immunogennykh svoystv nanochastits selen i zolota, konyugirovannykh s antigenom virusa transmissivnogo gastroenterita sviney [The study of the immunogenic properties of selenium and gold nanoparticles conjugated with the antigen of the transmissible gastroenteritis virus of pigs]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya – Modern problems of science and education*, 1, 1965 [in Russian].
7. Trachtenberg, I.M., Ulberg, Z.R., Chekman, I.S., et al. (2013). Ocinka bezpeki likarskich nanopreparativ: Metodychni rekomendacii [Safety assessment of drugs nanopreparation: Guidelines]. Kyiv [in Ukrainian].
8. Didenko, V.V. (Eds.) (2002). *In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols: Methods in Molecular Biology*. (Vol. 203). Totowa, New Jersey: Humana Press.
9. Dybkova, S.M., Hodovskyi, O.V., Romanko, M.Y., et al. Sposib ocinki genotoxychnykh vlastyvostey nanomaterialiv [Method for evaluation of genotoxic properties of nanomaterials]. *Patent UA on useful model MPK (2009.01) G01N33/00 G01N33/48 2010*.