

Розділ 8. Біотехнологія

УДК 576.535:575:[546.57+546.47] — 022.532

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУБЛІНІЇ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН FLK 50/100 ПІД ВПЛИВОМ НАНОЧАСТОК АРГЕНТУМУ ТА ЦИНКУ

Стегній М.Ю., Магац Д.Ю., Юрченко О.М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

У статті розглядається експериментальне вивчення біологічних ефектів дії наночастинок на біооб'єкти та оцінка їх впливу на генетичний апарат. Метою досліджень було визначення впливу наночастинок Аргентуму та Цинку на цитогенетичні показники сублінії перещеплюваної культури клітин FLK 50/100, яка використовується для виготовлення лейкозного антигену.

За результатами цитогенетичних досліджень за методом С.Е. Мамаєвої сублінії перещеплюваної культури клітин FLK 50/100 виявлено зміну варіації розмаху хромосом відносно до контролю та зниження модального класу від 68 (контроль) до 54-56 (Zn 1:20). Цитологічний контроль мітотичної активності клітин FLK 50/100 показав достовірне зниження під впливом наночастинок Цинку у двох розведеннях від загальної концентрації та при дії наночастинок Аргентуму в розведенні 1 до 20. У той час, як під впливом наночастинок Аргентуму в концентрації 1:100 відмічали достовірне зростання МА в першу добу відповідно до контролю, то при цьому відсоток патологічних мітозів знижувався не менш ніж у два рази на 3 та 4 добу дії наночастинок.

Ключові слова: наночастки, культура клітин flk (fetal lamb kidney), мітотична активність, цитогенетичні показники.

Швидкий розвиток нанотехнологій відкриває широкі горизонти отримання речовин з принципово новими властивостями для використання в гуманній та ветеринарній медицині з однієї сторони, а з іншої – викликає занепокоєння у зв'язку з потенційним ризиком наночастинок для здоров'я людини, тварин і навколишнього середовища [1].

Термін «нанотехнологія» (процес розділення, складання та змінення матеріалів шляхом впливу на них одним атомом чи молекулою, при цьому розмір наномеханізму не повинен перевищувати одного мікрону або 100 нанометрів) був введений професором Токійського наукового університету Норіо Танігучи ще у 1974 році [11]. Наноматеріали завдяки їх структурі та розмірам значно відрізняються від молекулярного та атомного рівня речовин. Вони мають більшу питому поверхню, вищі кумулятивні та адсорбційні властивості, у них змінюється розчинність, каталітична та реакційна активність [8]. Наночастки також характеризуються особливостями, які дозволяють припустити їх генотоксичну дію: висока проникність на тканинному та клітинному рівнях, ураження цитоскелету, проходження крізь каріолеми та розташування в ядрі клітини, деякі наноматеріали генерують активні форми кисню, яке призводить до канцерогенного ефекту [9, 6].

Серед усього різноманіття існуючих наночастинок металів особливої уваги заслуговують наночастки Цинку та Аргентуму. З появою нанотехнологій вчені прийшли до висновку щодо можливості впровадження в медичну практику препаратів наносрібла. Типові наночастки Аргентуму мають розмір 25 нм. Вони проявляють здатність до генерування активних форм кисню. Ці властивості обумовлюють антисептичні характеристики наносрібла. Завдяки малому розміру вони надзвичайно активні та можуть викликати загибель бактерій, вірусів і грибів на великих поверхнях. Дія наночастинок Аргентуму специфічна не за інфекцією (як у антибіотиків), а за клітинною структурою. Також на сьогоднішній день ці наночастки активно застосовуються в гуманній медицині, як протизапальний засіб. Тому, у порівнянні зі сріблом макророзмірів його наночастки можуть проявляти більшу токсичність. У макроорганізмі наночастки Аргентуму можуть призводити до цілого спектру відповідей тканин організму, до активації клітин або їх загибелі [5, 10].

Найперспективнішими для медицини також є наночастки Цинку, розмір яких становить до 60 нм [7]. Дослідженнями встановлено, що ці наночастки мають виражені антибактеріальні властивості завдяки проникненню їх до бактеріальної мембрани і подальшому руйнуванню. Також наночастки Цинку мають протизапальні та регенеративні властивості у лікуванні експериментальних гнійних ран, високу ефективність поглинання ультрафіолету [12].

У зв'язку з цим актуальним залишається питання вивчення біологічних ефектів впливу наночастинок на клітинному рівні. Культурально-морфологічні властивості клітинних культур являють собою сукупність важливих характеристик, які дозволяють уявити картину фізіологічного стану клітинних ліній під впливом різноманітних біотичних та абіотичних факторів. Основними культуральними показниками

є проліферативна активність, яка визначає ступінь розвитку клітинного моношару та число життєздатних клітин у пасажі [2].

Важливим цитогенетичним параметром, особливо для клітин, які використовуються в біотехнологічному виробництві, є мітотичний режим клітин, який враховує такі показники, як мітотична активність, відношення фаз мітозу, кількість патологічних мітозів. Також при визначенні впливу наночастинок на культури клітин важливе місце займає дослідження їх дії на хромосомний апарат, що на сьогоднішній день є питанням мало вивченим та актуальним.

Мета роботи – вивчення механізму впливу наночастинок Аргентуму та Цинку на цитогенетичні параметри та показники мітотичної активності сублінії перещеплюваної культури клітин FLK 50/100.

Матеріали та методи. У даній роботі використовували сублінію перещеплюваної культури клітин FLK 50/100, яка зберігається в Колекції культур клітин тваринного походження Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», що становить національне надбання України з 2004 року. Сублінія FLK 50/100 (fetal lamb kidney) – є основним продуцентом вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ), який у подальшому використовується при проведенні серологічних досліджень на це захворювання. Сублінія культури FLK-BLV з 1978 року перебуває в УНІЕВ (зараз ННЦ «ІЕКВМ»), а в 1987 році шляхом адаптації до росту з додаванням 50 % гемогідролізату великої рогатої худоби було отримано сублінію FLK-50/100.

У дослідженнях використовували наночастки Аргентуму (Ag) та Цинку (Zn), отримані конденсаційним методом шляхом відновлення солей відповідних металів [3]. Зразки наночастинок отримано за допомогою провідного наукового співробітника відділу токсикології, безпеки та якості сільськогосподарської продукції ННЦ «ІЕКВМ» Романько М.С. з Інституту біоколоїдної хімії імені Ф.Д. Овчаренка НАН України. Розміри наночастинок Аргентуму та Цинку становили $(31,5 \pm 0,9)$ нм та (10 ± 10) нм відповідно. Наночастки металів застосовували в розведеннях від загальної концентрації 1:20 та 1:100. Суспензія наночастинок була стійка до формування конгломератів і седиментації.

Для визначення цитогенетичних характеристик сублінії перещеплюваної культури клітин FLK 50/100 при дії на неї наночастинок користувалися такими методиками: експрес-метод суправітального фарбування для визначення збереженості клітин; готування банку зразків нормальних хромосом дослідної лінії для розмежування нормальних і структурно перебудованих хромосом у каріотипі лінії; цитологічний контроль мітотичної активності та стабільності перещеплюваної культури клітин FLK-BLV; виготовлення препаратів хромосом, для чого використовували культуру в метафазі ділення клітин, коли хромосоми мають найменшу довжину і легко досліджуються.

Клітини перещеплюваної лінії FLK 50/100 у концентрації 220 тис.клітин в 1 см^3 ростового середовища висівали на покривні скельця розміром 12×24 мм, які знаходилися у пеніцилінових флаконах ємністю 10 см^3 для визначення мітотичної активності, та у культуральні флакони ($0,25 \text{ дм}^3$) для каріологічного аналізу. Культивували перещеплювану лінію FLK 50/100 у поживному середовищі Ігла DMEM та 199 у рівних співвідношеннях з додаванням 10 % сироватки крові ВРХ нативної (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», м. Харків), обробленої поліетиленгліколем з молекулярною масою 6000 дальтон. Флакони у горизонтальному положенні інкубували в термальній кімнаті за температури 37°C .

Після виповнення моношару на 60–80 % станом на 24 год культивування, поживне середовище було замінено, і на клітини у стадії активного росту було внесено наночастки Аргентуму та Цинку в дослідних концентраціях. Вплив наночастинок металів досліджували на першу, другу, третю та четверту добу їх дії. Для цього покривні скельця виймали з пеніцилінових флаконів, клітини фіксували сумішшю льодяної оцтової кислоти та абсолютного етилового спирту у співвідношенні 1:3, фарбували гематоксиліном Караччі відповідно до загальноприйнятої методики. Мітотичну активність визначали за кількістю клітин, що діляться, віднесеному до загальної кількості врахованих клітин (1000), і виражали в проміле (‰). Одночасно з'ясовували кількість патологічних мітозів, а також їх окремих форм за класифікацією І.А. Алова по відношенню до їх загальної кількості, які приймали за 100 %.

Культивування моношару в культуральних флаконах ($0,25 \text{ дм}^3$) проводили впродовж 48 год, час впливу наночастинок на клітини складав 24 год. Для зупинки мітозу на стадії метафазі у флакони вносили колхіцин. Після 20 год дії колхіцину на клітини сублінії FLK 50/100, були зроблені препарати хромосом усіх дослідних варіантів [4].

Після закінчення дії колхіцину, середовище культивування зливали у центрифужні пробірки, а в культуральні флакони вносили $2\text{--}4 \text{ см}^3$ підігрітої за температури 37°C суміші 3 % трипсину та 0,2 % розчину Версену у співвідношенні 9:1 в об'ємі, який покривав моношар клітин. Потім культуральні флакони ставили до термостату за температури 37°C на 5 хв; суспензію з клітинами переносили у центрифужні пробірки та центрифугували протягом 5 хв за 1000 об./хв.

Після цього невеликими порціями додавали гіпотонічний розчин (0,56 % розчин хлористого калію). Тривалість гіпотонічного впливу складала 30 хв. Обробка клітин гіпотонічним розчином передбачала поступове набрякання клітин, що приводило до поліпшення розкиду хромосом у метафазній пластинці. Після чого клітину суспензію центрифугували впродовж 5 хв за 1000 об./хв. Надосадову рідину видаляли, залишаючи $0,5 \text{ см}^3$ над осадом. Препарати хромосом готували шляхом розкапування клітинної суспензії на холодне предметне скло та висушування над полум'ям. Рутинне фарбування проводили в 1 % розчині

барвника Гімза. Отримані препарати висушували на повітрі за кімнатної температури. Модальне число хромосом визначали шляхом їх підрахунку в 100 метафазних пластинок.

Отримані результати обробляли за методом Фішера-Стьюдента.

Результати досліджень. Мікроскопування клітин проводили через 24–48–72 год впливу наночасток Аргентуму та Цинку. При цьому в контрольному варіанті через 24 год впливу моношар виповнявся на 100 %, клітини були в задовільному стані. У варіантах впливу Аргентуму в розведеннях 1:20 та 1:100 моношар виповнявся на 70–80 %, у цитоплазмі виявлялась незначна зернистість. Під дією Цинку моношар не формувався, більшість клітин знаходилася в поживному середовищі.

Проаналізовано варіабельність числа хромосом та модальний клас клітин сублінії FLK 50/100. У контрольних клітинах розмах мінливості за кількістю хромосом був від 48 до 76 з вираженим модальним класом 68 (21 % від загальної кількості підрахованих клітин). Клітини під впливом наночасток Аргентуму в концентраціях 1:20 та 1:100 мали варіювання набору хромосом від 52 до 72 та від 52 до 74 відповідно. Модальний клас у двох варіантах складав 64 (Ag 1:20–21 %, Ag 1:100–20 %). Таким чином, під впливом наночасток Аргентуму (впродовж 24 год впливу) зменшується варіабельність кількості хромосом, а їх модальний клас зміщується в бік зменшення кількості. У клітинах під дією наночасток Цинку в розведенні 1:20 розмах числа хромосом становив від 42 до 68 з модальним класом 54–56 (39 %), а у клітинах під впливом Zn 1:100 – розмах від 48 до 70 з модальним класом 60 (21 %).

Результати досліджень мітотичної активності та відсотка патологічних мітозів сублінії FLK 50/100 під впливом наночасток Аргентуму та Цинку надано в таблиці 1.

Таблиця 1 – Порівняння мітотичної активності та відсотка патологічних мітозів сублінії FLK 50/100 під дією наночасток Аргентуму та Цинку (M±m, n=5)

Варіант	Експозиція, год							
	24	48		72		96		
	Мітотична активність %	% патологічних мітозів	Мітотична активність %	% патологічних мітозів	Мітотична активність %	% патологічних мітозів	Мітотична активність %	% патологічних мітозів
Контроль	34,67±0,33	2,00±0,00	33,00±1,53	1,67±0,33	26,33±0,88	2,67±0,33	14,33±0,88	0,67 ± 0,33
Ag 1:20	25,00±0,58***	6,62±1,23**	18,00±0,58***	3,81±1,91	21,00±0,58***	4,77±0,13***	4,33±0,33***	–
Ag 1:100	38,67±0,88**	2,33±0,33	33,00±1,15	2,33 ±0,33	20,33±1,20**	0,67±0,33**	12,33±0,67	0,33 ± 0,33
Zn 1:20	3,00±0,00***	–	2,00±0,00***	–	–	–	–	–
Zn 1:100	4,33±0,33***	–	3,00±0,00***	–	–	–	–	–

Примітка: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 порівняно з клітинами контрольного варіанту

При оцінці впливу наночасток на мітотичну активність (МА) Ag 1:20 у першу добу достовірно знижувалася на 28 % порівняно з контролем і на четверту добу впливу наночасток була нижче майже на 70 %. У розведенні 1 до 100 наночастки Аргентуму викликали достовірне стимулювання мітотичної активності в першу добу впливу з поступовим вирівнюванням з контролем. Показник патологічних мітозів зменшувався на третю та четверту добу впливу наночасток.

За даними таблиці видно, що у варіантах культивування з додаванням наночасток Цинку в розведенні 1:20 та 1:100 МА достовірно пригнічувалася в першу добу впливу у 8 та 11,55 разів відповідно, а у другу – у 16,5 та 11 разів. На 72 та 96 годину дії наночасток Цинку клітин не було.

При дослідженні патологічних мітозів в інтактних клітинах і в клітинах під дією наночасток Аргентуму та Цинку встановлено, що основною формою патології є пола метафаза (рис. 1).

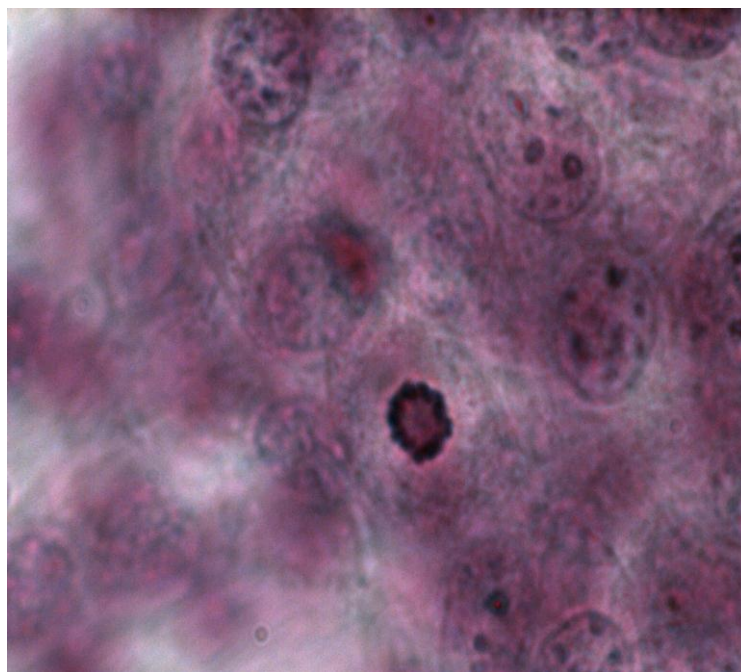


Рис. 1. Пола метафаза клітини контрольного варіанта

Висновки. 1. При аналізі ефекту наночастинок на цитогенетичні показники сублінії перещеплюваної культури клітин FLK 50/100 виявлено змінення варіації розмаху хромосом відносно до контролю та зниження модального класу від 68 % (контроль) до 54–56 (Zn 1:20).

2. Показник мітотичної активності клітин FLK 50/100 достовірно знижувався під впливом наночастинок Цинку в 8–11,55 разів у розведенні 1:20 та 1:100 у порівнянні з контролем. Під дією наночастинок Аргентуму в розведенні 1:20 МА клітин знижувалася в 6,7 рази, а під дією наночастинок у розведенні 1:100 зростала в першу добу з поступовим вирівнюванням відповідно до контролю. При цьому процент патологічних мітозів знижувався на третю та четверту добу впливу наночастинок у 2 та у 4 рази.

Список літератури

1. Горець В.І. Моделювання впливу важких металів та нанометалів на організм і ембріогенез в експерименті [Текст] / В.І. Горець // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип.1. – Т.2 (99). – С. 254-258.
2. Изучение культуральных свойств перевиваемой линии клеток MDBK при воздействии наночастиц микроэлементов [Текст] / П.А. Красочко, Д.С. Борисовец, М.С. Струк, В.Л. Рядько // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы, Сборник научных трудов. – 2013. – Т. 20. – С. 121-129.
3. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии [Текст] / под. ред. А.В. Порцова. – М.: Издательство МГУ, 1976. – 132 с.
4. Методичні рекомендації щодо цитогенетичного контролю якості культур клітин тваринного походження [Текст] / розроб. Б.Т. Стегній, В.С. Білокінь, М.Ю. Стегній, О.А. Лаврик, О.М. Юрченко // Харків. – 2008. – 29 с.
5. Наносеребро: технологии получения, фармакологические свойства, показания к применению [Текст] / И.С. Чекман, Б.А. Мовчан, М.И. Загородный, Ю.В. Гапонов, Ю.А. Куралов, Л.А. Крушинская, М.В. Кардаш // Препараты и технологии. – 2008. – № 5(51). – С. 32-34.
6. Сычева Л.П. Генотоксическое действие наноматериалов [Текст] / Л.П. Сычева // 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, 17-18 дек. 2007 г. – Москва, 2007. – С. 150-154.
7. Чекман И.С. Нанонаука, нанобиология, нанофармация [Текст] / И.С. Чекман, З.Р. Ульберг, В.О. Маланчук // Поліграф плюс, Київ. – 328 с.
8. Шиян А.А. Влияние нанопорошков оксидов металлов на успех прохождения личиночных стадий развития озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall) [Текст] / А.А. Шиян // Научный журнал КубГАУ. – 2011. – № 66 (02). – С. 1-11.
9. Яковлева Г.В. Основные подходы к оценке свойств нанообъектов [Текст] / Г.В. Яковлева, А.А. Стехина // 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, 17-18 дек. 2007 г. – Москва, 2007. – С. 174-177.
10. Braydich-Stolle L. Cytotoxicity of nanoparticles of silver in mammalian cells [Text] / L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. Schlager // Toxicological Sciences. – 2005. – 380 p.
11. Reis C.P. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems [Text] / C.P. Reis, R.I. Neufeld, A.J. Ribeiro // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2006. – 2. – P. 53-65.
12. Wang B. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice [Text] / B. Wang, W. Feng, M. Wang // Journal of Nanoparticle Research. – № 9(3). – P.479-489.

CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF THE SUBCULTURE CELLS FLK 50/100
UNDER THE INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF SILVER AND ZINC

Stegniy M.Y., Magats D.Y., Yurchenko O.N.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

The article describes the experimental study of the biological effects of nanoparticles on bioobjects, and estimation of their influence on genetic apparatus. The aim of the research was to determine the influence of nanoparticles of Silver and Zinc on cytogenetic indices of subculture cells FLK 50/100, which is used for production of leukemic antigen.

According to the results of cytogenetic investigations by the method of S.E. Mamaeva of the subline culture cells FLK 50/100 revealed the change of the dispersion of chromosomes regarding the control and reduction of modal class from 68 (control) to 54–56 (Zn 1:20). Cytological control of mitotic activity of cells FLK 50/100 showed a significant reduction under the influence of Zinc nanoparticles in two dilutions of the total concentrations and the effects of nanoparticles of Silver in dilution 1:20. At that time, under the influence of nanoparticles of Silver at a concentration of 1:100 noted significant growth of the MA on the first day, respectively, to the control, the percentage of pathological mitoses decreased to not less than two times on 3 and 4 day of action of nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, cell culture FLK (FETAL LAMB KIDNEY), MITOTIC ACTIVITY, cytogenetic parameters.

УДК 636.082.474:631.15:658.592.4:664.644.44:636.5

ЩОДО РОЗРОБКИ ТА АВТОМАТИЗАЦІЇ МЕТОДІВ БІОКОНТРОЛЮ В ІНКУБАЦІЇ

Бреславець В.О.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Стегній О.О.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

У статті наводяться дані щодо методів визначення ступеню розвитку зародків птиці та перспективи автоматизації процесів проведення біоконтролю в інкубації.

Основним приладом, який використовують при оцінці якості яєць та ступеню ембріонального розвитку зародків, є овоскоп. За допомогою нього проводять декілька переглядів яєць з метою вилучення незапліднених яєць та яєць з загиблими зародками. Однак особливо при третьому перегляді за допомогою овоскопа дуже важко розрізнити яйця з живими і загиблими зародками, так як усі вони мають темний колір. Тому існує нагальна необхідність створити прилад, який би міг автоматично на вивід переносити тільки яйця з живими зародками. Слід зазначити, що у світі існує декілька фізичних методів визначення якісних характеристик об'єктів, які застосовуються як у промисловості, так і в інших галузях господарювання людини (тепловізорний, імпульсного опромінення, термометричний, тонометричний, вимірювання артеріального тиску). Існують також прилади для визначення частоти серцевих скорочень (ЧСС) і вимірювання коливальних рухів. Із наведених вище методів є ще ціла низка інших, але вони занадто об'ємні, громіздкі та коштовні. Тому для розробки та автоматизації методів біоконтролю в інкубації необхідно підібрати із вищенаведених варіантів ті, які кращі та найбільш ефективні та на їх основі створити декілька дослідних зразків приладів, випробувавши їх дію в лабораторних умовах.

Ключові слова: біологічний контроль в інкубації, фізичні методи визначення якісних характеристик об'єктів.

Біологічний контроль в інкубації полягає у систематичному спостереженні за якістю інкубаційних яєць та виводимістю молодняка, розвитком ембріонів та аналізу причин їх загибелі.

Біологічний контроль дає можливість корегувати режим інкубації, племінну роботу з птицею, умови її утримання та годівлі, а також контролювати ветеринарно-санітарний стан господарства.

Прийоми біоконтролю різноманітні. Їх умовно можна розподілити на три групи:

оцінка якості яєць на початку інкубації, контроль за розвитком зародків у період інкубації та за ростом і розвитком молодняка у першу декаду вирощування.

Контроль за розвитком зародків дає змогу передбачити якісні та кількісні результати інкубації, виявити деякі недоліки інкубації яєць та своєчасно їх виправити.

До прижиттєвого контролю відносяться наступні прийоми: оцінка розвитку зародків при овоскопуванні яєць, а у разі необхідності і при розтинанні яєць; спостереження за підготовкою молодняка до виводу; облік терміну виводу та інкубаційного періоду; облік та аналіз результатів інкубації; встановлення віку та причин загибелі ембріонів; оцінка якості виведеного молодняка за екстер'єрно-інтер'єрними ознаками та біохімічними показниками.