

ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ МЕТАЛОВМІСНИХ НАНОЧАСТИНОК У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ТА НА БІЛИХ МИШАХ

С.В. Дерев'янюк, Л.М. Решотько, О.О. Дмитрук, А.В. Васильченко

*Інститут сільськогосподарської мікробіології
та агропромислового виробництва НААН*

Проведено досліді з визначення токсичності, форми та розмірів наночастинок. Встановлено, що металовмісні наночастишки мають сферичну форму, їх розміри становлять 10–60 нм. Наночастишки бентоніту мають як неправильну розміром 40–60 нм, так і гольчасту форму частинок розміром 100–500 нм. Максимально допустима концентрація металовмісних наночастинок для перещеплюваної культури клітин СНЕВ для бентоніту становить 500 мкг/см³, Al₂O₃ та CeO₂ — 100 мкг/см³, Ni — 50, V — 25, Al — 20, Ti — 12,5, Zn та Co — 5, Se — 0,1 мкг/см³. Досліджено гостру токсичність металовмісних наночастинок на білих безпородних мишах відповідно до OECD Guideline 425 for the Testing of Chemicals (Limit Test). Встановлено, що усі наночастишки виявились нетоксичними для білих мишей у концентрації 2000 мг/кг. Обгрунтовано, що їх можна використовувати для подальшого вивчення антивірусних властивостей на відповідному етапі розробки противірусних препаратів.

Ключові слова: металовмісні наночастишки, цитотоксичність, максимально допустима концентрація, культура клітин, гостра токсичність.

Сучасні наукові досягнення у галузі нанотехнологій відкривають широкі перспективи для виробництва та використання металовмісних наночастинок (НЧ), що можуть існувати у формах оксидів, гідроксидів, колоїдних сполук, гідратованих чи цитратованих формах. На сьогодні НЧ у тій чи іншій формі використовують в медицині, ветеринарії, сільському господарстві, рослинництві, парфумерній та харчовій промисловості [1–5].

Зокрема, НЧ є перспективними для розробки противірусних препаратів для сільського господарства. Однак встановлено, що наночастишки можуть бути токсичними, здатними проникати в незміненому вигляді через клітинні бар'єри, а також через гематоенцефалічний бар'єр у центральну нервову систему, циркулювати і накопичуватися в органах і тканинах, викликати виражені патоморфологічні зміни у внутрішніх органах, а також мають тривалий період напіввиведення. Так, НЧ можуть впливати на антиоксидантний стан, репарацію генів клітин організму та спричиня-

ти цитотоксичний ефект, що обмежує їх використання [6]. До того ж проникнення у клітину може бути фагоцитарним чи нефагоцитарним і залежить від розміру, заряду і концентрації наночастинок [7]. Вірогідно, що механізм, за допомогою якого наночастишки проникають у клітини без специфічних рецепторів на їх зовнішній поверхні, ґрунтується на пасивному захопленні чи адгезивній взаємодії.

Токсичність НЧ залежить від їх форми і розмірів. Так, дрібні наночастишки веретеноподібної форми викликають сильніші руйнівні ефекти в організмі, ніж подібні їм НЧ сферичної форми. Також за впливу НЧ на культури клітин та на організм чітко простежується зв'язок «доза — ефект» [8, 9].

Тому перспективними для розробки антивірусних препаратів, імуномодуляторів, ад'ювантів для вакцин є наночастишки, які не мають або характеризуються помірним рівнем цитотоксичних властивостей. Найчастіше токсичну дію НЧ вивчають в експерименті на тваринах або у культурах клітин.

Метою роботи було визначити цитотоксичну дію металовмісних наночастинок у

культури клітин та дослідити токсичність НЧ на тваринах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Були використані наночастинки оксидів металів, надані Інститутом мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного: CeO_2 (д-р біол. наук, професор М.Я. Співак), бентоніт (д-р біол. наук, професор І.К. Курдиш), цитрати Zn , $\text{Se} + \text{I}$, V , Co , Al , $\text{I} + \text{S}$, Ti , Ni , Ce — ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології» (д-р техн. наук В.Г. Каплуненко), Al_2O_3 — Інститутом сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (канд. с.-г. наук С.Б. Дімова).

Перед використанням порошкоподібні наночастинки розчиняли у краплі диметилсульфоксиду (ДМСО) та готували робочі суспензії. Водні суспензії НЧ розбавляли до потрібної концентрації та доводили значення рН до нейтрального. Суспензії стерилізували у спосіб автоклавування. Для контролю стерильності використовували м'ясопептонний агар (МПА) та тіюгліколевє середовище. Посіви інкубували при температурі 37°C . Тривалість інкубації становила близько 14 діб.

Цитотоксичність НЧ вивчали в перещеплюваній культурі клітин нирки ембріона свині (СНЕВ), надані ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН. Для вирощування культур клітин використовували живильні середовища (199, Ігла), сироватку крові великої рогатої худоби (ТОВ НДП «Ветеринарна медицина», Україна).

У сформований моношар клітин вносили поживне середовище, що містить досліджувану речовину у різних концентраціях. Використовували двократні розведення НЧ. Для кожної концентрації використовували чотири пробірки з культурою клітин. У контрольному варіанті також проводили заміну поживного середовища, але без досліджуваних речовини.

Облік результатів проводили щодоби впродовж семи діб. Моношар клітин досліджували в оптичному мікроскопі на наявність цитотоксичної дії речовини, яку оцінювали за порушенням цілісності мо-

ношару. Рівень токсичності визначали за 4-хрестовою системою, кожен з яких відповідає дегенерації 25% площі моношару клітин.

Гостру токсичність наночастинок *in vivo* визначали на білих безпородних лабораторних мишах. Оцінку гострої токсичності здійснювали за ліміт-тестом [10]. Цей метод надає змогу з'ясувати основні параметри токсичності речовин, а саме: середньолетальну дозу та її стандартну похибку ($\text{LD}_{50 \pm m}$) для речовин з невідомою токсичністю, а у разі якщо значення LD_{50} є вищим за 2000 мг/кг — спостерігати за розвитком або відсутністю клінічних ознак токсичності.

Морфологію НЧ вивчали за допомогою електронного мікроскопа JEOL JEM-1400 (Японія). Мікроскопію здійснювали на сіточках із формваровою плівкою. Проби контрастували в 1% розчину ацетату урану впродовж 30 с.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нині не існує уніфікованого методу оцінки цитотоксичності речовин у культурі клітин. Ми проводили дослід з визначення максимально допустимої концентрації (МДК) наночастинок, тобто такої, що не спричиняє незворотних видимих змін у морфології та життєздатності клітин.

За результатами дослідження встановлено, що МДК для різних НЧ варіює у значних межах. Так, з найнижчою токсичністю були НЧ бентоніту, їх МДК становила 500 мкг/см^3 . Більш токсичними були НЧ Al_2O_3 , CeO_2 — 100 мкг/см^3 кожна сполука, Ni — 50, V — 25, Al — 20 мкг/см^3 . Найвищою токсичністю відзначались наночастинки Ti ($12,5 \text{ мкг/см}^3$), Zn , Co (по 5), Ce — $0,1 \text{ мкг/см}^3$ (табл. 1).

У подальших дослідженнях у культурі клітин будуть використані ці речовини у МДК. Виявлення протівірусної активності металовмісних НЧ можливо лише за використання їх у МДК і нижче. За використання вищих за МДК концентрацій металовмісних НЧ спостерігалися дегенеративні зміни в культурі клітин СНЕВ: порушення цілісності моношару, округлення, розплас-

тування і зморщування, вакуолізація та зернистість клітин, зміна забарвлення живильного середовища тощо (рис. 1).

Визначення гострої токсичності здійснювали за описаними вище міжнародними правилами тестування невідомих хімічних речовин [9]. За результатами проведеного дослідження встановлено, що всі досліджувані наночастки виявились нетоксичними для білих мишей у концентрації 2000 мг/кг.

За допомогою електронної мікроскопії виявлено, що переважна більшість металовмісних наночастинок мають сферичну форму, їх розміри становлять 10–60 нм, спостерігаються як поодинокі НЧ, так і їх агломерати (рис. 2). Поряд із тим встановлено, що НЧ бентоніту мають як неправильну (40–60 нм), так і гольчасту (100–500 нм) форму частинок.

Отже, встановлено форму, розмір, МДК та гостру токсичність металовмісних на-

Таблиця 1

Максимально допустима концентрація наночастинок для культури клітин СНЕВ

№ пор.	Речовина	МДК, мкг/см ³
1	Ti	12,5
2	V	25
3	Zn	5
4	Ni	50
5	Al ₂ O ₃	100
6	Co	5
7	CeO ₂	100
8	Al	20
9	Бентоніт	500
10	Ce	0,1

ночастинок для подальшого вивчення їх антивірусних властивостей, що є необхідним етапом розробки противірусних препаратів.

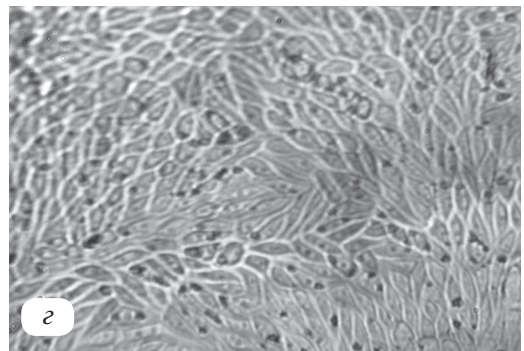
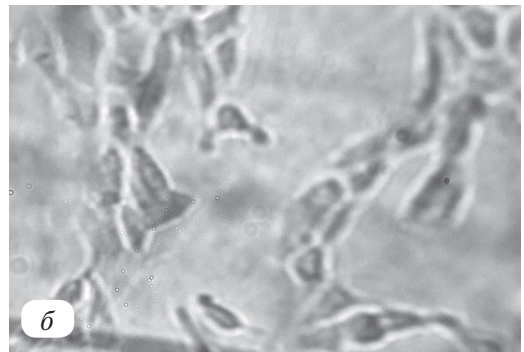
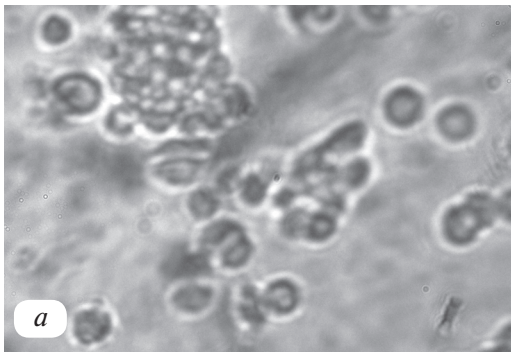


Рис. 1. Дегенеративні зміни у перешеплюваній культурі клітин нирки ембріона свині за дії високих концентрацій наночастинок: *а, б, в* — дегенеративні зміни клітин; *г* — культура клітин СНЕВ за відсутності наночастинок

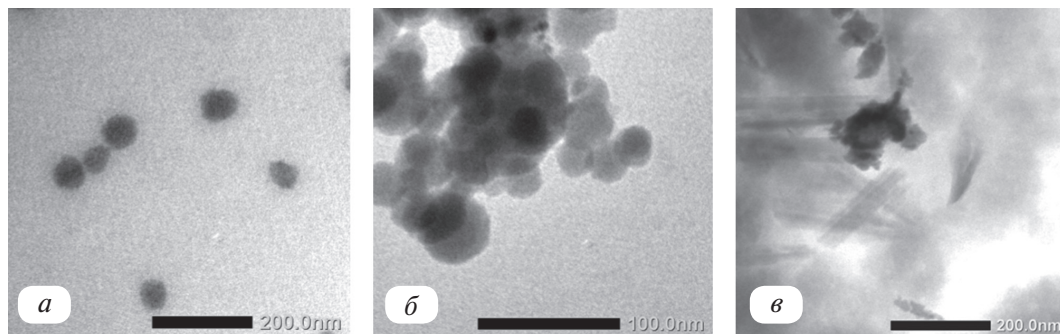


Рис. 2. Електронні фотознімки наночастинок: а — Al, б — Се, в — бентоніту

ВИСНОВКИ

Досліджувані металовмісні наночастинок мають переважно сферичну форму, їх розміри становлять 10–60 нм і є перспективними для подальшого вивчення в аспекті протівірусних властивостей. Наночастинок бентоніту мають як неправильну (40–60 нм), так і гольчасту (100–500 нм) форми частинок.

Встановлено, що максимально допустима концентрація для бентоніту становить 500 мг/см³, Al₂O₃ та СеО₂ — по 100, Ni — 50, V — 25, Al — 20, Ti — 12,5, Zn та Co — по 5, Се — 0,1 мг/см³.

Наночастинок (бентоніт, Al₂O₃, СеО₂, Zn, V, Co, Al, Ti, Ni, Се) не є токсичними для білих мишей у концентрації 2000 мг/кг. Ці наночастинок можна використовувати для подальшого вивчення їх антивірусних властивостей з метою розробки протівірусних препаратів.

Висловлюємо подяку провідному інженеру Інституту мікробіології та вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного М.С. Харчуку за допомогу у проведенні електронної мікроскопії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пат. 106101 Україна, МПК А61К 33/08, А61Р 31/22. Спосіб виготовлення медичних протівірусних препаратів, що містять наночастинок, та препарат проти вірусів герпесу hiv і грипу h1n1, виготовлений за даним способом / М.М. Локшин, М.Я. Співак, В.С. Лисенко. — Заявл. 17.07.12; опубл. 25.07.2014, Бюл. 14.
2. Пат. 106111 Україна, МПК А61К 38/21, А61Р 37/04. Спосіб отримання людського інтерферону

з використанням наночастинок оксиду церію / В.З. Лозовський, М.Я. Співак, М.М. Локшин, В.С. Лисенко. — Заявл. 10.08.12; опубл. 25.07.2014, Бюл. 14.

3. Пат. 2422377 Российская Федерация, МПК С02F1/50, А01 N25/00, В22F9/19. Биоцидный концентрат / В.Н. Голубев, И.А. Коленкор, В.В. Слепцов и др.; заявитель и патентообладатель Слепцов В.В. — № 2009126984/07; заявл. 15.07.09; опубл. 20.01.11, Бюл. 18.
4. Пат. 2431656 Российская Федерация, МПК С11D9/18, С11D9/22, С11 D9/50. Мыло туалетное с антимикробными свойствами / В.И. Беклемышев, И.И. Махони, У.О.Д. Мауджери и др.; заявитель и патентообладатель ЗАО «Институт прикладной нанотехнологии», Фонд Сальваторе Мауджери, Клиника Труда и Реабилитации, СИБ Лэборетрис Лимитед. — № 2010115401/04; заявл. 20.04.10; опубл. 20.10.11, Бюл. 29.
5. Нанотоксикология: напрямки досліджень (огляд) / І.С. Чекман, А.М. Сердюк, Ю.І. Кундієв [та ін.] // Довкілля та здоров'я. — 2009. — № 1. — С. 3–7.
6. Нанотехнологии в биологии и медицине [Електронний ресурс] / Коллективная монография под ред. Е.В. Шлякто. — 2009. — Режим доступу: <http://prostonauka.com/nano/nanotehnologii-v-biologii-i-medicine>
7. Thorek D.L. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells / D.L. Thorek, A. Tsourkas // Biomaterials. — 2008. — Vol. 29, No. 26. — P. 3583–3590.
8. Глушкова А.В. Нанотехнологии и нанотоксикология — взгляд на проблему / А.В. Глушкова, А.С. Радилов, В.Р. Рембовский // Токсикол. вестник. — 2007. — № 6. — С. 4–8.
9. Нанотехнології в медицині, фармації та фармакології / Л.Г. Розенфельд, І.С. Чекман, А.І. Тертишна та ін. // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2008. — № 1–3. — С. 3–7.
10. OECD Guideline 425 for the Testing of Chemicals (Limit Test) [Електронний ресурс]. — 2001. — 26 p. — Режим доступу: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl425-508.pdf

REFERENCES

1. Lokshyn, M.M., Spivak, M.Y., Lysenko, V.S. (2014). Sposib vyhotovlennia medychnykh likarskykh preparativ, shcho mistiat nanochastynky, ta preparat proty virusiv herpesu hiv I hrypu h1n1, vyhotovlenii za danym sposobom [A method of production of medical antiviral drugs, which contain nanoparticles, and a drug for treating herpes virus hiv and influenza h1n1, which is produced with this method]. *Patent of Ukraine No. 106101; 17th July 2012; 25th July 2014. Bul. No. 14. Ukraine* [in Ukrainian].
2. Lozovskii, V.Z., Spivak, M.Y., Lokshyn, M.M., Lysenko, V.S. (2014). Sposib otrymannia liudskoho interferonu z vykorystanniam nanochastynok ceriu [A method of production of human interferon using cerium oxide nanoparticles]. *Patent of Ukraine No. 106111; 10th August 2012; 25th July 2014. Bul. No. 14. Ukraine* [in Ukrainian].
3. Holubev, V.N., Kolenkor, I.A., Sleptsov, V.V., Tianginkii, A.Y., Tserulev, M.V., Shmidt, V.I. (2011). Biocydnii koncentrat [Biocidal concentrate]. *Patent of the Russian Federation No. 2422377; 15th July 2009; 20th January 2012. Bul. 18. Russian Federation* [in Russian].
4. Beklemyshev, V.I., Mahony, I.I., Maudgery, U.O.D., Abramian, A.A., Solodnikov, V.A., Filipov, K.V., Afanasiev, M.M. (2011). Mylo tualetnoe s antimikrobnymi svoistvami [Toilet soap with antimicrobial effect]. *Patent of the Russian Federation No. 2431656; 20th April 2010; 20th October 2011. Bul. 29. Russian Federation* [in Russian].
5. Checkman, I.S. et al. (2009). Nanotoxicologia: napriamky doslidzhen (ohliad) [Nanotoxicology: areas of research (a review)]. *Dovkillia ta zdorovia – Environment and health, 1, 3–7* [in Ukrainian].
6. Shlyakhto, E.V. (Ed.). (2009). Nanotehnologii v biologii i medicine [Nanotechnology in biology and medicine]. *prostonauka.com*. Retrieved from <http://prostonauka.com/nano/nanotehnologii-v-biologii-i-medicine> [in Russian].
7. Thorek, D.L., Tsourkas, A. (2008). Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials, 29 (26), 3583–3590* [in English].
8. Hlushkova, A.V., Radylov, A.S., Rembovskii, V.R. (2007). Nanotehnologii i nanotoksikologiya – vzgliad na problemu [Nanotechnology and nanotoxicology – a view of the problem]. *Toksikologicheskii vestnik – Toxicological Herald, 6, 4–8* [in Russian].
9. Rosenfeld, L.G., Checkman, I.S., Tertyshna, A.I. et al. (2008). Nanotehnologii v medicyni, farmacii ta farmakologii [Nanotechnology in medicine, pharmacy and pharmacology]. *Farmakologia ta likarska toxicologia – Pharmacology and medical toxicology, 1–3, 3–7* [in Ukrainian].
10. OECD Guideline 425 for the Testing of Chemicals (Limit Test). (2001). ntp.niehs.nih.gov. Retrieved from https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl425-508.pdf [in English].

Стаття надійшла до редакції журналу
30.04.2019