

5. Mosyakin, S.L. & Fedoronchuk, M.M. (1999). *Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist*. Kyiv [in English].
6. Didukh, Ya.P. & Pliuta, P.H. (1994). *Fitoindykacija ekologicznyh faktoriv [Phytoindication of ecological factors]*. Kyiv [in Ukrainian].
7. Didukh, Ya.P. (2011). *The ecological scales for the species of Ukrainian flora and their use in synphytoindication*. Kyiv: Phytosociocentre [in English].
8. Mucina, L., Bültmann, H., Dierßen, K. & al. (2016). Vegetation of Europe: hierarchical floristic classification system of vascular plant, bryophyte, lichen, and algal communities. *Appl. Veg. Science*, 19 (1), 3–264. doi:10.1111/avsc.12257 [in English].
9. Solomakha, I.V., Shevchyk, V.L. & Solomakha, V.A. (2017). *Ogljad vyshhyh odynyc' roslynnosti Ukrai'ny za metodom Braun-Blanke ta i'h diagnostychni vydy [Review of the higher vegetation units and diagnostic species of Ukraine according to the Braun-Blanquet approach]*. Kyiv: Phytosociocentre [in Ukrainian].
10. Shevchyk, V.L. & Solomakha, V.A. (1996). Syntaksonomija roslynnosti ostroviv Kruglyk ta Shelestiv Kanivs'kogo pryrodnoho zapovidnyka [The syntaxonomy of vegetation Kruglyk and Shelestiv islands of Kaniv natural reservation]. *Ukrai'ns'kyj fitocentychnyj zbirnyk – Ukrainian Phytosociological Collection, Ser. A, 1*, 12–27 [in Ukrainian].
11. Shevchyk, V.L., Senchylo, O.O. & Polishko, O.D. (2001). Geobotanichna charakterystyka osnovnyh stadij pervynnoi' sukcesii' zaplavnyh ostroviv Kanivs'kogo pryrodnoho zapovidnyka [Geobotanical characteristics of the primary succession main stages of the Kaniv Nature Reserve floodplain islands]. *Zapovidna sprava v Ukrai'ni – Conservation in Ukraine*, 7, 15–22 [in Ukrainian].

Стаття надійшла до редакції журналу 28.10.2019

УДК 57.085.25

DOI: <https://doi.org/10.33730/2077-4893.4.2019.189467>

ТОКСИЧНІСТЬ КОМПОЗИЦІЇ НАНОЧАСТИНОК НЕМЕТАЛІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН НИРКИ ЕМБРІОНА СВИНІ

С.В. Дерев'яно¹, Л.М. Решотько¹, А.В. Васильченко¹,
О.О. Дмитрук¹, М.С. Харчук²

¹ Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН

² Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України

Встановлено, що композиція наночастинок (НЧ) йоду та сірки містить частинки трикутної форми розміром 30–50 нм, округлі й неправильної форми частинки розміром 60–70 нм та їх агрегати округлої й неправильної форми розміром 150–200 нм. В композиції НЧ селену та йоду виявлено поодинокі частинки трикутної форми з довжиною сторони близько 30 нм та неправильної форми розміром 10–60 нм, а також їх агрегати округлої та неправильної форми розміром 150–200 нм. Максимально допустима концентрація композиції НЧ йоду та сірки для перещеплюваної культури клітин нирки ембріона свині становить 5 мкг/см³, композиції НЧ селену та йоду — 0,5 мкг/см³. Встановлено, що обидві композиції НЧ неметалів є нетоксичними для білих мишей у концентрації 2000 мг/кг.

Ключові слова: наночастинки неметалів, цитотоксичність, максимально допустима концентрація, гостра токсичність.

У всьому світі та в Україні зокрема наночастинки (НЧ) та нанотехнології дедалі частіше використовують для потреб сіль-

ського господарства [1, 2]. Застосування біогенних речовин у формі НЧ відкриває перед людством не тільки нові перспективи, але й створює нові ризики, зумовлені ймовірністю токсичного впливу на організм людини. Тому існує необхідність

© С.В. Дерев'яно, Л.М. Решотько, А.В. Васильченко, О.О. Дмитрук, М.С. Харчук, 2019

подальшого дослідження генотоксичного впливу та вивчення клітинного метаболізму за дії НЧ [3].

Встановлено, що НЧ можуть бути токсичними, здатними проникати в незміненому стані через клітинні мембрани, 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 та спричиняти цитотоксичний ефект, що обмежує їх використання [4]. Відомо, що токсичність НЧ залежить від їх форми і розмірів [5]. Крім того, за впливу НЧ на культури клітин та на організм чітко простежується зв'язок між концентрацією НЧ та біологічним ефектом, який вони викликають [6].

На відміну від НЧ металів, НЧ неметалів та їх композиції досліджено менше. У літературних джерелах наводяться дані, що НЧ елементарного селену є менш токсичними, ніж водорозчинні сполуки елемента, такі як діоксид селену, селенітна кислота та її солі [7]. Було доведено, що використання композиції НЧ кількох елементів підвищує ефективність розроблених засобів [8]. Разом з тим зміна рівня токсичності НЧ у цьому разі потребує додаткового вивчення.

Метою роботи було визначити форму та розміри композиції НЧ неметалів, їх цитотоксичну дію на культуру клітин та дослідити гостру токсичність на тваринах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідах використовували композиції НЧ йоду та сірки, селену та йоду, хелатовані аніонами лимонної кислоти, надані доктором технічних наук В.Г. Каплуненком (ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології»). Композиції НЧ отримано у спосіб абляції гранул йоду і сірки, селену та йоду у воді [9]. Перед використанням водні суспензії композицій НЧ неметалів розбавляли до потрібної концентрації та доводили значення рН до нейтрального. Суспензії

стерилізували автоклавуванням за тиску 0,7 атм упродовж 20 хв. Для контролю стерильності використовували м'ясо-пептонний агар та тіогліколеве середовище. Посіви інкубували при температурі 37°C. Тривалість інкубації становила 14 діб.

Цитотоксичність композицій НЧ неметалів вивчали в перещеплюваній культурі клітин нирки ембріона свині (СНЕВ), яку було отримано з ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН. Для вирощування культури клітин використовували живильні середовища 199 та Ігла, сироватку крові великої рогатої худоби (ТОВ НДП «Ветеринарна медицина», Україна). У сформований моношар культури клітин СНЕВ вносили поживне середовище, що містило досліджувані композиції НЧ неметалів у різних концентраціях. Використовували двократні розведення НЧ. Для кожної концентрації готували чотири пробірки з культурою клітин. У контрольному варіанті також здійснювали заміну поживного середовища, але без досліджуваних речовини. Облік результатів проводили з інтервалом 24 год упродовж 7 діб. Цитотоксичну дію внесених композицій НЧ оцінювали за порушенням цілісності моношару за допомогою світлової мікроскопії. Рівень токсичності визначали за дегенеративними змінами культури клітин.

Гостру токсичність композицій НЧ неметалів *in vivo* визначали на білих безпородних лабораторних мишах. Оцінку гострої токсичності здійснювали за ліміт-тестом [10].

Морфологію композицій НЧ неметалів вивчали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEOL JEM-1400 (Японія). Розведені суспензії з НЧ наносили на мідні сіточки з вуглецево-формварим покриттям і висушували на повітрі за кімнатної температури. Для визначення структури композицій НЧ неметалів використовували дифракцію електронів у відповідному режимі (Diffraction) з введенням польової і виведенням об'єктивної апертури трансмісійного електронного мікроскопа.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У перещеплюваній культурі клітин СНЕВ визначено максимальну допустиму концентрацію (МДК) для досліджуваних композицій НЧ неметалів. За результатами експерименту встановлено, що МДК композиції НЧ йоду та сірки становить 5 мкг/см^3 , селену та йоду — $0,5 \text{ мкг/см}^3$. За використання вищих від МДК концентрацій композицій НЧ неметалів спостерігалися дегенеративні зміни в культурі клітин СНЕВ: зміна забарвлення живильного середовища порівняно з контролем (рис. 1, сектор а), що свідчить про сповільнення метаболічних процесів або загибель клітин (рис. 1, сектор б); порушення цілісності моношару, розпластування і зморщування, вакуолізація клітин, їх округлення (рис. 1, сектор в) та збільшення розмірів (рис. 1, сектор г) тощо.

Визначення гострої токсичності здійснювали за описаними вище міжнародними правилами тестування невідомих хімічних речовин [10]. Результати проведеного дослідження свідчать, що обидві досліджувані композиції НЧ неметалів виявились нетоксичними для білих мишей у концентрації 2000 мг/кг . У тварин, які отримували НЧ, не спостерігалось ознак інтоксикації, усі вони залишалися живими впродовж 14 діб, не було виявлено відхилень від норми у поведінкових реакціях.

За допомогою електронної мікроскопії досліджено форми та розміри композицій НЧ неметалів (рис. 2). У препаратах, що містять композицію НЧ йоду та сірки, виявлено окремі НЧ трикутної, округлої й неправильної форми та їх агрегати округлої і неправильної форми. Зокрема, НЧ трикутної форми мали довжину сторони близько $30\text{--}50 \text{ нм}$, розміри НЧ округлої та неправильної форми становили $60\text{--}70 \text{ нм}$. Розміри агрегатів НЧ були в межах $150\text{--}200 \text{ нм}$ (рис. 2, сектор а).

У препаратах композиції НЧ селену та йоду спостерігалися як поодинокі

НЧ трикутної та неправильної форми, так і їх агрегати округлої та неправильної форми. Зокрема, НЧ трикутної форми мають довжину сторони близько 30 нм , розмір НЧ неправильної форми — $10\text{--}60 \text{ нм}$. Роз-

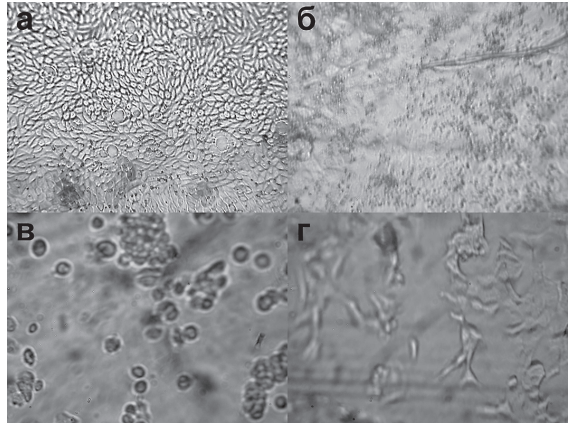


Рис. 1. Цитотоксична дія НЧ у культурі клітин СНЕВ: а — культура клітин СНЕВ без НЧ; б, в, г — дегенеративні зміни в культурі клітин СНЕВ за дії високих концентрацій композицій НЧ неметалів

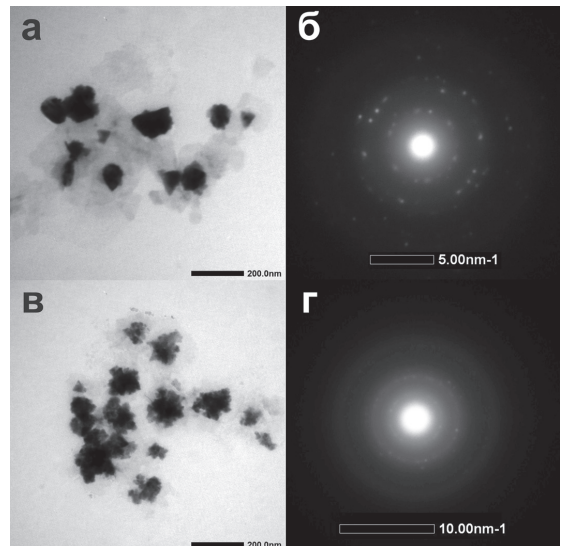


Рис. 2. Мікрофотографії трансмісійної електронної мікроскопії зразків композицій НЧ неметалів та їх електронограми дифракції електронів: а, б — йоду та сірки, в, г — селену та йоду відповідно

мір агрегатів становить 150–200 нм (рис. 2, сектор в).

Агрегати композицій НЧ йоду та сірки, селену та йоду мають кристалічну природу, що підтверджується відповідними електронограмами дифракції електронів (рис. 2, сектори б та г).

Порівняння результатів проведеного авторами дослідження з літературними даними засвідчує високу цитотоксичність композицій НЧ селену та йоду: МДК для культури клітин СНЕВ становить 0,5 мкг/см³. Цей показник є вищим, ніж у НЧ селену та, навіть, діоксиду селену (SeO₂). Результатами досліджень цитотоксичності сферичних НЧ селену [7], які мали діаметр 80–220 мкм, та SeO₂ було встановлено, що ТЦД₅₀ для НЧ селену становить 41,5±0,9 мкг/см³, а для SeO₂ — 6,7±0,8 мкг/см³. Це значно більше, ніж МДК композиції НЧ селену та йоду, що свідчить про їх високу цитотоксичність для культури клітин СНЕВ. Такий рівень цитотоксичності може бути зумовлено низкою чинників, як-от: алотропна модифікація селену у НЧ, їхня морфологія, розміри, присутність йоду у композиції НЧ селену

та йоду, рівень чутливості різних культур клітин до НЧ неметалів, методи вимірювання цитотоксичної дії [7].

ВИСНОВКИ

З огляду на розміри та форми НЧ і на те, що вони мають доволі низьку МДК та проявляють значну цитотоксичну дію в перещеплюваній культурі клітин СНЕВ, навіть за дуже низьких концентрацій, можна передбачити їх високу активність щодо інших живих об'єктів. Композиції НЧ йоду та сірки, селену та йоду в МДК можуть бути використані для вивчення їх віруліцидної, фунгіцидної та бактерицидної властивостей стосовно інших тест-об'єктів, що є необхідним етапом розробки протівірусних засобів та нових препаратів для захисту сільськогосподарських культур від хвороб та шкідників.

Незважаючи на порівняно високу цитотоксичність, композиції НЧ неметалів виявились нетоксичними для білих мишей за перорального введення, тому, окрім високої активності, засоби та препарати на основі НЧ неметалів повинні мати високу біосумісність, що робить їх ще перспективнішими.

ЛІТЕРАТУРА

1. Біологічна дія функціональних наноматеріалів у різних видів тварин / В.В. Влізлю, М.І. Бащенко, Р.Я. Іскра та ін. // Вісник аграрної науки. — 2015. — № 11. — С. 80–86.
2. Ефективність застосування нових мікроелементних комплексів при вирощуванні пшениці озимої / О.Є. Давидова, В.Г. Каплуненко, М.Д. Аксilenко та ін. // Физиология растений и генетика. — 2015. — № 3. — С. 212–223.
3. Клестова З.С. Нанотехнології та біоризики / З.С. Клестова, А.М. Головка // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. — 2014. — № 2–3. — С. 329–339.
4. Нанотехнологии в биологии и медицине. Современное состояние вопроса [Електронний ресурс] / Коллективная монография под ред. Е.В. Шляхто. — 2009. — Режим доступу: <http://prostonauka.com/nano/nanotechnologii-v-biologii-i-medicine>
5. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges [Електронний ресурс] / M. Ferrari // Nat. Rev. Cancer. — 2005. — Vol. 5, No. 3. — P. 161–171. — Режим доступу: <https://doi.org/10.1038/nrc1566>
6. Нанотехнології в медицині, фармації та фармакології / Л.Г. Розенфельд, І.С. Чекман, А.І. Тертишна, М.І. Загородний // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2008. — № 3. — С. 65–71.
7. Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide [Електронний ресурс] / H. Forooshanf, M. Adeli-Sardou, M. Nikkhoo et al. // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. — 2014. — Vol. 28, No. 1. — P. 75–79. — Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.07.005>
8. Пат. 53252 Україна, МПК С02F 1/50, А61L 2/16. Спосіб отримання бактерицидного засобу з сріблом і міддю / В.Л. Коваленко, Є.Г. Афтандіянц, Д.А. Засекін та ін. — Заявл. 27.04.2010; опубл. 27.09.2010, Бюл. 18.
9. Пат. 23550 Україна, МПК В22F 9/14. Спосіб ерозійно-вибухового диспергування металів / М.В. Косінов, В.Г. Каплуненко. — Опубл. 25.05.2007, Бюл. 7.
10. OECD Guideline 425 for the Testing of Chemicals (Limit Test) [Електронний ресурс]. — Режим доступу: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl425-508

REFERENCES

1. Vlizlo, V.V., Bashchenko, M.I., Iskra, R.Ya., Fedoruk, R.S., Zhukorskyi, O.M., Mezentseva L.M. (2008). Biologichna diia funktsionalnykh nanomaterialiv u riznykh vydiv tvaryn [Biological effects of various nanomaterials on different animal species]. *Visnyk ahrarynoi nauky – Herald of Agrarian Science*, 11, 80–86 [in Ukrainian].
2. Davydova, O.Ye., Kaplunenko, V.H., Aksylenko, M.D., Derevianko, K.Yu., Mokrynski V.M. (2015). Efektivnis zastosuvann novykh mikroelementnykh kompleksiv pry vyroshchuvanni psheynytsi ozymoi [The efficiency of the use of novel microelement complexes in winter wheat planting]. *Fyziolohiya rastenni y henetyky – Physiology of Plants and Genetics*, 3, 212–223 [in Ukrainian].
3. Klestova, Z.S., Holovko, A.M. (2014). Nanotekhnolohii ta bioryzky [Nanotechnologies and biohazards]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu biolohii tvaryn i Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho instytutu vetpreparativ ta kormovykh dobavok – Scientific and Technological Bulletin of the Institute of Animal Biology and State Scientific and Research Institute for Veterinary Drugs and Food Supplements*, 2–3, 329–339 [in Ukrainian].
4. Shlyakhto, E.V. (Ed.). (2009). Nanotekhnologii v biologii i medicine [Nanotechnology in biology and medicine]. *prostonauka.com*. Retrieved from: <http://prostonauka.com/nano/nanotekhnologii-v-biologii-i-medicine> [in Russian].
5. Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges *Nat. Rev. Cancer*, 5 (3), 161–171. Retrieved from: <https://doi.org/10.1038/nrc1566> [in English].
6. Rozenfeld, L.H., Chekman, I.S., Tertyshna, A.I., Zahorodnyi, M.I. (2008). Nanotekhnologii 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].
7. Forootanfar, H., Adeli-Sardou, M., Nikkhoo, M., Mehrabani, M., Amir-Heidari, B., Shahverdi, A.R., Shakibaie, M. (2014). Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28 (1), 75–79. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.07.005> [in English].
8. Lopatko, K.G., Aftandilansh, E.G., Kovalenko, V.L., Yashchenko, M.F., Zasekin, D.A., Solomon, V.V. (2010). Sposib otry`mannya bakteriy`cy`dnogo zasobu z sriblom i middyu [A method for obtaining bactericidal agent containing silver and copper]. *Patent of Ukraine No. 53252; from 27th April 2010; 27th September 2010. Bul. No.18. Ukraine* [in Ukrainian].
9. Kosinov, M.V., Kaplunenko, V.G. (2007). Sposib erozijno-vy`buxovogo dy`spervuvannya metaliv [A method of an erosive-bursting dispersion of metals]. *Patent of Ukraine No. 23550; 09 th February; 25th May. Bul. No.7. Ukraine* [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/iccvm/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl425-508.pdf [in English].

Стаття надійшла до редакції журналу 26.10.2019