

sections were stained with hematoxylin and eosin To histochemical studing sections were stained with Alcian blue for acid mucopolysaccharides, by Lugol for glycogen and with Sudan black B for lipids. The results were analyzed on a personal computer using a light microscope with a digital camera. The data were statistical analyzed.

Results and Conclusions. The features of histomorphological and histochemical changes in liver, heart, gizzard and skeletal muscle at chickens, sick with experimental salmonellosis caused by S. Typhimurium were determined. According to the results of histomorphological study, it was found that morphological changes of tissues at salmonellosis characterized by dystrophy, inflammation and necrosis. At muscle and heart sections hyperemia and muscle fibers necrosis was observed. At liver sections granular dystrophy and sinusoidal capillaries degeneration was observed. According to the results of histochemical studies it was found an increase in the level of acid mucopolysaccharides in the areas of acute inflammation. The total level of lipid and glycogen are reduced, which is associated with increased energy metabolism.

Keywords: poultry products, quality and safety, morphological and chemical changes, avian salmonellosis.

УДК 576.535:576.38:[546.57+546.713-31+546.72+546.47]-022.532

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ДИОКСИДА МАРГАНЦА, ЦИНКА И ЖЕЛЕЗА (НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК FLK-SBBL)

Магац Д.Ю., Стегний Б.Т., Стегний М.Ю.

Национальний научний центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», г. Харків, Україна, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

Изучено возможное цитотоксическое воздействие наночастиц серебра, диоксида марганца, цинка и железа на перевиваемую культуру клеток FLK-SBBL, которая является основным продуцентом лейкозного антигена для диагностических тест-систем по выявлению вируса лейкоза крупного рогатого скота. В ходе исследований установлено цитотоксическое влияние наночастиц диоксида марганца и цинка, проявляющееся в виде разрушения монослоя и пикноза клеток перевиваемой культуры. Под действием наночастиц железа цитотоксический эффект проявлялся повышенной зернистостью цитоплазмы клеток FLK-SBBL. Под влиянием наночастиц серебра цитотоксическое действие не проявлялось, морфологическое состояние клеток было лучше, чем в контроле.

Ключевые слова: культура клеток FLK (fetal lamb kidney), наночастицы, серебро, диоксид марганца, цинк, железо, цитотоксичность.

Важным фактором предотвращения распространения лейкоза крупного рогатого скота (КРС) является проведение серологической диагностики заболевания. Реакция иммунной диффузии (РИД) наряду с иммуноферментным анализом, принятая Международным эпизоотическим бюро (МЭБ), является основным диагностическим методом в программах профилактики и ликвидации лейкоза КРС (BLV) [5]. Для выявления маркеров лейкоза в РИД в качестве антигена используется инактивированный вирус, выращенный на перевиваемой культуре клеток FLK (fetal lamb kidney) [11]. Перевиваемая культура FLK-BLV была получена путем инокуляции лейкоцитами-носителями вируса лейкоза крупного рогатого скота клеток эмбриональной почки в 1976 году Van Der Maaten M.J. и Miller J.M в США, штат Айова [1, 9].

В криобанке ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» (ННЦ «ИЭКВМ») собрана Коллекция культур клеток животного происхождения, которая имеет статус Национального достояния Украины с 2004 года. Сублинию клеток FLK-SBBL, которая хранится в криобанке, получено в лаборатории биотехнологии ННЦ «ИЭКВМ» в 2003 году после длительного селекционного отбора наиболее жизнеспособных клеток методом уменьшения частоты пассажей. После чего клетки двукратно клонировали методом пограничных разведений. В результате было получено культуру клеток с унифицированными морфологическими признаками и активной пролиферацией. Главной задачей в настоящее время при использовании этой перевиваемой культуры является изучение изменения ее свойств под воздействием разнообразных абиотических факторов [3].

В последнее время происходит активное развитие нанотехнологий. Феномен наноразмерного парадокса свойств с переходом от микро- до наноразмеров до конца еще не изучен, но уже нашел достаточно широкое применение во всех отраслях: технике, медицине и ветеринарии [6]. Свойства наноматериалов, размером от 1 до 100 нм, крайне отличаются от свойств того же вещества в макроформе [2]. Малые размеры наночастиц дают им возможность образовывать связи с белками и нуклеиновыми кислотами, тем самым изменяя их свойства. Наночастицы также обладают высокой каталитической и реакционной активностью, что может приводить к чрезмерному образованию свободных радикалов и разрушению биологических структур клеток. Уникальные свойства наночастиц, их способность проникать сквозь биологические барьеры, влиять на метаболические процессы и структуру ДНК открывают широкие перспективы их использования в разнообразных сферах деятельности человека [8, 10].

В аспекте всестороннего внедрения результатов нанотехнологий в практику, остается открытым вопрос безопасности наночастиц при взаимодействии с организмом человека и сельскохозяйственных животных. Особое внимание в исследованиях уделяют наночастицам металлов. До сегодняшнего времени эффекты наночастиц металлов разделяли на 2 группы:

1) Нанометаллы, которые обладают биоцидным воздействием (зарегистрировано в основном в экспериментах с микроорганизмами);
2) Нанометаллы, которые вызывают изменения функций живых организмов, в том числе и человека. Изменения функций может носить как негативный, так и позитивный характер [7].

Взаимодействие нанометаллов с биологическими системами, особенно на уровне эукариотической клетки, остается мало изученным. Наглядным методом изучения влияния наночастиц металлов на клетки является проведение исследования на цитотоксичность. С помощью клеточной тест-культуры средствами микроскопии можно всесторонне оценить влияние исследуемых веществ на клетки. В частности, оценивать такие морфофункциональные характеристики, как морфология клеток и динамика формирования монослоя под воздействием исследуемых веществ и в контроле [4].

Поэтому целью нашей работы было изучение цитотоксического действия наночастиц серебра, диоксида марганца, цинка и железа на перевиваемую культуру клеток FLK-SBBL.

Материалы и методы. В исследовании были использованы наночастицы серебра (Ag), диоксида марганца (Mn), цинка (Zn) и железа (Fe). Часть нанометаллов – Ag размером ($31,5 \pm 0,9$ нм), Zn размером (100 ± 10 нм), Mn размером ($27,0 \pm 3,0$ нм) и Fe размером (100 ± 10 нм) представляют собой коллоидные дисперсии, а другие – Ag размером (30 нм), Zn размером (5–50 нм) и Fe размером (5–50 нм) – химически-скоординированные карбоксилаты металлов. Коллоидные дисперсии применяли в разведении от общей концентрации 1:20, 1:100 и 1:200, а карбоксилаты металлов – в разведении 1:10. Суспензии наночастиц были устойчивы к формированию конгломератов и седиментации.

Исследование цитотоксичности нанометаллов проводили согласно патенту Украины на полезную модель № 45458 от 10.11.2009 г. «Спосіб визначення якості та безпеки водорозчинних речовин за допомогою клітинної тест-системи» [4] в трёх повторах. Для этого культуру клеток FLK-SBBL с посевной концентрацией 220 тыс. клеток/см³ высевали в 24-луночные планшеты и культивировали при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе.

Через сутки культивирования клеток провели микроскопирование и на сформированный монослой клеток внесли наночастицы металлов в заданных концентрациях; одно разведение наночастиц – в четыре лунки планшета. Для контроля культуры клеток оставляли такое же количество лунок. За культурой клеток проводили двухразовое ежедневное наблюдение в течение 24, 48 и 72 часов влияния наночастиц металлов, сравнивая состояние исследуемых клеток с контролем.

Результаты исследования. Через сутки культивирования перевиваемой культуры FLK-SBBL путем микроскопирования выявлено, что клетки прикрепились, дали рост, монослой выполнен на 90–100 %. Спустя сутки культивирования клеток с наночастицами выявили цитотоксическое воздействие на клетки наночастиц цинка в разведении 1:10 (рис. 2), 1:100, 1:200, а также диоксида марганца 1:100 (рис. 3) и 1:200 по сравнению с контролем (рис. 1). Цитотоксичность при этом проявлялась в виде начала разрушения монослоя, появления округлых клеток в случае Zn 1:10, Zn 1:200, Mn 1:200 и полной деструкции монослоя под влиянием Zn 1:100, Mn 1:100.

В вариантах культивирования с наночастицами серебра и железа морфологических изменений монослоя не выявили.



Рис. 1. Контроль клеток культуры FLK-SBBL (вторые сутки культивирования)

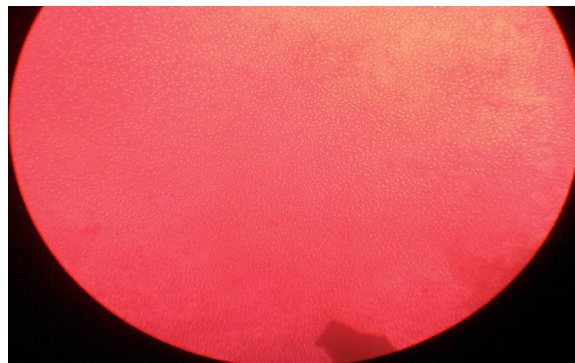


Рис. 2. Клетки культуры FLK-SBBL под воздействием наночастиц цинка 1:10 (через 24 часа влияния)

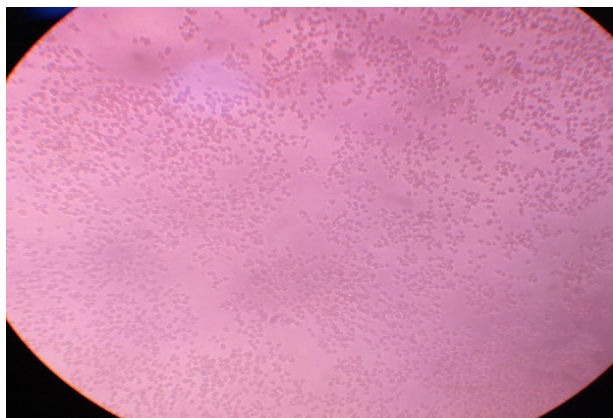


Рис. 3. Клетки культуры FLK-SBBL под воздействием наночастиц диоксида марганца 1:100 (через 24 часа влияния)

На вторые сутки влияния наночастиц металлов в вариантах Fe 1:10 (рис. 4), Fe 1:20 та Fe 1:100 появились округлые набухшие клетки, наблюдался пикноз клеток.

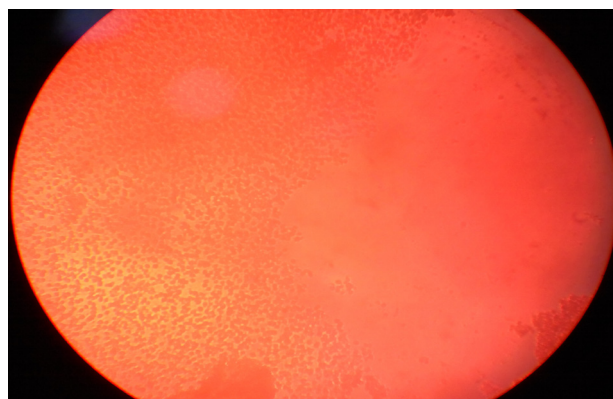


Рис. 4. Клетки культуры FLK-SBBL под воздействием наночастиц железа 1:10 (через 48 часов влияния)

В варианте культивирования клеток с наночастицами диоксида марганца 1:200 и цинка 1:200 (рис. 5) наблюдали «сливной» рост (клетки без четких границ), а при воздействии наночастиц цинка 1:10 – полную деструкцию монослоя.

В тоже время монослой под воздействием наночастиц серебра во всех исследуемых концентрациях не отличался от контрольного варианта, то есть цитотоксический эффект отсутствовал.

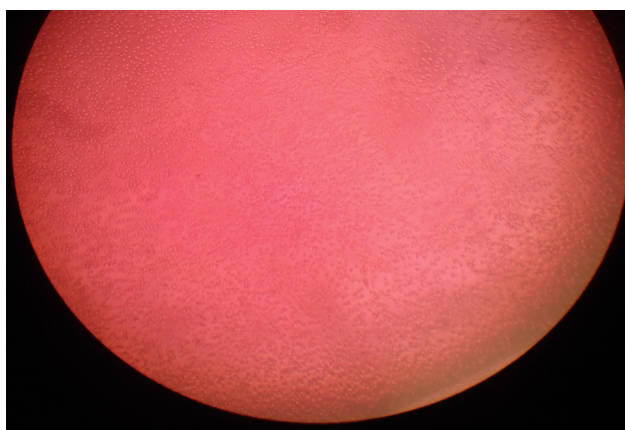


Рис. 5. Клетки культуры FLK-SBBL под воздействием наночастиц цинка 1:200 (через 48 часов влияния)

Через 72 часа воздействия наночастиц было выявлено следующие эффекты на клетки: Fe 1:10 – разрушение 50 % монослоя (рис. 6), Fe 1:20 – 40–50 % клеток округлые или сморщенные, Fe 1:100 – около 20% округлых клеток, Zn 1:10, Zn 1:100 (рис. 7) и Zn 1:200 – монослой разрушен, набухшие клетки, Mn 1:100 и Mn 1:200 – монослой разрушен, около 30 % округлых клеток. В вариантах при воздействии наночастиц серебра в разведении 1:10 и 1:20 клетки находились в состоянии, аналогичном с контролем, а при действии наночастиц серебра в разведении 1:100 зернистость в цитоплазме клеток была ниже, чем в клетках контроля (рис. 8).

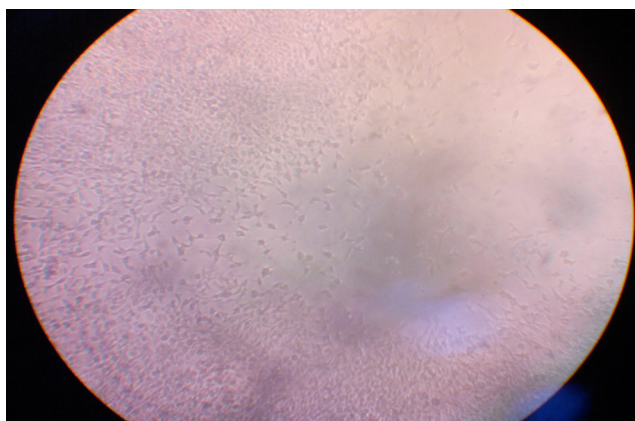


Рис. 6. Клетки культуры FLK-SBBL под воздействием наночастиц железа 1:10 (через 72 часа влияния)

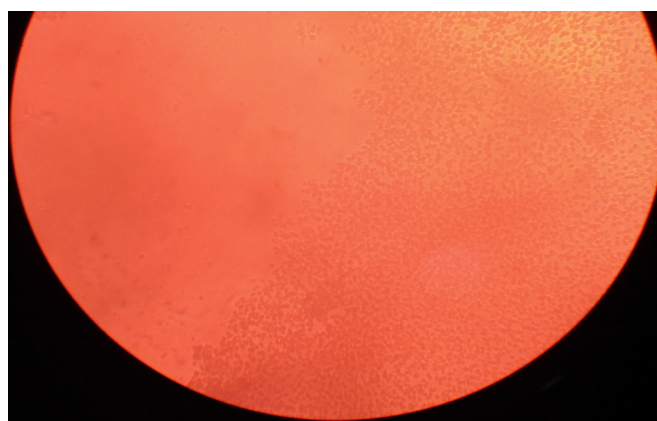


Рис. 7. Клетки культуры FLK-SBBL под воздействием наночастиц цинка 1:100 (через 72 часа влияния)

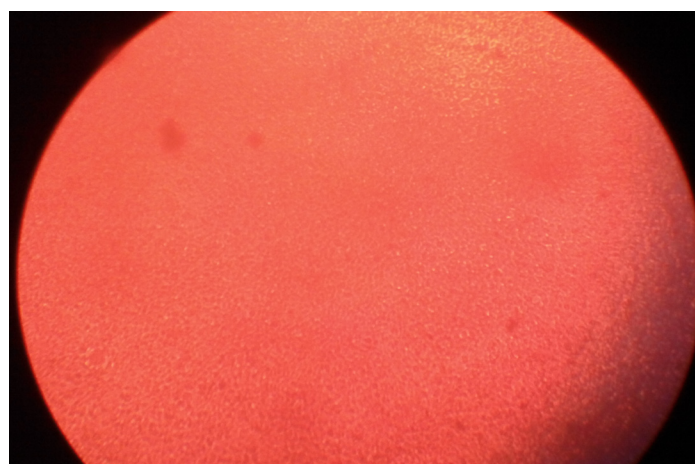


Рис. 8. Клетки культуры FLK-SBBL под воздействием наночастиц серебра 1:100 (через 72 часа влияния)

Выводы. 1. При изучении цитотоксического воздействия наночастиц металлов на сублинию перевиваемой культуры клеток FLK-SBBL установлено, что наночастицы диоксида марганца и цинка во всех разведениях 1:100 оказывали существенный цитотоксический эффект на рост и размножение клеток, который проявлялся в полной деструкции монослоя с первых суток влияния.

2. При воздействии наночастиц диоксида марганца 1:200 и цинка 1:10 и 1:200 цитотоксичность проявлялась в виде начала разрушения монослоя с последующей полной деструкцией.

3. Применение наночастиц железа во всех разведениях оказывало негативное воздействие в виде повышенной зернистости в цитоплазме клеток, но в тоже время менее выраженное, чем при влиянии наночастиц диоксида марганца и цинка.

4. Наночастицы серебра в разведениях 1:10 и 1:20 не оказывали цитотоксического действия на исследуемые культуральные клетки. В тоже время применение наночастиц серебра в разведении 1:100 улучшало морфо-функциональные показатели FLK-SBBL по сравнению с контролем.

Список літератури

1. Антигенпродукуюча активність FLK-клітин в ростових субстратах з нативною та аглобуліною сироватками крові великої рогатої худоби [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.] // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 82. – С. 568570.
2. Гарець В. І. Моделювання впливу важких металів та нанометалів на організм і ембріогенез в експерименті [Текст] / В. І. Гарець // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 1, т. 2 (99). – С. 254258.
3. Деклараційний патент на винахід № 55921 Україна, МПК С12N 5/06 (2007.01). Штам перещеплюваних клітин нирки вівці FLK-SBBL, який продукує вірус лейкозу великої рогатої худоби [Текст] / Стегній Б. Т., Білокінь В. С., Берус П. Т., Лаврик О. А. (Україна); заявник і правовласник Нац. наук. центр "Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини". – № u2002076125; заявл. 23.07.2002; опубл. 15.04.2003, Бюл. № 4. – 4 с.
4. Деклараційний патент на корисну модель № 45458 Україна, МПК (2009) G01N 33/15. Спосіб визначення якості та безпеки водорозчинних речовин за допомогою клітинної тест-системи [Текст] / Стегній Б. Т., Стегній М. Ю., Юрченко О. М., Головка В. О. (Україна); заявник і правовласник Нац. наук. центр "Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини". – № u200905847; заявл. 09.06.09; опубл. 10.11.09, Бюл. № 1. – 4 с.
5. Диагностические свойства синтезированного в *Escherichia coli* рекомбинантного антигена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / К. Н. Мукантаев [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 2. – С. 4752.
6. Дослідження впливу нанометалів на стан репродуктивної функції в експерименті [Текст] / В. Ф. Шаторна, В. І. Гарець, О. О. Савенкова, І. І. Колосова // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, № 1, ч. 1 (61). – С. 246250.
7. Кабаяси Н. Введение в нанотехнологию [Текст] / Н. Кабаяси. – М.: Бином, 2008. – 134 с.
8. Перспективы использования достижений нанотехнологии для решения проблемы дефицита микроэлементов в питании населения / А. М. Сердюк, М. П. Гулич, В. Г. Каплуненко, Н. В. Косинов // Актуальні питання та організаційно-правові засади співробітництва України та КНР у сфері високих технологій: зб. матеріалів VI Міжнар. наук.-практ. конф. (Київ, 2 червня 2009 р.). – К., 2009. – С. 135140.
9. Bovine leukemia virus (BLV) specific RNA in infected cells [Text] / T. Astier [et al.] // Ann. Rech. Vet. – 1978. – Vol.9, № 4 – P. 643649.
10. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy / G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson [et al.] // Particle and fibre toxicology. – 2005. – Vol. 2, № 8. – P. 235246.
11. Van Der Maaten M. J. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cultures [Text] / M. J. Van Der Maaten, J. M. Miller // Bibl. Haematol. – 1976. – Vol. 43. – P. 360362.

EXAMINATION OF CYTOTOXIC PROPERTIES OF NANOPARTICLES OF SILVER, MANGANESE DIOXIDE, ZINC AND IRON (ON A LONG-TERM CELL CULTURE FLK-SBBL)

Magats D.Y., Stegnyy B.T., Stegnyy M.Yu.

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

The cytotoxic influence of nanoparticles of Silver, Manganese Dioxide, Zinc and Iron on a long-term cell culture FLK-SBBL, which is the main producer of a leukemic antigen for diagnostic tests for the detection a bovine leukemia virus, was studied. The cytotoxic effect of nanoparticles of Manganese dioxide and Zinc in the form of destruction of the monolayer cells and pyknosis was established. Under the influence of nanoparticles of Iron observed increased granularity in the cell cytoplasm. In the options under the influence of Silver nanoparticles in a dilution of 1:20 and 1:100 morphology of the cells was better than that in the control.

Keywords: culture cells FLK (fetal lamb kidney), nanoparticles of Silver, Manganese Dioxide, Zinc and Iron, cytotoxicity.