

INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF SILVER AND MANGANESE DIOXIDE ON CYTOGENETIC INDEXES OF LONG-TERM CULTURE CELLS FLK-BLV**Stegniy M.Y., Magats D.Y., Yurchenko O.M.**

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

The article examines the use of nanotechnology in veterinary practice, namely in the biotechnological process cultivation of long-term cell culture FLK-BLV and production of leukemic antigen. In the experiments used the following methods: express - supravital staining method for determining the safety of cells, cytological control of mitotic activity and stability of long-term cell culture FLK-BLV, method of making preparations for cytogenetic chromosomes analysis to determine the changes of chromosomes under the influence of nanoparticles, investigations of shapes and amount of pathological mitoses.

Cytogenetic parameters and mitotic activity of long-term cell culture FLK-SBBL under the influence of nanoparticles of Manganese dioxide were studied. If in control variation modal class was 60, options under the influence of Manganese dioxide in dilutions of 1:20 and 1:100 – 56-58 and 54-56, respectively. Under the influence of Argentum 1:20 modal class ranged from 56 to 60 chromosomes.

In the process of cytological research revealed changes mitotic activity and offset max of MA in time relative to control. The main forms of pathological mitoses, discovered in the research process were K-mitosis and hollow metaphase. The amount of mitoses were the highest on the second day of cultivation in almost all variations, which could indicate damage cell mitotic apparatus. In addition, the negative effect of nanoparticles of Silver 1:20 (morphological changes of cells) and Manganese dioxide (destruction of the monolayer) on the cell culture.

Keywords: cell culture FLK (fetal lamb kidney), nanoparticles of metals, cytogenetic parameters, mitotic activity, pathological mitosis.

УДК 636.09:620.2-181.4:602.3:579.852.11

ВИВЧЕННЯ МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ НАНОМАТЕРІАЛІВ У БІОТЕХНОЛОГІЇ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ СИБІРКИ ТВАРИН**Ушкалов В.О., Мачуський О.В., Ковтун В.А.**

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Романько М.Є.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: marina_biochem@list.ru

Грузіна Т.Г., Резніченко Л.С.

Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка, м. Київ

*У статті наведено біотехнологію виготовлення експериментальних серій вакцини *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 та результати їх лабораторного дослідження. Показано, що рівень імуногенності даних препаратів коливається в межах 90–100 %. Отримані результати є підґрунтям для вивчення безпечності та ефективності препаратів із наночастинками золота в умовах господарств України.*

Ключові слова: сибірка, наноматеріали, безпечність, імуногенність.

Сибірка – унікальне захворювання тварин і людини, яке раз виникнувши на певній місцевості, може укорінитися, зберігаючи загрозу виникнення спалахів на багато десятиріч [1].

Літературні джерела стверджують, що людству з давніх-давен відомо захворювання, що за симптомами схоже на сибірку. Але лише з другої половини XVIII століття її відмежували в окрему нозологічну одиницю, що стало відправною точкою для ведення офіційної статистики по даному захворюванню [2, 3].

Умовно можна виділити періоди до та після винайдення препаратів (1881 р.) для специфічної профілактики антраксу. Період до винайдення вакцини проти сибірки характеризується масштабними, дифузними та не контрольованими спалахами даного захворювання серед тварин, та як наслідок, і серед людей. Період після 188 року характеризується з одного боку поступовим взяттям під контроль поширення спалахів сибірки та тенденцією до зниження їх кількості, з іншого – постійним вдосконаленням вакцинних препаратів і заходів для профілактики захворювання.

Завдяки таким заходам та їх масштабності вже починаючи з другої половини XX століття вдалося звести до мінімуму захворюваність на сибірку серед людей і тварин. Але феномену повної ліквідації не відбулося, ймовірно, за рахунок тривалого періоду збереженості збудника в ґрунті.

Нинішні погляди науковців на проблему сибірки змінили свій вектор – збудник сибірки посідає перше місце у списку агентів, що застосовуються з метою біотероризму [4, 5].

Таким чином, проблема сибірки відома людству здавна, вона призводить до значних економічних збитків та несе постійну загрозу життю людей (як від тварин, через продукти харчування, так і через можливість її використання для біотероризму).

Тому одним із пріоритетних напрямів досліджень є розробка нових засобів для профілактики сибірки та удосконалення існуючих – шляхом підвищення рівня їх імуногенності, у тому числі за рахунок використання в біотехнології їх виробництва наноматеріалів [5].

Метою досліджень було експериментальне обґрунтування можливості використання матеріалів у нанорозмірному діапазоні при конструюванні та виготовленні ветеринарних препаратів для профілактики сибірки тварин.

Матеріали та методи. Робота виконана на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ) у співпраці із науковими співробітниками Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка (м. Київ) та працівниками Херсонського державного підприємства-біологічна фабрика (м. Херсон).

Об'єктом наших досліджень були ветеринарні імунобіологічні засоби для профілактики сибірки тварин.

Під час проведення досліджень використовувалися бактеріологічні, біохімічні, фізико-хімічні, культуральні, мікроскопічні, біологічні та статистичні методи досліджень.

Штами мікроорганізмів, що використовували в дослідженнях: *Bacillus anthracis Sterne 34F2*, *Bacillus anthracis M-71* паспортизовані та депоновані у Депозитарії ДНКІБШМ.

При виконанні роботи для культивування бактерій використовували рідкі, щільні та напіврідкі поживні середовища: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) (рН=7,2±0,2, аміний азот 110±10 мг %), бульйон Хоттінгера (рН=7,0±0,2, аміний азот 120±10 мг %), середовище ГКИ, м'ясо-пептонний агар (МПА), агар Хоттінгера, тіогліколеве середовище. МПБ, МПА, бульйон та агар Хоттінгера виготовляли за загальноприйнятими методиками [6, 7].

Виготовлення експериментальних зразків вакцин (Таблиця 1) проводили в умовах Херсонського державного підприємства-біологічна фабрика в декілька етапів (Рис. 1).

Першим етапом було виготовлення матричної культури вакцинного штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2*, перевірка її на відсутність інволюційних форм сибіркового мікробу та контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою. При цьому матричну розплідку виготовляли в двох варіантах: без частинок нанозолота та з частинками нанозолота. Другим – накопичення бактеріальної маси вище названого мікроорганізму та третім – формування серій вакцин з частками та без часток нанозолота.

Виготовлення матричної культури проводили в рідкому поживному середовищі бульйон Хоттінгера (аміний азот 100–120 мг %, рН 7,4±0,2) та інкубацією в термостаті за температури (37±1) °С протягом 24 годин з або без додавання наночасток золота.

Таблиця 1 – Препарати, виготовлені в умовах Херсонського державного підприємства-біологічна фабрика

№ зразку	Назва	Опис
1.	Вакцина <i>Sterne34F2-Au/M</i>	Препарат виготовлено з матричної розплідки, вирощеної в середовищі, з додаванням наночастинок золота
2.	Вакцина <i>Sterne34F2-Au</i>	Препарат виготовлено з матричної розплідки без додавання нанозолота, а отриману спорову суспензію консервовано 30 % гліцерином з їх додаванням
3.	Вакцина <i>Sterne34F2</i>	Препарат виготовлено з матричної розплідки без додавання нанозолота, а отриману спорову суспензію консервовано 30 % гліцерином

Визначення контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою проводили згідно ДСТУ 4483:2005.

Накопичення бактеріальної маси *anthracis Sterne 34F2* проводили в ємностях на щільному поживному середовищі агар Хоттінгера та інкубацією в термальній камері за температури (37±1) °С протягом 4-ох діб.

Отриману бактеріальну масу змивали зі щільного середовища стерильним фосфатно-буферним розчином (ФБР) та перевіряли на відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою згідно ДСТУ 4483:2005.

Під час формування серій використовували стерильний гліцерин на ФБР – для вакцини без наночасточок золота та для вакцини, матрична культура *Bacillus anthracis* котрої була виготовлена в середовищі з нанозолотом; стерильний гліцерин на ФБР з наночасточками золота у співвідношенні в

кінцевому продукті 1:8 – для вакцини з нанозолотом. Концентрація золота в кінцевому продукті складала 19 ± 2 мкг/см³.

Контроль якості виготовлених зразків проводили за наступними показниками: зовнішній вигляд, масовий вміст гліцерину, контамінація сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою, капсулоутворення, визначення кількості життєздатних спор, визначення рухливості штаму, визначення морфології культури, визначення нешкідливості, визначення імуногенної активності (імуногенності) відповідно до «Методики міжвідомчих комісійних досліджень вакцин проти сибірки тварин із штаму *Sterne 34F2* (ДНКІБШМ)» [8, 9].

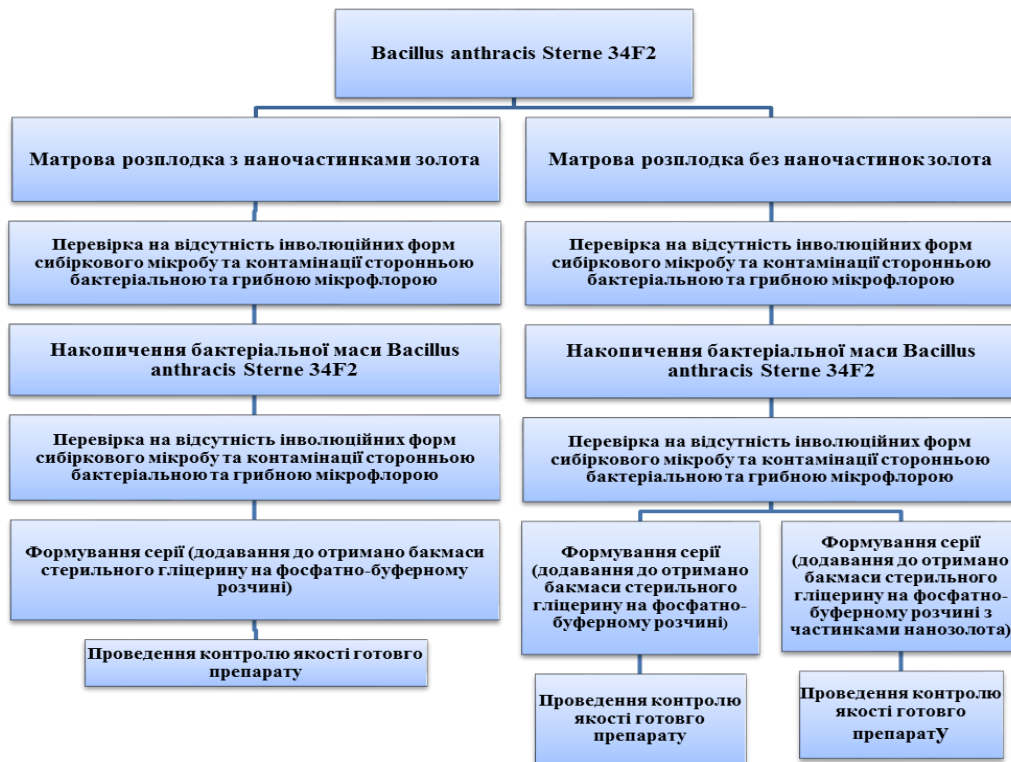


Рис. 1. Етапи виробництва експериментальних серій препаратів

Стандартизований не мутагенний, не генотоксичний та біобезпечний розчин колоїдного золота, що містив частинки у наностані виготовляли в Інституті біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка за оригінальними методиками Т.Г. Грузіної та Л.С. Рєзніченко [5]. У дослідженнях використовували наночастинки золота від $(19,0 \pm 0,9)$ нм до $(30,4 \pm 0,5)$ нм в кінцевій концентрації 19 ± 2 мкг/см³.

Експериментальні дані статистично та математично обробляли методами варіаційної статистики з використанням програми «Microsoft Excel – 14». Для позначення кількості повторів дослідів використовували латинську літеру «n», а кількості тварин в досліді – «N».

Результати досліджень та їх обговорення. Під час визначення типовості росту та морфології культури, у дослідних зразках вакцин, було виявлено ріст культури штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2* у рідкому поживному середовищі МПБ у вигляді шматочка вати на дні пробірки, який при струшуванні руйнувався та підіймався у вигляді коси, на поверхні середовища та на стінках пробірки плівки були відсутні, бульйон – прозорий. На щільному поживному середовищі МПА (з додаванням 1,5 % агар-агару) після 24 годин інкубації утворювалися однорідні дрібні колонії з завитками по краях сірувато-білого кольору зі сріблястим відтінком.

Під час вивчення залишкової вірулентності всі дослідні морські свинки залишилися живими.

Визначення імуногенності проводили відповідно до розроблених критеріїв якості [5], результати дослідження відображено на рис. 2.

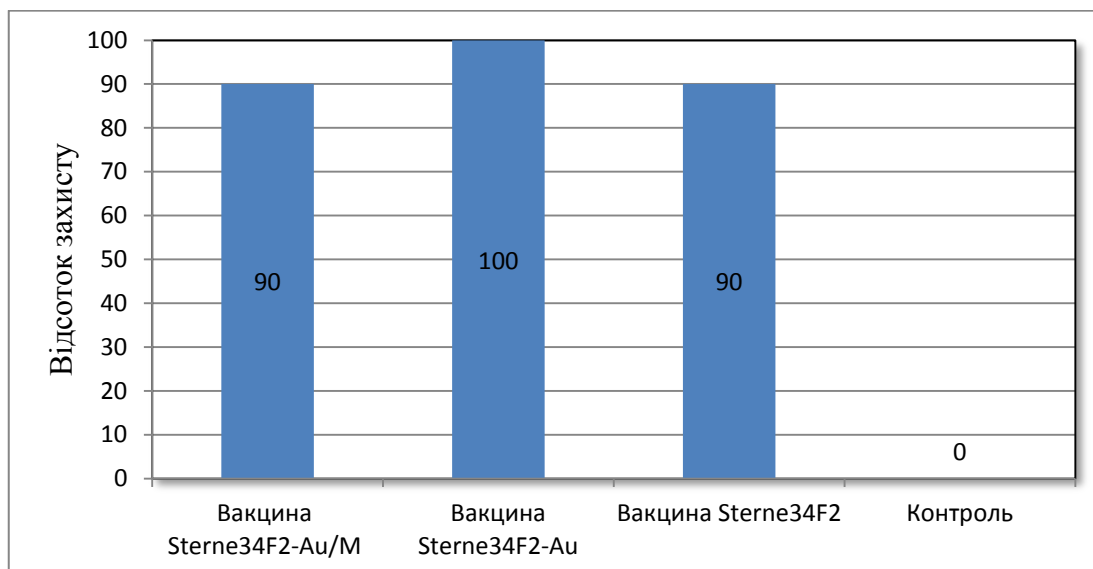


Рис. 2. Рівень імуногенності експериментальних серій вакцин зі штаму *Sterne 34F2*, виготовлених в умовах Херсонського державного підприємства-біологічна фабрика

Як бачимо Вакцина *Sterne 34F2-Au/M* та Вакцина *Sterne 34F2* захищали 90 % тварин, у той час як Вакцина *Sterne 34F2-Au* захищала 100 % тварин від загибелі. Аналізуючи отримані дані ми дійшли висновку про необхідність розрахунку $ІМД_{50}$ для виробничого штаму, що використовується для виготовлення вакцинних препаратів, а також розробки референт-препарату для проведення визначення імуногенності таких препаратів. Дану проблематику було окреслено як напрям подальших досліджень.

Оскільки морські свинки, використані у визначенні імуногенності, після інюкуляції їм препаратів залишалися живими у 100 % випадків – це вказує на безпечність дослідних зразків.

Таким чином, у результаті проведених лабораторних досліджень показано можливість використання наночастинок золота при конструюванні вакцини з наночастинками золота проти сибірки тварин зі штаму *Sterne 34F2*.

Висновки. У дослідях із лабораторними тваринами встановлено, що імуногенність експериментальних зразків коливається у межах 90–100 %. При цьому найвищий відсоток (100 %) імуногенності спостерігався у зразку вакцини, до якого було додано наночастинки золота під час формування серії препарату.

Виготовлені препарати відповідали за всіма показниками безпечності та якості, що застосовуються для такого роду препаратів.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати дають можливість для проведення подальших досліджень щодо вивчення безпечності та ефективності експериментальних препаратів в умовах господарств.

Перспективним вбачається подальше проведення досліджень щодо використання нанорозмірних матеріалів у складі ветеринарних імунобіологічних засобів проти інших інфекційних хвороб тварин.

Список літератури

1. *Сибирская язва* [Текст] / Н. Г. Ипатенко, В. А. Гаврилов, В. С. Зелепукин и др. ; ред. Н. Г. Ипатенко. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Колос, 1996. – 336 с.
2. *Коротич, А. С. Сибирская язва* / А. С. Коротич, Л. И. Погребняк. – К.: «Урожай». – 1976. – 160 с.
3. *Anthrax in humans and animals. Fourth edition* / World Organization for Animal Health, World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. – China : WHO Library Cataloguing-in-Publication Data – 2008. – 208 p.
4. *Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common Clostridium and Bacillus Proteins* / H. Barth, K. Aktories, M. R. Popoff, B. G. Stiles // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2004. – Vol. 68 (Sept.). – P. 373-402.
5. *Мачуський, О. В. Удосконалення вакцин проти сибірки тварин та методів контролю їх якості* : дис. ... канд. вет. наук 16.00.03 / О. В. Мачуський ; Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів. – К., 2013. - 174 с.
6. *Методические рекомендации по лабораторной диагностике сибирской язвы. Лабораторные исследования в ветеринарии. Справочник. Бактериальные инфекции* / Сост. Б. И. Антонов, В. В. Борисова, П. М. Волкова, Л. П. Каменева, Л. В. Кошеленко, Г. А. Михальский, В. В. Поповцев, Л. И. Прянишникова, В. Е. Храпова, под ред. Б. И. Антонова. – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 5-9.
7. *Anthrax Detection. Agencies Need to Validate Sampling Activities in order to Increase Confidence in Negative Results* : Report to the Chairman, Subcommittee on National Security, Emerging Threats, and International Relations, House

Committee on Government Reform, House of Representatives / United States Government Accountability Office. – USA, 2005. – 113 p.

8. *Anthrax Spore Vaccine (Live) for Veterinary Use*: 01/2005:0441 // European Pharmacopeia 5.0. – P. 715.
9. *Anthrax Vaccine Absorbed* // United States Pharmacopeia – National Formulary – United States of America, Washington, 2006. – P. 1002.

EXPLORE THE POSSIBILITIES FOR USING NANOMATERIALS IN BIOTECHNOLOGY OF DRUGS FOR THE PREVENTION OF ANIMALS ANTHRAX

Ushkalov V.A., Machus'kyi O.V., Kovtun V.A.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of microorganisms, Kyiv

Roman'ko M.E.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Gruzina T.G., Ryeznicenko L.S/

Institute of colloid Chemistry F.D. Ovcharenko, Kyiv

The aim of the research was an experimental study the possibility of using nanosized materials in a range in the design and manufacture of veterinary drugs for the prevention of animal's anthrax.

Materials and methods: During the study used bacteriological, biochemical, physical, chemical, cultural, microscopic, biological and statistical research methods.

There were used certified strains, strains deposited in the Depository of State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms: Bacillus anthracis Sterne 34F2, Bacillus anthracis M-71. Standardised not mutagenic, non-genotoxic and biosafety solution of colloidal gold containing nanoparticles was produced at the Institute of Chemistry of colloid F.D. Ovcharenko by original method of T. Gruzina and L. Ryeznicenko. In studies using gold nanoparticles of $(19,0 \pm 0,9)$ nm till $(30,4 \pm 0,5)$ nm at a final concentration of 19 ± 2 mg/ml.

Results and discussion: The vaccine Sterne 34F2-Au / M and Sterne 34F2 vaccine protected 90 % of animals, where as vaccine Sterne 34F2-Au protected 100 % of animals from death. Because guinea pigs used in determining the immunogenicity after inoculation drugs they were alive in 100 % of cases – this indicates a safety test specimens.

Conclusions and recommendations for further research. Thus, as a result of laboratory studies have shown the use of gold nanoparticles in the design of vaccines against anthrax gold nanoparticles animals with strain Sterne 34F2.

In experiments with laboratory animals found that the immunogenicity of experimental samples ranged within 90-100 %. In this case, the highest percentage of immunogenicity was observed in a sample of the vaccine, which has been linked gold nanoparticles during formation of a series of drug (100 %). Made drugs meet all indicators of safety and quality that are used for this kind of drugs. These results provide an opportunity for further research to study the safety and efficacy of experimental drugs in terms of households. Promising seen further research on the use of nanoscale materials consisting of veterinary immunobiological agents against other infectious diseases.

Keywords: anthrax, nanomaterials, safety, immunogenicity.