

лікування, відзначали як у 2, так і у 1 групі стосовно загального білку крові, АСТ, АЛТ, загального, прямого та непрямого білірубину.

Висновки

1. Як до, так і після лікування в рамках референтних значень реєструвалися показники АСТ, АЛТ, прямого білірубину, лужної фосфатази та креатиніну, що вказує на відсутність токсичного впливу запропонованих нами схем терапії.

2. Схема терапії асоційованої форми дерматофітозів собак №2 краще, оскільки термін повного одужання коротший.

Бібліографічний список:

1. Churpyna, M. (2024). Терапевтична ефективність різних схем за асоційованої форми мікозу собак. Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування, (10), 152-158. <https://doi.org/10.31890/vtpp.2024.10.14>

УДК 620.3:57.085.23

ВИВЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ТА ПРОЛІФЕРЕТИВНОЇ АКТИВНОСТІ НАНОЧАСТИНОК І КОМПОЗИТНИХ НАНОМАТЕРІАЛІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ВНК-21

Дерев'янюк С.В., кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Інститут ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України, м. Київ, Україна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9409-2473>

Небещук О.Д., кандидат ветеринарних наук, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ, Україна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-7418>

Сучасні наукові досягнення у галузі нанотехнологій відкривають широкі перспективи для виробництва та використання наночастинок (НЧ) та композитних наноматеріалів (НМ). На сьогодні НЧ та НМ у тій чи іншій формі використовують у біотехнології, гуманній та ветеринарній медицині [1, 2].

Одним із перспективних напрямків досліджень є вивчення проліферативних властивостей НЧ та НМ. Попередні літературні дані свідчать, що НЧ Au і Ag здатні впливати на проліферацію людських ембріональних нервових клітин-попередників [3]. НЧ Si розміром 50–120 нм стимулюють проліферацію людських стовбурових клітин (hADSC) через фосфорилування передачі сигналу [4].

Разом з тим, повідомлялося про негативний вплив НЧ TiO₂ на проліферацію мезенхімальних стовбурових клітин. [5]. Також, досліджено токсичність щодо нервових стовбурових клітин наночастинок ZnO різного розміру та концентрації. Встановлено, що токсичність НЧ ZnO залежить від концентрації (через вивільнення іонів Zn у культуральному середовищі), тоді як розмір помітно не виявляв впливу на токсичність НЧ ZnO. [6].

Вивчення НЧ та НМ відкриває не тільки нові перспективи, але й створює нові ризики. Відомо, що НЧ та НМ здатні впливати на метаболізм живої клітини, порушуючи його природний перебіг, в тому числі за рахунок утворення вільних радикалів. Є дані про властивість НЧ та НМ проникати в мітохондрії та блокувати мітохондріальну дихальну активність. В експериментах на ізольованих клітинах показано, що НЧ та НМ здатні викликати ушкодження ДНК, в тому числі за рахунок блокування активності рибосом. Відомо, що НЧ та НМ характеризуються малими розмірами та великою сумарною площею поверхні, що в поєднанні з іншими фізико-хімічними властивостями, такими як наявність домішок металів та заряду на поверхні, може виявляти досить непрогнозовані генотоксичні властивості. [7, 8].

На сьогодні в якості моделей для оцінки біологічної активності НЧ та НМ все частіше використовують культури клітин. Даних щодо цитотоксичної дії та проліферативної

активності НЧ та НМ у перещеплюваних культурах кліти, в опрацьованій нами літературі, виявлено недостатньо.

З огляду на зазначене, метою нашого дослідження було визначити цитотоксичність та проліферативну активність обраних НЧ та НМ в культурі клітин ВНК-21.

Матеріали та методи дослідження. У досліджах використано колоїдні розчини 12 НЧ (Ge, Ce, Fe (II), Fe (III), Mn, Mo, Cr, Ti, Ni, La, Zn, Co,) та 4 композитних НМ (S+I, Se+I, Se+S+I, шумерське срібло (Ag+Cu)), які були надані професором Каплуненко В.Г (ТОВ «Наночастинки та нанотехнології»).

Підготовка НЧ та НМ до використання полягала у проведенні їх автоклавування при 0,6 Па впродовж 20 хв та доведення рН суспензій НЧ та НМ до нейтрального значення (7,1-7,4). Контроль стерильності проводили шляхом прямого посіву, для чого застосовували м'ясопептонний бульйон (МПБ) або м'ясопептонний агар (МПА), тіогліколеве середовище або середовище Сабуро. Посіви в тіогліколовому середовищі інкубували за температури 37 °С, а у середовищі Сабуро – 22 °С. Тривалість інкубації становила до 14 діб. Посіви переглядали щодня і після закінчення періоду інкубації.

Цитотоксичність та проліферативну активність НЧ та НМ визначали в культурі клітин ВНК-21. Для культивування використовували Живильні середовища DMEM (середовище Ігла модифіковане Дюльбеко) (Sigma) з вмістом 10 % ембріональної сироватки теляти (FBS), антибіотика Pen Strep (Sigma) та Amphotericin B (Sigma) у вологому середовищі 5 % CO₂ при 37 °С в 96-ти лункових планшетах (Fisher Scientific). Пересів клітин здійснювали за допомогою 0,25 % Trypsin-EDTA при утворенні клітинами суцільного моношару.

У сформований дводобовий моношар вносили поживне середовище з вмістом наночастинок в різних концентраціях. Кожну концентрацію випробували у чотирьох повторях. У контролях проводили заміну поживного середовища без НЧ.

Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 CFL (Німеччина). Облік результатів проводили щодоби впродовж 3-5 діб. Моношар клітин досліджували в оптичному мікроскопі на наявність цитотоксичної дії НЧ та НМ. Ступінь токсичності визначали за 4-хрестовою системою, кожен з яких відповідає дегенерації 25 % площі моношару клітин.

Також використовували МТТ-тест. Для цього у сформований моношар клітин вносили поживне середовище, що містить тетразол (Invitrogen) та досліджувану речовину в різних концентраціях. Облік результатів проводили за допомогою спектрофотометра (BioRad) при довжині хвилі 595 нм.

Статистичну обробку результатів також проводять за допомогою програмного забезпечення Ms Excel.

Результати досліджень. Встановлено, що після автоклавування усі досліджувані розчини НЧ та НМ були стерильними.

За високих концентрацій НЧ та НМ зумовлювали цитотоксичну дію у культурі клітин ВНК-21, яка характеризувалась порушенням цілісності моношару, округленням або зморщуванням клітин, появою вогнищ дегенерованих клітин у яких спостерігали вакуолізацію, зернистість, підвищену розпластаність.

Так, деякі НЧ та композитні НМ були більш токсичними і проявляли цитотоксичну дію в культурі клітин за менших концентрацій, деякі за високих, а деякі взагалі не виявляли цитотоксичної дії.

Визначено максимально допустиму концентрацію (МДК) у моношарі культурі клітин ВНК-21. Для НЧ Zn МДК становила 0,5 мкг/см³; Ti – 1,125 мкг/см³; La – 3,375 мкг/см³; НМ S+I – 0,47+0,85 мкг/см³. Дещо вищими були показники МДК для НЧ Ni і становили 9,375 мкг/см³; Ge – 12,5 мкг/см³; Fe (II) – 25 мкг/см³; Mn – 75 мкг/см³; Mo – 75 мкг/см³; Fe (III) – 125 мкг/см³. МДК для НМ Se+I становила 6,25+12,5 мкг/см³; Ag+Cu – 6,75+6,75 мкг/см³.

Для НЧ Co, Ce, Cr та НМ Se+S+I визначити МДК не вдалося, так як у досліджуваних концентраціях вони не проявляли цитотоксичної дії.

За використання МТТ-тесту показано здатність НЧ Cr у концентрації 19 мкг/см³ зумовлюють підвищення проліферації клітин ВНК-21 до 10 % у порівнянні з контролем композиції. НЧ Fe (II) у концентрації 12,5-25 мкг/см³ підвищувати метаболічну активність та проліферацію клітин на 45,9 %. НЧ Mn у концентрації від 30 до 75 мкг/см³ здатні підвищувати проліферацію до 48 %. При внесенні до складу живильних середовищ композитного НМ Se+I у концентрації 1,5-3 + 12,5-25 мкг/см³ проліферація культури клітин ВНК-21 підвищувалась до 64 % у порівнянні з контролем.

При мікроскопічних дослідженнях у дослідних варіантах за використання НЧ та НМ з проліферативними властивостями моношар клітин формувался швидше, був щільнішим, клітини за розмірами були дещо меншими у порівнянні з контролем, іноді, в окремих варіантах, клітини розміщувались у декілька шарів.

Висновки та пропозиції подальших досліджень.

1. У культурі клітин ВНК-21 досліджено цитотоксичну дію та проліферативну активність 12 колоїдних розчинів наночастинок та 4 композитних наноматеріалів.
2. Встановлено, що НЧ Cr, Fe (II), Mn, НМ Se+I за певних концентрацій проявляють високу проліферативну активність та можуть бути використані при розробці нових та удосконаленні існуючих біотехнологій ведення культур клітин, підвищення репродуктивної активності клітин, зменшення термінів культивування, тощо.
3. Дослідження проліферативної активності НЧ та композитних НМ за різних умов культивування необхідно продовжити.

Бібліографічний список:

1. Редактори Черних, В.П., Котвіцька, А.А., Крутських, Т.В., Левітін, Є.Я., Ведерникова, І.О., & Криський, О.С. (2017). *Нанотехнології у фармації та медицині*. Харків. 55 с. Отримано з <https://inorgchem.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2017/04/Nano-2017.pdf>
2. Дерев'яно, С.В., Васильченко, А.В., Каплуненко, В.Г., Головка, А.М., Співак, М.Я., & Харчук, М.С. (2019). Перспективи розробки препаратів для сільського господарства на основі наночастинок. *Вісник аграрної науки*, 10(799), 44-54. doi: <https://doi.org/20.31073/agrovisnyk2019010-07>
3. Söderstjerna, E., Johansson, F., Klefbohm, B., & Johansson, U.E. (2013). Gold-and silver nanoparticles affect the growth characteristics of human embryonic neural precursor cells. *PLoS ONE*, 8(3), e58211. doi: [10.1371/journal.pone.0058211](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058211)
4. Kim, K.J., Joe, Y.A., Kim, M.K., Lee, S.J., Ryu, Y.H., Cho, D.-W., & Rhie, J.W. (2015). Silica nanoparticles increase human adipose tissue-derived stem cell proliferation through erk1/2 activation. *Int. J. Nanomed*, 24(10), P. 2261-72. doi: [10.2147/IJN.S71925](https://doi.org/10.2147/IJN.S71925)
5. Hou, Y., Cai, K., Li, J., Chen, X., Lai, M., Hu, Y., Luo, Z., Ding, X., Xu, D. (2013). Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. *Int. J. Nanomed*, 8, 3619-30. doi: [10.2147/IJN.S38992](https://doi.org/10.2147/IJN.S38992)
6. Deng, X., Luan, Q., Chen, W., Wang, Y., Wu, M., Zhang, H., Jiao, Z. (2009). Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology*, 20(11), 115101. doi: [10.1088/0957-4484/20/11/115101](https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/11/115101)
7. Чекман, І.С., Сердюк, А.М., Кундієв, Ю.І., Трахтенберг, І.М., Каплінський, С.П., & Бабій, В.Ф. (2009). Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд). *Довкілля та здоров'я*, 1(48), 3-7. Отримано з <http://www.dovkil-zdorov.kiev.ua/env/48-0003.pdf>
8. Gupta, A.K., & Gupta M. (2005). Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 26(13), 1565–1573. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.022>