

УДК 576.6:612.017.1:576.3

*Е. С. ДРОЗД^{1,2}, МОХАММЕД САЛЕМ А. А.³, С. А. ЧИЖИК¹,
О. С. СПИРИДОНОВА^{1,4}, Н. С. КУЖЕЛЬ¹, М. Е. МЫЧКО³*

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ
ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ НА СТРУКТУРНЫЕ
И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ПОЧКИ БЫКА ЛИНИИ MDBK**

¹ *Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси,*

² *Генуэзский университет,*

³ *Белорусский национальный технический университет,*

⁴ *Минский городской клинический онкологический диспансер*

(Поступила в редакцию 28.08.2014)

Введение. Особое место в современной биологии занимает изучение влияния наночастиц на клетки. Их широкое применение в медицине обусловлено уникальными антибактериальными свойствами. Наночастицы находят свое применение в борьбе против некоторых вирусов, для лечения ожогов, уничтожения опухолевых клеток, а также в качестве средств доставки лекарственных препаратов к больному органу. Известно, например, что наночастицы оксида цинка (ZnO) способны к ингибированию процесса репликации вирусов [1]. С одной стороны, применение цинка в любой фазе вирусной репликации прекращает формирование нового вируса. С другой, цинк обладает иммуностимулирующим эффектом, при его небольших концентрациях функции иммунной системы восстанавливаются [2]. Он участвует в регуляции процессов активации лимфоидных клеток, пролиферации и апоптоза. Таким образом, большой интерес представляет разработка современных препаратов на основе наночастиц с иммуностимулирующим, антибактериальным и противовирусным эффектом. Для подобных разработок большое значение имеет учет влияния препаратов на основе наночастиц на различные бактерии и вирусы, а также на клетки иммунной системы.

Цель данной работы – исследование методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) влияния наночастиц на культуру клеток почки быка линии MDBK (Madin–Darby Bovine Kidney Cells), а также определение модуля упругости и силы адгезии клеток почки быка при воздействии на них наночастиц меди и серебра (Cu + Ag), нитрита серебра (AgNO₃) и ZnO.

MDBK – культура эпителиальных клеток почки быка [3]. Она широко используется для изоляции вирусов диареи крупного рогатого скота, везикулярного стоматита (индийский штамм), инфекционного ринотрахеита и парвовируса крупного рогатого скота, аденовирусов I и III крупного рогатого скота, вируса парагриппа-3 [4]. Кроме того, эта культура является основной при получения культуральных противовирусных вакцин.

Методы и материалы исследования. Для визуализации одиночных частиц использовали специальную методику подготовки образцов, которая заключалась в гидрофилизации подложки и последующем осаждении наночастиц из суспензии L-B-L-способом, т. е. в вертикальном осаждении частиц на подложку. Очищенную подложку выдерживали в коллоидном растворе наночастиц в течение 5–10 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Для осуществления гидрофилизации кремниевую подложку помещали в раствор, состоящий из 2 мл раствора аммиака, 2 мл пероксида водорода и 10 мл воды и выдерживали в течение 15 мин при 75 °С. Затем промывали дистиллированной водой и высушивали. Оценка качества подготовленного образца наночастиц проводилась с помощью оптического микроскопа Микро200 (ОАО «Планар», Беларусь).

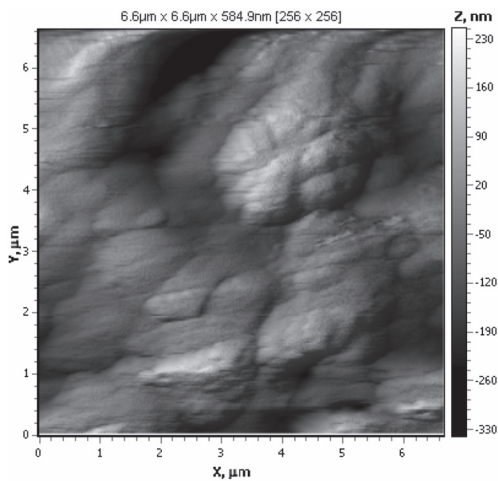


Рис. 1. АСМ-изображение топографии поверхности мембраны клеток линии MDBK (контрольные образцы, размер поля сканирования 7×7 мкм)

ребра определяли по профилю сечения поверхности изображения подложки с наночастицами, получаемому после сканирования исследуемого образца. На профилях маркерами отмечали края каждой частицы. Оценка размера частиц методом АСМ показала, что на поверхности клеток он составляет 220–250 нм.

Для получения образцов клеток, пригодных для АСМ-исследования, применяли химическую фиксацию. С этой целью культуру клеток инкубировали в течение 20 мин с суспензией наночастиц, разведенной в соотношении 1:5 раствором Хэнкса. Клетки отмывали фосфатным буфером, добавляли 1,5%-ный раствор глутарового альдегида на 30 мин, дважды отмывали фосфатным буфером и дистиллированной водой и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

АСМ-исследования проводились с помощью прибора НТ-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) в контактном режиме. Использованы кремниевые зонды («MikroMasch» Co, Эстония) NSC11 радиусом 20 нм с константой жесткости консоли 3 Н/м.

Влияние наночастиц на клеточную линию MDBK.

На рис. 1, 2 представлены изображения топографии поверхности клетки линии MDBK, полученные с помощью атомно-силового микроскопа. Размеры частиц серебра определяли по профилю сечения поверхности изображения подложки с наночастицами, получаемому после сканирования исследуемого образца. На профилях маркерами отмечали края каждой частицы. Оценка размера частиц методом АСМ показала, что на поверхности клеток он составляет 220–250 нм.

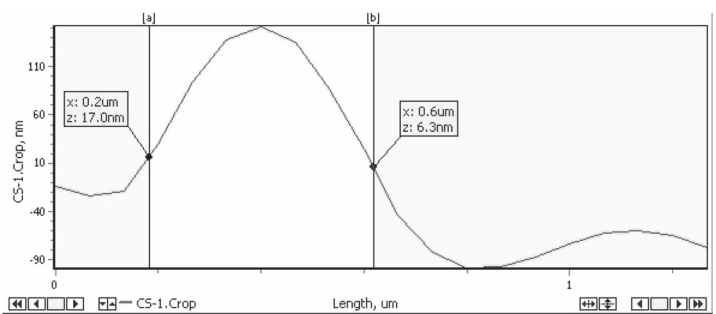
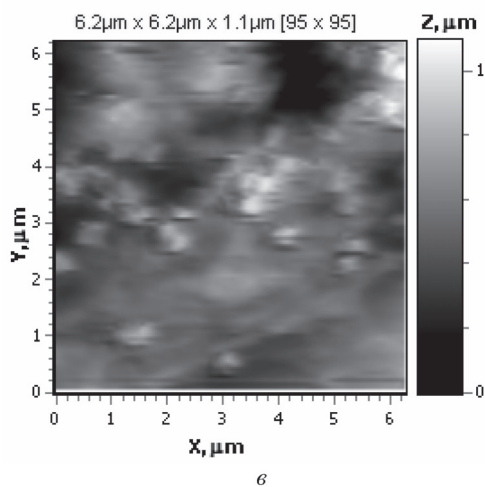
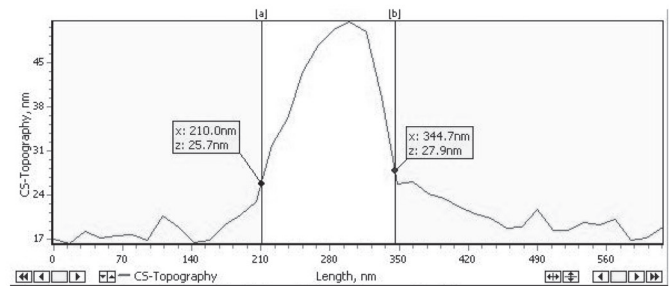
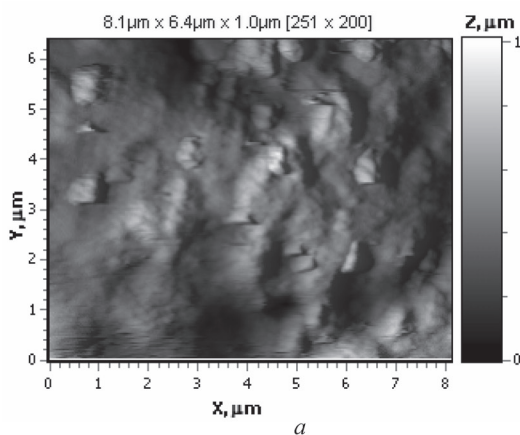


Рис. 2. Топография мембраны клетки с наночастицами Cu+Ag на поверхности, область сканирования 8,1×6,4 мкм (а), 6,2×6,2 мкм (е) и профиль сечения наночастицы (б, з)

Влияние наночастиц биоэлементов на упругие характеристики клеток линии MDBK.

С помощью атомно-силового микроскопа методом индентирования изучены упругие характеристики клеток. На практике индентирование осуществляется в режиме статической силовой спектроскопии. В результате устанавливается связь между силой и величиной деформации образца в области внедрения зонда. Расчет модуля упругости по формуле Герца [5] показал, что для клеток почки быка после 20 мин их инкубации с суспензией наночастиц характерны следующие значения модулей упругости E , МПа: контроль – $6,92 \pm 0,36$; Cu+Ag – $8,09 \pm 0,45$; AgNO₃ – $9,56 \pm 0,68$; ZnO – $0,017 \pm 0,001$. Значение модуля упругости клеток контрольного образца ниже, чем у клеток после воздействия наночастиц Cu+Ag и AgNO₃. После воздействия наночастиц ZnO модуль упругости клеток уменьшается.

Таким образом, анализируя полученные результаты, можно отметить, что проникновение наночастиц Cu+Ag и AgNO₃ внутрь клеток увеличивает их жесткость. Совершенно иное действие на клетки оказывают наночастицы ZnO, уменьшая упругость клеток более чем на порядок. Исходя из расчетов модуля упругости и анализа трехмерных изображений клеток после 20 мин инкубации с наночастицами ZnO, можно предположить, что в данном случае происходит сильное повреждение клеток.

Влияние наночастиц на адгезионные свойства клеток линии MDBK. Удельная поверхностная энергия (работа адгезии) γ определяется энергией, затраченной на разрыв связи по контакту между фазами и энергией, отнесенной к единице площади контакта. Удельную поверхностную энергию и силу адгезии соответственно вычисляли по формулам:

$$\gamma = \frac{2 F_a}{3 \pi R}, \quad F_a = k Z_{defl}.$$

Здесь R – радиус закругления острия зонда, k – жесткость консоли; Z_{defl} – изгиб консоли по вертикали, рассчитываемый по кривым подвода-отвода, получаемым в статическом режиме АСМ.

Результаты расчета силы адгезии и значения поверхностной энергии клеток линии MDBK представлены в таблице. Можно констатировать, что воздействие наночастиц AgNO₃ и ZnO приводит к уменьшению силы адгезии и поверхностной энергии. Как было показано выше, при инкубировании клеток с наночастицами ZnO происходит значительное снижение модуля упругости (примерно в 40 раз), кроме того, наблюдаются морфологические изменения клеток. Таким образом, наночастицы ZnO оказывают сильное повреждающее воздействие на клетки почек быка в отличие от наночастиц AgNO₃, не проявивших токсического эффекта.

Характеристики адгезии клеток MDBK

Образец	F_a , нН	γ , Дж/м ²
Контроль	$48,91 \pm 3,26$	$0,13 \pm 0,01$
AgNO ₃	$41,95 \pm 3,89$	$0,11 \pm 0,01$
ZnO	$36,80 \pm 6,71$	$0,09 \pm 0,01$

Влияние наночастиц на структурные особенности клеток линии MDBK. Для исследования влияния наночастиц на клетки животных выбраны наночастицы AgNO₃ и ZnO. Известно, что наночастицы производных серебра оказывают повреждающее действие на вирусы, а наночастицы ZnO не обладают антибактериальными свойствами. В качестве объекта для исследования влияния наночастиц AgNO₃ и ZnO выбрана культура клеток линии MDBK.

На рис. 3 представлены изображения отдельной клетки MDBK и участка поверхности мембраны, полученные в режиме латеральных сил. Исследование топографии показало, что поверхность клеток MDBK гладкая и ровная, без явно выраженных структурных элементов. Результаты исследования топографии поверхности после инкубации с суспензией наночастиц AgNO₃ при 37 °С представлены на рис. 4.

После взаимодействия клеток линии MDBK с наночастицами AgNO₃ наблюдались изменения формы их поверхности по сравнению с контрольным образцом (поверхность клеток стала

более рельефной с ярко выраженными выступами округлой формы). Топография поверхности клетки MDBK, подвергшейся влиянию наночастиц ZnO, приведена на рис. 5.

В результате взаимодействия клеток MDBK с наночастицами ZnO их форма сильно изменилась по сравнению с формой клеток контрольного образца. Можно предположить, что в резуль-

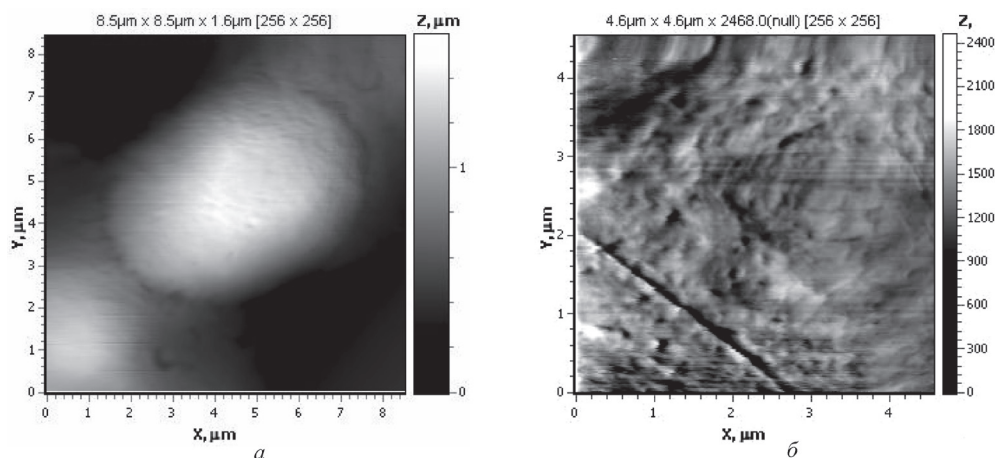


Рис. 3. АСМ-изображение поверхности клеток MDBK: *a* – топография поверхности, область сканирования $8,5 \times 8,5 \text{ мкм}^2$; *б* – изображение в режиме латеральных сил, область сканирования $4,6 \times 4,6 \text{ мкм}^2$

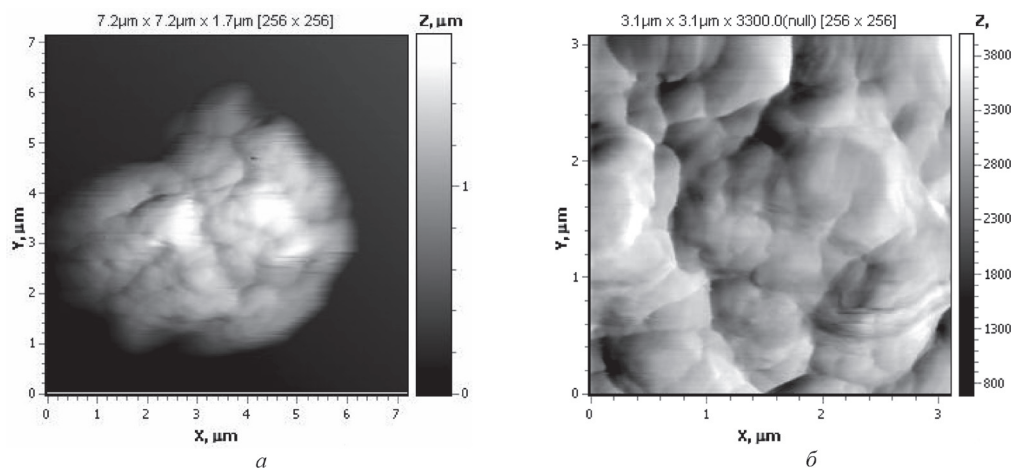


Рис. 4. АСМ-изображение поверхности клеток MDBK после их инкубации с AgNO_3 ; *a* – топография поверхности, область сканирования $7,2 \times 7,2 \text{ мкм}^2$; *б* – изображение в режиме латеральных сил, область сканирования $3,1 \times 3,1 \text{ мкм}^2$

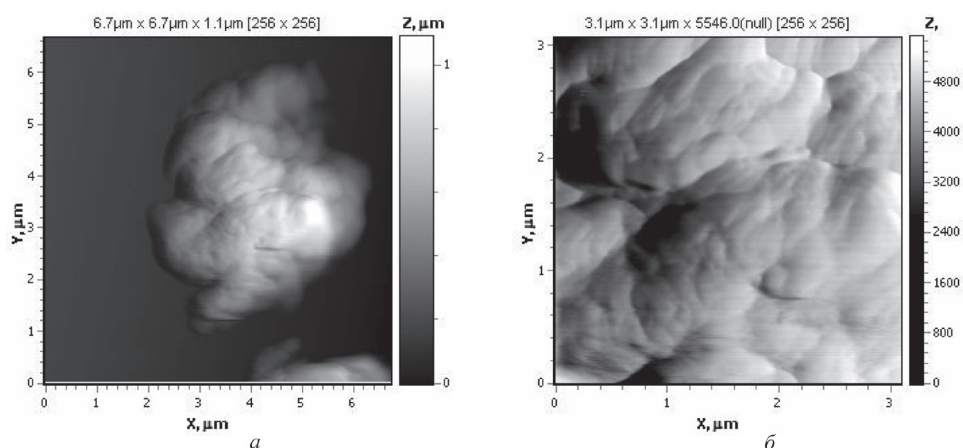


Рис. 5. АСМ-изображение поверхности клеток MDBK после их инкубации с наночастицами ZnO при $37 \text{ }^\circ\text{C}$; *a* – топография поверхности, область сканирования $6,7 \times 6,7 \text{ мкм}^2$; *б* – изображение в режиме латеральных сил, область сканирования $3,1 \times 3,1 \text{ мкм}^2$

тате воздействия наночастиц ZnO происходит повреждение внутренней структуры клеток. Морфология поверхности также отличается от морфологии поверхности клеток, инкубированных с наночастицами AgNO₃. Наблюдается неоднородная поверхность клеток с ярко выраженными структурными образованиями.

Заключение. Исследование влияния наночастиц на иммунокомпетентные клетки почки быка показало, что в результате инкубирования клеток с наночастицами меди и серебра, а также нитрита серебра значение модуля упругости увеличивается по сравнению с модулем упругости клеток контрольного образца. В случае инкубирования клеток с наночастицами оксида цинка наблюдается противоположный эффект – уменьшение величины модуля упругости клеток по сравнению с модулем упругости клеток контрольного образца. Установлено, что действие наночастиц оксида цинка приводит к значительному, практически разрушительному, изменению формы и структуры поверхности клеток (возрастает шероховатость поверхности клетки) и к уменьшению силы адгезии на 30 % по сравнению с контролем.

Литература

1. *Burnham N. A.* // J. Vac. Sci. Technol. 1989. Vol. A7. P. 1200–1210.
2. *Czajkowsky D. M.* // J. of Electron Microscopy. 2000. Vol. 49(3). P. 395–406.
3. *Nagata M.* // FEMS Microbiol. Lett. 1996. Vol. 145. P. 239–243.
4. *Генкель П. А.* Микробиология с основами вирусологии: Учеб. пособие для студентов. биол. фак. пед. ин-та. М., 1974.
5. *Jacot J. G.* // J. Biomed. Mater. Res. 2006. Vol. A79. P. 485–494.

E. S. DROZD, MOHAMMED SALEM A. A., S. A. CHIZHIK, O. S. SPIRIDONOVA, N. S. KUZHEL, M. E. MYCHKO

A STUDY BY ATOMIC FORCE MICROSCOPE OF EFFECT OF NANOPARTICLES ON STRUCTURAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF CELL LINES MDBK

Summary

The effect of copper and silver nanoparticles Cu+Ag, silver nitrite AgNO₃ and zinc oxide ZnO on morphology and mechanical properties of immunocompetent cells bovine kidney line MDBK is investigated by atomic force microscopy. The results of calculation of the local elastic modulus, strength, surface cell adhesion, adhesion work, and the three-dimensional image analysis of cells in control and after incubation with the nanoparticles bioelements for 20 min are presented.