исследований [3]. Развитие атрофии слизистой желудка не связано с деятельностью Helicobacter Pylori, а скорее всего с иммунными процессами, происходящими в слизистой желудка, о чем говорит большая плотность воспалительного инфильтрата. Развитием толстокишечной метаплазии при атрофическом гастрите ведет к увеличению размеров ядра клеток как показало наше исследование. В данном случае это обуславливает значительное сходство данной патологии с клеточной дисплазией и увеличением развития рака на этом фоне [3]. Поверхностные отделы желез желудка при хроническом атрофическом гастрите практически не отличаются от глубоких, что говорит о нарушении созревания и аберрантной дифференциации [4].

Выводы:

1. При хроническом атрофическом гастрите не всегда удается выявить Helicobacter Pylori в гастробиоптатах;

2. Степень атрофии слизистой оболочки желудка зависит от возраста пациентов и степени выраженности воспалительного инфильтрата, который возможно обусловливает повреждение пролиферативного компонента желез через развитие аутоиммунных реакций.

Литература:

1. Бабак О.Я. Хронический атрофический гастрит – точка отсчета начала канцерогенеза / О.Я. Бабак, Ю.В. Протас // Сучасна гастроентерологія. – 2005. –№ 5 (25). – С. 9-14.

2. Губергриц Н.Б. Хронический гастрит: насколько это просто? // Сучасна гастроентерологія. – 2010. – № 3 (53). – С. 58-69.

3. Зак М.Ю. Классификация хронического гастрита: от Сиднейской системы к системе OLGA // Сучасна гастроентерологія. – 2010. – № 6 (56). – С. 116-126.

4. Маев И.В. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка в практике гастроэнтеролога: современный взгляд на проблему / И.В. Маев, О.В. Зайратьянц, Ю.А. Кучерявый // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – № 4. – С. 38-48.

5. Mariam Abdullahi Adamu, Melanie Nicole Weck, Dietrich Rothenbacher and Hermann Brenner. Incidence and risk factors for the development of chronic atrophic gastritis: Five year follow-up of a population-based cohort study. International Journal of Cancer. – 2010. – Vol. 128. – P. 1652-1658.

УДК 615.916

Д.А. Прощенко, М.А. Шамбатов, О.Г. Макеев

ТЕСТ-СИСТЕМА ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МАРГАНЦА (II, III) И ОКСИДА НИКЕЛЯ (II) НА КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Кафедра медицинской биологии и генетики

Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий генной и клеточной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина
Екатеринбург, Российская Федерация

D.A. Proshchenko, M.A. Shambatov, O.G. Makeev

TEST SYSTEM FOR ASSESSING THE TOXICITY OF NANOPARTICLES OF MANGANESE OXIDE (II, III) AND NICKEL OXIDE (II) ON THE CULTURE OF HUMAN FIBROBLASTS

Department of medical biology and genetics
Ural state medical university
Institute of medical cell technologies
Ural federal university
Ekaterinburg, Russian Federation

Контактный e-mail: dasha.kushnina@yandex.ru, muraz.shambatov@rambler.ru

Аннотация. В работе исследовано влияние наночастиц оксида марганца (II, III) и оксида никеля (II) на культуру фибробластов человека. Оценивалась жизнеспособность клеток после воздействия методом отторжения красителя (трипановый синий) и с использованием МТТ-теста.

Annotation. In this paper we studied the effect of nanoparticles of manganese oxide (II, III) and nickel oxide (II) on culture of human fibroblasts. We evaluated the cell viability after exposure by the method of exclusion dye (trypan blue) and MTT assay.

Ключевые слова: наночастицы оксида марганца (II, III), оксида никеля (II), культура фибробластов человека.

Keywords: nanoparticles of manganese oxide (II, III) and nickel oxide (II), human fibroblasts.

Имеющиеся в настоящее время результаты токсикологических исследований наночастиц во многом противоречивы, и не дают ответа на вопросы об их токсичности, а скорее вызывают множество новых. Степень выраженности и механизм токсического действия этих частиц зависит от их размера, структуры и физико-химических свойств. Токсичность наночастиц обусловлена их высокой проникающей способностью, а также возможностью генерировать активные формы кислорода (АФК) [4]. Ещё одно существенное свойство, которое определяет особенности токсического действия наночастиц – это их чрезвычайная стабильность. Наночастицы в силу своей стабильности не подвергаются биотрансформации, усиливая эффект разрушения клеток [1].

Избыток наночастиц оксида марганца в клетке приводит к образованию активных форм кислорода, угнетению митохондриальной активности и апоптозу [2]. Токсичность наночастиц оксида никеля проявляется подавлением процессов пролиферации, синтеза белка и ДНК, образованием токсичного гидроксил-радикала и других АФК [3].

Учитывая широкий контингент лиц, контактирующих с марганцем, никелем и их соединениями в условиях производства, важно проанализировать степень токсичности этих техногенных поллютантов.

Цель исследования – изучение токсичности наночастиц марганца и никеля на культуре фибробластов человека.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы линии культивируемых фибробластов человека, 4-7 пассаж. Эксплантат кожи получали у здорового 50-летнего донора женского пола после подписания добровольного информированного согласия.

Для анализа возможного цитотоксического эффекта наночастиц оксида марганца и оксида никеля был произведён посев клеток в культуральные чашки Петри, на 6-е сутки вносили суспензию наночастиц в свежей среде DMEM (Sigma) в концентрации 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл и 0,1 мг/мл среды и клетки вновь инкубировали в течение 6 суток со сменой среды и подсчётом количества клеток каждые 3 дня.

Жизнеспособность клеток после цитотоксического воздействия определяли по проценту окрашенных (0,4% раствором трипанового синего) клеток в камере Фукса-Розенталя (в 10-ти кратной повторности). На основе полученных данных рассчитывали индекс жизнеспособности – число жизнеспособных фибробластов к общему количеству анализируемых клеток, выраженное в %.

Изменения в митохондриальной энергетике после добавления в культуры тестируемых типов наночастиц были определены с использованием МТТ-метода (бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия).

В основе МТТ-метода лежит реакция восстановления желтой соли тетразолия (МТТ) митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана, которые нерастворимы в водной среде обитания клеток.

Клетки сеяли в 24-луночный планшет в количестве $1 \cdot 10^4$ клеток/мл и инкубировали в течение 6 дней при 37˚С, концентрации CO_2 5% и 95% влажности в среде DMEM/Ham F-12 (Sigma) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma) в инкубаторе (Sanyo). После этого к культурам клеток добавляли тестируемые наночастицы в различных концентрациях (0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 и 0,1 мг/мл), а клетки культивировали в тех же условиях ещё 48 часов.

После инкубации с наночастицами в каждую лунку было добавлено 20 мкл МТТ (бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (5 мг/мл) (Sigma-Aldrich) и планшеты дополнительно инкубировали в течение

2 часов. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл смеси HCl-изопропанол для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при 530 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

В экспериментах произведена оценка жизнеспособности фибробластов после цитотоксического воздействия изучаемых типов наночастиц по сравнению с контролем (рис. 1).

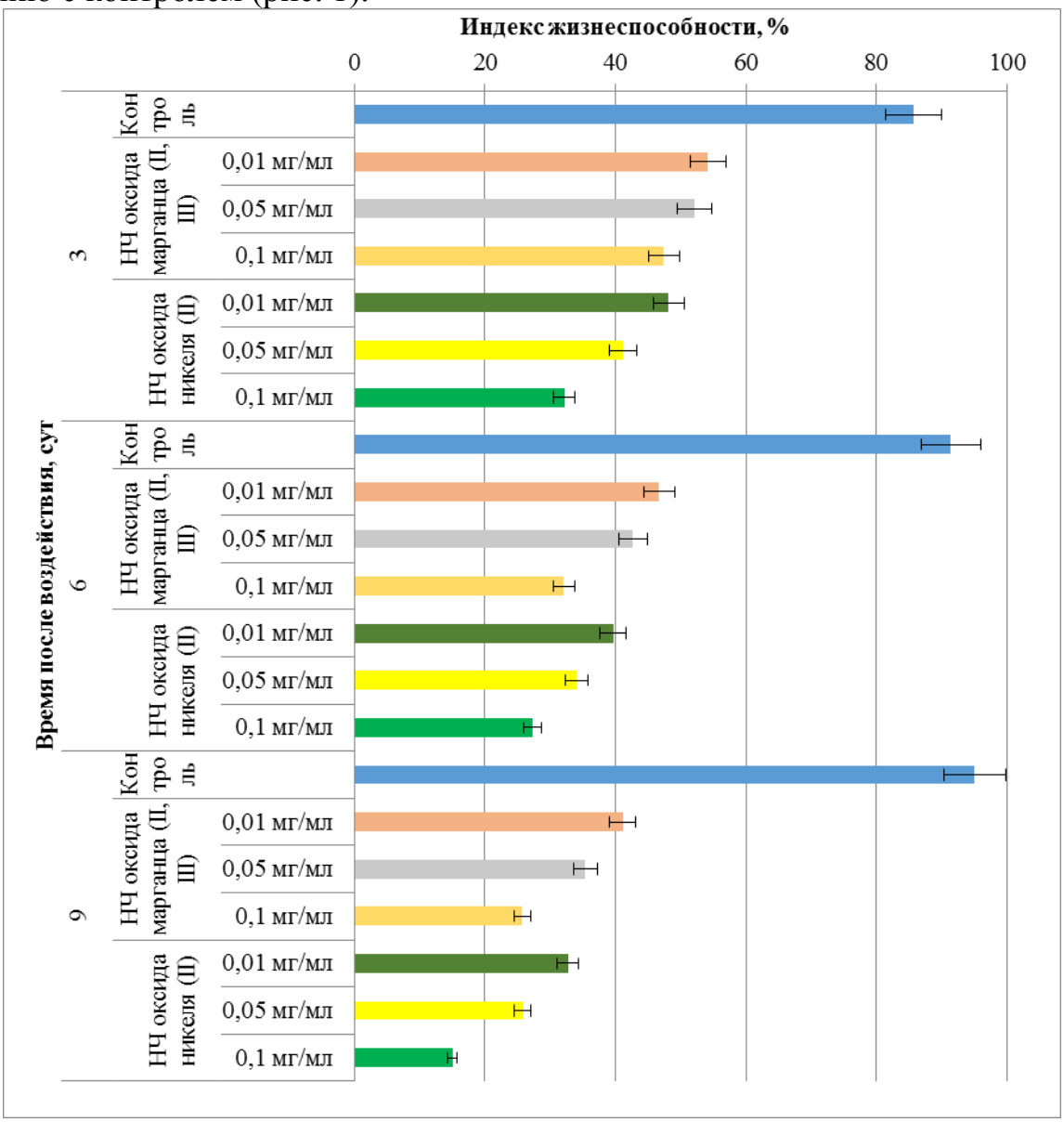

Рис. 1. Индекс жизнеспособности культур фибробластов после введения наночастиц оксида марганца (II, III) и наночастиц оксида никеля (II)

Из рисунка 1 следует, что наночастицы оксида марганца во всех исследуемых концентрациях оказывают выраженный цитотоксический эффект.

Так, после воздействия данных наночастиц на культуру фибробластов индекс жизнеспособности снизился в 0,5-3 раза (в зависимости от продолжительности воздействия) по сравнению с соответствующим показателем контрольной группы культур фибробластов, а различие между опытной и контрольной группами статистически достоверно.

Из оценки действия наночастиц оксида никеля (II) следует, что данный тип частиц более токсичен по сравнению с наночастицами оксида марганца (II, III): индекс жизнеспособности достоверно ниже при одинаковых концентрациях.

Таким образом, индекс жизнеспособности падает по мере увеличения времени контакта клеток с наночастицами.

Цитотоксический эффект наночастиц оксида марганца и оксида никеля, оцениваемый МТТ-тестом, характеризуется выраженным дозозависимым характером, индивидуальным для каждого типа наночастиц (рис. 2).

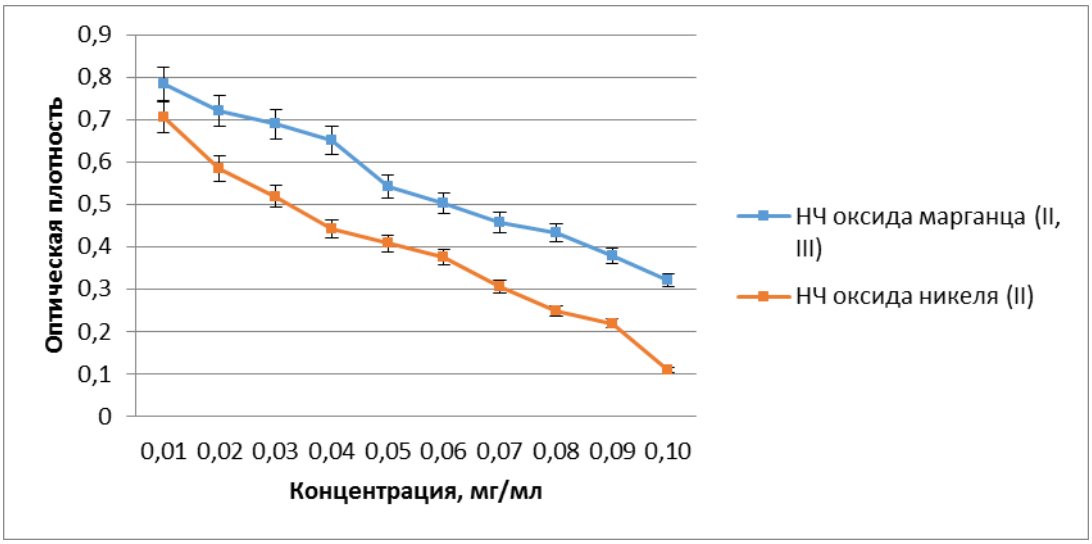

Рис. 2. Восстановление МТТ до МТТ-ф фибробластами после добавления наночастиц

Больший цитотоксический эффект на клеточную культуру фибробластов человека оказало добавление наночастиц оксида никеля (II) по сравнению с добавлением наночастиц оксида марганца (II, III), что проявилось в виде снижения митохондриальной активности.

Из полученных результатов следует, что действие тестируемых типов наночастиц сопряжено с ингибированием митохондриальных дегидрогеназ, в т.ч. NADH-дегидрогеназы, которая играет ключевую роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования. Нарушение функционирования данного фермента приводит к снижению количества АТФ, синтезируемого в митохондриях клетки. Низкое содержание АТФ приводит к повреждению клеточных мембран, которое проявляется в виде изменения ее

мембранного потенциала, транспортных свойств, проницаемости, нарушения и перераспределения баланса внутриклеточных микроэлементов.

Данное положение подтверждается данными, полученными после оценки жизнеспособности клеток с использованием метода отторжения красителя, механизм которого основан на окрашивании клеток с повреждёнными клеточными мембранами.

Выводы:

1. Наночастицы оксида марганца (II, III) и оксида никеля (II) имеют выраженный дозозависимый цитотоксический эффект на культуру фибробластов человека;

2. Полученные данные свидетельствуют о том, что наночастицы оксида марганца и оксида никеля обладают свойствами разобщителя дыхания и окислительного фосфорилирования, повреждая энергетику клетки. Повреждающее действие реализуется через нарушение функционирования мембранных структур, лишая их возможности к самовосстановлению;

3. Наибольшей цитотоксичностью обладают наночастицы оксида никеля (II).

Литература:

1. Зайцева Н.В. Негативные эффекты наночастиц марганца при ингаляционном поступлении в организм / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, Т.И. Акафьева // Экология человека. – 2013. – №11. – С. 25-29.

2. Зайцева Н.В. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности нанодисперсного и микродисперсного оксида марганца (III, IV) / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, В.Н. Звездин, Е.В. Саенко // Вопросы питания. – 2012. – Т. 81, № 5. – С. 13-19.

3. Тутельян В.А. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека: методические рекомендации / В.А. Тутельян, И.В. Гмошинский, А.Л Глинцбург. // М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2009. – 35 с.

4. Решение Пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздравсоцразвития РФ «Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды» // Гигиена и санитария. – 2008. – № 6. – С. 88.

УДК 616.8-005

И.С Пчельникова, О.А Четверикова, В.А. Лукаш

ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Кафедра биохимии