

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ НАНОПРЕПАРАТІВ, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ У РОСЛИННИЦТВІ

У статті розглядаються питання цитотоксичності нанопрепаратів, що застосовуються для покращання умов живлення сільськогосподарських рослин. Досліджено токсичність таких наноагрохімікатів: Аватар-1 – препарат вітчизняного виробництва, розміри НЧ елементного складу якого становлять 25,8 – 40 нм, та Nano-Gro, виробником якого є компанія Agro Nanotechnology Corp (США) з розміром НЧ 90 нм. Результати дослідження цитотоксичного ефекту на клітинах Allium сера L. показали, що використання нанопрепаратів призвело до порушення структури хромосом, пошкодження мітотичного веретена та зміни поведінки хромосом на веретені поділу. Показано, що токсичність НЧ безпосередньо пов'язана з їх розмірами, що обумовлює значну хімічну активність і високу здатність до проникнення. Токсична дія Аватару-1,

порівняно з Nano-Gro, проявлялася сильніше, що може бути пов'язано з меншим розміром НЧ, які входять до його складу.

Ключові слова: нанопрепарат, цитотоксичність, біотестування, *Allium sera L.*, мітотичний індекс.

Постановка проблеми

Наприкінці ХХ ст. у свідомість людей швидко ввійшло коротке слово «нано». Згодом цей префікс означав початок нової ери в розвитку науки і технологій [1].

Наночастинки(НЧ) мають розмір менше 100 нм є об'єктом дослідження багатьох вчених світу у зв'язку з їх унікальними хімічними, фізичними, біологічними, токсикологічними властивостями [1–2]. Вони мають специфічні фізичні і хімічні властивості та радикально відрізняються від властивостей цієї ж речовини у формі суцільних фаз або макроскопічних дисперсій. Це обумовлює високу біодоступність та токсичність нанопрепаратів і потребує вивчення можливих негативних ефектів на різних рівнях організації біосистем.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Науковий пошук багатьох дослідників спрямований на вивчення впливу наночастинок на біологічні об'єкти організмів різного рівня організації. Водночас, недостатньо вивченими залишаються механізми взаємодії наночастинок із клітиною та її компонентами, а також вплив на функції, що вони виконують [3].

Результати численних досліджень (Москаленко В. Ф., Oberdorster G.) показують, що НЧ, навіть у невеликих кількостях, здатні збільшувати продукцію медіаторів запалення і викликати запальну відповідь у тканинах організму. Крім того, НЧ перехідних металів можуть впливати на утворення активних форм кисню, що, в свою чергу, спричинює оксидативну атаку на ДНК та оксидативний стрес у клітинах. Внаслідок ушкодження ДНК активними формами кисню та хронічного запалення можуть активуватися зупинка клітинного циклу, апоптоз та репарація ДНК. Механізми репарації ДНК є центральними в запобіганні генетичному ушкодженню, яке може зафіксуватися як постійна мутація. При порушенні цих захисних механізмів можуть виникнути зміни, які передаються дочірнім клітинам [4]. Це підвищує ризик трансформації клітин та стимулює канцерогенез, тому дослідження впливу НЧ на клітину мають бути визначальними на шляху встановлення їх небезпечності.

Мета, завдання та методика досліджень

Метою дослідження було встановлення цитотоксичності нанопрепаратів (що містять у своєму складі наночастинки) за результатами дослідження їх впливу на процеси, які протікають у клітині.

Завданням дослідження було визначення залежності токсичності нанопрепаратів від розмірів НЧ, що входять до їхнього складу.

Досліджували препарати, які застосовуються з метою покращання умов живлення сільськогосподарських рослин:

Nano-Gro – стимулятор росту, представляє собою водорозчинні гранули діаметром близько 4 мм, масою 0,05 г з масовою долею активних компонентів сульфатів заліза, кобальту, алюмінію, магнію, марганцю, нікелю та срібла $2,84 \cdot 10^{-9}$ % гранули або $1,43 \cdot 10^{-11}$ г. Розмір НЧ сягає 90 нм. Виробником є компанія AgroNanotechnologyCorp (США).

Аватар-1 – мікроелементний комплекс, що представляє собою колоїдний розчин особливо чистих карбоксилатів природних харчових кислот та особливо чистих біогенних металів у концентрації (мг/л): Cu - 800, Zn - 70, Mg - 800, Ag - 1,3, Mn - 50, Co - 25, Cr - 0,3, Mo - 25, Fe - 80, Se - 15, Ge - 15,0 в деіонізованій воді чистотою 99,99999 %. Препарат вітчизняного виробництва. Розміри НЧ елементного складу препарату становлять 25,8 – 40 нм.

Нанорозмірна мідь отримана шляхом спільного осадження з парової фази металу і галогеніду лужних металів (NaCl).

Як тест-рослину використовували цибулю ріпчасту (*Allium sera* L.) сорту Халцедон. З кореневої меристеми проростків виготовляли тимчасові давлені препарати, згідно з загальноприйнятою методикою та розраховували мітотичний індекс [4–5].

Схема досліду передбачала наступні варіанти: контроль (вода); рекомендована доза (РД) – становить для Аватар-1 та наноміді – 50 мл/га, а для Nano-Gro- 100 мл/га; доза, збільшена у чотири рази (4 РД). Повторність досліду трикратна.

Результати досліджень

Багатьма дослідженнями доведено, що НЧ через невеликі розміри можуть проникати в клітинні органели і тим же самим змінювати функції біоструктур. Результати дослідження цитотоксичного ефекту на клітинах *Alliumsera* L. свідчать, що застосування наноагрохімікатів у дозах, які рекомендовані для сільськогосподарського виробництва, призвели до зниження мітотичної активності і тривалості окремих фаз мітотичного циклу (табл. 1.1).

Таблиця 1. Вплив наноагрохімікатів на мітотичну активність і тривалість окремих фаз мітотичного циклу

Препарат	Загальна кількість проаналізованих клітин	МІ**, %
Контроль (вода)	301	534,88
Nano-Gro	393	519,08
Аватар - 1	402	514,93
Наномідь	410	529,27
НІР		4,00

Мітозмодифікуючий ефект, який проявляється у зміні мітотичної активності меристеми і є відповіддю на дію наноагрохімікатів, визначали за величиною мітотичного індексу (МІ). Розраховували МІ (%) як відношення числа клітин мітотичного поділу до загальної кількості клітин за формулою:

$$MI = \frac{П + М + А + Т}{П + М + А + Т + I} * 1000,$$

де П – число клітин в профазі, М – в метафазі, А – в анафазі, Т – в телофазі, I – в інтерфазі. За результатами експериментальних досліджень було встановлено, що під впливом наноміді змінювалася тривалість фаз мітозу. Зафіксоване пригнічення зросло від 1,86 до 5,07 %. Зменшення кількості клітин у ана- та телофазі, активності мітотичного поділу на стадії метафазі, кількість клітин у цій фазі порівняно з контролем, свідчить про порушення веретена поділу (рис. 1).

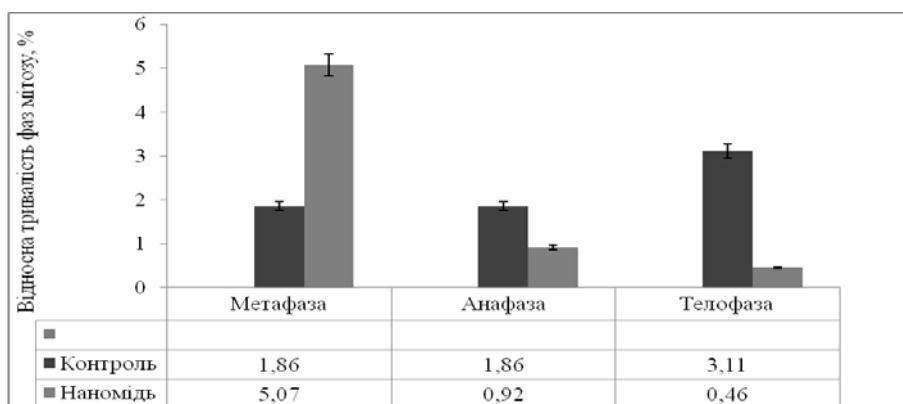
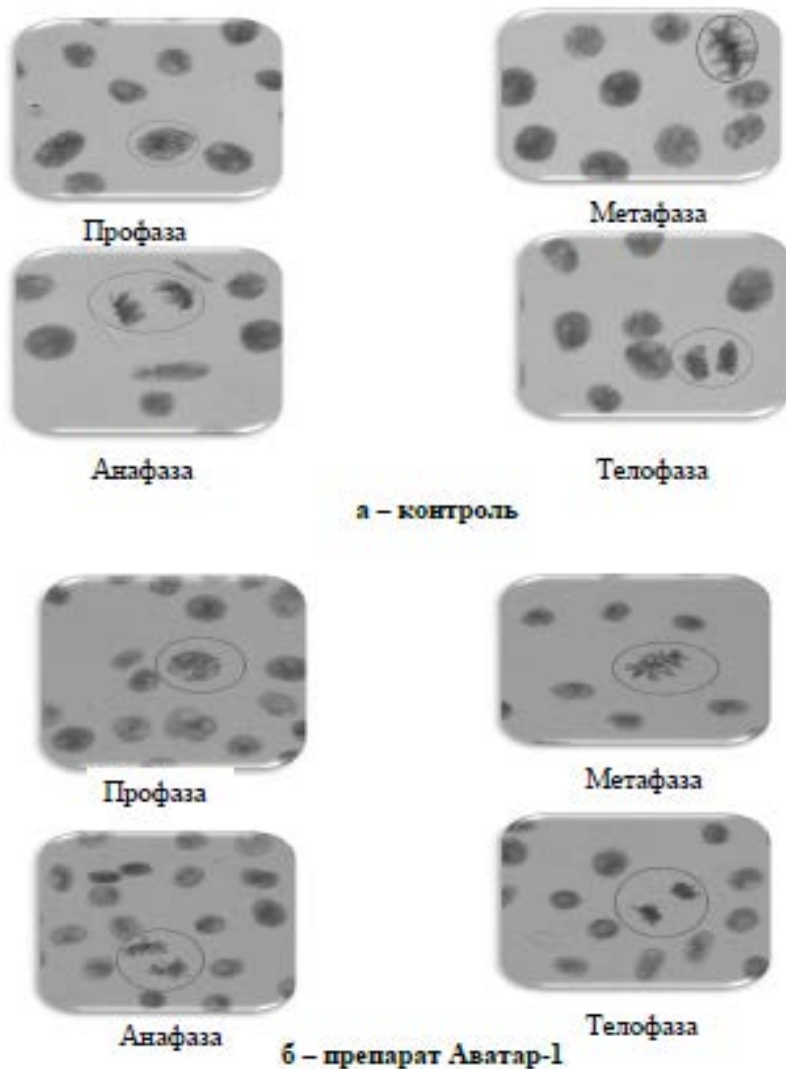


Рис. 1. Вплив наноміді на відносну тривалість окремих фаз мітозу клітин *Allium* сера L.

Дослідження механізму поділу клітин показало, що під впливом нанопрепаратів на стадії ана- і телофазі було зареєстровано аберації, пов'язані з певним порушенням структури хромосом, пошкодженням мітотичного веретена (веретена поділу), а також зі зміною поведінки хромосом на веретені поділу. Під впливом препарату Аватар-1 спостерігалася відставання хромосом у анафазі і телофазі, що може бути свідченням часткової втрати генетичної інформації в подальшому. Під дією препарату Nano-Gro спостерігалася пошкодження мітотичного веретена поділу, що призвело до утворення мостів. При цьому поділ клітин призупинився в анафазі (рис. 1.2).



в - препарат Nano-Gro

Рис. 2. Мітотичний поділ клітин *Allium sera* L. під впливом нанопрепаратів
(а - контроль, б - препарат Аватар-1, в - препарат Nano-Gro)

Виявлені зміни можна розглядати як наслідок прямого впливу НЧ, що входять до складу нанопрепаратів, на клітинні структури.

Вивчення цитотоксичного впливу препаратів, проведене на клітинах кореневої меристеми *A. Сера L.* (*Allium* - тест) за використання програмного забезпечення Image-Pro Premier 9.0 (USA), дозволило визначити середній розмір клітин під час поділу.

Було встановлено, що препарат Nano-Gro в дозі, яка рекомендована для виробництва, не виявив токсичної дії на клітини меристеми. Однак, збільшення дози у 4 рази призвело до зменшення розмірів клітин на 10,9% відносно контролю (табл. 1.2).

Таблиця 2. Вплив нанопрепаратів на розмір клітин меристематичної тканини *A. сера L.*

Варіант	Доза	Діаметр клітин, мкм
Контроль (вода)	–	9,2*
Nano-Gro	1РД	9,5
	4РД	8,2
Аватар - 1	1РД	7,9
	4РД	7,8

*F>Fкр, що свідчить про достовірність отриманих даних

На відміну від Nano-Gro, застосування препарату Аватар-1 навіть у рекомендованій дозі (1РД) призвело до зменшення розміру клітин на 14,1% щодо контролю.

Таким чином, дослідження проведені на клітинах *Alliumсера L.* дозволили пояснити висловлене припущення, що токсична дія і розвиток токсичного процесу залежали як від дози застосування препаратів, так і від його фізико-хімічних особливостей. Токсична дія Аватару-1, порівняно з Nano-Gro, проявлялася сильніше, що може бути пов'язано з меншим розміром НЧ, які входять до його складу.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Результати дослідження цитотоксичного ефекту на клітинах *Alliumсера L.* показали, що використання нанопрепаратів призвело до порушення структури хромосом, пошкодження мітотичного веретена та зміни поведінки хромосом на веретені поділу.

Встановлено, що нанопрепарати, які містять у своєму складі наночастинки, характеризуються високим рівнем цитотоксичності, здатні змінювати тривалість окремих фаз мітозу, та порушувати нормальний поділ клітин. Можна передбачити, що наночастинки діють, у першу чергу, на плазматичну мембрану,

порушують її цілісність, проникають через мембрани клітин та безпосередньо взаємодіють з ДНК у ядрі.

Перспективою подальшого дослідження є розроблення екотоксикологічних нормативів для оцінювання небезпечності нанопрепаратів за показниками цитотоксичності

Література

1. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.
 2. Прохорова И. М. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды : метод. указания / И. М. Прохорова, М. И. Комарова, А. Н. Фомичева. – Ярославль : Яросл. гос. ун-т, 2003. – 32 с.
 3. Москаленко В. Ф. Екологічні і токсиколого-гігієнічні аспекти біологічної безпеки нанотехнологій, наночастинок та наноматеріалів / В. Ф. Москаленко, О. П. Яворовський // Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту. – 2009. – № 3. – С. 25–35.
 4. Borm P. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC / P. Borm, D. Robbins, S. Haubold // Particle and Fibre Toxicol. – 2006. – Vol. 3, №. 11. – P. 1–35.
 5. Oberdorster G. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy / G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson // Particle and Fibre Toxicology. – 2005. – Vol. 2, № 1. – P. 8–43.
-