



ЗЕЛЕНЫЙ СИНТЕЗ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ С СИЛИМАРИНОМ, ИХ ДЕЙСТВИЕ НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

РЫБИН Александр Олегович, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

*Синтезированы золотые наночастицы с использованием силимарина – экстракта *Silybum marianum*. Используя электронную микроскопию и метод динамического светорассеяния, был проведен анализ препарата. Препарат концентрировали лиофилизировальной сушкой и изучали активность его растворенной формы на культурах клеток животных – здоровых и опухолевых.*

Флавоноиды представляют собой разнородную группу биоактивных веществ, которые являются метаболитами растений и представлены в природе более чем 10 000 соединений, многие из которых до сих пор мало изучены. В клетках растений они выполняют в основном защитные функции, в частности обеспечение растительной пигментации, которая способствует предохранению от УФ-излучения. Кроме того, они обладают антиоксидантными, противовирусными и антибактериальными свойствами, способны регулировать экспрессию генов и модулируют ферментативные реакции [1].

Силимарин – флавоноид, получаемый из плодов и семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L. Gaertn.). Он состоит в основном из силибинина (≈90 %) вместе с небольшими количествами других стереоизомеров, таких как изосилибин, дигидросилибин, силидианин, силикристин [2]. Силимарин был впервые выделен из расторопши и химически охарактеризован в 1968–1974 гг. [2, 3]. Позже появились сообщения о биохимическом воздействии силимарина на РНК, белки и синтез ДНК [4].

Силимарин широко используется в традиционной медицине [5]. Он был положительно оценен клинически при лечении гепатита печени, вызванного алкоголем [6] или применением противотуберкулезных препаратов [7]. Силибинин обладает очень сильным антиоксидантным действием [8]. Он способен нейтрализовать как свободные радикалы, так и активные формы кислорода.

За последние годы описано около 30 классов химических веществ с раковопрофилактическим эффектом, которые могут иметь практическое значение в снижении заболеваемости раком [9]. Среди них все большее внимание уделяется полифенольным антиоксидантам естественного происхождения [10]. Так, было показано, что силибинин увеличивает ацетилирование гистона H3 и H4 *in vitro* и *in vivo* в клетках линии Huh7 ксенотрансплантатов у голых мышей [11, 12]. В

клетках немелкоклеточного рака легкого силибинин ингибирует активность Histone deacetylases HDAC и снижение ее уровня [13]. Кроме того, обнаружено, что силибинин оказывает антипролиферативные и проапоптотические эффекты в первичных клетках аденокарциномы SW480 и в их метастатических производных [14]. Также было высказано предположение о том, что силибинин может быть полезным препаратом в химиопрофилактике злокачественных опухолей кожи, мочевого пузыря, печени, шейки матки и толстой кишки [15].

Многие исследователи в последнее время уделяют большое внимание синтезу и изучению свойств различных наноматериалов как носителей лекарственных веществ [16, 17]. Наночастицы имеют много привлекательных свойств: их можно легко транспортировать, присоединять к их поверхности диагностические и терапевтические вещества, а также иммуноактивные биомолекулы. Эти уникальные свойства наночастиц делают их пригодными для терапевтического применения при лечении различных заболеваний. Наночастицы обладают низкой токсичностью и позволяют быстро высвобождать лекарственные средства при таргетной терапии [18].

Золотые наночастицы в последнее время весьма активно используют в медицине [19], в частности в диагностике и терапии опухолей [20, 21]. Кроме того, показано наличие иммуностимулирующих свойств у самих золотых частиц [22, 23]. Однако число работ, посвященных использованию коллоидного золота как носителя химико-терапевтических средств растительного происхождения и его применению при терапии экспериментальных патологий, невелико [24]. В нашей работе мы исследуем использование золотых наночастиц как носителей силимарина при взаимодействии с опухолевыми и нормальными культурами клеток животных.

Методика исследований. Исследование проводили на клеточных линиях SPEV 2 (нормальные клетки) и Нер-2 (опухолевые клетки).



Клетки выращиваются в пластиковых матрасах на среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM) (Biological Industries, Израиль), содержащей L-глутамин, 15 мМ ХЕПЕС, 10 % фетальной коровьей сыворотки и антибиотиков. Культивирование проводили в термостате при 37 °C с 5 % CO₂. При постановке эксперимента клетки с поверхности матраса снимали раствором трипсин/Вересна при 37 °C в течение 10–15 мин. После этого клетки осаждали центрифугированием при 900 g 20 мин, осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере pH 7,2–7,4 и повторно центрифугировали при 900 g 20 мин. Полученные клетки перерастворяли в полной DMEM и проводили засев культуральной плашки с посевной дозой 1×10⁵ клеток на лунку.

После покрытия в плашки с клетками 80 % поверхности лунки (культивирование в течение 18–24 ч) вносили препарат в пяти повторностях в дозе 8 мкг силимарина на лунку. В качестве препарата сравнения использовали раствор силимарина в среде в аналогичной концентрации.

Препарат коллоидного золота с силимарином синтезировали по методу [40] с небольшими модификациями: 213 мкл 4%-й золотохлористоводородной кислоты (HAuCl₄) добавляли к 25 мл milliQ воды. Параллельно готовили навеску поташа (K₂CO₃, ОСЧ) 0,138 г в 10 мл milliQ. К полученному раствору поташа вносили 0,0768 г силимарина. После полного растворения силимарина раствор фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр (0,22 мкм) и по каплям вносили 5 мл фильтрованного раствора силимарина к раствору HAuCl₄. Реакция протекала в течение 1 ч при интенсивном помешивании. После окрашивания раствора в вишневый цвет полученный препарат лиофилизировали.

Определение концентрации силимарина в препарате осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Стайер» (Аквилон) с УФ-детектором при длине волны 288 нм. Измерения проводили при использовании колонки Луна С-18 2,0×60 мм в элюэнте – ацетонитрил «для жидкостной хроматографии» – 1%-й раствор уксусной кислоты в соотношении 2:3 по объему.

Диаметр синтезированных AuNPs определяли с использованием UV-Vis спектрофотометра Specord S 250 (Analytik Jena, Germany), трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Germany) и анализатора размера частиц и дзета-потенциала Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK) [25].

Жизнеспособность культивируемых клеток определяли методом анализа редукции МТТ до формазана [26].

Результаты исследований. Диаметр синтезированных AuNPs был определен методами

спектрофотометрии, трансмиссионной электронной микроскопии (TEM) и динамического светорассеяния (DLS) (рис.1).

Максимум спектра поглощения, полученного золя, составил $\lambda_{\max} = 529$ нм, при этом оптическая плотность равнялась $A_{529} = 0,356$. По данным TEM и DLS средний диаметр полученных наночастиц был 20–23 нм.

Концентрацию силимарина в препарате определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Было установлено, что концентрация силимарина в препарате составляет 2–56 мкг/мл. Исходя из данного результата, нами в дальнейшем проводились расчеты концентраций препарата для биологических исследований.

Активность полученного нами препарата была проверена на клеточных линиях Нер 2 и SPEV 2. Из рис. 2 видно, что препарат у опухолевой клеточной линии Нер 2 вызывает угнетение клеточного дыхания на 37 % по сравнению с контролем. Сам силимарин не вызывает угнетения клеточного дыхания, однако у клеток, которые культивировали в присутствии препарата коллоидного золота, также наблюдалось угнетение клеточного дыхания (на 11,3 %).

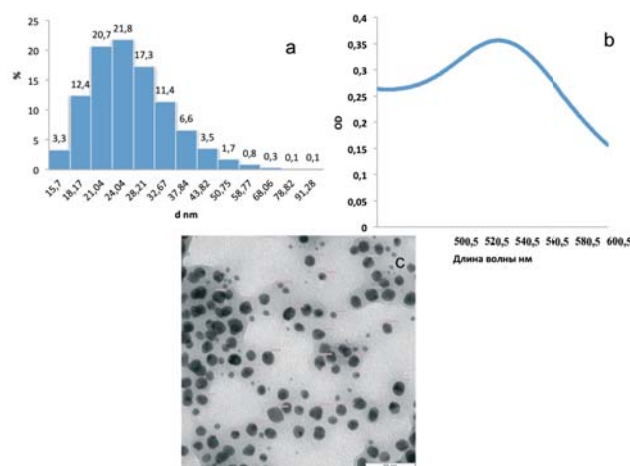


Рис. 1. Распределение размеров частиц (а), спектр поглощения (b) и TEM изображение (с)

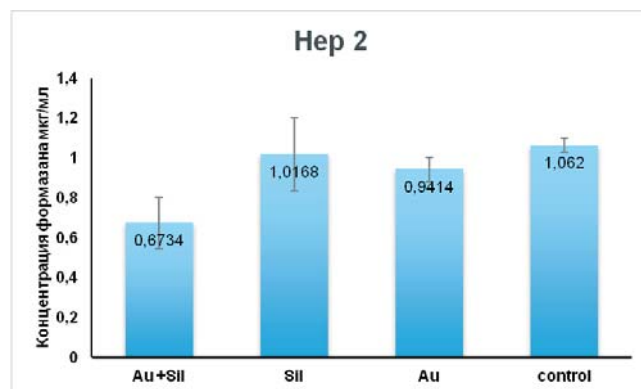


Рис. 2. Изменение дыхательной активности у клеток линии Нер 2, культивируемых в присутствии золотых наночастиц, синтезированных при помощи силимарина (Au +Sil), силимарина (Sil), золотых наночастиц (Au)



На рис. 3 представлены данные изменения интенсивности дыхания клеток линии SPEV 2 в присутствии различных препаратов. Показано, что препарат силимарин и наночастицы золота не вызывают изменения клеточного дыхания у неопухолевых клеток.

Выводы. Препарат силимарина с коллоидным золотом оказывает токсический эффект на линию опухолевых клеток Нер 2.

Коллоидное золото способствует повышению действия препарата. Это, по-видимому, связано с лучшим внутриклеточным проникновением силимарина, связанного с наночастицами.

В дальнейшем планируется провести изучение терапевтической эффективности разработанного нами препарата на моделях *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pollastri S., Tattini M. Flavonols: old compounds for old roles // *Ann. Bot.*, 2011., 108., P. 1225–1233.
2. Wagner H., Horhammer L., Munster R. On the chemistry of silymarin (silibinin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum* L. Gaertn. (*Carduus marianus* L.) // *Arzneimittelforschung*, 1968, 18, P. 688–696.
3. Wagner H., Diesel P., Seitz M. The chemistry and analysis of silymarin from *Silybum marianum* Gaertn. // *Arzneimittelforschung*, 1974, 24, P. 466–471.
4. Sonnenbichler J., Zetl I. Biochemical effects of the flavonolignan silibinin on RNA, protein, and DNA synthesis in rat liver // *Progr. Clin. Biol. Res.* 1986. 213. 319–331.
5. Morazzoni P., Bombardelli E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*) // *Fitoterapia*, 1996, 66, P. 3–42.
6. Wellington K., Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders // *BioDrugs*, 2001, 15, P. 465–489.
7. Tasduq S.A., Peerzada K., Koul S., Bhat R., Johri R.K. Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin // *Hepatology*, 2005, 31, P.132–135.
8. Wagner H. Plant constituents with antihepatotoxic activity. In: Beal J.L., Reinhard E. eds. *Natural Products as Medicinal Agents*. Stuttgart: Hippokrates-Verlag; 1981.
9. Wattenberg L.W. An overview of chemoprevention: current status and future prospects // *Proc. Soc. Exp.*

Biol. Med., 1997, 216, P. 133–141.

10. Dragsted L.O. Natural antioxidants in chemoprevention // *Arch. Toxicol. Suppl.*, 1998., 20., P. 209–226.

11. Lah J.J., Cui W., Hu K.Q. Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines // *World J. Gastroenterol.* 2007, 13, P. 5299–5305.

12. Cui W., Gu F., Hu K.Q. Effects and mechanisms of silibinin on human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice // *World J. Gastroenterol.* 2009, 15, P. 1943–1950.

13. Mateen S., Raina K., Jain A., Agarwal C., Chan D., Agarwal R. Epigenetic modifications and p21-cyclin B1 nexus in anticancer effect of histone deacetylase inhibitors in combination with silibinin on non-small cell lung cancer cells // *Epigenetics*, 2012, 7, P. 1161–1172.

14. Kauntz H., Bousserouel S., Gosse F., Raul F. Silibinin triggers apoptotic signaling pathways and autophagic survival response in human colon adenocarcinoma cells and their derived metastatic cells // *Apoptosis*, 2011, 16, P. 1042–1053.

15. Gazák R., Walterova D., Kren V. Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine // *Curr. Med. Chem.* 2007, 14, P. 315–338.

16. Singh R., Lillard J.W. Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery // *Exp. Mol. Pathol.* 2009. 86. 215–223.

17. Sundar S., Prajapati V.K. Drug targeting to infectious diseases by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules // *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19, P. 3196–3202.

18. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies // *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, P. 1647–1671.

19. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives // *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, P. 2256–2282.

20. Yen H.J., Hsu S.H., Tsai C.L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes // *Small*. 2009. 5. 1553–1561.

21. Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant. -New York: Nova Science Publishers, 2010, 54 p.

22. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells // *Chem. Rev.* 2014, 114, P. 1258–1288.

23. Khlebtsov N., Bogatyrev V., Dykman L., Khlebtsov B., Staroverov S., Shirokov A., Matora L., Khanadeev V., Pylaev T., Tsyganova N., Terentyuk G. Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites // *Theranostics*, 2013, 3, P. 167–180.

24. Kabir N., Ali H., Ateeq M., Bertino M.F., Shah M.R., Franze L. Silymarin coated gold nanoparticles ameliorates CCl₄-induced hepatic injury and cirrhosis through down regulation of Hepatic stellate cells and attenuation of Kupffer cells // *RSC Adv.*, 2014, 4, P. 9012–9020.

25. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, 2010, 111., P. 1–35.

26. Oez S., Platzner E., Welte K. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes // *Blut*, 1990, 60, P. 97–102.

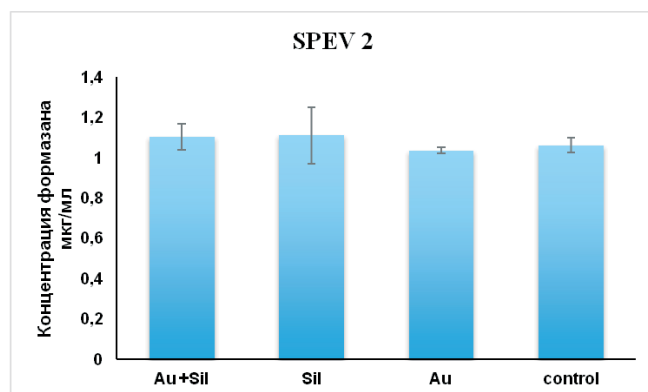


Рис. 3. Изменение дыхательной активности у клеток линии SPEV 2, культивируемых в присутствии золотых наночастиц, синтезированных при помощи силимарина (Au +Sil), силимарина (Sil), золотых наночастиц (Au)



Рыбин Александр Олегович, аспирант кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335.
Тел.: (8452) 69-25-32.

Ключевые слова: золотые наночастицы; наноматериалы; силимарин; флавоноиды.

GREEN SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES USING SILYMARIN, THEIR EFFECT ON ANIMAL CELL CULTURE IN VITRO AND IN VIVO.

Rybin Aleksandr Olegovich, Post-graduate Student of the chair "Animals' Diseases and Veterinarian-sanitarian Expertise", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Keywords: gold nanoparticles; nanomaterials; silymarin; flavonoid.

Flavonoids comprise a diverse group of bioactive sub-

stances which are plant me-tabolites and are found in more than 10 000 chemical compounds; most of them are not fully studied yet. They mainly fulfill protective functions in plant cells, namely creating pig-mentation which protects from ultra-violet radiation. Besides, flavonoids demonstrate anti-oxidant, antiviral and antibacterial qualities and are able to regulate gene expression as well as to modulate enzymatic reactions.

УДК619.615.4;636.5(470.333)

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕПАРАТОВ «АРГОДЕЗ» И «ДЕЗОЛАЙН-Ф»

ЦЫГАНКОВ Евгений Михайлович, Брянский государственный аграрный университет
МЕНЬКОВА Анна Александровна, Брянский государственный аграрный университет
АНДРЕЕВ Александр Иванович, Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва

Для изучения влияния обработки препаратами «Аргодез» и «Дезолайн-Ф» на морфологические показатели крови и санитарно-бактериологические результаты смывов была произведена аэрозольная газация птичников методом холодного тумана. Установлено инактивирующее действие препаратов на E. coli и общее микробное число. Выявлено незначительное изменение морфологических показателей крови.

Выполнение птицеводческими предприятиями необходимых требований по защите хозяйства от заноса патогенных микроорганизмов – один из актуальных вопросов организации работы птицеводческой отрасли [2]. Главный риск заноса инфекционных болезней на птицеводческие предприятия связан с приобретением инкубационных яиц и суточных цыплят [3, 5, 9, 11].

Трудное экономическое положение птицеводческих предприятий заставляет их использовать одни и те же помещения и ограничивать проведение санитарно-гигиенических мероприятий. В результате этого увеличивается количество условно-патогенных микроорганизмов в воздухе и на конструкциях, которые длительное время не подвергаются дезинфекции [1, 7, 8, 11].

Наночастицы кластерного серебра обладают выраженным бактерицидным действием по отношению к патогенным бактериям [12, 13]. Инактивирующее действие наночастиц более интенсивно, чем ионов серебра [1, 10]. Как основа для дезинфицирующих средств нового типа растворы на основе наночастиц серебра облада-

ют сильно выраженным антимикробным действием, безопасны для человека и животных и эффективны [13, 14].

Цель работы заключается в изучении пролонгированного бактерицидного влияния аэрозольной обработки в зимний период препаратами «Аргодез», в состав которого входят наночастицы кластерного серебра, и «Дезолайн-Ф» (на основе формальдегида) на санитарно-бактериологические результаты смывов, морфологические показатели крови.

Методика исследований. Экспериментальную часть работы выполняли в 2016–2017 гг. на базе ПАО «Снежка» Брянского р-на Брянской области и ФГБУ ВО «Брянский государственный аграрный университет». Объектом исследований служили птичники по выращиванию ремонтного молодняка, цыплята суточного и 30-суточного возраста яичного направления кросса ломанн браун. Контрольные и опытные группы птицы были скомплектованы по принципу групп-аналогов.

В научно-производственном эксперименте было задействовано 2 цеха, контрольный и