УДК 612.411-091.8:577.17]-092.9

# ДОЗОЗАВИСИМОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕЛЕЗЕНКИ

**Златник Е.Ю., Передреева Л.В.**

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnioi@list.ru, elena-zlatnik@mail.ru*

Изучали влияние внутрибрюшинного введения наночастиц переходных металлов (НЧ Zn, НЧ Fe) в различных дозах на структурно-функциональные характеристики селезенок мышей. Выявлено дозозависимое действие обоих видов наночастиц на морфологические показатели селезенки, преимущественно описывающие состояние белой пульпы, характеризующей активность В-клеточного звена (количество и размер фолликулов, наличие у них герминативного центра, митотическая активность клеток). Обе исследованные дозы НЧ Zn (0,2 и 1 мг/кг массы) и низкая доза НЧ Fe оказывали незначительное влияние на изученные показатели, в отличие от высокой дозы НЧ Fe (1 мг/кг массы), введение которой вызывало угнетение пролиферативной активности спленоцитов, но не приводило к грубым повреждениям органа, что присуще иммунодепрессантам и тяжелым металлам.

**Ключевые слова: наночастицы металлов, селезенка, морфологическое исследование**

# DOSE-DEPENDENT EFFECT OF NANOPARTICLES OF TRANSITION METALS ON MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF SPLEEN

**Zlatnik E.Y., Peredreeva L.V.**

*FSBI «Rostov Research Oncological Institute» MH RF, Rostov-on-Don, e-mail: rnioi@list.ru, elena-zlatnik@mail.ru*

Effect of intraperitoneal administration of various doses of transition metals (Zn and Fe) nanoparticles (NP Zn and NP Fe) on morphofunctional characteristics of mouse spleen was studied. Dose-dependent effect of both kinds of metallic nanoparticles on morphofunctional characteristics depicting predominantly the state of B-lymphocyte link of immune system (amount and size of follicules, presence of germinative centre, mitotic activity) was found. Both doses of NP Zn (0,2 and 1 mg/kg weight) and the lower one of NP Fe produced no significant effect. Administration of 1 mg/kg NP Fe caused the inhibition of spleenocytes` proliferation but did not induce severe destruction of the organ unlike immunodepressants and heavy metals.

**Keywords: metallic nanoparticles, spleen, morphological study**

В последние годы многими авторами в стране и в мире разрабатываются и конструируются наноразмерные частицы различных веществ, которые могут найти эффективное применение в биологии и медицине [5; 12]. Вследствие размера таких частиц, обеспечивающего многократное возрастание суммарной поверхности и проникающей способности, они могут представлять как значительные возможности для коррекции различных патологических процессов, так и определенную опасность для сохранности структуры и функции нормальных клеток и тканей. Дозозависимость действия на иммунную систему различных веществ и препаратов, в частности иммуномодуляторов, описана в литературе [7]. Хорошо известно, что многие металлы оказывают влияние на состояние иммунной системы, являясь необходимыми метаболическими компонентами для всех ее звеньев [3]. Тем не менее влияние вновь синтезированных металлосодержащих наночастиц на функции иммунной системы, в частности на структурное и функциональное состояние ее органов, описано в единичных работах, причем в них объектом исследования были животные-опухоленосители [2; 8]. Селезенка является периферическим органом иммунной системы, но выполняет, кроме того, ряд других важных функций; она способна реагировать не только на специфические антигены, но и на различные воздействия, включая экстремальные (интоксикация, кровопотеря, гипоксия, стресс, сепсис). В ней, наряду с печенью, происходит накопление металлов при их введении в организм. Отмечена фазность развития изменений в органе в зависимости от длительности введения, а следовательно, и суммарной дозы тяжелых металлов (свинца, кадмия) [4; 6]. Показано, что золотые наночастицы после их введения экспериментальным животным выводятся из печени и селезенки в течение 3–4-х мес. [1], в связи с чем вопрос об оптимальном соотношении доза – эффект и о возможном повреждении этих органов является актуальным для проведения исследований в области биомедицинского применения нанотехнологий. По-видимому, еще в большей мере, чем к золотым наночастицам, это относится к частицам металлов с переменной валентностью (переходным), которые более

активно участвуют в химических и метаболических процессах и могут вызывать их нарушения, проявляя токсичность, отмеченную, например, у наночастиц меди [9; 10].

**Целью данной работы** явилось экспериментальное исследование действия различных доз наночастиц переходных металлов (цинка и железа) на морфофункциональные характеристики селезенки мышей.

## Материалы и методы исследования

В работе были использованы наночастицы (НЧ, размер 40–100 нм), представляющие собой ультрадисперсные порошки переходных металлов (Zn, Fe), синтезированные на Саратовском плазмохимическом комплексе ФГУП РФ ГНЦ ГНИИХТЭОС. Эксперимент выполнялся с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей. Белым беспородным мышам-самцам массой 18–20 г, содержащимся в стандартных условиях вивария, выполняли внутрибрюшинное введение взвеси НЧ металлов (Zn, Fe) в концентрации 2 и 10 мкг/мл каждого металла по 0,5 мл. Непосредственно перед введением взвесь диспергировали с помощью ультразвуковой обработки. Введение выполняли в течение 4-х дней, суммарная доза НЧ составляла 4 и 20 мкг/мышь (0,2 и 1 мг/кг массы соответственно), после чего животных наблюдали 4 дня. Контрольной группе аналогичным образом вводили изотонический раствор NaCl. В каждой из 4-х опытных групп и 1 контрольной было по 10 мышей, всего 50 животных. Селезенки мышей всех групп фиксировали в формалине и в жидкости Карнуа, после проводки до парафиновых блоков готовили срезы, которые окрашивали гематоксилином-эозином и метиловым зеленым пиронином по Браше в модификации А.А. Симаковой. В срезах исследовали структурные характеристики органа с помощью светового микроскопа Micros (Австрия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием параметрических (критерий Стьюдента) и непараметрических (критерий Уилкоксона, z-критерий знаков) методов.

## Результаты исследования и их обсуждение

Данные морфологического исследования селезенок мышей, получавших НЧ металлов, представлены в таблице и на рис. 1 и 2.

При микроскопии срезов селезенки значительных различий гистологической картины между опытными и контрольными животными не отмечено; их характеристики были во многом сходны. Капсула, трабекулы селезенки – тонкие или умеренно выраженные, ретикулярная ткань слабо заметна, в некоторых препаратах практически не видна. Паренхима значительно преобладает над стромой, кровеносные сосуды едва заметны, местами расширены, заполнены эритроцитами. Плотность расположения клеток умеренная, в контроле иногда разреженная, у мышей опытных групп – местами высокая. Красная пульпа умеренно развита; представлена эритроцитами, лимфоцитами, единичными макрофагами и мегакариоцитами, а также россыпями плазматических клеток. Белая пульпа хорошо или умеренно развита, представлена многочисленными лимфоидными фолликулами и периартериальными муфтами. Не отмечено визуальных различий состояния периартериальных муфт и мантийной зоны фолликулов между животными исследованных групп. Введение различных доз НЧ не оказывало влияния на клеточность красной и белой пульпы мышей опытных групп, при этом содержание клеток в селезенках животных этих групп статистически достоверно превышало контрольные значения (рис. 1).

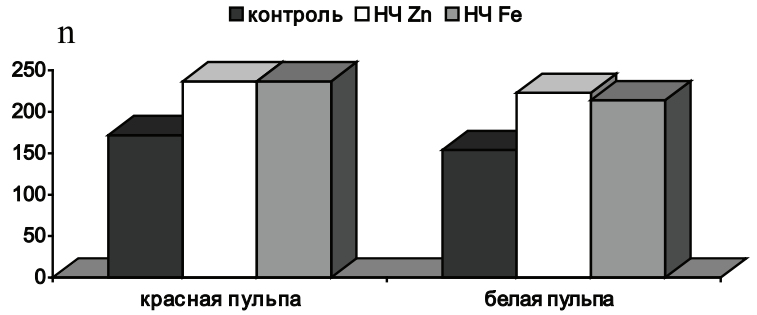


*Рис. 1. Общее количество клеток в красной и белой пульпе селезенки опытных (доза НЧ 1 мг/кг массы) и контрольных мышей в 1 поле зрения (x1350)*

Это превышение было обусловлено высоким содержанием лимфоцитов в селезенках мышей, получавших НЧ металлов (166,4 ± 17,25 в поле зрения при введении НЧ Zn и 177,3 ± 18,3 при введении НЧ Fe против 95,57 ± 4,52 в контроле; в обоих случаях $P < 0,05$).

При исследовании морфологии белой пульпы органа опытных и контрольных животных был выявлен ряд дозозависимых различий, сравнительная характеристика которых представлена в таблице.

Влияние различных доз НЧ металлов на структурные параметры селезенок мышей

| Показатели (*n* в срезе; x1350) | | Контроль | НЧ Zn | | НЧ Fe | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Доза НЧ (мг/кг массы) | | Доза НЧ (мг/кг массы) | |
| | | | 0,2 | 1 | 0,2 | 1 |
| Количество лимфоидных фолликулов | | 26,25 ± 3,11 | 36,83 ± 3,33* | 27,86 ± 2,02** *** | 28,5 ± 3,22 | 18,57 ± 2,06* ** *** |
| Из них | Малых | 10,09 ± 1,37 | 13,33 ± 1,24** | 10,43 ± 0,81** | 9,84 ± 1,09** | 6,45 ± 0,7* ** *** |
| | Средних | 8,9 ± 0,9 | 13,0 ± 1,17* | 9,14 ± 0,76*** | 11,5 ± 1,7 | 7,33 ± 0,94*** |
| | Больших | 7,26 ± 1,17 | 10,5 ± 2,3 | 8,29 ± 0,45** | 7,17 ± 1,28 | 4,79 ± 0,42* ** *** |
| | С герминативным центром | 11,42 ± 1,4 | 8,25 ± 1,36 | 11,57 ± 1,32** | 7,83 ± 1,84 | 4,62 ± 0,52* ** *** |
| Количество митозов в герминативном центре (n) | | 6,3 ± 1,04 | 5,75 ± 0,58 | 4,14 ± 0,19* ** | 4,66 ± 0,53 | 2,91 ± 0,38* ** *** |

Примечание. * – статистически достоверные отличия от контроля (P < 0,05); ** – статистически достоверные различия в зависимости от вида НЧ; *** – различия в зависимости от дозы НЧ.

Как видно из таблицы, введение меньшей суммарной дозы НЧ металлов (0,2 мг/кг массы) вызывает статистически достоверное возрастание количества лимфоидных фолликулов после введения НЧ Zn, а введение НЧ Fe в этой дозе не приводит к изменениям большинства исследованных показателей. Однако подсчет процентного содержания фолликулов различных видов от их общего количества выявил снижение процента фолликулов с герминативным центром после введения малых доз исследуемых НЧ металлов (рис. 2).

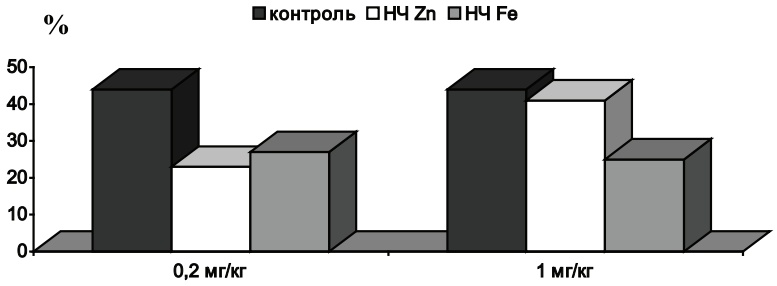


*Рис. 2. Процентное содержание фолликулов с герминативным центром в селезенках мышей после введения различных доз НЧ металлов*

Интересно, что при введении НЧ в более высокой дозе (1 мг/кг массы) у животных, получавших НЧ Zn, этот показатель восстанавливается до значений контрольной группы (41,53 ± 4,65 и 44,92 ± 4,41 % соответственно), а у мышей, получавших НЧ Fe, остается статистически достоверно ниже как контроля, так и результата действия НЧ Zn, составляя 24,88 ± 2,52 % (P < 0,05).

При введении НЧ Fe в дозе 1 мг/кг массы обнаружено снижение еще ряда параметров. У мышей данной группы происходит уменьшение по сравнению с контролем числа селезеночных фолликулов всех видов, а также количества митозов в герминативных центрах. Эти же показатели были статистически значимо ниже, чем у животных, получавших НЧ Zn в аналогичной дозе и получавших НЧ Fe дозе 0,2 мг/кг (таблица); таким образом, действие НЧ Zn можно считать более щадящим, чем НЧ Fe. Кроме того, о сохранности гуморального звена иммунитета после введения НЧ Zn свидетельствует более высокий уровень плазматических клеток в белой пульпе селезенок мышей данной группы (19,35 ± 2,28 %) по сравнению с получавшими НЧ Fe (12,88 ± 0,96 %; P < 0,05) и близкий к уровню контрольных значений (24,57 ± 2,12 %).

При введении НЧ Zn в дозе 1 мг/кг массы происходит статистически достоверное снижение только одного из исследованных показателей, а именно митотической активности клеток герминативных центров (таблица). У этих животных также наблюдается более низкое общее количество лимфоидных фолликулов по сравнению с группой мышей, получавших НЧ Zn в дозе 0,2 мг/кг массы, хотя оно находится на уровне контрольных значений.

Таким образом, показаны различия направленности влияния внутрибрюшинного введения наночастиц переходных металлов, зависящие от дозы и от химического

состава, на функционально значимые морфологические показатели селезенки. Продемонстрировано угнетающее действие НЧ Fe в дозе 1 мг/кг массы на некоторые структурные показатели селезенки, относящиеся преимущественно к активности В-клеточного звена иммунной системы, которое у НЧ Zn было выражено незначительно. Однако даже при введении этой дозы не наблюдается грубых повреждений селезенки, отмеченных у иммунодепрессантов, в частности цитостатиков [11, 13]: обнажения ретикулярной стромы, нарушения типичной структуры фолликулов, развития процессов некроза, признаков апоптоза и дистрофических изменений спленоцитов. Не выявлено также расширения синусов, утолщения стенки центральных артерий фолликулов, полнокровия сосудов с очагами кровоизлияний, выраженной плазмоклеточной реакции красной пульпы, уменьшения размеров фолликулов, площади Т- и В-зависимых зон, вызываемых действием тяжелых металлов (свинца, кадмия) [4, 6]. Подобных повреждающих эффектов у исследованных нами НЧ не обнаружено; а описанные изменения не характеризуют необратимых процессов в органе и, возможно, являются временными.

*Авторы выражают глубокую благодарность профессору Саратовского государственного медицинского университета В.Б. Бородулину за любезное предоставление наночастиц металлов.*

### Список литературы

1. Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Золотые частицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы // Acta Naturae. – 2011. – Т. 3. – № 2 (9). – С. 28–50.

2. Златник Е.Ю., Передреева Л.В., Евстратова О.Ф. Особенности морфофункционального состояния тимуса мышей при введении наночастиц различных металлов // Известия вузов Сев-Кав. регион. Естеств. науки. – 2011. – № 1 (161). – С. 106–109.

3. Кудрин А.В., Громова О.М. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. – М., 2007. – 544 с.

4. Кундиев Ю.И., Стежка В.А. Зависимость изменения иммунных и биохимических механизмов поддержания гомеостаза от материальной кумуляции свинца в организме (экспериментальное исследование) // Мед. труда и пром. экология. – 2002. – № 5. – С. 11–17.

5. Наноструктуры в биомедицине / под ред. К.Е. Гонсалвес, К.Р. Хальберштадт, К.Т. Лоренсин, Л.С. Наир. – М., 2012. – 519 с.

6. Стежка В.А., Лампека Е.Г., Дмитруха Н.Н. К механизму материальной кумуляции тяжелых металлов в организме белых крыс // Гигиена труда. – 2001. – Вып. 32. – С. 219–230.

7. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. – 2000. – № 5. – С. 4–7.

8. Шалашная Е.В., Горошинская И.А., Качесова П.С., Жукова Г.В. и др. Структурно-функциональные и биохимические изменения в органах иммунной системы при противоопухолевом действии наночастиц меди в эксперименте // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2011. – Т. 152. – № 11. – С. 552–556.

9. Chen Z., Meng H., Xing G. et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo // The journal of physical chemistry. Toxicology letter. – 2006. – Vol. 163. – P. 109–120.

10. Meng H., Chen Z., Xing G. et al. Ultrahigh reactivity and grave nanotoxicity of copper nanoparticles // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. – 2007. – Vol. 272. – № 3. – P. 595–598.

11. Strauss G., Osen W., Debatin K. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs // Clin. Exp. Immunology. – 2002. – № 2. – P. 255–266.

12. Zhang L., Gu F.X., Chan J.M. et al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2008. – Vol. 83. – P. 761–769.

13. Zusman I., Kossoy G., Ben-Hur H. T cell kinetics and apoptosis in immune organs and mammary tumors of rats treated with cyclophosphamide and soluble tumor-associated antigens // In vivo. – 2002. – Vol. 16. – № 6. – P. 567–576.

### References

1. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Zolotye chastitsy v biologii i meditsine: dostizheniya poslednikh let i perspektivy // Acta Naturae. 2011. T. 3. no. 2 (9). pp. 28–50.

2. Zlatnik E.Yu., Peredreeva L.V., Evstratova O.F. Osobennosti morfofunktsional'nogo sostoyaniya timusa myshey pri vvedenii nanochastits razlichnykh metallov // Izvestiya VUZov Sev-Kav. region. Estestv. nauki. 2011. no. 1 (161). pp. 106–109.

3. Kudrin A.V., Gromova O.M. Mikroelementy v immunologii i onkologii. M., 2007. 544 p.

4. Kundiev Yu.I., Stezhka V.A. Zavisimost' izmeneniya immunnykh i biokhimicheskikh mekhanizmov podderzhaniya gomeostaza ot material'noy kumulyatsii svintsa v organizme (eksperimental'noe issledovanie) // Med. truda i prom. ekologiya. 2002. no. 5. pp. 11–17.

5. Nanostruktury v biomeditsine / Pod red. K.E. Gonsalves, K.R. Khal'bershtadt, K.T. Lorensin, L.S. Nair. M., 2012. 519 p.

6. Stezhka V.A., Lampeka E.G., Dmitrukha N.N. K mekhanizmu material'noy kumulyatsii tyazhelykh metallov v organizme belykh krys // Gigiena truda. 2001. vyp. 32. pp. 219–230.

7. Khaitov R.M., Pinegin B.V. Sovremennye immunomodulyatory: osnovnye printsipy ikh primeneniya // Immunologiya. 2000. no. 5. pp. 4–7.

8. Shalashnaya E.V., Goroshinskaya I.A., Kachesova P.S., Zhukova G.V. i dr. Strukturno-funktsional'nye i biokhimicheskie izmeneniya v organakh immunnoy sistemy pri protivoopukholevom deystvii nanochastits medi v eksperimente // Byull. eksperim. biol. i med. 2011. T. 152. no. 11. pp. 552–556.

9. Chen Z., Meng H., Xing G. et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo // The journal of physical chemistry. Toxicology letter. 2006. Vol. 163. pp. 109–120.

10. Meng H., Chen Z., Xing G. et al. Ultrahigh reactivity and grave nanotoxicity of copper nanoparticles // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2007. Vol. 272. no. 3. pp. 595–598.

11. Strauss G., Osen W., Debatin K. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs // Clin. Exp. Immunology. 2002. no. 2. pp. 255–266.

12. Zhang L., Gu F.X., Chan J.M. et al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments // Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2008. Vol. 83. pp. 761–769.

13. Zusman I., Kossoy G., Ben-Hur H. T cell kinetics and apoptosis in immune organs and mammary tumors of rats treated with cyclophosphamide and soluble tumor-associated antigens // In vivo. 2002. Vol. 16. no. 6. pp. 567–576.

**Рецензенты:**

Николаева Н.В., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону;

Колесникова Н.В., д.б.н., профессор кафедры иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар.

Работа поступила в редакцию 13.05.2014.