

УДК

## **МЕСТНАЯ РЕАКЦИЯ ИММУНОЦИТОВ НА ПОДКОЖНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ.**

**Серебренников Д.Н., Архипкина Л.Н. (группа С 7106)**

Инженерная школа, Школа Биомедицины Дальневосточный Федеральный Университет

Владивосток, Россия; e-mail: [avers2@yandex.ru](mailto:avers2@yandex.ru)

**Научный руководитель:** доцент кафедры фундаментальной медицины Школы Биомедицины ДВФУ, к.м.н., **Недобыльская Ю.П.**

Проведены исследования токсикокинетики, токсикодинамики и токсичности золотых наночастиц, введённых в виде инъекций под кожу бедра, а также углеродных нанотрубочек на слизистую оболочку желудка при пероральном введении мышам линии СВА. Установлено, что имеется определённый алгоритм реакции иммуноцитов в зависимости от способов введения наночастиц в организм мыши. При пероральном введении при классических методах окрашивания слизистой оболочки ЖКТ выявляются в большом количестве тучные клетки, при подкожном введении наночастиц золота идентифицируются макрофаги.

**Ключевые слова:** золотые наночастицы, углеродные нанотрубочки, желудочно-кишечный тракт, кожа, токсикокинетика, иммуноциты.

**THE LOCAL REACTION OF IMMUNCYTES IN THE EFFECTS OF NANOPARTICLES.**

**LOCAL REACTION OF IMMUNE CELLS IN THE SUBCUTANEOUS INJECTION OF NANOPARTICLES.**

**Serebrennikov D.N., Arhipkina L.N. (Group C 7106)**

Engineering School, Biomedicine School of Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, e-mail: [avers2@yandex.ru](mailto:avers2@yandex.ru)

Studies on toksikokinetiks, toksikodinamiks and toxicity of gold nanoparticles, ntered into as an injection under the skin of the thigh to mice, as well as carbon nanotubes when administered to mice lines CBA. Found that there is a specific algorithm for the reaction of immune cells Depending on how the introduction of

nanoparticles in the body of the mouse. When administered with classical methods of staining mucous membrane syndrome identified in a large number of mast cells, When a skin gold nanoparticles are identified by macrophages.

**The key words:** gold nanoparticles, carbon nanotubes, gastrointestinal tract, skin, toxicokinetics, immunocytes.

**Актуальность.** В связи со стремительным развитием нанотехнологий контакты человека с наночастицами становятся неизбежными [1-5]. Основные исследования сосредоточены на изучении взаимосвязанных вопросов оценки биологических и токсических эффектов наночастиц, а также возможной перспективе их использования в качестве средств доставки лекарственных веществ и в диагностических целях [7, 13, 18, 23, 25, 29]. Их применение пока невозможно вследствие наличия побочных эффектов и отсутствия данных об их генерализованном влиянии на организм не только человека, но и экспериментальных животных [10, 19, 26, 28]. Ограниченность применения наночастиц связана с тем, что соединения золота токсичны, накапливаются в почках, печени, селезёнке и гипоталамусе, что может привести к органическим заболеваниям и дерматитам, стоматитам и тромбоцитопении [20].

Исследование наиболее общих закономерностей проявления биологических и токсических эффектов наночастиц в зависимости от их формы, размера, форм-фактора, исходного материала, площади поверхности, поверхностного заряда, примесей и других физико-химических особенностей строения, а также механизмов их воздействия на клетки и ткани, считаются актуальнейшими вопросами нанотоксикологии [6, 12, 15, 17, 27]. Не менее важны исследования, определяющие дозы, пути введения и концентрации наночастиц в области органа-мишени, продолжительность их воздействия [8, 14, 21]. При этом нами отмечено практически полное отсутствие данных о реакции местных иммуноцитов на введение наночастиц. Поэтому исследования в этом направлении являются актуальными и имеют практическую значимость [9, 11, 22].

Целью данного исследования было изучение особенностей реакции иммуноцитов структур кожи и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта крыс при введении наночастиц золота и углеродных нанотрубочек.

**Материал и методы:** для работы использованы 30 крыс-самцов линии СВА, которых разделили на 3 группы: 1. Контрольная интактная (чистый контроль, 5 крыс) группа, содержащаяся в одинаковых условиях

температурно-влажностного режима, освещения и питания с экспериментальными; 2. Экспериментальная группа, которой подкожно вводили наночастицы золота (NPG) (5 крыс). Топография введения наночастиц золота – задняя поверхность проксимальной трети бедра задней конечности. Время введения инъекций в группе контроля и эксперимента было также одинаковым, в 10.00, для исключения влияний суточных циркадных ритмов. Размеры наночастиц в коллоидном растворе достигали 10-20 нм. Получены коллоидные наночастицы золота в институте химии ДВО РАН, Владивосток).

Также был изучен материал различных отделов желудочно-кишечного тракта 5 мышей линии СВА (виварий ТИБОХ ДВО РАН) после перорального введения нанотрубок в течение 1, 2-х, 3-х, 4, 5 дней. Кормление комбикормом с нанотрубками проводилось в одно и то же время суток, в соответствии с суточными циркадными ритмами 1 раз в сутки в виде затравки в дозировке из расчета 500 мг/кг массы тела животного.

Последовательно, через 1, 2, 3, 4, 5 дней крыс забивали в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 12.08.77, выделяли мягкие ткани проксимальной трети заднего бедра у крыс при введении нанозолота и разных отделов ЖКТ у крыс, получавших углеродные нанотрубки, а затем классическим способом изготавливали парафиновые блоки. Полученные срезы депарафинировали и окрашивали по стандартной методике гематоксилин-эозином. Иллюстративный материал получен на микроскопе Olympus Vx51 с цифровой фотокамерой CDx25, а затем проанализирован с помощью оригинальных морфометрических компьютерных программ фирмы Olympus.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что в группах контроля в алгоритме забора материала через сутки в течение 5 дней морфологических изменений тканей кожи и ЖКТ не обнаружено. Типичное строение структур соединительной ткани, стенки кровеносных сосудов паховой области задней конечности и структур желудочно-кишечного тракта крыс прослеживалось во все дни забора материала.

Материал, полученный в первый день эксперимента от крыс, получавших подкожные инъекции наночастиц золота, позволил установить явления выраженной периваскулярной лейкоцитарной инфильтрации вокруг стенки кровеносных сосудов вблизи контаминации наночастиц в ткани. При этом морфологически лейкоциты соответствовали моноцитарно-макрофагальному

пулу. Отмечено, что на 1-2-е сутки макрофаги идентифицируются в области введения наночастиц, а к 4-5 суткам основная масса макрофагов идентифицируется только вблизи стенки кровеносных сосудов, периваскулярно. На 5-е сутки макрофаги мигрируют через сосудистую стенку в просвет кровеносных сосудов.

В ходе эксперимента установлено, что в группе контроля без использования нанотрубок в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта мышей патологических изменений не наблюдается.

В группе контроля после 1 суток перорального введения нанотрубок идентифицируются тучные клетки, мигрирующие в собственную пластинку слизистой оболочки.

Со вторых суток по 6-е нанотрубки идентифицируются в стенке желудочно-кишечного тракта опытной группы мышей в зоне мукозального барьера на поверхности слизистой оболочки желудка, 12-перстной кишки и тонкого кишечника. Идентифицируются нанотрубки и их агрегаты круглой и овальной формы, размерами до 10-20 мкм. На 6-е сутки эксперимента наблюдается увеличение лимфоидных фолликулов в собственной пластинке слизистой оболочки ЖКТ.

Идентификация тучных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки микроворсин тонкого кишечника может являться результатом реакции на пероральное введение нанотрубок. Учитывая функциональные особенности тучных клеток [21, 24], можно сделать вывод об их значении в привлечении макрофагов через выработку соответствующих цитокинов, а также индукции посредством секреции регуляторов местного гомеостаза для изменения просвета сосудов микроциркуляторного русла для выведения наночастиц через систему воротной вены в печень для дезинтоксикации.

Реакция иммунной системы организма мыши на пероральное введение нанотрубок проявляется сначала увеличением количества тучных клеток в собственной пластинке ЖКТ крыс с последующей гипертрофией лимфоидных структур в собственной пластинке слизистой оболочки, а инъекционное введение наночастиц золота в соединительную ткань кожи крыс сопровождается макрофагальной инфильтрацией.

В целом нами отмечена иммуногенность как углеродных нанотрубочек, так и золотых наночастиц при различных способах и местах введения.

Литература:

1. Богатиков О.А. Неорганические наночастицы в природе // Вестник РАН, 2003. Т.73, № 5. С. 426-428.
2. Бунятян Н.Д. и др. Современное состояние и перспективы развития нанотоксикологии // Фармация, 2008. №8. С. 3-5.
3. Глушкова А.В. и др. Нанотехнологии и нанотоксикология - взгляд на проблему // Токсикологический вестник, 2007. № 6. С. 4-8.
4. Дурнев А.Д. Токсикология наночастиц / Бюлл. эксперим. биол. и мед., 2008. Т. 145, № 1. С. 78 – 80.
5. Колесниченко А.В. и др. Токсичность наноматериалов – 15 лет исследований // Российские нанотехнологии, 2008. Т. 3, №3-4. С. 54-61.
6. Середенин С.Б., Дурнев А.Д. Мутагены (Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). – М.: Медицина, 1998. 328 с.
7. Abdelhalim MA. Gold nanoparticles administration induces disarray of heart muscle, hemorrhagic, chronic inflammatory cells infiltrated by small lymphocytes, cytoplasmic vacuolization and congested and dilated blood vessels.//Lipids Health Dis. 2011 Dec 9;10:233.
8. Arvizo R, Bhattacharya R, Mukherjee P. Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. //Expert Opin Drug Deliv. 2010 Jun;7(6):753-63.
9. Balogh L, Nigavekar SS, Nair BM, Lesniak W, Zhang C, Sung LY, Kariapper MS, El-Jawahri A, Llanes M, Bolton B, Mamou F, Tan W, Hutson A, Minc L, Khan MK. Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models.//Nanomedicine. 2007 Dec;3(4):281-96.
10. Cheng Y, Samia AC, Li J, Kenney ME, Resnick A, Burda C. Delivery and efficacy of a cancer drug as a function of the bond to the gold nanoparticle surface.//Langmuir. 2010 Feb 16;26(4):2248-55.
11. Chithrani DB. Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures.//Mol Membr Biol. 2010 Oct;27(7):299-311.
12. Comenge J, Sotelo C, Romero F, Gallego O, Barnadas A, Parada TG, Domínguez F, Puentes VF. Detoxifying Antitumoral Drugs via

Nanoconjugation: The Case of Gold Nanoparticles and Cisplatin.//PLoS One. 2012;7(10):e47562.

13. Dowling MB, Li L, Park J, Kumi G, Nan A, Ghandehari H, Fourkas JT, DeShong P. Multiphoton-absorption-induced-luminescence (MAIL) imaging of tumor-targeted gold nanoparticles. //Bioconjug Chem. 2010 Nov 17;21(11):1968-77.
14. Duncan B, Kim C, Rotello VM. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems.//J Control Release. 2010 Nov 20;148(1):122-7.
15. Freese C, Uboldi C, Gibson MI, Unger RE, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Kirkpatrick CJ. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells.//Part Fibre Toxicol. 2012 Jul 3;9:23.
16. Hoet P.H.M. et al. Nanoparticles – known and unknown health risks // Journal of Nanobiotechnology, 2004. №2. P. 12.
17. Thaxton CS, Georganopoulou DG, Mirkin CA. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets.//Clin Chim Acta. 2006 Jan;363(1-2):120-6.
18. Guo D, Wu C, Song W, Jiang H, Wang X, Chen B. Effect of colloidal gold nanoparticles on cell interface and their enhanced intracellular uptake of arsenic trioxide in leukemia cancer cells.//J Nanosci Nanotechnol. 2009 Aug;9(8):4611-7.
19. Kim CK, Ghosh P, Rotello VM. Multimodal drug delivery using gold nanoparticles.//Nanoscale. 2009 Oct;1(1):61-7.
20. Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. //Chem Soc Rev. 2011 Mar;40(3):1647-71.

21. Kojima C, Hirano Y, Yuba E, Harada A, Kono K. Preparation and characterization of complexes of liposomes with gold nanoparticles. // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008 Oct 15;66(2):246-52.
22. Kuznetsov V.L., Elumeeva K.V., Ishchenko A.V., Beylina N.Yu., Stepashkin A.A., Moseenkov S.I., Plyasova L.M., Molina I.Yu., Romanenko A.I., Anikeeva O.B., Tkachev E.N. Multi-walled carbon nanotubes with ppm level of impurities // *Phys. Status Solidi B*, 2010. Vol. 247, №11–12. P. 2695-2699.
23. Murray A.R., Kisin E.R., Tkach A.V., Yanamala N., Mercer R.R., Young S.H., Fadeel B., Kagan V.E., Shvedova A.A. Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos // *Part Fibre Toxicol*. 2012. 10. 9(1):10.
24. Nel A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel // *Science*, 2006. Vol. 311 (5761). P. 622–627.
25. Morais T, Soares ME, Duarte JA, Soares L, Maia S, Gomes P, Pereira E, Fraga S, Carmo H, Bastos Mde L. Effect of surface coating on the biodistribution profile of gold nanoparticles in the rat. // *Eur J Pharm Biopharm*. 2012 Jan;80(1):185-93.
26. Thakor AS, Luong R, Paulmurugan R, Lin FI, Kempen P, Zavaleta C, Chu P, Massoud TF, Sinclair R, Gambhir SS. The fate and toxicity of Raman-active silica-gold nanoparticles in mice. // *Sci Transl Med*. 2011 Apr 20;3(79):79ra33.
27. Wang F, Wang YC, Dou S, Xiong MH, Sun TM, Wang J. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. // *ACS Nano*. 2011 May 24;5(5):3679-92.
28. Zhang G, Yang Z, Lu W, Zhang R, Huang Q, Tian M, Li L, Liang D, Li C. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. // *Biomaterials*. 2009 Apr;30(10):1928-36.

29. Zhong Y., Shuzheng M., Yingge Z. Using activated carbon nanoparticles to decrease the genotoxicity and teratogenicity of anticancer therapeutic agents // J. Nanosci. Nanotechnol. 2010. 10(12). P. 8603-9.