

ID: 2013-05-6-A-2886

Оригинальная статья

Рассказова В.Ю., Злобина О.В., Пахомий С.С., Бучарская А.Б.

Морфофункциональное состояние тимуса под влиянием золотых наночастиц в эксперименте

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Минздрава России

Rasskazova V.Y., Zlobina O.V., Pachomyi S.S., Bucharskaya A.B.

Morphofunctional state of thymus in exposure of gold nanoparticles within experimental work

Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky

Резюме

Цель: изучить влияние золотых наночастиц на морфофункциональное состояние тимуса в эксперименте. *Материал и методы:* Эксперимент был поставлен на 72 белых беспородных крысах, разделенных на 4 группы. Животные опытных групп получали перорально золотые наночастицы длительностью 8, 16 и 30 суток по соответствующей схеме. *Результаты.* Пероральное введение наночастиц золота приводит к изменению морфофункционального состояния тимуса. *Заключение.* Изменения изучаемых показателей носят размерзависимый характер. Выявленные изменения свидетельствуют об активации процессов пролиферации, дифференцировки и миграции лимфоцитов.

Ключевые слова: золотые наночастицы, тимус, морфофункциональное состояние, лимфоциты

Abstract

The research goal is to study of the effect of gold nanoparticles on the morphofunctional state of the thymus in the experiment. *Material and methods.* The experiment was carried out on 72 albino rats were divided into 4 groups. Animals of the experimental group received orally gold nanoparticles duration of 8, 16 and 30 days for the respective scheme. It was established that the oral administration of gold nanoparticles caused the changes of the morphofunctional state of the thymus. *Results.* Oral administration of gold nanoparticles leads to changes in morphology and function thymus. *Conclusion.* The changes of the studied parameters are dependent on the size of the character. The identified changes are indicative of activation processes proliferation, differentiation and migration of lymphocytes.

Key words: gold nanoparticles, thymus, morphofunctional state, lymphocytes

Введение

В настоящее время все большее внимание уделяется изучению проблем нанотехнологий. Возможно, что применение наноматериалов приведет к значительным достижениям в медицине за счет их способности к взаимодействию с тканями. Исследования по применению нанотехнологий в медицине широко распространены. Особенно много работ по использованию и применению наночастиц золота [1]. Их используют в качестве носителей для доставки лекарственных средств при терапии онкологических заболеваний и как собственно лекарственное или диагностическое средство при лечении опухолей. В настоящее время наблюдается разброс данных и выводов по уровням и кинетике биораспределения золотых наночастиц (ЗНЧ) и по оценкам токсичности. Следовательно, имеется настоятельная необходимость в продолжении исследований, связанных с оценками размерных эффектов наночастиц в их биораспределении по органам и воздействию на организм человека, в частности на иммунную систему. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования о влиянии ЗНЧ на органы иммунной системы, в частности на тимус.

Цель: изучение морфофункционального состояния тимуса лабораторных животных при пероральном введении золотых наночастиц в эксперименте.

Материал и методы

В эксперименте использовали ЗНЧ, синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН (г. Саратов): частицы коллоидного золота диаметром 15 и 50 нм с числовой концентрацией 1,3× шт/мл и 3,5× шт/мл соответственно (концентрация золота 57 мкг/мл). Средний размер ЗНЧ определяли по электронно-микроскопическим изображениям на микроскопе Libra-120. Наночастицы коллоидного золота с размером 15 и 50 нм синтезировали цитратным методом Френса путем восстановления золотохлористо-водородной кислоты (HAuCl₄, Sigma-Aldrich, USA) цитратом натрия [1]. Для увеличения биодоступности и биосовместимости наночастицы были конъюгированы с полиэтиленгликолем. Протокол конъюгирования состоял в следующем. К 50 мл суспензии наночастиц добавляли 45 мкл 0,2 М поташа (углекалиевая соль) и 500 мкл 5 мМ метилполиэтиленгликольтиола. В результате ковалентного связывания тиол-групп с поверхностью золотой оболочки образуется конъюгат. Время реакции составляет примерно 10 часов. Полученные конъюгаты отмывали от избытка продуктов реакции двукратным центрифугированием и ресуспендированием в 0,9%-ном растворе хлорида натрия.

Эксперимент был поставлен на 72 белых беспородных крысах мужского пола массой 180-220 г. Животные во время эксперимента содержались в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Для устранения влияния сезонной циркадной зависимости эксперименты проводились в осенне-зимний период во второй половине дня. Все животные при проведении эксперимента находились в равных условиях. Опыты проводились в отдельной лаборатории при постоянной температуре со стандартным уровнем освещения, исключая сторонние раздражители. Эксперименты на животных проводились в соответствии с Женевской конвенцией «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» (Женева, 1990) и Хельсинкской декларацией (1975).

Таблица 1. Результаты подсчета на 8-е сутки

Показатели	Контроль	1-3 нм	15 нм	50 нм
Корково-мозговой индекс	2,08±0,14	2,07±0,6	1,81±0,7	2,08±0,04
Степень насыщенности лимфоцитами мозгового вещества	908±21	740±44	725±55	733±16
Степень насыщенности клетками коркового вещества	861±36	871±72	955±14	837,5±7,5

Таблица 2. Результаты подсчета на 16-е сутки

Показатели	Контроль	1-3 нм	15 нм	50 нм
Корково-мозговой индекс	2,08±0,14	1,9±0,22	1,76±0,01	2,2±0,6
Степень насыщенности лимфоцитами мозгового вещества	908±21	911±18	983±5	946±40
Степень насыщенности лимфоцитами коркового вещества	861±36	773±25	895±26	873±51

Таблица 3. Результаты подсчета на 30-е сутки

Показатели	Контроль	1-3 нм	15 нм	50 нм
Корково-мозговой индекс	2,08±0,14	1,9±0,62	2,09±0,4	2,01±0,92
Степень насыщенности лимфоцитами мозгового вещества	908±21	879±56	848±26	871±74
Степень насыщенности лимфоцитами коркового вещества	861±36	767±66	719±47	792±77

Исследование проводилось на четырех группах животных, в каждой группе по 6 особей. Первая группа – контрольная, вторая, третья и четвертая – опытные. Крысам опытных групп вводили перорально ЗНЧ размерами 1-3 нм, 15 нм и 50 нм длительностью введения 8, 16 и 30 суток из расчета 190 мкг/кг массы животного. Крысам контрольной группы через день вводили перорально по 1 мл физиологического раствора. Забор материала осуществляли через 24 часа после последнего введения [2]. Для гистологического исследования готовились серийные срезы тимусов толщиной 5-7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Фотосъемка препаратов проводилась с помощью цифровой фотокамеры Canon IXUS 115 HS. Подсчет корково-мозгового индекса проводился с помощью морфометрической программы ImageJ. Для изучаемого параметра определяли значения средней арифметической, ошибку средней арифметической. Достоверность различий между средними величинами (p) определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты

Эксперимент показал, что на разные сутки исследования отмечается изменение значений корково-мозгового индекса по сравнению с контрольной группой. При введении ЗНЧ на 8-е сутки размерами 1-3 нм и 50 нм значение корково-мозгового индекса незначительно отличается от контрольной группы (соответственно 2,07±0,6 и 2,08±0,04, при контроле 2,08±0,14 $p < 0,05$). При введении ЗНЧ размером 15 нм нами было замечено уменьшение показателя на 0,27 (2,08±0,04 при 2,08±0,14 в контроле, $p < 0,05$). На 16-е сутки при введении ЗНЧ размерами 1-3 нм и 50 нм значение изучаемого показателя незначительно отличалось от контрольной группы. При введении ЗНЧ размером 15 нм нами было замечено уменьшение значения изучаемого показателя на 0,32 по сравнению с контролем. На 30-е сутки отмечалось незначительное колебание показателя при введении ЗНЧ размерами 15 нм и 50 нм и небольшое уменьшение изучаемого показателя при введении ЗНЧ размером 1-3 нм (на 0,99 по сравнению с контролем). При введении ЗНЧ размерами 1-3 нм, 15 нм, 50 нм отмечается уменьшение лимфоцитов в мозговом веществе тимуса на 8-е сутки: 740±44, 725±55, 733±16 (при контроле 908±21, $p < 0,05$). Наибольшее уменьшение количества лимфоцитов наблюдается при введении ЗНЧ размером 15 нм (725±55 при контроле 908±21, $p < 0,05$). На 16-е сутки отмечается увеличение лимфоцитов при введении ЗНЧ размером 15 нм (983±5, контроль 908±21, $p < 0,05$). На 30-е сутки нами было замечено уменьшение значений исследуемого показателя при введении ЗНЧ различных размеров. При анализе степени насыщенности лимфоцитами коркового вещества нами были получены следующие результаты на 8-е сутки при введении ЗНЧ размерами 1-3 нм, 15 нм и 50 нм: 871±72, 955±14, 837,5±7,5 (при контроле 861±36, $p < 0,05$). При введении ЗНЧ размером 15 нм на 8-е сутки было отмечено значительное увеличение изучаемого показателя: 955±14 (при контроле 861±36, $p < 0,05$). На 16-е сутки отмечается уменьшение исследуемого показателя при введении ЗНЧ размерами 1-3 нм. На 30-е сутки нами было замечено уменьшение значений исследуемого показателя при введении ЗНЧ различных размеров (табл. 1-3).

Обсуждение

Тимус является центральным органом иммунопоэза. От его функционального состояния и активности во многом зависит степень выраженности защитных реакций всего организма. Сведений о воздействии наночастиц золота на пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов в тимусе крайне мало. В работе [3] наночастицы использовались как носители антигенов. Было установлено, что инъекционное введение лабораторным животным коллоидного золота может приводить к его накоплению в ретикулярных клетках лимфоидной ткани, активации клеточного и гуморального иммунитета за счет стимуляции фагоцитирующей активности макрофагов и лимфоцитов, что может обуславливать их иммуномодулирующий эффект. Кроме того, было установлено, что золотые наночастицы стимулируют дыхательную активность клеток ретикулоэндотелиальной системы и активность митохондриальных ферментов макрофагов, что, возможно, является одной из причин адьювантных свойств коллоидного золота. Кроме того, ЗНЧ, конъюгированные с антигенами, влияют на активацию Т-клеток, о чем свидетельствует увеличение степени их пролиферации в 10 раз [4]. Изучено влияние неконъюгированного коллоидного золота на иммунокомпетентные клетки *in vivo* [5] и показано, что введение мышам ЗНЧ вызывает усиление пролиферации лимфоцитов и нормальных киллеров, увеличение выработки интерлейкина II.

Кроме того, интересным является установленный факт размерзависимой цитотоксичности ЗНЧ: известна выраженная цитотоксичность лишь для частиц размером 1,4 нм, но никак не для частиц размером 15 нм [6].

Анализируя различные данные, можно прийти к заключению о том, что в тимусе отмечаются признаки активации процессов пролиферации, дифференцировки и миграции лимфоцитов. Это выражается в увеличении количества лимфоцитов в корковом и мозговом веществе тимуса при введении ЗНЧ размером 15 нм. Описанное морфофункциональное состояние тимуса согласуется с литературными данными о цитологических изменениях центральных органов иммуногенеза под влиянием различных воздействий.

Заключение

Резюмируя изложенные данные, можно прийти к заключению о том, что пероральное введение ЗНЧ размером 1-3 нм, 15 нм и 50 нм приводит к изменению морфофункционального состояния тимуса, а именно к изменению значений корково-мозгового индекса, степени насыщенности лимфоцитами коркового и мозгового вещества. Изменения названных показателей носят размерзависимый характер. Подсчет корково-мозгового индекса выявил некоторое снижение этого показателя на 8-е и 16-е сутки при введении ЗНЧ размером 15 нм с тенденцией к его увеличению на 30-е сутки эксперимента. Что касается ЗНЧ размером 1-3 нм и 50 нм, следует отметить незначительные колебания изучаемого показателя при введении ЗНЧ соответствующих размеров. Изменение степени насыщенности клетками тимуса под влиянием ЗНЧ имеет определенную временную динамику: на 8-е сутки отмечается уменьшение клеток в мозговом и корковом веществе при введении ЗНЧ размерами 1-3, 15 и 50 нм и увеличение клеток в корковом веществе при введении ЗНЧ размером 15 нм, что свидетельствует о стимулирующем влиянии ЗНЧ размером 15 нм на пролиферацию и дифференцировку тимоцитов. Кроме того, на 16-е сутки отмечается увеличение количества клеток в мозговом веществе, что свидетельствует о стимуляции процессов миграции в тимусе.

Конфликт интересов

Работа выполнена в рамках программы НИР кафедры гистологии СарГМУ.

Литература

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. С. 319-320.
2. Злобина О.В. Морфофункциональное состояние мезентериальных лимфатических узлов при длительном воздействии золотых наночастиц в эксперименте: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Саратов, 2012. С. 6-7.
3. Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. Gold Nanoparticles as an Antigen Carrier and an Adjuvant. N.Y.: Nova Publ., 2010. С. 54-55.
4. Effect of gold nanoparticles on the respiratory activity of peritoneal macrophages / S.A. Staroverov, N.M. Aksinenko, K.P. Gabalov [et al.] // Gold Bull. 2009. Vol. 42. P. 153-156.
5. Synthesis of gold nanoparticles with narrow size distribution by using AuCl or AuBr as the precursor / H. Lou, T.-Y. Tian, J.-Q. Gao [et al.] // Facile Chemistry: a European Journal. 2008. Vol. 14. P. 1584-1591.
6. Хлебцов Н.Г., Дыкман Л.А. Биораспределение и токсичность золотых наночастиц // Российские нанотехнологии. 2011. Т. 6, № 1-2. С. 21-24.