



УДК 57.08:577.29:615: 576.6; 576.33: 616-091.8572:616.716.8(571.5)

## ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ПЕРЕВИТЫМ РАКОМ ПОЧКИ ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ ЗОЛОТЫХ НАНООБОЛОЧЕК

Н. А. Наволокин, Г. Н. Маслякова, А. Б. Бучарская, Л. В. Сулейманова,  
С. М. Кун, Г. С. Терентюк, Н. Г. Хлебцов\*, Б. Н. Хлебцов<sup>1</sup>

Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского  
E-mail: navolokin1@rambler.ru

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов



В эксперименте изучали влияние золотых наноболочек при внутривенном введении на белых беспородных самцов-крыс с перевитой опухолью рака почки. Оценивали в динамике морфологические изменения во внутренних органах и биохимические показатели крови. Проведенные исследования показали, что наиболее выраженные изменения развиваются в течение 45 мин – 2 ч после внутривенного введения золотых наноболочек и носят обратимый характер.

**Ключевые слова:** наночастицы, золотые наноболочки, токсичность, морфология, биохимия, перевитая опухоль, рак почки.

### Dynamics of Morphological and Biochemical Changes in Laboratory Animals with Transplanted Kidney Cancer after Intravenous Injection of Gold Nanoshells

N. A. Navolokin, G. N. Maslyakova, A. B. Bucharskaya,  
L. V. Suleymanova, X. M. Kong, G. S. Terentyuk,  
N. G. Khlebtsov, B. N. Khlebtsov

The effect of intravenously injected nanoshells on white outbred male rats with transplanted tumor of kidney cancer was studied. The blood biochemical parameters and morphological changes in the rat internal organs were examined during 24 h after nanoparticle injection. The most pronounced changes were observed 45 min – 2 h after nanoparticle injection and were reversible.

**Key words:** nanoparticles, gold nanoshells, toxicity, morphology, biochemistry, transplanted cancer, kidney cancer.

### Введение

Злокачественные опухоли разных локализаций являются одной из основных причин смерти во всем мире. Недостаточная эффективность применяемых методов терапии злокачественных опухолей обуславливает необходимость поиска новых путей решения этой проблемы. Особый интерес представляют подходы, способные обеспечить селективное повреждение опухолевой ткани, так как отсутствие необходимой избирательности основных принятых в современной онкологии лечебных методов ограничивает их применение. Одним из таких подходов, сформировавшихся главным образом в течение последних 10 лет, является применение нанотехнологий.

Понятие «нанотехнология» было введено Норио Танигучи (Norio Taniguchi) в 1974 г. Он предложил так называть технологии и механизмы размером менее одного микрона. Наночастицы являются подклассом наноматериалов и в настоящее время единогласно определяются как одиночные частицы с диаметром  $< 100$  нм [1].

Как минимум 12 нанопрепаратов одобрены для применения в медицине и значительно большее количество находится на стадии разработки. Сегодня можно смело сказать, что XXI век – это век нанотехнологий.

Существует огромное количество видов наночастиц, но одними из самых перспективных для медицины, по нашему мнению, являются наночастицы золота.

Из-за своей химической инертности золото используется последние 50 лет в медицине очень широко: от зубных имплантатов до радиоактивного золота, применяемого для лечения рака. Однако золото наноразмера проявляет очень высокую химическую реактивность [2].

Сегодня уже известны некоторые важные механизмы влияния золотых наночастиц на клетки [3], и предполагается, что применение наноматериалов приведет к революционным достижениям в медицине благодаря способности наночастиц взаимодействовать с биологическими тканями на молекулярном и клеточном уровнях [4].

Безопасность наночастиц – одна из основных проблем в нанотехнологии. В Европе по данной проблеме опубликованы отчет SCENIHR (The Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) – Научного комитета по новым рискам для здоровья и официальное Руководство по рискам нанотехнологий (Nanotechnology Risk Governance), изданное в июне 2006 г. Международным советом руководства рисками (International Risk Governance Council). В обоих отчетах отмечается неполное изложение данных относительно потенциальных рисков, связанных



с наномедициной и нанотехнологией, для человеческого здоровья и окружающей среды. Отсутствует полноценная оценка результатов растущего использования наноматериалов в производстве и их выброса в окружающую среду [5].

Несмотря на широкое распространение наноматериалов, механизмы их токсичности и потенциального риска для здоровья остаются неясными [6]. Исследования загрязнения воздуха наночастицами показали, что частицы могут оказывать токсичное воздействие на клетки на наноуровне [7]. Последние исследования *in vitro* и *in vivo* подтвердили, что ингаляция и черезкожная абсорбция некоторых наночастиц могут негативно влиять на здоровье [2, 8]. Таким образом, использование медицинских продуктов, содержащих наноматериалы, может привести к возникновению риска для здоровья [3].

Цель исследования – изучить динамику морфологических изменений во внутренних органах и опухоли, а также динамику биохимических изменений крови.

#### Материалы и методы

В работе использовались золотые наноболочки, синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН: золотые наноболочки диаметром 160 нм, состоящие из ядра диоксида кремния диаметром 120 нм и золотой оболочки толщиной 20 нм с числовой концентрацией  $2 \times 10^9$  шт./мл, или 47 мкг/мл. Средний размер золотых наноболочек определяли по электронно-микроскопическим изображениям на микроскопе «Libra-120».

Золотые наноболочки получали по двухшаговому протоколу, в котором сначала синтезируются ядра диоксида кремния необходимых размеров и концентрации. Затем на их поверхности формируется золотая оболочка необходимой толщиной путем восстановления  $\text{HAuCl}_4$  формальдегидом на золотых зародышах размером 2–4 нм, предварительно адсорбированных на поверхности аминированных силикатных ядер.

Для увеличения биодоступности и биосовместимости наночастицы были конъюгированы с ПЭГ PEG-SH («Nektar»). К 50 мл суспензии золотых наноболочек добавляли 45 мкл 0.2 мМ поташа и 500 мкл 5 мМ метилполэтиленгликольтиола. В результате ковалентного связывания тиоловых групп с поверхностью золотой оболочки образуются конъюгаты. Время реакции составляет примерно 10 ч. Полученные конъюгаты отмывали от избытка продуктов реакции двукратным центрифугированием и ресуспендированием в 0.9 %-ном растворе NaCl.

В эксперименте использовали белых беспородных крыс-самцов ( $n = 60$ ) массой 180–200 г (10 групп по 6 особей в каждой группе). Штамм перевиваемой опухоли рака почки РА-1 был получен из банка опухолевых штаммов Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН. Применялись патоморфологические и биохимические методы исследования.

Работа с лабораторными животными осуществлялась согласно протоколу исследований и в соответствии с распоряжением Женевской конвенции 1985 г. о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных» и Хельсинкской декларации 2000 г. о гуманном отношении к животным, Президиума АН СССР № 120002496 от 02.04.80 г. «Правила проведения научных исследований с использованием экспериментальных животных».

Статистический анализ полученных данных проведен с использованием пакета прикладных компьютерных программ SPSS 13.0. Полученные данные были представлены в виде средней арифметической и её стандартной ошибки. О достоверности межгрупповых различий судили с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Колмогорова–Смирнова. Анализ динамики биохимических показателей крови проводился с помощью парного критерия Уилкоксона, предназначенного для суждения о значимости различий в связанных выборках. Проверка статистических гипотез осуществлялась при критическом уровне значимости  $p < 0.05$ .

#### Дизайн эксперимента

1 мл золотых наноболочек вводился крысам-самцам с перевитыми опухолями однократно внутривенно. Все животные выводились из эксперимента методом декапитации через определенные промежутки времени (30 мин, 45 мин, 1 ч, 1,5 ч, 4 ч, 8 ч, 16 ч, 24 ч). После декапитации забирались образцы внутренних органов и опухоли для морфологического исследования. Одновременно забиралась кровь для биохимического исследования. Была введена группа сравнения с перевитым раком почки и контрольная группа – без опухоли. В обеих группах животным однократно внутривенно вводился 1 мл физиологического раствора, через сутки животные выводились из эксперимента, забирались образцы органов и кровь для дальнейшего анализа. Полученные в динамике результаты опытной группы сравнивали с уровнем аналогичных параметров у животных контрольной группы и группы сравнения с перевитыми опухолями.



### Результаты и их обсуждение

При изучении морфогенеза патологических процессов в почках выявлено (рис. 1), что с течением времени прогрессирует дистрофия эпителия канальцев мозгового вещества, достигая максимального развития через 8 ч, однако через 24 ч степень ее становится умеренной. Дистрофия извитых канальцев была умеренной во всех временных точках. Отмечен интересный феномен чередования во времени процессов малокровия

и полнокровия в капиллярных петлях клубочков и крупных сосудах. Полагаем, что это является подтверждением влияния наночастиц на тонус как сосудов микроциркуляторного русла, так и крупных сосудов. Со временем изменялась морфология клубочков: через 4 ч отмечалась их фрагментация на 2–3 сегмента, которая сохранялась вплоть до 24 ч. Возможно, коллапс отдельных капиллярных петель также является отражением вазопатического действия крупных наночастиц.

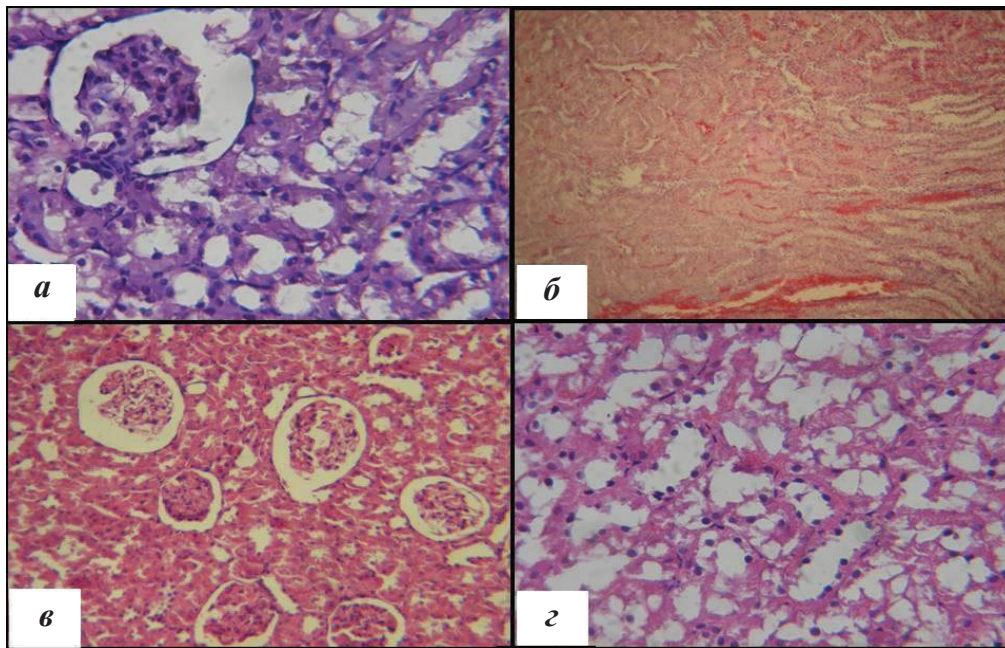


Рис. 1. Динамика морфологических изменений в почках при внутривенном введении золотых наночастиц через 30 мин (а), 1,5 ч (б), 4 ч (в), 8 ч (г)

Функциональное состояние почек отражает концентрация креатинина и мочевины (таблица) в плазме крови. Наиболее показательным при этом являлось снижение концентрации креатинина в опытной группе, что характеризует фильтрационную способность почек.

Помимо этого, снижение концентрации креатинина может быть связано со снижением его синтеза, осуществляемого в печени. Колебания содержания мочевины в плазме крови во времени не имели достоверных отличий от контрольного уровня.

Анализ морфологических изменений в печени показал (рис. 2), что кровенаполнение в сосудах так же, как и в почках, отличалось крайней нестабильностью и колебалось от малокровия до умеренного полнокровия. Было обнаружено прогрессирование дистрофии гепатоцитов во времени (в течение первых 4 ч дистрофия носила

умеренный характер, а начиная с 8 ч достигала выраженной степени).

Кроме гистологического исследования функция печени оценивалась с помощью определения динамики фермента аланинаминотрансферазы в крови (см. таблицу).

Индикаторным ферментом состояния печени служит аланинаминотрансфераза (АлАТ). Наблюдается некоторое увеличение активности АлАТ по сравнению с контрольной группой и группой с привитой опухолью. При этом активность АлАТ колеблется незначительно и находится практически на постоянном уровне в течение 1,5 ч от момента введения наночастиц. Стойкое накопление наночастиц в органе ведет к усилению деструкции гепатоцитов (и целостности их мембран), и, как следствие, увеличивается активность и концентрация АлАТ в кровяном русле, что снижает детоксикационную способность клеток





**Динамика концентрации биохимических показателей в плазме крови крыс  
после внутривенного введения золотых наночастиц**

Биохимический показатель	Контроль	Контроль с опухолью	Время выведения лабораторных животных из эксперимента для определения динамики концентрации биохимических показателей в плазме крови крыс после внутривенного введения золотых наночастиц					
			45 мин	1 ч	1.5 ч	2 ч	4 ч	24 ч
АСТ, МЕ	230±12.5	276±15.4	697.5±34.5	490±38.1	660±54.8	630±48.7	666.67±46.1	477.5±35.6
АЛТ, МЕ	55±6.2	52.5±4.7	157.5±14.7	140±13.7	155±14.9	362.5±27.3	113.75±10.2	110±18.3
Прямой билирубин, мг/дл	0.17±0.02	0.19±0.02	0.21±0.02	0.38±0.04	0.27±0.03	0.28±0.03	0.33±0.04	0.35±0.04
Общий билирубин, мг/дл	0.84±0.09	0.87±0.09	1.06±0.13	0.82±0.09	1.01±0.1	1±0.1	0.84±0.08	1.01±0.2
Мочевина, ммоль/л	3.49±0.5	11.98±2.1	11.02±1.8	8.02±0.89	13.7±1.5	8.35±0.8	14.92±1.7	9.02±0.89
Креатинин, мкмоль/л	32±3.1	35±3.1	32.5±2.9	27.5±2.5	60±5.9	12.5±1.5	23.75±2.9	32.5±3.07

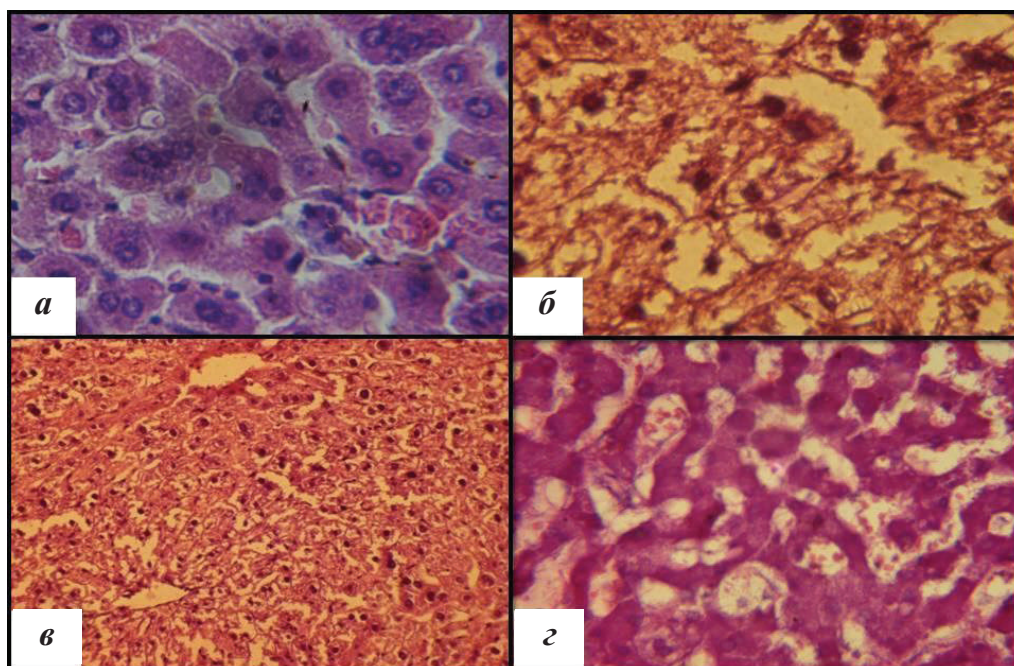


Рис.2. Динамика морфологических изменений в печени при внутривенном введении золотых наночастиц через 30 мин (а), 1.5 ч (б), 4 ч (в), 8 ч (г)

печени. Активность АЛТ достигает нормальных величин спустя 4 ч.

Определялись также общий билирубин и прямой билирубин (см. таблицу). Привитая экспериментальным животным опухоль вызывает увеличение концентрации общего билирубина в сыворотке крови. Введение наночастиц коллоидного золота приводит к значительному сдвигу содержания билирубина в крови. Нарастание концентрации общего билирубина происходит за счет увеличения в крови непрямого билирубина.

Увеличение концентрации общего (и непрямого) билирубина и снижение концентрации прямого билирубина происходит после 45-минутного персистирования наночастиц, вероятно, вследствие частичной утраты конъюгирующей способности гепатоцитов (наночастицы накапливаются (адсорбируются) на поверхности гепатоцитов, экранируя клеточные мембраны, что затрудняет проникновение и связывание билирубина), и билирубин в свободной форме поступает в кровь. Через 1 ч наночастицы вызывают нарушение



целостности мембран гепатоцитов, что ведет к нарушению экскреции прямого билирубина в желчь, и он попадает в кровь. Нормализация процессов желчного обмена происходит спустя 4–24 ч.

При изучении гистологических препаратов **сердца** обнаружили, что через 30 мин в сердце в большинстве случаев развивается выраженный отек стромы, и неравномерное кровенаполнение с сочетанием малокровия и умеренного полнокровия крупных сосудов. Через 45 мин выраженный отек стромы был выявлен во всех препаратах, и практически везде отмечалась нормализация кровенаполнения. Через 1–1.5 ч полнокровие было умеренным или выраженным в сочетании с умеренным либо выраженным отеком стромы. Через 4 ч отмечалось малокровие большинства сосудов и развитие умеренной зернистой дистрофии в кардиомиоцитах. Через 8 ч кровенаполнение было

неравномерным, дистрофия кардиомиоцитов достигала выраженной степени. Через 24 ч отмечались как некротические, так и некробиотические изменения кардиомиоцитов.

Оценка функционального состояния миокарда проводилась путем определения динамики уровня аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в плазме крови. Внутривенное введение крысам наночастиц коллоидного золота вызывало значительное увеличение активности АсАТ (см. таблицу). Необходимо отметить, что наибольший всплеск активности АсАТ наблюдается после 45-минутного персистирования наночастиц в кровотоке.

При изучении морфогенеза изменений **в селезенке** (рис. 3) нами выявлено постепенное прогрессирование полнокровия в красной пульпе. Количество визуализирующихся наночастиц было примерно одинаковым во всех временных точках.

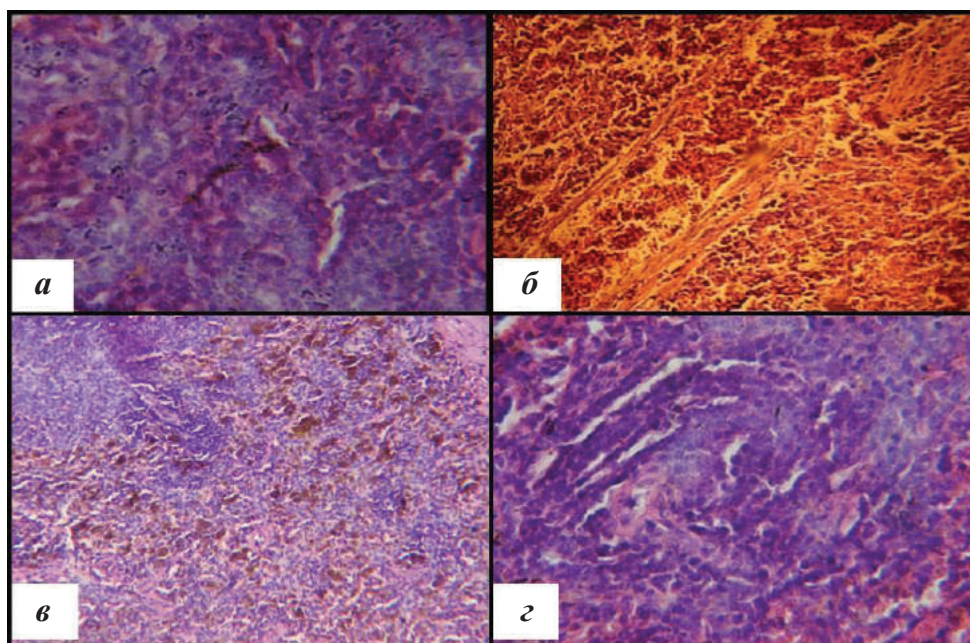


Рис. 3. Динамика морфологических изменений в селезенке при внутривенном введении золотых наноболочек через 30 мин (а), 1,5 ч (б), 4 ч (в), 8 ч (г)

В **легких** изменения касались в основном кровенаполнения крупных и мелких сосудов, которое, как и в других органах колебалось во времени. Следует отметить, что после 2-часового воздействия наночастиц в ткани легких наблюдались единичные диапедезные кровоизлияния.

#### Выводы

При однократном внутривенном введении золотых наноболочек наиболее выраженные морфологические изменения во внутренних органах развиваются в первые 8 ч после введения и носят

обратимый характер. Изменения биохимических показателей крови предшествуют структурным изменениям и развиваются в течение 45 мин – 2 ч после введения наноболочек.

#### Список литературы

1. Borm P. J. A., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials : a review carried out for ECETOC // Particle and Fiber Toxicology. 2006. Vol. 3, № 11. P. 11.



2. Kell A. J., Donkers R. L., Workentin M. Core Size Effects on the Reactivity of Organic Substrates as Monolayers on Gold Nanoparticles // *Langmuir*. 2005. Vol. 21, № 2. P. 735.
3. Connor E. E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C. J., Wyatt M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity // *Small*. 2005. Vol. 1, № 1. P. 325 – 327.
4. Goodman C. M., McCusker C. D., Yilmaz T., Rotello V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains // *Bioconjug Chem*. 2004. Vol. 15, № 4. P. 897–900.
5. Moghimi S. M., Hunter A. C., Murray J. C. Nanomedicine : current status and future prospects // *FASEB J*. 2005. Vol. 19. P. 311–330.
6. Brayden D. J. Controlled release technologies for drug delivery // *Drug Discov Today*. 2003. Vol. 8, № 21. P. 976–978.
7. Seaton A. Nanotechnology and the occupational physician : introduction // *Occupational Medicine*. 2006. Vol. 56. P. 312–316.
8. Lam C. W., James J. T., McCluskey R., Hunter R. L. Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days after Intratracheal Instillation // *Toxicol Sci*. 2003. Vol. 77, № 1. P. 126–134.

УДК 539.193/194;535/33.34

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КОЛЕБАТЕЛЬНЫХ СПЕКТРОВ ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

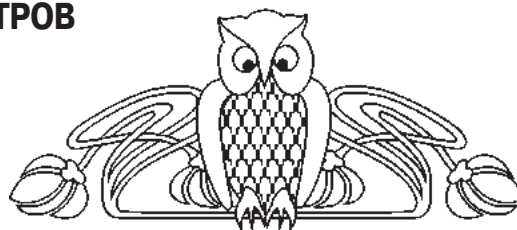
П. М. Элькин, И. М. Уманский<sup>1</sup>, Е. А. Джалмухамбетова<sup>2</sup>

Саратовский государственный технический университет

E-mail: pashaelkin@yandex.ru

<sup>1</sup>Саратовский государственный социально-экономический университет

<sup>2</sup>Астраханский государственный университет



На основании модельных неэмпирических квантовых расчетов геометрической и электронной структуры ряда изомеров замещенных бензойной кислоты исследованы закономерности в поведении параметров адиабатического потенциала карбоксильного фрагмента.

**Ключевые слова:** бензойная кислота, адиабатический потенциал, межмолекулярное взаимодействие, колебательные спектры.

### Modelling Calculations of Vibrational Spectra for Substituted Benzoic Acid

P. M. Elkin, I. M. Umansky, E. A. Djalmuhambetova

On the base of modeling calculations of geometric and electronic structure for substituted benzoic acid the parameters of adiabatic potential are investigated.

**Key words:** vibrational spectra, benzoic acid, adiabatic potential, intermolecular interection.

### Введение

Производные бензойной кислоты известны как надежные индикаторы загрязнения окружающей среды отходами нефтепродуктов, ингредиенты при производстве пестицидов, фармакологических препаратов, красителей текстильных производств [1, 2].

Исследование структуры и спектров указанных представителей ароматических бензойных

кислот является одним из этапов изучения физико-химических свойств лигандов (бензойной и салициловой кислот) с металлами. Теоретической основой таких исследований стали неэмпирические методы квантовой механики молекулярных систем.

Замещенные бензойной кислоты, как и остальные представители класса карбоновых кислот, легко образуют димеры с сильными водородными связями. Межмолекулярное взаимодействие между мономерами проявляется в высокочастотном (2500–3500 см<sup>-1</sup>) диапазоне спектра. Спектр димеров в этой области имеет сложную структуру. Предлагаемая в периодической литературе теоретическая интерпретация полос противоречива. Достаточно сослаться на публикации [3–7]. Если следовать представленным в них результатам, то свойство характеристичности полос фундаментальных колебаний, имеющее место для карбоксильного фрагмента (КФ) в мономерах карбоновых кислот, кардинально нарушается при образовании димеров соединений. Отметим, что в указанный высокочастотный диапазон попадают полосы, связанные с валентными колебаниями связей СН бензольного остова и связей ОН КФ, обертоны деформационных колебаний указанных связей.