



интерес для приложений. Полученные результаты показали, что линейная зависимость сохраняется на всем рассмотренном диапазоне.

Как известно, при возрастании жесткости \tilde{H} в граничных условиях (13) результаты расчетов в модели с винклеровским основанием должны приближаться к результатам для жесткого закрепления пластин. Точное совпадение в теории возникает при предельном переходе $\tilde{H} \rightarrow +\infty$. Проведены численные эксперименты для проверки наличия практической сходимости в предложенной модели. Сравнение проводилось с результатами работы [2]. Отмечается соответствие результатов расчетов с положениями теории. Так, при увеличении \tilde{H} на восемь порядков амплитудно-частотная характеристика практически совпадает с представленной в [2] для случая жесткого закрепления пластин. Расхождение по резонансному значению β составило менее 0.05%, а по резонансному значению $J\omega$ (β) – менее 1.1%.

Выводы

Таким образом, в представленной работе:

– получила развитие предложенная ранее модель датчика инерциальной информации;

– подтверждена линейная зависимость амплитудных показателей выходного тока от угловой скорости на всем диапазоне скоростей, представляющем практический интерес;

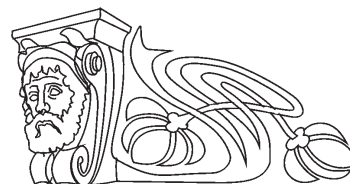
– путем численных экспериментов исследована устойчивость расчетной схемы к изменению жесткости основания, а также подтвержден результат работы [2].

Список литературы

1. Нагар Ю. Н., Ольшанский В. Ю., Панкратов В. М., Серебряков А. В. Об одной модели пьезогироскопа // Мехатроника, автоматизация, управление. 2010. № 2. С. 71–74.
2. Панкратов В. М., Ольшанский В. Ю., Нагар Ю. Н., Серебряков А. В. Влияние диссипации на характеристики измерителя угловой скорости на основе взаимного пьезоэффекта // Авиакосмическое приборостроение. 2010. № 8. С. 3–8.
3. Гринченко В. Т., Улитко А. Ф., Шульга Н. А. Электроупругость. Киев : Наук. думка, 1989. 280 с.
4. Ганопольский В. В., Касаткин Б. А., Лезуша Ф. Ф., Прудько Н. И., Пугачёв С. И. Пьезокерамические преобразователи : справочник / ред. С. И. Пугачёв. Л. : Судостроение, 1984. 256 с.

УДК 576.6:576.33:615.017:616.079:615.2/3.001.37:616-091.8

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ



С. С. Фирсова, А. Б. Бучарская, Г. Н. Маслякова, О. В. Злобина, О. В. Матвеева, И. О. Бугаева, Н. Г. Хлебцов*, Б. Н. Хлебцов*, В. А. Богатырев*

Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: gmaslyakova@yandex.ru

В эксперименте изучали воздействие золотых наночастиц разного размера на морфологические показатели красного костного мозга и периферической крови белых беспородных крыс при длительном пероральном введении. Проводилась оценка мутагенного воздействия золотых наночастиц на полихроматофильные эритроциты костного мозга с помощью микроядерного теста. В ходе исследования было обнаружено уменьшение количества лейкоцитов в периферической крови, уменьшение объема эритроцитов и увеличение насыщения их гемоглобином. При проведении микроядерного теста, изменений, свидетельствующих о мутагенной активности ЗНЧ, не было выявлено. Изменения морфологических показателей костного мозга свидетельствуют о происходящих в костном мозге процессах стимуляции лимфоцитарного и миелоцитарного ростков кроветворения в результате уменьшения зрелых клеток на периферии.

Ключевые слова: золотые наночастицы, периферическая кровь, красный костный мозг.

The Changes of Morphological Indicators of Bone Marrow and Peripheral Blood at Long Exposure of Gold Nanoparticles

S. S. Firsova, A. B. Bucharskaya, G. N. Maslyakova, O. V. Zlobina, O. V. Matveeva, I. O. Bugaeva, N. G. Khlebtsov, B. N. Khlebtsov, V. A. Bogatyrev

The exposure of gold nanoparticles with different size on the morphological indicators of red bone marrow and peripheral blood of white not purebred rats at long peroral introduction were studied in experiment. The mutagen influence of gold nanoparticles on



polychromatophilous erythrocytes of bone marrow were estimated by micronuclear test. During research the reduction of quantity of leukocytes in peripheral blood and the erythrocyte volume reduction with increase of their hemoglobin saturation were revealed. The changes reflecting the mutagen activity of gold nanoparticles were not revealed at carrying out micronuclear test. The changes of morphological indicators of bone marrow testify about stimulation processes occurring in a marrow lymphocytic and myelocytic sprouts of hemopoiesis as a result of reduction of mature cells in peripheral blood.

Key words: gold nanoparticles, peripheral blood, red bone marrow.

Введение

В последние годы золотые наночастицы (ЗНЧ) начинают активно использоваться в различных областях наномедицины в диагностических и терапевтических целях [1–3]. В частности, ЗНЧ применяют в качестве носителей для доставки лекарственных препаратов, генетического материала или как диагностическое средство при терапии опухолей. В настоящее время уже два лекарственных препарата с внутривенным способом введения – AurImmune™ и AuroLase™ – прошли клиническую апробацию [4].

Практически одновременно с началом применения ЗНЧ в медицине стали актуальными вопросы по изучению их биораспределения, элиминации и токсического воздействия как на уровне целого организма, так и на уровне цити и генотоксичности. Несмотря на достаточное количество публикаций, единого мнения относительно токсичности ЗНЧ пока не существует. Связано это с разными сроками проведения и условиями постановки экспериментов, применением разного размера и форм наночастиц и т.п. Большая часть опубликованных работ посвящена исследованию токсичности ЗНЧ в условиях *in vitro* с использованием клеточных культур. Для оценки токсичности ЗНЧ используется МТТ-тест, основанный на способности клеточных ферментов восстанавливать нитротетразолевым синим до формазана в зависимости от дыхательной активности клеток. Например, S. Wang с соавторами [4] применяли МТТ-тест для оценки токсичности ЗНЧ диаметром 5, 12, 20, 30, 50 и 70 нм и золотых наностержней с осевым отношением от 2.1 до 3.5.

К настоящему времени установлено, что действие наноматериалов зависит от нескольких параметров, критическими из которых являются форма и размер частиц, доза и способы введения и т. д. [6–9]. Однако мы не встретили в литературе работ, посвященных воздействию золотых наночастиц на показатели периферической крови и гемопоэза.

Целью работы явилось изучение воздействия ЗНЧ разного размера на гемопоэз и показатели периферической крови и оценка их мутагенного действия на полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) костного мозга белых беспородных крыс с помощью микроядерного теста.

Материалы и методы

В эксперименте использовали ЗНЧ, синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН (г. Саратов): частицы коллоидного золота диаметром 1–3, 15 и 50 нм с концентрацией золота 57 мкг/мл. Средний размер ЗНЧ определяли по электронно-микроскопическим изображениям на микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Наночастицы коллоидного золота размером 15 и 50 нм синтезировали цитратным методом Фрэнса путем восстановления золотохлористоводородной кислоты (HAuCl_4 , Sigma-Aldrich, USA) цитратом натрия. Наиболее мелкие частицы размером 1–3 нм получали по специальным методикам, описанным в монографии [3]. Кратко: к 48.75 мл деионизованной воды добавляли 0.5 мл 1%-ного раствора ЗХВК и 0.75 мл 0.2 М раствора поташа. Воду доводили до кипения и добавляли 0.3 мл 1 М раствора NaSCN , кипятили ещё 10 мин. К каждому препарату КЗ добавляли по 1 мл 1%-ного водного раствора полиэтиленгликоля ($M_n = 20\ 000$) и 0.5 мл 0.2 М раствора K_2CO_3 .

Для увеличения биодоступности и биосовместимости наночастицы размером 15 и 50 нм были конъюгированы с полиэтиленгликолем PEG-SH (Nektar, USA). Протокол конъюгирования состоял в следующем. К 50 мл суспензии наночастиц добавляли 45 мкл 0.2 М K_2CO_3 и 500 мкл 5 мМ метилполиэтиленгликольтиола. В результате ковалентного связывания тио-групп с поверхностью золотой частицы образуется конъюгат. Время реакции составляет примерно 10 ч. Полученные конъюгаты отмывали от избытка продуктов реакции двукратным центрифугированием и ресуспендированием в 0.9%-ном растворе хлорида натрия.

Эксперимент был проведен на 24 белых беспородных крысах мужского пола массой 180–220 г. Все лабораторные животные в ходе эксперимента содержались в обычных условиях вивария с использованием стандартного пищевого рациона. Все животные при проведении эксперимента находились в одинаковых условиях. Для устранения влияния сезонной циркадной зависимости эксперименты проводились в осенне-зимний период во второй половине дня.



Опыты проводились в отдельной лаборатории при постоянной температуре со стандартным уровнем освещения, исключающим посторонние раздражители. Эксперименты на животных проводились в соответствии с Женевской конвенцией «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990 г.).

Исследование проведено двумя сериями экспериментов на 4 группах животных, в каждой группе по 6 особей. Первая группа – контрольная, остальные группы – опытные. Крысам опытных групп в течение 15 дней ЗНЧ вводили перорально через день из расчета 190 мкг/кг массы животного по следующей схеме: 1-я опытная группа – диаметр ЗНЧ 1–3 нм, 2-я опытная группа – диаметр ЗНЧ 15 нм, 3-я опытная группа – диаметр 50 нм. Крысам контрольной группы вводили через день перорально по 1 мл физиологического раствора. Забор материала осуществляли через 24 ч после последнего введения.

Забор костного мозга проводили по стандартной методике из бедренной кости. Для морфологического исследования мазки окрашивали по Май–Грюнвальду. Морфологический анализ мазков осуществляли под большим увеличением ($\times 1000$) с дифференцированным подсчетом на 200 клетках. Мазки костного мозга для исследования с помощью микроядерного теста окрашивали 5%-ным красителем Гимза, затем докрасивали в неразведенном красителе Май–Грюнвальда. Подсчет микроядер проводили на 1000 ПХЭ. Забор крови осуществляли после декапитации в специальные пробирки для гематологии с наполнителями. Все используемые пробирки были покрыты ЭДТА. Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Micros-60 ABX. Статистическую обработку проводили при использовании программы «SPSS for Windows 13.0».

Результаты и их обсуждение

В проведенном исследовании были выявлены следующие изменения показателей периферической крови при воздействии ЗНЧ. В группе крыс, получавших перорально ЗНЧ размером 1–3 нм, отмечалось достоверное уменьшение среднего объема эритроцитов и увеличение насыщаемости их гемоглобином по сравнению с группой контроля.

В группе крыс, получавших ЗНЧ размером 15 нм, отмечалось уменьшение количества лейкоцитов (в большей степени лимфоцитов), уменьшение среднего объема эритроцитов и увеличение их насыщения гемоглобином по сравнению с контрольной группой.

В группе крыс, получавших ЗНЧ размером 50 нм, было выявлено уменьшение количества всех видов лейкоцитов (лимфоциты, моноциты, и в особенности гранулоциты), уменьшение среднего объема эритроцитов по сравнению с группой контроля.

В результате проведенного статистического анализа с использованием непараметрического метода Уилкоксона были выявлены достоверные различия между морфологическими показателями красного костного мозга в следующих группах. В группе крыс, получавших ЗНЧ размером 15 и 50 нм, отмечалось снижение количества метамиелоцитов и палочкоядерных лейкоцитов, более выраженное при воздействии ЗНЧ размером 50 нм, что свидетельствует о раздражении лейкоцитарного ростка кроветворения под влиянием наночастиц данного размера. В группе крыс, получавших ЗНЧ размером 50 нм, отмечалось, кроме того, увеличение количества базофильных нормоцитов и полихроматофильных нормоцитов по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о раздражении эритроцитарного ростка кроветворения.

При проведении микроядерного теста в костном мозге крыс, получавших ЗНЧ размером 1–3 и 15 нм, частота встречаемости клеток, содержащих два и более микроядрышек, незначительно повышалась по сравнению с контрольной группой. Достоверные различия с контрольной группой не были получены ни в одной из опытных групп крыс, что свидетельствует об отсутствии мутагенной активности исследованных ЗНЧ при данном способе введения.

Наши результаты согласуются с экспериментами по исследованию размерной зависимости биораспределения ЗНЧ после внутривенного введения животным [10]. В ранее проведенном нами исследовании [11] была установлена размерная зависимость морфологических изменений во внутренних органах крыс при внутривенном введении ЗНЧ.

Результаты нашего исследования согласуются с результатами эксперимента J. F. Hillyert и R. M. Albrecht [12], в котором исследовалось биораспределение ЗНЧ диаметром 4, 10, 28 и 58 нм после введения мышам в качестве питья в течение 7 дней в виде суспензии с концентрацией ЗНЧ 200 мкг/мл. Было обнаружено, что ЗНЧ диаметром 4 нм могут проникать через пищеварительный тракт и перераспределяться по внутренним органам в значительных количествах. При увеличении размера ЗНЧ проницаемость



пищеварительного тракта заметно снижалась. Так, например, частицы диаметром 10 нм были найдены в небольших количествах только в селезенке. Именно этим можно объяснить отсутствие мутагенного эффекта ЗНЧ в условиях нашего эксперимента (пероральное введение в дозе 0.19 мг/кг животного). Обнаружение заметного токсического эффекта в работах [13,14] связано, скорее всего, с существенно большими дозами (от 0.8 до 8 мг/кг по сравнению с нашими 0.19 мг/кг) при пероральном введении. Полученные результаты по изменению морфологических показателей костного мозга согласуются с результатами наших предыдущих исследований о размерной зависимости морфологических изменений во внутренних органах крыс при внутривенном введении ЗНЧ [11]. Более выраженные изменения отмечались в лимфоцитарном и миелоцитарном ростках кроветворения при воздействии ЗНЧ диаметром 15 и 50 нм.

Выводы

Таким образом, при длительном пероральном введении ЗНЧ были выявлены изменения показателей периферической крови, выражающиеся в уменьшении количества лейкоцитов (нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов), причем данные изменения имели размер-зависимый характер. Независимо от размера ЗНЧ отмечалось уменьшение объема эритроцитов и увеличение насыщения их гемоглобином. При проведении микроядрышкового теста изменений, свидетельствующих о мутагенной активности ЗНЧ, не было выявлено. Изменения морфологических показателей костного мозга, вероятно, отражают происходящие в костном мозге при длительном пероральном введении ЗНЧ процессы стимуляции лимфоцитарного и миелоцитарного ростков кроветворения в результате уменьшения зрелых клеток на периферии.

Список литературы

1. Jain K. K., Totowa N. J. A Handbook of Nanomedicine. Humana : Springer, 2008. 251 p.
2. Boisselier E., Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity // Chem. Rev. 2009. Vol. 38. P. 1759–1782.
3. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы : синтез, свойства, биомедицинское применение. М. : Наука, 2008. 319 с.
4. Wang S., Lu W., Tovmachenko O., Rai U. S., Yu H., Ray P. C. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes // Chem. Phys. Lett. 2008. Vol. 463. P. 145–149.
5. 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. Vol. 40. P. 1647–1671.
6. Хлебцов Н. Г., Дыкман Л. А. Биораспределение и токсичность золотых наночастиц // Российские нанотехнологии. 2011. Т. 6, № 1–2. С. 1–21.
7. Yen H.-J., Hsu S.-h., Tsai Ch.-L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes // Small. 2009. Vol. 5. P. 1553–1561.
8. Alkilany A. M., Murphy C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? // J. Nanopart. Res. 2010. Vol. 12. P. 2313–2333.
9. Witt K. L., Livanos E., Kissling G. E., Torous D. K., Casparly W., Tice R. R., Recio L. Comparison of flow cytometry- and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals // Mutation research. 2008. Vol. 649. P. 101–13.
10. De Jong W. H., Hagens W. I., Krystek P., Burger M. C., Sips A. J., Geertsma R. E. Particle size dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration // Biomaterials. 2008. Vol. 29. P. 1912–1919.
11. Terentyuk G. S., Maslyakova G. N., Suleymanova L. V., Khlebtsov B. N., Kogan B. Ya., Akchurin G. G., Shantrocha A. V., Maksimova I. L., Khlebtsov N. G., Tutchin V. V. Circulation and distribution of gold nanoparticles and induced alterations of tissue morphology at intravenous particle delivery // J. Biophoton. 2009. Vol. 2. P. 292–302.
12. Hillyer J. F., Albrecht R. M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles // J. Pharm. Sci. 2001. Vol. 90. P. 1927–1936.
13. Chen Y.-S., Hung Y.-C., Liao I., Huang G. S. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles // Nanoscale Res. Lett. 2009. Vol. 4. P. 858–864.
14. Cho W.-S., Cho M., Jeong J., Choi M., Cho H.-Y., Han B. S., Kim S. H., Kim H. O., Lim Y. T., Chung B. H., Jeong J. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. Vol. 236. P. 16–24.